



**HAL**  
open science

# Étude du rôle des sites de contact membranaires médiés par VAPA dans la migration cellulaire collective

Hugo Siegfried

► **To cite this version:**

Hugo Siegfried. Étude du rôle des sites de contact membranaires médiés par VAPA dans la migration cellulaire collective. Génétique. Université Paris Cité, 2022. Français. NNT : 2022UNIP5210 . tel-04677866

**HAL Id: tel-04677866**

**<https://theses.hal.science/tel-04677866v1>**

Submitted on 26 Aug 2024

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

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



Université  
Paris Cité



Université Paris Cité

Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (ED562)

**Laboratoire Institut Jacques Monod (UMR7592)**

**Equipe Dynamique des membranes et trafic intracellulaire**

# Etude du rôle des sites de contact membranaires médiés par VAPA dans la migration cellulaire collective

Par Hugo SIEGFRIED

Thèse de doctorat de Génétique

Dirigée par Jean-Marc Verbavatz

Présentée et soutenue publiquement le 23 Novembre 2022

Devant un jury composé de :

**Jean-Marc VERBAVATZ**, Professeur des Universités, Université Paris Cité, Directeur de thèse

**Florence NIEDERGANG**, Directeur de Recherche, Université Paris Cité, Présidente de Jury

**Fabien ALPY**, Directeur de Recherche, Université de Strasbourg, Rapporteur

**Carine ROSSE**, Chargée de Recherche HDR, Sorbonne Université, Rapporteur

**Alenka COPIC**, Chargée de Recherche HDR, Université de Montpellier, Examinatrice

**Mélina HEUZE**, Chargée de Recherche, Université Paris Cité, Membre Invité du Jury

## **Titre : Etude du rôle des sites de contact membranaires médiés par VAPA dans la migration cellulaire collective**

**Résumé :** La migration cellulaire collective est impliquée dans de nombreux processus physiopathologiques, dont le cancer. Il est maintenant clairement établi que la capacité des cellules épithéliales cancéreuses à migrer en groupe participe activement aux processus métastatiques dans différents types de cancer d'origine épithéliale. L'objectif de ma thèse est de comprendre l'implication de la protéine VAPA (VAMP-Associated-Protein A) dans la migration collective des cellules cancéreuses. VAPA régule la formation des sites de contact membranaires (SCM) qui sont des appositions de deux membranes, distantes de 10 à 30nm, impliquant généralement la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et celle d'un autre organelle. Les SCM régulent les échanges de lipides et de calcium. Nous avons émis l'hypothèse que VAPA, à travers la régulation de l'assemblage des SCM entre le RE et la MP, pourrait influencer le transfert de phosphoinositides et par conséquent la migration. Les résultats que j'ai obtenus montrent que VAPA est un acteur essentiel de la motilité des cellules cancéreuses, en la régulant à différents niveaux. Les cellules Caco2, d'adénocarcinome colorectal, déplétées pour VAPA (VAPA KO), montrent des défauts importants de migration collective et individuelle. L'organisation du cytosquelette d'actine, les adhésions focales et la dynamique de protrusions à l'avant des cellules VAPA KO sont affectés. Malgré la présence toujours importante de sites de contact membranaires dans ces cellules, j'observe un turnover des phosphoinositides beaucoup moins important à la membrane plasmique à l'avant des cellules, corrélé à une activité protrusive plus stable. En conclusion, cette étude fait émerger le rôle des SCM dans la migration cellulaire.

**Mots clefs :** Migration cellulaire, adhésions focales, SCM, phospholipides, VAPA

### **Title: The Role of VAPA mediated membrane contact sites in collective cell migration**

**Abstract :** Collective cell migration is a physiopathological process crucial during development, wound healing and cancer. It has been well established that collective migration of epithelial cancer cells participates actively in metastatic processes. The objectives of my PhD is to understand the role of the protein VAPA (VAMP-Associated-Protein A) in the regulation of the collective cancer cell migration. VAPA regulates the formation of Membrane Contact Sites (MCS) defined as close appositions of 10 to 30 nm involving the membrane of the endoplasmic reticulum (ER) and the membrane of another organelle. MCS regulate lipid and calcium exchanges in cells. By regulating MCS assembly, we hypothesised that VAPA could regulate lipids exchanges and thereby collective cell migration. My PhD work showed that VAPA is a crucial actor of cancer cell motility. CaCo2 cells, from human colorectal adenocarcinoma, depleted for VAPA (VAPA KO) exhibited several collective and individual migration defaults. Actin cytoskeleton organisation, focal adhesions and protrusions dynamics in VAPA KO cells were perturbed. Despite the presence of numerous MCS in absence of VAPA, I observed defaults of phosphoinositides distributions

at the plasma membrane correlating with more stable protrusive activity. To conclude, this study is demonstrating for the first time the implication of MCS in regulating cell migration.

**Keywords: Cell migration, Focal Adhesions, Membrane Contact Sites, phospholipids, VAPA**

*Je dédie ce manuscrit à ma mère, Claudine Couchi*

## Sommaire

<b>Table des illustrations .....</b>	<b>6</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>7</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>8</b>
I. La dynamique des Adhésions Cellule-Matrice au cours de la migration.....	8
II. Les phosphoinositides et la migration cellulaire .....	40
III. Les Sites de Contacts Membranaires et la migration cellulaire .....	57
<b>Objectif de ma thèse .....</b>	<b>77</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>79</b>
<b>Discussion et perspectives .....</b>	<b>120</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>140</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>163</b>

## Table des illustrations

Figure 1 : Migration mésenchymateuse.....	12
Figure 2. Cellules guides et suiveuses .....	13
Figure 3. Régulation de l'activité des RhoGTPases.....	15
Figure 4. Rôle des GTPase dans la dynamique de l'actine. ....	17
Figure 5. Adhésions Cellule-matrice observées au TIRF.....	20
Figure 6. Activation des intégrines .....	23
Figure 7. Activation de la taline par le PI(4,5)P2 selon le modèle « pull and push ». ....	26
Figure 8. Dynamique des ACM au cours de la migration. A Regroupement des intégrines .....	27
Figure 9. Rôle des RhoGTPases dans la dynamique des ACM. Initiation .....	32
Figure 10. Le nocodazole et le désassemblage des ACM .....	34
Figure 11. Structure des PPI et insertion dans une bicouche lipidique.....	41
Figure 12. Le cycle de synthèse du PI. ....	42
Figure 13. Identité membranaire et Synthèse des PPI. ....	44
Figure 14. Le PI(4,5)P2 régule la dynamique de l'actine. ....	48
Figure 15. Rôle du PIP2 dans l'internalisation des intégrines .....	53
Figure 16. Récapitulatif des rôles du PI(4,5)P2 et PI(3,4,5)P3 dans la migration .....	54
Figure 17. Schéma de la structure du RE et SCM .....	58
Figure 18. Le cycle du PI aux SCM .....	61
Figure 19. Structure des protéines VAPs et localisation aux SCM .....	63
Figure 20. Liste exhaustive des partenaires de VAPA et VAPB. ....	65
Figure 21. Exemples d'organisation de PTLs possédant un domaine FFAT.....	67
Figure 22. Transfert monomérique de lipide entre membranes. ....	68
Figure 23. Les protéines VAPs et le transfert de lipides à travers la cellule.....	71
Figure 24. GFP MAPPER, senseur des SCM RE-MP.....	76
Figure 25. Récapitulatif des résultats.....	121
Figure 26. A. Structure de la sonde optogénétique LiMETER .....	126
Figure 27. Activation de la sonde LiMETER dans les cellules CaCo-2.....	127
Figure 28. Le GFP ORP3 est localisé dans des structures ponctiformes associées au RE.....	133
Figure 29. Modèle du rôle des SCM RE-MP médiés par VAPA dans la migration.....	138

## Liste des abréviations

<b>ACM</b>	Adhésions cellule-matrice
<b>AP</b>	Acide phosphatidique
<b>Arp</b>	Actin Related Protein
<b>CLM</b>	Chaîne légère de la Myosine
<b>DAG</b>	Diacylglycérol
<b>ERM</b>	Ezrin/Radixin/Meosin
<b>FAK</b>	Focal adhesion kinase
<b>FERM</b>	Four-point-one protein/Ezrin/Radixin/Meosin
<b>FFAT</b>	Two phenylalanines in an acidic tract
<b>FRET</b>	Förster Resonance Energy Transfert
<b>GAP</b>	GTPase-activating proteins
<b>GDI</b>	Guanine nucleotide dissociation inhibitors
<b>GEF</b>	Guanine nucleotide Exchange Factors
<b>MEC</b>	Matrice Extracellulaire
<b>MMP</b>	Métalloprotéinase
<b>MOSPD1/2/3</b>	Motile Sperm Domain Containing 1/2/3
<b>MP</b>	Membrane Plasmique
<b>MSP</b>	Major-Sperm Protein
<b>OSBP</b>	Oxysterol Binding Protein
<b>ORP3</b>	Oxysterol-binding protein related 3
<b>PH</b>	Pleckstrin homology
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PI</b>	Phosphatidylinositol
<b>PPI</b>	Phosphoinositides
<b>PI4P</b>	Phosphatidylinositol 4-phosphate
<b>PI(4,5)P2</b>	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
<b>PI(3,4)P2</b>	Phosphatidylinositol 3,4-biphosphate
<b>PI(3,4,5)P3</b>	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
<b>PTEN</b>	Phosphatase and tensin homolog
<b>PTL</b>	Protéines de Transfert de Lipides
<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
<b>ROCK</b>	Rho-associated protein kinase
<b>SCM</b>	Site de contact membranaire
<b>SM</b>	sphingomyéline
<b>STIM1</b>	Stromal interaction molecule 1
<b>MET</b>	Microscopie électronique à transmission
<b>TIRF</b>	Total Internal Reflection Fluorescence
<b>VAPA/B</b>	VAMP associated protein A/B
<b>VASP</b>	Vasodilator-Stimulated phosphoprotein
<b>WASP</b>	Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
<b>WASH</b>	Wiskott-Aldrich Syndrom protein and Scar Homologue

# Introduction

## **I. La dynamique des Adhésions Cellule-Matrice au cours de la migration**

### **1. Définition de la migration cellulaire**

#### 1.1 Rôles physiologiques et pathologiques de la migration cellulaire

La migration ou motilité cellulaire se définit comme étant le déplacement d'une cellule ou d'un groupe de cellules dans son environnement au cours du temps. La migration cellulaire est un processus dont les structures et les mécanismes moléculaires la régulant sont complexes. Ce phénomène se met en place en réponse à des signaux chimiques et/ou mécaniques extérieurs, qui vont activer des voies de signalisation spécifiques (Mierke, 2020, Mak et al., 2016). L'importance physiologique de la motilité cellulaire s'établit à différents niveaux. Par exemple, aux stades précoces du développement embryonnaire (morphogénèse), les cellules s'organisent spatialement les unes par rapport aux autres pour former les feuillets embryonnaires qui établiront par la suite les tissus et les organes (Aman and Piotrowski, 2010, Friedl and Gilmour, 2009). Il peut s'agir des cellules de la crête neurale ou des PGCs (primordial germ cell) chez le poisson zèbre. Le cas d'une plaie ouverte, où les cellules connectives migrent pour réparer et refermer le tissu endommagé est une autre illustration de l'importance de ces capacités migratoires (Friedl and Gilmour, 2009). La motilité cellulaire joue aussi un rôle crucial lors de la réponse immunitaire, lorsque par exemple les neutrophiles ou les macrophages se déplacent rapidement sur les lieux d'infections pour lutter contre des agents pathogènes (Pizzagalli et al., 2021). Il est intéressant de noter que la migration cellulaire peut aussi être associée à des pathologies. En effet, certaines cellules cancéreuses accumulent des mutations génétiques qui peuvent perturber la régulation de la migration. Ces cellules peuvent métastaser à travers un organisme et envahir plusieurs tissus. Cette capacité à migrer de manière anormale est associée à l'agressivité du cancer. Des syndromes inflammatoires ou une immunodépression peuvent aussi être engendrés par des perturbations de la migration cellulaire (Worbs et al., 2017) .

## 1.2 Les différents types de migration

Plusieurs types de migration ont été décrits et classifiés selon un certain nombre de paramètres moléculaires et morphologiques. Cette classification comprend la manière dont le cytosquelette s'organise, la polarité de la cellule, la présence d'adhésions cellules-matrice, les forces appliquées sur le substrat, ainsi que les diverses modifications du tissu dans lequel les cellules se déplacent (Friedl and Wolf, 2010). On distingue deux grandes catégories de migration : i) La migration cellulaire isolée et ii) la migration cellulaire collective. Ces deux types de migration ont la capacité d'évoluer en 2D et en 3D en fonction de l'environnement et des signaux perçus.

### *1.2.1 La migration isolée amiboïde et mésenchymateuse*

La migration cellulaire isolée se caractérise par le déplacement d'une cellule individuelle dans son environnement. On distingue deux principaux types de migration isolée, la migration mésenchymateuse et la migration amiboïde. Ces deux modes de migration ne sont pas strictement prédéfinis pour un type cellulaire. En effet, la plasticité cellulaire intrinsèque permet à une même cellule de fluctuer d'un type de migration à l'autre (Friedl and Wolf, 2010; Panková et al., 2010). Au cours de ces deux types de migration, le cytosquelette d'actine joue un rôle central. Il s'organise dans l'espace et dans le temps pour générer des forces qui permettront à la cellule de se déplacer.

#### **Migration amiboïde**

La migration amiboïde a été particulièrement bien caractérisée chez *Dictyostelium discoideum*, et de nombreuses cellules sont capables d'adopter ce type de migration comme les lymphocytes, les neutrophiles, et certaines cellules cancéreuses. La migration amiboïde est définie principalement comme le mouvement rapide de cellules arrondies ou ellipsoïdales qui ne présentent pas (ou peu) d'adhésions avec la matrice extracellulaire (Fackler and Grosse, 2008; Lämmermann and Sixt, 2009). Ce type de migration se caractérise également par l'absence de dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire dans un environnement en 3D (Fackler and Grosse, 2008). Les cellules de morphologie ronde forment des structures protrusives, indépendamment de la polymérisation de l'actine, que

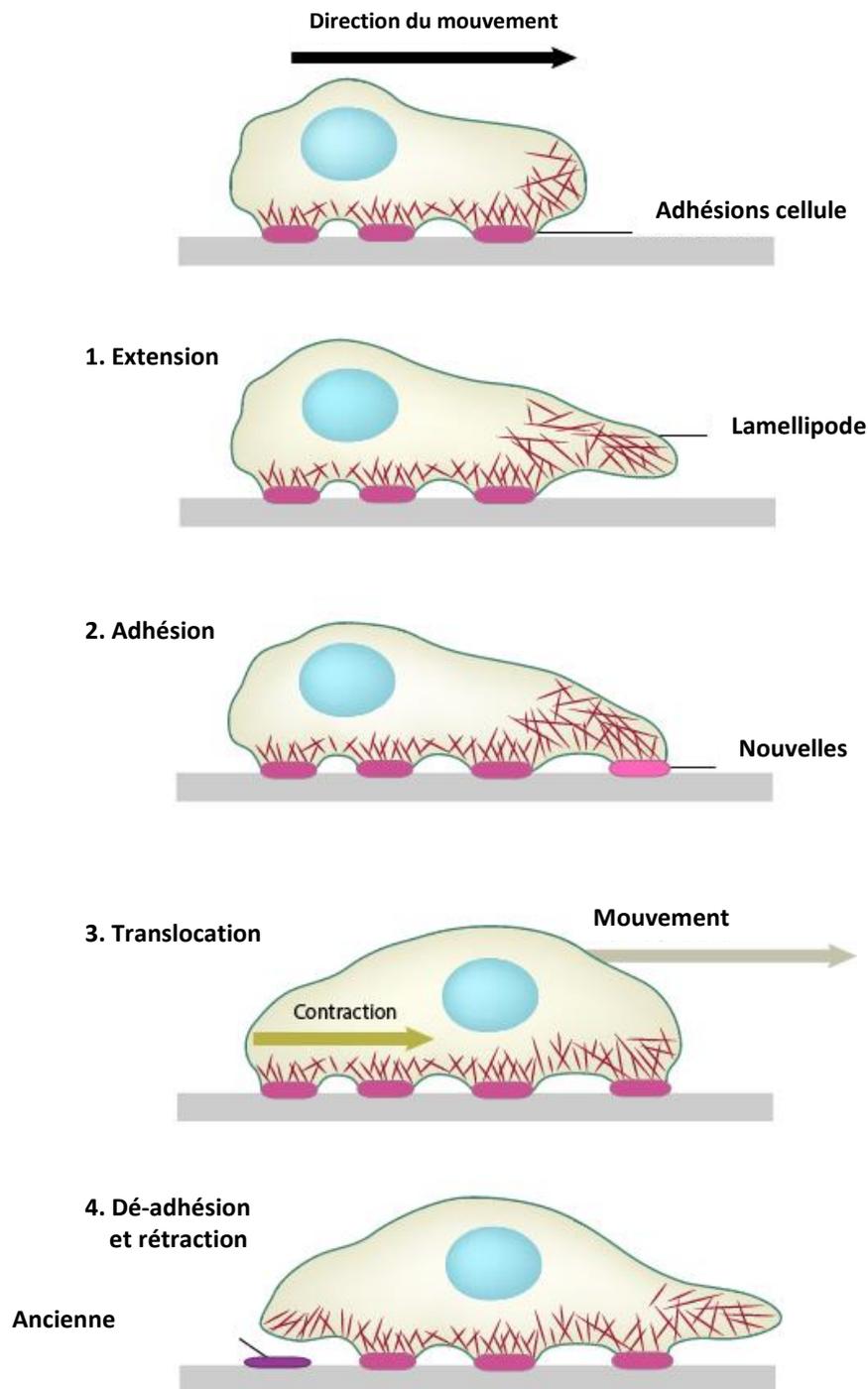
l'on appelle « bleb » (Fackler and Grosse, 2008). Le cortex d'actine se situant sous la membrane plasmique est très contractile. Cette contractilité est à l'origine d'une importante pression hydrostatique exercée sur le cytoplasme (Charras et al., 2005). De manière aléatoire, un détachement local du cortex d'actine de la membrane plasmique ou une rupture du cortex peut avoir lieu. Le cytoplasme sous pression va alors exercer une forte pression sur la membrane plasmique et générer rapidement un bleb de forme arrondie (Charras et al., 2005, Cunningham, 1995). Puis, le cortex d'actine va se refermer au niveau du bleb et sous l'influence de la contractilité de l'actomyosine ce bleb va se rétracter lentement (Charras et al., 2005). La cellule répètera ces cycles de protrusions rapides et de rétractions lentes du bleb et pourra ainsi se déplacer.

### **Migration mésenchymateuse**

La migration mésenchymateuse est caractérisée par la migration de cellules polarisées, de morphologie allongée, qui s'attachent au substrat par l'intermédiaire d'adhésions avec la matrice extracellulaire (Lauffenburger and Horwitz, 1996, Trepap et al., 2012, Le Clainche and Carlier, 2008) (Figure 1). Dans certains cas, généralement lors de la migration 3D, la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) par des métalloprotéases est nécessaire pour que la cellule puisse se mouvoir dans son environnement. Pour avancer, les cellules forment des protrusions qui dépendent de la polymérisation de l'actine (Lauffenburger and Horwitz, 1996, Trepap et al., 2012, Le Clainche and Carlier, 2008). La mise en place de ce type de migration suit différents stades (Figure 1).

-i) La cellule établit une **polarité** asymétrique associée à une différence structurale et moléculaire entre l'avant et l'arrière. A l'avant, la polymérisation de l'actine branchée engendre une force sous la membrane plasmique qui génère des structures protrusives, comme les lamellipodes (Pollard and Borisy, 2003). La formation de protrusions s'accompagne d'une redistribution des récepteurs des signaux chemo-attractant et/ou des intégrines qui se concentrent vers l'avant de la cellule (Sullivan et al., 1984, Lawson and Maxfield, 1995, Schmidt et al., 1993). ii) Au niveau des lamellipodes, le regroupement des intégrines permet la **formation d'adhésions cellule-matrice** qui se lient au cytosquelette d'actine (Izzard and Lochner, 1980, Regen and Horwitz, 1992). Les adhésions naissantes apparaissent comme de petits agrégats instables à l'avant de la cellule, dont la majorité se **désassemble** pour former de nouvelles adhésions. Au fur et à mesure que la cellule migre,

l'autre partie des adhésions naissantes se stabilise, se lie à l'actine et leur taille augmente avec le temps jusqu'à leur désassemblage qui peut avoir lieu à l'avant ou à l'arrière de la cellule (Izzard and Lochner, 1980; Regen and Horwitz, 1992). Ces adhésions servent de points d'ancrages de la cellule à la MEC. **iii)** Elles permettent aussi la transmission de **forces de traction** sur la MEC pour stimuler le déplacement du corps cellulaire dans le sens de migration (Ananthakrishnan and Ehrlicher, 2007). Ces transmissions de forces s'établissent notamment à travers la contractilité de l'actine via le système acto-myosine. **iv)** Enfin, à l'arrière de la cellule la **rétraction du corps cellulaire** est cruciale pour une migration rapide et dirigée. A l'arrière, les intégrines sont internalisées par endocytose et recyclées à l'avant pour participer à la formation de nouvelles adhésions naissantes et commencer un nouveau cycle de protrusion/rétraction



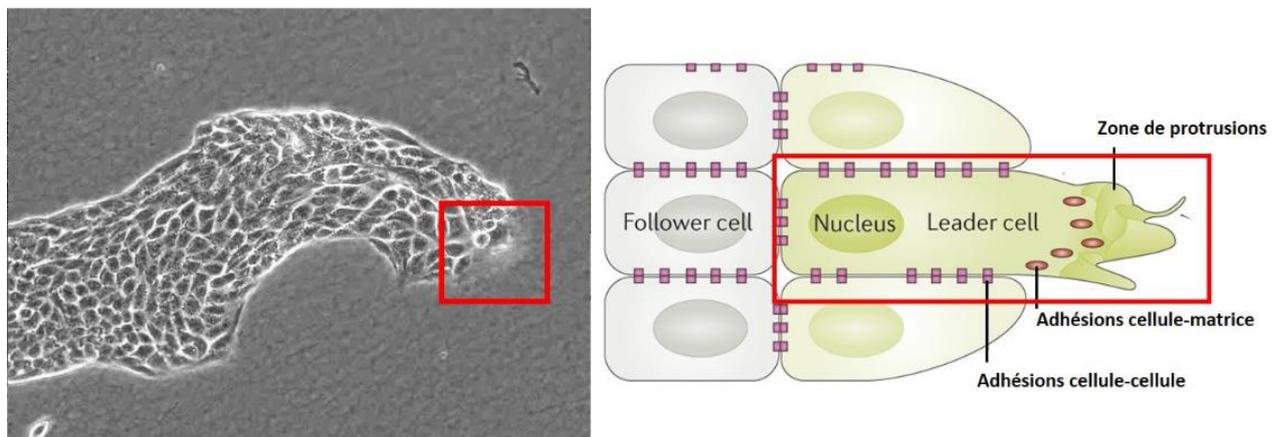
Adapté de MBInfo : What steps are involved in lamellipodia assembly ?

**Figure 1 : Migration mésenchymateuse.** 1. L'extension du lamellipode vers le sens de migration s'effectue grâce à la polymérisation d'actine branchée qui pousse sous la membrane plasmique 2. L'extension du lamellipode s'accompagne de formation d'ACM au bout du lamellipode qui se lie à l'actine. La majorité de ces ACM se désassemble, l'autre partie mature 3. Les contractions de l'actomyosine génèrent des forces de contraction qui s'accompagnent de la rétraction du corps cellulaire et du 4. Désassemblage des ACM.

### 1.2.2 Migration collective

La migration collective est un type de migration au cours duquel plusieurs cellules migrent ensemble de manière cohésive via la stabilisation de jonctions cellule-cellule médiées par les cadhérines (Bach et al., 1998, Li et al., 2012). Au cours de ce type de migration, on distingue deux catégories de cellules. Les cellules « leader » ou guides au front de migration qui se polarisent, établissent des structures protrusives et des adhésions cellule matrice (Figure 2). Ces cellules entraînent les cellules « follower » ou suiveuses à l'arrière. Ce type de migration est observé au cours du développement embryonnaire, de l'angiogenèse ou encore lors de la progression des cellules cancéreuses.

Au cours de ma thèse, je m'intéresse à la migration des cellules guides. Je me focalise sur la dynamique des adhésions cellule-matrice, plus particulièrement sur le désassemblage de ces dernières. Nous verrons comment les adhésions cellules-matrice se forment et se désassemblent au cours de la migration et décrirons brièvement leur fonction dans la migration cellulaire.



adapté de (Yamaguchi et al., 2015) et (Chen et al., 2019)

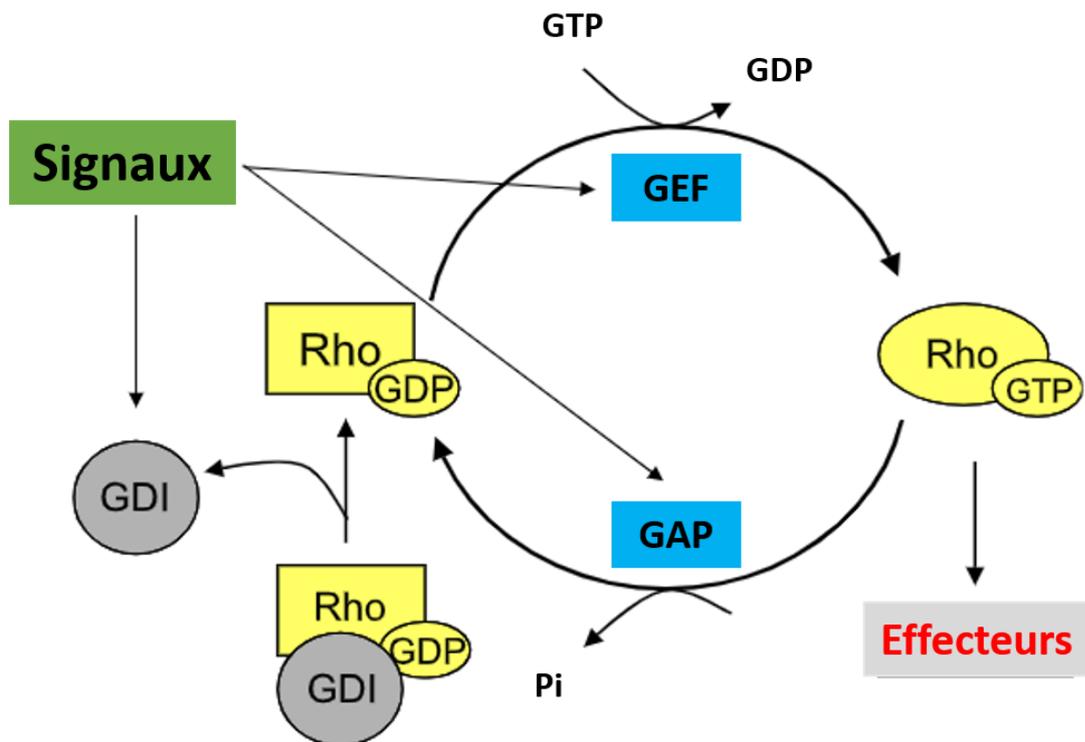
**Figure 2. Cellules guides et suiveuses :** A gauche : migration collective de cellules MDCK, l'encadré rouge montre une cellule Leader (guide), polarisée et étalée.

A droite : Schéma de cellules follower (suiveuses) et leader (guides). L'ensemble du groupe est cohésif, à travers la formation de jonctions cellule-cellule (en mauve). Les cellules leader présentent des zones de protrusions, des ACM (en rouge) et des jonctions cellule-cellule.

### 1.3. Le rôle central des RhoGTPases

La dynamique de l'actine et des ACM est régulée par les formes actives des RhoGTPases, chefs d'orchestres de la migration cellulaire.

Les Rho (Ras homologous) GTPases sont des protéines appartenant à la superfamille des Ras. Les RhoGTPases contiennent au moins 20 membres dont les RhoGTPases Rac1, Cdc42 et RhoA, les plus étudiées. Ce sont des protéines monomériques qui fonctionnent comme des « switches moléculaires », oscillant entre l'état « on » et l'état « off » (Figure 3). A l'état actif « on », les RhoGTPases sont liées à la guanine tri-phosphate (GTP) et peuvent interagir avec des effecteurs. A l'état inactif « off », les RhoGTPases sont liées à la guanine di-phosphate (GDP). Il existe trois types de régulateurs des RhoGTPases : Les activateurs Guanine nucleotide Exchange Factors (GEFs) qui catalysent l'échange du GDP par le GTP ; Les inhibiteurs GTPase-activating proteins (GAPs) qui induisent l'hydrolyse du GTP en GDP; et les Guanine nucleotide dissociation inhibitors (GDIs) qui se lient aux GTPases et les séquestrent dans le cytoplasme sous leur conformation inactive (van Buul et al., 2014, Ota et al., 2015). Au cours de la migration, les différentes RhoGTPases ont des fonctions qui leur sont propres sur la régulation du cytosquelette d'actine et la dynamique des adhésions focales (Figure 4). Ainsi, leur activité est régulée dans le temps et dans l'espace pour assurer ces fonctions particulières (Nobes and Hall, 1995, Nguyen et al., 2018).

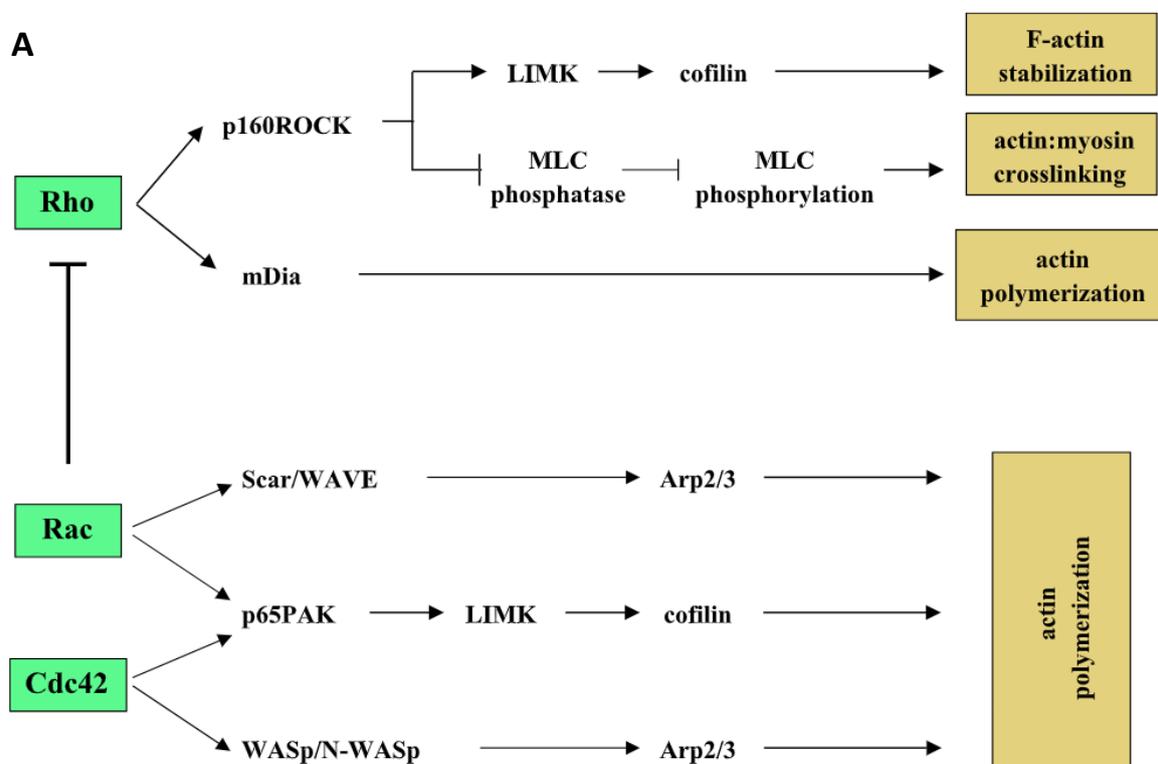


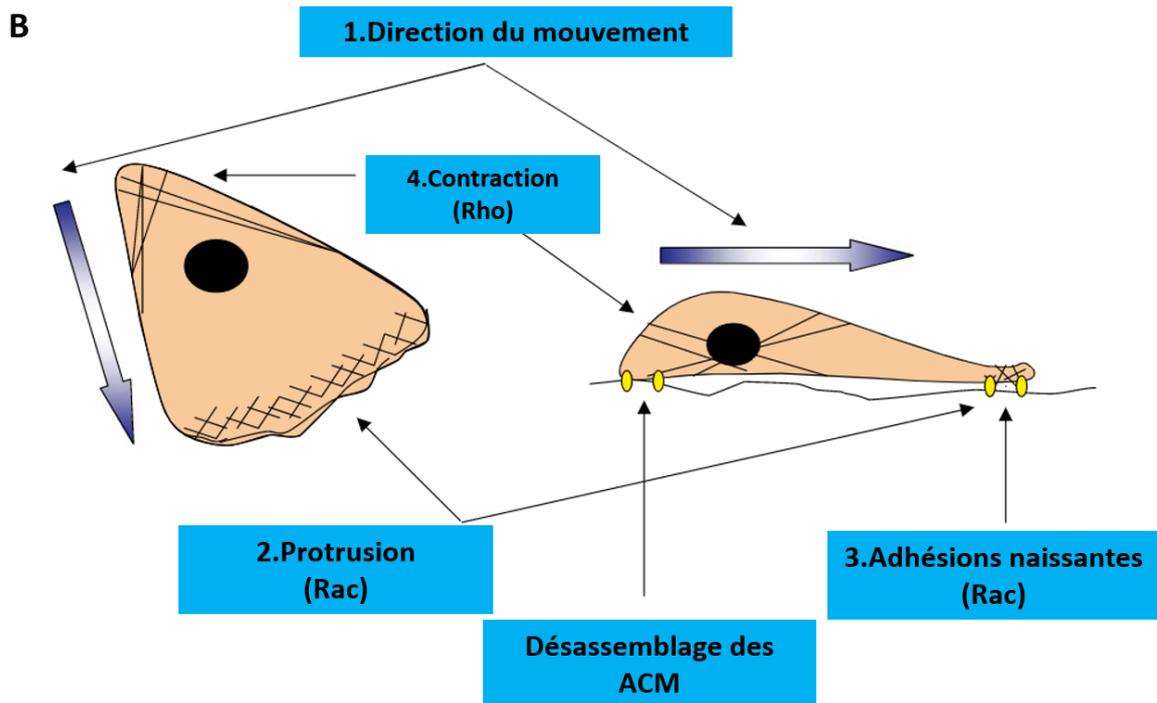
**Figure 3. Régulation de l'activité des RhoGTPases.** Des signaux régulent 1. Des Guanine Exchange Factors (GEF) qui catalysent l'association du GTP avec les RhoGTPases, ce qui leur permet d'adopter une conformation active et de réguler des effecteurs impliqués dans plusieurs processus, comme la migration cellulaire et la dynamique des ACM. 2. Des GAP vont au contraire inactiver les RhoGTPases. 3. Les RhoGTPases peuvent également être séquestrées dans le cytoplasme par des GDI.

Adapté de (Raftopoulou and Hall, 2004)

La GTPase Cdc42 se lie et active N-WASP (Rohatgi et al., 2000) qui induit la polymérisation de l'actine pour générer des filopodes à l'avant de la cellule (Lawson and Ridley, 2018). Aux lamellipodes, la GTPase Rac1 interagit avec le complexe protéique WAVE et/ou N-WASP, qui active le nucléateur d'actine Arp2/3 et favorise la polymérisation d'actine branchée. De plus, Rac et Cdc42 agissent ensemble en stimulant PAK et la kinase LIMK qui inhibe le facteur ADF/Cofiline (Lawson and Ridley, 2018). Proche du lamellipode, au niveau de la lamella, RhoA est activée et régule la polymérisation d'actine filamenteuse à travers la formine mDia1/2 (Gupton et al., 2007). Ces structures d'actine filamenteuse se transforment en fibres de stress

qui subissent des forces dépendantes de la myosine-II et exercent des tensions mécaniques sur les ACM. De plus RhoA régule la rétraction du lamellipode (Königs et al., 2014) de manière myosine-II dépendante. A l'arrière, RhoA est aussi active, et favorise la contractilité de l'actomyosine à travers l'activation de la voie ROCK/phosphatases de la Chaîne Légère de la Myosine (CLM) et stimule la rétraction du corps cellulaire. L'activation de ces RhoGTPases s'effectue par la régulation et le recrutement de leur GEF aux sites de fonctions.





Adapté de (Raftopoulou and Hall, 2004)

**Figure 4. Rôle des GTPase dans la dynamique de l'actine. A.** Cdc42 et Rac régule de manière positive la formation d'actine branché à travers le recrutement des voies Scar/WAVE et WASp/N-WASP qui recrutent et activent le nucléateur d'actine Arp 2/3. Ces deux RhoGTPases participent à la régulation de la dynamique de l'actine à travers l'activation de la cofiline. Rac inhibe RhoA. RhoA régule la polymérisation de l'actine filamenteuse à travers l'activation de mDia et stimule la contractilité actomyosine à travers la voie ROCK. **B** Rac agit à l'avant et RhoA à l'arrière au cours de la migration

## 2. Les adhésions Cellules Matrices (ACM) dans la migration

### 2.1 Dynamique des ACM au cours de la migration

#### 2.1.1 Découverte des adhésions cellules matrice (ACM)

Les adhésions cellules matrice (ACM) sont au cœur des interactions bidirectionnelles entre la cellule et son environnement. A travers la formation et la régulation rapide des ACM, une cellule peut sentir des forces extérieures et des signaux chimiques. En réponse, des protéines de signalisation, comme des kinases ou des phosphatases vont émettre des signaux intracellulaires et réguler un certain nombre de protéines et de gènes. C'est ce que l'on appelle la signalisation « outside-in ». Les ACM ne sont pas seulement des plateformes d'échanges de signaux de l'extérieur de la cellule vers l'intérieur, mais elles transmettent aussi des signaux intracellulaires vers l'extérieur de la cellule. Il s'agit de la signalisation « inside-out » (Brown and Hogg, 1996). Les ACM ont deux fonctions majeures dans la transmission de signaux et informations : elles régulent de nombreuses voies de signalisations comme celles impliquées dans la survie cellulaire, la division, la morphologie et la migration ; et elles génèrent des forces de tractions en reliant le substrat au réseau d'actomyosine. La compréhension de ces mécanismes complexes a nécessité de nombreuses études depuis plusieurs décennies. En 1971, les ACM ont été observées par microscopie électronique et décrites comme des sites d'attaches proche du substrat. Une partie de ces sites est associée à des paquets de microfilaments obliques, qui s'étendent de la partie ventrale jusqu'à la partie dorsale de la cellule. Ces sites, appelés plaques d'adhésions, coïncident avec des régions sombres en IRM (*interference reflection microscopy*), traduisant leur proximité avec le substrat (Abercrombie and Dunn, 1975, Heath and Dunn, 1978). En 1976, Abercrombie, Izzard et Lochner ont utilisé cette technique d'IRM pour mieux caractériser ces contacts (Izzard and Lochner, 1976). Ils ont calculé que leur taille varie entre 2 et 10 microns pour une largeur allant de 0,25 à 0,5 microns. Ils ont défini deux types d'adhésions : les « contacts rapprochés » pour lesquels la membrane plasmique est séparée d'environ 30 nanomètres du substrat et les « contacts focaux » séparés de 10 à 15 nanomètres du substrat. En 1979, Couchman et Rees ont défini les « adhésions focales » comme des structures très organisées, dont la durée de vie est importante et révèlent une structure sombre et dense en IRM (Couchman and Rees, 1979). Ils ont proposé que les adhésions focales, plus sombres en IRM, possèdent plus de protéines recrutées à ce

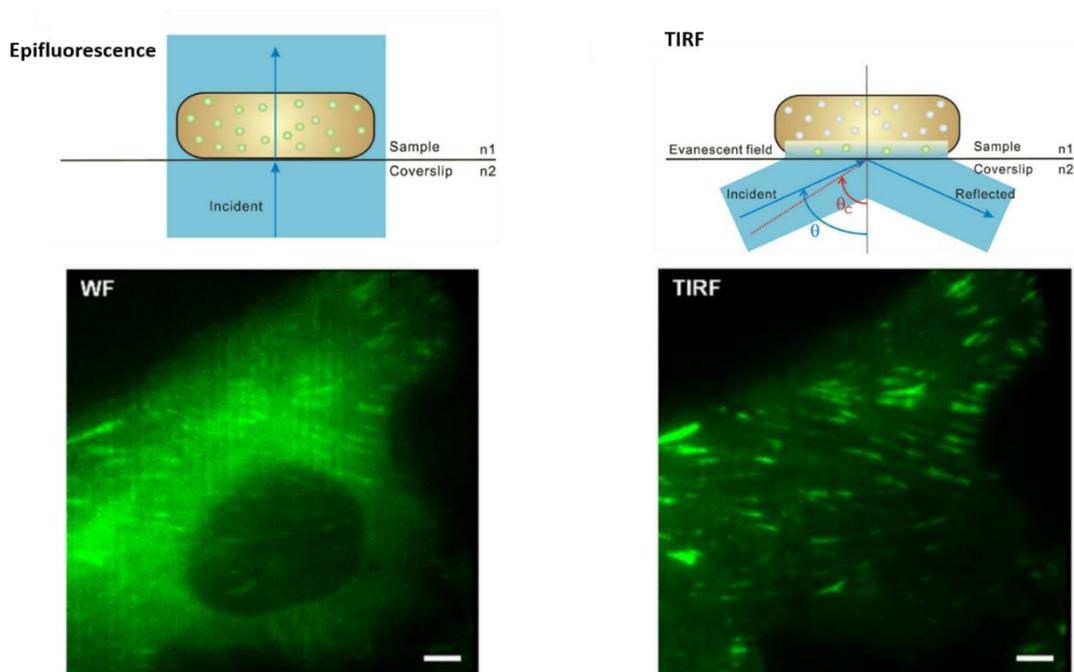
niveau par rapport aux contacts focaux. Cette idée supporte l'hypothèse que plus les adhésions deviennent matures plus des protéines y sont recrutées.

Au fil du temps, le terme « adhésion focale » est devenu commun. Cependant en 1995, le terme « complexe focale » est apparu pour différencier les adhésions qui vont se développer en adhésions focales matures de celles qui restent petites, transitoires et dont la durée de vie est courte (Nobes and Hall, 1995). Ces petites adhésions pour la plupart instables sont aujourd'hui appelées « adhésions naissantes ». Une petite partie va se développer en « complexes focaux » puis en « adhésions focales », plus importantes en taille et plus stables. La caractérisation des protéines constituant les ACM a été rendue possible grâce au développement de l'immunomarquage. Dans les années 1970, les immunomarquages étaient premièrement utilisés pour visualiser le cytosquelette d'actine (Lazarides and Weber, 1974). En 1975, Lazarides et Burridge observent l' $\alpha$ -actinin se répartir de manière périodique le long des fibres de stress mais aussi à leur extrémité, au niveau de 'patches' pouvant correspondre aux plaques d'adhésion (Lazarides and Burridge, 1975). Il a été proposé que l' $\alpha$ -actinin puisse servir d'attache entre l'actine et la membrane plasmique au niveau des ACM. C'est 4 ans après que la découverte de la vinculine a permis de marquer un tournant. L'utilisation d'un anticorps anti-vinculine a révélé pour la première fois par microscopie photonique une protéine qui se concentre uniquement aux ACM (Geiger, 1979). De nombreuses autres protéines recrutées aux ACM ont par la suite été découvertes. Par exemple, il a été démontré rapidement que la taline est une protéine qui interagit avec la vinculine, les intégrines et l'actine (Burridge and Mangeat, 1984, Horwitz et al., 1986).

### *2.1.2 Observation des ACM par TIRF*

Aujourd'hui on dénombre plus de 150 protéines qui composent les ACM et de nombreuses techniques ont été développées pour les étudier. L'utilisation de molécules fluorescentes des ACM permet de les observer en TIRF (Total internal reflection fluorescence) (Figure 5). Cette approche de microscopie photonique permet d'imager des molécules fluorescentes à l'interface cellule-lamelle de verre. Elle utilise un objectif inversé, avec un angle d'ouverture numérique important. La lumière excitatrice passe par cet objectif et atteint la lame de verre avec un grand angle d'incidence. Le faisceau lumineux incident pénètre l'échantillon et excite

les fluorophores dans une zone comprise entre 100 et 200 nanomètres de profondeur. Ainsi le microscope TIRF est adapté à l'étude des ACM et sera utilisé au cours de ma thèse (cf résultats). Dans la prochaine partie, nous allons étudier la dynamique des ACM au cours de la migration. Le terme « ACM » sera employé pour désigner au sens large tous les contacts formés entre la cellule et la matrice extracellulaire.



Adapté (Chiu and Leake, 2011) et(Legerstee and Houtsmuller, 2021)

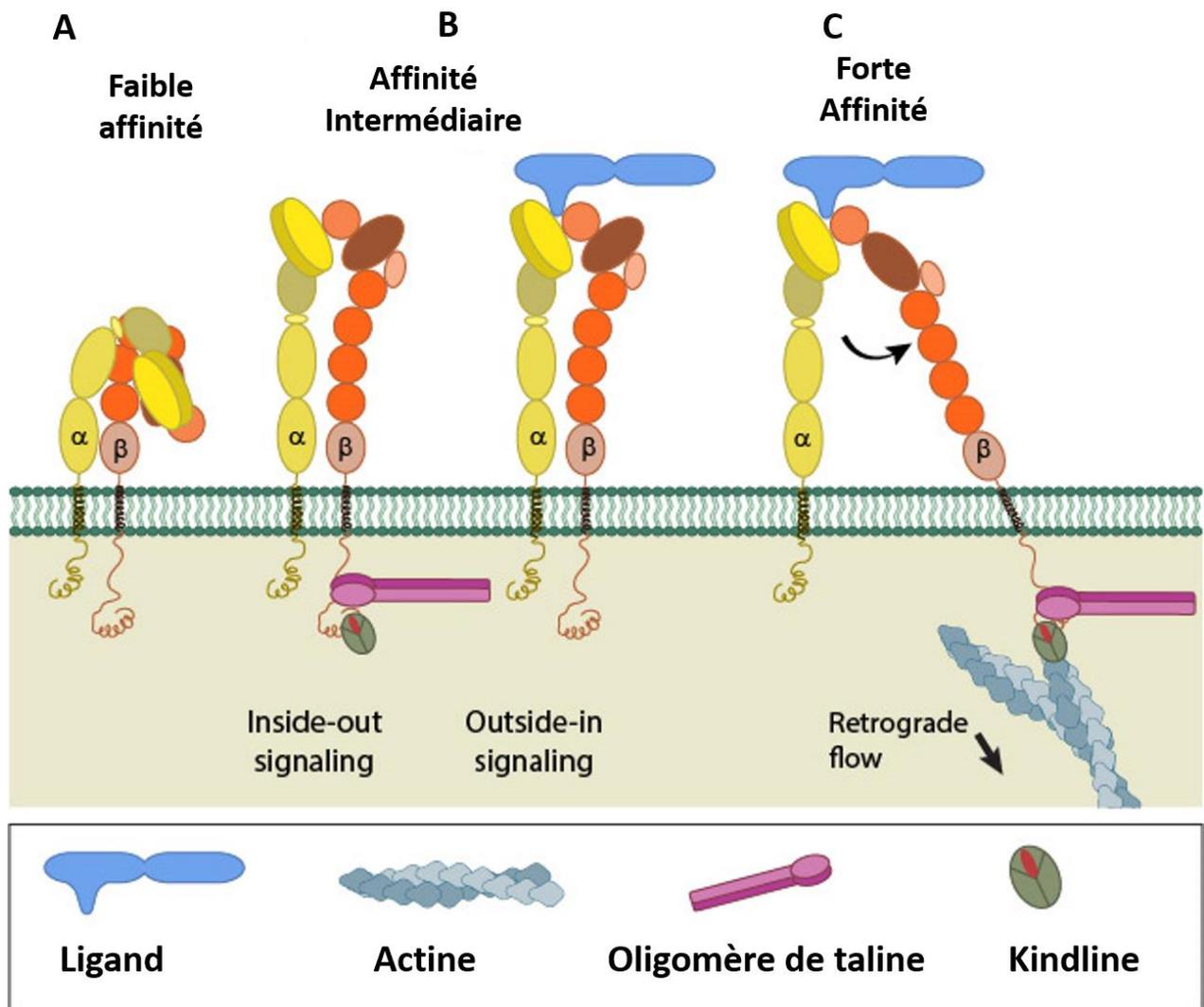
**Figure 5. Adhésions Cellule-matrice observées au TIRF.** En haut : Schéma d'illumination de l'échantillon en épifluorescence (à gauche) par rapport à l'illumination en TIRF (à droite). En épifluorescence, l'illumination est globale alors qu'en TIRF les rayons incidents pénètrent l'échantillon de 100 à 200 nanomètres excitant les fluorophores dans cette fine épaisseur. En bas : Paxilline en vert (marqueur des ACM) imagée en épifluorescence à gauche vs TIRF à droite. L'épifluorescence laisse apparaître le signal non spécifique du cytoplasme alors que le signal en TIRF est plus spécifique des ACM.

## 2.2 Formation et maturation des adhésions focales

### *2.2.1 L'activation des intégrines*

Les intégrines sont importantes pour réguler les adhésions cellules-matrice, la forme de la cellule, la prolifération et la migration cellulaire (van der Flier and Sonnenberg, 2001, Aplin et al., 1999). Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires qui forment des récepteurs reconnaissant des molécules de la MEC. Ce sont des hétérodimères qui sont formés de sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  liées de manière non covalente (Hynes, 2002). Il existe 8 sous unités  $\beta$  et 18 sous unités  $\alpha$  pouvant s'assembler de manière à générer 24 différentes combinaisons d'intégrines (Hynes, 2002). C'est la combinaison des sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  qui confère la spécificité d'interaction avec un ligand. La partie extracellulaire des intégrines, importante en taille, se lie à différents éléments de la MEC, comme le collagène, les laminines ou encore la fibronectine. Les intégrines se lient à des motifs spécifiques sur le ligand, comme par exemple le motif RGD (Arg-Gly-Asp) de la fibronectine. Une fois les intégrines attachées à la MEC, leur court domaine cytoplasmique relie l'actine via le recrutement de protéines adaptatrices du cytosquelette au niveau de la face interne de la membrane plasmique, comme la taline, la vinculine et la paxilline et forme des ACM (Sastry and Burridge, 2000). Les cellules peuvent interagir avec la même molécule de la matrice mais en engageant différentes intégrines, ce qui va affecter la dynamique des ACM et de la migration cellulaire. Les intégrines les plus étudiées sont les intégrines  $\alpha 5 \beta 1$  et  $\alpha \nu \beta 3$  qui reconnaissent la fibronectine et la vitronectine. Il a été montré que la sous unité  $\beta 3$  favorise une migration plus persistante alors que la sous unité  $\beta 1$  est associée à une migration plus aléatoire (Danen et al., 2005). De plus, l'expression de  $\alpha \nu \beta 3$  dans les mélanomes corrèle avec un phénotype d'invasion plus important (Seftor et al., 1992). L'augmentation de l'affinité des intégrines pour leur ligand modifie également le comportement cellulaire lors de la migration. Par exemple, le fait de bloquer l'affinité des intégrines  $\alpha \nu \beta 3$  affecte le profil d'adhésions avec le substrat et altère la migration dirigée des cellules endothéliales (Kiosses et al., 2001). Ainsi, le répertoire des intégrines et leur affinité pour leur ligand est associé à de multiples réponses cellulaires et régulations de voies de signalisations.

L'activation des intégrines et leur maintien dans cet état sont des étapes importantes pour réguler leur fonction au cours de la migration cellulaire. L'activation se fait à travers deux étapes majeures (Figure 6). **i)** Depuis l'extérieur de la cellule via l'association de la partie  $\alpha$  des intégrines avec le ligand et **ii)** depuis l'intérieur de la cellule via l'interaction de la sous unité  $\beta$  des intégrines avec la taline et la kindline (Luo et al., 2007). Ces deux procédés sont couplés, et permettent d'aboutir à l'activation complète des intégrines (Sun et al., 2019). Du point de vue moléculaire, cet état se caractérise par une conformation « étendue et ouverte » du domaine extracellulaire des intégrines, associée à une forte affinité pour le ligand. De plus, l'activation des intégrines se caractérise par la dissociation des deux domaines intracellulaires des sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  (Wang, 2012, Song et al., 2012). A l'état inactivé, les hétérodimères d'intégrines sont courbés et présentent peu d'affinité avec leur ligand. Les domaines intracellulaires des sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  sont rapprochés. Cette conformation dite « courbée-fermée » est thermodynamiquement favorisée car elle possède une faible énergie libre (Li et al., 2017, Li and Springer, 2017). Dans le modèle canonique d'activation « inside-out » des intégrines, les protéines adaptatrices taline et kindline sont connues pour être indispensables à l'activation des intégrines. La taline, en s'homodimérisant, génère des changements de conformation des intégrines et ainsi permet leur transition vers l'état activé. Ce qui permet la liaison du ligand avec une forte affinité (Anthis and Campbell, 2011).



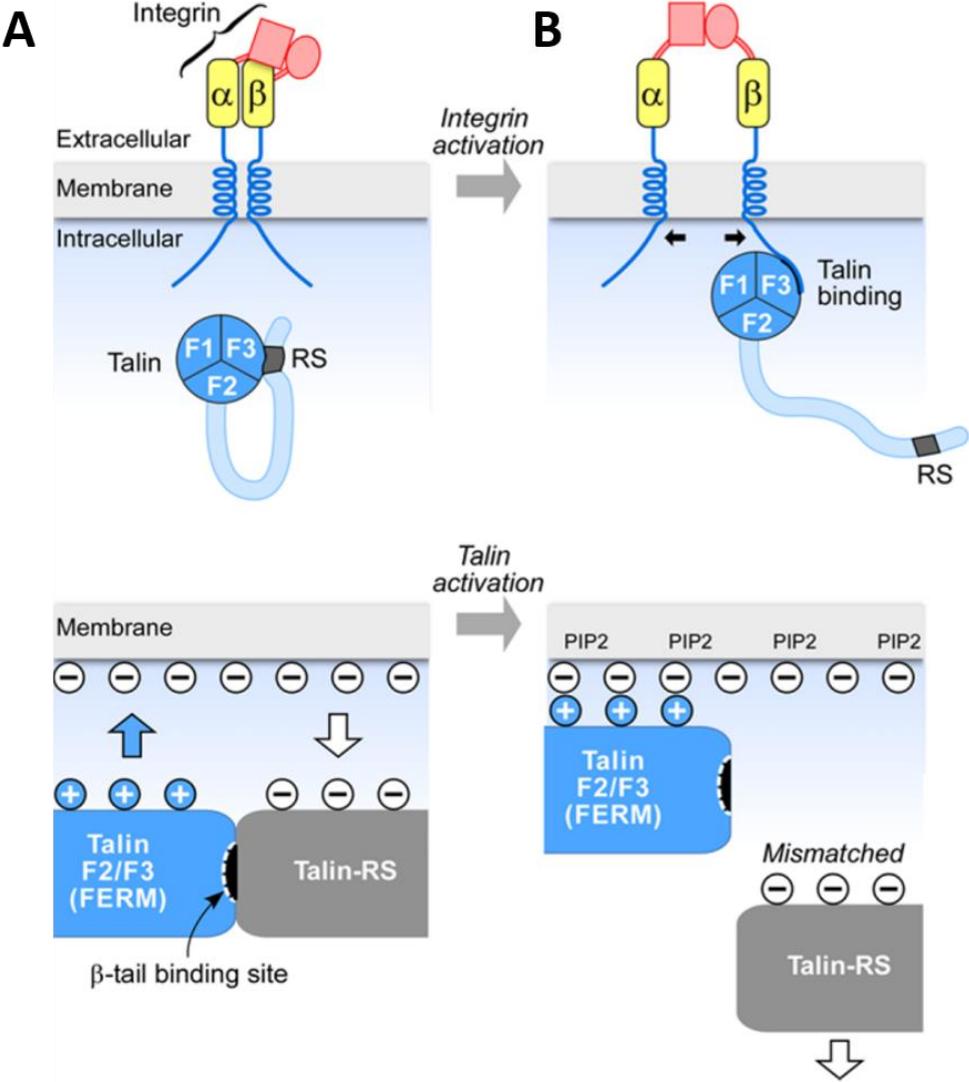
adapté de [How is integrin activated? | MBInfo \(mechanobio.info\)](http://mechanobio.info)

**Figure 6. Activation des intégrines.** En A, la partie extracellulaire des sous unités alpha et beta est courbée, les parties cytoplasmiques de ces sous unités sont proches. Cette conformation inactive présente peu d'affinité pour le ligand. En B La taline et la kindline génèrent des changements de conformation des intégrines qui se traduisent par le dépliement de la partie extracellulaire et l'éloignement des queues intracellulaires des sous unités alpha et beta, ce qui augmente l'affinité avec le ligand. En C, les intégrines s'associent à l'actine, ce qui génère des forces sur les intégrines et augmente l'affinité du ligand pour son récepteur.

