



HAL
open science

Voie de l'AMPc et cytosquelette au cours de polarisation et la migration des lymphocytes T en réponse aux chimiokines

Morgane Simao

► **To cite this version:**

Morgane Simao. Voie de l'AMPc et cytosquelette au cours de polarisation et la migration des lymphocytes T en réponse aux chimiokines. Immunologie. Université Paris Cité, 2022. Français. NNT : 2022UNIP5246 . tel-04691813

HAL Id: tel-04691813

<https://theses.hal.science/tel-04691813v1>

Submitted on 9 Sep 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

École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC, ED 562)

Institut Cochin

Voie de l'AMPC et cytosquelette au cours de polarisation et la migration des lymphocytes T en réponse aux chimiokines

Par Morgane Simao

Thèse de doctorat en Immunologie

Dirigée par Dr. Clotilde Randriamampita

Présentée et soutenue publiquement le 28/10/2022

Devant un jury composé de :

Dr. Andres Alcover, PU, Institut Pasteur, Sorbonne Université, Rapporteur

Dr. Loïc Dupré, CR-HDR, Université Toulouse III Paul Sabatier, Rapporteur

Dr. Sandrine Etienne-Manneville, DR, Institut Pasteur, Sorbonne Université,
Examinatrice

Dr. Claire Hivroz, DR, Université PSL, Examinatrice et Présidente du jury

Dr. Manuel Théry, DR, Université Paris Cité, Examineur

Dr. Clotilde Randriamampita, DR, Institut Cochin, Université Paris Cité, Directrice
de thèse

Résumé

Voie de l'AMPC et cytosquelette au cours de polarisation et la migration des lymphocytes T en réponse aux chimiokines

Lors de la stimulation par les chimiokines, les lymphocytes T se polarisent (acquisition d'un lamellipode et d'un uropode) puis entament leur migration. Ce processus est particulièrement important pour l'entrée des lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques et les tissus et augmente également leurs chances d'interagir avec une cellule présentatrice d'antigène afin d'être activés.

Nous nous intéressons, dans un premier temps, aux événements précoces de la réponse aux chimiokines. Par l'utilisation de biosenseurs, nous avons suivi les événements de signalisation succédant la stimulation par la chimiokine CXCL12. Nous avons mis en évidence que la stimulation par CXCL12 induit une augmentation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) intracellulaire suivie d'une activation d'une de ces cibles, la protéine kinase A (PKA). Cette kinase semble jouer un rôle clé dans l'établissement de la polarisation suivant un axe prédéfini par la position du centrosome mais aussi dans la régulation du niveau d'actine centrosomale. En effet, l'inhibition grâce à un composé chimique, H89, ou la délocalisation de la PKA du centrosome grâce au peptide inhibiteur, Ht31, induit à l'état basal, une accumulation d'actine. Inversement, après stimulation par CXCL12 des lymphocytes T dont la PKA a été inhibée ou délocalisée ne sont plus capables de se polariser et la déplétion d'actine reste partielle.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux événements ayant lieu au cours de migration et des changements de direction des lymphocytes T en réponse aux chimiokines. Des changements morphologiques portés par un remodelage dynamique du cytosquelette d'actine sont observés au cours de la migration et des changements de direction. Par l'utilisation d'imagerie dynamique, nous avons étudié l'implication de la voie de l'AMPC dans la directionnalité lymphocytes T. Nous avons suivi de façon concomitantes les variations d'AMPC et d'acto-myosine. Nous montrons que des augmentations spontanées et transitoires d'AMPC au niveau du lamellipode de lymphocytes T en cours de migration sont suffisantes pour promouvoir la redistribution d'acto-myosine et les changements de direction. Bien que l'AMPC soit considéré comme un facteur immunosuppresseur, nos résultats suggèrent que lorsque les variations d'AMPC sont transitoires, elles favorisent plutôt un comportement exploratoire des lymphocytes T. Ce projet devrait permettre de mieux caractériser la cascade de signalisation déclenchée dans les LTs lors de la stimulation par les chimiokines et de comprendre les interconnexions entre la voie de l'AMPC et le cytosquelette au cours de la polarisation et la migration des lymphocytes T.

Mots clefs : Lymphocyte T, Migration cellulaire, Polarisation, AMPC, PKA

Abstract

cAMP pathway and cytoskeleton during chemokine-induced T lymphocytes polarization and migration

Upon chemokine stimulation, T lymphocytes polarize (acquisition of a lamellipodium and an uropod) and start to migrate. This process is especially important for T cell entry into the lymph nodes and also increases their chance to interact with an antigen-presenting cell in order to get activated.

First, we are interested, in the early events after the chemokine response. By using biosensors, we followed the signaling events following the stimulation by the chemokine CXCL12. We have shown that CXCL12 stimulation induces an increase in intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) followed by an activation of one of its targets, protein kinase A (PKA). The activation of this kinase seems to play a key role in the establishment of polarization along an axis predefined by the position of the centrosome but also in the regulation of centrosomal actin. Indeed, inhibition by a chemical compound, H89, or delocalization of PKA from the centrosome by the inhibitory peptide, Ht31, induces in the basal state, an accumulation of actin. Conversely, after stimulation by CXCL12, T lymphocytes whose PKA has been inhibited or delocalized are no longer able to polarize and the depletion of actin remains partial.

Next, we were interested in the events occurring during migration and direction changes of T lymphocytes in response to chemokines. Morphological changes driven by a dynamic remodeling of the actin cytoskeleton are observed during migration and direction changes. By using dynamic imaging, we investigated the involvement of the cAMP pathway in T lymphocytes directionality. We concomitantly monitored cAMP and acto-myosin variations. We show that spontaneous and transient increases in cAMP at the lamellipod of migrating LTs are sufficient to promote acto-myosin redistribution and direction changes. Although cAMP is considered to be an immunosuppressive factor, our results suggest that when cAMP variations are transient, it rather promotes exploratory behavior of T lymphocytes.

This project should lead to a better characterization of the signaling cascade triggered in T lymphocyte upon chemokine stimulation and to the understanding of interconnections between cAMP pathway and cytoskeleton.

Mots clefs : T Lymphocyte, Cell migration, Polarization, cAMP, PKA

Remerciements

Merci aux rapporteurs et examinateurs : Loïc Dupré, Andrès Alcover, Claire Hivroz, Sandrine Etienne-Manneville et Manuel Théry, pour avoir accepté de faire partie de mon jury et pris le temps de lire et examiner mon travail.

Merci à Clotilde de m'avoir donné ta confiance pour travailler sur ce projet. Merci pour ton accompagnement à chaque étape, avant même que j'arrive à l'institut, en m'encourageant pendant mon premier semestre de master 2. Merci de m'avoir laissé être autonome tout en étant présente lorsque j'en avais besoin. Merci de m'avoir donné le goût de l'analyse précise et profonde, notamment en imagerie, c'est ce qui m'a permis de prendre conscience de mon intérêt pour la science des données. Tu as été une cheffe idéale, me laissant libre de tester mes hypothèses et idées, en étant toujours de bon conseil et sachant me dire lorsque je m'égarais.

Merci à Fabienne, d'avoir partagé ton bureau. Je ne pouvais pas avoir meilleure voisine de bureau. Tu es une personne solaire, tu brilles par ton intellect et ta bonté. Alors merci d'avoir été mon soleil durant ces 5 années, surtout dans les périodes grises. Tu as été mon repère dans le laboratoire mais également dans ma vie. Merci pour ton écoute et tes conseils. Merci pour tes recommandations en matière de thés, littérature et couture.

Merci à Mireille, de m'avoir initié au monde de la biomécanique, ta curiosité et ta passion transparent dans tout ce que tu fais et cela m'a beaucoup inspiré au cours de ma thèse. Merci à Achille de m'avoir donné tous les outils pour réussir les expériences de TFM.

Merci à Jérôme, pour avoir relu mon manuscrit et pour tes conseils. Merci pour m'avoir appris quelques techniques de biologie moléculaire qui sont bien éloignées de la microscopie.

Merci à Marianne, pour tes remarques et tes conseils. Ton regard extérieur m'a toujours permis de prendre du recul sur mes expériences.

Merci à Rachida, pour ton aide pour les expériences de Western Blot où j'étais assez catastrophique. Merci d'avoir partagé ton art avec moi.

Merci à Maude d'avoir été un soutien dans cette aventure. Deux filles du même âge ressentant les mêmes déceptions et frustrations mais également partageant nos petites victoires quotidiennes, ayant les mêmes questionnements sur la vie et notre avenir. Ce fut libérateur de parler avec toi au labo ou au beau milieu de Châtelet. Merci d'avoir partagé l'expérience des Apprentis Chercheurs avec moi. Il faut ABSOLUMENT que tu m'expliques Galerapagos !!!

Merci à Rana pour ton sourire et ta bienveillance, tu as toujours veillé à ce que tout le monde aille bien.

Merci aux étudiants et post-doctorants qui se sont succédés pendant ces 5 années à l'institut : David, Anaïs, Alberto, Margaux, Alice, Mattia, Adrien...

Merci à Clara & Marion, doctorantes à mon arrivée dans l'équipe, qui m'ont intégré et soutenu de mon master 2 jusqu'à l'obtention de ma bourse. Vous avez toujours été soucieuse du bien-être des nouveaux et je vous en remercie.

Globalement, merci aux équipes Donnadiou et Randriamampita du 3^e étage Roussy, pour les repas du midi partagés, les mots, les anecdotes, les discussions dans les couloirs...

Merci à mes professeurs (FRK, JLD & SKG) pour leur dévotion dans ce métier. Vous m'avez ouvert la voie pour que j'arrive jusqu'ici par vos encouragements et vos conseils.

Merci aux MilPatRoller, pour m'avoir fait sortir de chez moi pendant cette dernière année où il aurait été très facile pour moi de me renfermer. Merci pour toutes ces balades en roller et ces dimanches après-midi pleins de chutes et de jeux. Merci aux coachs du Gigafit de Conflans, vous ne le savez pas mais vous m'avez permis de me défouler et de libérer toute la négativité que j'ai pu emmagasiner au quotidien.

Merci à mes parents de m'avoir donné toutes les clés me permettant de faire ce que je voulais de ma vie. Merci de m'avoir appris que faire de mon mieux pour ne rien regretter. Merci à vous ainsi qu'Ines et Nawel, de m'avoir laissé construire ma vie tout en étant attentif à mon bien être.

Merci à Martine & François de m'avoir accueilli sous votre toit et dans vos vies. Vous avez été d'un grand soutien tout au long de cette thèse. Merci à Edwin et Briana, pour leur présence et leur soutien.

Merci à Andrew, pour tes encouragements depuis toujours en fait. Merci d'avoir veillé sur moi pendant ces 5 années. Merci de m'avoir rassuré quand l'angoisse prenait le dessus sur la raison.

Table des figures et box

FIGURES

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE :

FIGURE 1 : STRUCTURE DU CENTROSOME	24
FIGURE 2 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES SYNAPSES IMMUNOLOGIQUES	27
FIGURE 3 : DISTRIBUTION DES DIFFERENTES PROTEINES MEMBRANAIRES LORS DE LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE	29
FIGURE 4 : ROLES POSSIBLES DE L'ANTISYNAPSE	30
FIGURE 5 : POLARISATION DES LTS AU COURS DE LA MIGRATION ET DE LA FORMATION DE LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE	31
FIGURE 6 : ORGANISATION DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE DANS LES LYMPHOCYTES T MIGRANTS	34
FIGURE 7 : CYCLE FONCTIONNEL DE L'ACTIVITE DES PROTEINES G HETEROTRIMERIQUES	36
FIGURE 8 : DYNAMIQUE DE L'ACTINE	40
FIGURE 9 : ORGANISATION DES RESEAUX DE FILAMENTS D'ACTINE	42
FIGURE 10 : ASSEMBLAGE D'UN FILAMENT D'ACTINE	43
FIGURE 11 : STRUCTURE DE LA MYOSINE NON-MUSCULAIRE DE TYPE II	48
FIGURE 12 : STRUCTURE DES MICROTUBULES	49
FIGURE 13 : LA DYNAMIQUE DU CYTOSQUELETTE REGIT LA FORME ET LA DIRECTION DE MIGRATION DES LYMPHOCYTES	51
FIGURE 14 : REGULATION DE L'ACTINE BRANCHEE DANS LE LAMELLIPODE	53
FIGURE 15 : FORMATION ET RETRACTION DE BLEB	54
FIGURE 16 : CYCLE DES RHOGTPASES	55
FIGURE 17 : DIFFERENTS NIVEAUX DE REMODELAGE DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE DANS LES LYMPHOCYTES T EN MIGRATION	57
FIGURE 18 : REGULATION DE L'AMPC INTRACELLULAIRE	61
FIGURE 19 : PROPRIETES DE REGULATION DES ADENYLATES CYCLASES DES MAMMIFERES	62

FIGURE 20 : REGULATION DE L'ACTIVITE DE LA PKA	66
FIGURE 21 : REGULATION DE L'ACTIVITE DE LA MYOSINE PAR LA PKA	69
FIGURE 22 : LOCALISATION DES AKAPS DANS LES LTS.....	74
FIGURE 23 : TRAVAUX DE THESE.....	75

RESULTATS :

FIGURE 24 : FONCTIONNEMENT DE LA SONDE EXRAI-AKAR2	83
FIGURE 25 : FONCTIONNEMENT DE LA SONDE TEPACVV.....	83
FIGURE 26 : LA STIMULATION DES LTS AVEC LA CHIMIOKINE CXCL12 INDUIT LEUR DEFORMATION ET LEUR POLARISATION	87
FIGURE 27 : LA STIMULATION DES LTS AVEC LA CHIMIOKINE CXCL12 INDUIT UNE AUGMENTATION DE L'AMPC ET DE L'ACTIVITE DE LA PKA.....	89
FIGURE 28 : L'ACTIVATION DE LA PKA EST IMPLIQUEE DANS LA DEFORMATION DES LTS EN REPONSE A CXCL12	91
FIGURE 29 : LA RUPTURE DU CORTEX D'ACTINE A LIEU SELON UN AXE DEFINI PAR LA POSITION DU CENTROSOME	93
FIGURE 30 : LA STIMULATION DES LTS PAR CXCL12 INDUIT UNE DEPLETION DE L'ACTINE CENTROSOMALE IMPLIQUANT L'ACTIVITE DE LA PKA.....	95
FIGURE 31 : IMPLICATION DE LA PKA DANS LA DYNAMIQUE DE L'ACTINE CENTROSOMALE EN REPONSE A CXCL12	97
FIGURE 32 : IMPLICATION DE LA PKA DANS LA DELOCALISATION DU COMPLEXE ARP2/3 DU CENTROSOME EN REPONSE A CXCL12	98
FIGURE 33 : COMPARTIMENTATION DE L'ACTIVITE PKA AU COURS DE LA POLARISATION EN REPONSE A CXCL12	100
FIGURE 34 : IMPLICATION DE L'ACTIVITE DE RAC1 DANS LA REGULATION DE L'ACTINE CENTROSOMALE ET LA POLARISATION DES LTS.....	102
FIGURE 35 : SCHEMA RECAPITULATIF DE LA SEQUENCE DES EVENEMENTS PRECEDANT LA POLARISATION DES LTS.....	103
FIGURE 36 : SCHEMA RECAPITULATIF DES EVENEMENTS AYANT LIEU AU CENTROSOME APRES LA STIMULATION PAR CXCL12 ET L'IMPACT DE L'INHIBITION DE LA PKA	104
FIGURE 37 : MIGRATION DES LYMPHOCYTES T DANS LES MICROCANAU.....	137

**FIGURE 38 : REORGANISATION DU CYTOSQUELETTE LORS DE LA MIGRATION DES
LTS DANS DES MICROCANAU**140

**FIGURE 39 : VARIATIONS DE L'AMPC AU COURS DE LA MIGRATION DES LTS DANS
LES MICROCANAU**141

DISCUSSION :