La taline possède en N-terminal un domaine FERM (Four-point-one-protein/Ezrin/Radixin/Moesin) qui contient 3 sous domaines F1, F2 et F3 (Anthis and Campbell, 2011, Moser et al., 2009, Critchley, 2009) (Figure 7). Le domaine F3 du domaine FERM interagit avec le motif NPxY de la sous unité  $\beta$  et permet la dissociation des deux domaines courts des sous unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Au repos, la taline est dans un état d'auto-inhibition, adoptant une conformation repliée sur elle-même. Les résidus 482 à 2541 en C-terminal (taline RS) interagissent avec le domaine F3, inhibant ainsi l'interaction de la taline avec la sous unité  $\beta$  des intégrines (Wang, 2012) (Figure 7). De plus, le domaine F2/F3 de la taline, chargé positivement, est masqué par le domaine RS chargé négativement. Ainsi, le domaine RS éloigne la taline de la membrane plasmique, chargée négativement (Song et al., 2012). Cette double inhibition peut être levée selon un mécanisme de « pull and push » au niveau des zones de la membrane plasmique enrichies en PI(4,5)P2, chargé négativement (Wang, 2012, Goksoy et al., 2008)(Figure 7). Dans ce modèle, le PI(4,5)P2 active la taline en attirant (pull) le domaine F2/F3 vers la membrane et en même temps en repoussant (push) le domaine taline-RS. Ainsi le domaine F3 libéré interagit avec la sous unité  $\beta$  et permet l'activation des intégrines. L'interaction de la taline avec la partie cytosolique de la sous unité  $\beta$  est renforcée par le PI(4,5)P2. De plus, la taline se lie et active la kinase phosphatidylinositol phosphate de type I $\gamma$  (Martel et al., 2001, Ling et al., 2002). Ce qui renforce la production locale de PI(4,5)P2, le recrutement de la taline, l'activation des intégrines et la mise en place d'ACM. L'interaction entre la taline et les intégrines est régulée de plusieurs autres manières. Par exemple, la phosphorylation du domaine FERM de la taline par la kinase cycline-dépendante 5 (Cdk5) évite l'ubiquitination et la dégradation de la taline et permet ainsi de stabiliser l'engagement des intégrines (Huang et al., 2009). La taline relie directement l'actine par son domaine C-terminal ou indirectement via le recrutement de la vinculine et la paxilline (Gingras et al., 2008). L'actine, incorporée aux adhésions naissantes, applique des tensions mécaniques sur la sous unité  $\beta$  pour stabiliser la conformation active des intégrines et stimuler le regroupement ('clustering') des intégrines.

De plus, il a été montré que la kindline participe au renforcement de l'activation des intégrines par la taline et agit comme co-activateur (Lu et al., 2022). La kindline possède un domaine FERM qui interagit avec les intégrines mais, contrairement à la taline, la kindline n'induit pas de changement de conformation des intégrines (Bledzka et al., 2012). La surexpression de la

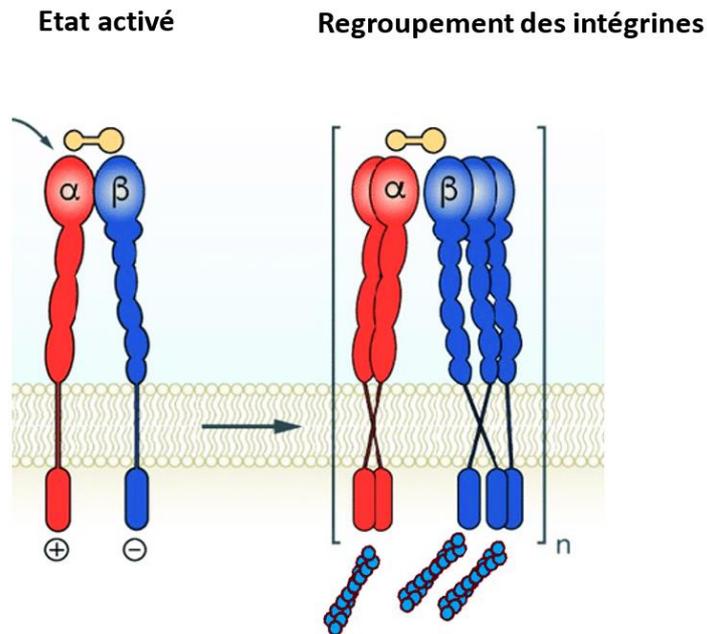
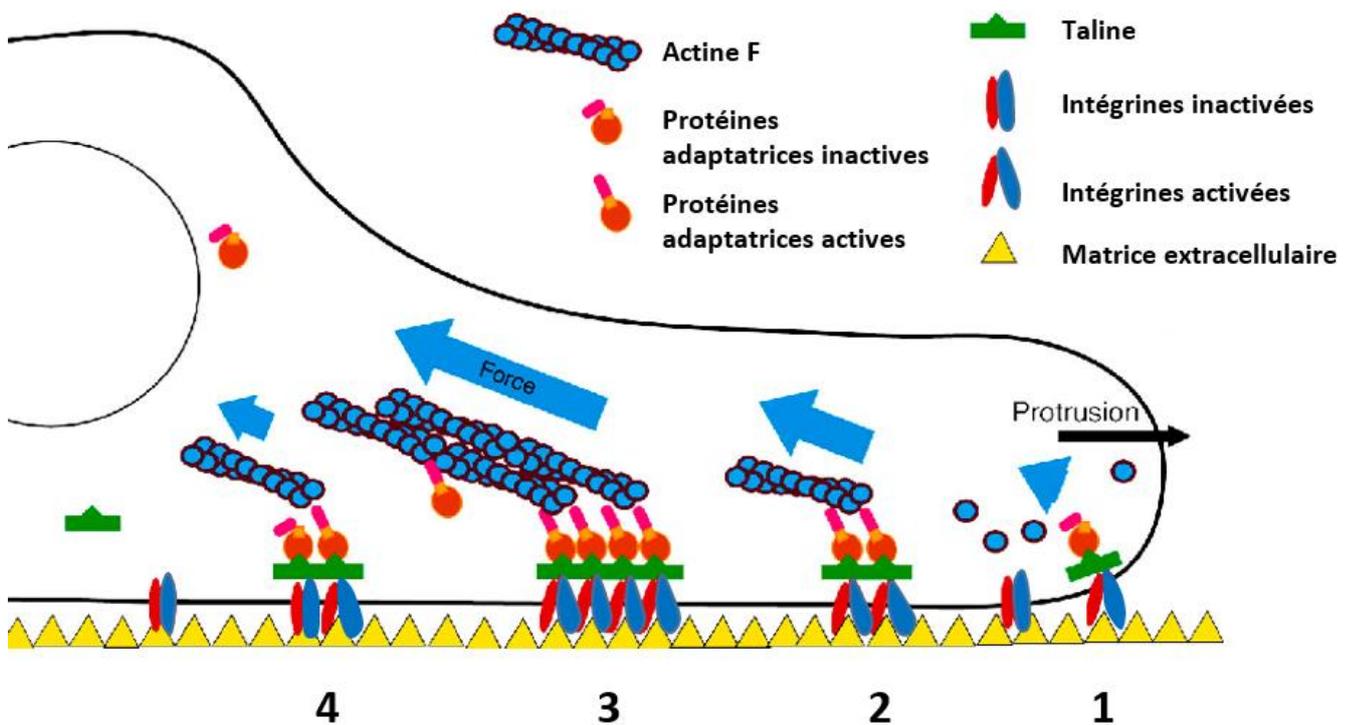
kindline n'entraîne pas l'activation des intégrines à elle seule mais nécessite au moins la présence de la partie N-terminal de la taline (Shi et al., 2007, Lu et al., 2022, Ma et al., 2008). Une étude récente a montré que des homodimères de taline forment des complexes avec la paxilline et la kindline et permettent, dans cette conformation, l'activation et le regroupement des intégrines (Lu et al., 2022). En outre la kindline relie l'actine via le recrutement de protéines adaptatrices comme la filamine, la migfiline, FAK, VASP ou  $\alpha$ -actinine et pourrait ainsi participer à la transmission de forces sur les intégrines (Karaköse et al., 2010, Nordenfelt et al., 2016).



adapté de (Wang, 2012)

**Figure 7. Activation de la taline par le PI(4,5)P2 selon le modèle « pull and push ».** A gauche : Le domaine Taline-RS s'associe au domaine F3 de la taline, la privant de toute interaction avec le domaine intracellulaire de la sous unité beta. Au même moment, les charges négatives du domaine Talin-RS repoussent la taline de la membrane. A droite : Lorsque la membrane est bien plus négativement chargée, le domaine F2/F3 de la taline est attirée par la membrane (pull) et au même moment la membrane repousse le domaine Taline-RS (push), ce qui génère un changement de conformation, libérant le domaine d'interaction avec la partie cytosolique de la sous unité beta.

Ainsi, à l'état initial de l'assemblage des ACM, les intégrines activées et regroupées sont enrichies en taline, kindline et lient l'actine via la taline, la vinculine et la paxilline. Ce qui leur permet d'être engagées mécaniquement et moléculairement par le recrutement séquentiel d'autres protéines d'adhésions focales, comme la zyxine, la kinase des adhésions focales FAK. Les intégrines activées et engagées sont le point de départ de la formation et de la stabilisation des adhésions naissantes, qui vont se transformer en complexe focaux puis adhésions focales (Figure 8).

**A****B**

adapté de (Nieberler et al., 2017) et (Humphries et al., 2007)

**Figure 8. Dynamique des ACM au cours de la migration.** **A** Regroupement des intégrines. Lorsque les intégrines sont activées, ces dernières se regroupent, se lient à l'actine et transduisent un signal selon la voie « outside-in ». **B** Au cours de la migration 1. Les intégrines s'activent et forment des adhésions naissantes. Une majorité se désassemble et une minorité se stabilise (2). Puis elles se regroupent, se lient à l'actine et s'engagent dans la voie de signalisation « outside-in ». Elles se stabilisent et forment des complexes focaux (3), et adhésions focales qui se 4. Désassemble à l'arrière de la cellule.

### 2.2.2 Régulation de la formation et de la maturation des ACM

Lorsque les intégrines sont activées et engagées, des cascades de voies de signalisation s'opèrent. Les RhoGTPases Rac1, Cdc42 et RhoA, décrites précédemment, jouent un rôle central dans cette régulation .

#### **Formation des Adhésions focales**

Il existe un « cross-talk » entre les RhoGTPases au cours de la vie des ACM. Initialement aux adhésions naissantes, l'activité de RhoA diminue alors que celle de Rac1 augmente. Puis au cours de la maturation des adhésions focales, l'activité de RhoA augmente et celle de Rac1 diminue (Figure 9).

La formation et la stabilité des adhésions naissantes aux lamellipodes dépend du remodelage et de l'organisation de l'actine (Alexandrova et al., 2008, Geiger, 1979). De plus, selon un phénomène d'amplification, les ACM vont à leur tour réguler la dynamique de l'actine. De manière intéressante, les cellules qui ont un faible réseau d'actine, comme les leucocytes, présentent des petites adhésions focales peu abondantes (Smith et al., 2005). Rac1 orchestre la polymérisation d'actine branchée en activant le complexe WAVE et le nucléateur d'actine Arp 2/3 (Machesky and Insall, 1998, Miki et al., 1998). Par ailleurs, l'utilisation de la cytochalasine D, qui inhibe la polymérisation d'actine, est marquée par l'absence de formation de nouvelles adhésions (Choi et al., 2008). Ainsi, à travers la formation de réseaux d'actine et de protrusions Rac1 joue un rôle clé dans la formation des adhésions (Nobes and Hall, 1995, Routray et al., 2011) qui à leur tour vont favoriser la dynamique de protrusions des lamellipodes (Barnhart et al., 2017).

La régulation de Rac1 au cours de la formation d'adhésions naissantes se fait à travers l'activation de certaines GEFs et GAPs en aval du regroupement des intégrines et de leur engagement. Cela implique l'interaction de certaines protéines des adhésions naissantes avec ces GEFs et GAPs (Lawson and Burridge, 2014). Plus précisément, cet ensemble de facteurs implique la participation de protéines adaptatrices et des tyrosine kinases, comme la paxilline et la kinase FAK qui se lient directement ou indirectement aux GEFs et GAPs (Lawson and Burridge, 2014, Brown and Turner, 2004). Le recrutement de FAK aux intégrines, entraîne son autophosphorylation sur la tyrosine 397 et le recrutement de la kinase Src (Mitra and

Schlaepfer, 2006). Les deux kinases stimulent leur activité mutuellement en se phosphorylant et agissent en synergie. Le complexe FAK-Src phosphoryle la paxilline et la p130Cas, ce qui permet à ces deux protéines de se lier à Crk et la paxilline d'interagir avec GIT2 (Turner et al., 1999, Lamorte et al., 2003). Ainsi Crk et GIT2 recrutent les GEFs de Rac1  $\beta$ -Pix et DOCK180 et permettent l'activation de Rac1 aux adhésions naissantes (ten Klooster et al., 2006, Kiyokawa et al., 1998a, Kiyokawa et al., 1998b). Certaines GEFs de Rac1 sont recrutées aux ACM, comme Tiam1 qui interagit avec la taline (Wang et al., 2012). Tiam1 forme un complexe avec la forme active de Ras-GTP à travers un domaine d'interaction avec Ras et active Rac1 (Lambert et al., 2002, 1). De plus, Tiam1 peut être activé par des phosphorylations sur des tyrosines médiées par Src et ainsi activer Rac1 via le complexe FAK-Src (Lambert et al., 2002, 1). D'autres GEFs sont recrutées aux adhésions naissantes pour activer Rac1, en fonction du contexte et du type cellulaire (Lawson and Burridge, 2014). De plus, il a été montré que l'engagement des intégrines est associé à une diminution de l'activité de RhoA. Cette inhibition est régulée par l'activation de la RhoGAP p190 de RhoA par Src (Arthur and Burridge, 2001, Arthur et al., 2000). Le complexe formé par FAK et p120RasGAP peut également activer RhoGAP p190 au cours de la migration et inhiber RhoA aux adhésions naissantes.

### **Maturation des adhésions focales :**

Lorsque les adhésions naissantes ne se désassemblent pas, elles évoluent en ACM plus larges et stables, appelés complexes focaux. Ces complexes focaux résident entre la lamella de la cellule et le lamellipode. Au fur et mesure que des protéines du cytosquelette d'actine sont recrutées et que des forces mécaniques y sont appliquées, ces complexes focaux forment des adhésions focales, qui vont éventuellement atteindre l'arrière de la cellule (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996). Ces ACM matures présentent plusieurs protéines adaptatrices, qui peuvent servir de marqueurs, comme la vinculine, la paxilline, la zyxine et l' $\alpha$ -caténine. Elles sont également associées avec la kinase FAK et sont reliées à l'actine. Ces étapes de maturation dépendent de la formation de fibres de stress et de la contractilité de l'actomyosine II, tous les deux régulés par RhoA (Parsons et al., 2010):(Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996). En effet, le blocage de RhoA et de la contractilité de la myosine inhibent la maturation des adhésions focales (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996). L'activité de la RhoGTPase RhoA augmente au fur et mesure qu'on s'éloigne de l'avant de la cellule. Comme pour Rac1, l'activité de RhoA est finement contrôlée par différentes GEFs et GAPs. Après

l'engagement des intégrines, la GEF p190Rho se lie et active RhoA, ce qui stimule la maturation des adhésions focales (Lim et al., 2008, Miller et al., 2012). Cette GEF est recrutée aux adhésions focales par l'intermédiaire de l'interaction directe avec FAK (Zhai et al., 2003). D'autres GEF sont recrutées aux adhésions focales, par exemple les GEFs LARG et GEF-H1, s'associent et activent RhoA en réponse à des forces mécaniques appliquées sur les intégrines (Guilluy et al., 2011). Cependant, l'activation de ces deux GEF s'établit à travers différentes voies de signalisation. LARG est activée par la tyrosine kinase Fyn, appartenant à la famille Src alors que l'activation de GEF-H1 est stimulée par ERK et Ras (Guilluy et al., 2011). L'augmentation de l'activité de RhoA est associée à une diminution de l'activité de Rac1. L'inhibition de Rac1 s'établit par l'activation de ses différentes GAPs, comme RacGAP1 ou FilGAP. Le rôle de la tension intracellulaire sur l'inhibition de Rac1 a été étudiée (Parsons et al., 2010). Le recrutement de  $\beta$ -pix aux ACM corrèle de manière négative avec la contractilité générée par l'acto-myosine (Parsons et al., 2010). Ainsi, RhoA actif est restreint dans les zones contractiles.

Une fois activée, RhoA agit à différents niveaux. RhoA active la kinase Rho (ROCK) qui phosphoryle la chaîne légère de la myosine (CLM) et inhibe les phosphatases de la chaîne légère. L'augmentation de la phosphorylation de la CLM entraîne l'activation du complexe hexamérique Myosine-II et son interaction avec les filaments d'actine. La Myosine II exerce des forces contractiles sur les fibres de stress, augmentant ainsi la tension sur l'actine. Cette tension est en partie transmise aux adhésions focales, et permet de maintenir le regroupement des intégrines, leur activation et la maturation des adhésions focales. De plus, ROCK phosphoryle la kinase LIM, ce qui inactive la cofilin, un régulateur négatif de l'actine. Ainsi ROCK stabilise l'actine filamenteuse. RhoA active également mDia qui augmente la polymérisation de l'actine et la formation des fibres de stress.

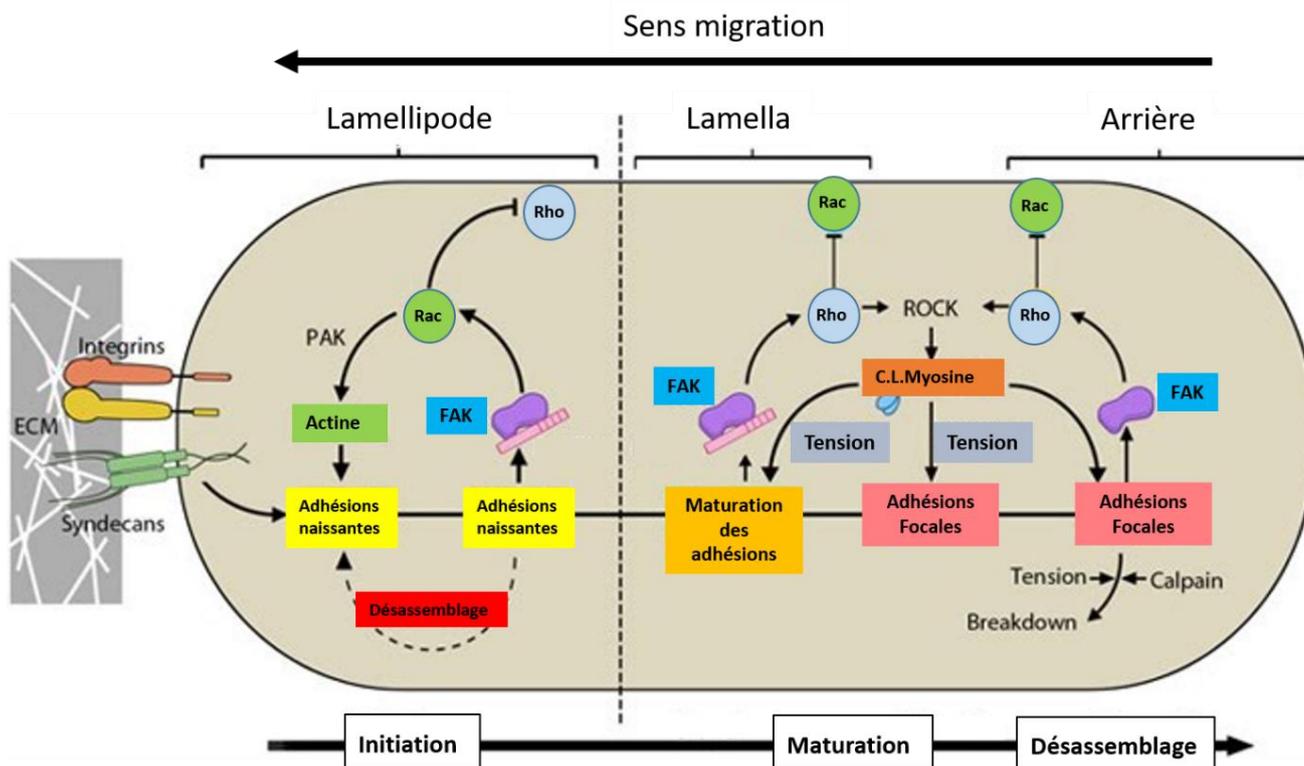
En conclusion, la régulation spatiale et temporelle des RhoGTPases permet d'orchestrer les événements nécessaires à la formation d'adhésion naissantes à l'avant de la cellule, puis à la formation d'adhésions de plus en plus matures, qui se rapprochent de l'arrière de la cellule au fur et mesure que cette dernière migre. La dernière étape est le désassemblage des ACM qui peut avoir lieu à l'avant ou à l'arrière de la cellule et est contrôlé selon différents mécanismes moléculaires.

### 3. Désassemblage des ACM et turnover

Au cours de la migration les adhésions focales s'attachent au substrat pour transduire des forces permettant à la cellule d'avancer. Pour continuer son mouvement dirigé, la cellule doit rétracter son corps cellulaire à l'arrière et se détacher du substrat à travers le désassemblage des adhésions focales (Webb et al., 2002, Broussard et al., 2008). Le désassemblage d'ACM a lieu aussi à l'avant des cellules. Dans les deux cas, les composants des adhésions, en particulier les intégrines, qui se désassemblent peuvent être recyclés pour former de nouvelles adhésions (turnover). On pourrait penser que le désassemblage et le turnover des adhésions focales s'établissent uniquement par l'inhibition des mécanismes qui régulent leur assemblage, à travers l'inhibition de RhoA ou de Rac1, par exemple. Mais ce sont d'autres mécanismes qui désassemblent les adhésions focales. Trois mécanismes majeurs seront décrits : **i)** la signalisation de FAK/Src **ii)** le clivage protéolytique des composants des ACM **iii)** et le rôle des microtubules et de l'endocytose.

#### 3.1 La signalisation FAK/Src dans le désassemblage des ACM

Le rôle de FAK sur la dynamique des adhésions focales est beaucoup plus important sur leur désassemblage que sur leur maturation (Ilić et al., 1995). (Figure 9). En effet, dans les cellules déficientes pour FAK, la durée de vie et le nombre d'adhésions focales augmentent, suggérant des défauts de désassemblage (Ilić et al., 1995). Dans les cellules de fibroblastes FAK nulles, la vitesse du désassemblage est diminuée de 14 fois par rapport aux fibroblastes contrôles (Webb et al., 2004). L'analyse de ces cellules a montré que le désassemblage des adhésions focales dépend du recrutement de Src à travers la phosphorylation de la tyrosine kinase 397 de FAK, et de l'activité de Src. De manière similaire, la phosphorylation de la paxilline et p130Cas est aussi importante pour le désassemblage des adhésions focales. De plus, la phosphorylation de FAK par Src est nécessaire pour le recrutement de Grb2 qui interagit avec la dynamine (Ezratty et al., 2005). La dynamine est recrutée à la surface interne de la membrane plasmique formant un anneau autour des adhésions focales et favorise l'endocytose des intégrines qui est dépendante des microtubules (Ezratty et al., 2005). Ainsi, FAK est un régulateur central du désassemblage des adhésions focales au cours de la migration.



adapté de [What is the role of Rho GTPases in the regulation of focal adhesion assembly? | MBIInfo \(mechanobio.info\)](http://www.mechanobio.info)

**Figure 9. Rôle des RhoGTPases dans la dynamique des ACM. Initiation.** Au niveau du lamellipode, Rac inhibe RhoA et il existe une boucle de rétroaction positive entre l'actine et les adhésions naissantes. Rac stimule la formation d'actine branchée qui régule positivement l'activation des intégrines et la formation des ACM. Les adhésions naissantes recrutent FAK qui à son tour régule Rac de manière positive. **Maturation.** RhoA inhibe Rac et Rho active la voie ROCK qui phosphoryle la chaîne légère de la myosine-II, ce qui permet d'établir une tension sur les ACM et ainsi de promouvoir leur maturation. **Désassemblage.** Le désassemblage a lieu à l'avant (pas montré ici) et à l'arrière de la cellule grâce aux microtubules, le clivage protéolytique et FAK.

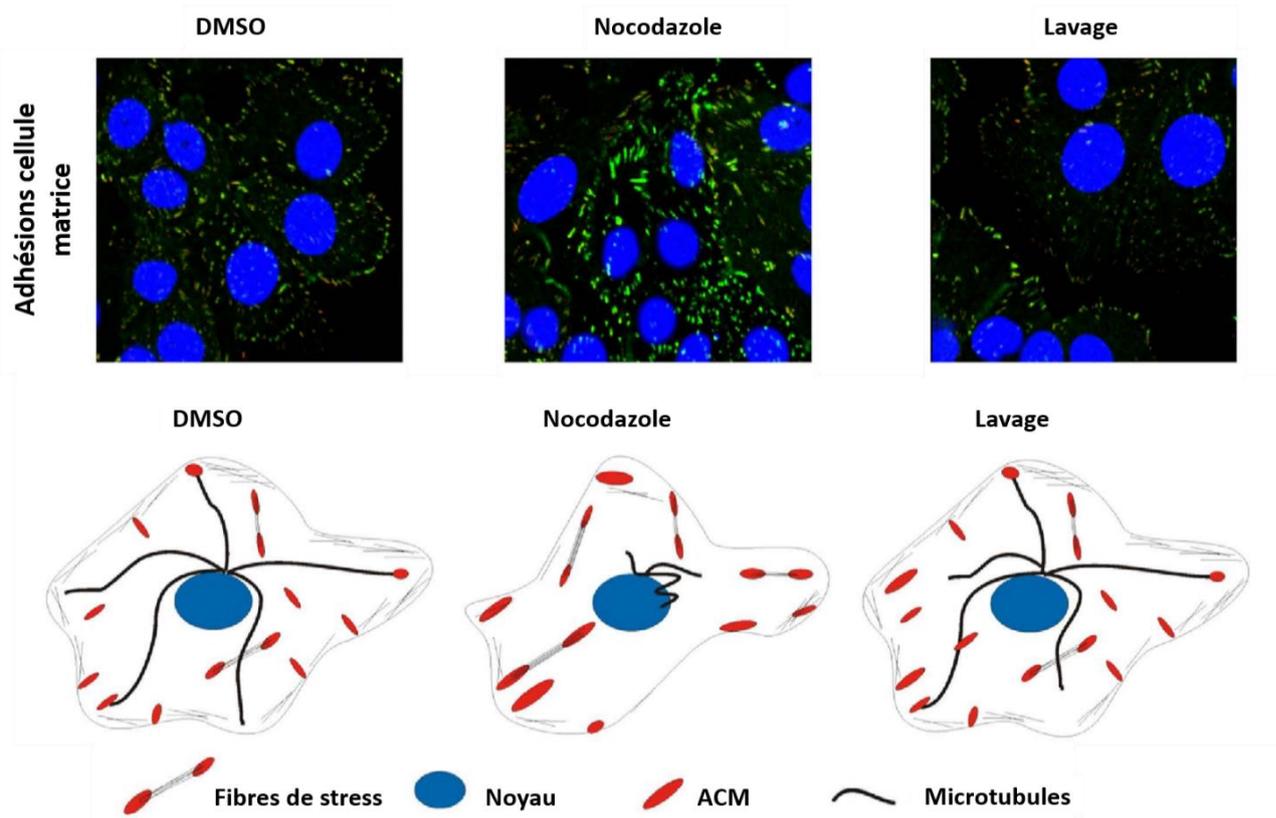
### 3.2 Clivage protéolytique par les calpaïnes

Les calpaïnes sont des hétérodimères composés d'une petite et d'une grande sous unité régulatrice (Undyala et al., 2008). Ces enzymes clivent les composants des adhésions focales et leur activité protéolytique dépend du calcium. L'importance des calpaïnes dans le désassemblage des adhésions focales a été montrée par le fait que leur inhibition stabilise les adhésions focales périphériques et diminue le détachement des cellules en cours de la migration (Huttenlocher et al., 1997, Undyala et al., 2008). Les calpaïnes ont plusieurs

substrats comme la taline, la paxilline, la vinculine, FAK et la zyxine (Franco et al., 2004, Franco and Huttenlocher, 2005, Chan et al., 2010, Cortesio et al., 2011). La taline est le substrat de la calpaïne-2 le mieux caractérisé et dont le clivage est crucial pour le désassemblage des adhésions focales (Cortesio et al., 2011). En effet, lorsque des fibroblastes expriment une forme exogène de la taline résistante aux calpaïnes, la durée de vie des adhésions focales augmente et le désassemblage n'est pas compensé par le clivage d'autres protéines. Enfin le désassemblage des adhésions focales par la calpaïne-2 dépend également des microtubules, selon un mécanisme encore incertain (Bhatt et al., 2002).

### 3.3. Le Rôle des microtubules dans le désassemblage des ACM

Au cours de la migration, il a été observé que les microtubules projettent vers l'avant et l'arrière de la cellule et ciblent les ACM (Rid et al., 2005, Kaverina et al., 1999). Cette observation est corrélée avec le désassemblage des ACM. Dans ce contexte, l'usage du nocodazole a été nécessaire pour synchroniser les ACM et étudier leur dynamique. Le nocodazole se lie à la bêta-tubuline et favorise la dépolymérisation des microtubules, ce qui est corrélée avec une accumulation d'adhésions focales de taille importante mais aussi la phosphorylation de FAK et de la paxilline (Bershadsky et al., 1996). La présence de nocodazole inhibe donc le désassemblage des ACM (Figure 10). Le lavage du nocodazole est ensuite associé à une re-polymérisation des microtubules dont l'extrémité (+) co-localise avec les ACM, et entraîne une vague de désassemblage synchronisé des ACM (Ezratty et al., 2005, Kaverina et al., 1999). Cette expérience a montré que le désassemblage des ACM s'établit, en tout cas en partie, grâce aux microtubules.



Adapté de (Fokkelman et al., 2016)

**Figure 10. Le nocodazole et le désassemblage des ACM.** En haut. Le traitement des cellules par du nocodazole entraîne l'arrêt du désassemblage des ACM (vert), qui paraissent plus importantes en taille (au centre) par rapport aux cellules contrôles traitées au DMSO. Le traitement au nocodazole synchronise les ACM. Le lavage du nocodazole (à droite) permet de rétablir le désassemblage des ACM. En bas, un schéma de l'effet du traitement des cellules avec du DMSO ou du nocodazole puis du lavage du nocodazole sur les ACM.

L'association de l'extrémité-plus des microtubules avec les ACM s'établit selon 3 étapes. Tout d'abord les microtubules sont « guidés » vers les ACM par le cytosquelette d'actine. Des protéines de liaisons, comme la spectraplakine ACF7 se lient à l'extrémité des microtubules et à l'actine (Kodama et al., 2003). ACF7 permet aux microtubules en cours de polymérisation de suivre les structures d'actine vers les adhésions focales (Kodama et al., 2003, Wu et al., 2008, 7). De plus, les protéines formines mDia1/2 sont aussi nécessaires à l'alignement des microtubules sur l'actine (Ishizaki et al., 2001, 1, Palazzo et al., 2001). Les microtubules peuvent également glisser le long des filaments intermédiaires, via l'association du facteur de liaison APC, et dont l'orientation est modulée par les moteurs

kinésine et dynéine des microtubules. Ensuite, lorsque l'extrémité du microtubule atteint la région des ACM cette dernière est « capturée ». Il s'agit de la capture corticale qui s'effectue grâce à l'interaction des protéines associées à l'extrémité-plus des microtubules, comme EB1-binding protein, CLIP-170 et CLASP, avec des facteurs corticaux comme IQGAP1 (Cao et al., 2015). Pour finir, une fois capturés, les extrémités-plus des microtubules sont stabilisées, généralement par des facteurs MAPs qui empêchent la dépolymérisation des microtubules et des événements de catastrophes (Dehmelt and Halpain, 2005). De plus, il a été montré que RhoA et mDia2 contrôlent la stabilité des microtubules de manière indépendante de la dynamique et des structures d'actine (Bartolini et al., 2008).

Les microtubules à proximité des ACM agissent à différents niveaux pour réguler leur désassemblage. Il a été proposé que les microtubules servent de 'plateforme' pour transporter différents cargos vers ou depuis les ACM. Au cours du recyclage des intégrines, elles sont internalisées et voyagent à travers les chemins de recyclage court ou long qui dépendent des microtubules (Loubéry et al., 2008, De Franceschi et al., 2015). Le chemin de recyclage court se caractérise par un recyclage rapide des intégrines à la membrane plasmique à travers les endosomes précoces Rab4-positif (De Franceschi et al., 2015). Les intégrines qui circulent à travers le chemin long se localisent dans les endosomes de recyclage péri-nucléaires Rab11-positif avant de rejoindre la membrane plasmique (De Franceschi et al., 2015). Ces deux voies de recyclage dépendent des moteurs moléculaires kinésine-1/2 et de la dynéine qui contribuent au mouvement des endosomes sur les microtubules (Loubéry et al., 2008). En plus de jouer un rôle dans le trafic vésiculaire, les microtubules sont impliqués dans le processus d'internalisation des intégrines à travers le transport de facteur de désassemblage vers les ACM. Par des approches de protéomiques une étude a permis de mettre en évidence le rôle de la kinase MAP4K4 dans ce processus (Yue et al., 2014, 4). MAP4K4 est un facteur qui s'associe à l'extrémité-plus des microtubules par l'interaction avec EB2 et IQSEC1. La déplétion de cette kinase entraîne la stabilisation des adhésions focales ainsi que des phénotypes sévères de migration et de cicatrisation. IQSEC1 est une GEF activatrice d'Arf6 qui a son tour stimule l'internalisation des intégrines, ce qui contribue au désassemblage des ACM (Yue et al., 2014, 4). De plus, la dynamine et la clathrine sont enrichies autour des adhésions focales dans les cellules traitées au nocodazole et sont importantes pour la formation et la scission des vésicules d'endocytose (Ezraty et

al., 2005, Ezratty et al., 2009). A ce jour, les microtubules ont été proposés comme aidant le transport de la clathrine, de la dynamine et des protéines adaptatrices vers les ACM même si leur accumulation aux adhésions focales est indépendante des microtubules (Ezratty et al., 2009, Nolte et al., 2021). Une autre manière de désassembler les ACM est de couper les intégrines attachées à la MEC via les métalloprotéines. Au cours de la migration, les métalloprotéases de type 1 (MMP Type1) sont recrutées aux adhésions focales et dégradent localement la MEC, ce qui est requis pour l'internalisation des intégrines (Takino et al., 2007, Wang and McNiven, 2012, Shi and Sottile, 2011). Le recrutement des MMP Type 1 aux ACM, se fait par l'activation de Src et le complexe FAK/p130Cas (Wang and McNiven, 2012). Le transport des vésicules contenant ces MMP Type 1 jusqu'à la surface de la cellule s'effectue à travers le réseau des microtubules et dépend des moteurs moléculaires kinésines KIF5B, KIF3A/3B (Wiesner et al., 2010). Un autre mécanisme de désassemblage des adhésions focales par les microtubules consiste à supprimer localement la contractilité de l'acto-myosine, ce qui génère une relaxation de la tension au niveau des ACM et leur désassemblage. La RhoGEF GEF-H1 a un rôle crucial dans ce processus. GEF-H1 est actif lorsque ce facteur n'est pas associé aux microtubules ou lorsque ces derniers se dépolymérisent. GEF-H1 active la protéine kinase D qui stimule le recrutement de Rab6 aux ACM et favorise le turnover des ACM. De plus la GEF-H1 active RhoA, ce qui augmente la contractilité de l'actomyosine et la maturation des ACM. Lorsque les microtubules se polymérisent, la dynéine Tctex-1 recrute GEF-H1 aux microtubules et agit ainsi comme un régulateur négatif de la contractilité de l'acto-myosine. Les microtubules agissent comme séquestreurs de GEF-H1, et permettent ainsi de déstabiliser les ACM localement et de favoriser leur désassemblage (cf partie RhoGTPase).

Bien que le rôle principal des microtubules soit associé au désassemblage des ACM, certaines études montrent leur importance pour la maturation des ACM. Plus particulièrement, les microtubules peuvent s'associer au réticulum endoplasmique au niveau des ACM, ce qui favorise leur maturation. Dans ce contexte, le réticulum endoplasmique s'associe aux microtubules à travers le complexe Kinectine-Kinesine. La kinectine est une protéine résidente du réticulum endoplasmique. La dissociation de l'interaction entre la kinésine et la kinectine cause une réduction du recrutement de la paxilline et de la vinculine aux ACM de la lamella, ce qui est associé à une réduction de leur

taille. La kinectine interagit également avec Rab18, une GTPase qui contrôle le transport antérograde du réticulum endoplasmique sur les microtubules de manière kinésine dépendante. De plus, l'association des microtubules avec le réticulum endoplasmique contribue à la dynamique des ACM à travers le recrutement de la protéine PTP1B aux ACM. PTP1B serait impliqué notamment dans l'activation de Src-FAK qui favoriserait la maturation des ACM.

#### **4 Fonction des ACM dans la migration**

Les ACM ont deux fonctions majeures, elles servent de centre de signalisation et de points de traction de forces qui permettent la formation de protrusions au cours de la migration.

##### 4.1 La signalisation aux ACM au cours de la migration

Les voies de signalisations régulées par les ACM sont primordiales pour contrôler la polarité de la cellule, les remaniements du cytosquelette d'actine et les forces appliquées sur le substrat pendant la migration. Ces voies de signalisation sont majoritairement activées par la kinase FAK, qui joue un rôle central dans la migration. La kinase FAK, après son autophosphorylation, recrute Src pour activer Rac1, et ainsi contrôler localement la polymérisation de l'actine et la formation de protrusion. L'association de FAK avec la kinase PI3K et avec Grb7 régule également la migration (Han and Guan, 1999, Han et al., 2000, Reiske et al., 1999) . En effet, Grb7 est une protéine adaptatrice qui interagit avec FAK via son domaine SH2. Grb7 peut être phosphorylée par FAK, indépendamment de Src, et stimule la migration (Han et al., 2000). De plus, Grb7 contient un domaine pleckstrin homology (PH), qui permet son association avec les phosphoinositides de la membrane plasmique au niveau des ACM (Shen et al., 2002). Le recrutement de la kinase PI3K aux ACM par FAK a lieu également de manière indépendante de Src. La kinase PI3K est impliquée dans l'activation de la voie Akt et l'activation de Rac, ce qui stimule la polymérisation de l'actine et la migration. La kinase PI3K phosphoryle le PI(4,5)P2 en PI(3,4,5)P3, second messenger activant Arp2/3. Ainsi la kinase PI3K favorise la polymérisation d'actine branchée et la formation de lamellipode. Enfin, l'interaction et la phosphorylation de N-WASP stimule son recrutement à l'avant de la cellule. N-WASP est un nucléateur d'actine qui va en partie activer Arp2/3 et ainsi promouvoir la formation d'actine branchée au cours de la migration (Wu et al., 2004).

D'autres mécanismes peuvent stimuler la migration, de manière FAK-indépendant. Par exemple, les protéines SHC peuvent être phosphorylés par des tyrosine kinases puis recruter un certain nombre d'adaptateurs pour activer la protéine kinase MAPK et la voie de signalisation PI3K/Akt, importante pour la migration cellulaire (Ahmed and Prigent, 2017).

#### 4.2 Les ACM et la dynamique des protrusions

Au cours de la migration, les cellules étendent et rétractent leur lamellipode en suivant le sens de migration. Ce phénomène peut être accompagné d'une propagation latérale du lamellipode, qui est comparée à la dynamique d'une vague (« waving »). La régulation de ces mécanismes est très complexe et fait appel à l'imbrication de boucles de rétroactions positives et négatives (Innocenti, 2018). Les protrusions d'actine et leur rétraction dépendent de l'équilibre formé entre la polymérisation de l'actine branchée et le flux rétrograde de l'actine (Koestler et al., 2008, Giannone et al., 2007, Gardel et al., 2010) . Au cours de la migration, les intégrines engagées forment des ACM auxquels s'attachent des filaments d'actine qui se polymérisent et s'orientent vers l'avant de la cellule (Parsons et al., 2010). La polymérisation de l'actine génère des forces contre la membrane plasmique et en contrepartie pousse l'actine vers le centre de la cellule. Ce mouvement centripète de l'actine est appelé flux rétrograde de l'actine. Ce flux rétrograde est renforcé par la contractilité du cytosquelette d'actomyosine et atténue les protrusions. Ainsi l'extension nette du lamellipode dépend de la différence entre les forces générées par la polymérisation de l'actine vers l'avant de la cellule et le mouvement du flux rétrograde. En effet, l'inhibition de la contractilité de l'actomyosine, et donc l'atténuation du flux rétrograde, augmente la vitesse de protrusion (Cai et al., 2006, Even-Ram et al., 2007). Les ACM ont un rôle crucial dans la dynamique du lamellipode. L'inhibition de la taline inhibe la formation de protrusions, soulignant l'importance des ACM dans la formation de protrusions (Sydor et al., 1996). Les ACM sont des plateformes d'ancrage de l'actine, qui permettent à cette dernière de véhiculer des forces de tractions sur le substrat et ainsi de contrôler la formation de protrusions. Les zones d'adhésions naissantes corrélient avec de fortes tensions appliquées sur le substrat. La présence d'adhésions focales naissantes à l'avant de la cellule permet donc la formation des protrusions via l'ancrage de la cellule au substrat. Dans le cas

contraire, où les ACM seraient désengagées de l'actine, les forces produites par la polymérisation d'actine ne permettraient pas la formation de protrusions. De plus, la formation d'adhésions naissantes diminue la vitesse du flux rétrograde d'actine, et ainsi favorise l'élongation du lamellipode vers l'avant (Alexandrova et al., 2008). Enfin, la rétraction du lamellipode s'établit notamment à travers la régulation négative des nucléateur d'actine, comme VASP ou Arp2/3, ce qui change l'équilibre entre le flux rétrograde et la polymérisation de l'actine. Erin Barnhart et al ont suggéré un modèle de dynamique des protrusions dans lequel les adhésions focales séquestrent et éloignent le facteur VASP du front de migration, favorisant ainsi le cycle de protrusion/rétraction (Barnhart et al., 2017).

Ainsi les ACM sont des structures complexes et dynamiques qui sont essentielles à la régulation de la migration. Une catégorie de lipides, les phosphoinositides, sont des messagers membranaires qui recrutent les différents acteurs nécessaires à la dynamique des ACM, de l'actine et des protrusions. Nous verrons comment les phosphoinositides jouent le rôle de 'compas' moléculaires, définissant des territoires membranaires et permettant à la cellule d'établir une polarité avant/arrière. Nous étudierons également comment ces lipides sont régulés.

## II. Les phosphoinositides et la migration cellulaire

Les membranes des compartiments cellulaires sont composées de différents types de lipides, comme le cholestérol et les sphingolipides. Ici nous nous intéressons aux phosphoinositides qui sont une classe de phospholipides. A la membrane plasmique, les phosphoinositides contribuent à réguler dans le temps et dans l'espace la dynamique des adhésions focales, mais aussi d'autres structures comme le cytosquelette d'actine, la polarité cellulaire ou la division cellulaire. On s'intéresse ici aux fonctions les mieux caractérisées des phosphoinositides PI4P, PI(4,5)P2, PI(3,4)P2 et PI(3,4,5)P3 au cours de la migration cellulaire.

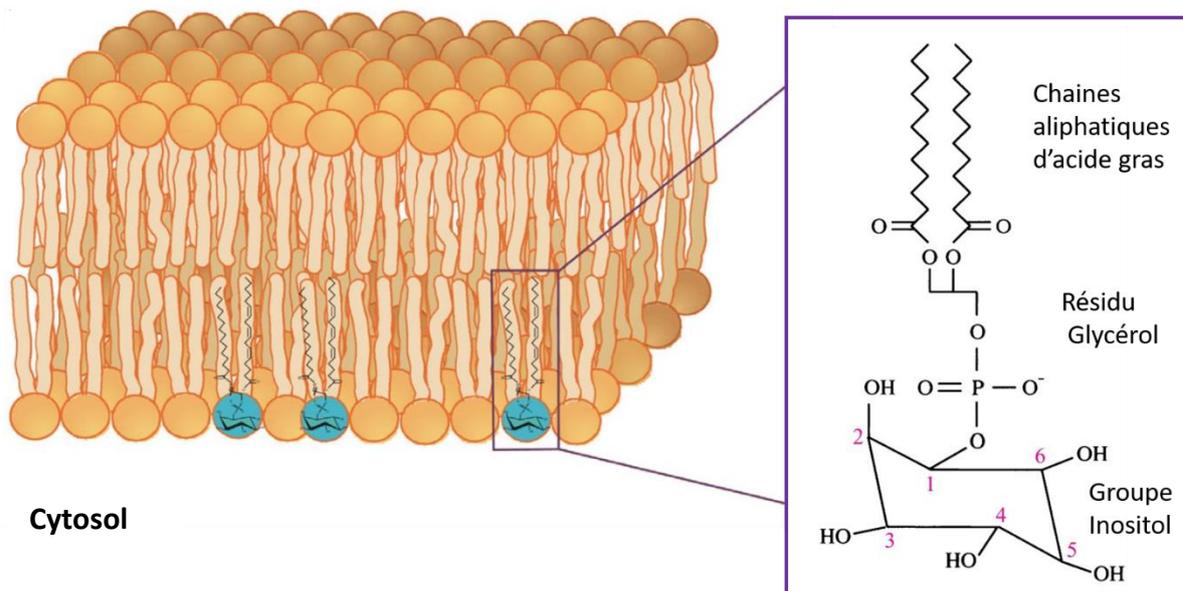
### 1. Les phosphoinositides dans la migration cellulaire

#### 1.1 Métabolisme des phosphoinositides : du RE aux kinases et phosphatases

Les phosphoinositides (PPI) sont présents en faible abondance dans la bicouche lipidique de chaque organelle. Comme les autres phospholipides, les PPI sont des molécules amphiphiles qui présentent des caractéristiques hydrophiles et hydrophobes (Kim et al., 2011). L'extrémité polaire hydrophile des PPI possède une tête inositol, contenant un ou plusieurs groupes phosphates chargés négativement (Kim et al., 2011). Cette tête polaire est orientée vers le cytoplasme. L'extrémité hydrophobe est composée de deux chaînes aliphatiques d'acide gras, l'une saturée et l'autre insaturée. Cette longue chaîne est ancrée dans la bicouche lipidique membranaire (Figure 11). Les deux extrémités des PPI sont liées par un résidu glycérol. Par convention, la position D1 de la tête inositol correspond au groupe -OH hydroxyle qui forme une liaison phosphodiester avec le squelette diacylglycerol du PPI (Kim et al., 2011).

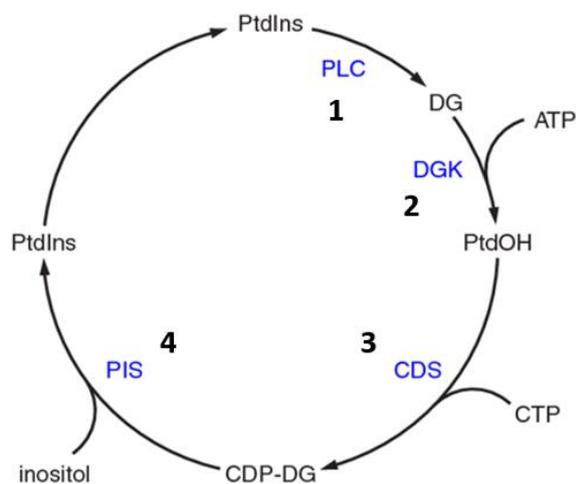
Le phosphatidylinositol (PI), précurseur de tous les PPI, est principalement synthétisé dans le réticulum endoplasmique (Agranoff et al., 1958, Balla, 2013, Kim et al., 2011). (Figure 12) La synthèse du PI est réalisée par l'association de la myo-inositol avec le CDP-DAG (diacylglycerol) par l'enzyme PI synthase PIS selon le cycle du PI (Nikawa and Yamashita, 1997, Tanaka et al., 1996, Balla, 2013). Cette synthèse a lieu dans des régions dynamiques du RE qui établissent des contacts avec d'autres membranes facilitant ainsi les échanges du PI avec d'autres compartiments (Kim et al., 2011). Le CDP-DAG et le myo-inositol

proviennent de la membrane plasmique, à partir de l'hydrolyse du PI(4,5)P2 en Inositol tri phosphate (IP3) et en DAG. Une fois le PI synthétisé au RE ce dernier est transporté vers les membranes de différents compartiments via trafic vésiculaire ou non vésiculaire (à travers les sites de contact membranaires) (Voelker, 1990, Lev, 2010) . Au niveau de la membrane plasmique le PI, métabolisé en PI(4,5)P2, permet la production d'IP3 et de DAG pour former à nouveau du PI au RE.

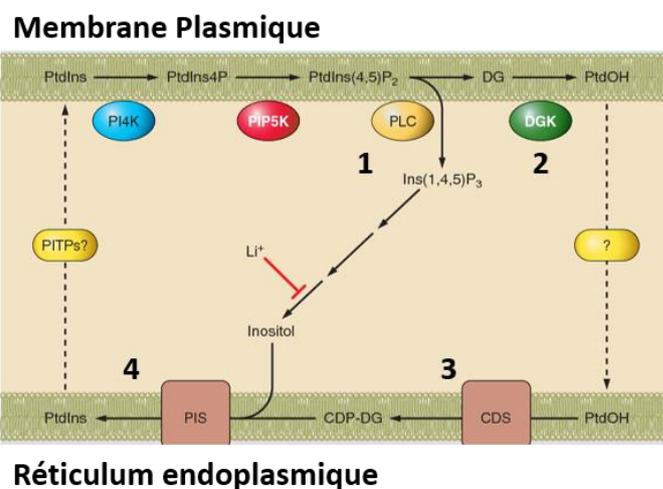


adapté de (Wen et al., 2012) et (Hughes et al., 2000)

**Figure 11. Structure des PPI et insertion dans une bicouche lipidique.** A gauche est représenté une bicouche lipidique dans laquelle un phospholipide (en bleu) est inséré. Les chaînes aliphatiques d'acide gras sont ancrées dans la bicouche lipidique et le groupe inositol est orienté vers le cytosol. Cette tête inositol peut être phosphorylée en position 3, 4 ou 5.



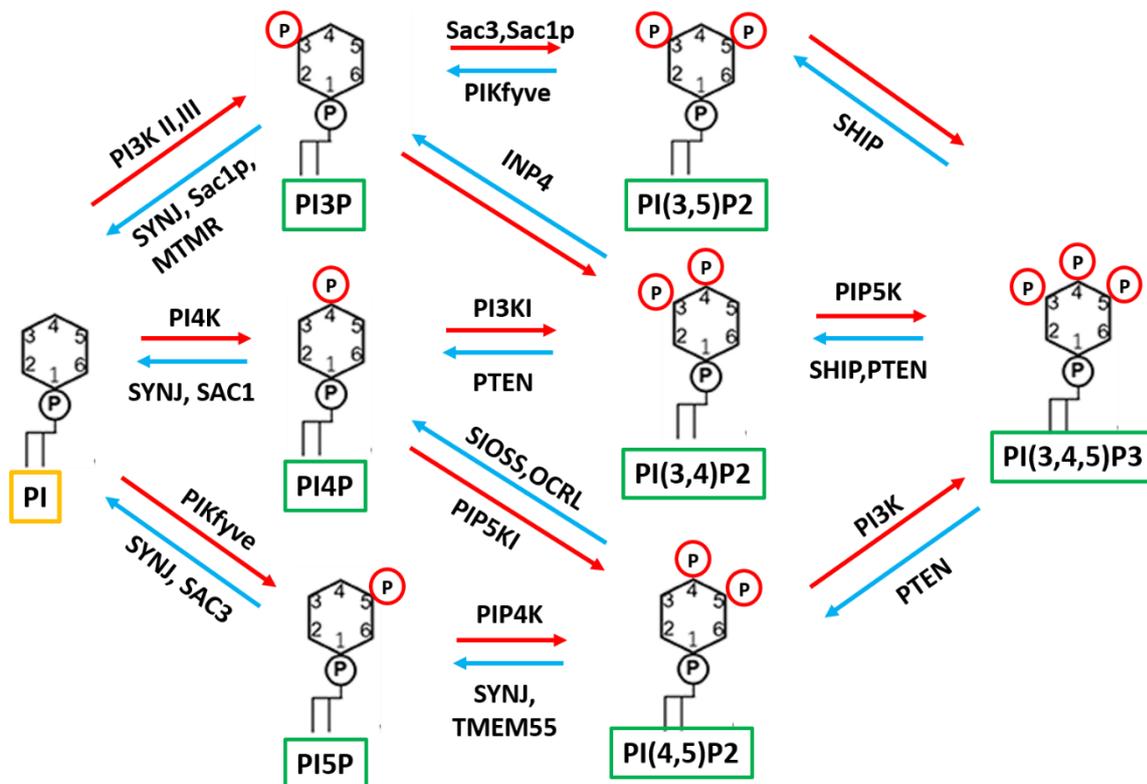
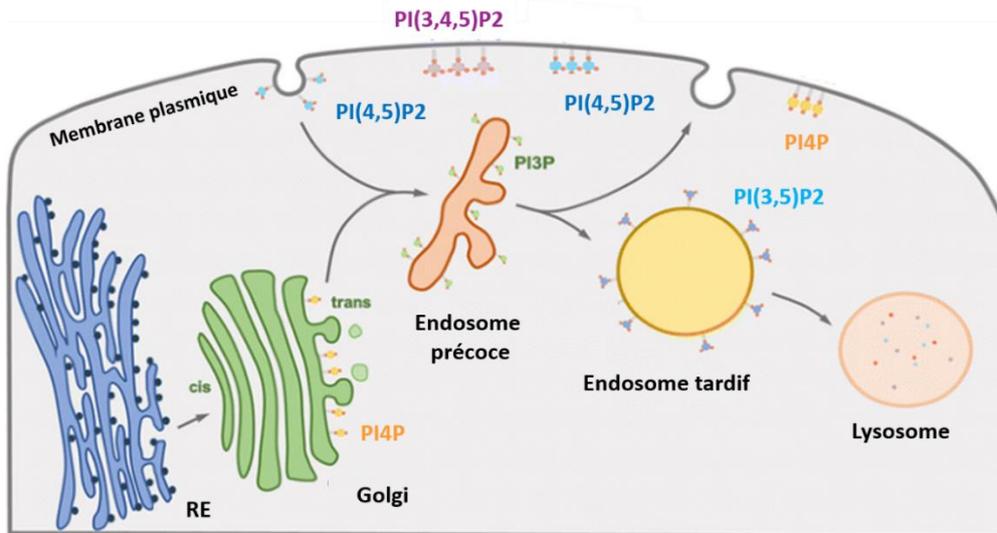
adapté de (Balla, 2013)



**Figure 12. Le cycle de synthèse du PI.** 1. A la membrane plasmique le PI(4,5)P<sub>2</sub> est hydrolysé en DAG et IP<sub>3</sub> (Ins (1,4,5)P<sub>3</sub>). 2. Le DAG est métabolisé en PtdOH par DGK et transite au RE selon un mécanisme par encore connu. 3. Au RE le PtdOH est métabolisé en CDP-DG par l'enzyme CDS. 4. Puis l'inositol issu de la déphosphorylation séquentielle de l'IP<sub>3</sub> est conjugué avec le CDP-DG pour former du PI à l'aide de l'enzyme PIS.