**FIGURE 40 : CARACTERISTIQUES DES VARIATIONS D'AMPC INFLUENCENT LA
REPOSE DES LTS**153

BOX

Box 1 : Les différents types de lymphocytes T26

Box 2 : Les différents types de synapse immunologique28

Box 3 : Migration cellulaire dans l'organisme33

Liste des principales abréviations

AC	Adénylate Cyclase
Actine-F	Actine Filamentaire
Actine-G	Actine Globulaire
ADP	Adénosine Diphosphate
AKAP	A-kinase anchoring proteins
AMPC	Adénosine Monophosphate Cyclique
Arp2/3	Actin Related Protein 2/3
ATP	Adénosine Triphosphate
BCR	B Cell Receptor
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmoduline
CD	Cluster de Différentiation
CG-NAP	Centrosome and Golgi localized protein kinase N (PKN)- associated protein
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNG	Canaux couplés aux nucléotides cycliques
CPA	Cellule Présentatrice d'antigène
Csk	C-terminal Src Kinase
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
DOCK 2	Dedicator of cytokinesis 2
DPC	Distal Pole Complex
EPAC	Exchange Protein directly Activated by cAMP
ERM	Ezrine, Radixine, Moésine
FH	Formin Homology domains

GAP	GTPase-Activating Proteins
GDI	Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors
GDP	Guanosine Diphosphate
GEF	Guanine Exchange Factors
GPCR	G protein-coupled receptor
GTP	Guanosine Triphosphate
HC	Heavy Chain
IP3	Inositol trisphosphate
LB	Lymphocyte B
LC	Light Chain
Lck	Lymphocyte Cell-specific tyrosine Kinase
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1
LT	Lymphocyte T
LTh	Lymphocyte T Helper
LTreg	Lymphocyte T régulateur
MAIT	Mucosal Associated Invariant T cells
MEC	Matrice Extracellulaire
MLCK	Myosin light-chain kinase
MLCP	Myosin light chain phosphatase
MTOC	Microtubules Organizing Center
NKT	Natural Killer T
NM	Non-muscular Myosin
NPF	Nucleation Promoting Factor
PAG	Phosphoprotein Associated with Glycosphingolipid-enriched microdomain
PCM	Pericentriolar Material

PDE	Phosphodiesterase
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PKG	Protein Kinase G
PKI	Protein Kinase Inhibitor
PLC β	Phospholipase C β
ROCK	Rho-associated protein kinase
SDF-1	Stromal cell-Derived Factor 1
SH3	SRC Homology 3 Domain
SI	Synapse Immunologique
SMAC	Supramolecular Activation Cluster
TCR	T Cell Receptor
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1
WASP	Wiskott–Aldrich syndrome protein
WAVE	WASP-family verprolin-homologous protein
γ TuRC	γ Tubulin Ring Complex

Sommaire

RESUME	3
ABSTRACT.....	5
REMERCIEMENTS	7
TABLE DES FIGURES ET BOX	11
LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS	15
SOMMAIRE.....	19
INTRODUCTION	21
1. POLARISATION ET MIGRATION DES LYMPHOCYTES T.....	23
1.1. POLARISATION CELLULAIRE.....	23
1.2. LES LYMPHOCYTES T	25
2. CYTOSQUELETTE	39
2.1. CYTOSQUELETTE D'ACTINE	39
2.2. MYOSINES NON MUSCULAIRES	46
2.3. MICROTUBULES	48
2.4. IMPLICATION DU CYTOSQUELETTE DANS LA MIGRATION CELLULAIRE.....	50
3. LE SECOND MESSAGER : L'AMPC.....	61
3.1. REGULATION DE LA CONCENTRATION D'AMPC.....	61
3.2. CIBLES DE L'AMPC.....	63
RESULTATS	77
1. ETABLISSEMENT DE L'AXE DE POLARISATION DES LYMPHOCYTES EN REPONSES AUX CHIMIOKINES.....	79
1.1. INTRODUCTION.....	79
1.2. MATERIELS & METHODES.....	80
1.3. RESULTATS	85

1.3.1. EFFET DE LA STIMULATION DES LTS PAR LA CHIMIOKINE CXCL12	85
1.3.1.1. DEFORMATION	85
1.3.1.2. AMPc ET PKA	88
1.3.2. IMPLICATION DE LA PKA DANS LA DEFORMATION ET LA POLARISATION DES LTS	90
1.3.3. POSITIONNEMENT DU CENTROSOME AU COURS DE LA POLARISATION	92
1.3.4. ACTINE AUTOUR DU CENTROSOME ET PKA	93
1.3.5. AKAP DE TYPE II ET ACTINE CENTROSOMALE	99
1.3.6. IMPORTANCE DE LA DIMINUTION D'ACTINE CENTROSOMALE POUR LA POLARISATION	101
1.4. DISCUSSION	103
2. VARIATIONS DE L'AMPC ET REMODELAGE DU CYTOSQUELETTE AU COURS DE LA MIGRATION DES LTS.....	109
2.1. INTRODUCTION.....	109
2.2. DISCUSSION	135
3. MIGRATION ET CHANGEMENT DE DIRECTION DANS UN MILIEU CONFINE	137
3.1. MATERIELS & METHODES.....	137
3.2. RESULTATS ET CONCLUSION	138
DISCUSSION GENERALE.....	143
1. COMMENT L'ACTINE CENTROSOMALE EST-ELLE REGULEE ?	145
2. QUELLES FONCTIONS POUR L'ACTINE CENTROSOMALE ?	149
3. L'AMPc, UN FACTEUR FAVORISANT OU INHIBANT LA REPOSE IMMUNE ?.....	151
CONCLUSION GENERALE.....	155
ANNEXE	157
BIBLIOGRAPHIE	161

Introduction

Le système immunitaire correspond à l'ensemble des organes, cellules et molécules permettant de défendre l'organisme contre les agents pathogènes (virus, bactéries, parasites) ou autres dommages dont il peut être victime (tumeurs). Il existe deux types de réponses : la réponse innée et la réponse adaptative.

La réponse innée représente la première ligne de défense. Elle implique les cellules et mécanismes permettant la défense de l'organisme contre les agents infectieux. Elle met en jeu différents moyens de défense notamment les barrières physiques (barrières peau-muqueuse) et chimiques (pH de la peau, lysozyme) contre ces agents. Elle permet la détection des agents infectieux et le recrutement des cellules immunitaires sur le site de l'infection, incluant les cellules phagocytaires (monocytes, cellules dendritiques et polynucléaires) et les cellules NK (Natural Killer). Cette première réponse est peu spécifique d'un pathogène. La réponse innée permet l'activation de l'immunité adaptative par la présentation antigénique.

La réponse adaptative intervient en seconde ligne contre les agents infectieux. Elle se met en place plus tardivement, quelques jours après le début de l'infection. Elle est caractérisée par la participation des lymphocytes B et T, et de leurs récepteurs associés, respectivement BCR (*B-Cell Receptor*) et TCR (*T-Cell Receptor*), qui vont reconnaître spécifiquement un ligand présenté par une cellule présentatrice d'antigène (CPA). L'interaction va entraîner leur prolifération et différenciation en lymphocytes B ou T effecteurs¹. Sur le long terme, cette réponse permet à l'organisme de conserver une mémoire de la rencontre avec le pathogène. La migration de ces cellules est nécessaire pour l'interaction avec une CPA. C'est pourquoi l'étude des mécanismes mis en place par ces cellules est importante.

Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons à la polarité cellulaire dans le contexte du système immunitaire, plus particulièrement la polarité des lymphocytes T (LTs) au cours de leur migration. Après avoir défini les principales caractéristiques de la polarité cellulaire puis rappelé les propriétés des LTs, nous caractériserons la polarisation de ces cellules tant lors de la formation de la synapse immunologique que lors de la migration. Dans un second temps, nous détaillerons les caractéristiques du cytosquelette, acteur moléculaire majeur impliqué dans la polarisation et la migration cellulaires. Enfin, dans

une dernière partie, nous nous intéresserons à une voie de signalisation particulière, celle de l'AMPC et de la Protéine Kinase A que nous avons montré comme jouant un rôle clé dans les processus de polarisation et migration des lymphocytes T.

1. POLARISATION ET MIGRATION DES LYMPHOCYTES T

1.1. Polarisation cellulaire

La polarisation cellulaire est définie comme la répartition asymétrique de protéines, organelles et composants du cytosquelette^{2,3}, conférant à chaque pôle une spécificité. L'organisation intracellulaire est d'une importance fondamentale pour assurer les fonctions cellulaires telles que la migration, la prolifération, la morphogénèse et la réponse immunitaire. Bien que la polarisation ait été décrite dans des cellules individuelles et dans les complexes multicellulaires, c'est uniquement à la polarisation à l'échelle unicellulaire à laquelle nous nous intéresserons dans ce paragraphe.

Il existe différents types de polarisation cellulaire :

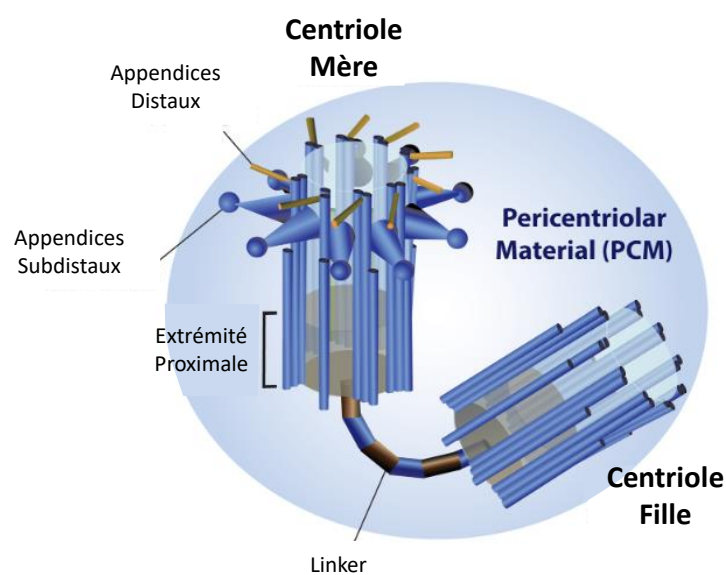
- La **polarité apico-basale** spécifique des épithéliums où le pôle apical est en contact avec l'environnement extérieur, le pôle basal est ancré à la matrice extracellulaire et latéralement ces cellules interagissent entre elles. Les jonctions entre les cellules empêchent les protéines et les ions de circuler librement créant ainsi une barrière empêchant les substances indésirables d'entrer dans l'organisme⁴.
- La **polarité planaire** désigne l'alignement coordonné des cellules dans le plan du tissu (par exemple les cellules ciliées au niveau de l'oreille)⁵⁻⁷.
- La **polarité avant/arrière** des cellules migrantes requise pour la directionnalité du mouvement par exemple. La migration cellulaire concerne les cellules individuelles et les groupes de cellules interagissant entre elles afin de migrer de manière collective⁸.

Lorsque l'on parle de cellules non-polarisées, en réalité elles peuvent être individuellement asymétriques par le positionnement des différentes structures cellulaires. Une structure cellulaire est particulièrement intéressante dans l'étude de la polarisation cellulaire : le centrosome.

Le centrosome est une structure très conservée dans des organismes différents au cours de l'évolution⁹. Il est constitué d'une paire de centrioles composée de 9 triplets de microtubules (Figure 1). Autour des centrioles, le matériel péricentriolaire (PCM,

pericentriolar material) permet notamment la nucléation et la stabilisation des microtubules. Dans les cellules eucaryotes, le centrosome représente le principal centre organisateur des microtubules (MTOC) et joue un rôle dans le contrôle de la morphologie, la division et la motilité cellulaire¹⁰. Comme nous le verrons notamment dans la troisième partie de cette introduction, le centrosome peut être considéré, au-delà de son rôle de MTOC, comme une plateforme de signalisation impliquée dans l'accomplissement des fonctions mentionnées en amont.

Figure 1 : Structure du centrosome



Représentation schématique du centrosome, composé d'une paire de centrioles mère-fille et entouré d'une enveloppe, le matériel péricentriolaire (PCM). Le centriole mère possède des appendices subdistaux et distaux le distinguant du centriole fille. Un domaine protéique permet la liaison des extrémités proximales des centrioles. Le PCM sert d'échafaudage pour le complexe γ TuRC impliqué dans la nucléation et la croissance des microtubules.

Figure tirée et traduite à partir de *Ryniawec JM, Rogers GC. Centrosome instability: when good centrosomes go bad. Cell Mol Life Sci. 2021 Nov;78(21-22):6775-6795.*²²⁵

Comme son nom l'indique, le centrosome est positionné au centre du corps cellulaire à différentier du centre géométrique de la cellule. Des études montrent que la position du centrosome est définie par un équilibre entre les forces de poussée et les forces de tractions appliquées par les microtubules^{11,12}. Le positionnement du centrosome relativement à ces forces se fait dans une zone où le cytosquelette de microtubule a la plus basse énergie¹³⁻¹⁶. De plus, une étude récente montre l'implication de la distribution spatiale des adhésions cellulaires ainsi que des forces contractiles sur le

cytosquelette d'actine. Ce dernier définit le positionnement du réseau de microtubule lié au centrosome¹⁷.

La polarité des lymphocytes T est critique pour l'accomplissement de leur fonction. Elle se manifeste sous différentes formes selon la fonction à accomplir. Après avoir rappelé dans un premier temps les principales propriétés de ces cellules, nous nous attarderons sur leurs caractéristiques lors de la polarisation pour la formation de la synapse immunologique et la migration.

1.2. Les lymphocytes T

Les lymphocytes T (LTs) sont des cellules lymphocytaires jouant un rôle central dans l'immunité cellulaire adaptative. La lettre « T » correspond au thymus, l'organe dans lequel les LTs arrivent à maturité.

Le récepteur des lymphocytes T (TCR), va subir une réorganisation aléatoire de sa séquence et deux étapes de sélection pour tester sa réactivité avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). La première étape de sélection, dite positive, se fait *via* la reconnaissance du CMH de l'organisme propre puis une sélection négative, où les lymphocytes T dont le TCR interagit trop intensément avec les antigènes de l'organisme présentés par des cellules présentatrices d'antigène (CPA) sont éliminés. A l'issue de ces étapes, un répertoire de lymphocytes T naïfs (n'ayant pas rencontré leur antigène spécifique) est libéré dans le sang et va rejoindre les organes lymphoïdes secondaire (ganglions, rate, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses). On peut de façon très schématique distinguer plusieurs types de lymphocytes T qui sont détaillés dans la **Box 1**.

Les LTs sont des cellules montrant un comportement exploratoire important en lien avec leurs fonctions¹⁸. Ces cellules doivent être capables de naviguer dans le sang, les organes lymphoïdes et non lymphoïdes pour les cellules effectrices. Ce processus se nomme la recirculation. Afin de rejoindre les organes lymphoïdes secondaires, les LTs doivent opérer une extravasation correspondant à la sortie des LTs de la circulation sanguine. Un premier contact s'établit entre les cellules endothéliales et le LT circulant, médié par des récepteurs de type sélectine. Des protéines chimio-attractantes, les chimiokines (voir paragraphe 1.4.2.), présentes à la surface de l'endothélium induisent l'activation des récepteurs d'adhésion, les intégrines. Une fois cette adhésion forte établie,

Box 1 : Les différents types de lymphocytes T

- Les **LTs cytotoxiques** (CTLs) expriment le cluster de différenciation (CD), CD8. Ces cellules sont capables de reconnaître les peptides présentés par les CPA. Après leur activation, ces cellules prolifèrent et se différencient en cellules effectrices. Cette différenciation leur permet, lorsqu'elles entrent en contact avec une cellule exprimant l'antigène spécifique, de déclencher son apoptose (= mort cellulaire programmée).
- Les **LTs auxiliaires** ou T *helper* (LTh) exprimant le CD4. Comme leur nom l'indique, ces cellules sont des intermédiaires de la réponse immunitaire. Après leur activation, *via* la reconnaissance d'un peptide présenté par une CPA, ces cellules prolifèrent et « aident » la réponse immune en produisant des cytokines qui vont stimuler différents types de fonctions immunitaires.
- Les **LTs mémoires**. Une partie des cellules T activées va se différencier en cellule mémoire. Ces cellules ne vont pas agir sur le pathogène mais permettront à l'organisme de conserver une mémoire de l'agresseur. Ces LTs mémoires s'activeront rapidement en cas d'une seconde rencontre avec le pathogène. Les LTs CD8 et CD4 peuvent se différencier en LTs mémoires.
- Les **LTs régulateurs** (LTreg). Ces cellules aident à diminuer l'activité des LTs, par exemple en fin de réponse ou lors de l'activation de LTs auto-immuns (dirigés contre le Soi).
- Les **Natural Killer T** (NKT). Ce sont des cellules impliquées dans la réponse innée et la réponse adaptative. Ces cellules reconnaissent les cellules dont la fonction est altérée par exemple les cellules tumorales ou les cellules infectées par un virus.
- Les **LTs invariants associés aux muqueuses** (MAIT, *Mucosal Associated Invariant T cells*)
- Les **LTs $\gamma\delta$** exprimant un TCR particulier. Les TCR « classiques » sont constitués de chaînes $\alpha:\beta$, tandis que les TCR de ces LTs possèdent une chaîne γ et une chaîne δ . Ces LTs sont localisés principalement dans les épithéliums des muqueuses respiratoires et digestives.

le lymphocyte peut effectuer une migration trans-endothéliale (à la jonction entre deux cellules endothéliales) afin de rejoindre des tissus lymphoïdes ou des tissus non-lymphoïde pour les cellules T activées¹⁹.