Parmi les 6 groupes hydroxyles de la tête inositol du PI, seules les positions D3, D4 et D5 sont susceptibles d'être phosphorylées de manière réversible par des kinases (Kim et al., 2011). (Figure 13). Au contraire, des phosphatases peuvent déphosphoryler les PPI (Kim et al., 2011). Ces rapides modifications peuvent donner jusqu'à 7 différents PPI, qui ont des propriétés et des rôles qui leur sont propres (Hammond and Burke, 2020). Ces PPI participent à la définition de « l'identité membranaire » des organites (Figure 13). Par exemple, le PI4P est majoritairement localisé à la membrane du trans-Golgi, des endosomes et la membrane plasmique (Raghu et al., 2019). Cette dernière est également enrichie en PI(4,5) et en PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. Le PI(4,5)P<sub>2</sub> est également enrichi à la membrane des vésicules d'endocytose clathrine-dépendante. Le PI(3,5)P<sub>2</sub> est majoritairement localisé dans la membrane du lysosome et des endosomes tardifs. Chez les mammifères, on dénombre 18 réactions d'interconversion des PPI régulées par l'activité de 19 kinases et de 28 phosphatases (Sasaki et al., 2009). Ces kinases et phosphatases sont classifiées, en fonction de leur substrat, de leur lieu d'action et de leur structure. Par exemple, les kinases PI4KIIIβ et PI4KIIα, spécifiques du trans-Golgi, phosphorylent le PI en PI4P (Sasaki et al., 2009, Bankaitis et al., 2012). Ainsi, la synthèse des PPI se fait de manière spécifique et locale à travers de nombreuses enzymes. L'interaction

des PPI avec les protéines s'effectue généralement à travers le domaine pleckstrin homology (PH) des protéines. Ces interactions sont importantes pour activer localement des voies de signalisation qui vont réguler de nombreuses fonctions cellulaires. Le domaine PH canonique est un domaine de 100 à 120 acides aminés qui consiste en 7 feuillets  $\beta$  et 1 hélice  $\alpha$  associés de manière à former une poche chargée positivement grâce à des résidus arginine et lysine (Baraldi et al., 1999, Reckel et al., 2017). Cette poche interagit avec les groupement phosphates, chargés négativement, de la tête inositol des PPI. L'interaction entre les protéines contenant un domaine PH et les PPI est spécifique (Singh et al., 2021). Par exemple, les domaines PH de RasGAP et de la phospholipase C (PLC $\delta$ ) ont une forte spécificité pour le PI(4,5)P2 à la membrane plasmique (Harlan et al., 1994, Lemmon et al., 1995) et la protéine Akt se lie au PI(3,4,5)P3 avec une forte sélectivité (James et al., 1996). Il est important de noter que ces interactions spécifiques entre ces protéines et le PI(4,5)P2 ou le PI(3,4,5)P3 ont permis de développer des outils pour détecter ces PPI dans les cellules. La sonde PH-PLC  $\delta$  couplée à une molécule fluorescente permet par exemple de visualiser le PI(4,5)P2.



Adapté de (Jang and Lee, 2016) et de (Nakada-Tsukui et al., 2019)

**Figure 13. Identité membranaire et Synthèse des PPI.** En haut, les PPI définissent l'identité des membranes. Par exemple, le PI(4,5)P2 et PI(3,4,5)P3 sont enrichis à la MP, le PI4P est enrichi au Golgi et le PI(3,5)P2 aux endosomes. En bas, synthèses des PPI à partir du PI par les kinases et phosphatases. La tête inositol peut être phosphorylée (représenté par un P entouré) ou déphosphorylée, par des kinases et phosphates en position 3,4 et/ou 5 donnant 7 PPI possibles.

## 1.2 L'importance des kinases et phosphatases dans la migration : l'exemple de la PI3K et de PTEN

Parmi les kinases et phosphatases présentées dans la partie précédente, la kinase PI3K et la phosphatase PTEN sont connues depuis de nombreuses années pour leur rôle central dans la migration cellulaire (Tamura et al., 1998)(Meili et al., 1999). La kinase PI3K phosphoryle le PI(4,5)P2 en PI(3,4,5)P3 et la phosphatase PTEN déphosphoryle ce dernier en PI(4,5)P2. La stimulation de la migration par des chimio-attractants, comme l'AMP cyclique, entraîne une redistribution spatiale de ces enzymes(Funamoto et al., 2002)(Iijima and Devreotes, 2002)(Servant et al., 2000). La PI3K est recrutée à la membrane plasmique au niveau du front de migration, là où la concentration en chimio-attractant est la plus importante. PTEN, quant à elle, se localise au niveau de la membrane plasmique à l'arrière de la cellule. PTEN favorise l'accumulation et le maintien du PI(3,4,5)P3 à l'avant de la cellule(Huang et al., 2003)(Funamoto et al., 2002)(Iijima and Devreotes, 2002). En effet, les cellules PTEN nulles présentent un front de migration plus large enrichi en PI(3,4,5)P3(Huang et al., 2003). De plus, les neutrophiles nuls pour PTEN présentent des défauts de réponses à des chimio-attractant et présentent des défauts de migration dirigée(Heit et al., 2008). Par ailleurs, l'utilisation de l'inhibiteur de la PI3K LY294002 entraîne une perte rapide de la polarité de la cellule et de la migration dirigée(Chung et al., 2001). Dans les cellules privées des différentes iso formes de la PI3K, des phénotypes similaires de défauts de directionnalité, de vitesse des cellules et de polarité sont mesurés même après stimulation par l'AMP cyclique(Takeda et al., 2007). La PI3K est importante au maintien de la polarité avant/arrière en favorisant la production locale de PI(3,4,5)P3 à l'avant de la cellule.

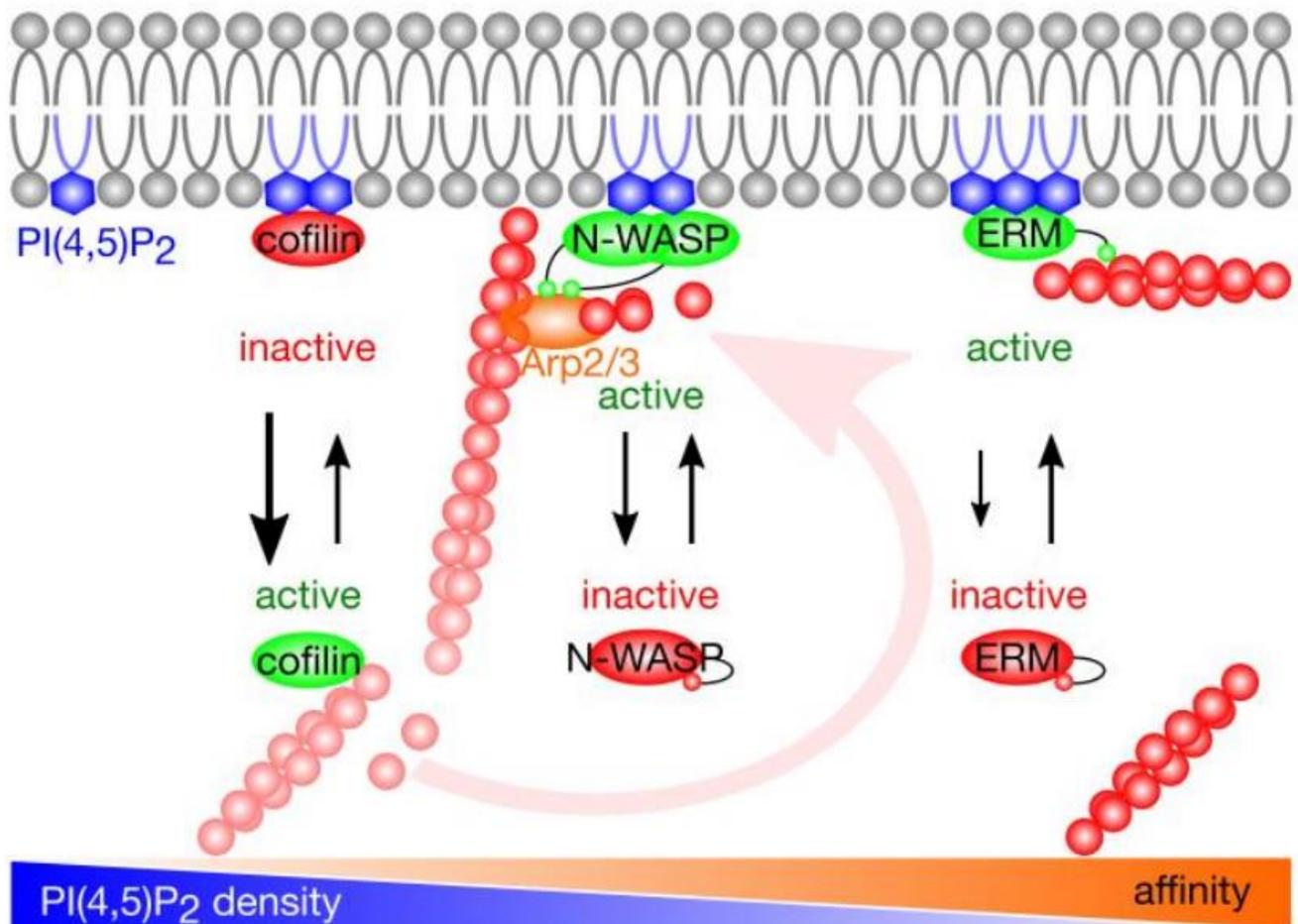
De plus, le produit de ces enzymes (PI(4,5)P2 ou PI(3,4,5)P3) recrute un certain nombre d'effecteurs qui vont jouer de multiples rôles dans la migration, comme la régulation de la dynamique de l'actine, des ACM et du trafic vésiculaire.

## 2. Le rôle du PI(4,5)P2 et PI(3,4,5)P3 dans la migration cellulaire

### 2.1 Rôle du PI(4,5)P2 et PI(3,4,5)P3 dans la dynamique de l'actine

Le PI(4,5)P2 et le PI(3,4,5)P3 sont les PPI les mieux caractérisés dans la régulation de la dynamique de l'actine à travers le recrutement d'acteurs, généralement à la membrane plasmique (Figure 14). En général, le PI(4,5)P2, plus abondant, interagit directement avec certaines protéines se liant à l'actine (PLA) alors que le PI(3,4,5)P3 recrute et active les nucléateurs de l'actine à travers l'activation des RhoGTPases (Saarikangas et al., 2010). Le PI(4,5)P2 inhibe les PLA qui favorisent le désassemblage de l'actine, comme l'ADF/Cofiline, la profiline et les protéines de « capping » gelsoline (Mandal, 2020). En revanche, le PI(4,5)P2 active les protéines ERM, N-WASP et les formines mDia1/2 qui régulent de manière positive la polymérisation de l'actine. A l'état inactivé, ces régulateurs positifs sont localisés dans le cytosol et adoptent une conformation inactive. Le PI(4,5)P2 situé à la membrane plasmique modifie leur conformation et les active. Par exemple, les extrémités NH2 et COOH de la protéine N-WASP interagissent entre elles, ce qui permet à la protéine de masquer ses domaines présentant de l'affinité pour le nucléateur d'actine branchée Arp2/3 (Rohatgi et al., 2000). Dans cette conformation la protéine est inactive. L'interaction du PI(4,5)P2 avec N-WASP entraîne la diminution de l'affinité entre les deux extrémités de la protéine, qui adopte une conformation ouverte, permettant ainsi d'activer Arp2-3 (Rohatgi et al., 2000). De manière importante, le PI(4,5)P active N-WASP de manière coopérative avec Cdc42, Rac1 et Nck. De plus, le PI(4,5)P2 favorise l'inhibition des régulateurs négatifs de l'actine en les séquestrant physiquement à la membrane plasmique (Zhao et al., 2010). Par exemple, l'ADF/Cofiline se lie à l'actine et favorise sa dépolymérisation (Bernstein and Bamburg, 2010). Lorsque la densité en PIP2 à la membrane plasmique varie, l'ADF/Cofiline se détache de l'actine et se lie au PI(4,5)P2, libérant ainsi l'actine de ce régulateur négatif (Zhao et al., 2010). Plusieurs études révèlent que les PLA interagissent avec la membrane à travers des motifs, moins complexes que le domaine PH, qui contiennent des résidus basiques et hydrophobes qui interagissent avec les charges négatives des groupements phosphates des PPI (Tomasevic et al., 2007, Zhao et al., 2010, Gorbatyuk et al., 2006, Janmey and Stossel, 1987). Cependant, la dynamique et l'affinité avec laquelle les PLA se lient au PI(4,5)P2 sont différentes et corrèlent avec leur fonction (Senju et al., 2017). Les PLA agissent

comme senseurs du niveau du PI(4,5)P2 (Figure 14). Les formines mDia2 et la protéine N-WASP ont une affinité importante pour le PI(4,5)P2 à la membrane plasmique, ce qui permet d'établir une interaction rapide et durable avec les membranes (Senju et al., 2017) favorisant ainsi, dans les zones protrusives, l'assemblage et la nucléation de l'actine. En revanche, les régulateurs négatifs de l'actine comme la profiline et la cofiline ont peu d'affinité avec le PI(4,5)P2. Ils s'associent de manière moins durable avec le PI(4,5)P2 et restent éloignés des membranes là où ils régulent le désassemblage de l'actine. De manière intéressante, les protéines ezrine, radixine et moesine (ERM) ont une très forte affinité pour les membranes contenant du PI(4,5)P2. Ces protéines établissent un lien entre la MP et l'actine cortical tout autour de la cellule et nécessitent des niveaux moins importants en PI(4,5)P2 pour être recrutés à la MP (Senju et al., 2017).



de (Senju and Lappalainen, 2019)

**Figure 14. Le PI(4,5)P2 régule la dynamique de l'actine.** La cofilin, N-WASP et les protéines ERM se lient au PI(4,5)P2 avec différentes affinités. Les cofiline, régulateurs négatifs de l'actine, sont inactivées par le PI(4,5)P2, ce qui leur permet de rester dans une conformation active lorsqu'elles sont éloignées de la membrane plasmique. N-WASP a une forte affinité pour le PI(4,5)P2 et régule de manière positive la polymérisation de l'actine dans les zones enrichies en PI(4,5)P2. Les protéines ERM qui régulent l'actine corticale et la forme de la cellule sont recrutées tout autour de la cellule. Elles ne nécessitent pas d'une importante densité en PI(4,5)P2 pour être recrutées car elles possèdent beaucoup d'affinité pour ce phospholipide.

La dynamique de l'actine est régulée par les formes actives des RhoGTPase, chefs d'orchestres de la migration cellulaire (cf figure 14). La GTPase Cdc42 se lie et active N-WASP (Rohatgi et al., 2000) qui induit la polymérisation de l'actine pour générer des filopodes à l'avant de la cellule (Lawson and Ridley, 2018). Aux lamellipodes, la GTPase Rac1 interagit avec le complexe protéique WAVE et/ou N-WASP, qui active le nucléateur d'actine Arp2/3 et favorise la polymérisation d'actine branchée. De plus, Rac et Cdc42 agissent ensemble en

stimulant PAK et la kinase LIMK qui inhibe le facteur ADF/Cofiline (Lawson and Ridley, 2018). Proche du lamellipode, au niveau de la lamella, RhoA est activée et régule la polymérisation d'actine filamenteuse à travers la formine mDia1/2 (Lawson and Ridley, 2018, (Gupton et al., 2007). Ces structures d'actine filamenteuse se transforment en fibres de stress qui subissent des forces dépendantes de la myosine-II et exercent des tensions mécaniques sur les ACM. De plus RhoA régule la rétraction du lamellipode (Königs et al., 2014) de manière myosine-II dépendante. A l'arrière, RhoA est aussi active, et favorise la contractilité de l'actomyosine à travers l'activation de la voie ROCK/phosphatases de la Chaîne Légère de la Myosine (CLM) et stimule la rétraction du corps cellulaire. L'activation de ces RhoGTPases s'effectue par la régulation et le recrutement de leur GEF aux sites de fonctions. La présence de PI(3,4,5)P3 augmente l'activité de Vav, une GEF des RhoGTPase de la famille des Rho et l'activité de SOS et  $\alpha$ -Pix, des GEF de Rac (Han et al., 1998, Nimnual et al., 1998, Yoshii et al., 1999) . Le niveau du PI(3,4,5)P3 à la membrane plasmique est important pour activer et recruter les RhoGTPase Cdc42 et Rac1 puisque l'inhibition de la production du PI(3,4,5)P3 empêche l'activation de ces RhoGTPases (Benard et al., 1999, Hawkins et al., 1995). De plus le PI(4,5)P2 active RhoA (Staruschenko et al., 2004). Les RhoGTPases Rac1 et RhoA activent la kinase PI(4)P-5K qui phosphoryle le PI(4)P en position D5 et augmente le niveau de PI(4,5)P2 (Oude Weernink et al., 2000, Yang et al., 2004). Rac1, mais pas Cdc42, active la PI3K et génère l'accumulation du PI(3,4,5)P3 à l'avant de la cellule (Srinivasan et al., 2003, 3). Ainsi RhoA et Rac1 exercent une boucle de rétroaction positive qui amplifie localement la synthèse des PPI qui les activent.

Principalement, les GEFs se lient aux PPI grâce à leur domaine PH et activent les RhoGTPases à la membrane plasmique. Par exemple, la perturbation de l'intégrité structurelle du domaine PH de la GEF Dbs de RhoA et Cdc42 est associée à un défaut d'adressage de la GEF à la membrane plasmique (Whitehead et al., 1999). Les GEF PIX et Tiam-1 de Rac1 possèdent un domaine PH qui se lie au PI(3,4,5)P3. De plus, le PI(4,5)P2 est aussi important pour l'adressage des GEF à la membrane plasmique. Par exemple, une étude récente a montré que la GEF DOCK8 de Cdc42 se localise dans les zones enrichies en PI(4,5)P2 grâce à son domaine DHR-1 (Sakurai et al., 2021, 8). Cependant, le domaine DHR-1 de DOCK8 est capable de se lier également au PI(3,4,5)P3 (Premkumar et al., 2010).

Ainsi le PI(4,5)P2 et le PI(3,4,5)P3 sont d'importants messagers qui permettent de réguler la dynamique de l'actine au cours de la migration.

## 2.2 Rôle du PI(4,5)P2 et PI(3,4,5)P3 dans la dynamique des adhésions focales

La dynamique des ACM dépend majoritairement plus du PI(4,5)P2 que du PI(3,4,5)P3. Le PI(4,5)P2 se lie à de nombreuses protéines des adhésions focales, comme la taline, la vinculine, la paxilline et la kinase FAK et sert d'intermédiaire entre les ACM et l'actine (Mandal, 2020). Le PI(4,5)P2 intervient dans le processus d'assemblage et/ou de désassemblage des ACM en fonction du type cellulaire et du contexte. En effet, dans les cellules du colon HCT116 la déplétion de la kinase PIPKI $\gamma$  entraîne une réduction du pool de PI(4,5)P2 jusqu'à quarante pourcent par rapport aux cellules contrôles (Wu et al., 2011). Cette diminution corrèle avec l'inhibition de la formation des ACM. Par ailleurs, la surexpression de cette kinase augmente la vitesse d'assemblage et de désassemblage des ACM (Wu et al., 2011), suggérant une régulation des différentes étapes de la dynamique des ACM qui est dépendante de la quantité de PI(4,5)P2 à la membrane plasmique. Au contraire, dans les cellules MDA-MB-231, la déplétion optogénétique du pool de PI(4,5)P2 à la membrane plasmique entraîne l'accumulation d'ACM de taille importante suggérant un défaut de désassemblage (D'Souza et al., 2020). Au cours de l'assemblage et de la maturation des ACM, plusieurs adaptateurs, comme la vinculine sont recrutés à la membrane plasmique pour lier les ACM à l'actine. La vinculine est importante au cours de la formation des adhésions naissantes car elle recrute d'autres protéines adaptatrices comme la taline, l' $\alpha$ -actinine et la paxilline (Hüttelmaier et al., 1998). La vinculine adopte une conformation fermée dans le cytosol, qui masque les sites d'interactions avec les protéines adaptatrices (Hüttelmaier et al., 1998, Johnson and Craig, 1994, Johnson and Craig, 1995, Kroemker et al., 1994). De plus, la vinculine possède deux sites d'interaction avec certains PPI acides (chargés négativement) (Bakolitsa et al., 1999, Johnson et al., 1998). Par exemple, l'association de la vinculine au PI(4,5)P2 et sa phosphorylation par la kinase PKC permet à la vinculine d'adopter une conformation ouverte et de recruter les protéines adaptatrices des ACM. De plus, la kinase PKC nécessite la liaison au PI(4,5)P2 pour phosphoryler la vinculine (Ziegler et al., 2002). Le PI(4,5)P2 recrute et active également FAK, dont l'activité est importante pour réguler l'assemblage mais aussi le désassemblage des ACM au cours de la

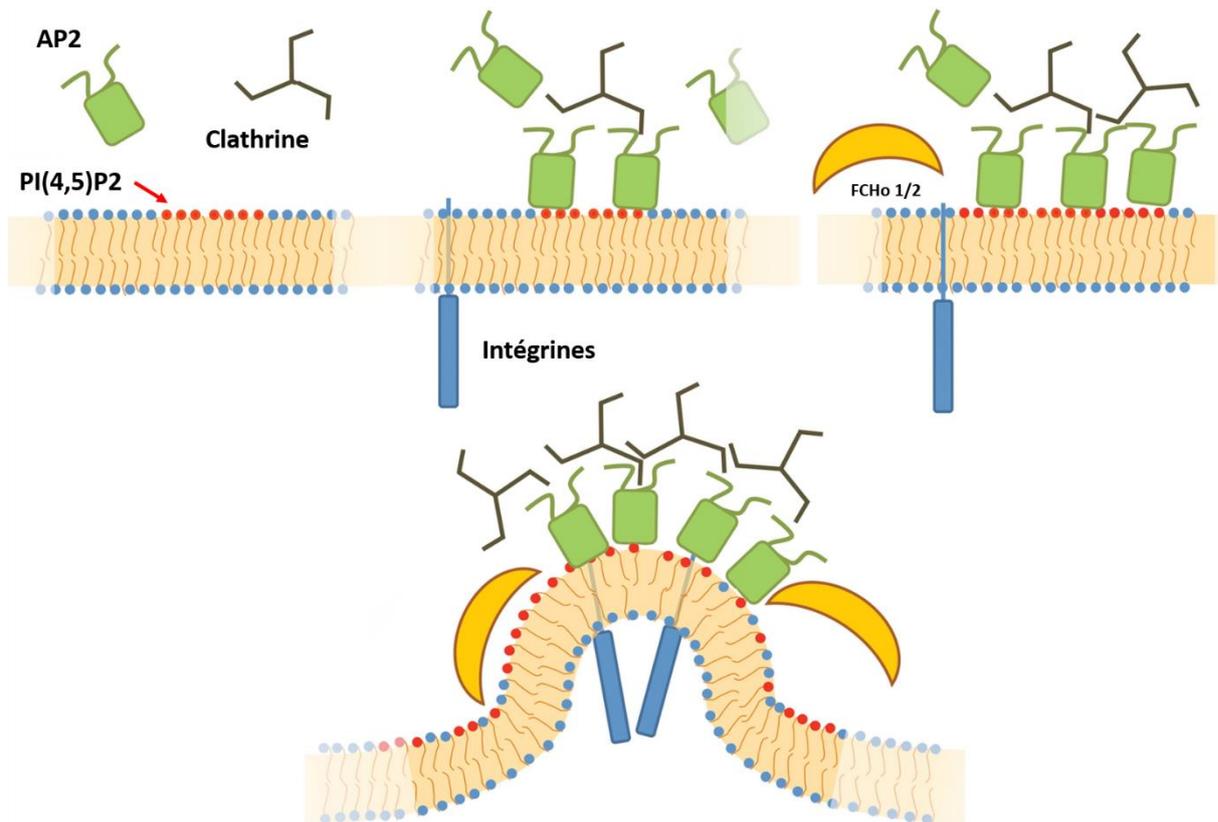
migration. Le recrutement de FAK à la membrane plasmique est associé à un changement de conformation et à son oligodimerisation (Acebrón et al., 2020). L'activation de FAK s'effectue via son autophosphorylation au niveau des résidus tyrosines entre son domaine FERM et le domaine kinase. Cette phosphorylation entraîne le recrutement de Src qui phosphoryle et active FAK. FAK se lie au PI(4,5)P2 de la membrane plasmique grâce aux résidus basiques de son domaine FERM (Cai et al., 2008). La liaison au PI(4,5)P2 entraîne une oligodimerisation de FAK via son domaine FERM, qui confère une conformation propice à son autophosphorylation et donc à son activation (Goñi et al., 2014). Ainsi, le PI(4,5)P2 à la membrane plasmique agit comme activateur des protéines des ACM. De plus, l'endocytose est un mécanisme important qui permet de favoriser l'internalisation et le recyclage des ACM. L'endocytose est également régulé par le PI(4,5)P2

### 2.3 Rôle du PI(4,5)P2 et PI(3,4,5) dans le trafic vésiculaire

L'endocytose médiée par la clathrine est une voie majeure d'internalisation de différents récepteurs, de molécules transmembranaires, et des intégrines. Au cours de la migration, l'endocytose des facteurs de croissance et des intégrines permet de transmettre leurs signaux à l'intérieur de la cellule. Au niveau de la membrane plasmique, la formation d'un manteau de clathrine est couplée à la courbure de la membrane générée par différentes protéines. Cette étape est suivie de la formation de vésicules qui se séparent de la membrane et suivent les routes d'endocytoses. De manière importante, l'actine joue un rôle de génération et de transmissions des forces dans le processus de courbure des membranes et dans la scission des vésicules. Le PI(4,5)P2 est également important pour réguler l'endocytose médié par la clathrine en recrutant des protéines adaptatrices (Figure 15). Par exemple, le complexe AP2, les protéines AP180, la dynamine, Num et Dab2 s'associent au PI(4,5)P2 à la membrane plasmique et participent au recrutement local de la clathrine (Bairstow et al., 2006, Ford et al., 2002, Posor et al., 2015). De plus, les kinases PIPKIs, qui génèrent le PI(4,5)P2, se lient et recrutent l'adaptateur AP2 de la clathrine (Krauss et al., 2006). AP2 est composé de deux petites sous unités  $\mu$ 2-adaptine et  $\sigma$ -adaptine et de deux sous unités  $\alpha$ -adaptine et  $\beta$ -adaptine plus larges. Le PI(4,5)P2 se lie à la sous unité  $\alpha$ -adaptine et génère un changement de conformation de AP2 et le recrutement de la clathrine. L'inhibition des kinases PIPKI $\beta$  ou PIPKI $\gamma$  est associée à des défauts d'endocytose de la

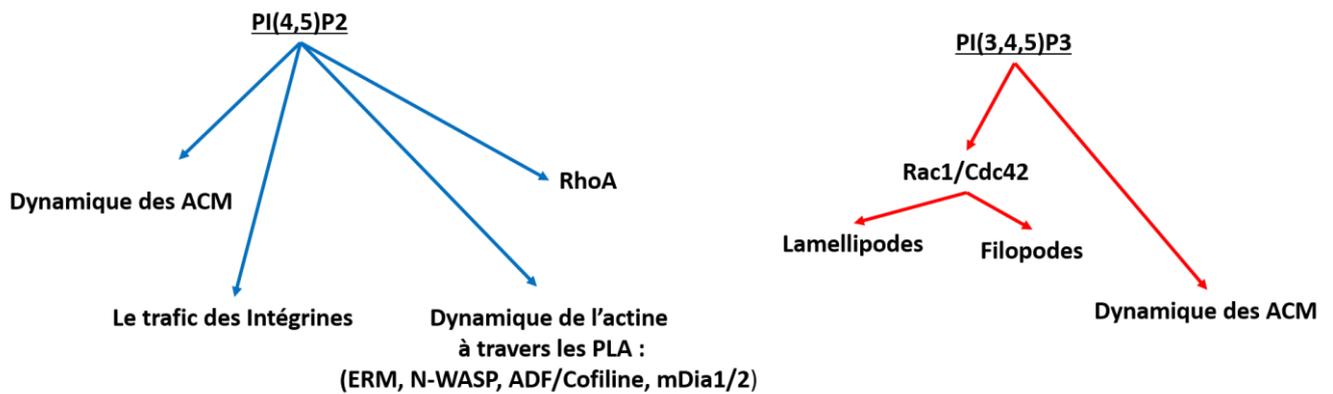
transferrine, soulignant notamment l'importance du PI(4,5)P2, produit de ces kinases (Padrón et al., 2003, Bairstow et al., 2006). Le PI(4,5)P2 influence également le recrutement des protéines à domaine BAR, qui vont réguler la formation d'actine. Par exemple, la protéine SNX9 à domaine BAR se lie directement au facteur N-WASP et favorise la polymérisation d'actine (Yarar et al., 2007). De plus, le PI(4,5)P2 est important pour la scission des vésicules car il recrute et active la dynamine (Zoncu et al., 2007, Zheng et al., 1996). La dynamine est une GTPase qui forme un anneau concentrique entre la membrane plasmique et la vésicule d'endocytose en cours de formation. Une fois activée, la dynamine change de conformation, ce qui entraîne la scission du lien entre la vésicule et la membrane. De plus, le PI(4,5)P2 joue un rôle crucial dans le trafic/recyclage des intégrines au cours de la migration. Par exemple, la kinase FAK, la taline et la kinase PIPKlg2 s'associent avec les intégrines pour les maintenir dans une conformation active au cours de leur internalisation et de leur recyclage (Nader et al., 2016). Ainsi, le maintien de l'activation des intégrines à l'aide de la coopération de ces différents facteurs permet de reformer rapidement des adhésions naissantes à l'avant de la cellule en cours de migration.

Ainsi, à travers le recrutement de différents facteurs, le PI(4,5)P2 et le PI(3,4,5)P3 sont des PPI importants pour la régulation de la dynamique de l'actine, des ACM, du trafic vésiculaire, et plus généralement de la migration (Figure 16).



adapté de (Swan, 2013)

**Figure 15. Rôle du PIP2 dans l'internalisation des intégrines.** A la membrane plasmique, les zones enrichies en PI(4,5)P2 recrutent l'AP2, adaptateur de la clathrine. Les protéines FCHO 1/2 participent à l'initiation de l'internalisation des cargos, comme les intégrines.



**Figure 16. Récapitulatif des rôles du PI(4,5)P2 et PI(3,4,5)P3 dans la migration.** Le PI(4,5)P2 stimule la dynamique des ACM, en recrutant par exemple la taline, la paxilline, et FAK. Il participe au trafic des intégrines, en recrutant les adaptateurs de la clathrine à la MP. Le PI(4,5)P2 régule la dynamique de l'actine à travers les PLA et l'activation de RhoA. Le PI(3,4,5)P3 active les RhoGTPase Rac1 et Cdc42 qui régulent la formation des lamellipodes et des filopodes. Le PI(3,4,5)P3 participe à la dynamique des ACM.

### **3. L'implication d'autres phosphoinositides dans la migration : Le PI(4)P et le PI(3,4)P2**

#### 3.1 Rôle du PI(4)P au Golgi et le trafic vésiculaire

Le rôle du PI4P dans la migration est peu caractérisé mais son implication dans la migration cellulaire fait l'objet de plus en plus d'études. Au trans Golgi, le niveau de PI4P peut être régulé par les kinases PI4KIII $\beta$  et PI4KII $\alpha$  qui phosphorylent le PI en PI4P, et la phosphatase SAC1 qui déphosphoryle le PI4P en PI (Bankaitis et al., 2012). L'inhibition de la PI4KIII $\beta$  entraîne la diminution du PI4P au trans Golgi et cela corrèle avec un défaut d'invasion des cellules du cancer du sein (Tokuda et al., 2014). En revanche, l'inhibition de SAC1 entraîne l'accumulation du PI4P et stimule l'invasion de ces cellules cancéreuses (Tokuda et al., 2014). La réorientation du Golgi suivant l'axe de migration mais également son architecture sont des caractéristiques importantes pour assurer la migration cellulaire (Kupfer et al., 1982, Millarte and Farhan, 2012, Millarte and Farhan, 2012). En effet, l'utilisation de drogues qui perturbent l'architecture du Golgi inhibe la migration. En particulier, l'inhibition de la Golgin-160 et GMAP120 génère une fragmentation du Golgi associée à des défauts de migration (Yadav et al., 2009). Le repositionnement du Golgi en suivant l'axe de migration et sa structure allongée s'établissent grâce au lien physique avec le cytosquelette d'actine (Xing et al., 2016, Dippold et al., 2009). Dans ce contexte, le PI4P sert d'ancrage à la protéine GOLPH3, qui se lie à l'actine via l'interaction avec la Myosine 18A non conventionnelle qui génère des forces de tensions sur le Golgi. La surexpression de GOLPH3 favorise le repositionnement du Golgi le long de l'axe de migration et accélère la migration. De plus l'inhibition de GOLPH3 et de la Myosine 18A entraîne un défaut d'orientation du Golgi et de la migration cellulaire. En plus de réguler la forme du Golgi, le complexe

PI4P/GOLPH3/Myosine18A/F-actine est requis pour la formation de vésicules et la mise en place du trafic polarisé du Golgi vers la membrane plasmique. Lorsque GOLPH3 interagit avec le PI4P du trans Golgi, sa boucle  $\beta$  hydrophobe s'insère dans la membrane du Golgi et entraîne sa courbure, ce qui favorise la formation de tubules et de vésicules (Rahajeng et al., 2019). L'utilisation d'une forme de GOLPH3 incapable de se lier au PI4P montre l'absence de formation de tubules du Golgi, indiquant que le PI4P est nécessaire à cette fonction. Il est établi qu'au cours de la migration, le Golgi régule le trafic polarisé de vésicules vers la membrane plasmique, à l'avant de la cellule (Millarte and Farhan, 2012). La composition de ces vésicules n'est pas encore bien caractérisée. Cependant des études ont montré que GOLPH3 est impliqué dans la sécrétion de facteurs pro-invasifs (Halberg et al., 2016, Zhou et al., 2013). En effet, l'inhibition de GOLPH3 est associée à une réduction de la sécrétion des métalloprotéases MMP2 et MMP14 dans les gliomes et diminue leur capacité d'invasion. De plus, l'effecteur du PI4P PITPNC1 recrute Rab1b au Golgi. Rab1b recrute à son tour GOLPH3 ce qui facilite la formation de vésicules et la sécrétion de facteurs pro-invasif et pro-angiogénèse comme MMP1, HTRA1 et PDGFA. Ainsi à travers ses effecteurs GOLPH3 et PITPNC1, le PI4P au trans-Golgi est important pour réguler la migration des cellules.

### 3.2 Rôle du PI(3,4)P2 dans la polarité cellulaire

Un nombre croissant d'études révèle l'importance du PI(3,4)P2 au cours de la migration. Certains effecteurs du PI(3,4)P2 sont communs avec le PI(3,4,5)P3, comme les protéines Akt/PKB. D'autres effecteurs du PI(3,4)P2 sont spécifiques, comme la lamellipodine qui régule la formation de structures protrusives et la dynamique de l'actine (Krause et al., 2004, Yoshinaga et al., 2012, Hansen and Mullins, 2015). La dérégulation de la lamellipodine, à travers sa surexpression ou inhibition, entraîne des défauts de motilité (Li et al., 2016). Par exemple, la surexpression de la lamellipodine entraîne l'accélération de la vitesse d'extension des lamellipodes ; alors que son inhibition impact la formation de ces derniers et leur vitesse d'expansion (Krause et al., 2004). La lamellipodine se lie à l'actine, recrute le complexe Ena/VASP au bout des lamellipodes et augmente son activité de polymérisation de l'actine (Hansen and Mullins, 2015). Au cours de la migration stimulée par le facteur SDF, la lamellipodine est recrutée dans les zones protrusives de la membrane

plasmique enrichies en PI(3,4)P<sub>2</sub>, via son domaine PH. Ce recrutement à la membrane plasmique souligne l'importance du PI(3,4)P<sub>2</sub> au cours de la migration (Li et al., 2016). En plus de recruter des régulateurs de l'actine, le PI(3,4)P<sub>2</sub> joue un rôle important dans le trafic des intégrines et la dynamique des ACM. Dans les cellules MDA-MB-231, la phosphatase SHIP2 déphosphoryle le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> en position D5 et génère du PI(3,4)P<sub>2</sub> aux adhésions focales. Le PI(3,4)P<sub>2</sub> favorise le turnover des ACM puisque l'inhibition de SHIP2 entraîne le développement des ACM, augmente l'étalement des cellules et diminue leur capacité d'invasion (Fukumoto et al., 2017). Par ailleurs, la production de PI(3,4)P<sub>2</sub> aux invadopodes par la kinase PI3K et la phosphatase SHIP2 promeut la formation de vésicules de clathrine et stimule l'internalisation des intégrines (Feng and Yu, 2021, Posor et al., 2013). L'enrichissement local de PI(3,4)P<sub>2</sub> permet le recrutement des protéines SNX9 et de la dynamine DNM2. SNX9 est une protéine possédant un domaine PX-BAR qui contribue à la courbure membranaire et à l'internalisation des intégrines-β3. Le PI(3,4)P<sub>2</sub> est aussi important pour la régulation de l'activation de la kinase PI3K au cours de la maturation des invadopodes (Erami et al., 2019). Plus particulièrement, l'activation de l'iso-forme PI3Kβ nécessite la production de PI(3,4)P<sub>2</sub> par la phosphatase SHIP2 (Erami et al., 2019). Au cours de la migration, le PI(3,4)P<sub>2</sub> ne s'accumule pas uniquement à l'avant des cellules. Chez Dictyostelium, le PI(3,4)P<sub>2</sub> s'accumule à la MP au cours de la rétraction des protrusions (Li et al., 2018, (Saarikangas et al., 2010). Ce phénomène s'accompagne de la formation de vésicules de macropinosomes, enrichies en PI(3,4)P<sub>2</sub> qui sont transportées vers l'arrière de la cellule. Ces vésicules fusionnent avec la MP et génèrent l'accumulation locale du PI(3,4)P<sub>2</sub> à l'arrière des cellules. Chez Dictyostelium, le PI(3,4)P<sub>2</sub> inhibe l'activation de Ras, qui est une GTPase importante dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine (Lim et al., 2002). Ainsi, chez Dictyostelium, la régulation spatiale du PI(3,4)P<sub>2</sub> permet de réguler finement la polarité de la cellule et la dynamique du front de migration.

### III. Les Sites de Contacts Membranaires et la migration cellulaire

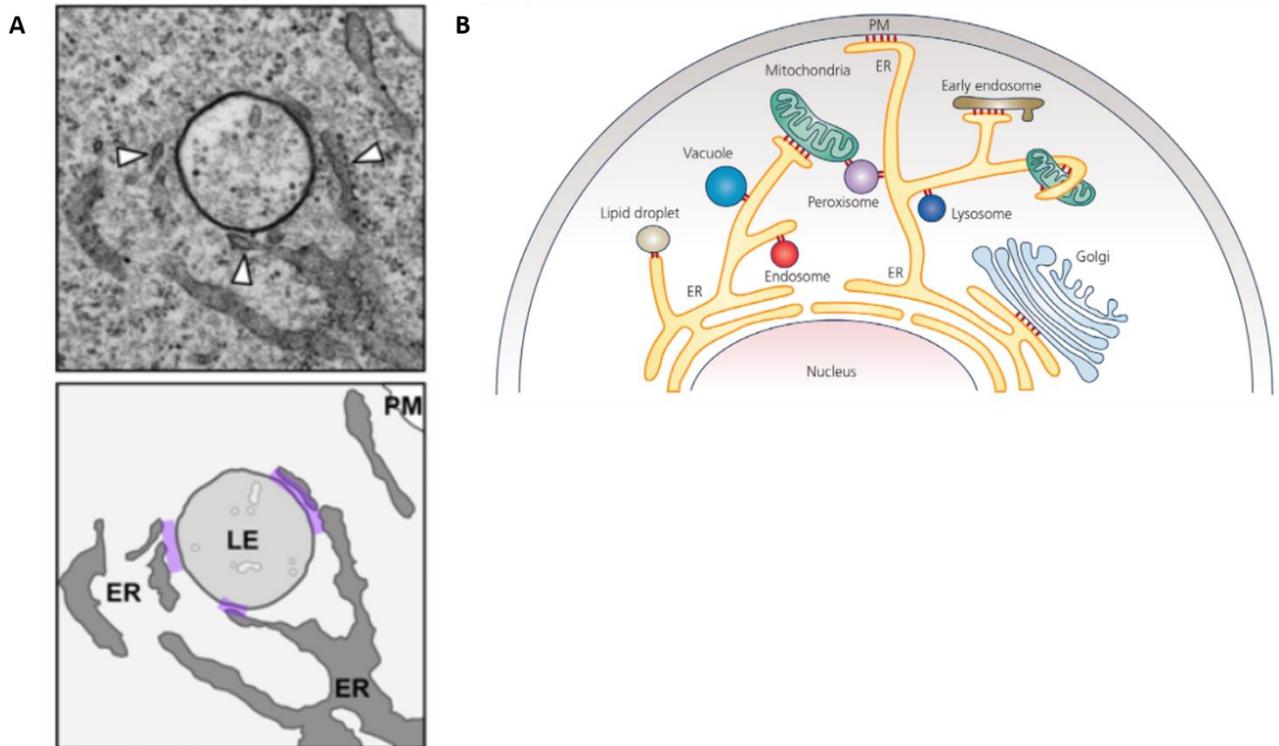
L'homéostasie des PPI est régulée par les kinases/phosphatases au cours de la migration. Par ailleurs, le métabolisme et le transport des PPI peuvent aussi s'établir à travers des mécanismes de transport non vésiculaire au niveau des sites de contacts membranaires.

#### 1. Définition et exemples de SCM

##### 1.1 Définition

Les sites de contacts membranaires (SCM) sont des zones d'apposition membranaire entre deux compartiments cellulaires, sans fusion membranaire (Figure 17). Ces zones de contact font intervenir des complexes protéiques qui remplissent différentes fonctions. Il existe deux types d'apposition membranaire : des contacts homotypiques et des contacts hétérotypiques (Scorrano et al., 2019). Les contacts homotypiques s'établissent entre deux organites identiques par exemple entre peroxysomes ou entre mitochondries. Les contacts hétérotypiques, les plus étudiés, s'établissent entre deux organites différents et font généralement intervenir le RE. Le RE peut établir des contacts hétérotypiques de quelques dizaines voire centaines de nanomètres de long avec la membrane plasmique, les endosomes, les mitochondries, le trans-golgi, les lysosomes, les gouttelettes lipidiques, les peroxysomes et le noyau (Friedman and Voeltz, 2011). Ces SCM présentent plusieurs caractéristiques. Tout d'abord, les membranes apposées sont distantes de 10 à 80 nm et sont les lieux de formation de multiples complexes protéiques (Scorrano et al., 2019). Dans la majorité des cas, des protéines ancrées au RE recrutent et interagissent avec des protéines cytosoliques ou ancrées à la membrane apposée. L'ensemble du complexe permet de maintenir les deux membranes en contact (Eisenberg-Bord et al., 2016). Ces SCM ont différentes fonctions : ils régulent les échanges et le métabolisme des lipides, les flux de  $Ca^{2+}$ , l'autophagie, le trafic, la dynamique membranaire, le positionnement et la dynamique des organites cellulaires (Prinz et al., 2020). Au cours de mon travail de thèse, en raison de la thématique du laboratoire, je me suis focalisé sur la fonction de transfert de lipides ayant lieu au niveau des SCM, mettant de côté les échanges de calcium. Cependant, il est

important de préciser que les études récentes montrent que ces deux fonctions sont inter-dépendantes, ce qui sera discuté dans la partie discussion du manuscrit.



Adapté de (Meneses-Salas et al., 2020) et (Jing et al., 2020)

**Figure 17. Schéma de la structure du RE et SCM.** **A** Image acquise en microscopie électronique à transmission donnant un exemple de site de contact membranaire entre les endosomes tardifs et le RE (flèches) dans des cellules CHO WT. **B** Schéma des principaux sites de contacts membranaires hétérotypiques entre le RE et les organites cellulaires. Le RE s'étend du noyau à la membrane plasmique et entre en contact avec tous les organites cellulaires.

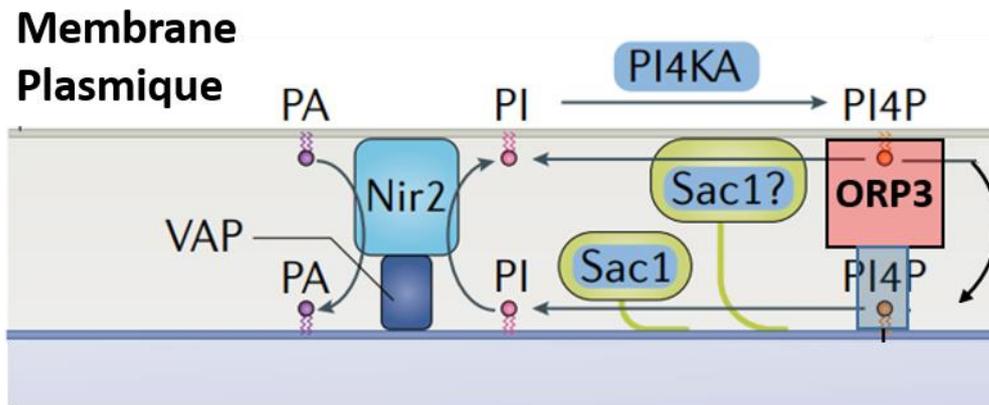
### 1.2 Des échanges asymétriques de lipides aux SCM : l'exemple du cycle du PI

Les échanges non vésiculaires de lipides s'établissent à travers trois mécanismes. Par les échanges monomériques de lipides entre différentes membranes, par la diffusion latérale de lipides ou par les échanges de lipides au sein d'une même bicouche lipidique catalysés par des flipases (Lev, 2010). Les échanges lipidiques monomériques entre deux membranes s'établissent de manière spontanée ou sont accélérés grâce à des protéines de transferts de lipides (PTL) qui agissent aux SCM (Lev, 2010). Les PTL possèdent une poche hydrophobe qui se lie à un lipide, l'extrait d'une membrane et le transfère à une autre

membrane. Ce processus de transfert ne nécessite pas de consommation d'énergie mais dépend de la composition lipidique locale des membranes (Lev, 2010). Les échanges de lipides sont généralement asymétriques et se déroulent en plusieurs étapes. Tout d'abord, la plupart de ces PTL est soluble et se lie à des protéines ancrées au RE, comme les protéines VAPs. De plus, ces PTL se lient généralement à la membrane apposée grâce à leur domaine PH. Elles transfèrent un type de lipide du RE vers la membrane apposée et par contre-échange transfèrent un lipide d'un type différent de la membrane apposée vers le RE. Ce contre échange n'est pas obligatoire. Il peut y avoir le transfert d'un lipide vers une membrane dans un seul sens uniquement. De plus, d'autres PTLs aux SCM RE-MP peuvent moduler le transfert de lipides sans interagir avec les protéines résidentes du RE. Par exemple, les protéines ORP5/8 qui sont ancrées au RE, se lient et échangent le PI4P de la MP contre du phosphatidylsérine (PS), ce qui permet de réguler le niveau de PI4P à la MP (Chung et al., 2015). L'un des exemples le mieux caractérisé d'échanges asymétriques de lipides concerne le cycle du PI entre la RE, la MP et le Golgi (Figure 18). Les SCM et la présence de kinases/phosphatases permet de réguler localement le métabolisme et la quantité de certains phosphoinositides, ou d'autres lipides, ce qui a un impact sur les voies de signalisation (Prinz et al., 2020). Aux SCM RE-MP médiés par les protéines VAPs, les protéines Nir2 transfèrent le PI du RE vers la MP. En contrepartie, l'acide phosphatique (AP) est transféré de la MP au RE. A la MP, les kinases PI4K peuvent phosphoryler le PI en position 4 pour synthétiser du PI4P. Ce PI4P peut être métabolisé en PI(4,5)P2 et PI(3,4,5)P3 ou peut être transféré au RE par les complexes VAPs-ORP3. Cependant, le lipide qui est échangé en contrepartie n'est pas encore clairement caractérisé. Au RE, la phosphatase Sac1 déphosphoryle le PI4P en PI, qui peut être ensuite transféré à la MP. De la même manière aux SCM RE-trans Golgi médiés par les protéines VAPs, les protéines Nir2 transfèrent du PI du RE vers le trans-Golgi qui peut être métabolisé en PI4P par les kinases PI4K. En échange, l'AP est échangé du trans-Golgi vers le RE. OSBP, à travers son interaction avec les protéines VAPs, transfère le PI4P du trans-Golgi au RE où Sac 1 peut déphosphoryler le PI4P en PI qui peut être à nouveau transféré au trans-Golgi. En échange OSBP transfère le cholestérol du RE vers le trans-Golgi, contre son gradient de concentration.

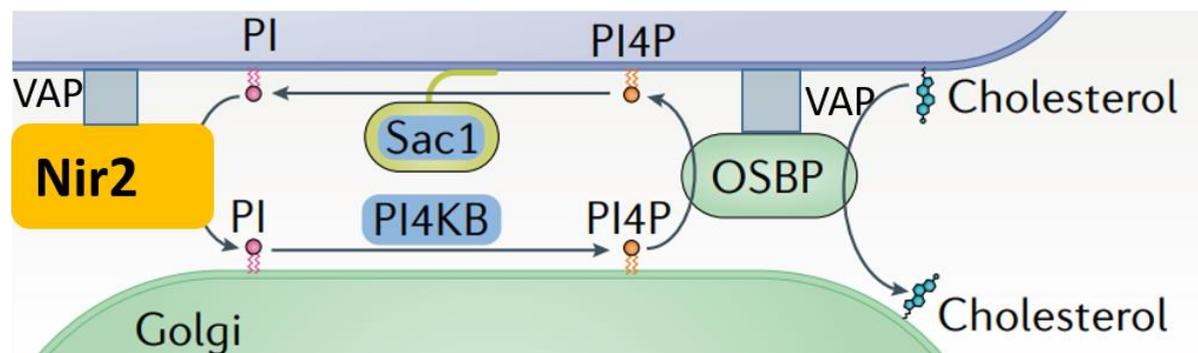
Ainsi, à travers cet exemple, les SCM hétérotypiques sont d'importantes plateformes d'échanges de lipides qui maintiennent et régulent l'homéostasie de certains lipides dans

les membranes cellulaires. Au cours de ma thèse je me suis concentré sur les protéines VAPs et la régulation du pool des PPI à la MP. Pour expliquer mes résultats, je m'intéresse dans la partie discussion de ce manuscrit aux partenaires des protéines VAPs ORP3 et Nir2, dont le rôle dans la migration a déjà été caractérisé et fait l'objet de la partie suivante.



**Réticulum endoplasmique**

**Réticulum endoplasmique**



Adapté de (Prinz et al., 2020)

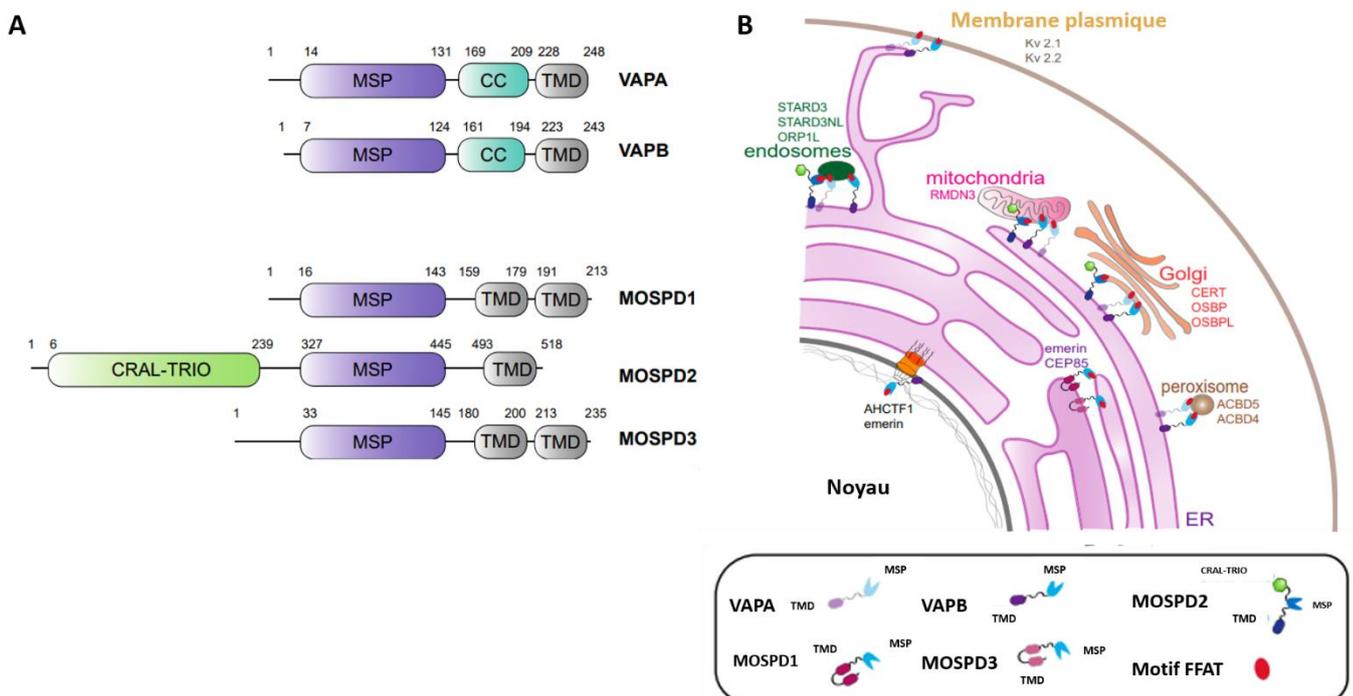
**Figure 18. Le cycle du PI aux SCM.** En haut, aux SCM RE-MP médiés par les protéines VAPs, les protéines Nir2 transfèrent le PI du RE vers la MP. Les kinases PI4K peuvent phosphoryler le PI en position 4 pour synthétiser du PI4P. Ce PI4P peut être métabolisé en PI(4,5)P2 et PI(3,4,5)P3 ou peut être transféré au RE par les complexes VAPs-ORP3. Au RE, la phosphatase Sac1 déphosphoryle le PI4P en PI, qui peut être ensuite transféré à la MP. De manière similaire, au Golgi, le PI peut être transféré du RE au trans-Golgi par le complexe VAPs/Nir2. Les kinases PI4KB peuvent phosphoryler le PI en PI4P qui peut être transporté au RE à travers le complexe VAPs/OSBP. Au RE, Sac1 peut déphosphoryler le PI4P en PI, qui peut être à nouveau transféré au trans-Golgi.

## **2. Les protéines VAPs ancrées au RE et leur partenaire ORP3 et Nir2 dans la migration cellulaire.**

### 2.1 Structure des protéines VAPs

Les protéines VAPs ont été clonées pour la première fois en 1995 à l'aide du système de double hybride chez *Aplysia californica* (Skehel et al., 1995). Une protéine de 33 kilodaltons a été identifiée et nommée VAMP-associated protein (VAP). Les protéines VAMP sont des protéines SNARE impliquées dans la fusion des vésicules synaptiques et qui interagissent avec SNAP-25 et les syntaxines (Chen and Scheller, 2001). Dans ce contexte, cette étude a montré que les protéines VAPs interagissent avec les protéines VAMP et régulent l'exocytose de neurotransmetteurs. Les protéines VAPs sont conservées chez les eucaryotes. Elles sont localisées principalement dans le RE et possèdent un domaine cytosolique (Lev et al., 2008). La famille des protéines VAPs inclue les protéines VAPA, VAPB et les protéines MOSPD 1/2/3 (Loewen and Levine, 2005, Di Mattia et al., 2018, Cabukusta et al., 2020, Di Mattia et al., 2018, James and Kehlenbach, 2021). Les protéines VAPs possèdent, en N-terminal, un domaine MSP (Major Sperm domain), à l'exception de MOSPD2 pour lequel le domaine MSP est central (Figure 19). Elles possèdent également un ou plusieurs domaines transmembranaire (TMD) en C terminal, permettant l'ancrage au RE (Figure 19). Les protéines VAPA et VAPB possèdent 63% de similarité. Ces deux protéines possèdent un domaine coiled-coil en leur centre. Au RE, les protéines VAPA et VAPB peuvent s'homodimeriser ou s'hétérodimeriser à travers leur domaine transmembranaire contenant un motif de dimérisation GxxxG et à travers leur domaine coiled-coil (Kaiser et al., 2005). Le domaine MSP des protéines VAPA et VAPB permet l'interaction avec de nombreux partenaires, généralement via leur motif FFAT (two phenylalanine in an acidic tract (Kaiser et al., 2005). La cristallographie de VAPA en complexe avec le motif FFAT d'ORP1 révèle que deux motifs FFAT interagissent avec deux domaines MSP. Plus particulièrement, la face chargée positivement du domaine MSP se lie aux résidus anioniques du domaine FFAT. La substitution des résidus du domaine MSP qui interagissent avec le domaine FFAT par des résidus acides suffit à abolir l'interaction. Par exemple, les mutations K94D et M96D (autrement appelée KD/MD) dans le domaine MSP de VAPA ou les mutations K87D et M89D dans le domaine MSP de VAPB, qui modifient la charge de VAP, empêchent l'interaction avec

le motif FFAT, sans modifier la structure du domaine MSP. De plus d'autres résidus dans le domaine MSP sont importants pour établir cette interaction comme les résidus K45, T47 et K118 (Loewen and Levine, 2005). Ainsi, les domaines MSP peuvent conférer une certaine spécificité d'interaction aux protéines VAPs : par exemple, les protéines MOSPD1 et MOSPD3 dont la séquence du domaine MSP diverge par rapport à celui de VAPA, VAPB et MOSPD2, reconnaissent et interagissent avec des motifs FFAT différents (Neefjes and Cabukusta, 2021).



de (James and Kehlenbach, 2021)

**Figure 19. Structure des protéines VAPs et localisation aux SCM.** A Structure des protéines VAPs. Les protéines VAPA et VAPB possèdent un domaine MSP d'interaction avec le motif FFAT de ses partenaires en N-terminal. Elles possèdent un domaine coiled coil (CC) en leur centre et un domaine transmembranaire (TMD) en C-terminal. Les protéines MOSPD sont dépourvues de domaine coiled coil. MOSPD1 et 3 ont un domaine MSP et deux domaines TMD. MOSPD2 possède un domaine TMD, MSP et un domaine CRAL-TRIO en C-terminal.

Les protéines VAPA et VAPB possèdent plus de 250 partenaires dont 50% sont en commun (James and Kehlenbach, 2021). La plupart de ces partenaires interagissent avec les protéines VAPA et VAPB à travers leur motif FFAT et ces partenaires sont souvent impliqués dans le transfert de lipides aux SCM (Figure 20). On peut prendre l'exemple des partenaires Nir2 et ORP3, qui interagissent avec VAPA et VAPB. De plus, il est important de noter que tous les

partenaires des protéines VAPs possédant un motif FFAT, ne sont pas forcément impliqués dans le transfert de lipides. Par exemple la protrudine régule le trafic des endosomes tardifs et la morphologie du RE. La protrudine, ancrée au RE, possède un motif FFAT qui lui permet d'interagir avec les protéines VAPs sans échanger de lipides.

<b>Protéines d'interaction</b>	<b>Protéine VAP</b>
SNAREs	
VAMP	aVAP-33
VAMP-1	VAP-A
VAMP-2	VAP-A
Syntaxin 1A	VAP-A
bet1	VAP-A
sec22	VAP-A
αSNAP	VAP-A
NSF	VAP-A
Viral proteins	
P48	VAP-A
Norwalk virus nonstructural protein	
NS5A HCV nonstructural (NS) protein	VAP-B
NS5A	VAP-A
NS5B	VAP-A
60K cowpea mosaic virus	VAP27-1/2
FFAT-proteins	
Opi1p	Scs2p
Osh1, Osh2, Osh3	Scs2p
OSBP	VAP-A
ORP1-4, 6, 7, 9	VAP-A(B)
CERT	VAP-A/B
Nir1, Nir2, Nir3	VAP-B(A)
ORP3	VAP-A(B)

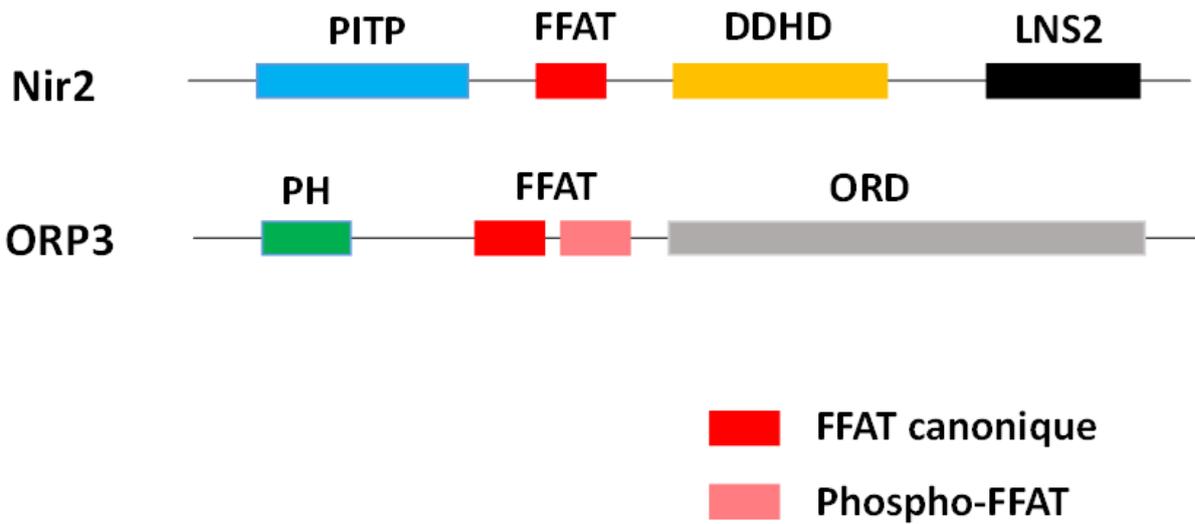
Adapté de (Lev et al., 2008)

**Figure 20. Liste exhaustive des partenaires de VAPA et VAPB.** Les protéines VAPA et VAPB possèdent de nombreux partenaires. Ces partenaires peuvent être spécifiques, comme la protéine NS5A du virus de l'hépatite C qui interagit spécifiquement avec VAPB. D'autres partenaires des protéines VAPs sont en commun, comme les protéines Nir2 et ORP3 (carré rouge). Nir2 et ORP3 interagissent avec VAPA et VAPB via leur domaine FFAT. Ces partenaires sont des PTL.

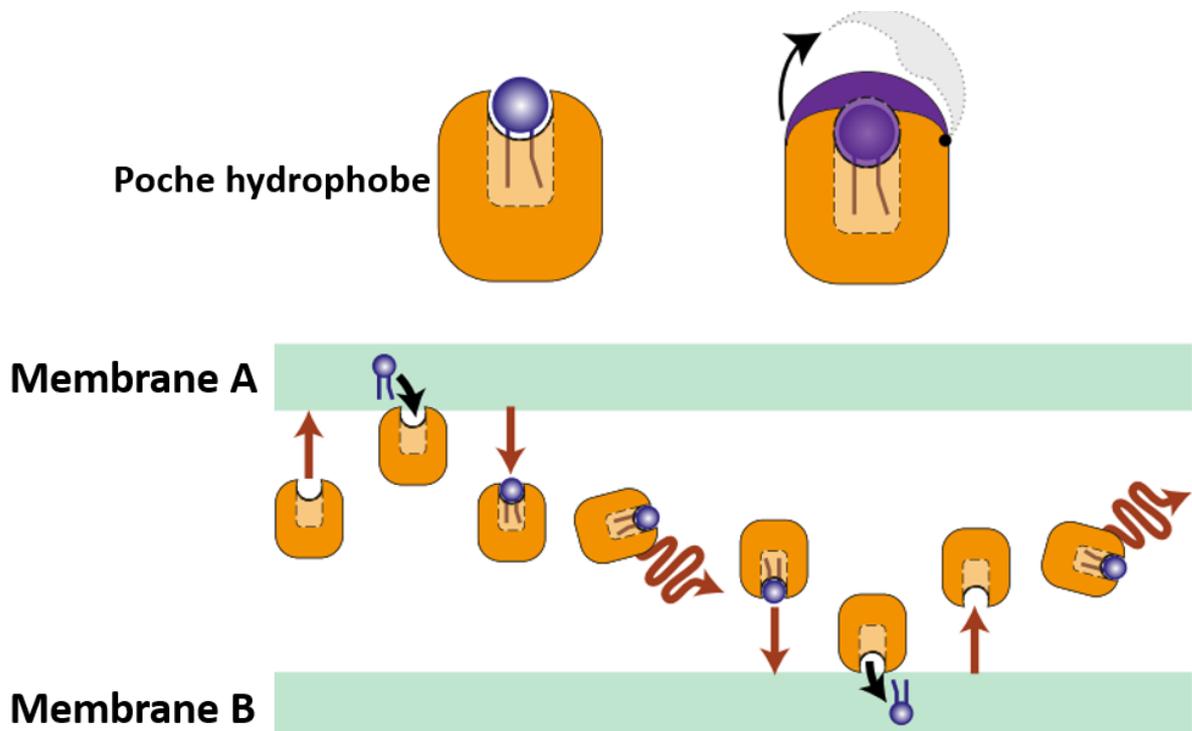
## 2.2 Structure des protéines PTL (protéines de transfert de lipides) s'associant aux protéines VAPs : Les exemples de Nir2 et ORP3

Généralement, les protéines PTLs possédant un motif FFAT et qui interagissent avec les protéines VAPs, sont cytosoliques. On distingue plusieurs familles de PTLs pouvant former un complexe avec les protéines VAPs, comme les oxysterol binding protein OSBP-related proteins ORPs, les ceramide transfer protein ( de la famille START), et les phosphatidylinositol transfer protein PITP qui regroupe les protéines Nir1/2/3 (Murphy and Levine, 2016). Parmi ces familles de protéines, nous nous intéressons aux protéines ORP3 et Nir2 qui appartiennent aux familles ORPs et PITP respectivement (Figure 21). Ces protéines sont recrutées au RE par les protéines VAPs (Loewen et al., 2004, Wyles and Ridgway, 2004, Amarilio et al., 2005, Kawano et al., 2006). Le motif FFAT consensus consiste en une séquence  $E^1F^2 F^3D^4A^5x^6E^7$  précédée par une région adjacente, vers le côté N-terminal, composée d'acides aminés acides anioniques (Loewen et al., 2003). Le motif FFAT, de charge négative, forme une boucle étendue qui interagit avec la face chargée positivement du domaine MSP des protéines VAPs. De plus, les résidus  $F^2$  et  $A^5$  établissent des interactions van-der-Waals avec deux poches hydrophobes du domaine MSP (Kaiser et al., 2005, Murphy and Levine, 2016). Il a été montré qu'initialement la liaison du domaine FFAT avec le domaine MSP se fait à travers l'interaction de la région adjacente acide du domaine FFAT avec la face chargée positivement du domaine MSP. Ensuite, cette liaison est renforcée par les liaisons spécifiques des acides aminés phénylalanine  $F^2$  et alanine  $A^5$  du domaine FFAT avec le domaine MSP (Furuita et al., 2010). Le motif FFAT peut contenir quelques variations de séquences. L'une des plus connues est la substitution des acides aminés phénylalanine (F) par des acides aminés qui peuvent être phosphorylés comme la sérine ou la thréonine et donc peuvent être chargés négativement (Di Mattia et al., 2020). On appelle ces motifs les phospho-FFAT dont la phosphorylation permet l'interaction avec les protéines VAPA et VAPB. Une même PTL peut avoir des motifs FFAT canonique et phospho-FFAT. C'est le cas

de la protéine ORP3, qui peut être phosphorylée par la kinase PKC (Gulyás et al., 2020). En revanche, Nir2 possède un seul motif canonique FFAT. Ainsi, la présence des motifs phospho-FFAT permet de réguler la localisation d'ORP3 aux SCM par des kinases/phosphatases et de favoriser la formation de SCM RE-MP (Gulyás et al., 2020). Par ailleurs il est important de préciser que les protéines MOSPD1 et MOSPD3 possèdent un domaine MSP qui interagit avec un motif FFAT non conventionnel appelé FFNT (two phenylalanines in a neutral tract). Ce motif ne possède pas ou peu de résidus qui correspondent à la région adjacente acide du FFAT conventionnel. En revanche, cette région adjacente comporte des résidus neutres (James and Kehlenbach, 2021). Au RE, les protéines VAPA, VAPB et MOSPD2 recrutent les PTL à travers l'interaction avec leur motifs FFAT conventionnels et les phospho-FFAT alors que les protéines MOSPD1 et MOSPD3 s'associent avec les protéines possédant un motif FFNT. De manière importante, les PTL possèdent un domaine qui permet leur association avec la membrane apposée au RE. Généralement ces domaines reconnaissent les lipides que les PTL extraient de la membrane et transfèrent au RE. Par exemple, les protéines de la famille ORP, comme ORP3, possèdent un domaine PH au niveau de la partie N-terminale reconnaissant le PI4P (Wu et al., 2018). Les protéines de la famille PITP, comme Nir2 possèdent en C-terminal un domaine LNS2 qui reconnaît l'AP à la membrane plasmique. En général, ces PTL établissent un transfert monomérique de lipide au cours duquel un lipide est chargé et transporté dans une poche hydrophobe qui se trouve au niveau du cœur de la protéine (Figure 22). Ce domaine, appelé ORD pour les protéines ORP3 et domaine PITP pour les protéines Nir2, possède un « couvercle » qui protège le lipide transporté de la phase aqueuse du cytosol et qui s'ouvre lors de l'apport du lipide et du chargement d'un autre lipide à la membrane apposée (Wong et al., 2019). Dans certains cas, des changements de conformation très rapides sont induits lorsque que la PTL s'associe à la membrane, ce qui permet notamment l'ouverture de la poche hydrophobe, le chargement du lipide et son transfert vers la membrane apposée. De plus, la poche hydrophobe des PTL est souvent bispécifique, traduisant la possibilité de lier deux types de lipides différents et d'établir ainsi des échanges asymétriques entre membranes. Les PTL oscillent donc entre la conformation fermée et ouverte aux SCM, ce qui est possible à travers leur recrutement au RE via le domaine FFAT et à la membrane apposée grâce au domaine PH et à leur domaine de transfert de lipides.



**Figure 21. Exemples d'organisation de PTLs possédant un domaine FFAT.** Les protéines Nir2 possèdent en N-terminal un domaine de transfert de lipide PITP. Elles possèdent un domaine FFAT de liaison aux motifs MSP des protéines VAPs et un domaine de liaison à l'acide phosphatique (AP) LNS2 en C-terminal. Les protéines ORP3 possèdent un domaine PH de liaison aux phosphoinositides, un domaine FFAT canonique et non canonique et un domaine de transfert de lipide, domaine ORD en C-terminal.



Adapté de (Wong et al., 2019)

**Figure 22. Transfert monomérique de lipide entre membranes.** En haut est représenté une poche hydrophobe d'un domaine échangeur de lipides d'une PTL. A gauche, la poche hydrophobe expose la tête hydrophile du lipide au milieu aqueux du cytoplasme. A droite un « couvercle » protège le lipide du milieu aqueux. En bas, le transfert d'un lipide nécessite plusieurs étapes : Le chargement du lipide de la membrane A dans la poche hydrophobe, la rotation de la poche contenant le lipide dans l'espace inter-membranaire, la réception et l'ancrage du lipide dans la membrane B.

### 2.3 Fonctions des protéines VAPs

Les protéines VAPs sont très conservées entre les organismes eucaryotes, que ce soit chez les plantes, la souris, les nématodes ou encore chez les mouches et sont ubiquitaires dans les cellules humaines (Amarilio et al., 2005, Kors et al., 2022). Les protéines VAPs sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires. Elles régulent la stabilité du réseau des microtubules (Amarilio et al., 2005) ou la réponse UPR (Kagiwada et al., 1998). Les protéines VAPs interagissent avec les protéines non structurales NS5A et NS5B du virus de l'hépatite C, ce qui est essentiel pour la réplication du virus (Gao et al., 2004, Hamamoto et al., 2005). Une mutation dans le gène codant VAPB a été identifiée dans trois formes de maladies familiales de neurones moteurs (Nishimura et al., 2005, Nishimura et al., 2004). De plus, les protéines VAPs, régulent la morphologie du RE, à travers l'interaction des VAPs avec ses partenaires possédant un motif FFAT, comme par exemple la protrudine ou les protéines Nir2/3 (Hashimoto et al., 2014, Amarilio et al., 2005). Mais leur rôle principal consiste à réguler le transport non vésiculaire de lipide (figure 23) et le trafic des endosomes (Lev et al., 2008).

#### Régulation des PPI par les protéines VAPs

Dans les cellules rénales HEK293T, l'inhibition des protéines VAPs est associée à une augmentation du niveau du PI4P au Golgi (Mao et al., 2019). Cependant, il existe des résultats contradictoires, liés peut-être au type cellulaire. En effet, l'inhibition des protéines VAPs dans les cellules HeLa est associée à une diminution de la quantité de PI4P au Golgi détectée à l'aide de la sonde PH-OSBP-GFP (Peretti et al., 2008). Cette sonde fluorescente, qui est le domaine PH de la protéine OSBP fusionné à la GFP, est régulièrement utilisée pour visualiser le PI4P intracellulaire. La diminution du PI4P au Golgi s'accompagne d'une diminution de la SM et du DAG au Golgi. En effet dans cette condition, la protéine CERT n'est plus adressée au Golgi, ce qui inhibe le transfert de la Céramide, précurseur de la SM et du

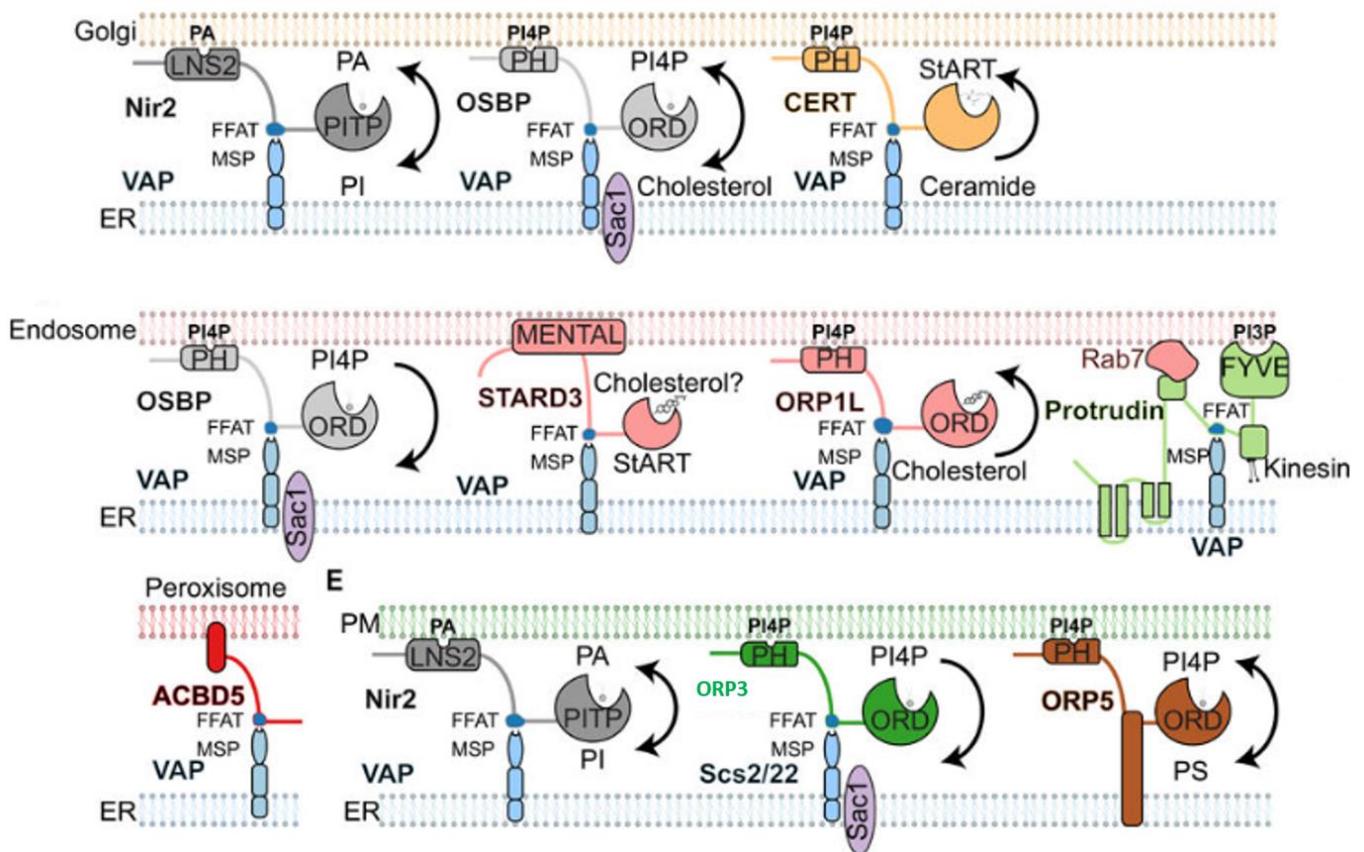
DAG, au Golgi. Une autre étude a montré que la déplétion des protéines VAPs dans les cellules HeLa est associée à l'augmentation de l'abondance du PI4P dans les endosomes (Dong et al., 2016). De manière intéressante, ce phénotype est sauvé par la surexpression de la forme VAPA ou VAPB exogène, suggérant une redondance entre VAPA et VAPB pour la régulation du PI4P au Golgi. Dans ces cellules HeLa, les VAPs régulent la nucléation de l'actine WASH-dépendante et le trafic des endosomes vers le Golgi. En effet, dans les cellules déplétées pour les VAPs, l'accumulation d'actine autour des endosomes entraîne la formation de comètes d'actine. L'apparition de ce phénotype est liée à l'abondance anormale de PI4P aux endosomes puisque dans les cellules déplétées pour OSBP on retrouve également une accumulation de PI4P et la formation de comète d'actine aux endosomes. De plus, l'inhibition des kinases PI4K aux endosomes réduit de manière significative l'abondance d'actine aux endosomes. En plus de réguler le niveau de PI4P au Golgi et aux endosomes, les protéines VAPs régulent la quantité de PI4P à la MP de la levure. Les orthologues Scs2 et Scs22 sont les protéines VAPs chez la levure (Manford et al., 2012). Dans les doubles mutants Scs2/Scs22 le niveau de PI4P à la MP est 3 fois plus important par rapport au contrôle. Chez la levure les protéines Scs2/Scs22 peuvent activer Sac1 aux SCM RE-MP et ainsi permettre de phosphoryler le PI4P de la MP en PI. En absence des protéines Scs2/Scs22, la phosphatase Sac1 n'est plus recrutée aux SCM RE-MP, ce qui corrèle avec l'accumulation de PI4P à la MP dans les doubles mutants.

Les protéines VAPs, régulent le transfert de nombreux lipides par l'interaction leurs partenaires. Par exemple aux SCM RE/Golgi les protéines VAPs ancrées au RE interagissent avec des partenaires PTL comme Nir2, CERT et OSBP. CERT se lie au PI4P du trans-Golgi via son domaine PH et s'associe aux protéines VAPs du RE (Kumagai and Hanada, 2019). CERT transfère le céramide du RE au Golgi grâce à son domaine StART. Le céramide est métabolisée en shingomyéline (SM) et en DAG au Golgi. OSBP se lie également au PI4P du trans-Golgi grâce à son domaine PH et interagit avec les protéines VAPs (Mesmin et al., 2017). OSBP transfère du cholestérol contre son gradient de concentration du RE vers le trans-Golgi grâce au transfert du PI4P du trans-Golgi vers le RE (Mesmin et al., 2017). Ceci nécessite la production de PI4P au trans-Golgi. En effet, l'inactivation de la kinase PI4KIII $\beta$  qui hydrolyse le PI en PI4P génère des vagues de PI4P au trans-golgi qui sont dues à la kinase PI4KII $\alpha$ . Ces vagues sont associées à un déplacement des SCM RE-Golgi dans

les zones du trans-golgi enrichies en PI4P. Ce transfert de PI4P par VAPs/OSBP peut être facilité également par Nir2 qui transfère du PI du RE au Golgi, générant ainsi un pool de précurseur du PI4P (Amarilio et al., 2005).

### **Régulation du trafic des endosomes par les protéines VAPs**

Les protéines VAPs régulent d'autres fonctions cellulaires comme le trafic des endosomes tardifs sur les microtubules vers les extrémités moins (-) et plus (+). Le trafic des endosomes tardifs est régulé par le niveau de cholestérol notamment détecté par les SCM RE-endosomes médiés par VAPs/ORP1L. Lorsque le niveau de cholestérol aux endosomes tardifs est bas, ORP1L s'associe à VAPA. Cette association inhibe l'association des endosomes avec la dynéine à travers le complexe RILP-Rab7 et empêche leur mouvement vers l'extrémité (-) des microtubules. Aux SCM ORP1L/VAPA, le cholestérol peut être transféré du RE vers les endosomes. Lorsque le niveau de cholestérol est plus important aux endosomes, la protéine ORP1L adopte une conformation qui ne permet plus son association avec VAPA. Ainsi, la dynéine peut s'associer aux endosomes et les transporter vers l'extrémité (-), en direction du centre de la cellule (van der Kant et al., 2013, Rocha et al., 2009). De plus aux SCM RE-endosome, les protéines VAPs peuvent s'associer avec la protrudine et Rab7, qui favorisent le chargement de la kinésine sur les endosomes tardifs et régulent leur trafic vers l'extrémité (+) des microtubules, du centre de la cellule vers la MP (Raiborg et al., 2015). Ainsi les protéines VAPs régulent de nombreuses fonctions et jouent un rôle important dans la régulation du niveau du PI4P à la membrane du trans-golgi, des endosomes et de la MP.



de (Wu et al., 2018)

**Figure 23. Les protéines VAPs et le transfert de lipides à travers la cellule.** SCM médiés par les protéines VAPs et ses partenaires au Golgi, endosomes, peroxisome, et à la membrane plasmique. En bas à droite, ORP5 ne nécessite pas d'interagir avec les protéines VAP pour transférer des lipides. Le complexe VAPs/Protrudine ne régule pas l'échange de lipide, mais la position des endosomes tardifs.

## 2.4 Rôle des PTL partenaires des VAPs dans la migration cellulaire

### 2.4.1 Rôle de la protéine ORP3 dans la migration cellulaire

Parmi les protéines ORPs, la protéine ORP3 est connue pour son implication dans la dynamique des ACM. Dans les cellules HEK293, ORP3 co-localise avec des marqueurs du RE (Lehto et al., 2008). De plus, la forme endogène d'ORP3 se localise à la MP et se concentre à l'extrémité des structures protrusives comme les filopodes. ORP3 régule la dynamique de l'actine et la formation de protrusions. En effet, la surexpression d'ORP3 est associée à la formation de longues protrusions alors que l'inhibition d'ORP3 diminue considérablement la formation de filopodes et perturbe les structures du cytosquelette d'actine. Ce phénotype de protrusions n'est pas lié à l'interaction d'ORP3 avec les protéines VAPs mais dépendant de son adressage à la membrane plasmique. En effet, lorsqu'une forme d'ORP3 inactive pour

son motif FFAT est surexprimée, les protrusions induites par ORP3 ne sont pas différentes de celles observées avec la forme d'ORP3 sauvage. En revanche, la surexpression d'une forme d'ORP3 déplétée de son domaine PH inhibe la formation de longues protrusions. ORP3 est un important facteur pour réguler également la formation d'adhésions focales. Dans les cellules HEK293, la déplétion d'ORP3 entraîne l'augmentation de l'étalement sur fibronectine, suggérant un défaut des ACM. La déplétion d'ORP3 est accompagnée d'une inhibition de la formation des ACM (Lehto et al., 2008). ORP3 possède deux motifs FFAT. Le motif FFAT1 est un motif consensus canonique et le domaine phospho-FFAT2 est susceptible d'être phosphorylé (Weber-Boyyat et al., 2015). Ces deux motifs sont importants pour réguler la dynamique des ACM. La phosphorylation d'ORP3 stimulée par le traitement à la PMA permet son association avec VAPA à la MP. Cette association dépend également du domaine PH d'ORP3. L'interaction VAPA/ORP3 recrute R-Ras, une GTPase importante au cours de la migration. La voie PI3K/Akt est une cible majeure de cette GTPase (Marte et al., 1997). Le complexe VAPA/ORP3 active R-Ras et stimule l'activation des intégrines  $\beta$ 1. De plus, l'activation des intégrines est amplifiée lorsque les formes sauvages d'ORP3 et VAPA sont surexprimées (Weber-Boyyat et al., 2015). En revanche, cette stimulation n'est pas observée lorsque la forme d'ORP3 mutée dans ses domaines FFAT1 et FFAT2 est surexprimée. Récemment, il a été montré qu'ORP3 participe au désassemblage des ACM. ORP3 est recrutée à la MP en réponse à l'influx de  $Ca^{2+}$ , du niveau du PI4P et du PI(4,5)P2 à la MP et de la phosphorylation de son phospho-FFAT médié par la protéine kinase C (PKC). Aux SCM RE-MP, ORP3 s'associe avec la GTPase IQSec1, dont son activation est stimulée par l'influx de  $Ca^{2+}$ . La GTPase IQSec1 active Arf5, qui favorise le désassemblage des ACM. Ainsi aux SCM RE-MP proche des ACM, le complexe ORP3/IQSec1/Arf5 régule la dynamique des ACM.

#### **2.4.2 Rôle de la protéines Nir2 dans la migration cellulaire**

Nir2 interagit avec VAPA et VAPB (Lev et al., 2008) et s'associe également à RhoA (Tian et al., 2002). Tout d'abord, Nir2 joue un rôle structurel du RE (Amarilio et al., 2005). Nir2 se localise principalement au Golgi et peut se trouver dans le RE dans les cellules en interphase. La surexpression de Nir2 entraîne la déformation du RE. La formation de structures granulaires de taille hétérogène apparaît autour du noyau et à travers le cytoplasme. Ces structures ne se forment pas lorsqu'une forme mutante du domaine FFAT de Nir2 est

surexprimée, suggérant que c'est à travers l'interaction Nir2 avec les protéines VAPs que ce phénotype s'établit. En microscopie électronique ces structures granulaires sont associées à des empilements de saccules du RE. De manière intéressante, la surexpression de Nir3 affecte l'organisation du RE différemment et agit sur les microtubules qui apparaissent plus épais. Le RE forme des structures tubulaires à travers la cellule et autour du noyau dans ces conditions. Ensuite, en réponse à l'EGF, IGF-I ou à la neureguline 1, il a été montré que Nir2 se localise à la MP (Kim et al., 2013, (Keinan et al., 2014). En plus de dépendre de facteurs de croissance, la localisation de Nir2 à la MP dépend également de la présence d'acide phosphatidique (AP) généré à partir de l'hydrolyse du PI(4,5)P2. Nir2 agit donc comme senseurs du niveau d'acide phosphatidique (AP) (Chang and Liou, 2015, Kim et al., 2013). La déplétion de Nir2 entraîne la diminution de l'invasion des cellules MDA-MB-231 et MCF10A à travers le matrigel. Ces cellules déplétées pour Nir2 présentent un niveau d'ARN messager pour les métalloprotéases MMP2, MMP9 et MMP14 moins important par rapport au contrôle, corrélant avec les défauts d'invasion. Dans les cellules MDA-MB-231 déplétées pour Nir2, Akt, qui régule la transcription des MMP9 chez les cellules MDA-MB-231 (Cho et al., 2008), est moins phosphorylé en réponse à l'EGF par rapport au contrôle. Ceci suggère que Nir2 est impliquée dans la migration des cellules à travers la voie PI3K/Akt (Keinan et al., 2014). Cette voie dépend notamment de la signalisation médiée par les PPI à la MP. En effet, le PI(3,4,5)P3 active la voie Akt et le PI(4,5)P2 hydrolysé en IP3 et DAG active les voies MAPK et ERK1/2 (Kim et al., 2013, 2). La déplétion de Nir2 entraîne la diminution de la quantité relative de PI(4,5)P2 et PI(3,4,5)P3 à la MP, ce qui corrèle avec une diminution de l'activité de voies Akt, MAPK et ERK1/2.

Ainsi, Nir2 est recrutée à la MP en réponse à une diminution du PI(4,5)P2 qui se traduit par une augmentation en AP. A la MP Nir2 interagit avec la protéine VAPs au RE et régule de manière positive le niveau des PPI de la MP et les voies de signalisation associées qui contrôlent la migration cellulaire.

### **3. Outils d'études des Sites de Contact Membranaire**

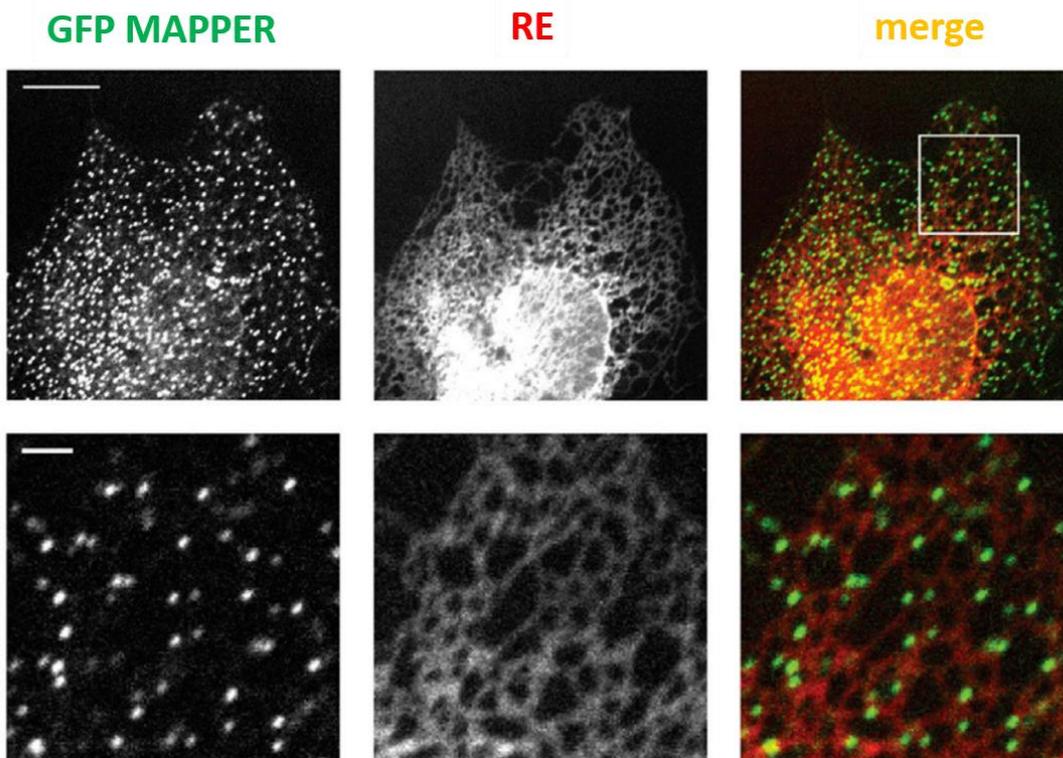
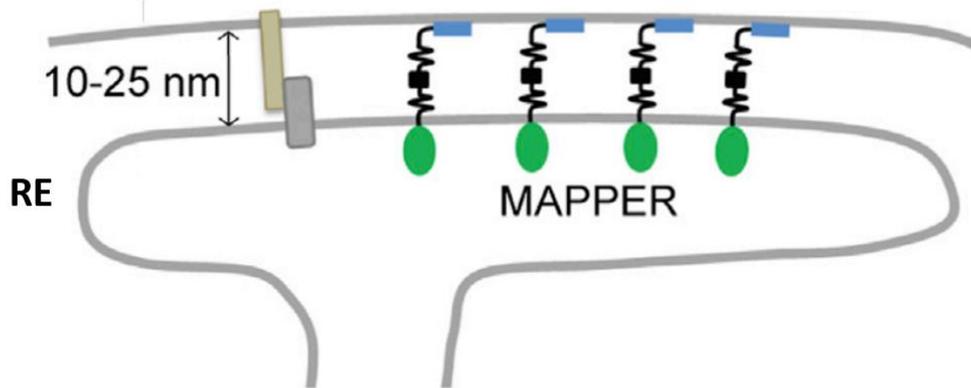
La résolution des microscopes photoniques n'est pas suffisante pour suivre la dynamique des SCM dont leur taille est nanométrique, mais plusieurs approches ont été développées pour les observer sur cellules vivantes ou fixées. L'identification des SCM par l'étude des distances entre les membranes apposées nécessite l'utilisation d'un microscope électronique. En effet,

ces distances varient de 10 nm à 80 nm ou peuvent être plus restreintes, entre 10 et 30 nm en fonction des études (Scorrano et al., 2019). Globalement, la résolution d'un microscope électronique à transmission (TEM) est proche de 0.1 nanomètre en X et Y, ce qui offre une résolution suffisante pour l'identification des SCM. En revanche, l'observation de l'ultrastructure des SCM en TEM s'effectue sur des coupes de 50 à 200 nm d'épaisseur, ce qui représente une petite partie de la cellule. Une possibilité serait d'effectuer des coupes en série et de reconstruire la cellule en 3D pour avoir la distribution globale des SCM. Cette approche demande une certaine expertise, du temps, et n'est pas adaptée à l'étude des SCM en dynamique. De plus, l'approche en microscopie électronique requiert l'utilisation de fixateurs, comme les formaldéhydes qui peuvent générer des artefacts de structures. La visualisation de l'ultrastructure des SCM ne révèle pas les protéines qui y sont engagées. Plusieurs approches de microscopie photonique sont utilisées pour définir les protéines des SCM qui sont physiquement proches et qui interagissent potentiellement entre elles. L'utilisation de la PLA (proximity ligation assay) nécessite des anticorps primaires des protéines d'intérêts et des anticorps secondaires couplés à des oligonucléotides (sondes de PLA) (Alam, 2018). Lorsque les protéines d'intérêts sont proches (environ 40 nm), les sondes de PLA se liquent et l'ADN circulaire qui en résulte s'amplifie. Cette amplification est détectée par un signal ponctiforme fluorescent indiquant les lieux d'interactions potentielle des protéines d'intérêts. Cependant, cette approche ne permet pas d'étudier l'étendue du SCM et sa dynamique. Le FRET (Förster Resonance Energy Transfert) et l'approche par complémentation de molécules fluorescentes sont utilisées pour détecter, en dynamique, la proximité de deux membranes. Le FRET, consiste en un transfert d'énergie entre un donneur et un accepteur dont l'efficacité de transfert est inversement proportionnelle à la distance entre ces deux acteurs. Cette approche a permis d'identifier par exemple la proximité du réticulum endoplasmique avec les mitochondries (Csordás et al., 2010). Cependant, cette technique a des limites comme la nécessité d'effectuer de nombreux contrôles et de s'assurer que les sondes FRET sont exprimées de manière équimolaire. La complémentation de molécules fluorescentes consiste en la fragmentation en deux d'un fluorophore, comme la GFP. L'adressage des deux fragments de la GFP aux organites d'intérêts peut s'effectuer avec une séquence différente de celle des protéines des SCM. Lorsque les membranes des deux organites sont proches, la complémentation de la GFP a lieu et laisse apparaître un signal de fluorescence (Kakimoto et al., 2018). La complémentation de ce système est thermodynamiquement stable, ce qui

stabilise les SCM. Ainsi, l'étude de la dynamique de ces SCM n'est pas physiologique et peut être dans certains cas toxique pour la cellule. Une autre méthode consiste à utiliser des sondes réversibles. Par exemple, la sonde GFP MAPPER (figure 24). La sonde GFP-MAPPER, développée en 2013, est utilisée pour suivre les SCM RE-MP basés notamment sur la localisation de STIM1 (Chang et al., 2013). STIM1 est une protéine ancrée au RE qui interagit avec Orai1 à la MP aux SCM (Hogan, 2015). En N terminal, la sonde GFP MAPPER possède le domaine Signal Peptide (SP) et le domaine transmembranaire (TM) de STIM1 qui sont séparés par la GFP. Ces domaines permettent l'adressage et l'ancrage de la sonde au RE et à la GFP de se situer dans la lumière de cet organite. Pour éviter d'altérer la taille des SCM et leur stabilité, des liens souples entourent le domaine FRB. En C terminal, un domaine polybasique PB de la GTPase Rit permet de se lier aux phospholipides de la membrane plasmique (chargée négativement). Lorsque cette sonde est transfectée dans les cellules, elle s'accumule dans les SCM RE-MP sans les stabiliser. En microscopie photonique, l'accumulation du GFP MAPPER aux SCM RE-MP se présente sous la forme de structures ponctiformes, dynamiques et associées au RE. Pour tester l'efficacité de leur sonde à suivre les SCM RE-MP, Chang et al ont déplété le pool de Calcium au RE en utilisant la thapsigargine (TG) (Hogan, 2015). Des études précédentes ont montré que l'utilisation de la TG augmente le nombre de SCM RE-MP observés en microscopie électronique (Orci et al., 2009, Wu et al., 2006). La TG entraîne l'oligomérisation de STIM1 aux SCM RE-MP et permet d'induire un influx de  $Ca^{2+}$  extracellulaire vers le cytosol à travers l'activation d'Orai1 et l'assemblage des canaux Stim1/Orai1. Dans leur étude, STIM1 se localise dans les structures marquées par le GFP MAPPER dont la densité augmente après le traitement avec la TG. Cette approche indique que le GFP MAPPER permet de suivre la dynamique des SCM RE-MP dans ce contexte.



**Membrane plasmique**



adapté de (Chang et al., 2013)

**Figure 24. GFP MAPPER, senseur des SCM RE-MP.** En haut, structure du GFP MAPPER. Le peptide signal (SP) et transmembranaire (TM) permettent l'adressage et l'ancrage de la sonde au RE. La GFP est entre ces deux domaines. Au centre se trouve un linker et un domaine FRB puis en C-terminal un domaine polybasique (PB) capable de se lier aux phospholipides de la membrane plasmique. En bas, le GFP MAPPER s'accumule dans le RE sous forme de structures ponctiformes.

## Objectif de ma thèse

Au cours de la migration des cellules, les PPI ont un rôle crucial pour réguler un certain nombre de voies moléculaires. Nous avons vu que les PPI contrôlent la dynamique de l'actine, des ACM, le trafic vésiculaire et la polarité de la cellule en cours de migration. Pour réguler ces fonctions, les PPI sont finement régulés dans le temps et dans l'espace. Les kinases et les phosphatases sont des acteurs bien caractérisés dans cette régulation spatio-temporelle des PPI. Cependant le rôle des SCM dans la régulation des PPI au cours de la migration reste peu connue.

Dans le but de comprendre quelle est l'implication des SCM dans la migration cellulaire, nous avons décidé de nous intéresser aux SCM médiés par VAPA. En effet, VAPA est un organisateur majeur des LTPs, qui régulent les échanges des PPI à de nombreux SCM de la cellule.

-Le premier objectif de ma thèse était de générer une lignée, dérivée d'un carcinome colorectal humain (CaCo-2), déplétée pour le gène VAPA. Les cellules CaCo-2 sont utilisées comme modèle de la migration cellulaire. Nous avons utilisé le système de CRISPR Cas9 double nickase offrant une grande spécificité tout en diminuant les effets off-targets.

-Le deuxième objectif de mes travaux, en utilisant cette lignée, consistait à caractériser le rôle de VAPA dans la migration collective et individuelle des cellules. Mes travaux de thèse ont permis de montrer que VAPA régule la vitesse et la directionnalité des cellules mais également leur étalement.

-Le troisième objectif de ma thèse visait à comprendre quelles sont les voies moléculaires régulées par VAPA au cours de la migration. Nous avons mis en évidence l'importance de VAPA dans le contrôle du désassemblage des ACM induit par les microtubules, de la dynamique du lamellipode et des structures d'actines. De manière importante, VAPA régule spécifiquement la quantité de PI(4,5)P2 à la membrane plasmique.

-Le quatrième objectif de ma thèse consistait à comprendre la dynamique des SCM entre le RE et la membrane plasmique (RE-MP) au cours de la migration. Nous avons observé une population stable de SCM RE-MP ancrée au substrat. Une partie de cette population est accolée aux ACM lors de leur désassemblage de manière VAPA dépendante.

L'ensemble de ces objectifs nous a permis de construire un modèle selon lequel les SCM RE-MP médiés par VAPA régulent localement les échanges de PPI, ce qui permet de réguler la dynamique des ACM, des lamellipodes et ainsi de la migration cellulaire.

## Résultats

# **The tether protein VAPA is required for proper cell motility and for the anchoring of ER-PM contact sites to focal adhesions**

## **Co-auteurs**

Hugo Siegfried , Rémi Le Borgne , Catherine Durieu , Thaïs De Azevedo Laplace , Agathe Verraes , Lucien Daunas , Jean-Marc Verbavatz, Mélina L. Heuzé

Soumis à BioRxiv le 17 Octobre 2022.

## **VAPA is required for cell motility and for anchoring ER-plasma membrane contact sites to focal adhesions**

Hugo Siegfried<sup>1</sup>, Rémi Le Borgne<sup>1</sup>, Catherine Durieu<sup>1</sup>, Thaïs De Azevedo Laplace<sup>2</sup>, Agathe Verraes<sup>1</sup>, Lucien Daunas<sup>1</sup>, Jean-Marc Verbavatz<sup>1\*</sup>, Mélina L. Heuzé<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Université Paris Cité, CNRS, Institut Jacques Monod, F-75013 Paris, France

<sup>2</sup> Université Paris Cité, INSERM UMR1266, Institut de Psychiatrie et Neurosciences de Paris, Paris, France

\* Co-Corresponding authors

### **ABSTRACT**

Membrane contact sites (MCS) serve as platforms for direct calcium fluxes and lipid exchange between two organelles. Despite growing knowledge on the molecular composition of MCS, their roles in physio-pathological processes are barely studied. Cell motility processes highly depend on membrane dynamics of Plnst, giving rise to cytoskeleton reshaping and membrane trafficking modulation. Here, we show that an ER-resident MCS tether, VAPA, plays a crucial role during cell motility. CaCo2 adenocarcinoma epithelial cells depleted for VAPA (VAPAKO) exhibit several collective and individual migration defects, disorganized actin cytoskeleton and altered protrusive activity. These observations are accompanied by a perturbation of Plnst homeostasis at the plasma membrane of VAPAKO cells, but not in other membrane compartments, indicating that VAPA regulates lipid exchange at ER-plasma membrane (PM) contact sites in these conditions. Importantly, we show that during migration, VAPA mediates the anchoring of ER-PM contact sites to focal adhesions at the time of FA disassembly. As a consequence, focal adhesions fail to properly disassemble in VAPAKO cells. We propose that

during migration, VAPA could regulate the local pool of PInst at focal adhesions, thus favouring their turnover. To conclude, this study reveals the importance of VAPA-mediated MCS as local regulators of cell motility, thus opening new roads in the understanding of patho-physiological functions of lipid exchange through MCS.

## INTRODUCTION

The lipid identity of cell membrane compartments is highly regulated and plays key roles in a diversity of cellular processes. During cell motility, lipids, and in particular Phosphoinositides (PInst), can serve as local instructors for molecular events leading to cell polarization, actin-driven formation of protrusions and turnover of focal adhesions (FA) (Hammond and Burke, 2020; Tsujita and Itoh, 2015). PI(4,5)P<sub>2</sub>, the most abundant PInst at the plasma membrane, controls FA dynamics by regulating the binding of talin to integrins (Martel et al., 2001; Thapa et al., 2012) and the polarized trafficking of integrins (Nader et al., 2016). PI(4,5)P<sub>2</sub> is described as a modulator of actin cytoskeleton organization and dynamics, either directly through the recruitment of several actin-binding proteins (Senju et al., 2017), or indirectly by regulating the activation of RhoA (Lacalle et al., 2007; Xu et al., 2010) and Cdc42 GTPases (Daste et al., 2017). The product of PI(4,5)P<sub>2</sub> phosphorylation, PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, also plays a crucial role in cell motility at the PM. Several in vitro and in vivo studies have shown that PI(3,4,5)P<sub>3</sub> acts as a “compass lipid” that stabilizes the direction of migration (Hannigan et al., 2002; Funamoto et al., 2002; Lam et al., 2012) through activation of Rac1 (Kunisaki et al., 2006; Welch et al., 2002; Yoshii et al., 1999).

Lipids are synthesized in the Endoplasmic Reticulum (ER) and delivered to membranes through vesicular transport, but also through non-vesicular transport at so-called Membrane Contact Sites (MCS) (Jackson et al., 2016). MCS are sites of close apposition between two membranes, often the ER membrane and the membrane of another organelle, at a distance of 10nm to ~80nm, where exchanges of lipids, Ca<sup>2+</sup> and metabolites take place (Prinz et al., 2020; Scorrano et al., 2019; Wu et al., 2018). While the activity of lipid transfer at MCS was

observed decades ago (Vance, 1990), their implication in patho-physiological processes such as cell motility has gained interest only recently.

In this work, we studied the role of a tethering protein, VAPA, during cell motility. VAPA is a member of the highly conserved VAP family of proteins, together with VAPB. **Verreuer ! Signet non défini.** VAPA is an integral ER membrane protein bridging the ER membrane to the membrane of other compartments by assembling with Lipid Transfer Proteins (LTPs), such as Nir proteins and OSBP-related (ORP) proteins, through a conserved N-terminal MSP (Major Sperm Protein) domain on VAPs and a FFAT (2 phenyl alanines in an acidic tract) motif on their partner proteins. VAPA also contains a central coiled-coil dimerization domain and an ER transmembrane domain in its C-terminus (Murphy and Levine, 2016). VAPA is involved in several cellular functions such as lipid transport, membrane trafficking, UPR (Unfolded Protein Response) pathway and microtubules organization (Lev et al., 2008; Kamemura and Chihara, 2019). VAPs/LTP complexes have been shown to control the homeostasis of PI and sterols at various intracellular locations. At ER-PM contact sites, the VAPs/Nir2 and VAPs/ORP3 complexes regulate the transport of Phosphoinositol (PI) and PI(4)P respectively. Together with membrane-associated kinases and phosphatases, they contribute to modulating locally the pool of PI(4)P, PI(4,5)P<sub>2</sub> and PI(3,4,5)P<sub>3</sub> at the PM (Gulyás et al., 2020; Chang and Liou, 2015; Kim et al., 2013). In addition, the association of VAPs with members of the OSBP-related family of proteins modifies the level of PI(4)P at endosomal membranes and at the Golgi respectively, therefore regulating trafficking events in these two compartments (Mesmin et al., 2013; Dong et al., 2016; Kawasaki et al., 2022). Moreover, VAP proteins facilitate cholesterol transport at ER-Golgi, ER-endosome and ER-peroxisome MCS (Hua et al., 2017; Mesmin et al., 2013; Dong et al., 2019; Wilhelm et al., 2017). Depending on the cell type and organism, the loss of VAPA and VAPB proteins can lead to either a reduction (Peretti et al., 2008) or an accumulation (Mao et al., 2019) of PI(4)P levels in the Golgi membranes and its redistribution on endosomes (Dong et al., 2016). In yeast, depleting VAP orthologs results in the accumulation of PI(4)P at the PM (Stefan et al., 2011).

Altogether, these observations prompted us to hypothesize that VAPA, by regulating PInst homeostasis, could modulate cell motility processes, which heavily rely on regulation of PM PInst. Importantly, two partners of VAPA at ER-PM contact sites, ORP3 and Nir2, have been shown to regulate cell motility processes through different pathways (Lehto et al., 2008; Weber-Boyvat et al., 2015; D'Souza et al., 2020; Keinan et al., 2014). Here, we show that the depletion of VAPA strongly affects the motile behaviour of human adenocarcinoma Caco2 cells and impacts the organization of the actin cytoskeleton, the dynamics of protrusions and the turnover of FA. The role of VAPA stands mainly at the PM where it regulates the level of PI(4,5)P2, the stability of ER-PM contact sites, their local anchoring at FA, to regulate their disassembly.

## **RESULTS**

### **VAPA is required for proper cell migration and cell spreading**

To assess the role of VAPA during cell motility, we generated, using CRISPR/Cas9 gene editing, stable Caco-2 cells either depleted for VAPA (VAPAKO), or expressing non-targeting sequences (Ctrl). VAPAKO cells exhibited a complete and specific depletion of VAPA protein (Fig.1A and 1B) without affecting the levels of VAPB or its distribution in the ER (Sup Fig.1A). We first assessed the capacity of VAPAKO and Ctrl monolayers to migrate collectively upon space release on fibronectin-coated glass. In these conditions, VAPAKO monolayers filled the open space less efficiently than Ctrl monolayers (Fig.1C and 1D). The analysis of leader cells trajectories revealed that VAPAKO leader cells were displacing faster but with a remarkable lack of directionality compared to Ctrl leader cells (Fig.1E and 1F), which could account for the slower colonization capacity by VAPAKO monolayers. This collective migration impairment was at least partially cell-intrinsic, as single VAPAKO cells displacing on a 2D surface exhibited identical velocity defects compared to VAPAKO leader cells in monolayers (Fig.1G). Moreover, upon plating, VAPAKO cells were spreading much faster than Ctrl cells, indicating once more

a general intrinsic motility defect arising in these cells (Fig.1H and 1I). Together, these results identify VAPA as a novel actor of collective and individual cell motility processes.

### **VAPA regulates focal adhesions and actin cytoskeleton through its MSP domain**

In order to characterize the motility defects of VAPAKO cells, we studied the organization of cell-matrix adhesions and actin cytoskeleton in these cells. To facilitate the analysis, we decided to focus our investigations on leader cells standing at the leading edge of migrating monolayers, as these cells displace in a given direction with a polarized and reproducible morphology. We observed an alteration of cell-matrix adhesions in VAPAKO cells that formed larger FA compared to Ctrl cells (Fig. 2A, 2B). Importantly, the expression of an exogenous wild-type form of VAPA in VAPAKO cells restored the size of FA, but it was not the case when VAPA was mutated in its, LTP-binding, MSP domain (VAPA KDMD), indicating that VAPA regulates FA size through its association with proteins containing a FFAT motif. The expression of exogenous VAPA (WT and KDMD) was verified by fluorescence microscopy (Sup Fig.1B). We then compared the organization of actin cytoskeleton in both Ctrl and VAPAKO cell lines. In Ctrl cells, the F-actin and cortactin stainings revealed the presence of numerous and thick parallel transverse actin arcs at the front, accompanied by cortactin-rich subdomains of branched actin standing at the front edge corresponding to lamellipodial extensions (Fig.2C). We indeed observed periodic waves of protrusion-retraction arising in these cells every 15 minutes in average (Fig.2E and 2F). By contrast, VAPKO cells exhibited disorganized and thinner transverse actin arcs, wider cortactin-rich subdomains occupying most of the leading edge and giving rise to long-lasting protrusions (Fig.2D, 2E and 2F). Similarly to the FA phenotype, we were able to recover the size of cortactin-rich domains by expressing a wild-type form of VAPA but not the MSP mutant (VAPA KDMD) (Fig.2G). To conclude, we show that VAPA controls different aspects of cell motility, by maintaining the size of FA and preserving the spatial and temporal organization of the actin cytoskeleton. This function depends on the VAPA binding-site in the MSP domain for FFAT-motif containing proteins such as LTPs, suggesting that lipid transfer is probably required.