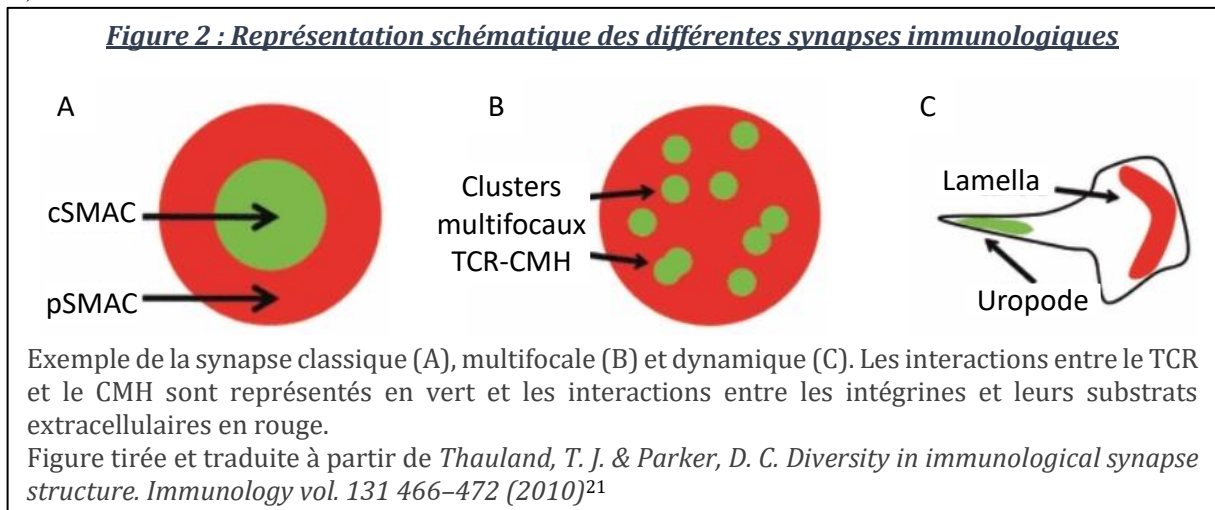
Les LTs naïfs scannent continuellement leur environnement de manière à favoriser la reconnaissance d'un antigène spécifique présenté à la surface d'une CPA au sein des organes lymphoïdes secondaires²⁰. La migration des LTs naïfs dans ces organes présente les caractéristiques d'une migration aléatoire avec des fluctuations de vitesse, alternant périodes de motilité rapide et lente et éventuellement des phases d'arrêt. Ces fluctuations de vitesse peuvent être dues à l'hétérogénéité du microenvironnement chimique ou à la présence d'obstacles. Cette

migration se fait sur un réseau de fibroblastes exprimant des chimiokines dont nous détaillerons l'implication plus bas. La présence de ces protéines augmente la motilité basale des LTs par haptokinèse (migration le long d'une surface utilisant des ligands immobilisés sans gradient imposant la direction du mouvement) ou chimiokinèse (migration menée par des chimiokines solubles sans gradient imposant la direction du mouvement).

La rencontre des LTs avec une CPA induit des changements morphologiques majeurs conduisant à une polarisation du LT. Nous verrons dans la prochaine partie les caractéristiques de ce contact aboutissant à la formation de la synapse immunologique.

1.3. Polarisation des LTs dans le cadre de la reconnaissance antigénique

La synapse immunologique (SI) correspond à la zone de contact entre un LT et une CPA. Il n'existe pas de SI unique puisque selon le type de lymphocytes, leur stade de maturation, la CPA impliquée le LTs peut établir des synapses différentes²¹ (Figure 2 et **Box 2**).



Box 2 : Les différents types de synapse immunologique

TYPE DE SYNAPSE	LT IMPLIQUE	« CPA » IMPLIQUE
CLASSIQUE OU MONOFOCALE	CD4+	Lymphocyte B Bicouche lipidique
	Th1	Bicouche lipidique Fibroblastes
	CD8+	Cellule cible
	cytotoxique	Bicouche lipidique
	CD4+ naïf	Lymphocyte B CPA splénique Bicouche lipidique
MULTIFOCALE	Thymocyte DP	Cellule Stromale Bicouche lipidique
	CD4+ et CD8+ naïfs	Cellule dendritique
	Th2	CPA splénique Bicouche lipidique Fibroblastes
	LT CD4+ naïf	Fibroblaste
DYNAMIQUE	LT CD4+ naïf	Bicouche lipidique
	LT CD4+ activé	Fibroblastes

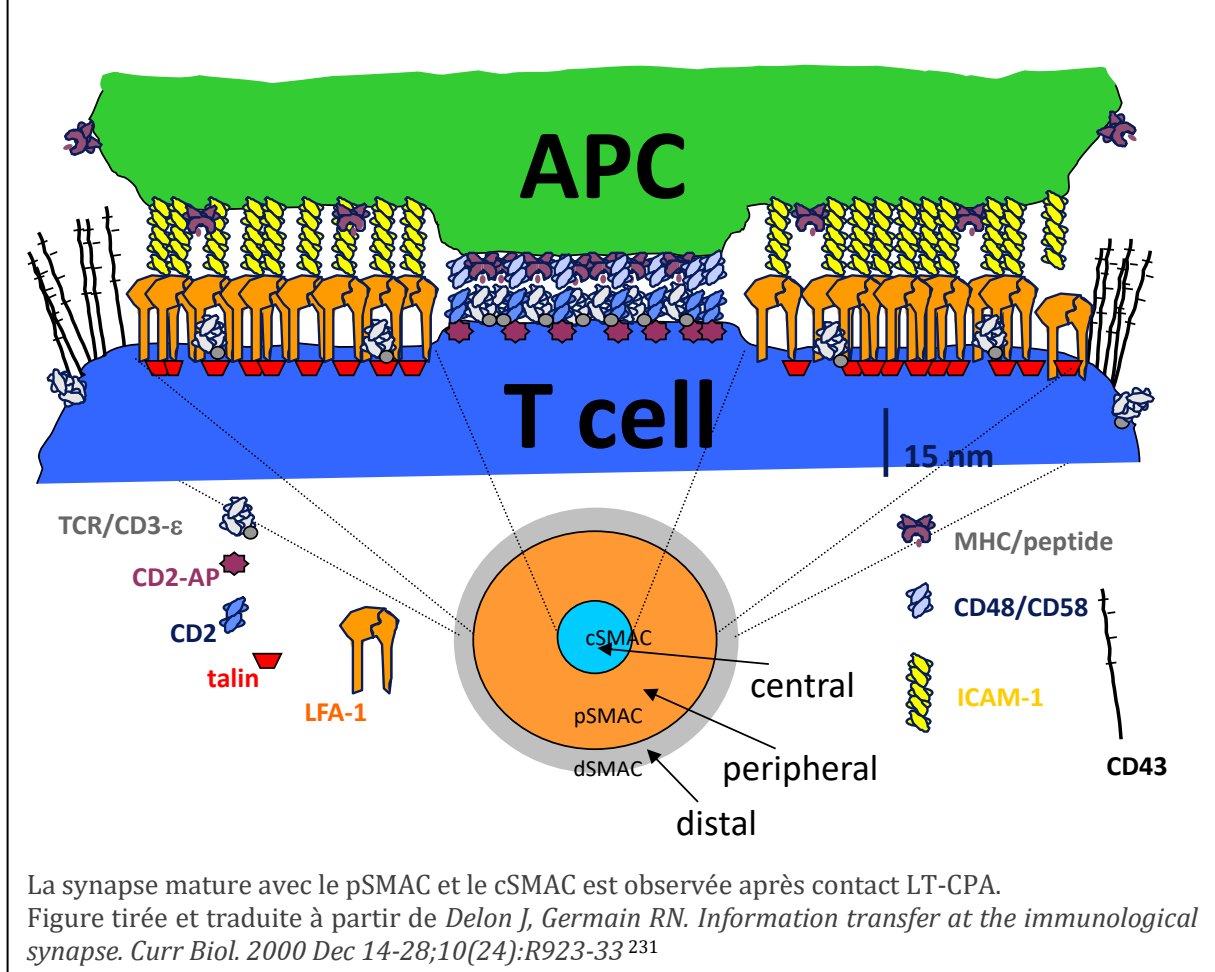
La synapse classique ou monofocale²²⁶ : caractérisée par la formation de clusters d'activation supramoléculaires dynamiques (SMACs) dont la composition diffère : (Figure 3)

- SMAC central (cSMAC) contenant le TCR lié à l'antigène présenté par le CMH et les molécules de signalisation associées
- SMAC périphérique (pSMAC), formant un anneau autour du SMAC central, est enrichi en molécules d'adhésion telles que LFA-1
- SMAC distal externe (dSMAC) où se concentre notamment un composant du cytosquelette : l'actine filamenteuse et CD43.

La synapse multifocale : ce type de synapse se différencie de la synapse classique par l'absence d'une organisation avec des SMACs. Elle est caractérisée par la présence de microclusters composés de molécules d'adhésion dispersées parmi des microclusters de TCR interagissant avec le CMH présentant un peptide antigénique et de molécules de signalisation²²⁷⁻²³⁰.

La synapse dynamique : ces synapses sont formées lors de contacts transitoires, le LT se déplace à la surface d'une CPA formant des contacts transitoire pouvant former des synapses plus stables. La formation d'une synapse stabilisée dépend de l'activation du LT résultant de la détection d'une quantité seuil d'antigène présent sur la CPA²⁷.

Figure 3 : Distribution des différentes protéines membranaires lors de la synapse immunologique

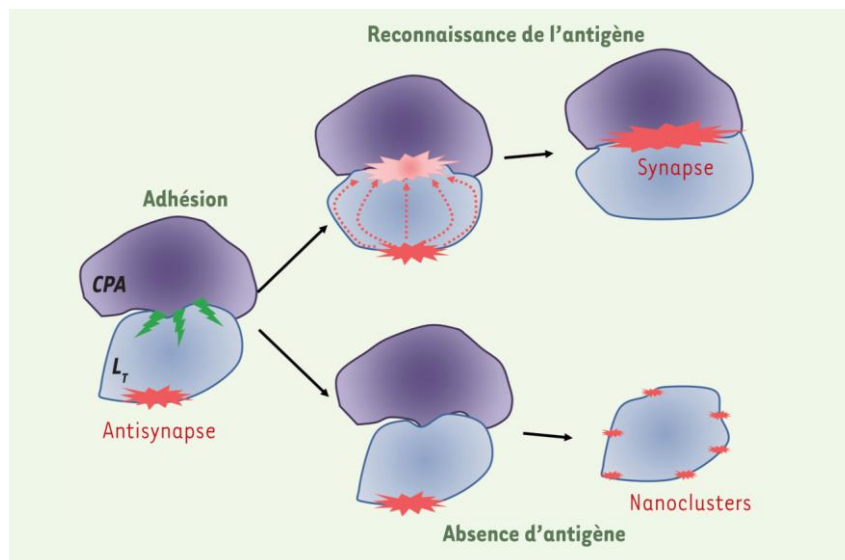


La formation de la synapse et la polarisation du LT s'accompagne d'une relocalisation vers la zone contact de nombreuses protéines (protéines de signalisation et protéine d'adhésion). Cette formation est coordonnée par des remaniements du cytosquelette d'actine et des microtubules et s'accompagne d'un trafic vésiculaire permettant la relocalisation des différentes protéines.

Cependant, avant même la formation de la synapse, le contact initial entre le LT et la CPA induit la formation d'une structure transitoire à l'opposé du contact entre ces deux cellules et induisant une polarisation du LT : l'antisynapse²². Cette structure inclut tous les éléments classiquement décrits à la synapse. Elle pourrait permettre de rassembler le signalosome dès le stade de l'adhésion et de restreindre le signal en attendant une confirmation de l'activation du TCR pour permettre rapidement la formation de la synapse immunologique. Cette antisynapse empêcherait la formation de synapse en

absence d'antigène. Cette structure constitue une première polarisation des LTs (Figure 4).

Figure 4 : Rôles possibles de l'antisynapse



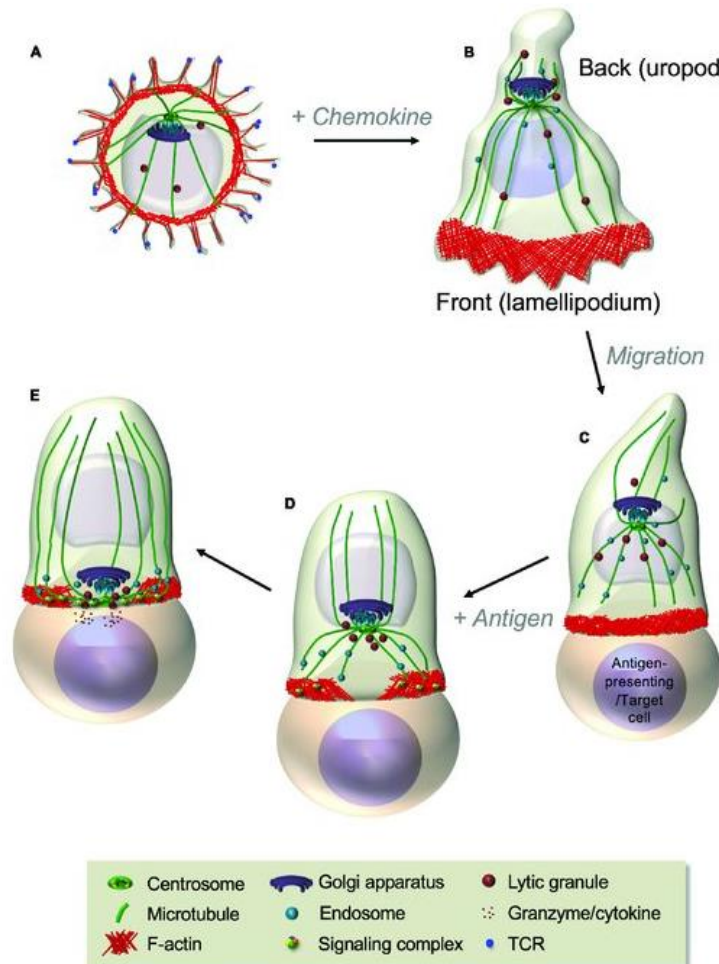
L'antisynapse se forme à la suite du contact entre le LTs et la CPA. En rouge est représenté l'accumulation des protéines de signalisation impliquées dans la synapse immunologique. En présence d'antigène, ces protéines peuvent être recrutée au niveau de la synapse, favorisant l'activation du LT. En revanche en absence d'antigène, l'antisynapse pourrait empêcher la formation de la synapse en séquestrant les molécules de signalisation.

Figure tirée à partir de *L'antisynapse : présynapse et garde-fou de l'activation lymphocytaire ?* Chloé Guedj, Nicolas Abraham, Clotilde Randriamampita *Med Sci (Paris)* 32 (12) 1053-1056 (2016)²³²

Après reconnaissance de l'antigène, le MTOC (centre organisateur des microtubules) ou centrosome jusqu'alors situé à l'arrière du noyau, se réoriente au niveau de la zone de contact entre les deux cellules. Cette relocalisation est importante pour le transport vésiculaire lors de la formation de la SI^{23,24}. Le modèle de repositionnement du centrosome dans ce contexte implique un mécanisme de capture et de rétraction des microtubules permis par l'action de la dynéine corticale et la dépolymérisation des microtubules²⁵ (Figure 5).

Afin d'optimiser leur probabilité de rencontre avec une CPA présentant un antigène spécifique les LTs doivent être capables de se déplacer rapidement et de changer de cap. Ce comportement exploratoire est induit par une stimulation chimiokinique en réponse à laquelle les LTs subissent des changements morphologiques importants aboutissant à leur polarisation puis leur motilité.

Figure 5 : Polarisation des LTs au cours de la migration et de la formation de la synapse immunologique



(A) Une cellule au repos se polarise en réponse aux chimiokines (B). Cette polarisation se caractérise par la formation d'un lamellipode à l'avant et d'un uropode à l'arrière. Le centrosome est positionné à l'arrière du noyau. Le LT mire dans les organes lymphoïdes secondaires ou les tissus périphériques où il rencontre des CPA. Lors de la reconnaissance antigénique, la signalisation *via* le TCR induit la polarisation du cytosquelette (C) se caractérisant par une polymérisation d'actine au niveau du site de contact et par une réorganisation du réseau de microtubules déplaçant le centrosome et les organelles qui lui sont associées (appareil de Golgi, endosomes, granules lytiques) vers le site de contact (D). Une réorganisation finale génère la SI, où se concentrent des TCRs, des molécules de signalisation et d'adhésion et des récepteurs de co-stimulation (E).

Figure tirée et traduite à partir de Mastrogiovanni M, Juzans M, Alcover A, Di Bartolo V. Coordinating Cytoskeleton and Molecular Traffic in T Cell Migration, Activation, and Effector Functions. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Oct 21;8:591348.²³³

1.4. Migration des lymphocytes T

La migration cellulaire est un processus fondamental. Il s'agit de la capacité d'une cellule à se déplacer de façon spontanée ou stimulée. La migration cellulaire est essentielle pour divers processus physiologiques tels que le développement embryonnaire (organogénèse), l'homéostasie des tissus (cicatrisation) et l'immunité. Des dérégulations de ces processus physiologiques peuvent être impliquées dans de nombreuses pathologies affectant le développement mais aussi dans la formation de métastases cancéreuses. Nous nous intéresserons plus particulièrement dans ce paragraphe aux LTs, sujets de cette étude et à leur migration de type amiboïde. Nous nous attarderons notamment sur les caractéristiques de leur migration et sur les éléments régulant ce processus.

1.4.1. Migration amiboïde

La nature des cellules qui exercent une migration amiboïde est hétérogène et comprend des organismes unicellulaires eucaryotes (amibes) et un certain nombre de types cellulaires d'organismes plus complexes (lymphocytes, neutrophiles...). Toutes ces cellules partagent une même caractéristique morphologique qui définit le terme « *amoeboid* » (*amoibe* en grec signifiant *change*) : au cours de leur déplacement, elles changent constamment de morphologie par de rapides protrusions et rétractions²⁶.

La migration amiboïde est très différente de la migration mésenchymateuse (**Box 3**). Elle est utilisée par les leucocytes leur permettant de se déplacer rapidement, plus de 10 μ m/min (contre moins de 1 μ m/min pour la migration mésenchymateuse). Ce mode de migration est indépendant des adhésions avec le tissu et préserve l'intégrité de celui-ci en n'exerçant aucune activité protéolytique. Ces nombreux changements morphologiques impliquent un remodelage de la cellule important au cours de la migration et lui permettent ainsi de se déplacer dans et entre les différents tissus (intravasation, extravasation). Cette migration implique également une capacité à « sentir » et à intégrer rapidement les signaux de l'environnement^{26,27}.

Au cours de la migration amiboïde, le noyau est localisé vers l'avant de la cellule antérieur au centrosome²⁶ et il semble servir de senseur afin d'explorer la géométrie de l'environnement permettant ainsi de guider la migration²⁸.

Box 3 : Migration cellulaire dans l'organisme

Les cellules peuvent se déplacer seule ou collectivement. Les cellules migrantes individuellement sont séparées selon deux types de migration : mésenchymateuse ou amiboïde²³⁴.

CARACTERISTIQUES	MESENCHYMATEUSE	AMIBOÏDE
TYPES CELLULAIRES	Fibroblastes, certaines cellules cancéreuses	Leucocytes, cellules germinales
MORPHOLOGIE	Allongée	Arrondie et dynamique (rapides changements morphologiques <i>via</i> extension et rétraction des protrusions)
PROTRUSIONS	Lamellipode ou filopode à l'avant	Lamellipode, filopode ou bleb à l'avant Uropode à l'arrière
LOCALISATION NOYAU ET CENTROSOME	Noyau à l'arrière de la cellule Centrosome à l'avant du noyau	Noyau à l'avant de la cellule Centrosome à l'arrière du noyau
ADHESION AU SUBSTRAT	Dépendante de l'adhésion au substrat Génération de force de traction Modification du substrat par activité protéolytique	Indépendante de l'adhésion au substrat
VITESSE DE MIGRATION	Environ 1µm/min	Environ 10µm/min

Centrosome : organite sans membrane et centre organisateur des microtubules (MTOC)

Lamellipode : protrusion cellulaire plane située à l'avant des cellules, générée par la polymérisation d'actine branchée.

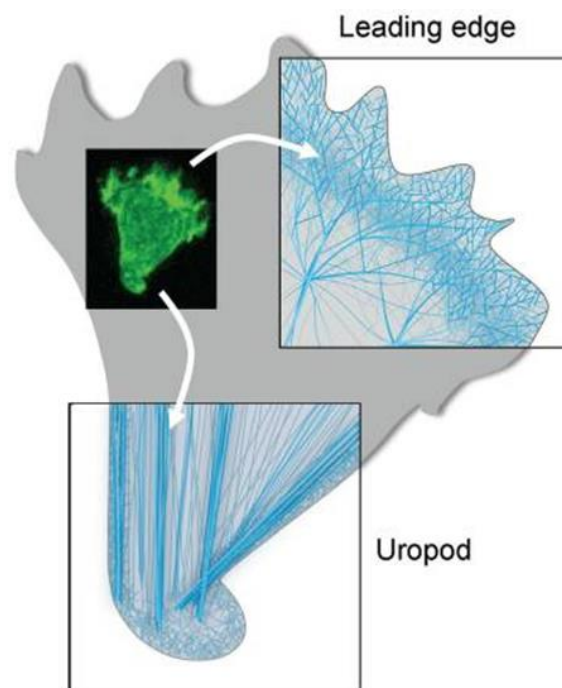
Filopode : protrusion cellulaire fine ressemblant à des doigts contenant des faisceaux d'actine. Ces filopodes sont utiles pour sonder le microenvironnement local et fournir des sites d'adhésion au niveau de leur extrémité.

Bleb : renflement arrondi membranaire contenant du cytoplasme. Les blebs résultent d'une perturbation locale de l'interaction entre la membrane et le cortex d'actine. Une région sans actine corticale se bombe vers l'extérieur de la cellule en raison de la pression hydrostatique exercée par le réseau d'actomyosine intracellulaire.

Uropode : correspond à l'arrière des cellules amiboïde polarisées.

Toutes les cellules migrant de manière amiboïde sont guidées par un cytosquelette d'actomyosine polarisé avec un réseau permettant l'expansion par la polymérisation d'actine et la formation d'une protrusion à l'avant (le lamellipode) et un réseau permettant le rétrécissement de la cellule et la contraction à l'arrière (l'uropode), indispensable pour la dynamique de migration²⁹ (Figure 6). L'organisation de ces structures sera détaillée dans le chapitre consacré au cytosquelette. La migration des LTs est principalement contrôlée par des chimiokines mais peut être également stimulée par le lipide de signalisation, sphingosine-1-phosphate³⁰ ou par le confinement physique^{31,32}. La migration dans un contexte confiné prend en compte la complexité du microenvironnement *in vivo*. La migration des leucocytes dans ces environnements ne nécessite pas de forte adhésion au substrat. Le déplacement est permis par un couplage des forces induites par la déformation cellulaire pour s'adapter à la topographie de l'environnement extracellulaire, la friction et des adhésions lâches^{33,34}. Nous nous concentrerons ici sur la migration induite par les chimiokines.

Figure 6 : Organisation du cytosquelette d'actine dans les lymphocytes T migrants



Représentation schématique de l'ultrastructure des réseaux du cytosquelette d'actine à l'avant et à l'arrière du LT en migration. À l'avant, le LTs qui migre sur une surface 2D émet une protrusion, le lamellipode. Elle contient un réseau d'actine très dynamique et branchée. À l'arrière, l'uropode est constitué d'un réseau de faisceaux d'actine parallèles qui peuvent glisser les uns le long des autres pour générer des forces contractiles.

Figure tirée et traduite à partir de Dupré, L., Houmadi, R., Tang, C. & Rey-Barroso, J. *T lymphocyte migration: An action movie starring the actin and associated actors. Frontiers in Immunology 6, (2015).*¹⁹²

1.4.2. Signalisation *via* les récepteurs aux chimiokines

Les chimiokines sont des cytokines chimio-attractantes^{35,36}. Elles ont un rôle crucial dans la migration des cellules immunitaires et notamment le positionnement des LTs pour générer la réponse adaptative. Ces protéines sont indispensables pour leur fonction immunologique comme leur entrée et leur déplacement dans les ganglions lymphatiques. Les chimiokines présentes dans les ganglions lymphatiques et l'endothélium augmentent la motilité des cellules T (haptokinèse ou chimiokinèse). Après leur sécrétion, elles peuvent être immobilisées à la surface cellulaire et sur la matrice extracellulaire (MEC). Les chimiokines constituent une grande famille de protéines avec 50 membres répertoriés chez l'humain et la souris.

Les chimiokines sont reconnues par des récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules immunitaires. Il existe deux types de récepteurs aux chimiokines : les récepteurs conventionnels couplés aux protéines G hétérotrimériques (cCKRs ou GPCRs pour *G-protein-coupled receptors*) et les récepteurs atypiques (ACKRs) qui n'induisent pas de signalisation mais qui contrôlent la localisation et la concentration de chimiokines dans le milieu extracellulaire (piégeage des chimiokines).

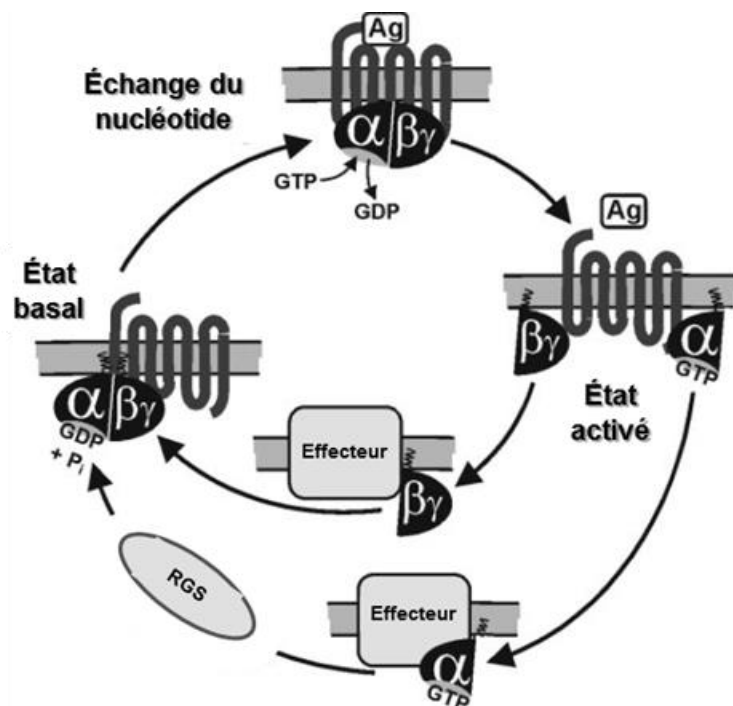
En fonction de l'état d'activation, les LTs ont une expression de GPCRs différente. Les LTs naïfs expriment par exemple les récepteurs aux chimiokines CCR7 (ligands : CCL19 et CCL21) et CXCR4 (ligands : CXCL12, également nommé SDF1 pour *stromal cell-derived factor 1*)¹⁸.

1.4.2.1. Les protéines G trimériques

Les récepteurs aux chimiokines conventionnels, auxquels nous nous intéressons ici, appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G trimériques et sont constitués de sept domaines transmembranaires. Les protéines G trimériques sont constituées de trois sous-unités : $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$. L'hétérotrimère $G\alpha/G\beta\gamma$ interagit avec la partie cytosolique du récepteur. Ces protéines G trimériques subissent des cycles d'activation et d'inactivation se basant sur la liaison du GTP par la sous-unité $G\alpha$ et la dissociation d'avec $G\beta\gamma$. Les sous-unités ainsi libérées peuvent interagir avec leurs effecteurs en aval³⁷ (Figure 7).

Les protéines G trimériques sont associées à différentes voies de signalisation permettant la transduction de signaux extracellulaires différents selon le type de sous-unité $G\alpha$ associée. Il existe 4 familles de $G\alpha$: α_s , α_i , $\alpha_q/11$ et $\alpha_{12/13}$.

Figure 7 : Cycle fonctionnel de l'activité des protéines G hétérotrimériques



Le complexe se formant entre un GPCR et son agoniste ou ligand permet le relargage du GDP de la sous-unité α du trimère. La sous-unité α peut alors fixer un GTP. GTP- α et $G\beta\gamma$ se dissocient et sont capables d'interagir avec leurs effecteurs. L'hydrolyse spontanée du GTP en GDP peut être accélérée par des protéines RGS qui régulent la signalisation des protéines G. GDP- α se réassocie alors avec $G\beta\gamma$.

Figure tirée et traduite à partir de *Wettschureck N, Offermanns S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. Physiol Rev. 2005 Oct;85(4):1159-204.*²³⁵

1.4.2.2. Les chimiokines et leurs récepteurs associés dans la migration des lymphocytes T

Les récepteurs aux chimiokines impliqués dans la migration des LTs naïfs sont CCR7, activés par CCL19 et CCL21, et CXCR4, activé par CXCL12^{38,39}.

La stimulation de ces récepteurs induit l'activation de la protéine G hétérotrimérique associée. Il a été montré que pour ces récepteurs, cette dernière était principalement de type $G_{\alpha 2}$ ⁴⁰⁻⁴². La stimulation des lymphocytes T par CCL19, CCL21 ou CXCL12 induit une augmentation de la polymérisation d'actine et la polarisation du LT, étapes nécessaires à sa migration, *via* l'activation de RhoGTPases (voir Chapitre 2 : Cytosquelette).

Ces chimiokines tapissent les organes lymphoïdes secondaires, ce qui permet aux LTs circulants d'entrer, de naviguer et ainsi de rencontrer possiblement une CPA présentant son antigène spécifique. Ces chimiokines ont donc un rôle dans l'immunosurveillance⁴³.

Par ailleurs, la migration cellulaire nécessite des changements de morphologie importants portés par le cytosquelette. Dans cette prochaine partie, différents composants du cytosquelette et leur implication dans la migration seront abordés.