### **VAPA controls PI(4)P homeostasis at the PM, but not in other compartments**

We then intended to decipher the mechanisms by which VAPA could regulate cell motility processes. To test the lipid transfer hypothesis, we first characterized to which extent its deletion affected PI(4)P homeostasis. Previous studies have shown that depleting both VAPA and VAPB affected the levels of PI(4)P at the Golgi and PM (Mao et al., 2019; Stefan et al., 2011), and eventually induced the accumulation of PI(4)P in early endosomes (Dong et al., 2016). Using the GFP-PH-OSBP probe, we detected a major intra-cellular pool of PI(4)P enriched at similar levels in the Golgi compartment in Ctrl and VAPAKO cells (Fig.3A, 3B and 3C). Importantly, the depletion of VAPA alone was not sufficient to observe an accumulation of PI(4)P in early endosomes or in the trans-Golgi network (Fig.3A, 3B and 3C), as previously described by Dong et al upon re-expression of VAPB in VAPA/VAPB double knock-out (Dong et al., 2016). This result suggests that VAPB might compensate for the absence of VAPA at ER-Golgi and ER-endosome contact sites thus maintaining PI(4)P homeostasis at the Golgi and endosomes in VAPAKO Caco-2 cells. However, at the PM, the depletion of VAPA induced a decrease of PI(4,5)P<sub>2</sub>, the product of PI(4)P phosphorylation. This decrease was visible either directly on endogenous levels of PI(4,5)P<sub>2</sub> detected at the dorsal side of cells by immunofluorescence staining (Fig.3D and 3E), or indirectly on the PM/cytoplasm ratio of RFP-PH-PLC $\delta$  probe for PI(4,5)P<sub>2</sub>, which is enriched at the protrusive leading edge of migrating cells (Fig.3F and G). Altogether, these results show that in Caco-2 cells, VAPA is required to maintain a certain level of PI(4,5)P<sub>2</sub> specifically at the PM, but is dispensable for PI(4)P homeostasis in the Golgi and endosomal compartment.

### **VAPA stabilizes ventral ER-PM contact sites at the front of migrating cells**

Based on our observation pointing to a specific role of VAPA at the PM, we questioned the spatio-temporal distribution of ER-PM contact sites during cell migration and the role of VAPA in this organization. To reach the necessary spatial and temporal resolution, we took advantage of a fluorescent probe, called GFP-MAPPER, which selectively labels ER-PM

contact sites (Chang et al., 2013a). When overexpressed in Caco-2 cells, GFP-MAPPER distributed as puncta along ER tubules (Fig.4A) and appeared at ER-PM appositions detected by TIRF microscopy at the cell bottom (Fig.4B). At the front of leader cells, GFP-MAPPER puncta divided in two subpools: the dorsal subpool ongoing forward movement together with the migrating cell and the ventral subpool remaining immobile relative to the substrate, suggesting that ventral ER-PM contact sites might be anchored to cell-matrix adhesions (Fig.4C). Using electron microscopy, we were indeed able to identify numerous ER-PM contact sites sitting at the leading edge of migrating cells (Fig.4D). At the ultrastructural level, the depletion of VAPA had no significant effect on ER-PM contact sites (Sup Fig.2). However, the dynamic analysis of GFP-MAPPER puncta revealed that ventral ER-PM contact sites, which barely moved (400nm/min on average) and persisted for long times (more than 10 minutes) in Ctrl cells, were significantly less stable both spatially and temporally in VAPAKO cells (Fig.4E). To conclude, our results identify a subpool of ER-PM contact sites, docked to the substrate at the front of migrating cells, and whose spatio-temporal stability requires VAPA. Together with the fact that FAs size is altered in VAPAKO cells, these results prompted us to hypothesize that VAPA might accomplish a local function at FAs.

### **VAPA regulates microtubule-dependent FA disassembly**

To further investigate the role of VAPA in FAs turnover, we studied more precisely FA dynamics in Ctrl and VAPAKO cells during cell migration by TIRF microscopy. While the assembly rate of FAs was similar in both cell lines, their disassembly rate was slower in VAPAKO cells (Fig.5A, B and C). In addition, VAPAKO FAs exhibited a longer lifetime in average, with a majority lasting more than 50 minutes (Fig.5D and E). To test whether VAPA-mediated disassembly of FAs relied on the microtubule network, we synchronized FA disassembly by nocodazole treatment and washout and measured the evolution of FA size, as described previously (Ezratty et al., 2005). Our results clearly show that VAPAKO FAs failed to disassemble upon microtubule recovery, which was not the case of Ctrl FAs, that lost half of their size as early as 15 minutes after nocodazole washout (Fig.5F and 5G). These results

demonstrate that FA disassembly is regulated in a microtubule-dependent mechanism in Ctrl cells, and VAPA is required for microtubule-dependent FA disassembly.

### **VAPA mediates the anchoring of ER-PM contact sites to FAs**

To understand the local function of VAPA at FAs, we analyzed the repartition and the dynamic of ER-PM contact sites relative to FAs by TIRF microscopy. In Ctrl cells, the majority of vinculin-stained FAs (80%) established a contact with ventral ER-PM contact sites whereas it was the case for only 40% of FAs in VAPAKO cells (Fig.6A and 6B). Moreover, when focusing on single FAs ongoing a complete cycle of assembly and disassembly, we observed the accumulation of GFP-MAPPER signal in the perimeter of the FA at the time of its disassembly (Fig.6C, D and 6E). Thus, we show that the apposition of ER-PM contact sites to FAs starts upon FA disassembly and that VAPA is necessary for their proper mutual anchoring.

## **DISCUSSION**

In this work, we identify VAPA as a new crucial regulator of cell motility, with implications in different aspects of this process. We show that VAPA controls both single and collective cell migration, cell spreading, protrusive waves, actin cytoskeleton dynamics and FAs turnover.

Our study reveals for the first time a non-redundant function of VAPA among the VAPs family. Indeed, the presence of VAPB in VAPAKO cells was not sufficient to compensate the loss of VAPA, indicating that VAPA and VAPB do not have redundant functions during cell motility.

The function of VAPA in cell migration seems to arise from its specific role at ER-PM contact sites where it was necessary to maintain high levels of PI(4,5)P<sub>2</sub> independently of VAPB. It was not the case at the Golgi membrane where the depletion of VAPA alone had no effect on PI(4)P levels in agreement with previous observations (Dong et al., 2016), suggesting that VAPB might compensate for the absence of VAPA at ER-Golgi contact sites and that migration defects in VAPAKO cells were not a result of Golgi or endosome dysfunction. Together, our results converge to the idea that VAPA and VAPB might fulfill both redundant and specific tasks in lipid homeostasis and cellular functions.

PI(4,5)P<sub>2</sub> and its phosphorylation product PI(3,4,5)P<sub>3</sub> have been described for decades as central orchestrators of cell motility through regulation of actin dynamics, FA maturation and turnover, membrane organization and curvature, and intracellular trafficking (Mandal, 2020; Tsujita and Itoh, 2015). The phenotypes observed in VAPAKO cells – namely disorganization of actin arcs, lack of retraction events at the leading edge and loss of directional movement - point to a probable lack of contractility that could be due to a lower RhoA activation which depends on PI(4,5)P<sub>2</sub> levels (Lacalle et al., 2007; Xu et al., 2010). Thus, one could think that the function of VAPA during cell motility would be restrained to the maintenance of PI(4,5)P<sub>2</sub> homeostasis at the PM. However, our results clearly point to an additional function of VAPA at FAs where it is required to anchor ER-PM contact sites, favors their stability, is necessary for microtubule-dependent FAs disassembly. Importantly, we could follow the dynamics of ER-PM contact sites during migration and observed for the first time that anchoring of ER-PM contact sites to FAs correlated temporally with FAs disassembly. Based on these results, we propose a model in which VAPA, through local regulation of lipid transfer in the vicinity of FA would induce the internalization of integrins through clathrin-mediated endocytosis which depends on PI(4,5)P<sub>2</sub> levels (Chao et al., 2010; Nader et al., 2016). Interestingly, MCS have already been shown to directly regulate endocytosis in yeast (Encinar del Dedo et al., 2017).

Which proteins could control the anchoring of VAPA-mediated ER-PM contact sites to FAs? Previous studies have highlighted the role of ER proteins in FAs turnover and maturation that could be potential candidates. Kinectin, an integral ER membrane protein interacting with kinesin, has been shown to control the apposition of ER to FAs through microtubule-dependent transport (Guadagno et al., 2020; Ng et al., 2016). The phosphatase PTP1B, which localizes to the cytoplasmic face of the ER and was identified as a partner of VAPA using a BioID approach (Antonicka et al., 2020), is targeted to newly formed FAs and contributes to their maturation through dephosphorylation of its substrate p130Cas (Dadke and Chernoff, 2002; Hernández et al., 2006; Liu et al., 1998). On the other hand, we demonstrate that the function of VAPA at FAs depends on the interaction with its partners through the MSP domain. Importantly, two LTPs functioning with VAPA at ER-PM contact sites, Nir2 and ORP3, have

been previously described as regulators of cell motility, establishing them as potential drivers for the specific function of VAPA at FAs. Nir2, which interacts with VAPs at ER-PM and ER-Golgi contact sites and regulates PI transport (Chang and Liou, 2015; Kim et al., 2013b; Peretti et al., 2008), favors epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis (Keinan et al., 2014). Similarly to VAPAKO cells, the depletion of Nir2 in HeLa cells induced a decrease of PI(4,5)P<sub>2</sub> levels at the PM (Kim et al., 2013), indicating that a part of VAPA effect on Pln<sub>st</sub> homeostasis could be supported by VAPA/Nir2-mediated lipid transfer. ORP3, which extracts PI(4)P from the PM at ER-PM contact sites (Gulyás et al., 2020), positively regulates the R-Ras pathway promoting cell-matrix adhesion (Lehto et al., 2008; Weber-Boyvat et al., 2015). Recently, ORP3 was found to be recruited to disassembling FAs upon calcium influx and to favor their turnover through lipid exchange. Interestingly, the authors highlight a crosstalk between ORP3-mediated lipid exchange and STIM1/Orai1-mediated calcium influx at FAs (D'Souza et al., 2020). Therefore, the role of VAPA at FAs could not only be the local modulation of lipid transfer, but also the establishment of a common platform with STIM1, anchored to FAs at ER-PM contact sites controlling lipid and calcium exchanges and driving FAs maturation and turnover.

To conclude, our study reveals unprecedented functions of VAPA in cell motility processes through regulation of Pln<sub>st</sub> homeostasis and local anchoring of ER-PM contact sites to FAs. It offers a new picture describing the role of MCS-mediated lipid transfer in cell motility. Finally, this work opens new roads to decipher the precise molecular determinants of VAPA function and to explore the role of VAPA during cancerogenesis.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell culture**

CaCo-2 cells, originally acquired from ATCC, were kindly provided by Dr. D. Delacour (Jacques Monod Institute, Paris). CaCo-2 CRISPR control and VAPA knock-out cell lines were maintained in culture in DMEM (1x) GlutMax 5g/L D-glucose + pyruvate medium (Gibco)

supplemented with 20% of fetal bovine serum (Gibco), 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2 µg/ml (Gibco) puromycin in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

### **Cell transfection**

0.5 million of cells were used for transient nucleofection using the Amaxa nucleofactor Kit (Lonza). Cell medium was completely removed and 100 µL of the T solution from the kit T Amaxa Cell Line Nucleofactor (Lonza) were used to re-suspend the cells. 2 µg of plasmid DNA was added to the mixture. This mixture was placed inside a nucleofactor cuve and put inside the Amaxa Nucleofactor II machine. The B024 program was set to nucleofect the CaCo-2 cells. CaCo-2 transfected cells were then re-suspended with 37 degrees-CaCo-2 medium and incubated at 37°C. 24 hours later, the CaCo-2 medium was changed and replaced by fresh medium.

### **Antibodies, reagents and plasmids**

The following primary antibodies were used : mouse anti-EEA1 monoclonal antibody (BD transduction, 610456) for early endosomes; rabbit anti-VAPB (atlas antibody HPA 013144); mouse anti-VAPA (Sigma 10355-4C12); rabbit anti-TGN46 (abcam ab50595) for trans-golgi; mouse anti-paxilline (Merck, 05-417) for analysis of focal adhesions; mouse anti-cortactin (Merck, 05-180). The following secondary antibodies were used : goat anti-mouse IgM Alexa fluor 555 (Invitrogen, A21426) or alexa fluor 488 (Invitrogen, A21042); goat anti-mouse IgG Alexa fluor 555 (Invitrogen, A21424) or alexa fluor 488 (Invitrogen, A31620); goat anti-rabbit IgG Alexa fluor 555 (Invitrogen, A21429) or alexa fluor 488 (Invitrogen, A11033); phalloidine Alexa fluor 647 (Invitrogen, A22287).

Following reagents were used: fibronectin Hu Plasma Fibronectine EMD Milipore Corp; Fluoromont-G with DAPI (Invitrogen, 00-4959-52).

The following plasmids were used : GFP-MAPPER was a kind gift from Jen Liou (Chang et al., 2013b), pmCherry-Vinculin was a gift from Chinten James Lim (Addgene plasmid # 80024 ; <http://n2t.net/addgene:80024> ; RRID:Addgene\_80024) (Lee et al., 2013); EGFP-OSBP-PH

was a gift from Marci Scidmore (Addgene plasmid # 49571 ; <http://n2t.net/addgene:49571> ; RRID:Addgene\_49571) (Moorhead et al., 2010); and PH-PLCD1-GFP was a gift from Tamas Balla (Addgene plasmid # 51407 ; <http://n2t.net/addgene:51407> ; RRID:Addgene\_51407) (Várnai and Balla, 1998). mRFP-KDEL plasmid was a kind gift from Nihal Altan-Bonnet.

### **VAPA CRISPR Cas9 lines generation**

Cells were transfected as describe above using the double nickase CRISPR Cas9 plasmid (Santa Cruz, sc-424440-NIC) and a control plasmid (Santa Cruz, sc-437281). The following day cells were incubated with puromycin at 2 µg/mL. After antibiotic selection, GFP positive cells were individually isolated using FACS. Clones were maintained in culture with puromycin and the absence of VAPA protein was detected by western blot and immunofluorescence. Rescue lines were generated from VAPA KO clone. The pmCherry-VAPA and pmCherry-VAPA KD/MD plasmids, kindly gifted by Fabien Alpy, were modified to resist to the CRISPR Cas9 system and transfected in VAPA KO cells. Geneticin (Gibco) selection was performed and positive population was isolated using FACS.

### **Western Blot**

Confluent cells were lysed in 100 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% NP40, 0.5% triton-X100, 10% glycerol, 1X protease inhibitor cocktail (Roche) and 1X phosphatase inhibitor (Phosphostop, Roche) for 20 minutes at 4°C. Insoluble debris were centrifuged for 15 minutes at 13000 g and supernatants were recovered. Protein concentration was quantified by Bradford assay (BioRad), SDS PAGE and electrotransfer were performed on 4-12% Bis-Tris gel (Novex) using mini gel tank and iBlot transfer systems (Invitrogen). Non-specific sites were blocked with 5% non-fat dry milk in PBS 0.1% Tween 20. Primary antibodies were diluted (1/1000) in PBS 0.1% Tween 20 and incubated overnight at 4°C. After three washes in PBS 0.1% Tween 20, secondary HRP antibodies diluted in PBS 0.1% Tween 20 (1/10000) were incubated for 1 hour and washed 3 times with PBS 0.1% Tween 20. Immunocomplexes of interest were detected using Supersignal west femto maximum sensitivity substrate (ThermoFisher) and

visualized with ChemiDoc chemoluminescence detection system (Biorad). Quantification of Western blots by densitometry was performed using the Gel analyzer plug in from Image J.

### **Cell migration assay**

2-well silicon inserts from ibidi were used to perform migration assays. Glass cover slips were incubated with fibronectin solution at 20 µg/mL in water, for 1h at room temperature. Cover slip surface were washed using sterile water and dried. Ibidi inserts were stucked to the fibronectin coated surface and 40.000 cells were loaded inside each well of the ibidi insert. For fluorescence live imaging, cells were directly inserted after transfection in the well. After 3 to 4 hours of incubation, cell division was blocked using mitomycin at 10 µg/mL in CaCo-2 culture medium, for 1 hour. After overnight incubation in a fresh CaCo-2 culture medium, the ibidi insert was removed. Experiments were next performed 24h to 48h after ibidi insert removal.

For individual cell migration, cell division was blocked using mitomycin at 10 µg/mL in CaCo-2 culture medium, for 1 hour. After overnight incubation in a fresh CaCo-2 culture medium, cells were detached and plated on a glass coverslip coated with fibronectin. After 6 hours of spreading cells were imaged for 24h.

Collective and individual cell migration assays were performed using a Zeiss Wide-Field Microscope and imaged at 1 frame every 10 minutes. Movement of migrating cells were analyzed using Manual Tracking from Fiji.

### **Electron microscopy**

Migrating cells were fixed in a 2% PFA/1% glutaraldehyde in PBS solution for 1h at room temperature, then washed in PBS. Cells were embedded in a 10% BSA and 10% gelatin gel. Post fixation was performed in 1% OsO<sub>4</sub>+1% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> in water at 4°C for 1h. After extensive washes, cells were incubated in 1% Thiocarbohydrazine in water for 20 min at room temperature and then washed and incubated with 2% OsO<sub>4</sub> in water for 30 min at room temperature. After washes, cells were contrasted with 1% uranyl acetate overnight at 4°C. The following day, the uranyl acetate solution was removed and the samples washed using pure

water. Cells were incubated with a pH 5.5 lead nitrate in aspartic acid solution for 30 min at 60°C, washed in water and dehydrated in successive ethanol baths. Cells were embedded in Agar Low Viscosity Resin (R1018 Kit from agar Scientific). 70 nm-thick thin sections were cut using a UC6 ultramicrotome from Leica and deposited on EM grids. Electron microscopy acquisitions were performed using a 120kV Tecnai 12 electron microscope (ThermoFisher) equipped with a OneView 4K camera (Gatan).

### **Measurement of focal adhesion assembly and disassembly**

Cells were transfected as described above using the mCherry-Vinculine plasmid and migration assays were performed on fibronectin coated 1.5H Glass bottom Dishes from ibidi. Cells were imaged using a TIRF microscope at 1 frame every minute for 1 to 2 hours. Focal adhesion assembly and disassembly rates were obtained using the focal adhesion analysis server (<https://faas.bme.unc.edu/>). Movies were converted into grayscale, compressed into TIFF format using Fiji and uploaded to the server. Focal adhesion assembly and disassembly rates tracks were generated. The tracks with a R-squared equals to or greater than 0.8 were used for the analysis.

Berginski ME, Gomez SM. (2013) The Focal Adhesion Analysis Server : a web tool for analyzing focal adhesion dynamics [v1; ref status: indexed, <http://f1000r.es/ycjF1000Research> 2013, 2:68 (doi: 10.3410/f1000research.2-68.v1)

### **PIP2 immunolabelling and imaging**

All steps were performed on ice. After cell spreading for 24h on fibronectin coated cover slips, cells were washed using cold PBS and fixed for 1h in a solution of 3.7% PFA and 0.1 glutaraldehyde diluted in PBS. Then cells were incubated in a PBS solution containing 0.1M of glycine for 15 min and then were incubated in a blocking buffer composed of 0.5% saponin, 2.5% BSA and 5% of fetal bovine serum for 30 min. Cells were incubated with the primary IgM mouse anti-PI(4,5)P2 antibody (Echelon Biosciences ZP045) for 1h in the incubating solution

of 0.1% saponin, 2.5% BSA and 5% fetal bovine serum diluted in PBS. After 3 washes using PBS, cells were incubated for 1h with the secondary Alexa-fluor 555 goat anti-mouse IgM (Invitrogen A21426) diluted in the same incubating solution. Samples were washed and mounted on slides. Cells were then imaged using a Lsm780 confocal microscope from Zeiss with the same microscope settings.

### **Immunofluorescence**

Cells were fixed in a 4% PFA diluted in 1x PBS solution for 15 min at 30 degrees. PFA solution were next washed 3 times using 1x PBS solution and cells were incubated in the permeabilizing 1x Saponine 1% BSA in PBS solution for 30 min at RT. Cells were incubated with primary antibodies that were diluted in 1x Saponine 1% BSA in PBS solution for 1h at RT. Samples were washed 3 times using the permeabilizing solution. Cells were next incubated with the secondary antibodies for 1h at RT used in the permeabilizing solution. All the highly cross-adsorbed Alexa 488 and Alexa 555 anti-mouse IgG and anti-rabbit IgG secondary antibodies were coming from Invitrogen. Secondary antibodies were removed using a 1x PBS solution. Coverslips were mounted on glass using fluoromont with DAPI.

### **Nocodazole experiment**

Cell migration assay were performed as described in the collective cell migration assay section but cells were placed in ibidi inserts in starving conditions (1% of fetal bovine serum, 1% of penicillin/streptomycin in DMEM GlutaMax medium). After 48h of starvation, migrating cells were treated with 10  $\mu$ M of nocodazole in starved conditions for 2h. Then, nocodazole wash-out was performed and cells were incubated with fresh starved medium for 0, 15, 30 and 60 min and then fixed using PFA 4% solution. Focal adhesions were labeled using a mouse anti-paxillin antibody as described above.

### **Phosphoinositide quantifications at the PM, TransGolgi and EEA1-positive endosomes**

Cells were transiently transfected with PH-PLC-mRFP probe as described in the cell transfection section to visualize the pool of PM PI(4,5)P<sub>2</sub>. PM to cytosol signal ratio of the PH-PLC-mRFP probe was measured along lines of 5 to 15 microns in cell clusters and at the front of migrating cells. Ratio was performed between the maximum of the peak intensity and the mean value of the PH-PLC-mRFP signal in the local cytosol. For each cell, at least 3 lines were drawn at the PM and the mean of the PM/cytosol ratio per cell was used for the analysis.

Anti-PI(4,5)P<sub>2</sub> antibodies were used as described above for measuring the relative quantity of PM PI(4,5)P<sub>2</sub> in cluster cells. Confocal imaging was performed using the same acquisition parameters between control and VAPA KO cells. For one z-section, 3 lines were drawn per cell and the maximum of fluorescence intensity at the peak were used for the analysis.

To visualize the intracellular pool of PI(4)P, cells were transiently transfected with OSBP-PH-GFP probe. The trans-Golgi and the early endosomes of migrating cells were labeled using anti-TGN46 and anti-EEA1 antibodies as described above, respectively. Colocalization between the OSBP-PH-GFP and TGN46 signals or the OSBP-PH-GFP and EEA1 signals were obtained using Fiji Pearson coefficient plugins. Next, the ratio between the signal of OSBP-PH-GFP at the trans-Golgi or at the EEA1 positive endosomes and the signal in the cytosol were measured using Fiji.

### **Spreading experiment**

Cells were incubated for 1h on fibronectin coated coverslips and fixed with PFA 4% solution as described in the immuno labelling section. Phalloidin was used to label actin. Coverslips were mounted on slides and samples were imaged using a Zeiss Apotome fluorescence microscope equipped with a 10x objective.

### **Images acquisition and analysis**

For live-microscopy experiments, the samples were placed in a chamber equilibrated at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

Fluorescence live microscopy imaging were acquired using a Yokogawa CSU-X1 Spinning Disk confocal mounted on an inverted motorized Axio Observer Z1 (Zeiss) and equipped with a sCMOS PRIME 95 (photometrics) camera and a 63 X oil immersion objective or using a ELYRA TIRF microscope from Zeiss equipped with EMCCD, iXon 897 (512\*512, 16 microns of pixel size) camera and 63 X oil immersion objective.

ER-PM MCS proximity to focal adhesions were imaged using TIRF microscopy. 10 to 30 focal adhesions were randomly selected per cell. GFP-MAPPER sharing at least one pixel was counted as one ER-PM MCS in close proximity to focal adhesions.

For fixed samples, images were acquired with a Zeiss Apotome fluorescence microscope equipped with a 63 X oil immersion objective or with a Zeiss LSM 780 confocal microscope equipped with a 63 X oil immersion objective at a resolution of 0.3  $\mu\text{m}$  z-stacks. Image processing and analysis were done on Fiji software. Cell spreading and focal adhesions area were analyzed by thresholding the image and applying an “analyze particules” which gives the number and the area of the objects.

Electron microscopy images were analyzed using Fiji. Endoplasmic Reticulum to the plasma membrane appositions distant less than 30 nm were taken into account for the analysis.

### **Protrusions and retractions analysis**

Migrating cells were imaged using DIC components mounted on a Zeiss Wide-Field Microscope at 1 frame every 3 seconds for 30 minutes. By using FIJI, kymographs were obtained along drawing lines following cell protrusions. Positive slopes were counted as protrusions and negative slopes as retractions. For each cell 2 to 4 kymographs were performed and the mean of the time spent in protrusion and the number of protrusions were used for the analysis.

## **AKNOWLEDGEMENTS**

We thank Delphine Delacour, Fabien Alpy and the past and current members of Membrane Dynamics and Intracellular Trafficking team at Institut Jacques Monod for helpful discussions. We acknowledge the ImagoSeine core facility of the IJM, member of IBIISA and France-Biolmaging (ANR-10-INBS-04) infrastructures. This work was supported by grants from the Gefluc groupement Les Entreprises Contre le Cancer (to M.H), the Cancéropôle Ile de France (to M.H), the Agence Nationale de la Recherche (to J-M.V), the Fondation pour la Recherche Médicale (to J-M.V and H.S) and the Ligue Contre le Cancer (to H.S). M.H acknowledges René-Marc Mège, Benoît Ladoux and Delphine Delacour for kindly providing antibodies and plasmids during the starting period of this work.

## REFERENCES

- Antonicka, H., Z.Y. Lin, A. Janer, M.J. Aaltonen, W. Weraarpachai, A.C. Gingras, and E.A. Shoubridge. 2020. A High-Density Human Mitochondrial Proximity Interaction Network. *Cell Metab.* 32:479-497.e9. doi:10.1016/J.CMET.2020.07.017.
- Chang, C.L., T.S. Hsieh, T.T. Yang, K.G. Rothberg, D.B. Azizoglu, E. Volk, J.C. Liao, and J. Liou. 2013a. Feedback regulation of receptor-induced  $ca^{2+}$  signaling mediated by e-syt1 and nir2 at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Cell Rep.* 5:813–825. doi:10.1016/j.celrep.2013.09.038.
- Chang, C.L., T.S. Hsieh, T.T. Yang, K.G. Rothberg, D.B. Azizoglu, E. Volk, J.C. Liao, and J. Liou. 2013b. Feedback regulation of receptor-induced  $ca^{2+}$  signaling mediated by e-syt1 and nir2 at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Cell Rep.* 5:813–825. doi:10.1016/j.celrep.2013.09.038.
- Chang, C.L., and J. Liou. 2015. Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate homeostasis regulated by Nir2 and Nir3 proteins at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *J. Biol. Chem.* 290:14289–14301. doi:10.1074/jbc.M114.621375.

- Chao, W.-T., F. Ashcroft, A.C. Daquinag, T. Vadakkan, Z. Wei, P. Zhang, M.E. Dickinson, and J. Kunz. 2010. Type I phosphatidylinositol phosphate kinase beta regulates focal adhesion disassembly by promoting beta1 integrin endocytosis. *Mol. Cell. Biol.* 30:4463–4479. doi:10.1128/MCB.01207-09.
- D'Souza, R.S., J.Y. Lim, A. Turgut, K. Servage, J. Zhang, K. Orth, N.G. Sosale, M.J. Lazzara, J. Allegood, and J.E. Casanova. 2020. Calcium-stimulated disassembly of focal adhesions mediated by an ORP3/IQSec1 complex. *Elife.* 9. doi:10.7554/eLife.54113.
- Dadke, S., and J. Chernoff. 2002. Interaction of protein tyrosine phosphatase (PTP) 1B with its substrates is influenced by two distinct binding domains. *Biochem. J.* 364:377–383. doi:10.1042/BJ20011372.
- Daste, F., A. Walrant, M.R. Holst, J.R. Gadsby, J. Mason, J.E. Lee, D. Brook, M. Mettlen, E. Larsson, S.F. Lee, R. Lundmark, and J.L. Gallop. 2017. Control of actin polymerization via the coincidence of phosphoinositides and high membrane curvature. *J. Cell Biol.* 216:3745–3765. doi:10.1083/jcb.201704061.
- Dong, J., X. Du, H. Wang, J. Wang, C. Lu, X. Chen, Z. Zhu, Z. Luo, L. Yu, A.J. Brown, H. Yang, and J.W. Wu. 2019. Allosteric enhancement of ORP1-mediated cholesterol transport by PI(4,5)P<sub>2</sub>/PI(3,4)P<sub>2</sub>. *Nat. Commun.* 10. doi:10.1038/s41467-019-08791-0.
- Dong, R., Y. Saheki, S. Swarup, L. Lucast, J.W. Harper, and P. De Camilli. 2016. Endosome-ER Contacts Control Actin Nucleation and Retromer Function through VAP-Dependent Regulation of PI4P. *Cell.* 166:408–423. doi:10.1016/j.cell.2016.06.037.
- Encinar del Dedo, J., F.Z. Idrissi, I.M. Fernandez-Golbano, P. Garcia, E. Rebollo, M.K. Krzyzanowski, H. Grötsch, and M.I. Geli. 2017. ORP-Mediated ER Contact with Endocytic Sites Facilitates Actin Polymerization. *Dev. Cell.* 43:588-602.e6. doi:10.1016/J.DEVCEL.2017.10.031.

- Ezratty, E.J., M.A. Partridge, and G.G. Gundersen. 2005. Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat. Cell Biol.* 7:581–590. doi:10.1038/NCB1262.
- Funamoto, S., R. Meili, S. Lee, L. Parry, and R.A. Firtel. 2002. Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell.* 109:611–23.
- Guadagno, N.A., A. Margiotta, S.A. Bjørnstad, L.H. Haugen, I. Kjos, X. Xu, X. Hu, O. Bakke, F. Margadant, and C. Progida. 2020. Rab18 regulates focal adhesion dynamics by interacting with kinectin-1 at the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 219. doi:10.1083/jcb.201809020.
- Gulyás, G., M. Sohn, Y.J. Kim, P. Várnai, and T. Balla. 2020. ORP3 phosphorylation regulates phosphatidylinositol 4-phosphate and Ca<sup>2+</sup> dynamics at PM-ER contact sites. *J. Cell Sci.* jcs.237388. doi:10.1242/jcs.237388.
- Hammond, G.R.V., and J.E. Burke. 2020. Novel roles of phosphoinositides in signaling, lipid transport, and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 63:57–67. doi:10.1016/j.ceb.2019.12.007.
- Hannigan, M., L. Zhan, Z. Li, Y. Ai, D. Wu, and C.K. Huang. 2002. Neutrophils lacking phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  show loss of directionality during N-formyl-Met-Leu-Phe-induced chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:3603–3608. doi:10.1073/pnas.052010699.
- Hernández, M. V., M.G. Davies Sala, J. Balsamo, J. Lilien, and C.O. Arregui. 2006. ER-bound PTP1B is targeted to newly forming cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 119:1233–1243. doi:10.1242/JCS.02846.
- Hua, R., D. Cheng, É. Coyaud, S. Freeman, E. Di Pietro, Y. Wang, A. Vissa, C.M. Yip, G.D. Fairn, N. Braverman, J.H. Brumell, W.S. Trimble, B. Raught, and P.K. Kim. 2017. VAPs and ACBD5 tether peroxisomes to the ER for peroxisome maintenance and lipid

- homeostasis. *J. Cell Biol.* 216:367–377. doi:10.1083/JCB.201608128.
- Jackson, C.L., L. Walch, and J.M. Verbavatz. 2016. Lipids and Their Trafficking: An Integral Part of Cellular Organization. *Dev. Cell.* 39:139–153. doi:10.1016/j.devcel.2016.09.030.
- Kamemura, K., and T. Chihara. 2019. Multiple functions of the ER-resident VAP and its extracellular role in neural development and disease. *J. Biochem.* 165:391–400. doi:10.1093/jb/mvz011.
- Kawasaki, A., A. Sakai, H. Nakanishi, J. Hasegawa, T. Taguchi, J. Sasaki, H. Arai, T. Sasaki, M. Igarashi, and F. Nakatsu. 2022. PI4P/PS countertransport by ORP10 at ER–endosome membrane contact sites regulates endosome fission. *J. Cell Biol.* 221. doi:10.1083/jcb.202103141.
- Keinan, O., A. Kedan, N. Gavert, M. Selitrennik, S. Kim, T. Karn, S. Becker, and S. Lev. 2014. The lipid-transfer protein Nir2 enhances epithelial-mesenchymal transition and facilitates breast cancer metastasis. *J. Cell Sci.* 127:4740–4749. doi:10.1242/jcs.155721.
- Kim, S., A. Kedan, M. Marom, N. Gavert, O. Keinan, M. Selitrennik, O. Laufman, and S. Lev. 2013. The phosphatidylinositol-transfer protein Nir2 binds phosphatidic acid and positively regulates phosphoinositide signalling. *EMBO Rep.* 14:891–899. doi:10.1038/embor.2013.113.
- Kunisaki, Y., A. Nishikimi, Y. Tanaka, R. Takii, M. Noda, A. Inayoshi, K. Watanabe, F. Sanematsu, T. Sasazuki, T. Sasaki, and Y. Fukui. 2006. DOCK2 is a Rac activator that regulates motility and polarity during neutrophil chemotaxis. *J. Cell Biol.* 174:647–52. doi:10.1083/jcb.200602142.
- Lacalle, R.A., R.M. Peregil, J.P. Albar, E. Merino, C. Martínez-A, I. Mérida, and S. Mañes. 2007. Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase controls neutrophil polarity and directional movement. *J. Cell Biol.* 179:1539–53. doi:10.1083/jcb.200705044.

- Lam, P. ying, S.K. Yoo, J.M. Green, and A. Huttenlocher. 2012. The SH2-domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP) limits the motility of neutrophils and their recruitment to wounds in zebrafish. *J. Cell Sci.* 125:4973–4978. doi:10.1242/jcs.106625.
- Lee, H.S., P. Anekal, C.J. Lim, C.C. Liu, and M.H. Ginsberg. 2013. Two modes of integrin activation form a binary molecular switch in adhesion maturation. *Mol. Biol. Cell.* 24:1354–1362. doi:10.1091/MBC.E12-09-0695.
- Lehto, M., M.I. Mäyränpää, T. Pellinen, P. Ihalmo, S. Lehtonen, P.T. Kovanen, P.H. Groop, J. Ivaska, and V.M. Olkkonen. 2008. The R-Ras interaction partner ORP3 regulates cell adhesion. *J. Cell Sci.* 121:695–705. doi:10.1242/jcs.016964.
- Lev, S., D. Ben Halevy, D. Peretti, and N. Dahan. 2008. The VAP protein family: from cellular functions to motor neuron disease. *Trends Cell Biol.* 18:282–290. doi:10.1016/j.tcb.2008.03.006.
- Liu, F., M.A. Sells, and J. Chernoff. 1998. Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates integrin signaling. *Curr. Biol.* 8:173–176. doi:10.1016/S0960-9822(98)70066-1.
- Mandal, K. 2020. Review of PIP2 in cellular signaling, functions and diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 21:1–20. doi:10.3390/ijms21218342.
- Mao, D., G. Lin, B. Tepe, Z. Zuo, K.L. Tan, M. Senturk, S. Zhang, B.R. Arenkiel, M. Sardiello, and H.J. Bellen. 2019. VAMP associated proteins are required for autophagic and lysosomal degradation by promoting a PtdIns4P-mediated endosomal pathway. *Autophagy.* 15:1214–1233. doi:10.1080/15548627.2019.1580103.
- Martel, V., C. Racaud-Sultan, S. Dupe, C. Marie, F. Paulhe, A. Galmiche, M.R. Block, and C. Albiges-Rizo. 2001. Conformation, Localization, and Integrin Binding of Talin Depend on Its Interaction with Phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* 276:21217–21227. doi:10.1074/jbc.M102373200.

- Mesmin, B., J. Bigay, J. Moser Von Filseck, S. Lacas-Gervais, G. Drin, and B. Antonny. 2013. XA four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-Golgi Tether OSBP. *Cell*. 155:830. doi:10.1016/j.cell.2013.09.056.
- Moorhead, A.M., J.Y. Jung, A. Smirnov, S. Kaufer, and M.A. Scidmore. 2010. Multiple host proteins that function in phosphatidylinositol-4-phosphate metabolism are recruited to the chlamydial inclusion. *Infect. Immun.* 78:1990–2007. doi:10.1128/IAI.01340-09.
- Murphy, S.E., and T.P. Levine. 2016. VAP, a Versatile Access Point for the Endoplasmic Reticulum: Review and analysis of FFAT-like motifs in the VAPome. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. 1861:952–961. doi:10.1016/J.BBALIP.2016.02.009.
- Nader, G.P.F., E.J. Ezratty, and G.G. Gundersen. 2016. FAK, talin and PIPKI 3 regulate endocytosed integrin activation to polarize focal adhesion assembly. *Nat. Cell Biol.* 18:491–503. doi:10.1038/ncb3333.
- Ng, I.C., P. Pawijit, L.Y. Teo, H. Li, S.Y. Lee, and H. Yu. 2016. Kinectin-dependent ER transport supports the focal complex maturation required for chemotaxis in shallow gradients. *J. Cell Sci.* 129:2660–2672. doi:10.1242/jcs.181768.
- Peretti, D., N. Dahan, E. Shimoni, K. Hirschberg, and S. Lev. 2008. Coordinated lipid transfer between the endoplasmic reticulum and the golgi complex requires the VAP proteins and is essential for Golgi-mediated transport. *Mol. Biol. Cell.* 19:3871–3884. doi:10.1091/mbc.E08-05-0498.
- Prinz, W.A., A. Toulmay, and T. Balla. 2020. The functional universe of membrane contact sites. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21:7–24. doi:10.1038/s41580-019-0180-9.
- Scorrano, L., M.A. De Matteis, S. Emr, F. Giordano, G. Hajnóczky, B. Kornmann, L.L. Lackner, T.P. Levine, L. Pellegrini, K. Reinisch, R. Rizzuto, T. Simmen, H. Stenmark, C. Ungermann, and M. Schuldiner. 2019. Coming together to define membrane contact sites. *Nat. Commun.* 10:1287. doi:10.1038/s41467-019-09253-3.

- Senju, Y., M. Kalimeri, E. V. Koskela, P. Somerharju, H. Zhao, I. Vattulainen, and P. Lappalainen. 2017. Mechanistic principles underlying regulation of the actin cytoskeleton by phosphoinositides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114:E8977–E8986. doi:10.1073/pnas.1705032114.
- Stefan, C.J., A.G. Manford, D. Baird, J. Yamada-Hanff, Y. Mao, and S.D. Emr. 2011. Osh proteins regulate phosphoinositide metabolism at ER-plasma membrane contact sites. *Cell.* 144:389–401. doi:10.1016/j.cell.2010.12.034.
- Thapa, N., Y. Sun, M. Schramp, S. Choi, K. Ling, and R.A. Anderson. 2012. Phosphoinositide signaling regulates the exocyst complex and polarized integrin trafficking in directionally migrating cells. *Dev. Cell.* 22:116–30. doi:10.1016/j.devcel.2011.10.030.
- Tsujita, K., and T. Itoh. 2015. Phosphoinositides in the regulation of actin cortex and cell migration. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1851:824–831. doi:10.1016/j.bbalip.2014.10.011.
- Vance, J.E. 1990. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J. Biol. Chem.* 265:7248–7256. doi:10.1016/S0021-9258(19)39106-9.
- Várnai, P., and T. Balla. 1998. Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-[3H]inositol-labeled phosphoinositide pools. *J. Cell Biol.* 143:501–510. doi:10.1083/JCB.143.2.501.
- Weber-Boyvat, M., H. Kentala, J. Lilja, T. Vihervaara, R. Hanninen, Y. Zhou, J. Peränen, T.A. Nyman, J. Ivaska, and V.M. Olkkonen. 2015. OSBP-related protein 3 (ORP3) coupling with VAMP-associated protein A regulates R-Ras activity. *Exp. Cell Res.* 331:278–291. doi:10.1016/j.yexcr.2014.10.019.
- Welch, H.C.E., W.J. Coadwell, C.D. Ellson, G.J. Ferguson, S.R. Andrews, H. Erdjument-

Bromage, P. Tempst, P.T. Hawkins, and L.R. Stephens. 2002. P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell*. 108:809–21.

Wilhelm, L.P., C. Wendling, B. Védie, T. Kobayashi, M. Chenard, C. Tomasetto, G. Drin, and F. Alpy. 2017. STARD 3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites . *EMBO J*. 36:1412–1433.  
doi:10.15252/emj.201695917.

Wu, H., P. Carvalho, and G.K. Voeltz. 2018. Here, there, and everywhere: The importance of ER membrane contact sites. *Science (80-. )*. 361. doi:10.1126/science.aan5835.

Xu, W., P. Wang, B. Petri, Y. Zhang, W. Tang, L. Sun, H. Kress, T. Mann, Y. Shi, P. Kubes, and D. Wu. 2010. Integrin-induced PIP5K1C kinase polarization regulates neutrophil polarization, directionality, and in vivo infiltration. *Immunity*. 33:340–50.  
doi:10.1016/j.immuni.2010.08.015.

Yoshii, S., M. Tanaka, Y. Otsuki, D.Y. Wang, R.J. Guo, Y. Zhu, R. Takeda, H. Hanai, E. Kaneko, and H. Sugimura. 1999. alphaPIX nucleotide exchange factor is activated by interaction with phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene*. 18:5680–90.  
doi:10.1038/sj.onc.1202936.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. VAPA is required for proper cell migration and cell spreading.**

**A.** Western blot analysis. CaCo-2 cells were transfected with CRISPR/Cas9 double nickase control or VAPA-targeting gene. Stable clones were selected and lysates from control and VAPA KO pools were immunoblotted for VAPA protein and tubulin. **B.** Confocal acquisitions. Control and VAPA KO clones were immunostained with anti-VAPA antibody (white) and nuclei (blue) were stained using DAPI. Scale bar 20  $\mu\text{m}$ . **C.** Collective cell migration assay. The trajectory of a control or VAPA KO leader cell is shown in green. **D.** Empty space surface area ( $\mu\text{m}^2$ ) colonized in 20h in control (black dots) and in VAPA KO (red dots) cells, mean ( $\pm\text{SEM}$ ); number of positions analyzed: Control n=8 VAPA KO n=7. **E.** Leader cell velocity in  $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$  and **F.** leader cell directionality coefficient of control (black dots) and VAPA KO (red dots) cells, mean ( $\pm\text{SEM}$ ); number of cells analyzed: Control n=33 VAPA KO n=36. **G.** Cell velocity in  $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$  of individual control (black dots) and VAPA KO (red dots) cells, mean ( $\pm\text{SEM}$ ); number of cells analyzed: Control n=55 VAPA KO n=24 in 2 independent experiments. **H.** 1h-cell spreading of control and VAPA KO cells by apotome microscopy. Actin (white) was labeled using phalloidin and nuclei (blue) were stained with DAPI to identify isolated cells **I.** Surface area in  $\mu\text{m}^2$  of control (black dots) and VAPA KO (red dots) spreading cells. mean ( $\pm\text{SEM}$ ); number of cells analyzed: Control n=170 VAPA KO n=163. Data were analyzed using non parametric Mann-Whitney t-test (ns: non significant; \*\*\*P-values <0.001).

**Figure 2. VAPA regulates focal adhesions and actin cytoskeleton through its MSP domain.**

**A.** Confocal imaging of paxillin-labeled focal adhesions in leader cells of control, VAPA KO, VAPA KO stably expressing wild-type mCherry-VAPA, or KD/MD mutant mCherry-VAPA cell lines. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$  (5  $\mu\text{m}$  in insets). **B.** Size of focal adhesion ( $\mu\text{m}^2$ ) obtained from A, in control (n=2968 focal adhesions, n=20 cells), VAPA KO (n=4329 focal adhesions, n=22 cells), VAPA KO expressing mCherry-VAPA, (n= 3818 focal adhesions, n= 24 cells) and, VAPA KO expressing KD/MD mCherry-VAPAshort (n=2801 focal adhesions, n= 19 cells). **C.** Confocal acquisitions of control and VAPA KO leader cells showing branched actin and F-actin using an

anti-cortactin antibody and phalloidin labeling, respectively. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ . **D.** Length of the cortactin-rich protrusions ( $\mu\text{m}$ ) in control (black) and in VAPA KO (red) cells, mean ( $\pm\text{SEM}$ ); number of cells analyzed: Control n= 77 VAPA KO n=72 **E.** Image of control (top) and VAPA KO (bottom) leader cells from a 30 min Differential Interference Contrast (DIC) movie at 1 frame every 3 seconds. Scale bars: 20  $\mu\text{m}$ . Yellow lines were used to perform kymographs to follow membrane protrusion and retraction events. On the right, kymographs of the control (top) and VAPA KO (bottom). The x-axis represents the distance in  $\mu\text{m}$  and the y-axis shows the time. Positive slopes are associated with protrusions and negative slopes represent retractions. Scale bars: 5  $\mu\text{m}$ . **F.** Number of protrusions in 30 min resulting from the kymographs analysis in control (black) and VAPA KO (red) cells, mean ( $\pm\text{SEM}$ ); number of cells analyzed: Control n=16 VAPA KO n=21, 2 to 3 kymographs were calculated per cell. Data were analyzed using non parametric Mann-Whitney t-test (ns: non significant, \*\*\*P-values <0.001). **G.** Proportion of the leading edge occupied by cortactin in control, VAPA KO, VAPA KO expressing wild-type mCherry-VAPA and VAPA KO expressing KD/MD mCherry-VAPA. Between 5 and 10 cells were analyzed in one experiment.

### **Figure 3. VAPA controls Plnst homeostasis at the PM, but not in other compartments**

**A.** Confocal acquisitions of control (top) and VAPA KO (bottom) leader cells transiently transfected with OSBP-PH GFP (green) and immunostained with an anti-EEA1 antibody (left) to label early endosomes (magenta) or with an anti-TGN46 antibody (magenta) to label the trans Golgi (right). **B.** Pearson coefficient between the OSBP-PH GFP and the TGN46 signal (left) or the TGN46 signal (right) in control (black dots) and VAPA KO (red dots) cells. mean ( $\pm\text{SEM}$ ); number of cells analyzed: Control n=9 and 12 respectively and VAPA KO n=9 and 12, respectively. **C.** On the left, normalized ratio between the OSBP-PH GFP signal at the TGN46 and in the cytosol in control (black dots) and VAPA KO (red dots) cells. mean ( $\pm\text{SEM}$ ); number of cells analyzed: Control n=7 VAPA KO n=8. Normalized ratio between the OSBP-PH GFP signal at early endosomes (EEA1-positive compartment, right), or the trans-Golgi network (TGN46, left) and in the cytosol in control (black dots) and VAPA KO (red dots) cells.

mean ( $\pm$ SEM); number of cells analyzed: Control n=12 VAPA KO n=11. **D.** XZ view of PM PI(4,5)P2 immunostained with an antibody in control and VAPA KO cluster cells acquired using identical confocal microscope settings. Each acquisition represents one cell. Scale Bar: 5  $\mu$ m. **E.** Relative quantity of PM PI(4,5)P2 in control (black) and VAPA KO (red) cells obtained from D.; mean ( $\pm$ SEM); number of cells analyzed: Control n=58 VAPA KO n=53. **F.** PI(4,5)P2-selective PH-PLC mRFP probe transiently transfected in control (top) and VAPA KO (bottom) leader cells. Confocal acquisitions show PH-PLC mRFP (white) in actin-based cell protrusions labeled with phalloidin (magenta). Scale bar: 10  $\mu$ m. **G.** Normalized Ratio between the signal of PH-PLC-mRFP at the ruffles and the cytosol in control (black dots) and VAPA KO (red dots) cells obtained from C. ; mean ( $\pm$ SEM); number of cells analyzed: Control n=27 VAPA KO n=26. Data were analyzed using non parametric Mann-Whitney t-test (ns: non-significant, \*\*\*P-values <0.001)

#### **Figure 4. VAPA stabilizes ventral ER-PM contact sites at the front of migrating cells**

**A.** Acquisition of GFP MAPPER (in green) and RFP KDEL (in magenta) by TIRF microscopy in control and VAPA KO cells. Scale bar: 5  $\mu$ m. **B.** Time series in TIRF microscopy of the accumulation of the GFP MAPPER (green) in ER structures (magenta) close to the PM. Scale bar: 1  $\mu$ m. **C.** spinning disk acquisition. Time series of GFP MAPPER at the top z-plans (magenta) and the bottom z-plans (in green) in control cells. In blue are circled 2 GFP MAPPER labeled- ER-PM MCS at the top of the migrating cell and in red are circled 2 GFP MAPPER labeled- ER-PM MCS at the bottom of the migrating cell. Scale bar: 5  $\mu$ m. **D.** TEM acquisition of ER-PM membrane contact sites at the front of migrating cells. Scale bar 1 micron (top) and 100 nanometers in the squares 1 and 2. **E.** Time scale of ER-PM MCS in control (top) and VAPA KO (bottom) acquired by TIRF microscopy. Scale bar 1  $\mu$ m. Schemes below represent the positions of the circled ER-PM MCS used as example. On the right, life time in seconds of ER-PM MCS (top) and speed in  $\mu$ m\*s<sup>-1</sup> of ER-MP MCS in control (black dots) and in VAPA KO (red dots) (bottom), mean ( $\pm$ SEM); at least 10 ER-PM MCS were analyzed per cell and number

of cells analyzed were Control n=8 and VAPA KO n=6. All data were analyzed using non parametric Mann-Whitney t-test (\*\*P-values <0.001).

**Figure 5. VAPA promotes focal adhesion disassembly.**

**A.** Assembly and **B.** disassembly rate in  $\text{min}^{-1}$  of focal adhesion. in control (black) and in VAPA KO (red) cells, mean ( $\pm$ SEM); number of cells analyzed during 1 to 2h movies: Control n=9 VAPA KO n=8. **C.** Time scale of focal adhesion life span in minutes in control and VAPA KO by TIRF microscopy. Scale Bar 1  $\mu\text{m}$ . **D.** Distribution of focal adhesion life time in minutes in control (black) and VAPA KO (red) cells **E.** Mean of focal adhesion life time in minutes in control (black dots) and VAPA KO (red dots) cells obtained from TIRF live imaging; mean ( $\pm$ SEM); number of cells analyzed: Control n=9 VAPA KO n=8 **F.** Nocodazole treatment (10  $\mu\text{M}$  for 2h) in starved conditions in control and VAPA KO cells. Nocodazole was washed-out and cells fixed 0,15,30 or 60 min post washout. Paxillin staining with an antibody was used to label focal adhesions. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$  (2  $\mu\text{m}$  in insets). **G** Focal adhesions size in  $\mu\text{m}^2$  were calculated and normalized to the time point 0 min post washout in control (black) and VAPA KO (red) cells. Control cells (black): washout :n=6053 focal adhesions for n=25 cells, 15 min post washout: n=5146 focal adhesions for 25 cells, 30 min post washout: n=5543 focal adhesions for 25 cells, and 60 min post washout: n=3913 focal adhesions for 22 cells).VAPA KO (red): washout: n=4481 focal adhesions for n= 23 cells, 15 min post washout: n=3878 for 24 cells, 30 min post washout: n= 4165 focal adhesions for 22 cells, and 60 min post washout: n=4889 focal adhesions for 23 cells,. mean ( $\pm$ SEM). Data were analyzed using non parametric Mann-Whitney t-test (\*\*P-values <0.001).

**Figure 6. VAPA regulates microtubule-induced focal adhesion disassembly.**

**A.** TIRF acquisitions of leader control and VAPA KO cells showing transiently transfected GFP-MAPPER and mCherry-Vinculin. Scale bars: 10  $\mu\text{m}$  (1  $\mu\text{m}$  in insets 1,2,3 and 4). **B.**

Percentage of focal adhesions in close proximity (TIRF microscopy) to ER-PM MCS in control (black dots) and in VAPA KO (red dots) cells, mean ( $\pm$ SEM); number of cells analyzed: Control n=12 VAPA KO n=10. **C.** Time series of the GFP MAPPER and mCherry-Vinculin acquired by TIRF microscopy in control leader cell. Scale bar: 1  $\mu$ m. and **D.** Temporal correlation between mCherry-Vinculin (magenta) and GFP MAPPER (green) signals in the area of the focal adhesion pointed with the white arrow in (C). Fluorescence intensities are given in arbitrary units. Data were analyzed using non parametric Mann-Whitney t-test (\*\*\*P-values <0.001).

## SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

### Supplemental Figure 1

**A.** Control and VAPA KO clones were immunostained with anti-VAPB antibody. Scale bar 20  $\mu\text{m}$ . **B.** Confocal acquisitions of VAPA KO cells lines stably expressing mCherry-VAPA short Wild-Type form and mCherry-VAPA short KD/MD form. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ .

### Supplemental Figure 2

**A.** Transmission Electron Microscopy (TEM) acquisitions of ER-related Membrane Contact Sites between Endoplasmic (ER) Reticulum and the Plasma Membrane (PM). Scale bar: 0.3  $\mu\text{m}$ . A scheme represents the ER in orange and the PM in green. **B.** Quantification of the ER portion in contact with the PM in control (black dots) and in VAPA KO (red dots) in  $\mu\text{m}$ , mean ( $\pm\text{SEM}$ ); the number of cells analyzed: Control  $n= 25$  and VAPA KO  $n= 14$ . ns: non-significant **C.** Percentage of the PM in contact with the ER in control (black dots) and in VAPA KO (red dots), mean ( $\pm\text{SEM}$ ); the number of cells analyzed Control  $n= 25$  and VAPA KO  $n= 14$ . ns: non-significant. All data were analyzed using non parametric Mann-Whitney t-test.