2. CYTOSQUELETTE

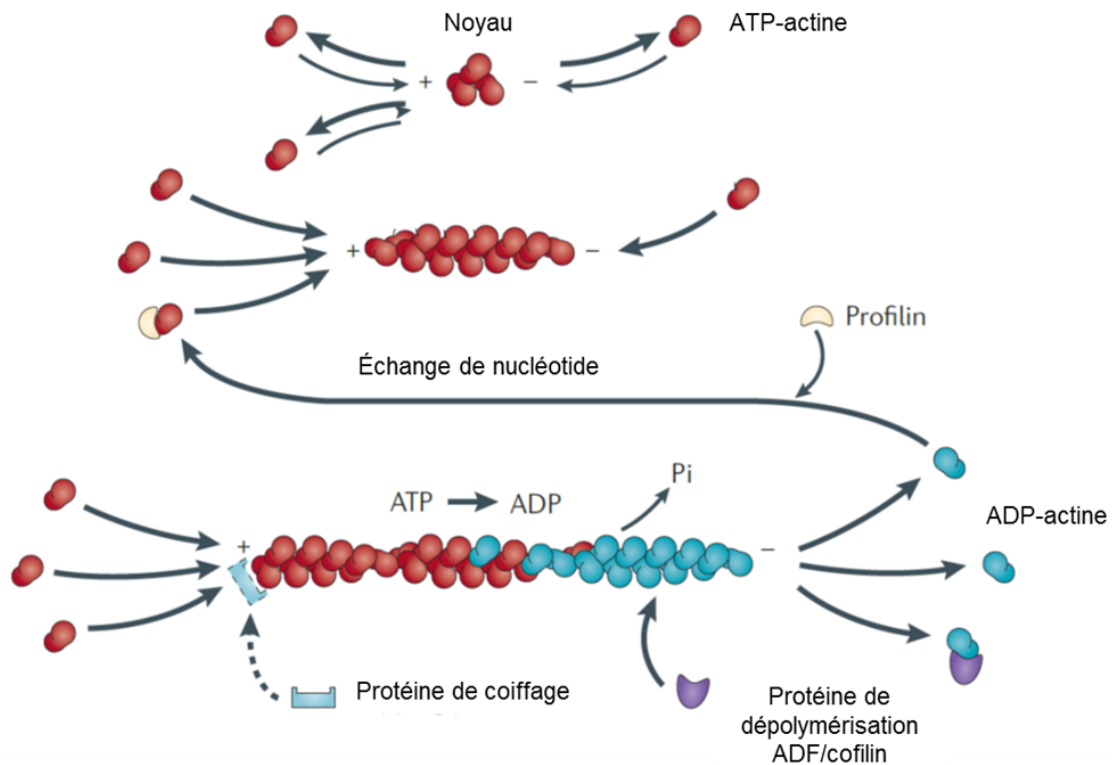
Le cytosquelette est un réseau de filaments protéiques composés de microfilaments d'actine, de filaments intermédiaires, de microtubules et les septines. Il contient en plus des protéines motrices capables de se déplacer activement le long des fibres du cytosquelette. Parmi ces protéines, on compte : les myosines, les kinésines et les dynéines. Le cytosquelette intervient dans de nombreuses fonctions cellulaires comme l'organisation spatiale des organites de la cellule, l'exocytose et l'endocytose, le contact entre la cellule et la matrice extracellulaire, les changements morphologiques et la mobilité.

Dans cette partie, nous nous intéresserons aux différents éléments du cytosquelette (à l'exception des septines) ainsi qu'à leur dynamique et régulation respective en particulier au cours de la migration cellulaire.

2.1. Cytosquelette d'actine

Le cytosquelette d'actine provient de l'assemblage d'actine globulaire (actine-G), une protéine de 42kDa, liée à une molécule d'ATP formant ainsi un filament d'actine (actine-F). Leurs assemblages et désassemblages sont des processus dynamiques contrôlés, comme nous le verrons, par de nombreux facteurs⁴⁴ (Figure 8).

Figure 8 : Dynamique de l'actine



L'actine est une ATPase, c'est-à-dire qu'elle est capable de catalyser l'hydrolyse de l'ATP en ADP. Les monomères d'actine liant un ATP (actine-ATP) peuvent s'associer entre eux pour former des trimères d'actine-G, c'est la nucléation. L'association des autres monomères se fait alors rapidement. Le filament d'actine se polarise, l'actine-ATP se fixe sur l'extrémité positive. L'activité ATPase augmente au cours de l'incorporation des monomères et les monomères l'actine-ADP se dissocient au niveau de l'extrémité négative. Cette dissociation rend le filament sensible à l'action de protéines régulatrices de la polymérisation de l'actine qui promeuvent la dépolymérisation des monomères d'ADP-actine. Il existe aussi des protéines

Figure tirée et traduite à partir de Nürnberg, A., Kitzing, T. & Grosse, R. *Nucleating actin for invasion*. 11, 177-187.²³⁶

2.1.1. Structures

2.1.1.1. Réseau d'actine branchée

Le réseau d'actine branchée participe à la génération de forces impliqués dans la motilité cellulaire. Il s'agit d'un réseau ramifié initié par un complexe protéique : Arp2/3. Ce complexe est composé de 7 protéines⁴⁵.

La polymérisation du réseau branché est déclenchée par l'interaction entre un filament préexistant ou amorce et le complexe Arp2/3. Un réseau d'actine branchée est caractérisé par la nucléation sur un filament préexistant d'actine, d'un nouveau filament

avec un angle de 70° par rapport au filament amorce (Figure 9A). En amont, les facteurs de nucléation (NPF pour *Nucleation Promoting Factor*) comme la famille des protéines du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) sont nécessaires pour activer ce complexe. Le point commun entre toutes les protéines permettant l'activation du complexe Arp2/3 est la présence d'un ou plusieurs domaines WH2⁴⁶. Ces domaines sont courts (50 acides aminés) et sont capables de lier l'actine-G permettant ainsi la nucléation d'un nouveau filament d'actine.

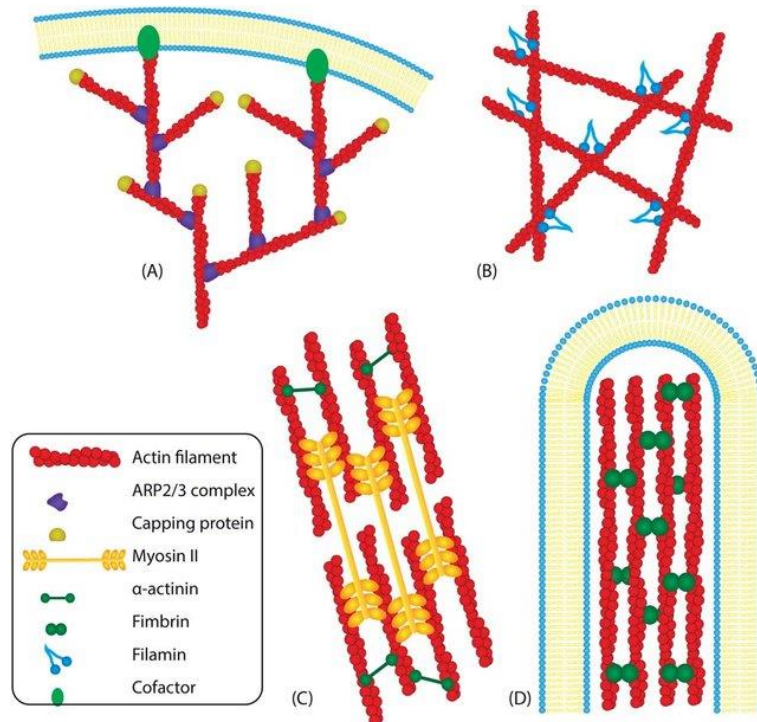
2.1.1.2. Réseau d'actine réticulée

Ce réseau correspond à toutes les structures de filaments d'actine connectés par des protéines reliant les filaments entre eux à l'exception du complexe Arp2/3⁴⁷. Ce réseau est impliqué dans le contrôle de la forme des cellules (Figure 9B). Les protéines impliquées dans ce réseau ne jouent pas ou peu de rôle dans la polymérisation de l'actine à partir des monomères mais relient les filaments d'actine déjà polymérisés pour générer une organisation macroscopique complexe.

Il existe également des faisceaux de filaments d'actine organisés de manière antiparallèles avec une contraction induite par la myosine (Figure 9C). Ceux-ci sont nécessaires à la division cellulaire. Ces organisations antiparallèles sont stabilisées par la réticulation de protéines favorisant cette configuration spécifique.

Enfin, des faisceaux de filaments d'actine peuvent être organisés de façon parallèle (Figure 9D). Ce type de structure est retrouvé dans différents contextes cellulaires comme la formation de protrusions membranaires variées telles que les filopodes et les microvilli. Ceux-ci sont constitués de filaments orientés avec leurs extrémités positives dans la même direction et, la plupart du temps, face à la membrane cellulaire. Les filaments d'actine d'un faisceau sont maintenus en contact étroit par des protéines de réticulation (actinine, fimbrine, fascine).

Figure 9 : Organisation des réseaux de filaments d'actine



A- Réseau d'actine branchée résultant de l'activité du complexe Arp2/3.

B- Réseau d'actine réticulée

C- Fibre de stress formée par réticulation d' α -actinine avec des faisceaux parallèles de myosine II

D- Faisceaux formés par des réticulations de fimbrine formant des filipodes

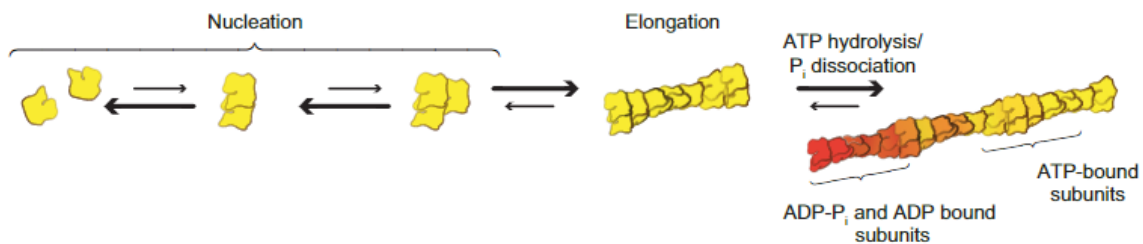
Figure tirée et traduite à partir de Pritchard RH, Huang YY, Terentjev EM. *Mechanics of biological networks: from the cell cytoskeleton to connective tissue*. *Soft Matter*. 2014 Mar 28;10(12):1864-84.²³⁷

2.1.2. Régulations

La cinétique d'assemblage des filaments d'actine est limitée par l'étape de nucléation consistant en la formation de dimères ou de trimères de monomère d'actine-G. Dès que les trimères sont formés, l'élongation du filament peut se poursuivre en fonction de la concentration en actine-G disponible (Figure 10). L'ajout des monomères d'actine aux extrémités est suivi par l'hydrolyse de l'ATP lié aux sous-unités d'actine au sein du filament⁴⁸.

La polymérisation spontanée d'actine-G en filaments est empêchée par l'instabilité des dimères ou trimères d'actine ainsi que par des protéines se fixant à l'actine-G, la rendant ainsi inaccessible à la polymérisation (profiline par exemple)⁴⁹.

Figure 10 : Assemblage d'un filament d'actine



La polymérisation de l'actine à partir d'un pool de monomères d'actine se déroule en 2 phases. L'étape limitante de nucléation où des dimères et trimères est suivie de l'étape d'élongation.

Figure tirée et traduite à partir de *Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C. & Plastino, J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. Physiological Reviews 94, 235–263 (2014).*⁴⁵

2.1.2.1. Facteurs de nucléation de l'actine

2.1.2.1.1. ARP2/3

Le complexe Arp2/3 est composé de 7 sous-unités comprenant Arp2 et Arp3. Ce complexe est intrinsèquement inactif car les autres sous-unités maintiennent les deux moitiés de Arp séparées. Lorsque le complexe Arp2/3 se fixe sur un filament d'actine, Arp2 et Arp3 se rapprochent et forment la base de la croissance d'une branche participant ainsi à la formation d'un réseau d'actine branchée. Différents facteurs favorisant la nucléation (NPFs) activent le complexe. Chacun de ces facteurs est requis dans des contextes cellulaires particuliers. Dans le cas la migration cellulaire, ce sont les protéines de la famille WASP qui sont requises, principalement WAVE. Ces NPFs sont intrinsèquement inactifs en raison du masquage de leur site de liaison avec les monomères d'actine et avec le complexe Arp2/3⁵⁰.

2.1.2.1.2. Formines

Les formines sont des protéines homodimériques caractérisées par un domaine d'homologie 2 (FH2) interagissant avec l'extrémité positive d'un filament d'actine⁵¹. Lorsque le dimère ne fixe pas d'actine-G, les deux domaine FH2 du dimère sont proches. La liaison avec un monomère d'actine permet au dimère de s'étirer afin de s'enrouler autour d'un filament d'actine. La régulation des formines peut se faire par auto-inhibition suite à l'interaction entre un domaine auto-inhibiteur diaphane (DAD) près de l'extrémité

N-terminale et un domaine interagissant avec le DAD (DID) près de l'extrémité carboxyle. La liaison des GTPases de la famille Rho près du DAD lève cette auto-inhibition. À côté du domaine FH2, la plupart des formines possèdent un domaine FH1 avec de multiples séquences riches en proline qui se lient à la profiline. La plupart des formines sont capables d'induire la nucléation de filaments d'actine, probablement par la stabilisation de dimères d'actine-G⁵².

2.1.2.2. Facteurs d'élongation de l'actine

2.1.2.2.1. Formines

En plus de leur rôle dans la nucléation de filaments d'actine, les formines sont capables d'inhiber et de promouvoir l'élongation de filaments d'actine au niveau de l'extrémité positive en interagissant avec cette dernière. Seuls, les domaines FH2 des formines ralentissent l'élongation. En effet, le complexe contenant les domaines FH2 et l'extrémité du filament d'actine ont deux conformations : ouverte ou fermée. Les monomères d'actine peuvent se lier seulement à la conformation ouverte. La profiline permet de lever cette inhibition et oriente la polymérisation *via* les formines, à la condition que la formine en question possède en plus de son domaine FH2, un domaine FH1 capable de lier la profiline. Après la liaison de la profiline-actine sur le domaine FH1 de la formine, la profiline-actine est transportée à l'extrémité du filament, permettant ainsi une élongation de ce dernier⁵³.

2.1.2.2.2. Ena/VASP

Comme les formines, les tétramères d'Ena/VASP s'associent aux extrémités positives des filaments d'actine, favorisant l'élongation et inhibant la fixation des protéines de coiffage qui empêchent l'ajout de monomères d'actine au niveau de l'extrémité à laquelle elles sont fixées. VASP est capable de délivrer des monomères d'actine libres ainsi que des monomères d'actine liés à la profiline.

2.1.2.3. Profiline

La profiline est donc une protéine régulatrice clé de la polymérisation de l'actine. Les profilines sont des petites protéines de 15kDa. Il en existe 4 isoformes chez les mammifères : profiline 1 exprimée de manière ubiquitaire, profiline 2 associée au tissu

nerveux, les profilines 3 et 4 exprimées dans les testicules et les reins (seulement la profiline 3). Nous allons principalement nous intéresser à la profiline 1⁵⁴.

La profiline est capable de se lier à l'actine-G ainsi qu'aux facteurs de nucléation et d'élongation (discuté en amont : Ena/VASP, formines, Arp2/3). Le recrutement de monomères d'actine liés à la profiline est central pour l'activité de ces protéines qui recrutent ce complexe maintenant ainsi des concentrations élevées sur les sites de remodelage actif de l'actine grâce à de multiples domaines poly-proline⁵⁵. Deux types de protéines sont impliqués dans l'élongation des filaments d'actine *via* leur interaction avec la profiline : les formines et les membres de la famille Ena/VASP.

Paradoxalement, à des concentrations élevées, la profiline accélère le renouvellement des filaments d'actine en entrant en compétition pour les extrémités positives et en augmentant la vitesse de sortie des monomères d'actine⁵⁶.

2.1.2.4. Désassemblage des filaments d'actine

2.1.2.4.1. ADF/cofilines

La famille des protéines ADF, pour *Actin Depolymerizing Factor*, également nommée cofiline, est une famille de protéines hautement conservées et impliquées dans la division cellulaire ou encore dans la formation du lamellipode⁵⁷.

Ce sont des protéines capables de fixer l'actine. Leur activité de dépolymérisation est double : les ADF/cofilines sectionnent les filaments d'actine et augmentent également la vitesse avec laquelle les monomères quittent l'extrémité négative du filament. Ces protéines sont généralement retrouvées dans des zones de la cellule où le *turn-over* des filaments d'actine est important (par exemple à l'avant de cellules en cours de migration)⁵⁸.

La régulation principale des ADF/cofilines se fait par phosphorylation. Ces protéines sont phosphorylées sur une sérine en extrémité N-terminale par les kinases LIM 1 et 2, TESK1 et TESK2. La phosphorylation par ces kinases prévient la liaison avec l'actine⁵⁹.

2.1.2.4.2. Protéines de coiffages

Les protéines de coiffage sont des hétérodimères capables de lier l'extrémité positive des filaments d'actine. Ces protéines coopèrent avec la profiline pour maintenir une réserve d'actine monomérique et limiter le nombre d'extrémités positives

disponibles pour l'élongation des filaments d'actine. Cette fonction est importante pour l'orientation du déplacement de la cellule car elle permet d'orienter la polymérisation des filaments vers la membrane plasmique en bloquant les sites de polymérisation à l'arrière du lamellipode⁶⁰.