Figure 1

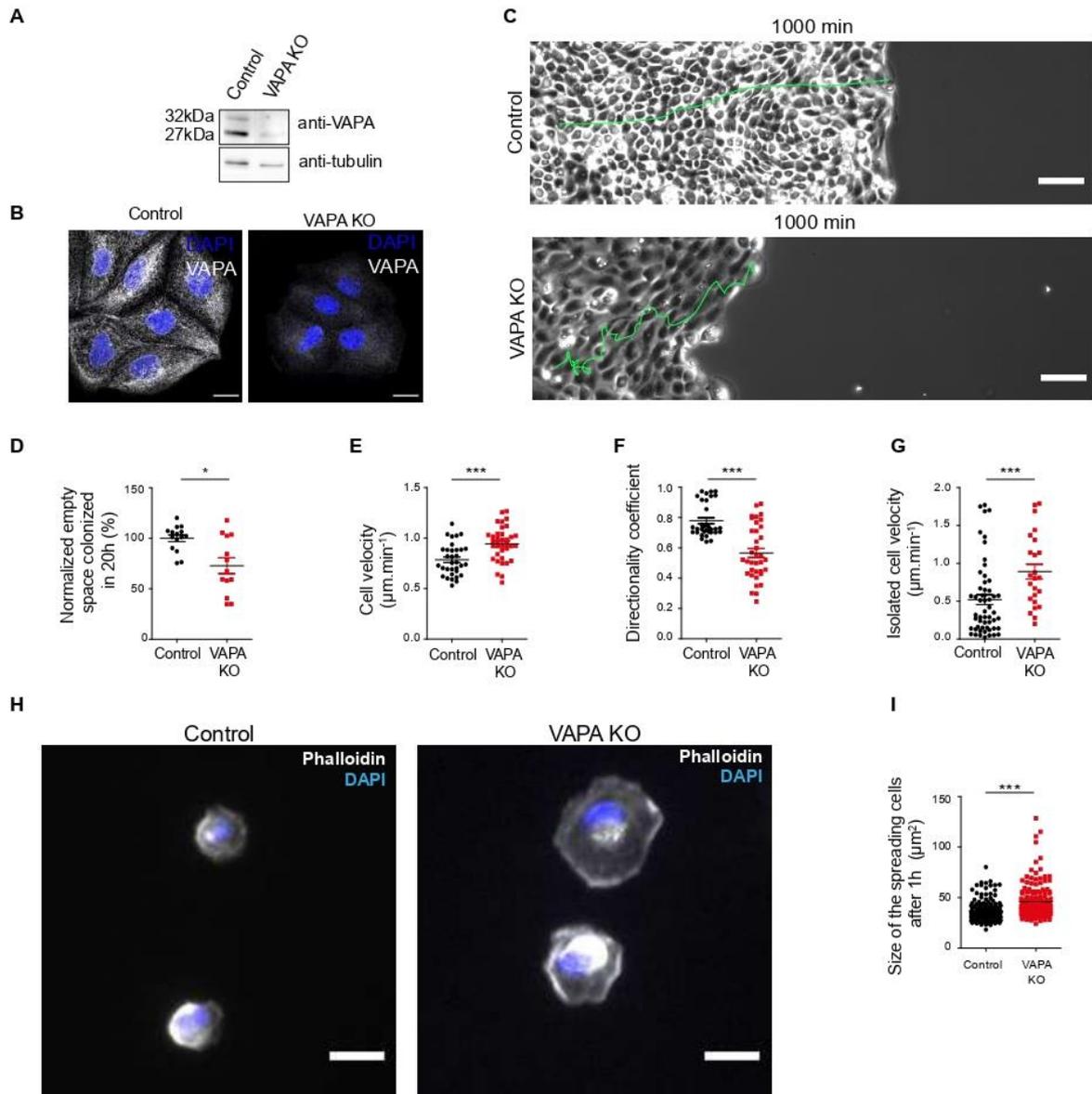


Figure 2

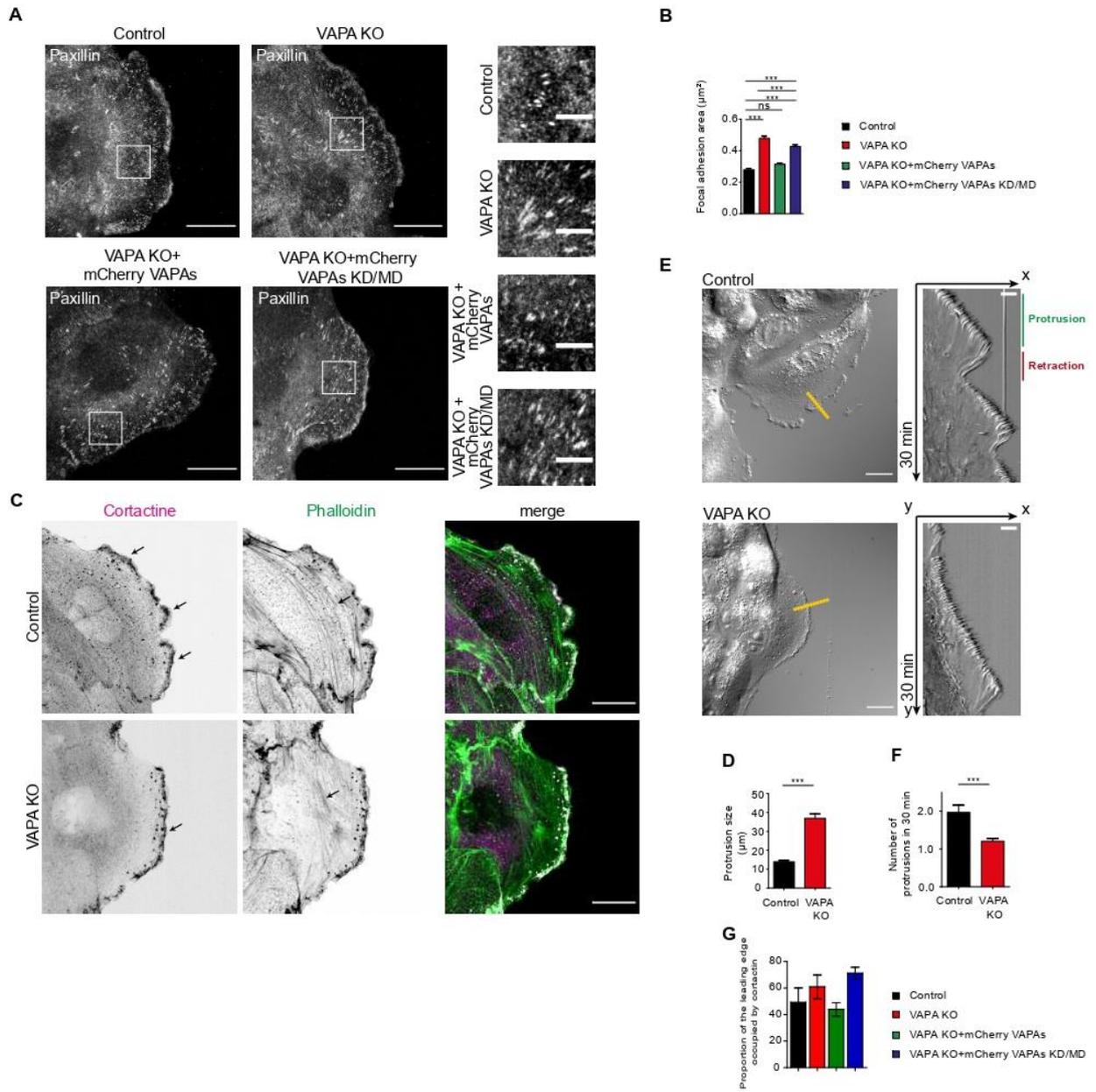


Figure 3

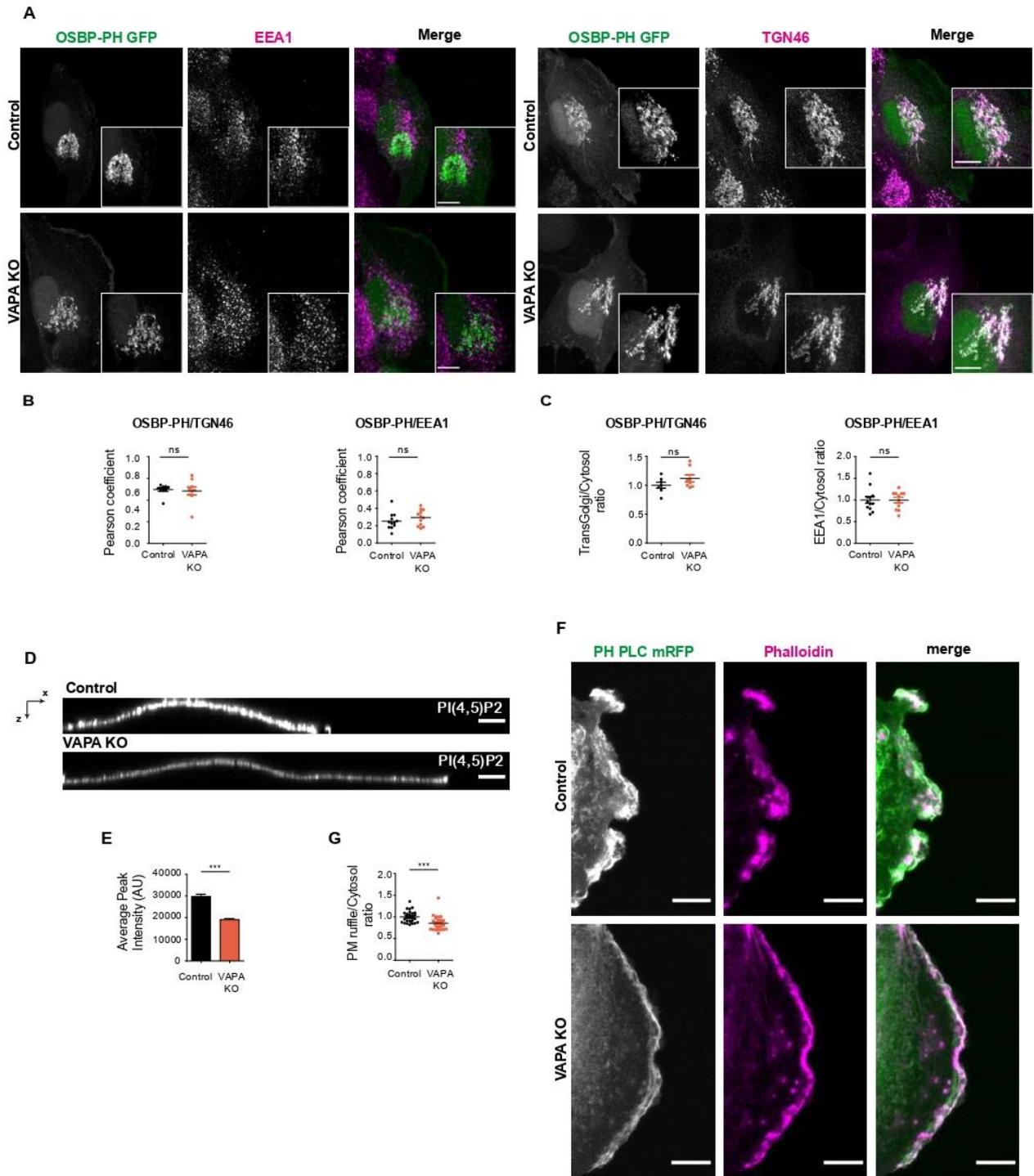


Figure 4

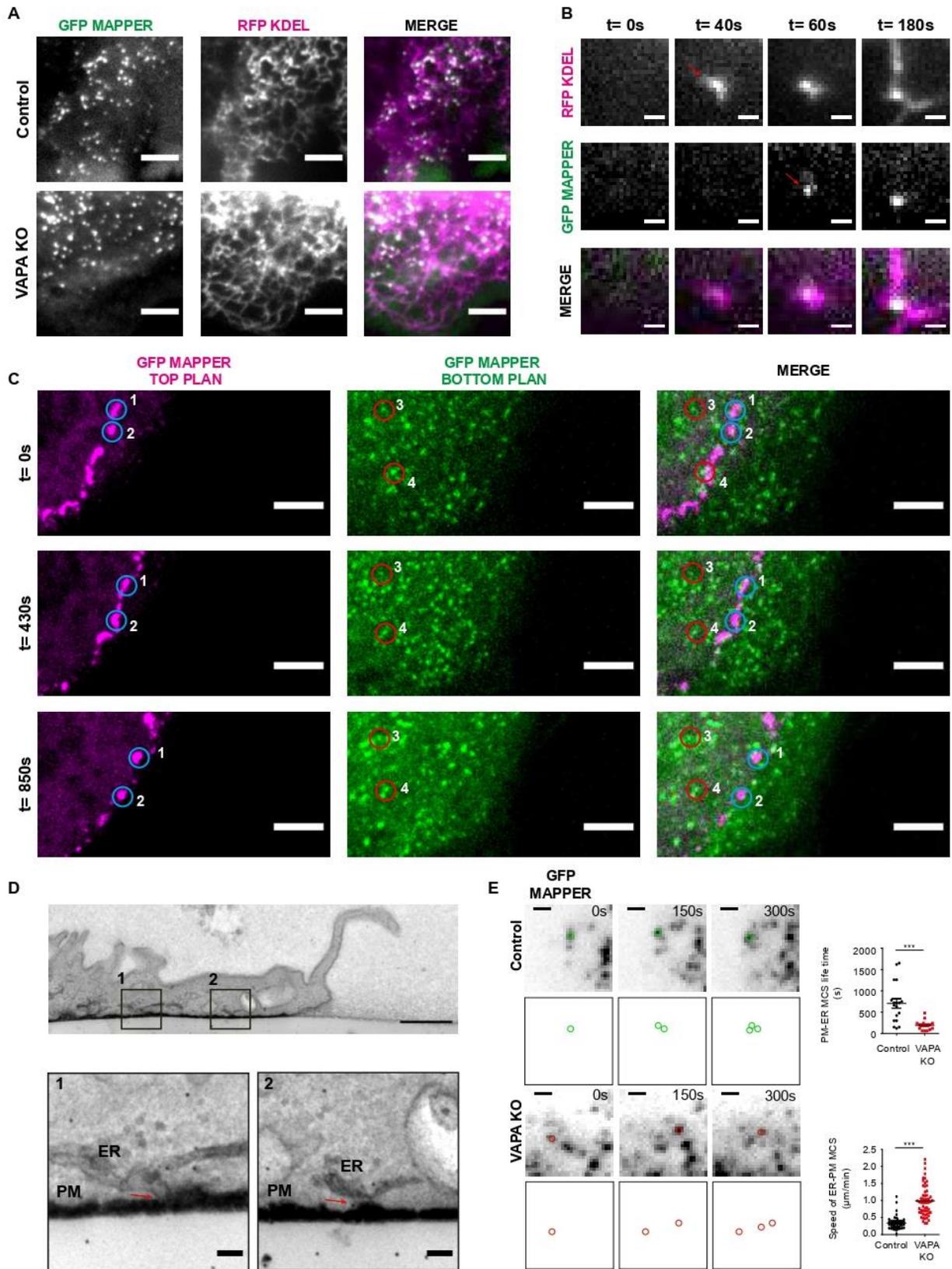


Figure 5

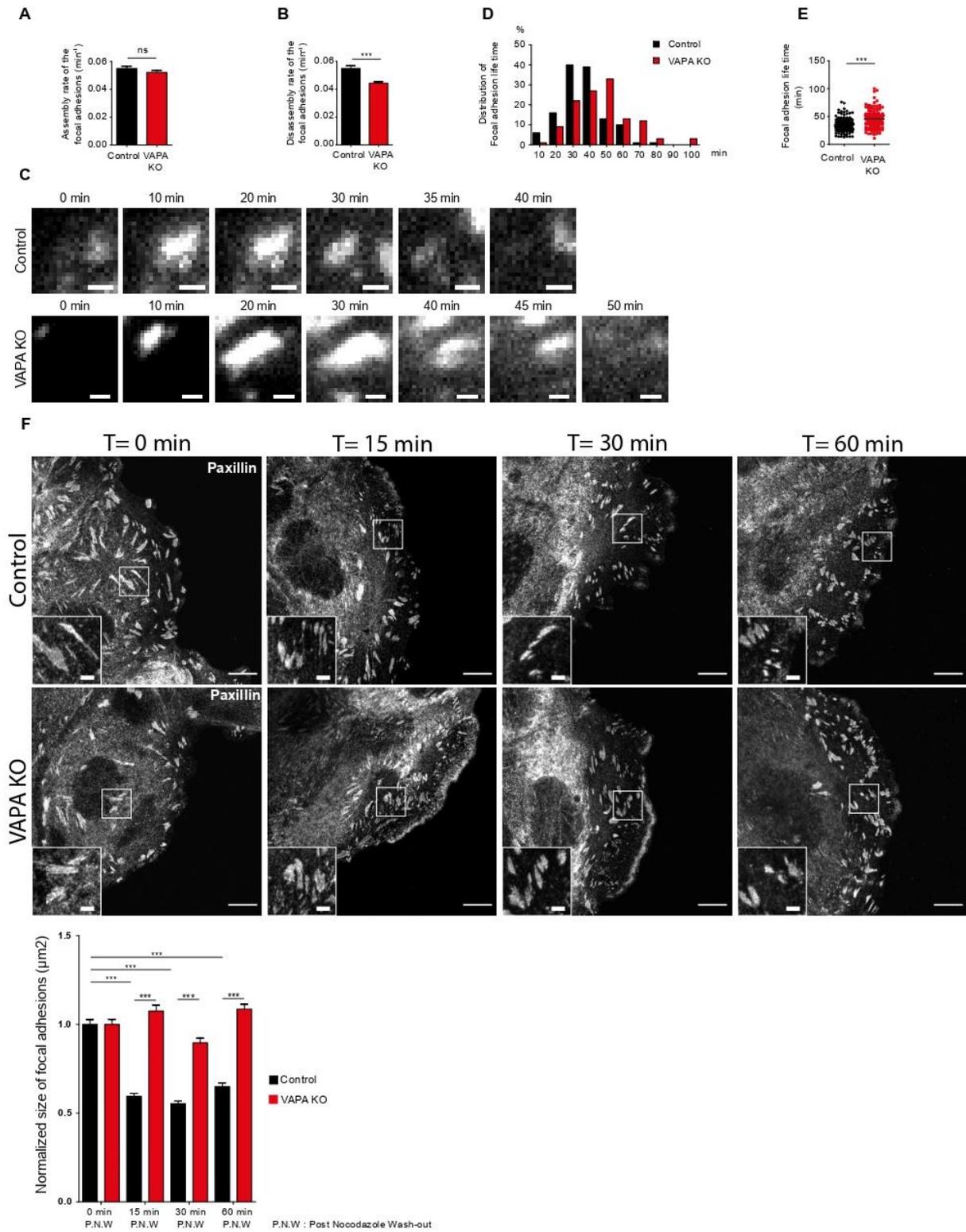
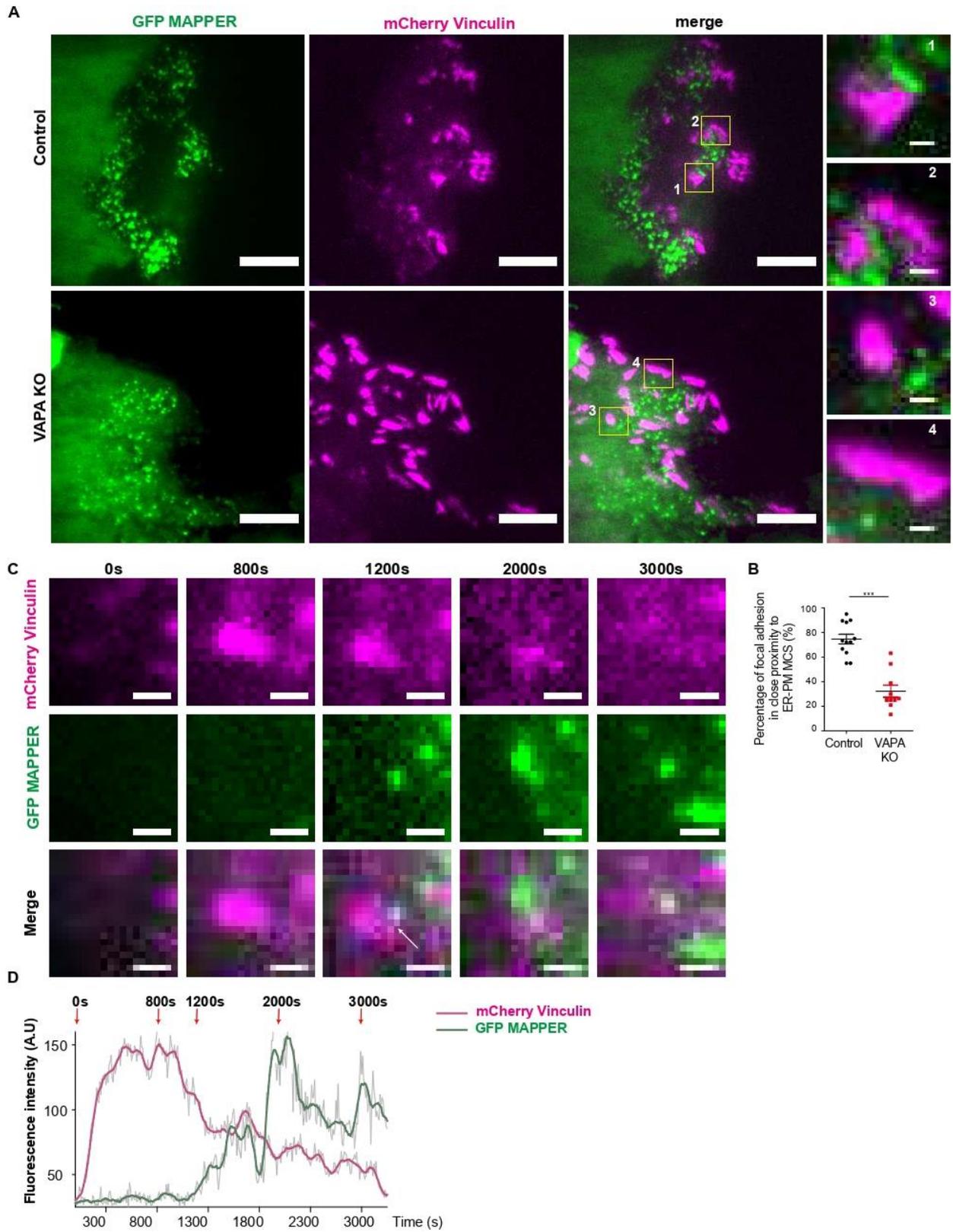
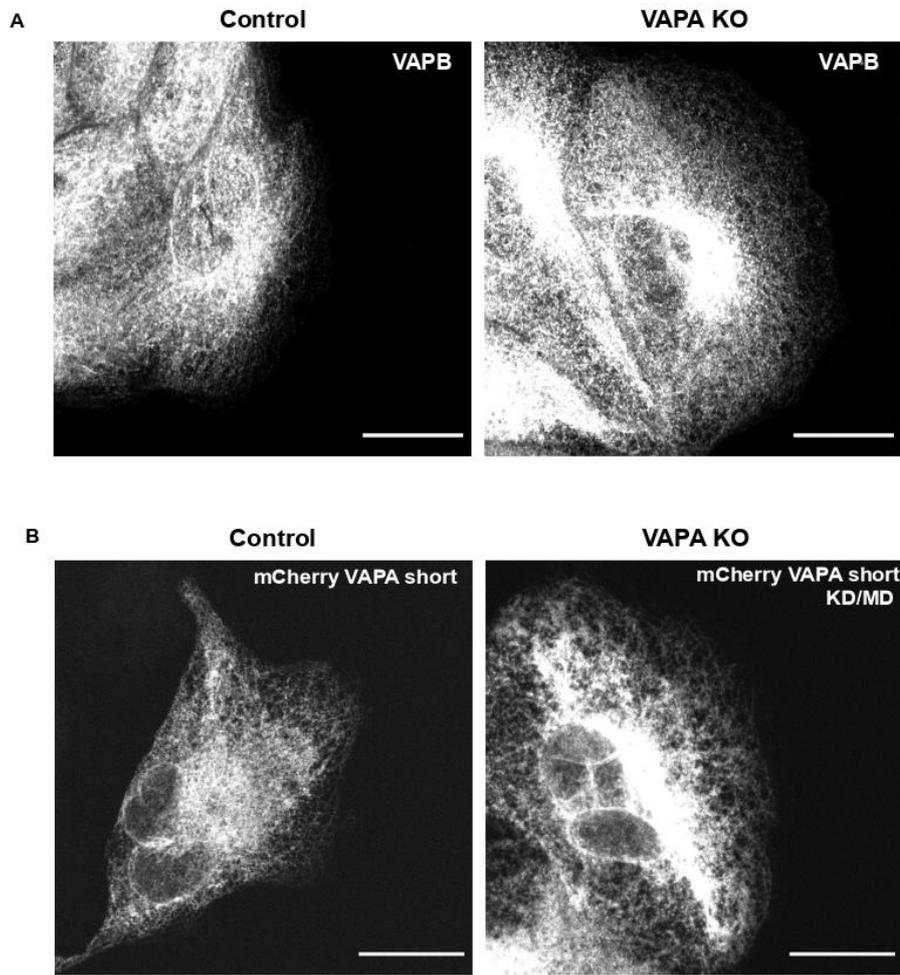


Figure 6

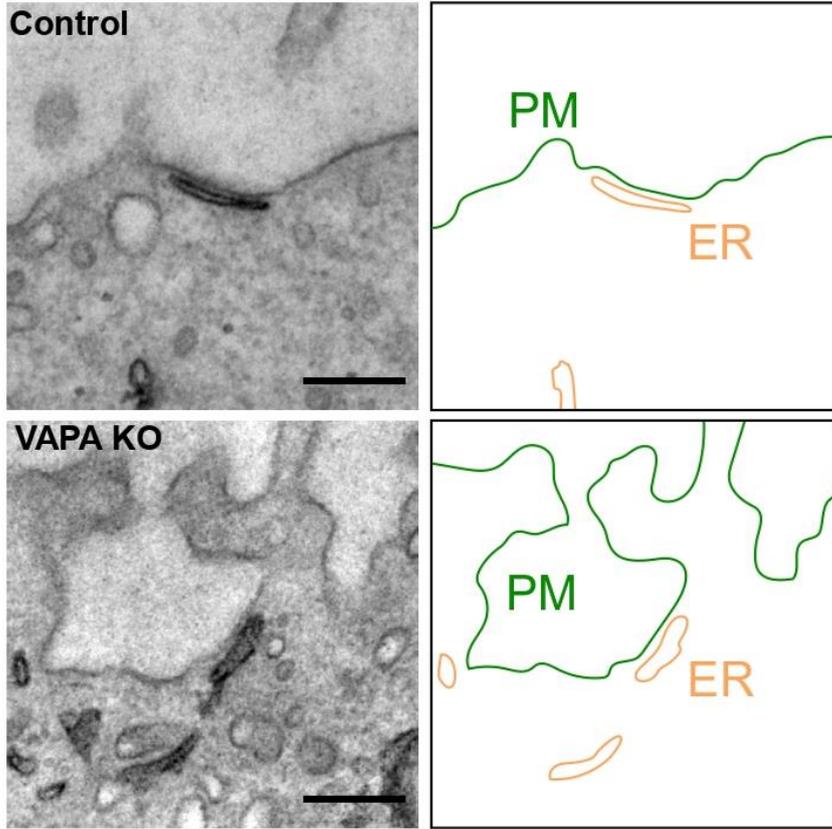


Supplemental Figure 1

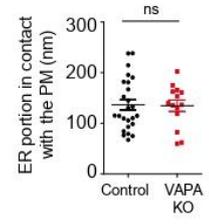


Supplemental Figure 2

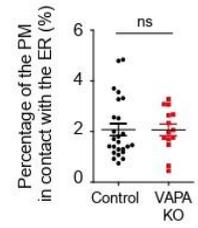
A



B



C



## Discussion et perspectives

### 1. Rappel des résultats principaux et modèle

Au cours de ma thèse, nous avons démontré que VAPA est un régulateur essentiel de la migration cellulaire (figure 25) :

VAPA régule la capacité des cellules à coloniser un espace vide mais également leur vitesse et directionnalité.

VAPA contrôle la taille des ACM à travers la régulation du désassemblage des adhésions focales. En effet, dans les VAPA KO, nous avons mesuré que la vitesse de désassemblage des ACM est plus lente que dans les contrôles. Ce résultat peut expliquer l'accumulation d'ACM plus importante en taille dans les VAPA KO par rapport aux contrôles. De plus, ce phénotype dépend de l'interaction de VAPA avec ses partenaires via son domaine MSP. Nous avons également montré que le désassemblage des ACM induit par les microtubules dépend de VAPA.

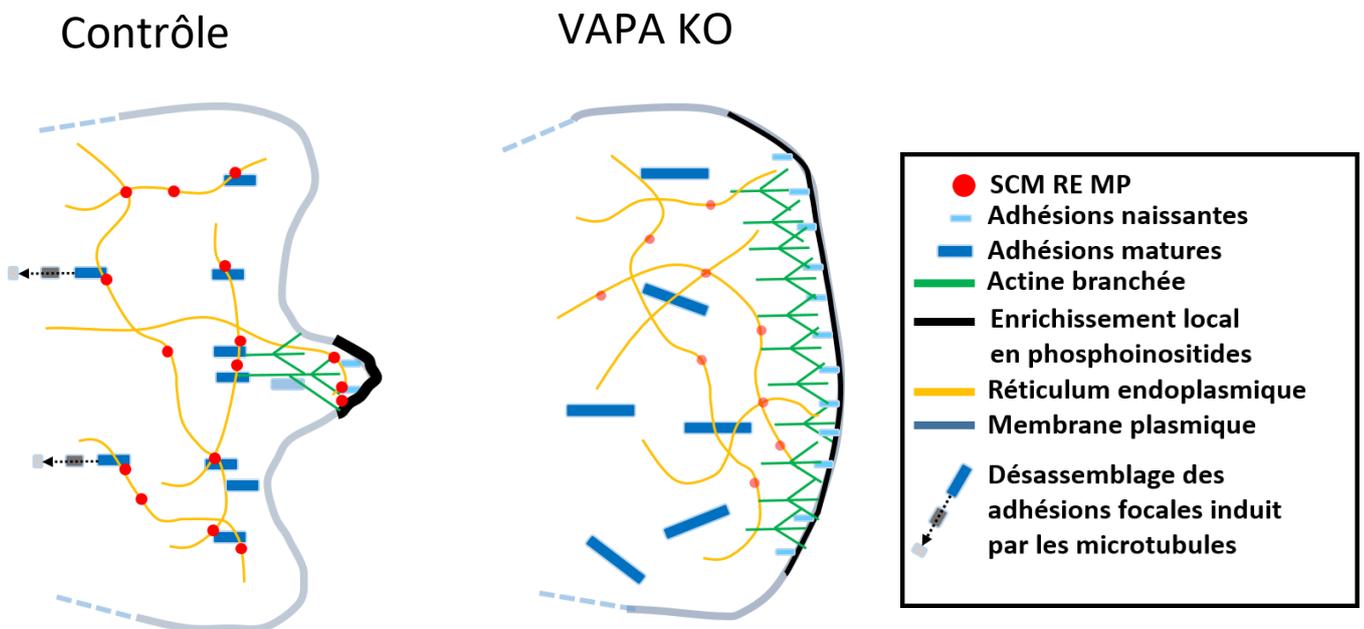
VAPA régule le réseau d'actine et la dynamique du lamellipode au cours de la migration. Dans les cellules contrôles, on mesure deux fois plus de phases de protrusions/rétractions que dans les cellules VAPA KO. Ce phénotype s'accompagne d'un défaut des structures d'actine pour lesquelles les fibres de stress sont plus petites et moins épaisses en absence de VAPA.

La dynamique des ACM et du réseau d'actine dépendent en partie du pool de phosphoinositides à la membrane plasmique. Nous avons mesuré moins de PI(4,5)P2 à la membrane plasmique des cellules VAPA KO par rapport au contrôle. De plus, nous n'avons pas observé de perturbation du pool du PI4P intracellulaire dans les VAPA KO. Ce résultat montre que VAPA régule spécifiquement la quantité de PI(4,5)P2 à la membrane plasmique.

Pour étudier la dynamique des SCM RE-MP, nous avons utilisé la sonde GFP MAPPER qui les marque spécifiquement. Nous avons caractérisé la présence d'une population de SCM RE-MP ancrée au substrat dans les contrôles et VAPA KO. Nous avons identifié une population à proximité des ACM dont la présence corrèle avec le désassemblage des adhésions focales dans les contrôles. De manière intéressante, cette proximité entre ACM et SCM RE-MP au

cours de leur désassemblage est moins fréquente dans les VAPA KO. De plus, nous avons mesuré que la stabilité des SCM RE-MP est régulée par VAPA. En effet dans les VAPA KO, nous avons mesuré que la durée de vie des SCM RE-MP est moins importante que dans les contrôles.

En microscopie électronique nous avons mesuré que l'absence de VAPA ne perturbe pas la formation de SCM RE-MP. De plus dans les VAPA KO, nous avons observé que la taille du RE qui s'appose à la membrane plasmique est similaire à celle du contrôle. Nous avons également calculé que le pourcentage de la membrane plasmique en contact avec le RE est similaire dans les contrôles et VAPA KO.



**Figure 25. Récapitulatif des résultats.** A gauche : représentation d'une cellule guide contrôle. Les SCM RE-MP sont stables et accolés aux ACM. A travers les échanges des PPI les SCM RE-MP maintiennent l'homéostasie des lipides, ce qui favorise la dynamique des ACM et des protrusions/rétractions des lamellipodes. A droite, représentation d'une cellule guide VAPA KO. L'instabilité des SCM RE-MP est associée à un niveau moins important en PPI à la MP, ce qui dérégule la dynamique des ACM et des vagues d'actine.

Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives qui sont explorées ci-dessous selon plusieurs points :

- Ancrage des SCM RE-MP aux ACM
- Lien direct entre les SCM RE-MP et le désassemblage des ACM
- Rôle de Nir2 dans la régulation du PI(4,5)P2 à la MP
- Le PI(4,5)P2 dans le désassemblage des ACM induit par les microtubules
- Rôle d'ORP3 dans le désassemblage des ACM
- ORP3 dans la régulation de l'activité lamellipodiale
- Interdépendance entre les ACM et les protrusions membranaires
- Dialogue entre les SCM RE-MP d'échanges de lipides et de Calcium
- Implication de VAPA dans des processus physiopathologiques
- Modèle du rôle de VAPA dans la migration

## **2. Ancrage des SCM RE-MP aux ACM**

Dans les cellules contrôles, les SCM RE-MP au niveau du substrat sont stables et accolés aux ACM. Alors que dans les VAPA KO, les SCM RE-MP sont moins stables et moins associés aux ACM. VAPA régule donc la stabilité des SCM RE-MP et leur ancrage aux ACM. Pour expliquer ces résultats, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses. Tout d'abord à travers l'interaction de VAPA avec ses partenaires (comme ORP3 et Nir2) les SCM RE-MP peuvent s'établir de manière stable à la MP. En effet, l'ensemble du complexe formé entre VAPA et ses partenaires permet de maintenir les deux membranes apposées en contact (Eisenberg-Bord et al., 2016). Cependant, en absence de VAPA, la formation de SCM RE-MP est toujours possible, notamment à travers l'interaction de VAPB avec ses partenaires. En revanche, dans les VAPA KO, nous avons observé un défaut de recrutement d'ORP3. Basé sur ce résultat, nous pouvons émettre l'hypothèse que des défauts de recrutement d'autres partenaires des protéines VAPs peuvent avoir lieu dans les VAPA KO. Ce qui permettrait d'expliquer pourquoi les SCM RE-MP ont une durée de vie environ 4 fois plus importante dans les contrôles que

dans les VAPA KO. Ensuite, VAPA interagit avec les microtubules (Skehel et al., 2000). Or les microtubules sont proches des ACM au cours de leur désassemblage. On peut émettre l'hypothèse que le RE interagit avec les microtubules à travers VAPA au cours du désassemblage des ACM. Ainsi, dans les contrôles, les microtubules peuvent servir de support pour transloquer le RE à proximité de la membrane plasmique. En conséquences, VAPA se retrouverait proche de la membrane plasmique et favoriserait la formation des SCM RE-MP accolés aux ACM lors de leur désassemblage. Ainsi cette hypothèse permettrait d'expliquer comment VAPA et les microtubules pourraient réguler la proximité des SCM RE-MP avec les ACM.

### **3. Lien direct entre les SCM RE-MP et le désassemblage des ACM**

Mes résultats montrent que VAPA contrôle le désassemblage des ACM. De plus, j'ai montré que VAPA régule la proximité des SCM RE-MP avec les adhésions focales. Ces résultats suggèrent que la dynamique des ACM est régulée par les SCM médiés par VAPA. Notre étude se place dans un contexte où les travaux récemment réalisés par [D'Souza et al., 2020](#) ont montré qu'ORP3, partenaire de VAPA, est recrutée à la MP et contrôle le désassemblage des adhésions focales en réponse à l'influx de calcium dans les cellules MDA-MB-231. Les auteurs ont montré qu'ORP3 est recruté dans des structures ponctiformes et co-localise avec des protéines des SCM RE-MP comme E-Syt1 et STIM1 en réponse au Calcium, au cours de la migration. De plus, ils ont montré que dans les zones de rétractions du lamellipode, ORP3 est accolé aux ACM et que cela corrèle avec leur désassemblage. Nos résultats vont dans le même sens que cette étude en montrant pour la première fois qu'une partie de la population de SCM RE-MP corrèle avec le désassemblage des ACM. De manière similaire à leur étude, dans nos cellules ORP3 pourrait être recruté aux SCM RE-MP médiés par VAPA et réguler la dynamique des ACM. Cependant, nous avons montré que la corrélation entre la présence de SCM RE-MP et le désassemblage des ACM s'établit au niveau de la lamella malgré la présence de SCM RE-MP dans les zones de protrusions. En plus d'établir un lien de corrélation entre la présence de SCM RE-MP et le désassemblage des ACM, notre étude a permis de caractériser la dynamique des SCM RE-MP au cours de la motilité. En effet, depuis des décennies la visualisation des SCM s'est majoritairement faite sur des échantillons fixés en microscopie électronique. Depuis quelques années seulement

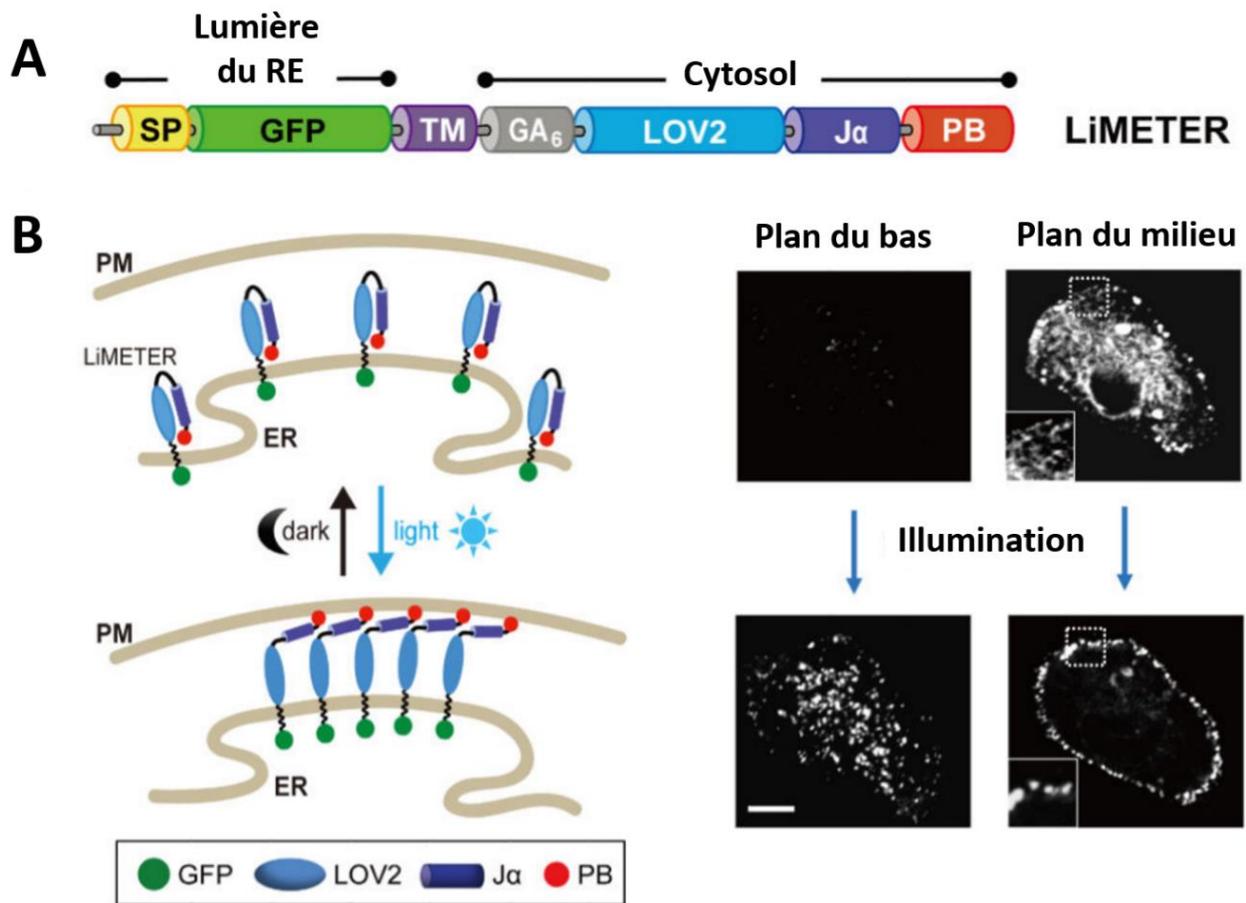
certains outils ont été développés pour étudier la dynamique des SCM. Ici, la sonde GFP MAPPER nous a permis de caractériser la dynamique des SCM RE-MP au cours de la migration. J'ai observé que les SCM RE-MP s'établissent du côté ventral et dorsal de la cellule au cours de la migration. Nous avons défini deux populations : Une accolée au substrat, pour laquelle les SCM RE-MP sont stables (environ d'une durée de vie de 11 min) et peu mobiles et dont une partie se localise à proximité des ACM, comme observé dans l'étude de (Dingsdale et al., 2013). Et une population du côté dorsal de la MP dont les SCM RE-MP sont stables et suivent le mouvement de la cellule en migration. L'étude de (Dingsdale et al., 2013) révèle qu'une partie des jonctions entre le RE et la MP sont dynamiques au cours de la rétraction de l'arrière des cellules PANC-1 au cours de la migration. Ils ont identifié également une population de jonctions plus stables proches des ACM et des structures d'actines au niveau du front de migration. Leur étude et nos résultats obtenus dans les CaCo-2 ouvrent plusieurs possibilités. Parmi l'ensemble des SCM RE-MP, on peut émettre l'hypothèse que des sous populations peuvent réguler localement des voies moléculaires différentes et avoir plusieurs fonctions au cours de la migration. Tout d'abord d'après notre étude, les SCM RE-MP médiés par VAPA pourraient recruter différents partenaires LTPs comme ORP3 et Nir2. A travers les échanges de phosphoinositides et la régulation du niveau du PI(4,5)P2 à la MP ces SCM RE-MP pourraient modifier localement les propriétés de la membrane plasmique et recruter un certain nombre de facteurs impliqués dans le désassemblage des ACM, comme par exemple RhoA et la clathrine. De plus, les SCM RE-MP pourraient localement réguler la traduction de certaines protéines au cours de la migration. On sait par exemple que des ARNm du complexe Arp2/3 sont transportés à l'avant de la cellule, où ils sont traduits localement (Mingle et al., 2005). Les SCM RE-MP pourraient faciliter la traduction locale des protéines Arp2/3, ce qui favoriserait la formation d'actine branchée et des protrusions.

Pour établir un lien direct entre les SCM RE-MP et le désassemblage locale des adhésions focales, notre étude pourrait être complétée par des expériences d'optogénétique dans nos cellules. En effet, nous avons établi un lien de corrélation entre VAPA, les SCM RE-MP et la dynamique des ACM. Dans les VAPA KO, le phénotype de désassemblage des ACM que nous avons décrit pourrait être associé à des effets indirects liés à l'absence de VAPA. Pour

s'affranchir de cette limite, nous voulons utiliser la sonde optogénétique LiMETER pour former/stabiliser des SCM RE-MP localement (figure 26).

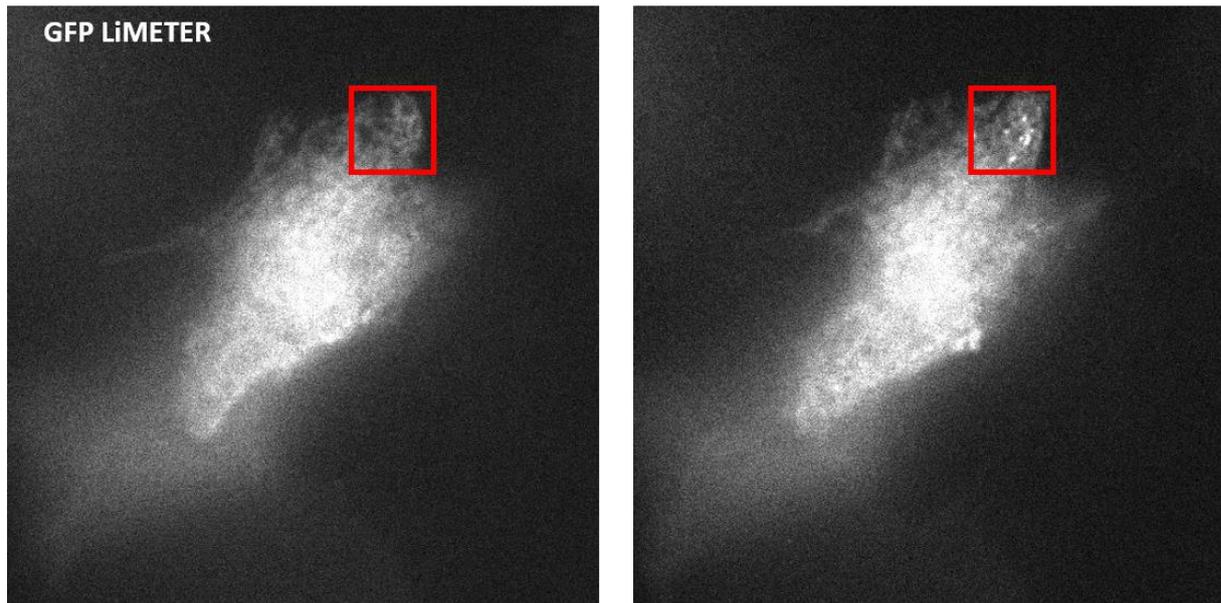
La sonde LiMETER (pour light-inducible membrane tethered peripheral endoplasmic reticulum) est une sonde optogénétique ancrée au RE qui s'associe à la MP après activation, permettant de manipuler les SCM RE-MP de manière réversible. La partie ancrée au RE possède un peptide signal (SP) et le domaine transmembranaire (TM) de STIM1 qui sont séparés par la GFP. La partie cytosolique possède un linker, le domaine photosensible LOV2 et du domaine polybasique de la GTPase Rit. Le domaine LOV2 change de conformation en présence d'une longueur d'onde comprise entre 450 et 490 nm. Dans le noir le domaine polybasique est masqué par le domaine LOV2. En présence d'une lumière bleue, le domaine LOV2 libère le domaine polybasique qui s'associe à la MP. Lorsque l'excitation est interrompue, la sonde optogénétique change de conformation et retrouve son état fermé initial. La sonde LiMETER module donc de manière réversible la formation/stabilité des SCM RE-MP.

Dans les cellules CaCo-2 nous avons trouvé les paramètres d'illumination locale à l'aide d'un module FRAP d'un spinning disk équipé d'un laser 488nm (Figure 27). Des pulses de 500 ms espacés de 10secondes permettent de recruter la sonde LiMETER à la MP et de moduler les SCM RE-MP. Dans des expériences de migration, nous aimerions utiliser cette sonde dans les cellules contrôles et VAPA KO. Nous aimerions recruter la sonde LiMETER, localement, proche des ACM et mesurer leur dynamique de désassemblage. Dans les contrôles, on s'attend à pouvoir déclencher le désassemblage local des ACM après activation de la sonde. Dans les cellules VAPA KO au contraire, moduler la dynamique de désassemblage des ACM ne serait pas possible. Ainsi, cette expérience permettrait de conclure sur le rôle direct et local des SCM RE-MP médiés par VAPA dans la régulation de la dynamique des ACM. Cependant, comme VAPA possède plusieurs partenaires, des expériences futures consisteraient à caractériser le(s) complexe(s) VAPA/PTL impliqué(s) dans la motilité des cellules CaCo-2.



adapté de (Jing et al., 2015)

**Figure 26. A. Structure de la sonde optogénétique LiMETER.** En N terminal, le signal peptide (SP) et le domaine transmembranaire (TM) sont séparés par la GFP. Les domaines SP et TM permettent l'adressage et l'ancrage de la sonde au RE. La partie cytosolique comprend un domaine LOV2 photosensible et un domaine polybasique (PB) d'association avec la membrane plasmique. En **B**, A gauche, principe de fonctionnement de la sonde. En absence de lumière, le domaine LOV2 adopte une conformation fermée qui empêche le domaine PB d'interagir avec la membrane plasmique. En présence de lumière un changement de conformation du domaine LOV2 libère le domaine PB qui interagit avec la MP. A droite. Plan du bas et plan du milieu de la cellule transfectée avec la sonde LiMETER. Avant illumination, la sonde est présente dans le RE et après illumination, la sonde est recrutée à la MP et favorise la formation et/ou la stabilité des SCM RE-MP.



**Figure 27. Activation de la sonde LiMETER dans les cellules CaCo-2.** Acquisition au spinning disk. A gauche, une cellule contrôle positive pour la sonde LiMETER ancrée au RE. Le carré rouge indique la zone FRAP d'intérêt. A droite, activation de la sonde LiMETER dans la zone FRAP après des pulses de 500 ms au laser 488nm espacés de 10s. On observe l'apparition de structures ponctiformes après illumination.

#### 4. Rôle de Nir2 dans la régulation du PI(4,5)P2 à la membrane plasmique

Les protéines VAPs possèdent plus de 250 partenaires (James and Kehlenbach, 2021). La déplétion des protéines VAPs est associée à de nombreux phénotypes. Le rôle principal des protéines VAPs est d'interagir avec des protéines d'échanges de lipides aux SCM pour maintenir l'homéostasie des lipides dans la cellule. Cependant, il existe des différences liées aux types cellulaires (Stefan et al., 2011, Mao et al., 2019). Par exemple, dans les levures la déplétion des orthologues des protéines VAPA et VAPB, Scs22 et Scs2, entraîne l'augmentation du niveau du PI4P à la membrane plasmique (Manford et al., 2012). Dans les cellules HeLa, la déplétion de VAPA et de VAPB entraîne une diminution du niveau de PI4P au Golgi et une accumulation du PI4P aux endosomes (Dong et al., 2016). Dans les cellules VAPA KO, on pourrait s'attendre à obtenir une élévation de la quantité du PI4P à la membrane plasmique. Pour tester cette hypothèse, j'ai transfecté les cellules avec la sonde P4M-SidM qui permet de visualiser le PI4P, notamment le pool à la membrane plasmique

(Hammond et al., 2014). Malheureusement, le niveau de PI4P dans les contrôles et les VAPA KO est trop faible pour mesurer sa quantité relative par cette méthode. Comme le PI4P est un précurseur du PI(4,5)P<sub>2</sub>, une élévation du PI4P dans les VAPA KO pourrait être associée à une augmentation du niveau du PI(4,5)P<sub>2</sub> à la membrane plasmique de ces cellules. Or, nous mesurons une diminution du niveau du PI(4,5)P<sub>2</sub> à la membrane plasmique des VAPA KO par rapport aux cellules contrôles. Pour expliquer ce résultat, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses. En absence de VAPA, le cycle du PI pourrait être perturbé. Le PI est normalement transféré du RE à la membrane plasmique via l'interaction de Nir2 avec VAPA/VAPB aux SCM RE-MP. Ce PI peut servir de précurseur du PI4P qui peut se métaboliser à son tour en PI(4,5)P<sub>2</sub>. Malgré la présence de VAPB dans les VAPA KO, on a mesuré une instabilité importante des SCM RE-MP pouvant entraîner un défaut de recrutement de Nir2 à la MP. Ainsi cela pourrait être associé à un défaut de transfert du PI à la MP et donc à une diminution du PI(4,5)P<sub>2</sub> à la membrane plasmique. Ce résultat serait en accord avec l'étude réalisée par (Kim et al., 2013) qui montre que Nir2 régule le niveau de PI(4,5)P<sub>2</sub> à la membrane plasmique au cours de la migration. Pour tester l'hypothèse de défaut de recrutement de Nir2 dans les VAPA KO, je pourrais utiliser des anticorps anti-Nir2 et visualiser si Nir2 est associé au GFP MAPPER dans les cellules contrôles et VAPA KO. Je m'attends à observer Nir2 recruté aux SCM RE-MP dans les contrôles. En revanche, dans les cellules VAPA KO, je m'attends à voir Nir2 localisé au Golgi et dans le cytosol. La deuxième hypothèse pour expliquer la diminution du PI(4,5)P<sub>2</sub> dans les VAPA KO est indépendante du niveau pré existant du PI4P à la MP. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de la PI4K, comme la drogue LY294002, cause une déplétion du pool de PI4P. Cet inhibiteur a des effets mineurs sur le pool de PI(4,5)P<sub>2</sub> à la membrane plasmique des cellules COS-7 (Hammond et al., 2012). Cette étude indique qu'il y'a au moins une autre source de précurseur permettant de synthétiser du PI(4,5)P<sub>2</sub> à la membrane plasmique. Les travaux de (Szentpetery et al., 2010) ont permis de montrer que le pool du PI4P au Golgi peut maintenir en partie le niveau du PI(4,5)P<sub>2</sub> à la membrane plasmique. Cette maintenance s'établi à travers le trafic de cargo enrichies en PI4P qui transitent du Golgi à la membrane plasmique et permet de générer un nouveau pool de PI4P qui sera ensuite métabolisé en PI(4,5)P<sub>2</sub>. Si l'on suit cette deuxième hypothèse, une diminution du PI(4,5)P<sub>2</sub> à la membrane plasmique des cellules VAPA KO pourrait être expliqué si le niveau de PI4P au Golgi est moins important par rapport au contrôle ou si le trafic de cargos du Golgi vers la membrane plasmique est impacté. De

manière intéressante, nous avons détecté un défaut d'orientation du Golgi dans les VAPA KO au cours de la migration. L'axe noyau-Golgi n'est plus orienté face à la membrane plasmique comme mesuré dans les contrôles. Ce défaut d'orientation pourrait s'accompagner d'un défaut de trafic vers la membrane plasmique des cargos enrichis en PI4P dans les VAPA KO. Ainsi, on pourrait expliquer la diminution du PI(4,5)P2 mesurée en absence de VAPA.

De plus, nous avons mesuré que le niveau de PI4P au Golgi et aux endosomes sont similaires dans les contrôles et VAPA KO. Ces résultats sont en accord avec les travaux réalisés par (Dong et al., 2016). En effet, dans les cellules HeLa KO pour VAPA et VAPB la sur-expression de la forme exogène de VAPB ou de VAPA suffit à rétablir les niveaux du PI4P au Golgi. Dans les cellules VAPA KO, nous avons montré que la quantité relative de VAPB est importante et similaire aux cellules contrôle. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que les niveaux de PI4P intracellulaires peuvent être régulés par VAPA ou VAPB dans les CaCo-2 et qu'il existe un fort niveau de redondance entre ces deux protéines en ce qui concerne la régulation des niveaux de PI4P au Golgi. Pour vérifier cette hypothèse, on peut utiliser des siRNA dirigés contre les ARNm de VAPB dans les VAPA KO. Si on observe dans cette condition une accumulation de PI4P dans les endosomes, notre hypothèse sera validée. Par ailleurs, si une redondance fonctionnelle existe entre VAPA et VAPB, comment peut-on expliquer une diminution de la quantité de PI(4,5)P2 à la MP dans les VAPA KO ? Dans les VAPA KO nous avons mesuré une instabilité importante des SCM RE-MP. Ces derniers ont un temps de vie environ 4 fois moins important que dans les contrôles et se déplacent environ 2 fois plus rapidement. Ce phénotype d'instabilité des SCM RE-MP dans les VAPA KO peut être accompagné d'un défaut de recrutement des partenaires de VAPB mais également d'un défaut de transfert des lipides entre le RE et la MP, ce qui permet d'expliquer en partie la diminution du PI(4,5)P2 à la MP.

Ici, Nir2 semble être un candidat partenaire de VAPA possible pour réguler le niveau de PI(4,5)P2 à la membrane plasmique des cellules CaCo-2 au cours de la migration. Les expériences effectuées au cours de ma thèse peuvent être complétées par la génération de lignée KO pour Nir2 pour vérifier que le niveau de PI(4,5)P2 diminue dans ces conditions. Par ailleurs, pour valider l'implication directe du candidat Nir2 dans la régulation du PI(4,5)P2 à la membrane plasmique, mes travaux pourront être complétés par l'utilisation de sonde

optogénétiques. Nous développons des sondes permettant de moduler l'interaction de VAPA avec Nir2 aux SCM RE-MP à l'aide de pulses lumineux. Les sondes consisteront à générer des formes de VAPA et Nir2 exogènes, recrutées au RE et à la MP, respectivement. Le domaine FFAT de Nir2 pourrait être masqué par le domaine photosensible LOV2. L'utilisation de laser pourrait modifier la conformation de la sonde optogénétique Nir2, démasquant son domaine d'interaction FFAT. Je pourrais utiliser ces sondes dans les VAPA KO et les futures Nir2 KO pour visualiser si la quantité de PI(4,5)P2 peut être modulée. Par illumination globale, je m'attends à recruter la sonde aux SCM RE-MP et induire leur interaction. Dans les VAPA KO et futures Nir2 KO, je m'attends à pouvoir rétablir le pool de PI(4,5)P2 à la MP. Je pourrais ainsi conclure que Nir2 est un partenaire de VAPA impliqué dans la régulation du PI(4,5)P2 dans les CaCo-2 au cours de la migration cellulaire.