Les protéines de coiffage sont constitutivement actives mais régulées de manière allostérique par des protéines qui contiennent un motif d'interaction avec la protéine de coiffage, par exemple la *capping protein Arp2/3 myosin I linker* (CARMIL)⁶¹.

2.2. Myosines non musculaires

La superfamille de la myosine est une famille de protéines vaste et diversifiée. Ses membres sont regroupés en de nombreuses classes et sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires. Les myosines contiennent des sites de liaison pour l'actine et pour une molécule d'ATP. Dans cette partie, nous allons nous concentrer sur la myosine non-musculaire (qui n'est pas impliquée dans la contraction musculaire) de type II (NMII), la principale myosine retrouvée dans les lymphocytes T et impliquée dans leur migration^{62,63}.

Il existe 3 NMII paralogues (provenant de gènes homologues issus d'un même gène ancestral qui, suite à une duplication, divergent pour devenir paralogues). Les NMII sont des hexamères constitués de 2 chaînes lourdes (*Heavy Chain* : HC) et de deux paires de chaînes légères (*Light Chain* : LC) (Figure 11A). Trois gènes codent pour les HC, *MYH9*, *MYH10* et *MYH14* codant respectivement pour les chaînes lourdes de NMIIA, NMIIB et NMIIC⁶⁴.

2.2.1. Structures et fonctionnement

NMII HC contient un domaine moteur en N-terminal conservé sous forme de tête globulaire suivi d'une région en hélice alpha. Dans cette région se lient les LC : *essential LC* (ELC) et *myosin regulatory LC* (MRLC). Ce domaine est suivi par une tige en hélice alpha responsable de la dimérisation des HC. A l'extrémité C-terminale, la HC contient une partie non-hélicale qui est la partie la plus divergente entre les différentes NMII. Cette partie permet le repli sur elle-même de la myosine (la queue avec MRLC), induisant son auto-inhibition (Figure 11B). Cette interaction inhibe l'activité motrice et la polymérisation de la myosine⁶⁴.

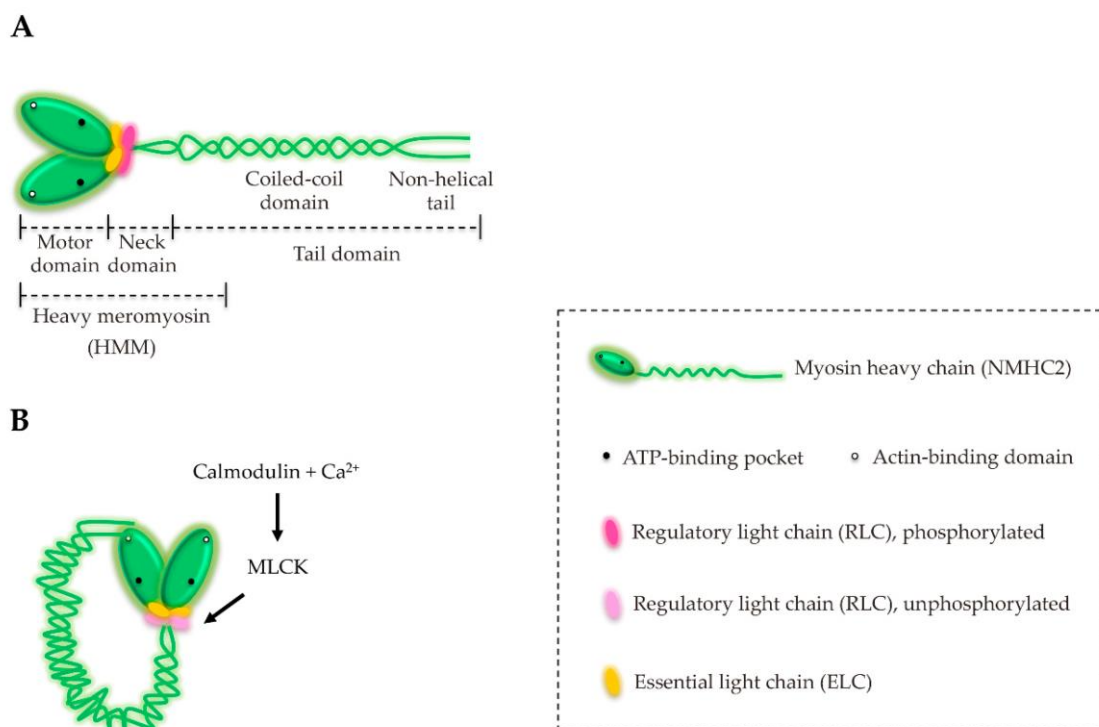
Les NMII utilisent l'énergie de l'ATP pour se déplacer sur les filaments d'actine au niveau de l'extrémité positive.

La polymérisation des NMII peut se faire par des interactions parallèles ou antiparallèles entre les tiges non-repliées. Les filaments bipolaires de NMII sont constitués d'environ 30 molécules pour NMIIA et NMIIB et environ 14 molécules pour NMIIC. Dans les filaments bipolaires, les sous-unités sont décalées et distribuées entre les 2 orientations opposées avec le domaine moteur positionné près des extrémités. La nucléation repose sur 2 ACDs (*Associated Competence Domains* – ACD1 et 2) situés à la fin des chaînes lourdes. Ces domaines sont hautement conservés, ce qui explique la capacité des NMII à copolymériser^{65,66}.

2.2.2. Régulations

La régulation de l'activité contractile de la myosine se fait par phosphorylation et déphosphorylation. NMII est principalement phosphorylée au niveau de la Ser19 et optionnellement au niveau de la Thr18 de la chaîne légère⁶⁷. Cette phosphorylation restaure l'activité motrice de NMII et elle peut être induite par ROCK, MLCK, MRCK, PAK et citron-kinases. En restaurant l'activité motrice, la chaîne lourde est libérée permettant à la protéine de se déplier. La phosphorylation simultanée de MRLC et HC produit une protéine dépliée active mais incapable de polymériser.

Figure 11 : Structure de la myosine non-musculaire de type II



A- NMII est un hexamère composé de deux chaînes lourdes (vertes) et de quatre chaînes légères : deux chaînes régulatrices (rose) et deux chaînes essentielles (jaune). Ce complexe peut être divisé en trois régions : un domaine moteur, un domaine *neck* et un domaine *tail*.

B- Représentation schématique de NMII inactive. Les chaînes légères non phosphorylées favorisent l'interaction intramoléculaire entre les domaines moteur et *tail*. La phosphorylation du domaine régulateur lève cette auto-inhibition.

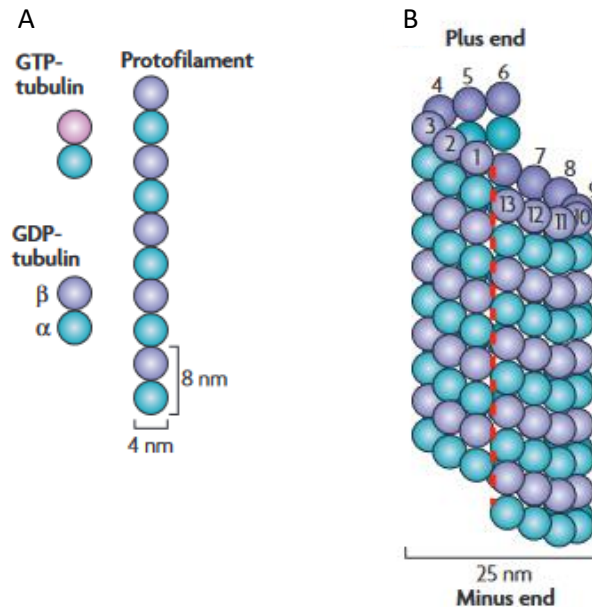
Figure tirée de Hanoune J, Defer N. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:145-74s¹⁸⁰

2.3. Microtubules

Les microtubules sont des polymères de dimères d' α - et de β -tubuline, qui s'associent tête-bêche en protofilaments et s'assemblent latéralement pour former des tubes creux (Figure 12). L'assemblage des microtubules est un processus polarisé qui, dans les cellules de mammifères, part d'un ou plusieurs centres d'organisation des microtubules (MTOC). Dans la plupart des types de cellules, le centrosome fait office de MTOC principal et stabilise les extrémités négatives des microtubules qui sont intégrées dans cette structure complexe. Cependant, il a récemment été démontré que l'appareil de

Golgi participe à l'organisation du réseau de microtubules dans certains types de cellules⁶⁸.

Figure 12 : Structure des microtubules



A- Les microtubules sont composés d'hétérodimères stables d' α et de β tubuline alignés de manière polaire pour former des protofilaments

B- La paroi des microtubules comprend généralement 13 protofilaments parallèles.

Figure tirée à partir de Akhmanova A, Steinmetz MO. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Apr;9(4):309-22.²³⁸

Le centrosome est impliqué dans la nucléation des microtubules avec le γ -TuRC (γ Tubulin Ring Complex) et ses protéines associées. γ -TuRC forme une structure en forme d'anneau sur laquelle sont ajoutés des dimères d' α et de β -tubuline. L'élongation des microtubules se fait selon une polarité spécifique avec l'extrémité négative accrochée au complexe et l'extrémité positive s'éloignant du centrosome grâce à l'ajout de dimères de tubuline⁶⁹.

Les implications des microtubules dans la migration cellulaire sont nombreuses. En effet, ceux-ci fournissent un réseau de transport intracellulaire pour des vésicules membranaires, des molécules de signalisation et d'autres composants du cytosquelette qui sont essentiels au maintien de la polarité et de la persistance de la migration cellulaire. Les microtubules grâce à leur capacité à générer des forces de poussée, contribuent à la formation et au maintien des protrusions. Les microtubules sont également capables

d'exercer des forces de traction utilisées par les cellules pour déplacer le noyau vers l'avant et positionner le centrosome^{70,71}.

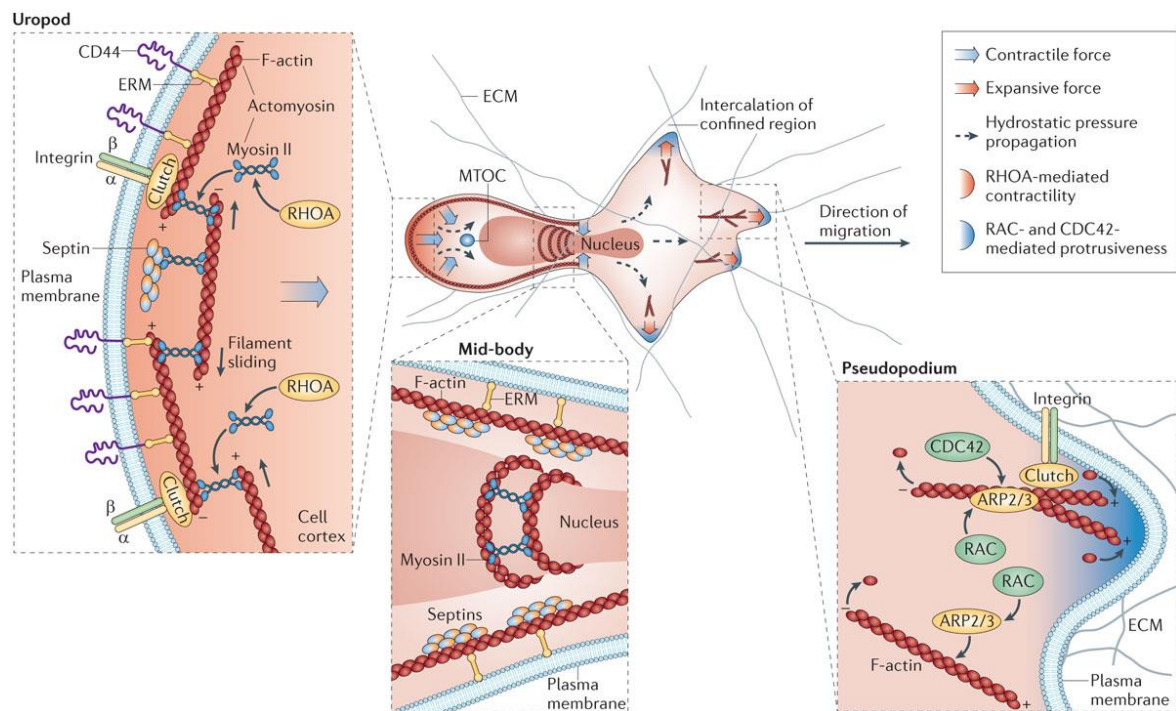
Le PCM entourant les centrioles est composé de protéines d'échafaudage censées former la base du PCM et de protéines effectrices, telles que des kinases et phosphatases impliquées dans l'organisation des microtubules⁷².

Il existe des interconnexions entre les microtubules et les filaments d'actine. Les réseaux préexistants influencent la formation de nouveaux réseaux d'actine-F ou de microtubule. Par exemple, les microtubules présents à la périphérie de la cellule doivent s'organiser dans un maillage d'actine-F généré par le complexe Arp2/3 dans cette zone. Ce maillage forme un « mur » d'actine corticale agissant comme une barrière empêchant la croissance des microtubules dans des zones denses en actine-F, par exemple dans le lamellipode de cellules migrantes^{73,74}. Les microtubules parvenant à s'insérer dans ce réseau d'actine-F sont alignés et stables grâce à des facteurs de réticulation^{75,76} et des protéines motrices⁷⁷. Au niveau du centrosome, on retrouve ces interactions. En effet, il a été montré que le centrosome, en plus de son rôle de MTOC, était centre de nucléation de l'actine⁷⁸. De plus, une augmentation de l'actine centrosomale est corrélée avec une diminution du réseau de microtubule démontrant ainsi que les filaments d'actine constituent une barrière physique à la croissance des microtubules⁷⁹.

2.4. Implication du cytosquelette dans la migration cellulaire

Une cellule en cours de migration est caractérisée par une morphologie polarisée avec un avant et un arrière bien défini ainsi que par des structures d'assemblage de filaments d'actine différentes. Ces structures permettent la directionnalité du mouvement (Figure 13).

Figure 13 : La dynamique du cytosquelette régit la forme et la direction de migration des lymphocytes



Nature Reviews | Immunology

Représentation schématique d'un leucocyte en cours de migration utilisant une migration de type pseudopodiale-amiboïde.

Il existe un équilibre entre les forces expansives et les forces contractiles régulant la forme de la cellule. Les forces contractiles s'exercent au centre et à l'arrière et les forces expansives à l'avant permettant la formation de protrusions.

Dans l'uropode, la contractilité des filaments d'acto-myosine est assurée par la RhoGTPase RhoA. Cette contractilité permet de propulser la cellule vers l'avant en perturbant les interactions avec la matrice extracellulaire. CD44, une glycoprotéine de surface permet le recrutement des protéines ERM (Ezrine, Radixine et Moésine) qui renforcent l'intégrité du cortex et empêchent la formation de protrusions à l'arrière.

Au milieu, la contractilité de l'acto-myosine permet de déformer le noyau pour faciliter le passage de la cellule dans des espaces réduits.

A l'avant, les RhoGTPases Rac et Cdc42 activent le complexe Arp2/3 déclenchant ainsi la polymérisation de l'actine branchée.