Par ailleurs, le niveau de PI(4,5)P2 à la membrane plasmique est important pour recruter ORP3, un autre partenaire de VAPA, et d'autres protéines impliquées dans la dynamique des ACM. Ce point fait l'objet des parties suivantes.

### **5. Le PI(4,5)P2 dans le désassemblage des ACM induit par les microtubules**

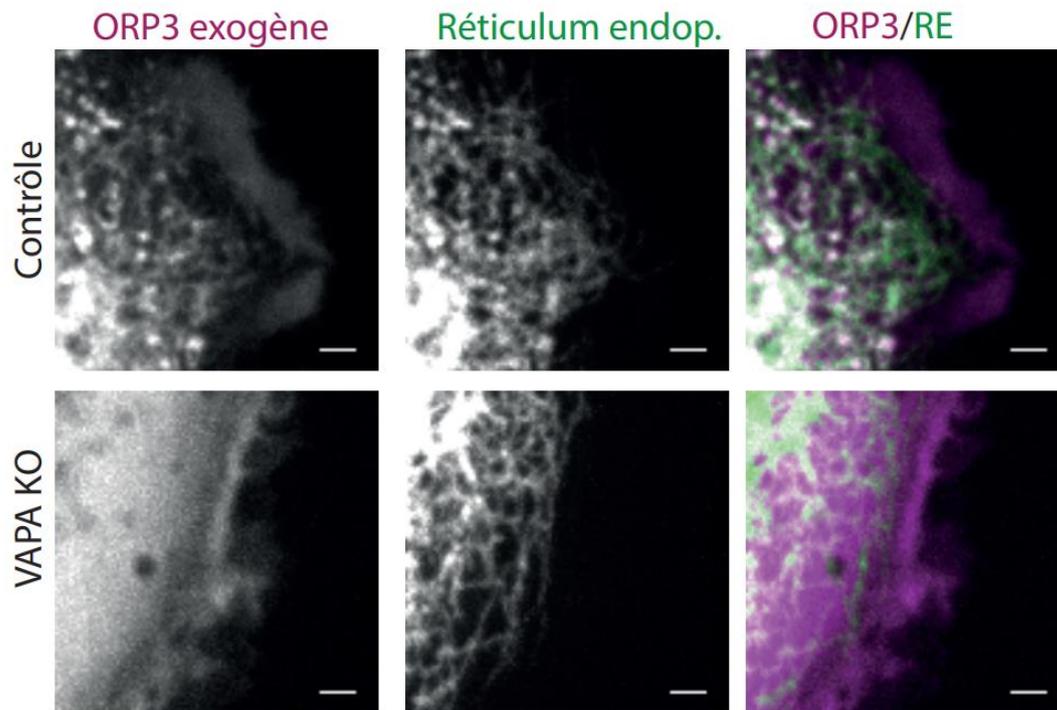
Au cours de ma thèse, nous avons montré que VAPA régule la dynamique des ACM à travers les microtubules. Il a clairement été établi que le désassemblage des ACM est dépendant des microtubules. Le traitement des cellules avec du nocodazole a permis dans un premier temps de synchroniser les ACM. Ensuite, le lavage du nocodazole permet de rétablir le désassemblage des ACM. On peut ainsi suivre l'évolution de leur taille et donc leur vitesse de désassemblage. Nous avons mesuré dans les contrôles que la taille des ACM diminue rapidement dans les premières minutes qui suivent le lavage du nocodazole. Dans les VAPA KO, la taille des ACM ne diminue pas après lavage du nocodazole. Cette expérience montre que VAPA régule le désassemblage des ACM qui est médié par les microtubules. Par ailleurs, il a été montré que le désassemblage des ACM au cours de la migration des cellules de fibroblastes s'établit à travers un mécanisme d'endocytose reliant les microtubules, la clathrine et des adaptateurs de la clathrine (Ezratty et al., 2009). Dans leur expériences, Ezratty et al., 2009 ont montré que la clathrine s'accumule à proximité des ACM pendant leur désassemblage induit par les microtubules. De plus, certains adaptateurs de la clathrine

comme Dab2 et ARH sont recrutés aux ACM. Or le recrutement de ces adaptateurs et de la clathrine dépendent du niveau du PI(4,5)P2 à la membrane plasmique (Di Paolo and De Camilli, 2006). De plus, (Chao et al., 2010) ont démontré que l'inhibition de la kinase PIPKI $\beta$ , qui génère du PI(4,5)P2 à la MP, bloque l'internalisation des intégrines  $\beta$  et la dynamique des ACM. Ce phénotype est notamment causé par l'absence du recrutement de la dynamine et de la clathrine aux ACM. (D'Souza et al., 2020) ont montré que la déplétion optogénétique du PI(4,5)P2 à la membrane plasmique est associé à une augmentation de la taille des ACM, suggérant un défaut de leur désassemblage.

Dans les cellules CaCo-2, comme VAPA régule la quantité de PI(4,5)P2 à la membrane plasmique, nous émettons les hypothèses que i) VAPA régule l'endocytose clathrine-dépendant des intégrines, qui régulerait en partie le désassemblage des ACM. Pour valider ces hypothèses, je propose de dépléter le pool de PI(4,5)P2 dans les cellules contrôles. Je m'attends à observer des défauts de recrutement de la clathrine et de la dynamique de désassemblage des ACM. Cette expérience me permettrait de valider que le recrutement de la clathrine et le désassemblage des ACM dépendent du PI(4,5)P2 dans mon système. Ensuite, je suivrai la dynamique du PI(4,5)P2 après traitement des cellules au nocodazole. Dans les cellules contrôles, je m'attends à observer après lavage du nocodazole des zones d'enrichissements du PI(4,5)P2 à proximité des ACM. Dans les VAPA KO, je m'attends à observer des zones d'enrichissement du PI(4,5)P2 qui ne seraient pas associées aux ACM. Cette expérience pourra être complétée par un marquage des protéines adaptatrices de la clathrine, comme AP-2, Dab2 et ARH pour vérifier qu'elles se localisent dans les zones enrichies en PI(4,5)P2 dans les contrôles après lavage du nocodazole. Dans les cellules VAPA KO, je m'attends à ne pas observer le recrutement des protéines adaptatrices de la clathrine à proximité des ACM. Cette série d'expériences permettrait de valider l'hypothèse selon laquelle VAPA régule l'endocytose clathrine dépendante à travers la régulation locale du PI(4,5)P2 à la membrane plasmique.

## 6. Rôle d'ORP3 dans le désassemblage des ACM

Nous avons vu qu'ORP3, partenaire de VAPA, est un facteur important pour réguler le désassemblage des ACM. De plus, le recrutement d'ORP3 à la membrane plasmique dépend également du niveau du PI(4,5)P2. En effet, la déplétion du PI(4,5)P2 génère un défaut de localisation d'ORP3 au SCM RE-MP d'après les travaux de (D'Souza et al., 2020). Par ailleurs, dans leur étude, la sur-expression d'une forme exogène d'ORP3 mutée sur le domaine ORD dans les cellules déplétées pour ORP3 sauve partiellement le phénotype de défaut de désassemblage des ACM. Ce résultat indique que la fonction de transfert de lipides d'ORP3 stimule le désassemblage des ACM mais n'est pas une fonction essentielle. Dans ce contexte, ORP3 remplit deux fonctions. La première est d'activer IQSec1 aux SCM RE-MP, qui va ensuite stimuler le désassemblage des ACM (cf introduction). La deuxième est d'établir des échanges de lipides qui vont participer au désassemblage des ACM selon un mécanisme pas encore caractérisé. Dans les cellules CaCo-2 contrôle, j'ai observé que la forme exogène d'ORP3 se localise aux SCM RE-MP et qu'elle est associée aux ACM. Ce résultat suggère, qu'ORP3 pourrait réguler la dynamique des ACM dans les cellules CaCo-2. De manière intéressante, dans les cellules VAPA KO, la forme exogène d'ORP3 est cytosolique (Figure 28). Ainsi VAPA régule comme attendu le recrutement d'ORP3 aux SCM RE-MP dans les CaCo-2. Pour valider le rôle d'ORP3 dans la régulation du désassemblage des ACM dans les CaCo-2, il serait intéressant de générer des lignées ORP3 KO. Dans ces lignées je m'attends à observer un défaut du désassemblage des ACM comme observé dans les travaux de D'souza et al, 2020. Il serait également intéressant de mesurer la quantité de PI(4,5)P2 à la membrane plasmique et de voir si la déplétion d'ORP3 est associée à un défaut de la quantité de PPI à la MP des cellules en cours de migration.



**Figure 28.** Le GFP ORP3 est localisé dans des structures ponctiformes associées au RE. Images acquises au spinning disk du GFP ORP3 et du RFP KDEL (marqueur du RE) dans les cellules contrôles et VAPA KO. Dans les cellules contrôles, le GFP ORP3 est associé au RE dans des structures ponctiformes, alors que dans les VAPA KO, le GFP ORP3 est diffus dans le cytoplasme.

## 7. ORP3 dans la régulation de l'activité lamellipodiale

Au cours de ma thèse, j'ai montré que VAPA régule la dynamique de protrusion/rétraction des lamellipodes. Dans les cellules contrôles, nous avons mesuré deux fois plus de rétractions que dans les VAPA KO. A l'inverse, dans les VAPA KO nous avons mesuré que les protrusions du lamellipode sont plus stables que dans les contrôles. Ces résultats montrent que VAPA contrôle les phases de rétractions au cours de la migration des cellules. De plus, après une heure d'étalement sur des lamelles cotées avec de la fibronectine, les cellules VAPA KO s'étaient plus que les cellules contrôles. Ce phénotype s'accompagne d'un défaut des structures d'actines où les fibres de stress apparaissent moins nombreuses et moins épaisses dans les VAPA KO que dans les contrôles. Ainsi ces résultats suggèrent que VAPA régule la contractilité de l'actine. Ce résultat est en accord avec une étude réalisée sur ORP3 dans les cellules HEK293 (Lehto et al., 2008). Les cellules déplétées pour ORP3 s'étaient plus que les contrôles et présentent également des défauts de structures d'actine. ORP3 interagit avec R-Ras, une RhoGTPase qui régule la migration, l'étalement des cellules et la dynamique des ACM. R-Ras est également importante pour contrôler la dynamique de protrusions et de rétractions du lamellipode au cours de la migration. Selon, Wozniak et al., 2005, la forme active de R-Ras se trouve à l'avant de la cellule. De plus, une forme dominante négative de R-Ras augmente la persistance des protrusions membranaires. Dans leur étude, les auteurs montrent que R-Ras contrôle l'activité des RhoGTPases Rho et Rac. L'expression de la forme constitutivement active de R-Ras, diminue l'activité de Rac et augmente celle de Rho. A l'inverse, l'expression de la forme dominante négative de R-Ras augmente l'activité de Rac et diminue celle de Rho. Ainsi, R-Ras active spatialement Rho à l'avant de la cellule au cours de la migration. Or, l'activité de Rho est finement régulée à l'avant de la cellule, pour notamment induire la rétraction du lamellipode via la voie ROCK et la contractilité de l'actomyosine. Dans les cellules CaCo-2, nous avons vu que la forme exogène d'ORP3 est recrutée aux SCM RE-MP dans les cellules contrôles mais reste cytosolique dans les VAPA KO. Les défauts de rétraction des lamellipodes observés dans les VAPA KO pourraient être expliqués par le fait que R-Ras ne soit plus recrutée et activée à l'avant des cellules. Ainsi, à travers les SCM RE-MP, VAPA pourrait interagir avec ORP3, ce qui favoriserait l'activation de R-Ras à l'avant de la cellule et stimulerait la rétraction du lamellipode de manière Rho dépendant. Pour vérifier cette hypothèse, l'utilisation d'anticorps anti R-Ras pourrait nous

indiquer si dans les contrôles et VAPA KO, R-Ras est recruté au SCM RE-MP à l'avant de la cellule. Dans les cellules VAPA KO, je m'attends à observer un marquage de R-Ras diffus dans le cytoplasme alors que dans les contrôles je m'attends à observer R-Ras aux SCM RE-MP, à l'avant. Cette expérience pourrait être accompagné d'une quantification relative par westernblot de la quantité de la forme RhoA active (liée au GTP) par rapport au RhoA non actif en mesurant par exemple le ratio des intensités de la bande de la forme active sur la forme non active dans les contrôles et VAPA KO. Je m'attends à quantifier plus de RhoA actif dans les contrôle que dans les VAPA KO.

Par ailleurs, dans les cellules VAPA KO, nous avons mesuré une diminution de la quantité du PI(4,5)P2 dans les zones de protrusions. Ce phénotype peut également expliquer le défaut de rétraction du lamellipode des cellules VAPA KO puisque l'activation de RhoA dépend du niveau de PI(4,5)P2 à la membrane plasmique. En effet, la déplétion du PI(4,5)P2 entraîne une diminution importante de l'activité de RhoA.

### **8. Interdépendance entre les ACM et les protrusions membranaires**

Il a été établi que les ACM et les protrusions sont régulées par des mécanismes de boucles de rétroaction interdépendants. Par exemple, selon Barnhart et al., 2017, le facteur VASP oscille entre l'avant de la cellule et les ACM. Le facteur VASP, qui promeut la polymérisation de l'actine, joue un rôle dans la dynamique du lamellipode. Selon leur modèle, VASP est tout d'abord recruté à la membrane plasmique et favorise dans un premier temps la polymérisation de l'actine branchée et la formation de protrusions. Selon un mécanisme de boucle de rétroaction positive, les protrusions induisent la formation d'adhésions naissantes. Dans un second temps, VASP s'associe avec ces adhésions et se retrouve éloigné de l'avant de la cellule, ce qui favorise la formation de vagues de protrusions. Or le PI(4,5)P2 recrute le facteur VASP à la membrane plasmique. Ainsi, une diminution du pool du PI(4,5)P2 dans les VAPA KO peut être associé à une perturbation de la dynamique du lamellipode médiés par VASP.

### **9. Dialogue entre les SCM RE-MP d'échanges de lipides et de Calcium**

Les défauts de rétraction du lamellipode et du désassemblage des ACM observés dans les VAPA KO peuvent s'expliquer également à travers une perturbation du Calcium. Tout d'abord, d'après les travaux de Tsai and Meyer, 2012, des cycles répétitifs de pulses de  $Ca^{2+}$  se déclenchent proche de l'avant de la cellule en cours de migration. Ces pulses régulent la

contraction des filaments d'actine à travers l'activation de la kinase de la chaîne légère de la myosine et de la myosine II. Les forces générées par la myosine II sur l'actine causent la rétraction cyclique du lamellipode. Ensuite, l'utilisation de senseurs de Calcium a révélé que l'augmentation locale du niveau du  $Ca^{2+}$  à proximité des ACM, déclenche leur désassemblage (Giannone et al., 2004). De plus, aux SCM RE-MP médiés par les protéines STIM1 et Orai1, les influx de calcium régulent la dynamique des ACM à travers l'activation du complexe ORP3/IQSec1 (D'Souza et al., 2020) de l'activation des calpaines (Chen et al., 2013a) et de la régulation de l'actomyosine (Chen et al., 2013b). Les travaux de Lopez-Guerrero et al., 2017 ont montré également que les protéines des SCM RE-MP STIM1 et Orai1 régulent la dynamique des protrusions membranaire à travers le contrôle des influx de  $Ca^{2+}$  dans la cellule.

Dans les cellules VAPA KO, on a montré que les SCM RE-MP sont instables et présentent une durée de vie plus courte que dans les contrôles. Comme la sonde GFP MAPPER marque l'ensemble des SCM RE-MP, on peut également penser que la dynamique des SCM RE-MP médiés par STIM1 et Orai1 est impactée dans les VAPA KO, ce qui pourrait limiter l'influx de  $Ca^{2+}$  dans les cellules. Ainsi, dans la VAPA KO, on pourrait s'attendre à observer moins de pulses de  $Ca^{2+}$  que dans les contrôles, ce qui permettrait d'expliquer que les lamellipodes se rétractent moins et que la dynamique des ACM soit perturbée. Cette hypothèse soulève l'idée selon laquelle les SCM RE-MP médiés par VAPA et transférant des lipides peuvent également servir de plateforme pour recruter des protéines d'échanges de  $Ca^{2+}$ . Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'observer la dynamique de STIM1 et Orai1 dans les VAPA KO et de la comparer par rapport au cellules contrôles. Je m'attends à observer un défaut de recrutement des protéines STIM1 et Orai1 aux SCM RE-MP dans les VAPA KO.

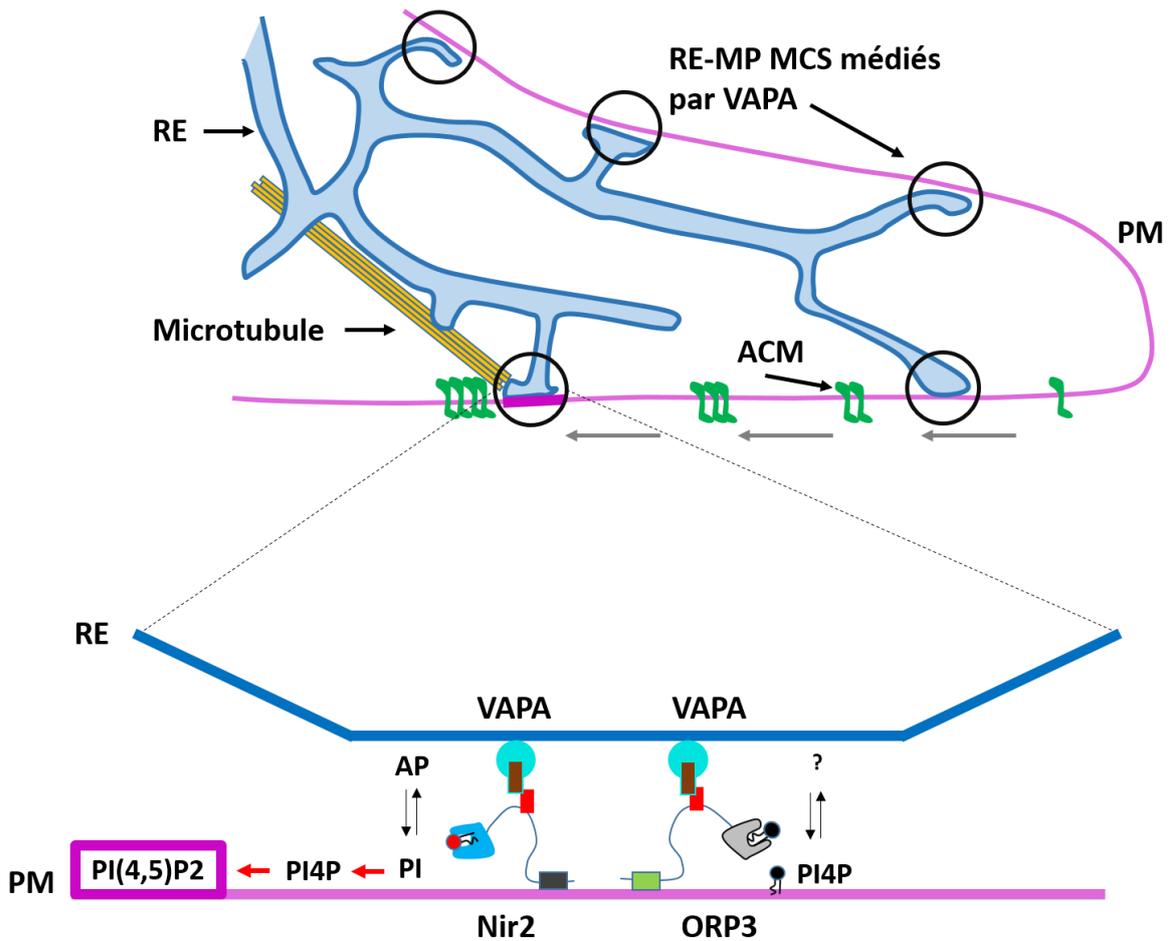
## **10. Implication de VAPA dans des processus physiopathologiques**

Nous avons vu que VAPA joue un rôle important dans la migration collective et isolée des cellules CaCo-2. L'une des questions qui se pose est de savoir si VAPA régule la migration d'autre types cellulaires dans des contextes plus physiologiques. Par exemple, VAPA pourrait avoir un rôle dans le développement embryonnaire, au cours duquel les cellules migrent collectivement pour organiser les différents feuilletts. VAPA pourrait également réguler la migration des cellules immunitaires. De manière intéressante, d'après les données du Gepia,

le gène VapA est surexprimé dans plusieurs cancers : cholangiocarcinome, glioblastome multiforme, gliome du cerveau et adénocarcinome pancréatique ([GEPIA \(cancer-pku.cn\)](http://GEPIA.cancer-pku.cn)), indiquant un rôle potentiel de VAPA dans la survenue de certains cancers.

### **11. Modèle du rôle de VAPA dans la migration**

L'ensemble de ces résultats nous a permis d'établir un modèle (figure 29) selon lequel VAPA régule la migration en modulant la quantité de PPI à la fois localement au niveau des ACM, mais aussi globalement le long de la MP. Dans les cellules contrôles, VAPA facilite l'ancrage des SCM RE MP à proximité des ACMs, ce qui favorise leur stabilisation spatiale et temporelle. A travers l'interaction de VAPA avec ses partenaires au niveau de ces SCM, des échanges de phospholipides ont lieu à proximité des ACM. Ceci permettrait de déclencher l'internalisation des intégrines et le désassemblage des ACM de manière microtubules dépendant. De plus, à travers le maintien du niveau global de PI(4,5)P2 à la membrane plasmique et le turnover des ACM, VAPA régulerait la dynamique de protrusions/rétractions du lamellipode, la polarité et la migration individuelle et collective des cellules. Les partenaires Nir2 et ORP3 de VAPA pourraient être impliqués dans la migration des cellules CaCo-2. VAPA recrute ORP3 aux SCM RE-MP. ORP3 pourrait participer au désassemblage des ACM à travers le recrutement et l'activation de R-RAS et du complexe Arf5/IQSec1. ORP3 pourrait également contrôler l'activité de protrusions/rétractions du lamellipode à travers la régulation de RhoA. De plus, via son domaine d'interaction avec RhoA, le partenaire de VAPA, Nir2 pourrait aussi participer à la dynamique du lamellipode et des ACM. De plus, Nir2 pourrait favoriser le maintien local et globale de PI(4,5)P2 à la MP, ce qui favoriserait la migration.



**Figure 29. Modèle du rôle des SCM RE-MP médiés par VAPA dans la migration.** Aux SCM RE-MP VAPA pourrait interagir avec Nir2 et ORP3 et réguler les échanges de PPI. Dans notre modèle, VAPA maintient un certain niveau de PI(4,5)P2 localement, aux ACM, et globalement à la MP. Ceci permettrait de réguler la dynamique des ACM et des protrusions membranaires et donc la migration cellulaire.



## Références bibliographiques

- Abercrombie, M., and G.A. Dunn. 1975. Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. *Exp Cell Res.* 92:57–62. doi:10.1016/0014-4827(75)90636-9.
- Acebrón, I., R.D. Righetto, C. Schoenherr, S. de Buhr, P. Redondo, J. Culley, C.F. Rodríguez, C. Daday, N. Biyani, O. Llorca, A. Byron, M. Chami, F. Gräter, J. Boskovic, M.C. Frame, H. Stahlberg, and D. Lietha. 2020. Structural basis of Focal Adhesion Kinase activation on lipid membranes. *EMBO J.* 39:e104743. doi:10.15252/embj.2020104743.
- Agranoff, B.W., R.M. Bradley, and R.O. Brady. 1958. The enzymatic synthesis of inositol phosphatide. *J Biol Chem.* 233:1077–1083.
- Ahmed, S.B.M., and S.A. Prigent. 2017. Insights into the Shc Family of Adaptor Proteins. *J Mol Signal.* 12:2. doi:10.5334/1750-2187-12-2.
- Alam, M.S. 2018. Proximity Ligation Assay (PLA). *Curr Protoc Immunol.* 123:e58. doi:10.1002/cpim.58.
- Alexandrova, A.Y., K. Arnold, S. Schaub, J.M. Vasiliev, J.-J. Meister, A.D. Bershadsky, and A.B. Verkhovsky. 2008. Comparative dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions: formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow. *PLoS One.* 3:e3234. doi:10.1371/journal.pone.0003234.
- Aman, A., and T. Piotrowski. 2010. Cell migration during morphogenesis. *Dev Biol.* 341:20–33. doi:10.1016/j.ydbio.2009.11.014.
- Amarilio, R., S. Ramachandran, H. Sabanay, and S. Lev. 2005. Differential regulation of endoplasmic reticulum structure through VAP-Nir protein interaction. *J Biol Chem.* 280:5934–5944. doi:10.1074/jbc.M409566200.
- Ananthakrishnan, R., and A. Ehrlicher. 2007. The forces behind cell movement. *Int J Biol Sci.* 3:303–317. doi:10.7150/ijbs.3.303.
- Anthis, N.J., and I.D. Campbell. 2011. The tail of integrin activation. *Trends Biochem Sci.* 36:191–198. doi:10.1016/j.tibs.2010.11.002.
- Aplin, A.E., A.K. Howe, and R.L. Juliano. 1999. Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr Opin Cell Biol.* 11:737–744. doi:10.1016/s0955-0674(99)00045-9.
- Arthur, W.T., and K. Burridge. 2001. RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. *Mol Biol Cell.* 12:2711–2720. doi:10.1091/mbc.12.9.2711.
- Arthur, W.T., L.A. Petch, and K. Burridge. 2000. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr Biol.* 10:719–722. doi:10.1016/s0960-9822(00)00537-6.
- Bach, T.L., C. Barsigian, D.G. Chalupowicz, D. Busler, C.H. Yaen, D.S. Grant, and J. Martinez. 1998. VE-Cadherin mediates endothelial cell capillary tube formation in fibrin and collagen gels. *Exp Cell Res.* 238:324–334. doi:10.1006/excr.1997.3844.

- Bairstow, S.F., K. Ling, X. Su, A.J. Firestone, C. Carbonara, and R.A. Anderson. 2006. Type I $\gamma$ 661 phosphatidylinositol phosphate kinase directly interacts with AP2 and regulates endocytosis. *J Biol Chem.* 281:20632–20642. doi:10.1074/jbc.M601465200.
- Bakolitsa, C., J.M. de Pereda, C.R. Bagshaw, D.R. Critchley, and R.C. Liddington. 1999. Crystal structure of the vinculin tail suggests a pathway for activation. *Cell.* 99:603–613. doi:10.1016/s0092-8674(00)81549-4.
- Balla, T. 2013. Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol Rev.* 93:1019–1137. doi:10.1152/physrev.00028.2012.
- Bankaitis, V.A., R. Garcia-Mata, and C.J. Mousley. 2012. Golgi membrane dynamics and lipid metabolism. *Curr Biol.* 22:R414-424. doi:10.1016/j.cub.2012.03.004.
- Baraldi, E., K. Djinovic Carugo, M. Hyvönen, P.L. Surdo, A.M. Riley, B.V. Potter, R. O'Brien, J.E. Ladbury, and M. Saraste. 1999. Structure of the PH domain from Bruton's tyrosine kinase in complex with inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate. *Structure.* 7:449–460. doi:10.1016/s0969-2126(99)80057-4.
- Barnhart, E.L., J. Allard, S.S. Lou, J.A. Theriot, and A. Mogilner. 2017. Adhesion-Dependent Wave Generation in Crawling Cells. *Curr Biol.* 27:27–38. doi:10.1016/j.cub.2016.11.011.
- Bartolini, F., J.B. Moseley, J. Schmoranzler, L. Cassimeris, B.L. Goode, and G.G. Gundersen. 2008. The formin mDia2 stabilizes microtubules independently of its actin nucleation activity. *J Cell Biol.* 181:523–536. doi:10.1083/jcb.200709029.
- Benard, V., B.P. Bohl, and G.M. Bokoch. 1999. Characterization of rac and cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *J Biol Chem.* 274:13198–13204. doi:10.1074/jbc.274.19.13198.
- Bernstein, B.W., and J.R. Bamburg. 2010. ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol.* 20:187–195. doi:10.1016/j.tcb.2010.01.001.
- Bershadsky, A., A. Chausovsky, E. Becker, A. Lyubimova, and B. Geiger. 1996. Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction. *Curr Biol.* 6:1279–1289. doi:10.1016/s0960-9822(02)70714-8.
- Bhatt, A., I. Kaverina, C. Otey, and A. Huttenlocher. 2002. Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain. *J Cell Sci.* 115:3415–3425. doi:10.1242/jcs.115.17.3415.
- Bledzka, K., J. Liu, Z. Xu, H.D. Perera, S.P. Yadav, K. Bialkowska, J. Qin, Y.-Q. Ma, and E.F. Plow. 2012. Spatial coordination of kindlin-2 with talin head domain in interaction with integrin  $\beta$  cytoplasmic tails. *J Biol Chem.* 287:24585–24594. doi:10.1074/jbc.M111.336743.
- Broussard, J.A., D.J. Webb, and I. Kaverina. 2008. Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells. *Curr Opin Cell Biol.* 20:85–90. doi:10.1016/j.ceb.2007.10.009.
- Brown, E., and N. Hogg. 1996. Where the outside meets the inside: integrins as activators and targets of signal transduction cascades. *Immunol Lett.* 54:189–193. doi:10.1016/s0165-2478(96)02671-5.

- Brown, M.C., and C.E. Turner. 2004. Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev.* 84:1315–1339. doi:10.1152/physrev.00002.2004.
- Burridge, K., and P. Mangeat. 1984. An interaction between vinculin and talin. *Nature.* 308:744–746. doi:10.1038/308744a0.
- van Buul, J.D., D. Geerts, and S. Huveneers. 2014. Rho GAPs and GEFs: controlling switches in endothelial cell adhesion. *Cell Adh Migr.* 8:108–124. doi:10.4161/cam.27599.
- Cabukusta, B., I. Berlin, D.M. van Elsland, I. Forkink, M. Spits, A.W.M. de Jong, J.J.L.L. Akkermans, R.H.M. Wijdeven, G.M.C. Janssen, P.A. van Veelen, and J. Neefjes. 2020. Human VAPome Analysis Reveals MOSPD1 and MOSPD3 as Membrane Contact Site Proteins Interacting with FFAT-Related FFNT Motifs. *Cell Rep.* 33:108475. doi:10.1016/j.celrep.2020.108475.
- Cai, X., D. Lietha, D.F. Ceccarelli, A.V. Karginov, Z. Rajfur, K. Jacobson, K.M. Hahn, M.J. Eck, and M.D. Schaller. 2008. Spatial and temporal regulation of focal adhesion kinase activity in living cells. *Mol Cell Biol.* 28:201–214. doi:10.1128/MCB.01324-07.
- Cai, Y., N. Biais, G. Giannone, M. Tanase, G. Jiang, J.M. Hofman, C.H. Wiggins, P. Silberzan, A. Buguin, B. Ladoux, and M.P. Sheetz. 2006. Nonmuscle myosin IIA-dependent force inhibits cell spreading and drives F-actin flow. *Biophys J.* 91:3907–3920. doi:10.1529/biophysj.106.084806.
- Cao, D., Z. Su, W. Wang, H. Wu, X. Liu, S. Akram, B. Qin, J. Zhou, X. Zhuang, G. Adams, C. Jin, X. Wang, L. Liu, D.L. Hill, D. Wang, X. Ding, and X. Yao. 2015. Signaling Scaffold Protein IQGAP1 Interacts with Microtubule Plus-end Tracking Protein SKAP and Links Dynamic Microtubule Plus-end to Steer Cell Migration. *J Biol Chem.* 290:23766–23780. doi:10.1074/jbc.M115.673517.
- Chan, K.T., D.A. Bennin, and A. Huttenlocher. 2010. Regulation of adhesion dynamics by calpain-mediated proteolysis of focal adhesion kinase (FAK). *J Biol Chem.* 285:11418–11426. doi:10.1074/jbc.M109.090746.
- Chang, C.-L., T.-S. Hsieh, T.T. Yang, K.G. Rothberg, D.B. Azizoglu, E. Volk, J.-C. Liao, and J. Liou. 2013. Feedback regulation of receptor-induced Ca<sup>2+</sup> signaling mediated by E-Syt1 and Nir2 at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Cell Rep.* 5:813–825. doi:10.1016/j.celrep.2013.09.038.
- Chang, C.-L., and J. Liou. 2015. Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Homeostasis Regulated by Nir2 and Nir3 Proteins at Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Junctions. *J Biol Chem.* 290:14289–14301. doi:10.1074/jbc.M114.621375.
- Chao, W.-T., F. Ashcroft, A.C. Daquinag, T. Vadakkan, Z. Wei, P. Zhang, M.E. Dickinson, and J. Kunz. 2010. Type I Phosphatidylinositol Phosphate Kinase Beta Regulates Focal Adhesion Disassembly by Promoting  $\beta$ 1 Integrin Endocytosis. *Mol Cell Biol.* 30:4463–4479. doi:10.1128/MCB.01207-09.
- Charras, G.T., J.C. Yarrow, M.A. Horton, L. Mahadevan, and T.J. Mitchison. 2005. Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells. *Nature.* 435:365–369. doi:10.1038/nature03550.
- Chen, B.-J., Y.-J. Tang, Y.-L. Tang, and X.-H. Liang. 2019. What makes cells move: Requirements and obstacles for leader cells in collective invasion. *Exp Cell Res.* 382:111481. doi:10.1016/j.yexcr.2019.06.026.

- Chen, Y.A., and R.H. Scheller. 2001. SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:98–106. doi:10.1038/35052017.
- Chen, Y.-F., Y.-T. Chen, W.-T. Chiu, and M.-R. Shen. 2013a. Remodeling of calcium signaling in tumor progression. *Journal of Biomedical Science.* 20:23. doi:10.1186/1423-0127-20-23.
- Chen, Y.-T., Y.-F. Chen, W.-T. Chiu, Y.-K. Wang, H.-C. Chang, and M.-R. Shen. 2013b. The ER Ca<sup>2+</sup> sensor STIM1 regulates actomyosin contractility of migratory cells. *J Cell Sci.* 126:1260–1267. doi:10.1242/jcs.121129.
- Chiu, S.-W., and M.C. Leake. 2011. Functioning nanomachines seen in real-time in living bacteria using single-molecule and super-resolution fluorescence imaging. *Int J Mol Sci.* 12:2518–2542. doi:10.3390/ijms12042518.
- Cho, S.J., M.J. Chae, B.K. Shin, H.K. Kim, and A. Kim. 2008. Akt- and MAPK-mediated activation and secretion of MMP-9 into stroma in breast cancer cells upon heregulin treatment. *Mol Med Rep.* 1:83–88.
- Choi, C.K., M. Vicente-Manzanares, J. Zareno, L.A. Whitmore, A. Mogilner, and A.R. Horwitz. 2008. Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat Cell Biol.* 10:1039–1050. doi:10.1038/ncb1763.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., and K. Burridge. 1996. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol.* 133:1403–1415. doi:10.1083/jcb.133.6.1403.
- Chung, C.Y., G. Potikyan, and R.A. Firtel. 2001. Control of cell polarity and chemotaxis by Akt/PKB and PI3 kinase through the regulation of PAKa. *Mol Cell.* 7:937–947. doi:10.1016/s1097-2765(01)00247-7.
- Chung, J., F. Torta, K. Masai, L. Lucast, H. Czapla, L.B. Tanner, P. Narayanaswamy, M.R. Wenk, F. Nakatsu, and P. De Camilli. 2015. INTRACELLULAR TRANSPORT. PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. *Science.* 349:428–432. doi:10.1126/science.aab1370.
- Cortesio, C.L., L.R. Boateng, T.M. Piazza, D.A. Bennin, and A. Huttenlocher. 2011. Calpain-mediated proteolysis of paxillin negatively regulates focal adhesion dynamics and cell migration. *J Biol Chem.* 286:9998–10006. doi:10.1074/jbc.M110.187294.
- Couchman, J.R., and D.A. Rees. 1979. The behaviour of fibroblasts migrating from chick heart explants: changes in adhesion, locomotion and growth, and in the distribution of actomyosin and fibronectin. *J Cell Sci.* 39:149–165. doi:10.1242/jcs.39.1.149.
- Critchley, D.R. 2009. Biochemical and structural properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin. *Annu Rev Biophys.* 38:235–254. doi:10.1146/annurev.biophys.050708.133744.
- Csordás, G., P. Várnai, T. Golenár, S. Roy, G. Purkins, T.G. Schneider, T. Balla, and G. Hajnóczky. 2010. Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Mol Cell.* 39:121–132. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.029.
- Cunningham, C.C. 1995. Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing. *J Cell Biol.* 129:1589–1599. doi:10.1083/jcb.129.6.1589.

- Danen, E.H.J., J. van Rheenen, W. Franken, S. Huveneers, P. Sonneveld, K. Jalink, and A. Sonnenberg. 2005. Integrins control motile strategy through a Rho-cofilin pathway. *J Cell Biol.* 169:515–526. doi:10.1083/jcb.200412081.
- De Franceschi, N., H. Hamidi, J. Alanko, P. Sahgal, and J. Ivaska. 2015. Integrin traffic - the update. *J Cell Sci.* 128:839–852. doi:10.1242/jcs.161653.
- Dehmelt, L., and S. Halpain. 2005. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 6:204. doi:10.1186/gb-2004-6-1-204.
- Di Mattia, T., A. Martinet, S. Ikhlef, A.G. McEwen, Y. Nominé, C. Wendling, P. Poussin-Courmontagne, L. Voilquin, P. Eberling, F. Ruffenach, J. Cavarelli, J. Slee, T.P. Levine, G. Drin, C. Tomasetto, and F. Alpy. 2020. FFAT motif phosphorylation controls formation and lipid transfer function of inter-organelle contacts. *EMBO J.* 39:e104369. doi:10.15252/embj.2019104369.
- Di Mattia, T., L.P. Wilhelm, S. Ikhlef, C. Wendling, D. Spehner, Y. Nominé, F. Giordano, C. Mathelin, G. Drin, C. Tomasetto, and F. Alpy. 2018. Identification of MOSPD2, a novel scaffold for endoplasmic reticulum membrane contact sites. *EMBO Rep.* 19:e45453. doi:10.15252/embr.201745453.
- Di Paolo, G., and P. De Camilli. 2006. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature.* 443:651–657. doi:10.1038/nature05185.
- Dingsdale, H., E. Okeke, M. Awais, L. Haynes, D.N. Criddle, R. Sutton, and A.V. Tepikin. 2013. Saltatory formation, sliding and dissolution of ER–PM junctions in migrating cancer cells. *Biochem J.* 451:25–32. doi:10.1042/BJ20121864.
- Dippold, H.C., M.M. Ng, S.E. Farber-Katz, S.-K. Lee, M.L. Kerr, M.C. Peterman, R. Sim, P.A. Wiharto, K.A. Galbraith, S. Madhavarapu, G.J. Fuchs, T. Meerloo, M.G. Farquhar, H. Zhou, and S.J. Field. 2009. GOLPH3 bridges phosphatidylinositol-4- phosphate and actomyosin to stretch and shape the Golgi to promote budding. *Cell.* 139:337–351. doi:10.1016/j.cell.2009.07.052.
- Dong, R., Y. Saheki, S. Swarup, L. Lucast, J.W. Harper, and P. De Camilli. 2016. Endosome-ER Contacts Control Actin Nucleation and Retromer Function through VAP-Dependent Regulation of PI4P. *Cell.* 166:408–423. doi:10.1016/j.cell.2016.06.037.
- D’Souza, R.S., J.Y. Lim, A. Turgut, K. Servage, J. Zhang, K. Orth, N.G. Sosale, M.J. Lazzara, J. Allegood, and J.E. Casanova. 2020. Calcium-stimulated disassembly of focal adhesions mediated by an ORP3/IQSec1 complex. *Elife.* 9:e54113. doi:10.7554/eLife.54113.
- Eisenberg-Bord, M., N. Shai, M. Schuldiner, and M. Bohnert. 2016. A Tether Is a Tether Is a Tether: Tethering at Membrane Contact Sites. *Dev Cell.* 39:395–409. doi:10.1016/j.devcel.2016.10.022.
- Erami, Z., S. Heitz, A.R. Bresnick, and J.M. Backer. 2019. PI3K $\beta$  links integrin activation and PI(3,4)P<sub>2</sub> production during invadopodial maturation. *Mol Biol Cell.* 30:2367–2376. doi:10.1091/mbc.E19-03-0182.
- Even-Ram, S., A.D. Doyle, M.A. Conti, K. Matsumoto, R.S. Adelstein, and K.M. Yamada. 2007. Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin-microtubule crosstalk. *Nat Cell Biol.* 9:299–309. doi:10.1038/ncb1540.

- Ezratty, E.J., C. Bertaux, E.E. Marcantonio, and G.G. Gundersen. 2009. Clathrin mediates integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells. *J Cell Biol.* 187:733–747. doi:10.1083/jcb.200904054.
- Ezratty, E.J., M.A. Partridge, and G.G. Gundersen. 2005. Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat Cell Biol.* 7:581–590. doi:10.1038/ncb1262.
- Fackler, O.T., and R. Grosse. 2008. Cell motility through plasma membrane blebbing. *J Cell Biol.* 181:879–884. doi:10.1083/jcb.200802081.
- Feng, Z., and C.-H. Yu. 2021. PI(3,4)P2-mediated membrane tubulation promotes integrin trafficking and invasive cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 118:e2017645118. doi:10.1073/pnas.2017645118.
- van der Flier, A., and A. Sonnenberg. 2001. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 305:285–298. doi:10.1007/s004410100417.
- Fokkelman, M., H.E. Balcioğlu, J.E. Klip, K. Yan, F.J. Verbeek, E.H.J. Danen, and B. van de Water. 2016. Cellular adhesome screen identifies critical modulators of focal adhesion dynamics, cellular traction forces and cell migration behaviour. *Sci Rep.* 6:31707. doi:10.1038/srep31707.
- Ford, M.G.J., I.G. Mills, B.J. Peter, Y. Vallis, G.J.K. Praefcke, P.R. Evans, and H.T. McMahon. 2002. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature.* 419:361–366. doi:10.1038/nature01020.
- Franco, S.J., and A. Huttenlocher. 2005. Regulating cell migration: calpains make the cut. *J Cell Sci.* 118:3829–3838. doi:10.1242/jcs.02562.
- Franco, S.J., M.A. Rodgers, B.J. Perrin, J. Han, D.A. Bennin, D.R. Critchley, and A. Huttenlocher. 2004. Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat Cell Biol.* 6:977–983. doi:10.1038/ncb1175.
- Friedl, P., and D. Gilmour. 2009. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:445–457. doi:10.1038/nrm2720.
- Friedl, P., and K. Wolf. 2010. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol.* 188:11–19. doi:10.1083/jcb.200909003.
- Friedman, J.R., and G.K. Voeltz. 2011. The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network. *Trends Cell Biol.* 21:709–717. doi:10.1016/j.tcb.2011.07.004.
- Fukumoto, M., T. Ijuin, and T. Takenawa. 2017. PI(3,4)P2 plays critical roles in the regulation of focal adhesion dynamics of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Sci.* 108:941–951. doi:10.1111/cas.13215.
- Funamoto, S., R. Meili, S. Lee, L. Parry, and R.A. Firtel. 2002. Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell.* 109:611–623. doi:10.1016/s0092-8674(02)00755-9.
- Furuita, K., J. Jee, H. Fukada, M. Mishima, and C. Kojima. 2010. Electrostatic interaction between oxysterol-binding protein and VAMP-associated protein A revealed by NMR and mutagenesis studies. *J Biol Chem.* 285:12961–12970. doi:10.1074/jbc.M109.082602.

- Gao, L., H. Aizaki, J.-W. He, and M.M.C. Lai. 2004. Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol.* 78:3480–3488. doi:10.1128/jvi.78.7.3480-3488.2004.
- Gardel, M.L., I.C. Schneider, Y. Aratyn-Schaus, and C.M. Waterman. 2010. Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 26:315–333. doi:10.1146/annurev.cellbio.011209.122036.
- Geiger, B. 1979. A 130K protein from chicken gizzard: its localization at the termini of microfilament bundles in cultured chicken cells. *Cell.* 18:193–205. doi:10.1016/0092-8674(79)90368-4.
- Giannone, G., B.J. Dubin-Thaler, O. Rossier, Y. Cai, O. Chaga, G. Jiang, W. Beaver, H.-G. Döbereiner, Y. Freund, G. Borisy, and M.P. Sheetz. 2007. Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell.* 128:561–575. doi:10.1016/j.cell.2006.12.039.
- Giannone, G., P. Rondé, M. Gaire, J. Beaudouin, J. Haiech, J. Ellenberg, and K. Takeda. 2004. Calcium rises locally trigger focal adhesion disassembly and enhance residency of focal adhesion kinase at focal adhesions. *J Biol Chem.* 279:28715–28723. doi:10.1074/jbc.M404054200.
- Gingras, A.R., N. Bate, B.T. Goult, L. Hazelwood, I. Canestrelli, J.G. Grossmann, H. Liu, N.S.M. Putz, G.C.K. Roberts, N. Volkman, D. Hanein, I.L. Barsukov, and D.R. Critchley. 2008. The structure of the C-terminal actin-binding domain of talin. *EMBO J.* 27:458–469. doi:10.1038/sj.emboj.7601965.
- Goksoy, E., Y.-Q. Ma, X. Wang, X. Kong, D. Perera, E.F. Plow, and J. Qin. 2008. Structural basis for the autoinhibition of talin in regulating integrin activation. *Mol Cell.* 31:124–133. doi:10.1016/j.molcel.2008.06.011.
- Goñi, G.M., C. Epifano, J. Boskovic, M. Camacho-Artacho, J. Zhou, A. Bronowska, M.T. Martín, M.J. Eck, L. Kremer, F. Gräter, F.L. Gervasio, M. Perez-Moreno, and D. Lietha. 2014. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate triggers activation of focal adhesion kinase by inducing clustering and conformational changes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111:E3177-3186. doi:10.1073/pnas.1317022111.
- Gorbatyuk, V.Y., N.J. Nosworthy, S.A. Robson, N.P.S. Bains, M.W. Maciejewski, C.G. Dos Remedios, and G.F. King. 2006. Mapping the phosphoinositide-binding site on chick cofilin explains how PIP2 regulates the cofilin-actin interaction. *Mol Cell.* 24:511–522. doi:10.1016/j.molcel.2006.10.007.
- Guilluy, C., V. Swaminathan, R. Garcia-Mata, E.T. O'Brien, R. Superfine, and K. Burridge. 2011. The Rho GEFs LARG and GEF-H1 regulate the mechanical response to force on integrins. *Nat Cell Biol.* 13:722–727. doi:10.1038/ncb2254.
- Gulyás, G., M. Sohn, Y.J. Kim, P. Várnai, and T. Balla. 2020. ORP3 phosphorylation regulates phosphatidylinositol 4-phosphate and Ca<sup>2+</sup> dynamics at plasma membrane-ER contact sites. *J Cell Sci.* 133:jcs237388. doi:10.1242/jcs.237388.
- Gupton, S.L., K. Eisenmann, A.S. Alberts, and C.M. Waterman-Storer. 2007. mDia2 regulates actin and focal adhesion dynamics and organization in the lamella for efficient epithelial cell migration. *J Cell Sci.* 120:3475–3487. doi:10.1242/jcs.006049.

- Halberg, N., C.A. Sengelaub, K. Navrazhina, H. Molina, K. Uryu, and S.F. Tavazoie. 2016. PTPN13 Recruits RAB1B to the Golgi Network to Drive Malignant Secretion. *Cancer Cell*. 29:339–353. doi:10.1016/j.ccell.2016.02.013.
- Hamamoto, I., Y. Nishimura, T. Okamoto, H. Aizaki, M. Liu, Y. Mori, T. Abe, T. Suzuki, M.M.C. Lai, T. Miyamura, K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2005. Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J Virol*. 79:13473–13482. doi:10.1128/JVI.79.21.13473-13482.2005.
- Hammond, G.R.V., and J.E. Burke. 2020. Novel roles of phosphoinositides in signaling, lipid transport, and disease. *Curr Opin Cell Biol*. 63:57–67. doi:10.1016/j.ceb.2019.12.007.
- Hammond, G.R.V., M.J. Fischer, K.E. Anderson, J. Holdich, A. Koteci, T. Balla, and R.F. Irvine. 2012. PI4P And PI(4,5)P2 Are Essential But Independent Lipid Determinants Of Membrane Identity. *Science*. 337:727–730. doi:10.1126/science.1222483.
- Hammond, G.R.V., M.P. Machner, and T. Balla. 2014. A novel probe for phosphatidylinositol 4-phosphate reveals multiple pools beyond the Golgi. *J Cell Biol*. 205:113–126. doi:10.1083/jcb.201312072.
- Han, D.C., and J.L. Guan. 1999. Association of focal adhesion kinase with Grb7 and its role in cell migration. *J Biol Chem*. 274:24425–24430. doi:10.1074/jbc.274.34.24425.
- Han, D.C., T.L. Shen, and J.L. Guan. 2000. Role of Grb7 targeting to focal contacts and its phosphorylation by focal adhesion kinase in regulation of cell migration. *J Biol Chem*. 275:28911–28917. doi:10.1074/jbc.M001997200.
- Han, J., K. Luby-Phelps, B. Das, X. Shu, Y. Xia, R.D. Mosteller, U.M. Krishna, J.R. Falck, M.A. White, and D. Broek. 1998. Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science*. 279:558–560. doi:10.1126/science.279.5350.558.
- Hansen, S.D., and R.D. Mullins. 2015. Lamellipodin promotes actin assembly by clustering Ena/VASP proteins and tethering them to actin filaments. *Elife*. 4. doi:10.7554/eLife.06585.
- Harlan, J.E., P.J. Hajduk, H.S. Yoon, and S.W. Fesik. 1994. Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature*. 371:168–170. doi:10.1038/371168a0.
- Hashimoto, Y., M. Shirane, F. Matsuzaki, S. Saita, T. Ohnishi, and K.I. Nakayama. 2014. Protrudin Regulates Endoplasmic Reticulum Morphology and Function Associated with the Pathogenesis of Hereditary Spastic Paraplegia\*. *Journal of Biological Chemistry*. 289:12946–12961. doi:10.1074/jbc.M113.528687.
- Hawkins, P.T., A. Eguinoa, R.G. Qiu, D. Stokoe, F.T. Cooke, R. Walters, S. Wennström, L. Claesson-Welsh, T. Evans, and M. Symons. 1995. PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr Biol*. 5:393–403. doi:10.1016/s0960-9822(95)00080-7.
- Heath, J.P., and G.A. Dunn. 1978. Cell to substratum contacts of chick fibroblasts and their relation to the microfilament system. A correlated interference-reflexion and high-voltage electron-microscope study. *J Cell Sci*. 29:197–212. doi:10.1242/jcs.29.1.197.

- Heit, B., S.M. Robbins, C.M. Downey, Z. Guan, P. Colarusso, B.J. Miller, F.R. Jirik, and P. Kubes. 2008. PTEN functions to “prioritize” chemotactic cues and prevent “distraction” in migrating neutrophils. *Nat Immunol.* 9:743–752. doi:10.1038/ni.1623.
- Hogan, P.G. 2015. The STIM1-ORAI1 microdomain. *Cell Calcium.* 58:357–367. doi:10.1016/j.ceca.2015.07.001.
- Horwitz, A., K. Duggan, C. Buck, M.C. Beckerle, and K. Burridge. 1986. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin—a transmembrane linkage. *Nature.* 320:531–533. doi:10.1038/320531a0.
- Huang, C., Z. Rajfur, N. Yousefi, Z. Chen, K. Jacobson, and M.H. Ginsberg. 2009. Talin phosphorylation by Cdk5 regulates Smurf1-mediated talin head ubiquitylation and cell migration. *Nat Cell Biol.* 11:624–630. doi:10.1038/ncb1868.
- Huang, Y.E., M. Iijima, C.A. Parent, S. Funamoto, R.A. Firtel, and P. Devreotes. 2003. Receptor-mediated regulation of PI3Ks confines PI(3,4,5)P3 to the leading edge of chemotaxing cells. *Mol Biol Cell.* 14:1913–1922. doi:10.1091/mbc.e02-10-0703.
- Hughes, W.E., F.T. Cooke, and P.J. Parker. 2000. Sac phosphatase domain proteins. *Biochem J.* 350 Pt 2:337–352.
- Humphries, J.D., P. Wang, C. Streuli, B. Geiger, M.J. Humphries, and C. Ballestrem. 2007. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol.* 179:1043–1057. doi:10.1083/jcb.200703036.
- Hüttelmaier, S., O. Mayboroda, B. Harbeck, T. Jarchau, B.M. Jockusch, and M. Rüdiger. 1998. The interaction of the cell-contact proteins VASP and vinculin is regulated by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Curr Biol.* 8:479–488. doi:10.1016/s0960-9822(98)70199-x.
- Huttenlocher, A., S.P. Palecek, Q. Lu, W. Zhang, R.L. Mellgren, D.A. Lauffenburger, M.H. Ginsberg, and A.F. Horwitz. 1997. Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *J Biol Chem.* 272:32719–32722. doi:10.1074/jbc.272.52.32719.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110:673–687. doi:10.1016/s0092-8674(02)00971-6.
- Iijima, M., and P. Devreotes. 2002. Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients. *Cell.* 109:599–610. doi:10.1016/s0092-8674(02)00745-6.
- Ilić, D., Y. Furuta, S. Kanazawa, N. Takeda, K. Sobue, N. Nakatsuji, S. Nomura, J. Fujimoto, M. Okada, and T. Yamamoto. 1995. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature.* 377:539–544. doi:10.1038/377539a0.
- Innocenti, M. 2018. New insights into the formation and the function of lamellipodia and ruffles in mesenchymal cell migration. *Cell Adh Migr.* 12:401–416. doi:10.1080/19336918.2018.1448352.
- Ishizaki, T., Y. Morishima, M. Okamoto, T. Furuyashiki, T. Kato, and S. Narumiya. 2001. Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nat Cell Biol.* 3:8–14. doi:10.1038/35050598.

- Izzard, C.S., and L.R. Lochner. 1976. Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J Cell Sci.* 21:129–159. doi:10.1242/jcs.21.1.129.
- Izzard, C.S., and L.R. Lochner. 1980. Formation of cell-to-substrate contacts during fibroblast motility: an interference-reflexion study. *J Cell Sci.* 42:81–116. doi:10.1242/jcs.42.1.81.
- James, C., and R.H. Kehlenbach. 2021. The Interactome of the VAP Family of Proteins: An Overview. *Cells.* 10:1780. doi:10.3390/cells10071780.
- James, S.R., C.P. Downes, R. Gigg, S.J. Grove, A.B. Holmes, and D.R. Alessi. 1996. Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *Biochem J.* 315 ( Pt 3):709–713. doi:10.1042/bj3150709.
- Jang, D.-J., and J.-A. Lee. 2016. The roles of phosphoinositides in mammalian autophagy. *Arch. Pharm. Res.* 39:1129–1136. doi:10.1007/s12272-016-0777-x.
- Janmey, P.A., and T.P. Stossel. 1987. Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Nature.* 325:362–364. doi:10.1038/325362a0.
- Jing, J., L. He, A. Sun, A. Quintana, Y. Ding, G. Ma, P. Tan, X. Liang, X. Zheng, L. Chen, X. Shi, S.L. Zhang, L. Zhong, Y. Huang, M.-Q. Dong, C.L. Walker, P.G. Hogan, Y. Wang, and Y. Zhou. 2015. Proteomic mapping of ER-PM junctions identifies STIMATE as a regulator of Ca<sup>2+</sup> influx. *Nat Cell Biol.* 17:1339–1347. doi:10.1038/ncb3234.
- Jing, J., G. Liu, Y. Huang, and Y. Zhou. 2020. A molecular toolbox for interrogation of membrane contact sites. *J Physiol.* 598:1725–1739. doi:10.1113/JP277761.
- Johnson, R.P., and S.W. Craig. 1994. An intramolecular association between the head and tail domains of vinculin modulates talin binding. *J Biol Chem.* 269:12611–12619.
- Johnson, R.P., and S.W. Craig. 1995. F-actin binding site masked by the intramolecular association of vinculin head and tail domains. *Nature.* 373:261–264. doi:10.1038/373261a0.
- Johnson, R.P., V. Niggli, P. Durrer, and S.W. Craig. 1998. A conserved motif in the tail domain of vinculin mediates association with and insertion into acidic phospholipid bilayers. *Biochemistry.* 37:10211–10222. doi:10.1021/bi9727242.
- Kagiwada, S., K. Hosaka, M. Murata, J. Nikawa, and A. Takatsuki. 1998. The *Saccharomyces cerevisiae* SCS2 gene product, a homolog of a synaptobrevin-associated protein, is an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum and is required for inositol metabolism. *J Bacteriol.* 180:1700–1708. doi:10.1128/JB.180.7.1700-1708.1998.
- Kaiser, S.E., J.H. Brickner, A.R. Reilein, T.D. Fenn, P. Walter, and A.T. Brunger. 2005. Structural basis of FFAT motif-mediated ER targeting. *Structure.* 13:1035–1045. doi:10.1016/j.str.2005.04.010.
- Kakimoto, Y., S. Tashiro, R. Kojima, Y. Morozumi, T. Endo, and Y. Tamura. 2018. Visualizing multiple inter-organelle contact sites using the organelle-targeted split-GFP system. *Sci Rep.* 8:6175. doi:10.1038/s41598-018-24466-0.
- van der Kant, R., I. Zondervan, L. Janssen, and J. Neefjes. 2013. Cholesterol-binding molecules MLN64 and ORP1L mark distinct late endosomes with transporters ABCA3 and NPC1. *J Lipid Res.* 54:2153–2165. doi:10.1194/jlr.M037325.

- Karaköse, E., H.B. Schiller, and R. Fässler. 2010. The kindlins at a glance. *J Cell Sci.* 123:2353–2356. doi:10.1242/jcs.064600.
- Kaverina, I., O. Krylyshkina, and J.V. Small. 1999. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J Cell Biol.* 146:1033–1044. doi:10.1083/jcb.146.5.1033.
- Kawano, M., K. Kumagai, M. Nishijima, and K. Hanada. 2006. Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT. *J Biol Chem.* 281:30279–30288. doi:10.1074/jbc.M605032200.
- Keinan, O., A. Kedan, N. Gavert, M. Selitrennik, S. Kim, T. Karn, S. Becker, and S. Lev. 2014. The lipid-transfer protein Nir2 enhances epithelial-mesenchymal transition and facilitates breast cancer metastasis. *J Cell Sci.* 127:4740–4749. doi:10.1242/jcs.155721.
- Kim, S., A. Kedan, M. Marom, N. Gavert, O. Keinan, M. Selitrennik, O. Laufman, and S. Lev. 2013. The phosphatidylinositol-transfer protein Nir2 binds phosphatidic acid and positively regulates phosphoinositide signalling. *EMBO Rep.* 14:891–899. doi:10.1038/embor.2013.113.
- Kim, Y.J., M.L. Guzman-Hernandez, and T. Balla. 2011. A highly dynamic ER-derived phosphatidylinositol-synthesizing organelle supplies phosphoinositides to cellular membranes. *Dev Cell.* 21:813–824. doi:10.1016/j.devcel.2011.09.005.
- Kiosses, W.B., S.J. Shattil, N. Pampori, and M.A. Schwartz. 2001. Rac recruits high-affinity integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 to lamellipodia in endothelial cell migration. *Nat Cell Biol.* 3:316–320. doi:10.1038/35060120.
- Kiyokawa, E., Y. Hashimoto, S. Kobayashi, H. Sugimura, T. Kurata, and M. Matsuda. 1998a. Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev.* 12:3331–3336. doi:10.1101/gad.12.21.3331.
- Kiyokawa, E., Y. Hashimoto, T. Kurata, H. Sugimura, and M. Matsuda. 1998b. Evidence that DOCK180 up-regulates signals from the CrkII-p130(Cas) complex. *J Biol Chem.* 273:24479–24484. doi:10.1074/jbc.273.38.24479.
- ten Klooster, J.P., Z.M. Jaffer, J. Chernoff, and P.L. Hordijk. 2006. Targeting and activation of Rac1 are mediated by the exchange factor beta-Pix. *J Cell Biol.* 172:759–769. doi:10.1083/jcb.200509096.
- Kodama, A., I. Karakesisoglou, E. Wong, A. Vaezi, and E. Fuchs. 2003. ACF7: an essential integrator of microtubule dynamics. *Cell.* 115:343–354. doi:10.1016/s0092-8674(03)00813-4.
- Koestler, S.A., S. Auinger, M. Vinzenz, K. Rottner, and J.V. Small. 2008. Differentially oriented populations of actin filaments generated in lamellipodia collaborate in pushing and pausing at the cell front. *Nat Cell Biol.* 10:306–313. doi:10.1038/ncb1692.
- Königs, V., R. Jennings, T. Vogl, M. Horsthemke, A.C. Bachg, Y. Xu, K. Grobe, C. Brakebusch, A. Schwab, M. Bähler, U.G. Knaus, and P.J. Hanley. 2014. Mouse macrophages completely lacking Rho subfamily GTPases (RhoA, RhoB, and RhoC) have severe lamellipodial retraction defects, but robust chemotactic navigation and altered motility. *J Biol Chem.* 289:30772–30784. doi:10.1074/jbc.M114.563270.

- Kors, S., J.L. Costello, and M. Schrader. 2022. VAP Proteins - From Organelle Tethers to Pathogenic Host Interactors and Their Role in Neuronal Disease. *Front Cell Dev Biol.* 10:895856. doi:10.3389/fcell.2022.895856.
- Krause, M., J.D. Leslie, M. Stewart, E.M. Lafuente, F. Valderrama, R. Jagannathan, G.A. Strasser, D.A. Rubinson, H. Liu, M. Way, M.B. Yaffe, V.A. Boussiotis, and F.B. Gertler. 2004. Lamellipodin, an Ena/VASP ligand, is implicated in the regulation of lamellipodial dynamics. *Dev Cell.* 7:571–583. doi:10.1016/j.devcel.2004.07.024.
- Krauss, M., V. Kukhtina, A. Pechstein, and V. Haucke. 2006. Stimulation of phosphatidylinositol kinase type I-mediated phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate synthesis by AP-2mu-cargo complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:11934–11939. doi:10.1073/pnas.0510306103.
- Kroemker, M., A.H. Rüdiger, B.M. Jockusch, and M. Rüdiger. 1994. Intramolecular interactions in vinculin control alpha-actinin binding to the vinculin head. *FEBS Lett.* 355:259–262. doi:10.1016/0014-5793(94)01216-4.
- Kumagai, K., and K. Hanada. 2019. Structure, functions and regulation of CERT, a lipid-transfer protein for the delivery of ceramide at the ER-Golgi membrane contact sites. *FEBS Lett.* 593:2366–2377. doi:10.1002/1873-3468.13511.
- Kupfer, A., D. Louvard, and S.J. Singer. 1982. Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in cultured fibroblasts at the edge of an experimental wound. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:2603–2607. doi:10.1073/pnas.79.8.2603.
- Lambert, J.M., Q.T. Lambert, G.W. Reuther, A. Malliri, D.P. Siderovski, J. Sondek, J.G. Collard, and C.J. Der. 2002. Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nat Cell Biol.* 4:621–625. doi:10.1038/ncb833.
- Lämmermann, T., and M. Sixt. 2009. Mechanical modes of “amoeboid” cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* 21:636–644. doi:10.1016/j.ceb.2009.05.003.
- Lamorte, L., S. Rodrigues, V. Sangwan, C.E. Turner, and M. Park. 2003. Crk associates with a multimolecular Paxillin/GIT2/beta-PIX complex and promotes Rac-dependent relocalization of Paxillin to focal contacts. *Mol Biol Cell.* 14:2818–2831. doi:10.1091/mbc.e02-08-0497.
- Lauffenburger, D.A., and A.F. Horwitz. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell.* 84:359–369. doi:10.1016/s0092-8674(00)81280-5.
- Lawson, C.D., and K. Burridge. 2014. The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration. *Small GTPases.* 5:e27958. doi:10.4161/sgtp.27958.
- Lawson, C.D., and A.J. Ridley. 2018. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J Cell Biol.* 217:447–457. doi:10.1083/jcb.201612069.
- Lawson, M.A., and F.R. Maxfield. 1995. Ca(2+)- and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature.* 377:75–79. doi:10.1038/377075a0.
- Lazarides, E., and K. Burridge. 1975. Alpha-actinin: immunofluorescent localization of a muscle structural protein in nonmuscle cells. *Cell.* 6:289–298. doi:10.1016/0092-8674(75)90180-4.
- Lazarides, E., and K. Weber. 1974. Actin antibody: the specific visualization of actin filaments in non-muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71:2268–2272. doi:10.1073/pnas.71.6.2268.

- Le Clainche, C., and M.-F. Carrier. 2008. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev.* 88:489–513. doi:10.1152/physrev.00021.2007.
- Legerstee, K., and A.B. Houtsmuller. 2021. A Layered View on Focal Adhesions. *Biology (Basel)*. 10:1189. doi:10.3390/biology10111189.
- Lehto, M., M.I. Mäyränpää, T. Pellinen, P. Ihalmo, S. Lehtonen, P.T. Kovanen, P.-H. Groop, J. Ivaska, and V.M. Olkkonen. 2008. The R-Ras interaction partner ORP3 regulates cell adhesion. *J Cell Sci.* 121:695–705. doi:10.1242/jcs.016964.
- Lemmon, M.A., K.M. Ferguson, R. O'Brien, P.B. Sigler, and J. Schlessinger. 1995. Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:10472–10476. doi:10.1073/pnas.92.23.10472.
- Lev, S. 2010. Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:739–750. doi:10.1038/nrm2971.
- Lev, S., D. Ben Halevy, D. Peretti, and N. Dahan. 2008. The VAP protein family: from cellular functions to motor neuron disease. *Trends Cell Biol.* 18:282–290. doi:10.1016/j.tcb.2008.03.006.
- Li, H., X. Wu, S. Hou, M. Malek, A. Kielkowska, E. Noh, K.J. Makondo, Q. Du, J.A. Wilkins, J.B. Johnston, S.B. Gibson, F. Lin, and A.J. Marshall. 2016. Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphate and Its Binding Protein Lamellipodin Regulate Chemotaxis of Malignant B Lymphocytes. *J Immunol.* 196:586–595. doi:10.4049/jimmunol.1500630.
- Li, J., and T.A. Springer. 2017. Integrin extension enables ultrasensitive regulation by cytoskeletal force. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114:4685–4690. doi:10.1073/pnas.1704171114.
- Li, J., Y. Su, W. Xia, Y. Qin, M.J. Humphries, D. Vestweber, C. Cabañas, C. Lu, and T.A. Springer. 2017. Conformational equilibria and intrinsic affinities define integrin activation. *EMBO J.* 36:629–645. doi:10.15252/embj.201695803.
- Li, L., R. Hartley, B. Reiss, Y. Sun, J. Pu, D. Wu, F. Lin, T. Hoang, S. Yamada, J. Jiang, and M. Zhao. 2012. E-cadherin plays an essential role in collective directional migration of large epithelial sheets. *Cell Mol Life Sci.* 69:2779–2789. doi:10.1007/s00018-012-0951-3.
- Li, X., M. Edwards, K.F. Swaney, N. Singh, S. Bhattacharya, J. Borleis, Y. Long, P.A. Iglesias, J. Chen, and P.N. Devreotes. 2018. Mutually inhibitory Ras-PI(3,4)P2 feedback loops mediate cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 115:E9125–E9134. doi:10.1073/pnas.1809039115.
- Lim, C.J., G.B. Spiegelman, and G. Weeks. 2002. Cytoskeletal regulation by Dictyostelium Ras subfamily proteins. *J Muscle Res Cell Motil.* 23:729–736. doi:10.1023/a:1024471527153.
- Lim, Y., S.-T. Lim, A. Tomar, M. Gardel, J.A. Bernard-Trifilo, X.L. Chen, S.A. Uryu, R. Canete-Soler, J. Zhai, H. Lin, W.W. Schlaepfer, P. Nalbant, G. Bokoch, D. Ilic, C. Waterman-Storer, and D.D. Schlaepfer. 2008. PyK2 and FAK connections to p190Rho guanine nucleotide exchange factor regulate RhoA activity, focal adhesion formation, and cell motility. *J Cell Biol.* 180:187–203. doi:10.1083/jcb.200708194.
- Ling, K., R.L. Doughman, A.J. Firestone, M.W. Bunce, and R.A. Anderson. 2002. Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase targets and regulates focal adhesions. *Nature.* 420:89–93. doi:10.1038/nature01082.

- Loewen, C.J.R., M.L. Gaspar, S.A. Jesch, C. Delon, N.T. Ktistakis, S.A. Henry, and T.P. Levine. 2004. Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid. *Science*. 304:1644–1647. doi:10.1126/science.1096083.
- Loewen, C.J.R., and T.P. Levine. 2005. A highly conserved binding site in vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) for the FFAT motif of lipid-binding proteins. *J Biol Chem*. 280:14097–14104. doi:10.1074/jbc.M500147200.
- Loewen, C.J.R., A. Roy, and T.P. Levine. 2003. A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *EMBO J*. 22:2025–2035. doi:10.1093/emboj/cdg201.
- Lopez-Guerrero, A.M., P. Tomas-Martin, C. Pascual-Caro, T. Macartney, A. Rojas-Fernandez, G. Ball, D.R. Alessi, E. Pozo-Guisado, and F.J. Martin-Romero. 2017. Regulation of membrane ruffling by polarized STIM1 and ORAI1 in cortactin-rich domains. *Sci Rep*. 7:383. doi:10.1038/s41598-017-00331-4.
- Loubéry, S., C. Wilhelm, I. Hurbain, S. Neveu, D. Louvard, and E. Coudrier. 2008. Different microtubule motors move early and late endocytic compartments. *Traffic*. 9:492–509. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00704.x.
- Lu, F., L. Zhu, T. Bromberger, J. Yang, Q. Yang, J. Liu, E.F. Plow, M. Moser, and J. Qin. 2022. Mechanism of integrin activation by talin and its cooperation with kindlin. *Nat Commun*. 13:2362. doi:10.1038/s41467-022-30117-w.
- Luo, B.-H., C.V. Carman, and T.A. Springer. 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol*. 25:619–647. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618.
- Ma, Y.-Q., J. Qin, C. Wu, and E.F. Plow. 2008. Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of beta3 integrins. *J Cell Biol*. 181:439–446. doi:10.1083/jcb.200710196.
- Machesky, L.M., and R.H. Insall. 1998. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol*. 8:1347–1356. doi:10.1016/s0960-9822(98)00015-3.
- Mak, M., F. Spill, R.D. Kamm, and M.H. Zaman. 2016. Single-Cell Migration in Complex Microenvironments: Mechanics and Signaling Dynamics. *J Biomech Eng*. 138:021004. doi:10.1115/1.4032188.
- Mandal, K. 2020. Review of PIP2 in Cellular Signaling, Functions and Diseases. *Int J Mol Sci*. 21:E8342. doi:10.3390/ijms21218342.
- Manford, A.G., C.J. Stefan, H.L. Yuan, J.A. Macgurn, and S.D. Emr. 2012. ER-to-plasma membrane tethering proteins regulate cell signaling and ER morphology. *Dev Cell*. 23:1129–1140. doi:10.1016/j.devcel.2012.11.004.
- Mao, D., G. Lin, B. Tepe, Z. Zuo, K.L. Tan, M. Senturk, S. Zhang, B.R. Arenkiel, M. Sardiello, and H.J. Bellen. 2019. VAMP associated proteins are required for autophagic and lysosomal degradation by promoting a PtdIns4P-mediated endosomal pathway. *Autophagy*. 15:1214–1233. doi:10.1080/15548627.2019.1580103.

- Marte, B.M., P. Rodriguez-Viciano, S. Wennström, P.H. Warne, and J. Downward. 1997. R-Ras can activate the phosphoinositide 3-kinase but not the MAP kinase arm of the Ras effector pathways. *Curr Biol.* 7:63–70. doi:10.1016/s0960-9822(06)00028-5.
- Martel, V., C. Racaud-Sultan, S. Dupe, C. Marie, F. Paulhe, A. Galmiche, M.R. Block, and C. Albiges-Rizo. 2001. Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *J Biol Chem.* 276:21217–21227. doi:10.1074/jbc.M102373200.
- Meili, R., C. Ellsworth, S. Lee, T.B. Reddy, H. Ma, and R.A. Firtel. 1999. Chemoattractant-mediated transient activation and membrane localization of Akt/PKB is required for efficient chemotaxis to cAMP in Dictyostelium. *EMBO J.* 18:2092–2105. doi:10.1093/emboj/18.8.2092.
- Meneses-Salas, E., A. García-Melero, K. Kanerva, P. Blanco-Muñoz, F. Morales-Paytuvi, J. Bonjoch, J. Casas, A. Egert, S.S. Beevi, J. Jose, V. Llorente-Cortés, K.-A. Rye, J. Heeren, A. Lu, A. Pol, F. Tebar, E. Ikonen, T. Grewal, C. Enrich, and C. Rentero. 2020. Annexin A6 modulates TBC1D15/Rab7/StARD3 axis to control endosomal cholesterol export in NPC1 cells. *Cell Mol Life Sci.* 77:2839–2857. doi:10.1007/s00018-019-03330-y.
- Mesmin, B., J. Bigay, J. Polidori, D. Jamecna, S. Lacas-Gervais, and B. Antonny. 2017. Sterol transfer, PI4P consumption, and control of membrane lipid order by endogenous OSBP. *EMBO J.* 36:3156–3174. doi:10.15252/emboj.201796687.
- Mierke, C.T. 2020. Mechanical Cues Affect Migration and Invasion of Cells From Three Different Directions. *Front Cell Dev Biol.* 8:583226. doi:10.3389/fcell.2020.583226.
- Miki, H., S. Suetsugu, and T. Takenawa. 1998. WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J.* 17:6932–6941. doi:10.1093/emboj/17.23.6932.
- Millarte, V., and H. Farhan. 2012. The Golgi in cell migration: regulation by signal transduction and its implications for cancer cell metastasis. *ScientificWorldJournal.* 2012:498278. doi:10.1100/2012/498278.
- Miller, N.L.G., C. Lawson, X.L. Chen, S.-T. Lim, and D.D. Schlaepfer. 2012. Rgnef (p190RhoGEF) knockout inhibits RhoA activity, focal adhesion establishment, and cell motility downstream of integrins. *PLoS One.* 7:e37830. doi:10.1371/journal.pone.0037830.
- Mingle, L.A., N.N. Okuhama, J. Shi, R.H. Singer, J. Condeelis, and G. Liu. 2005. Localization of all seven messenger RNAs for the actin-polymerization nucleator Arp2/3 complex in the protrusions of fibroblasts. *J Cell Sci.* 118:2425–2433. doi:10.1242/jcs.02371.
- Mitra, S.K., and D.D. Schlaepfer. 2006. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol.* 18:516–523. doi:10.1016/j.ceb.2006.08.011.
- Moser, M., K.R. Legate, R. Zent, and R. Fässler. 2009. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science.* 324:895–899. doi:10.1126/science.1163865.
- Murphy, S.E., and T.P. Levine. 2016. VAP, a Versatile Access Point for the Endoplasmic Reticulum: Review and analysis of FFAT-like motifs in the VAPome. *Biochim Biophys Acta.* 1861:952–961. doi:10.1016/j.bbali.2016.02.009.

- Nader, G.P.F., E.J. Ezratty, and G.G. Gundersen. 2016. FAK, talin and PIPKly regulate endocytosed integrin activation to polarize focal adhesion assembly. *Nat Cell Biol.* 18:491–503. doi:10.1038/ncb3333.
- Nakada-Tsukui, K., N. Watanabe, T. Maehama, and T. Nozaki. 2019. Phosphatidylinositol Kinases and Phosphatases in *Entamoeba histolytica*. *Front Cell Infect Microbiol.* 9:150. doi:10.3389/fcimb.2019.00150.
- Neefjes, J., and B. Cabukusta. 2021. What the VAP: The Expanded VAP Family of Proteins Interacting With FFAT and FFAT-Related Motifs for Interorganellar Contact. *Contact (Thousand Oaks)*. 4:25152564211012250. doi:10.1177/25152564211012246.
- Nguyen, L.K., B.N. Kholodenko, and A. von Kriegsheim. 2018. Rac1 and RhoA: Networks, loops and bistability. *Small GTPases.* 9:316–321. doi:10.1080/21541248.2016.1224399.
- Nieberler, M., U. Reuning, F. Reichart, J. Notni, H.-J. Wester, M. Schwaiger, M. Weinmüller, A. Räder, K. Steiger, and H. Kessler. 2017. Exploring the Role of RGD-Recognizing Integrins in Cancer. *Cancers (Basel)*. 9:E116. doi:10.3390/cancers9090116.
- Nikawa, J., and S. Yamashita. 1997. Phosphatidylinositol synthase from yeast. *Biochim Biophys Acta.* 1348:173–178. doi:10.1016/s0005-2760(97)00103-3.
- Nimnual, A.S., B.A. Yatsula, and D. Bar-Sagi. 1998. Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science.* 279:560–563. doi:10.1126/science.279.5350.560.
- Nishimura, A.L., A. Al-Chalabi, and M. Zatz. 2005. A common founder for amyotrophic lateral sclerosis type 8 (ALS8) in the Brazilian population. *Hum Genet.* 118:499–500. doi:10.1007/s00439-005-0031-y.
- Nishimura, A.L., M. Mitne-Neto, H.C.A. Silva, A. Richieri-Costa, S. Middleton, D. Cascio, F. Kok, J.R.M. Oliveira, T. Gillingwater, J. Webb, P. Skehel, and M. Zatz. 2004. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet.* 75:822–831. doi:10.1086/425287.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 81:53–62. doi:10.1016/0092-8674(95)90370-4.
- Nolte, M.A., E.N.M. Nolte-'t Hoen, and C. Margadant. 2021. Integrins Control Vesicular Trafficking; New Tricks for Old Dogs. *Trends Biochem Sci.* 46:124–137. doi:10.1016/j.tibs.2020.09.001.
- Nordenfelt, P., H.L. Elliott, and T.A. Springer. 2016. Coordinated integrin activation by actin-dependent force during T-cell migration. *Nat Commun.* 7:13119. doi:10.1038/ncomms13119.
- Orci, L., M. Ravazzola, M. Le Coadic, W.-W. Shen, N. Demaurex, and P. Cosson. 2009. From the Cover: STIM1-induced precortical and cortical subdomains of the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:19358–19362. doi:10.1073/pnas.0911280106.
- Ota, T., M. Maeda, M. Okamoto, and M. Tatsuka. 2015. Positive regulation of Rho GTPase activity by RhoGDIs as a result of their direct interaction with GAPs. *BMC Syst Biol.* 9:3. doi:10.1186/s12918-015-0143-5.

- Oude Weernink, P.A., P. Schulte, Y. Guo, J. Wetzel, M. Amano, K. Kaibuchi, S. Haverland, M. Voss, M. Schmidt, G.W. Mayr, and K.H. Jakobs. 2000. Stimulation of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase by Rho-kinase. *J Biol Chem.* 275:10168–10174. doi:10.1074/jbc.275.14.10168.
- Padrón, D., Y.J. Wang, M. Yamamoto, H. Yin, and M.G. Roth. 2003. Phosphatidylinositol phosphate 5-kinase I $\beta$  recruits AP-2 to the plasma membrane and regulates rates of constitutive endocytosis. *J Cell Biol.* 162:693–701. doi:10.1083/jcb.200302051.
- Palazzo, A.F., T.A. Cook, A.S. Alberts, and G.G. Gundersen. 2001. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol.* 3:723–729. doi:10.1038/35087035.
- Panková, K., D. Rösel, M. Novotný, and J. Brábek. 2010. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci.* 67:63–71. doi:10.1007/s00018-009-0132-1.
- Parsons, J.T., A.R. Horwitz, and M.A. Schwartz. 2010. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:633–643. doi:10.1038/nrm2957.
- Peretti, D., N. Dahan, E. Shimoni, K. Hirschberg, and S. Lev. 2008. Coordinated lipid transfer between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex requires the VAP proteins and is essential for Golgi-mediated transport. *Mol Biol Cell.* 19:3871–3884. doi:10.1091/mbc.e08-05-0498.
- Pizzagalli, D.U., A. Pulfer, M. Thelen, R. Krause, and S.F. Gonzalez. 2021. In Vivo Motility Patterns Displayed by Immune Cells Under Inflammatory Conditions. *Front Immunol.* 12:804159. doi:10.3389/fimmu.2021.804159.
- Pollard, T.D., and G.G. Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 112:453–465. doi:10.1016/s0092-8674(03)00120-x.
- Posor, Y., M. Eichhorn-Gruenig, D. Puchkov, J. Schöneberg, A. Ullrich, A. Lampe, R. Müller, S. Zerbakhsh, F. Gulluni, E. Hirsch, M. Krauss, C. Schultz, J. Schmoranzner, F. Noé, and V. Haucke. 2013. Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Nature.* 499:233–237. doi:10.1038/nature12360.
- Posor, Y., M. Eichhorn-Grünig, and V. Haucke. 2015. Phosphoinositides in endocytosis. *Biochim Biophys Acta.* 1851:794–804. doi:10.1016/j.bbaliip.2014.09.014.
- Premkumar, L., A.A. Bobkov, M. Patel, L. Jaroszewski, L.A. Bankston, B. Stec, K. Vuori, J.-F. Côté, and R.C. Liddington. 2010. Structural basis of membrane targeting by the Dock180 family of Rho family guanine exchange factors (Rho-GEFs). *J Biol Chem.* 285:13211–13222. doi:10.1074/jbc.M110.102517.
- Prinz, W.A., A. Toulmay, and T. Balla. 2020. The functional universe of membrane contact sites. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 21:7–24. doi:10.1038/s41580-019-0180-9.
- Raftopoulou, M., and A. Hall. 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol.* 265:23–32. doi:10.1016/j.ydbio.2003.06.003.
- Raghu, P., A. Joseph, H. Krishnan, P. Singh, and S. Saha. 2019. Phosphoinositides: Regulators of Nervous System Function in Health and Disease. *Front Mol Neurosci.* 12:208. doi:10.3389/fnmol.2019.00208.

- Rahajeng, J., R.S. Kuna, S.L. Makowski, T.T.T. Tran, M.D. Buschman, S. Li, N. Cheng, M.M. Ng, and S.J. Field. 2019. Efficient Golgi Forward Trafficking Requires GOLPH3-Driven, PI4P-Dependent Membrane Curvature. *Dev Cell*. 50:573-585.e5. doi:10.1016/j.devcel.2019.05.038.
- Raiborg, C., E.M. Wenzel, N.M. Pedersen, H. Olsvik, K.O. Schink, S.W. Schultz, M. Vietri, V. Nisi, C. Bucci, A. Brech, T. Johansen, and H. Stenmark. 2015. Repeated ER-endosome contacts promote endosome translocation and neurite outgrowth. *Nature*. 520:234–238. doi:10.1038/nature14359.
- Reckel, S., C. Gehin, D. Tardivon, S. Georgeon, T. Kükenshöner, F. Löhr, A. Koide, L. Buchner, A. Panjkovich, A. Reynaud, S. Pinho, B. Gerig, D. Svergun, F. Pojer, P. Güntert, V. Dötsch, S. Koide, A.-C. Gavin, and O. Hantschel. 2017. Structural and functional dissection of the DH and PH domains of oncogenic Bcr-Abl tyrosine kinase. *Nat Commun*. 8:2101. doi:10.1038/s41467-017-02313-6.
- Regen, C.M., and A.F. Horwitz. 1992. Dynamics of beta 1 integrin-mediated adhesive contacts in motile fibroblasts. *J Cell Biol*. 119:1347–1359. doi:10.1083/jcb.119.5.1347.
- Reiske, H.R., S.C. Kao, L.A. Cary, J.L. Guan, J.F. Lai, and H.C. Chen. 1999. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Biol Chem*. 274:12361–12366. doi:10.1074/jbc.274.18.12361.
- Rid, R., N. Schiefermeier, I. Grigoriev, J.V. Small, and I. Kaverina. 2005. The last but not the least: the origin and significance of trailing adhesions in fibroblastic cells. *Cell Motil Cytoskeleton*. 61:161–171. doi:10.1002/cm.20076.
- Rocha, N., C. Kuijl, R. van der Kant, L. Janssen, D. Houben, H. Janssen, W. Zwart, and J. Neefjes. 2009. Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *J Cell Biol*. 185:1209–1225. doi:10.1083/jcb.200811005.
- Rohatgi, R., H.Y. Ho, and M.W. Kirschner. 2000. Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol*. 150:1299–1310. doi:10.1083/jcb.150.6.1299.
- Routray, C., C. Liu, U. Yaqoob, D.D. Billadeau, K.D. Bloch, K. Kaibuchi, V.H. Shah, and N. Kang. 2011. Protein kinase G signaling disrupts Rac1-dependent focal adhesion assembly in liver specific pericytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 301:C66-74. doi:10.1152/ajpcell.00038.2011.
- Saarikangas, J., H. Zhao, and P. Lappalainen. 2010. Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiol Rev*. 90:259–289. doi:10.1152/physrev.00036.2009.
- Sakurai, T., M. Kukimoto-Niino, K. Kunita, N. Yamane, D. Sakata, R. Aihara, T. Yasuda, S. Yokoyama, M. Shirouzu, Y. Fukui, and T. Uruno. 2021. A conserved PI(4,5)P2-binding domain is critical for immune regulatory function of DOCK8. *Life Sci Alliance*. 4:e202000873. doi:10.26508/lsa.202000873.
- Sasaki, T., S. Takasuga, J. Sasaki, S. Kofuji, S. Eguchi, M. Yamazaki, and A. Suzuki. 2009. Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. *Prog Lipid Res*. 48:307–343. doi:10.1016/j.plipres.2009.06.001.
- Sastry, S.K., and K. Burridge. 2000. Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. *Exp Cell Res*. 261:25–36. doi:10.1006/excr.2000.5043.

- Schmidt, C.E., A.F. Horwitz, D.A. Lauffenburger, and M.P. Sheetz. 1993. Integrin-cytoskeletal interactions in migrating fibroblasts are dynamic, asymmetric, and regulated. *J Cell Biol.* 123:977–991. doi:10.1083/jcb.123.4.977.
- Scorrano, L., M.A. De Matteis, S. Emr, F. Giordano, G. Hajnóczky, B. Kornmann, L.L. Lackner, T.P. Levine, L. Pellegrini, K. Reinisch, R. Rizzuto, T. Simmen, H. Stenmark, C. Ungermann, and M. Schuldiner. 2019. Coming together to define membrane contact sites. *Nat Commun.* 10:1287. doi:10.1038/s41467-019-09253-3.
- Seftor, R.E., E.A. Seftor, K.R. Gehlsen, W.G. Stetler-Stevenson, P.D. Brown, E. Ruoslahti, and M.J. Hendrix. 1992. Role of the alpha v beta 3 integrin in human melanoma cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:1557–1561. doi:10.1073/pnas.89.5.1557.
- Senju, Y., M. Kalimeri, E.V. Koskela, P. Somerharju, H. Zhao, I. Vattulainen, and P. Lappalainen. 2017. Mechanistic principles underlying regulation of the actin cytoskeleton by phosphoinositides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114:E8977–E8986. doi:10.1073/pnas.1705032114.
- Senju, Y., and P. Lappalainen. 2019. Regulation of actin dynamics by PI(4,5)P2 in cell migration and endocytosis. *Curr Opin Cell Biol.* 56:7–13. doi:10.1016/j.ceb.2018.08.003.
- Servant, G., O.D. Weiner, P. Herzmark, T. Balla, J.W. Sedat, and H.R. Bourne. 2000. Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science.* 287:1037–1040. doi:10.1126/science.287.5455.1037.
- Shen, T.-L., D.C. Han, and J.-L. Guan. 2002. Association of Grb7 with phosphoinositides and its role in the regulation of cell migration. *J Biol Chem.* 277:29069–29077. doi:10.1074/jbc.M203085200.
- Shi, F., and J. Sottile. 2011. MT1-MMP regulates the turnover and endocytosis of extracellular matrix fibronectin. *J Cell Sci.* 124:4039–4050. doi:10.1242/jcs.087858.
- Shi, X., Y.-Q. Ma, Y. Tu, K. Chen, S. Wu, K. Fukuda, J. Qin, E.F. Plow, and C. Wu. 2007. The MIG-2/integrin interaction strengthens cell-matrix adhesion and modulates cell motility. *J Biol Chem.* 282:20455–20466. doi:10.1074/jbc.M611680200.
- Singh, N., A. Reyes-Ordoñez, M.A. Compagnone, J.F. Moreno, B.J. Leslie, T. Ha, and J. Chen. 2021. Redefining the specificity of phosphoinositide-binding by human PH domain-containing proteins. *Nat Commun.* 12:4339. doi:10.1038/s41467-021-24639-y.
- Skehel, P.A., R. Fabian-Fine, and E.R. Kandel. 2000. Mouse VAP33 is associated with the endoplasmic reticulum and microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:1101–1106.
- Skehel, P.A., K.C. Martin, E.R. Kandel, and D. Bartsch. 1995. A VAMP-binding protein from *Aplysia* required for neurotransmitter release. *Science.* 269:1580–1583. doi:10.1126/science.7667638.
- Smith, A., Y.R. Carrasco, P. Stanley, N. Kieffer, F.D. Batista, and N. Hogg. 2005. A talin-dependent LFA-1 focal zone is formed by rapidly migrating T lymphocytes. *J Cell Biol.* 170:141–151. doi:10.1083/jcb.200412032.
- Song, X., J. Yang, J. Hirbawi, S. Ye, H.D. Perera, E. Goksoy, P. Dwivedi, E.F. Plow, R. Zhang, and J. Qin. 2012. A novel membrane-dependent on/off switch mechanism of talin FERM domain at sites of cell adhesion. *Cell Res.* 22:1533–1545. doi:10.1038/cr.2012.97.

- Srinivasan, S., F. Wang, S. Glavas, A. Ott, F. Hofmann, K. Aktories, D. Kalman, and H.R. Bourne. 2003. Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol.* 160:375–385. doi:10.1083/jcb.200208179.
- Staruschenko, A., A. Nichols, J.L. Medina, P. Camacho, N.N. Zheleznova, and J.D. Stockand. 2004. Rho small GTPases activate the epithelial Na(+) channel. *J Biol Chem.* 279:49989–49994. doi:10.1074/jbc.M409812200.
- Stefan, C.J., A.G. Manford, D. Baird, J. Yamada-Hanff, Y. Mao, and S.D. Emr. 2011. Osh Proteins Regulate Phosphoinositide Metabolism at ER-Plasma Membrane Contact Sites. *Cell.* 144:389–401. doi:10.1016/j.cell.2010.12.034.
- Sullivan, S.J., G. Daukas, and S.H. Zigmond. 1984. Asymmetric distribution of the chemotactic peptide receptor on polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol.* 99:1461–1467. doi:10.1083/jcb.99.4.1461.
- Sun, Z., M. Costell, and R. Fässler. 2019. Integrin activation by talin, kindlin and mechanical forces. *Nat Cell Biol.* 21:25–31. doi:10.1038/s41556-018-0234-9.
- Swan, L.E. 2013. Initiation of clathrin-mediated endocytosis: all you need is two? *Bioessays.* 35:425–429. doi:10.1002/bies.201200129.
- Sydor, A.M., A.L. Su, F.S. Wang, A. Xu, and D.G. Jay. 1996. Talin and vinculin play distinct roles in filopodial motility in the neuronal growth cone. *J Cell Biol.* 134:1197–1207. doi:10.1083/jcb.134.5.1197.
- Szentpetery, Z., P. Várnai, and T. Balla. 2010. Acute manipulation of Golgi phosphoinositides to assess their importance in cellular trafficking and signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:8225–8230. doi:10.1073/pnas.1000157107.
- Takeda, K., A.T. Sasaki, H. Ha, H.-A. Seung, and R.A. Firtel. 2007. Role of phosphatidylinositol 3-kinases in chemotaxis in Dictyostelium. *J Biol Chem.* 282:11874–11884. doi:10.1074/jbc.M610984200.
- Takino, T., H. Saeki, H. Miyamori, T. Kudo, and H. Sato. 2007. Inhibition of membrane-type 1 matrix metalloproteinase at cell-matrix adhesions. *Cancer Res.* 67:11621–11629. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5251.
- Tamura, M., J. Gu, K. Matsumoto, S. Aota, R. Parsons, and K.M. Yamada. 1998. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science.* 280:1614–1617. doi:10.1126/science.280.5369.1614.
- Tanaka, S., J. Nikawa, H. Imai, S. Yamashita, and K. Hosaka. 1996. Molecular cloning of rat phosphatidylinositol synthase cDNA by functional complementation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* pis mutation. *FEBS Lett.* 393:89–92. doi:10.1016/0014-5793(96)00858-7.
- Tian, D., V. Litvak, M. Toledo-Rodriguez, S. Carmon, and S. Lev. 2002. Nir2, a Novel Regulator of Cell Morphogenesis. *Mol Cell Biol.* 22:2650–2662. doi:10.1128/MCB.22.8.2650-2662.2002.
- Tokuda, E., T. Itoh, J. Hasegawa, T. Ijuin, Y. Takeuchi, Y. Irino, M. Fukumoto, and T. Takenawa. 2014. Phosphatidylinositol 4-phosphate in the Golgi apparatus regulates cell-cell adhesion and

- invasive cell migration in human breast cancer. *Cancer Res.* 74:3054–3066. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2441.
- Tomasevic, N., Z. Jia, A. Russell, T. Fujii, J.J. Hartman, S. Clancy, M. Wang, C. Beraud, K.W. Wood, and R. Sakowicz. 2007. Differential regulation of WASP and N-WASP by Cdc42, Rac1, Nck, and PI(4,5)P2. *Biochemistry.* 46:3494–3502. doi:10.1021/bi062152y.
- Trepap, X., Z. Chen, and K. Jacobson. 2012. Cell migration. *Compr Physiol.* 2:2369–2392. doi:10.1002/cphy.c110012.
- Tsai, F.-C., and T. Meyer. 2012. Ca<sup>2+</sup> Pulses Control Local Cycles of Lamellipodia Retraction and Adhesion along the Front of Migrating Cells. *Current biology : CB.* 22:837–42. doi:10.1016/j.cub.2012.03.037.
- Turner, C.E., M.C. Brown, J.A. Perrotta, M.C. Riedy, S.N. Nikolopoulos, A.R. McDonald, S. Bagrodia, S. Thomas, and P.S. Leventhal. 1999. Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *J Cell Biol.* 145:851–863. doi:10.1083/jcb.145.4.851.
- Undyala, V.V., M. Dembo, K. Cembrola, B.J. Perrin, A. Huttenlocher, J.S. Elce, P.A. Greer, Y.-L. Wang, and K.A. Beningo. 2008. The calpain small subunit regulates cell-substrate mechanical interactions during fibroblast migration. *J Cell Sci.* 121:3581–3588. doi:10.1242/jcs.036152.
- Voelker, D.R. 1990. Lipid transport pathways in mammalian cells. *Experientia.* 46:569–579. doi:10.1007/BF01939695.
- Wang, J. 2012. Pull and push: talin activation for integrin signaling. *Cell Res.* 22:1512–1514. doi:10.1038/cr.2012.103.
- Wang, S., T. Watanabe, K. Matsuzawa, A. Katsumi, M. Kakeno, T. Matsui, F. Ye, K. Sato, K. Murase, I. Sugiyama, K. Kimura, A. Mizoguchi, M.H. Ginsberg, J.G. Collard, and K. Kaibuchi. 2012. Tiam1 interaction with the PAR complex promotes talin-mediated Rac1 activation during polarized cell migration. *J Cell Biol.* 199:331–345. doi:10.1083/jcb.201202041.
- Wang, Y., and M.A. McNiven. 2012. Invasive matrix degradation at focal adhesions occurs via protease recruitment by a FAK-p130Cas complex. *J Cell Biol.* 196:375–385. doi:10.1083/jcb.201105153.
- Webb, D.J., K. Donais, L.A. Whitmore, S.M. Thomas, C.E. Turner, J.T. Parsons, and A.F. Horwitz. 2004. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol.* 6:154–161. doi:10.1038/ncb1094.
- Webb, D.J., J.T. Parsons, and A.F. Horwitz. 2002. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat Cell Biol.* 4:E97-100. doi:10.1038/ncb0402-e97.
- Weber-Boyvat, M., H. Kentala, J. Lilja, T. Vihervaara, R. Hanninen, Y. Zhou, J. Peränen, T.A. Nyman, J. Ivaska, and V.M. Olkkonen. 2015. OSBP-related protein 3 (ORP3) coupling with VAMP-associated protein A regulates R-Ras activity. *Exp Cell Res.* 331:278–291. doi:10.1016/j.yexcr.2014.10.019.
- Wen, P.J., S.L. Osborne, and F.A. Meunier. 2012. Phosphoinositides in neuroexocytosis and neuronal diseases. *Curr Top Microbiol Immunol.* 362:87–98. doi:10.1007/978-94-007-5025-8\_4.

- Whitehead, I.P., Q.T. Lambert, J.A. Glaven, K. Abe, K.L. Rossman, G.M. Mahon, J.M. Trzaskos, R. Kay, S.L. Campbell, and C.J. Der. 1999. Dependence of Dbl and Dbs transformation on MEK and NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol.* 19:7759–7770. doi:10.1128/MCB.19.11.7759.
- Wiesner, C., J. Faix, M. Himmel, F. Bentzien, and S. Linder. 2010. KIF5B and KIF3A/KIF3B kinesins drive MT1-MMP surface exposure, CD44 shedding, and extracellular matrix degradation in primary macrophages. *Blood.* 116:1559–1569. doi:10.1182/blood-2009-12-257089.
- Wong, L.H., A.T. Gatta, and T.P. Levine. 2019. Lipid transfer proteins: the lipid commute via shuttles, bridges and tubes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 20:85–101. doi:10.1038/s41580-018-0071-5.
- Worbs, T., S.I. Hammerschmidt, and R. Förster. 2017. Dendritic cell migration in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 17:30–48. doi:10.1038/nri.2016.116.
- Wozniak, M.A., L. Kwong, D. Chodniewicz, R.L. Klemke, and P.J. Keely. 2005. R-Ras Controls Membrane Protrusion and Cell Migration through the Spatial Regulation of Rac and Rho. *MBoC.* 16:84–96. doi:10.1091/mbc.e04-04-0277.
- Wu, H., P. Carvalho, and G.K. Voeltz. 2018. Here, there, and everywhere: The importance of ER membrane contact sites. *Science.* 361:eaa5835. doi:10.1126/science.aan5835.
- Wu, M.M., J. Buchanan, R.M. Luik, and R.S. Lewis. 2006. Ca<sup>2+</sup> store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol.* 174:803–813. doi:10.1083/jcb.200604014.
- Wu, X., A. Kodama, and E. Fuchs. 2008. ACF7 regulates cytoskeletal-focal adhesion dynamics and migration and has ATPase activity. *Cell.* 135:137–148. doi:10.1016/j.cell.2008.07.045.
- Wu, X., S. Suetsugu, L.A. Cooper, T. Takenawa, and J.-L. Guan. 2004. Focal adhesion kinase regulation of N-WASP subcellular localization and function. *J Biol Chem.* 279:9565–9576. doi:10.1074/jbc.M310739200.
- Wu, Z., X. Li, M. Sunkara, H. Spearman, A.J. Morris, and C. Huang. 2011. PIPKly regulates focal adhesion dynamics and colon cancer cell invasion. *PLoS One.* 6:e24775. doi:10.1371/journal.pone.0024775.
- Wyles, J.P., and N.D. Ridgway. 2004. VAMP-associated protein-A regulates partitioning of oxysterol-binding protein-related protein-9 between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Exp Cell Res.* 297:533–547. doi:10.1016/j.yexcr.2004.03.052.
- Xing, M., M.C. Peterman, R.L. Davis, K. Oegema, A.K. Shiau, and S.J. Field. 2016. GOLPH3 drives cell migration by promoting Golgi reorientation and directional trafficking to the leading edge. *Mol Biol Cell.* 27:3828–3840. doi:10.1091/mbc.E16-01-0005.
- Yadav, S., S. Puri, and A.D. Linstedt. 2009. A primary role for Golgi positioning in directed secretion, cell polarity, and wound healing. *Mol Biol Cell.* 20:1728–1736. doi:10.1091/mbc.e08-10-1077.
- Yamaguchi, N., T. Mizutani, K. Kawabata, and H. Haga. 2015. Leader cells regulate collective cell migration via Rac activation in the downstream signaling of integrin  $\beta$ 1 and PI3K. *Sci Rep.* 5:7656. doi:10.1038/srep07656.

- Yang, S.-A., C.L. Carpenter, and C.S. Abrams. 2004. Rho and Rho-kinase mediate thrombin-induced phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase trafficking in platelets. *J Biol Chem.* 279:42331–42336. doi:10.1074/jbc.M404335200.
- Yarar, D., C.M. Waterman-Storer, and S.L. Schmid. 2007. SNX9 couples actin assembly to phosphoinositide signals and is required for membrane remodeling during endocytosis. *Dev Cell.* 13:43–56. doi:10.1016/j.devcel.2007.04.014.
- Yoshii, S., M. Tanaka, Y. Otsuki, D.Y. Wang, R.J. Guo, Y. Zhu, R. Takeda, H. Hanai, E. Kaneko, and H. Sugimura. 1999. alphaPIX nucleotide exchange factor is activated by interaction with phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene.* 18:5680–5690. doi:10.1038/sj.onc.1202936.
- Yoshinaga, S., T. Ohkubo, S. Sasaki, M. Nuriya, Y. Ogawa, M. Yasui, H. Tabata, and K. Nakajima. 2012. A phosphatidylinositol lipids system, lamellipodin, and Ena/VASP regulate dynamic morphology of multipolar migrating cells in the developing cerebral cortex. *J Neurosci.* 32:11643–11656. doi:10.1523/JNEUROSCI.0738-12.2012.
- Yue, J., M. Xie, X. Gou, P. Lee, M.D. Schneider, and X. Wu. 2014. Microtubules regulate focal adhesion dynamics through MAP4K4. *Dev Cell.* 31:572–585. doi:10.1016/j.devcel.2014.10.025.
- Zhai, J., H. Lin, Z. Nie, J. Wu, R. Cañete-Soler, W.W. Schlaepfer, and D.D. Schlaepfer. 2003. Direct interaction of focal adhesion kinase with p190RhoGEF. *J Biol Chem.* 278:24865–24873. doi:10.1074/jbc.M302381200.
- Zhao, H., M. Hakala, and P. Lappalainen. 2010. ADF/cofilin binds phosphoinositides in a multivalent manner to act as a PIP(2)-density sensor. *Biophys J.* 98:2327–2336. doi:10.1016/j.bpj.2010.01.046.
- Zheng, J., S.M. Cahill, M.A. Lemmon, D. Fushman, J. Schlessinger, and D. Cowburn. 1996. Identification of the binding site for acidic phospholipids on the pH domain of dynamin: implications for stimulation of GTPase activity. *J Mol Biol.* 255:14–21. doi:10.1006/jmbi.1996.0002.
- Zhou, X., W. Zhan, W. Bian, L. Hua, Q. Shi, S. Xie, D. Yang, Y. Li, X. Zhang, G. Liu, and R. Yu. 2013. GOLPH3 regulates the migration and invasion of glioma cells through RhoA. *Biochem Biophys Res Commun.* 433:338–344. doi:10.1016/j.bbrc.2013.03.003.
- Ziegler, W.H., U. Tigges, A. Zieseniss, and B.M. Jockusch. 2002. A lipid-regulated docking site on vinculin for protein kinase C. *J Biol Chem.* 277:7396–7404. doi:10.1074/jbc.M110008200.
- Zoncu, R., R.M. Perera, R. Sebastian, F. Nakatsu, H. Chen, T. Balla, G. Ayala, D. Toomre, and P.V. De Camilli. 2007. Loss of endocytic clathrin-coated pits upon acute depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:3793–3798. doi:10.1073/pnas.0611733104.

## **-Remerciements**

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de thèse Mélina Heuzé et Jean Marc Verbavatz de m'avoir accueilli au sein de l'équipe. Je les remercie énormément de m'avoir permis de développer beaucoup de compétences intellectuelles, techniques et sociales. Je remercie infiniment Mélina Heuzé d'avoir encadré mes travaux, de m'avoir fait confiance et de m'avoir enseigné la démarche scientifique. Grâce à vous, j'ai eu beaucoup de chances d'évoluer dans un environnement sain, qui m'a permis notamment de m'ouvrir aux autres dans l'Institut. Mélina, tu m'as encouragé à m'investir dans l'organisation du YSC, de participer à la formation du « green committee », et à participer au conseil de l'Institut. Merci également de m'avoir soutenu au cours de ma thèse, surtout pendant le confinement lié à la Covid-19. Je vous remercie infiniment de m'avoir confié ce projet de thèse qui m'a profondément passionné, et qui m'a confirmé mon envie de continuer dans le domaine de la Recherche après ma thèse.

Je remercie les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté mon invitation. Je remercie Florence Niedergang d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je remercie Fabien Alpy et Carine Rosse d'avoir accepté d'être mes rapporteurs. Je remercie Alenka Copic d'être mon examinatrice. Je remercie également Mélina Heuzé et Jean Marc Verbavatz de participer à mon jury de thèse.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse, Fabien Alpy et Delphine Delacour, d'avoir suivi mes travaux de thèse. Je vous remercie pour les discussions très enrichissantes concernant mes résultats de thèse.

J'aimerais également remercier les membres de mon laboratoire avec qui j'ai passé de très bons moments. Je remercie Emilie P. et Laurence W. pour vos aides et conseils que vous m'avez apportés au cours de mon M2. Je remercie énormément Juan Martin D. pour les nombreuses heures passées à rigoler au labo et en dehors. Merci d'avoir été là aussi pendant la période du Covid. Merci à Lucien D. et Anaïs V. pour ces moments qu'on a passé à discuter et à rigoler. Je remercie également les ingénieurs de la plateforme ImagoSeine, notamment Paul L. pour l'ensemble des formations, des pauses cafés, et de toutes les discussions qu'on a eues et qu'on va continuer d'avoir en dehors du labo. Je remercie Catherine D. et Rémi L. de m'avoir aidé en microscopie électronique.

Je remercie ma famille, en particulier ma mère et Bernard. Vous m'avez beaucoup aidé à décompresser, vous m'avez beaucoup soutenu et écouté. Je remercie infiniment mes frères Tom et Shawn et ma sœur Marion pour tous les beaux moments qu'on a vécu ensemble. Je remercie mon oncle, Manu pour son écoute et nos nombreuses balades dans les Vosges. Je remercie énormément Juliana Geay, qui m'a énormément aidé et conseillé au cours de ma thèse. Je te remercie énormément pour tout ton soutien, nos weekends et voyages magnifiques, et surtout je te remercie d'avoir lu et corrigé ma thèse ! Un grand merci à Jean et Claude Siegfried ainsi qu'à mon grand-père Olivier Siegfried pour leur aide importante au cours de mes études. Je remercie mes amis, Guillaume L. et Thibault L. que je considère comme mes frères choisis. Je remercie énormément Mathieu S., Julia Q., Yoann K. et Diane C. pour nos nombreuses discussions et fous rires qu'on a eu pendant nos études.

## Table des matières

<b>Table des illustrations .....</b>	<b>6</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>7</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>8</b>
I. La dynamique des Adhésions Cellule-Matrice au cours de la migration.....	8
1. Définition de la migration cellulaire .....	8
1.1 Rôles physiologiques et pathologiques de la migration cellulaire .....	8
1.2 Les différents types de migration.....	9
1.2.1 La migration isolée amiboïde et mésenchymateuse.....	9
1.2.2 Migration collective.....	13
1.3. Le rôle central des RhoGTPases .....	14
2. Les adhésions Cellules Matrices (ACM) dans la migration .....	18
2.1 Dynamique des ACM au cours de la migration .....	18
2.1.1 Découverte des adhésions cellules matrice (ACM) .....	18
2.1.2 Observation des ACM par TIRF.....	19
2.2 Formation et maturation des adhésions focales.....	21
2.2.1 L'activation des intégrines.....	21
2.2.2 Régulation de la formation et de la maturation des ACM .....	28
3. Désassemblage des ACM et turnover .....	31
3.1 La signalisation FAK/Src dans le désassemblage des ACM.....	31
3.2 Clivage protéolytique par les calpaïnes.....	32
3.3. Le Rôle des microtubules dans le désassemblage des ACM .....	33
4 Fonction des ACM dans la migration.....	37
4.1 La signalisation aux ACM au cours de la migration .....	37
4.2 Les ACM et la dynamique des protrusions .....	38
II. Les phosphoinositides et la migration cellulaire .....	40
1. Les phosphoinositides dans la migration cellulaire.....	40
1.1 Métabolisme des phosphoinositides : du RE aux kinases et phosphatases.....	40
1.2 L'importance des kinases et phosphatases dans la migration : l'exemple de la PI3K et de PTEN .....	45
2. Le rôle du PI(4,5)P2 et PI(3,4,5)P3 dans la migration cellulaire .....	46
2.1 Rôle du PI(4,5)P2 et PI(3,4,5)P3 dans la dynamique de l'actine .....	46
2.2 Rôle du PI(4,5)P2 et PI(3,4,5) dans la dynamique des adhésions focales .....	50
2.3 Rôle du PI(4,5)P2 et PI(3,4,5) dans le trafic vésiculaire.....	51
3. L'implication d'autres phosphoinositides dans la migration : Le PI(4)P et le PI(3,4)P2 .....	54

3.1 Rôle du PI(4)P au Golgi et le trafic vésiculaire.....	54
3.2 Rôle du PI(3,4)P2 dans la polarité cellulaire.....	55
III. Les Sites de Contacts Membranaires et la migration cellulaire .....	57
1. Définition et exemples de SCM .....	57
1.1 Définition.....	57
1.2 Des échanges asymétriques de lipides aux SCM : l'exemple du cycle du PI .....	58
2. Les protéines VAPs ancrées au RE et leur partenaire ORP3 et Nir2 dans la migration cellulaire.....	62
2.1 Structure des protéines VAPs.....	62
2.2 Structure des protéines PTL (protéines de transfert de lipides) s'associant aux protéines VAPs : Les exemples de Nir2 et ORP3 .....	65
<b>Objectif de ma thèse .....</b>	<b>77</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>79</b>
<b>Discussion et perspectives .....</b>	<b>120</b>
1. Rappel des résultats principaux et modèle .....	120
2. Ancrage des SCM RE-MP aux ACM.....	122
3. Lien direct entre les SCM RE-MP et le désassemblage des ACM .....	123
4. Rôle de Nir2 dans la régulation du PI(4,5)P2 à la membrane plasmique.....	127
5. Le PI(4,5)P2 dans le désassemblage des ACM induit par les microtubules .....	130
6. Rôle d'ORP3 dans le désassemblage des ACM.....	132
7. ORP3 dans la régulation de l'activité lamellipodiale.....	134
8. Interdépendance entre les ACM et les protrusions membranaires.....	135
9. Dialogue entre les SCM RE-MP d'échanges de lipides et de Calcium .....	135
10. Implication de VAPA dans des processus physiopathologiques .....	136
11. Modèle du rôle de VAPA dans la migration .....	137
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>140</b>
<b>-Remerciements .....</b>	<b>163</b>