Figure tirée à partir de *Weninger, W., Biro, M. & Jain, R. Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. Nature Reviews Immunology 14, 232–246 (2014).*²⁷

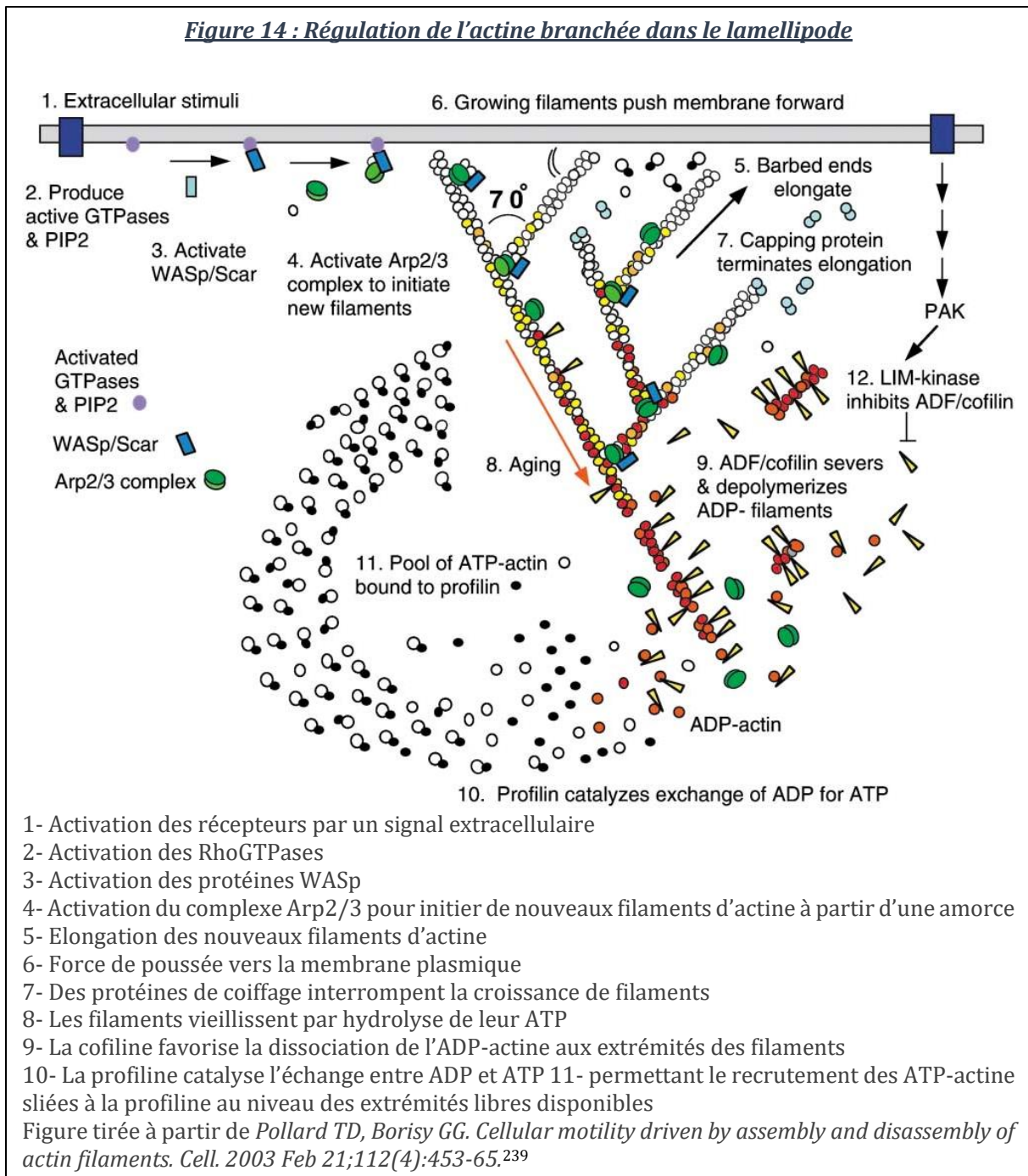
2.4.1. Lamellipode

Le lamellipode est une structure dense en filaments d'actine branchée se formant à l'avant de cellule en cours de migration. Comme nous l'avons vu, un réseau d'actine branchée est caractérisé par la nucléation sur un filament préexistant d'actine d'un nouveau filament avec un angle de 70° par rapport au premier filament et est régulé par

le complexe protéique Arp2/3 (Figure 14). Cette organisation pousse vers l'avant la membrane plasmique pendant le mouvement. La structure de ce réseau est caractérisée par différents paramètres tels que la densité, la longueur des branches, et leur orientation. Ces paramètres varient en fonction des types cellulaires et de l'état de la protrusion. Un lamellipode contenant une faible densité de longs filaments effectue des protrusions dynamiques. Cependant, ces filaments sont plus vulnérables à la rétraction. Un lamellipode avec une forte densité en filaments courts est plus persistant et effectue des protrusions plus lentement.

Au niveau du lamellipode des LTs se trouvent les récepteurs des chimiokines, le TCR et des molécules d'adhésion. L'activation des RhoGTPases Rac et Cdc42 permet la polymérisation d'actine *via* WAVE2, WASP et Arp2/3⁸⁰. L'implication des RhoGTPases dans le contexte de la migration des LTs sera abordée dans la partie 2.4.4.

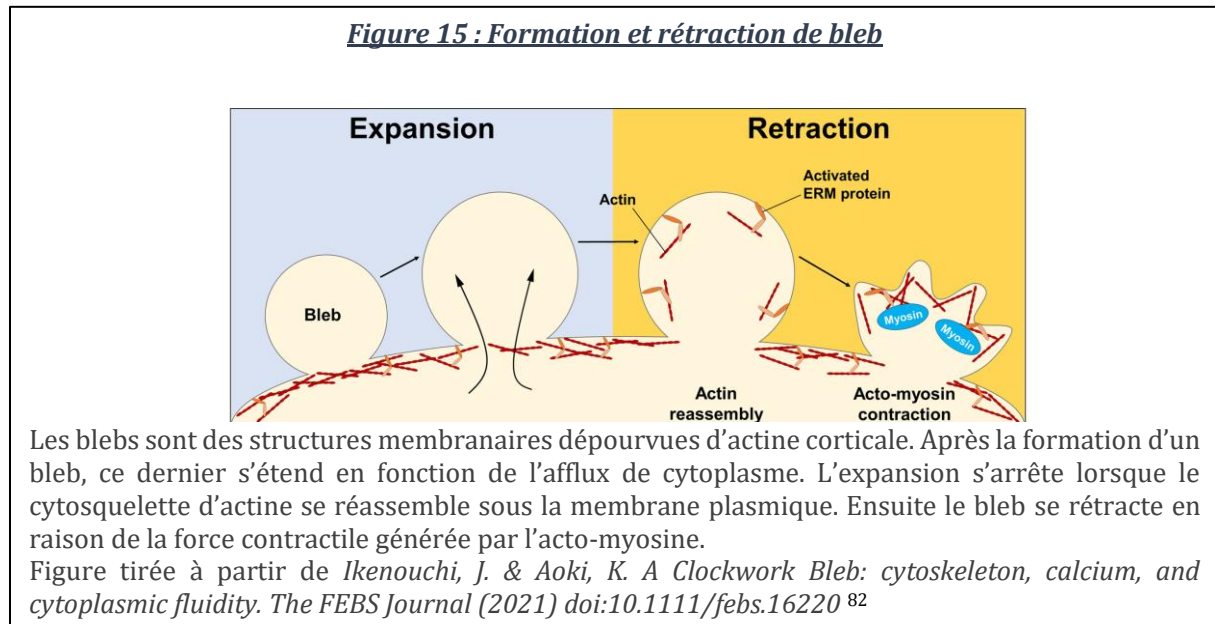
Figure 14 : Régulation de l'actine branchée dans le lamellipode



2.4.2. Blebs

Les blebs sont des protrusions cellulaires formant des expansions sphériques à la membrane, initialement dépourvus de filaments d'actine. Ces protrusions ont longtemps été considérées comme des signes d'apoptose. Récemment, son implication dans la migration cellulaire a été établie⁸¹. Après la formation du bleb, ce dernier continue de s'étendre en fonction de l'afflux de cytoplasme, mais l'expansion s'arrête lorsque le

cytosquelette d'actine se réassemble sous la membrane plasmique. Par la suite, le bleb se rétracte en raison de la force contractile générée par l'actomyosine (Figure 15). Dans les cellules en mouvement multidirectionnel, plusieurs blebs sont formés et répètent le cycle d'expansion et de rétraction, alors que dans les cellules en mouvement unidirectionnel, un seul bleb est formé en avant de la direction du mouvement⁸²⁻⁸⁵. Ce mode de migration a été montré récemment dans les LTs⁸⁶.



2.4.3. Uropode

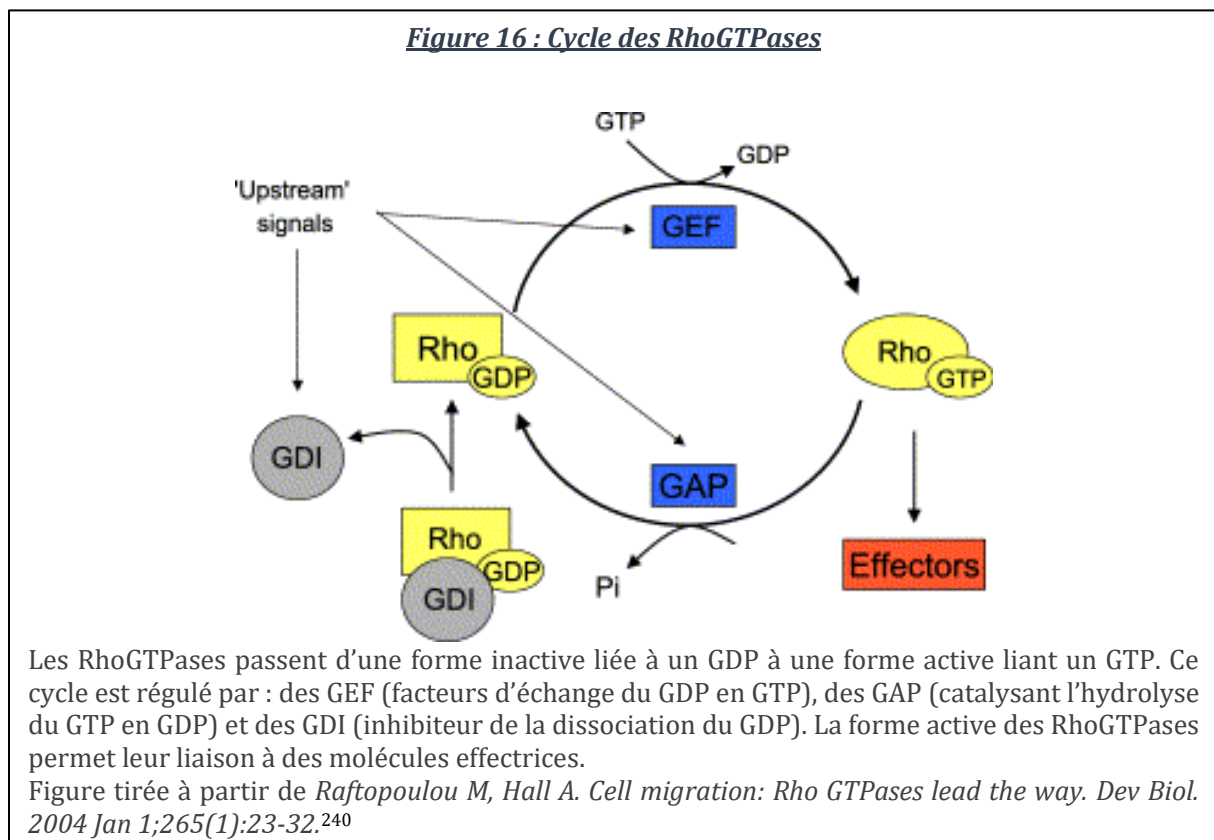
L'uropode est une structure située à l'arrière de cellule migrant de manière amiboïde. Il est composé de filaments d'actine parallèle orientés dans le sens de migration. En face de l'uropode se situe le centrosome ou MTOC, le réticulum endoplasmique ainsi que l'appareil de Golgi et les mitochondries. Cette zone est caractérisée par des propriétés contractiles conférées par la myosine de type II. Pour que les forces contractiles produites dans le cortex par la myosine puissent être communiquées à la membrane plasmique, il faut que le cortex d'actine soit lié à cette membrane. De nombreuses protéines ont été impliquées dans cette liaison, parmi lesquelles on trouve principalement les ERM (ezrine, radixine, moesine)⁸⁷(Figure 13). La contraction de l'uropode est un processus clé de la migration des LTs. C'est un site de détachement des molécules d'adhésion, les intégrines⁸⁸.

Cette contractilité au niveau de l'uropode favorise son détachement du substrat mais génère également une vague de contractilité qui produit une force de traction permettant l'avancée de la cellule en cours de migration⁸⁹.

2.4.4. Contrôle du cytosquelette par les RhoGTPases au cours de la migration

Les Rho GTPases sont des protéines impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que le développement des organelles, la dynamique du cytosquelette et la migration cellulaire. Nous allons ici nous concentrer sur les rôles de ces protéines au cours la polarisation et de la migration cellulaire⁹⁰.

Ces protéines agissent comme des interrupteurs moléculaires pour le contrôle des voies de signalisation en passant d'une forme inactive liée à un GDP, à une forme active liant un GTP. Sous leur forme GTP, ces protéines sont capables d'interagir avec des effecteurs en aval afin de déclencher diverses réponses intracellulaires.

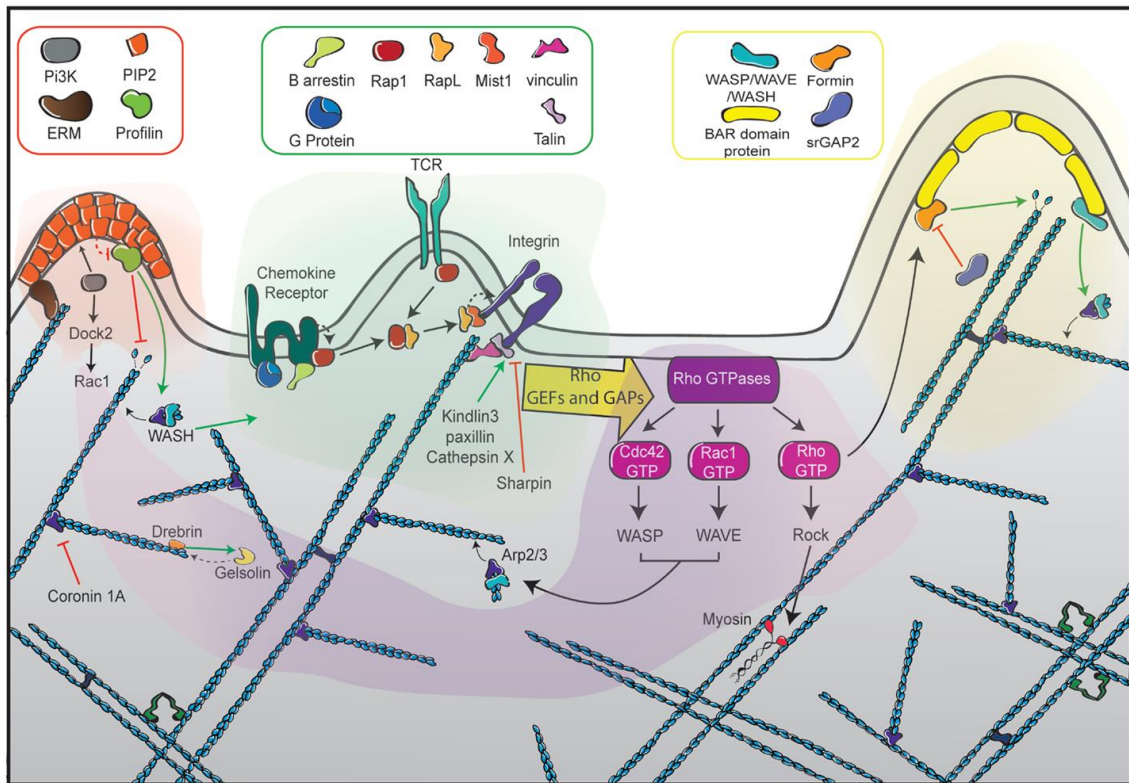


Le cycle d'activité des Rho GTPases est finement régulé par trois groupes de protéines (Figure 16) :

- Les facteurs d'échange du nucléotide guanine (GEFs, *guanine nucleotide exchange factors*) promouvant l'échange entre GDP et GTP dans le but d'activer la RhoGTPase.
- Les protéines d'activation de la GTPase (GAPs, *GTPase-activating proteins*) catalysant l'hydrolyse du GTP en GDP.
- Les inhibiteurs de la dissociation du GDP (GDIs, *guanine nucleotide dissociation inhibitors*) bloquant le cycle de la GTPase en séquestrant et en solubilisant la forme liée au GDP.

Les RhoGTPases les plus étudiées sont RhoA, Rac1 et Cdc42. Elles sont impliquées dans la migration cellulaire et la dynamique du cytosquelette (Figure 17).

Figure 17 : Différents niveaux de remodelage du cytosquelette d'actine dans les lymphocytes T en migration



Les récepteurs dominants dans le contrôle de la motilité des cellules T sont représentés au centre du schéma (vert). Ils comprennent les récepteurs aux chimiokines, le TCR et les intégrines telles que LFA-1, chacun étant interconnecté avec le cytosquelette d'actine par des molécules de signalisation. L'activation de ces récepteurs entraîne l'activation des RhoGTPases Rac, Rho et Cdc42 *via* des GEF et des GAP (violet). Cette activation est hautement contrôlée dans le temps et l'espace pour orchestrer l'assemblage de réseaux d'actine distincts. Rac et Cdc42 activent respectivement le complexe WAVE et WASP, entraînant une polymérisation de l'actine médiée par Arp2/3 au niveau du lamellipode pour former un réseau d'actine branchée.

En plus de son rôle majeur au niveau de l'uropode, RhoA joue un double rôle à l'avant en favorisant l'élongation des filaments d'actine *via* la formine mDia et en favorisant la rétraction de la membrane *via* l'activation de la myosine.

La partie gauche du schéma illustre le rôle des protéines ERM permettant l'ancrage du cytosquelette d'actine à la membrane plasmique (orange).

La partie droite du schéma illustre le rôle des protéines à domaine BAR comme liens moléculaires garantissant la coordination locale de la courbure de la membrane et de la polymérisation de l'actine (jaune).

Le réseau d'actine est représenté par des filaments bleus qui sont entrelacés avec les différentes zones de signalisation.

Figure tirée à partir de Dupré, L., Houmadi, R., Tang, C. & Rey-Barroso, J. T lymphocyte migration: An action movie starring the actin and associated actors. *Frontiers in Immunology* 6, (2015).173

2.4.4.1. Rac

Une cellule ne peut pas se déplacer sans la production de forces l'aidant à se déformer. Le principal moteur des lymphocytes est la polymérisation de l'actine. Dans le LT polarisé et en cours de migration, l'actine se polymérise à l'avant de la cellule. Le

principal acteur de la polymérisation de l'actine est Rac1. La conformation active de cette dernière induit un changement conformationnel de son effecteur WAVE qui à son tour active le complexe Arp2/3. Ce processus initie une phase de polymérisation d'actine permettant la formation d'un lamellipode. Une déplétion de Rac1 et/ou Rac2 induit une inhibition totale de la polymérisation d'actine après stimulation des récepteurs CXCR4 et CCR7. Dans ce cas, les LTs sont entravés dans leur migration⁹¹.

Les GEFs activant Rac1 sont aussi étudiées pour leur rôle dans la polymérisation de l'actine. Par exemple lorsque la GEF DOCK2 est déplétée⁹² ou que la forme inactive de la GEF Vav1 est surexprimée⁹³, Rac1 n'est plus capable de porter un GTP et par conséquent n'est pas capable d'induire la polymérisation de l'actine.

2.4.4.2. Cdc42

La stimulation des LTs induit une activation transitoire de Cdc42. Cet événement se produit principalement à l'avant des cellules T polarisées⁹⁴. Des données basées sur l'expression de dominant négatif de Cdc42 dans des CEM (lignée de LTs) suggèrent que cette Rho GTPase prévient la formation de protrusions au niveau de l'uropode et est par conséquent cruciale pour la directionnalité au cours de la migration⁹⁵. Cependant ces cellules ont toujours une polarisation bien définie avec des protéines de l'uropode telle que la moésine et un lamellipode riche en actine-F à l'avant. Cdc42 pourrait ne pas être requis pour la polarisation initiale des LTs mais serait plutôt impliquée dans le maintien de la polarité et l'amélioration de la persistance des lamellipodes. Une cible en aval de Cdc42 est WASP qui active la nucléation d'actine branchée *via* Arp2/3⁹⁶.

2.4.4.3. RhoA

La formine mDia1 a été décrite comme un effecteur de RhoA⁹⁷. mDia1 interagit directement avec RhoA-GTP (active) induisant ainsi la formation de protrusions riches en actine. L'absence de mDia influence négativement l'adhésion des LTs sur la fibronectine et bloque presque entièrement la migration des LTs en réponse à CXCL12 et CCL21⁹⁸. L'absence de mDia détériore également la polymérisation d'actine. Il a été observé que la déplétion de mDia induit une forte diminution de WASP⁹⁸.

RhoA active son effecteur principal ROCK (*Rho-activated kinase*). ROCK phosphoryle et inhibe les myosines phosphatases et phosphoryle directement les chaînes légères de myosine, levant ainsi l'inhibition de la myosine de type II et augmentant ainsi

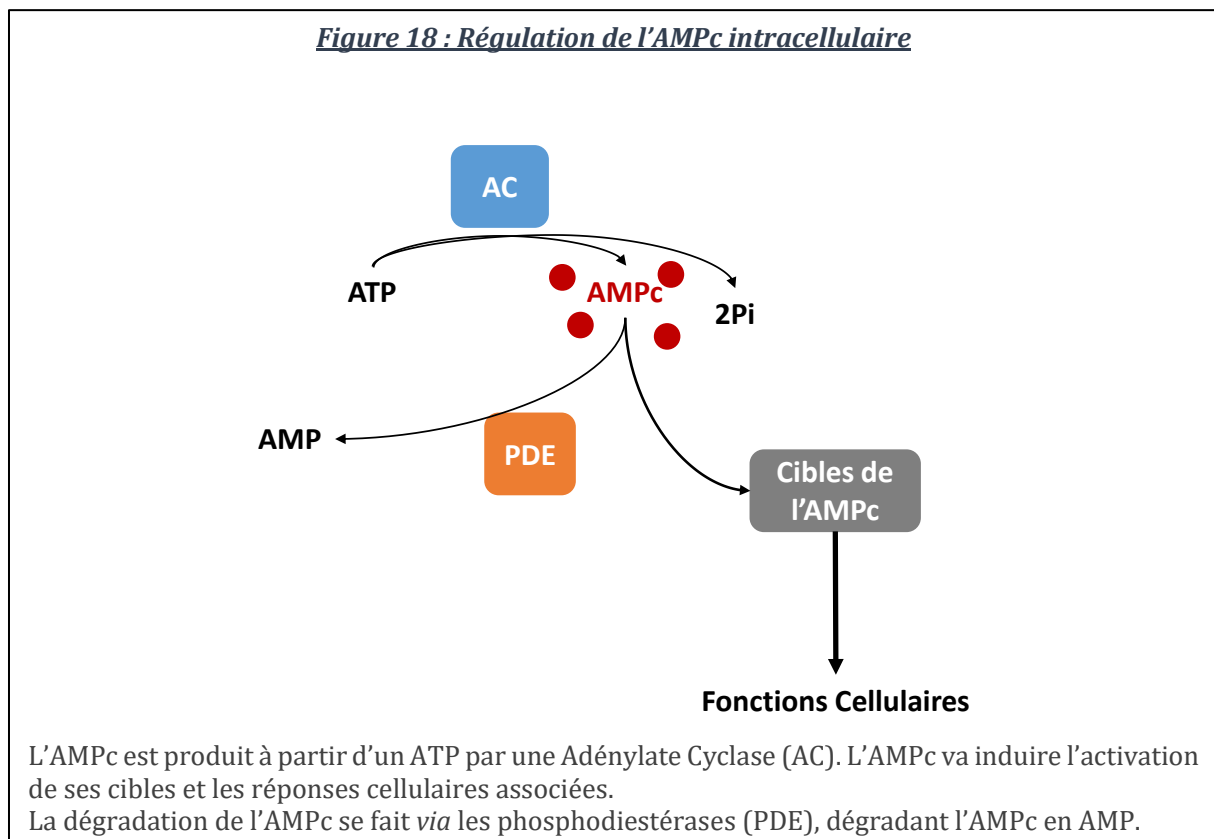
la contractilité⁹⁹. La phosphorylation de RhoA par la protéine kinase A (PKA) se fait sur la sérine 188 et empêche l'interaction entre RhoA et ROCK et augmente l'interaction entre RhoA et les GDI. En privilégiant cette interaction, RhoA n'est plus recrutée à la membrane plasmique et est maintenue dans le cytoplasme sous sa forme inactive^{100,101}.

La stimulation des LTs par CXCL12 induit une augmentation rapide de l'activité de RhoA et de ROCK et en parallèle une augmentation de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine II. Un haut niveau de RhoA actif est requis lors de la migration des LT au niveau de l'uropode pour sa contraction et rétraction nécessaire à une migration efficace. Des niveaux plus faibles de RhoA actif sont retrouvés à l'avant au niveau du lamellipode permettant une régulation de la formine mDia.

Les données de l'équipe ont par ailleurs mis en évidence qu'un des signaux importants pour la mobilité des LTs induite par les chimiokines implique entre autres une modulation du second messager : l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC). Dans cette dernière partie, nous aborderons la dynamique de régulation de cette molécule ainsi que la nature de ses cibles en aval. Nous nous attarderons sur l'une d'elles : la PKA et sur son implication dans les fonctions lymphocytaires, notamment la migration.

3. Le second messenger : l'AMPc

L'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) est un second messenger. C'est une molécule permettant la transduction d'un signal provenant de l'extérieur de la cellule. Ses trois principaux effecteurs sont la protéine kinase A (PKA), EPAC (*Exchange Protein directly Activated by cAMP*) et certains canaux ioniques. Le niveau intracellulaire d'AMPc est finement régulé par l'activité de deux enzymes : les adénylates cyclases (ACs) et les phosphodiésterases (PDEs) (Figure 18).



Après une brève description de la régulation de l'AMPc intracellulaire, nous nous pencherons sur ses cibles en particulier sur la PKA. Nous verrons l'implication de cette kinase dans la régulation du cytosquelette. Enfin, nous explorerons la compartimentation subcellulaire de son activité, constituant un autre niveau de régulation, dans les LTs et son implication dans la migration.

3.1. Régulation de la concentration d'AMPc

3.1.1. Adénylates Cyclases

La synthèse de l'AMPc se fait par l'action d'une enzyme, l'adénylate cyclase (AC), qui transforme de l'ATP en AMPc¹⁰². La plupart des ACs sont activées en aval des récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) par l'interaction avec la sous-unité α_s de ces dernières. Il existe au moins 9 isoformes d'ACs transmembranaire (AC1 jusqu'à AC9). En plus de leurs capacités à répondre aux $G\alpha_s$ ou à la forskoline (une molécule végétale qui se lie au site catalytique des ACs, déclenchant ainsi une forte réponse enzymatique), l'activité des différentes ACs peut être modulée par d'autres signaux venant de sources variées comme : $G\alpha_i$ (inhibant l'activité des ACs), $G\beta\gamma$, certaines protéines kinases (PKA, PKC et calmoduline), phosphatases (calcineurine) ou encore le calcium (Figure 19).

Figure 19 : Propriétés de régulation des adénylates cyclases des mammifères

TABLE 1 Regulatory properties of mammalian adenylyl cyclases

AC isoform	Response to cAMP signaling pathway component ^a					
	$G\alpha_s$	$G\alpha_i$	$G\beta\gamma$	FSK	Calcium	Protein kinases
AC1	↑	↓ (CaM- or FSK-stimulated activities)	↓	↑	↑ (CaM) ↓ (CaM kinase IV)	↑ PKC (weak) ↓ (CaM kinase IV)
AC2	↑	→	↑ (when stimulated by $G\alpha_s$)	↑		↑ (PKC)
AC3	↑	↓		↑	↑ (CaM) (in vitro) ↓ (CaM kinase II)	↑ (PKC) (weak) ↓ (CaM kinase II)
AC4	↑		↑	↑		↑ (PKC)
AC5	↑	↓	↓ ($\beta 1\gamma 2$)	↑	↓ (<1 μ M)	↓ (PKA) ↑ (PKC α/ζ)
AC6	↑	↓	↓ ($\beta 1\gamma 2$)	↑	↓ (<1 μ M)	↓ (PKA, PKC)
AC7	↑		↑	↑		↑ (PKC)
AC8	↑	↓ (Ca ²⁺ rises)		↑	↑ (CaM)	→ (PKC)
AC9	↑	↓		↑ (weak)	↓ (calcineurin)	
sAC	→	→		→		

^a↑, positive regulatory response; ↓, negative regulatory response; →, neutral response.

Figure tirée de Hanoune J, Defer N. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:145-74s¹⁸⁰

Dans les LTs murins, l'AC7 est majoritairement exprimée avec, en proportion moindre, les ACs 3, 6 et 9. L'AC7 peut être activée par les $G\alpha_s$, la PKC ou encore $G\beta\gamma$ ¹⁰³. De

plus, elle est insensible à l'inhibition par les $G\alpha_i$. L'AC9 est activée par G α_s et une étude montre qu'une diminution d'expression de cette cyclase conduit à une diminution de la migration par chimiotaxie (migration selon un gradient croissant d'une substance attractante) des neutrophiles¹⁰⁴.

Il existe également des ACs solubles ou AC10 activées par des variations de concentration en bicarbonates ou en calcium intracellulaire ce qui en fait des senseurs métaboliques¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Ces ACs ne répondent pas à la forskoline. Elles sont retrouvées dans les mitochondries, le noyau, les centrioles ou encore au niveau du fuseau mitotique. Elles peuvent être incorporées dans un microdomaine avec la PKA grâce à des protéines d'échafaudage : les *A-kinase anchoring proteins* (AKAPs) dont nous discuterons plus tard dans ce chapitre. Ces cyclases solubles ont un rôle dans la motilité des spermatozoïdes¹⁰⁵.

3.1.2. Phosphodiésterases

Les phosphodiésterases (PDEs) constituent une famille d'enzymes composée de 11 sous-types comprenant au total plus de 100 isoformes. Ces protéines sont impliquées dans la régulation de la concentration en AMPc intracellulaire en hydrolysant ce dernier pour former du 5'AMP. Les LTs sont capables d'exprimer les PDEs : 1, 2, 3, 4, 5, 7 et 8. La distribution est similaire dans les CD4⁺ ou les CD8⁺¹⁰⁸. L'implication des PDEs dans la fonction des LTs sera abordée dans la partie 3.2.3.3.

3.2. Cibles de l'AMPc

3.2.1. EPAC

Les signaux de l'AMPc peuvent être transmis via EPAC (*Exchange protein activated by cAMP*) servant de GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) pour les GTPases Rap1 et Rap2¹⁰⁹. Des deux isoformes de EPAC existantes, EPAC1 est l'isoforme majoritairement présente dans les cellules du système immunitaire¹¹⁰. Cette protéine existe sous une conformation auto-inhibée qui est abandonnée après la liaison d'AMPc, exposant ainsi son site catalytique.

Rap1 est la cible principale de EPAC1, qui l'active en remplaçant le GDP en GTP au niveau de son site catalytique. L'affinité de EPAC1 pour l'AMPc est inférieure à celle de la PKA, impliquant des concentrations plus importantes d'AMPc pour que EPAC1 soit activée¹¹¹.

Rap1 est capable d'induire un changement conformationnel de LFA-1 permettant ainsi une augmentation de son affinité pour ICAM-1. Les chimiokines CXCL12 et CCL21 permettent une activation rapide de Rap1 qui active à son tour LFA-1 des LTs des ganglions lymphatiques de souris¹¹².

3.2.2. Canaux couplés aux nucléotides cycliques

Les canaux couplés aux nucléotides cycliques (CNG) sont des canaux cationiques non sélectifs pour des cations comme Na⁺, K⁺, Ca²⁺ et Mg²⁺. Chez les mammifères, il a été retrouvé 6 sous-unités : 4 membres de type A (CGNA1-4) et 2 membres de type B (CGNB1 et 3). Les canaux se forment par assemblage de 4 sous-unités constituées de 3 sous-unités de type A et 1 de type B. Chaque sous-unité est constitué de 6 hélices- α transmembranaires et est capable de lier un nucléotide cyclique comme l'AMPc au niveau de l'extrémité C-terminale cytosolique de la protéine^{113,114}. Cette liaison induit un changement conformationnelle des sous-unités du canal conduisant à son ouverture permettant l'entrée de cations dans la cellule. Ils sont impliqués dans la transduction sensorielle au niveau des cellules impliquées dans la vision et l'olfaction¹¹⁵. Ils n'ont cependant pas été décrits dans les cellules du système immunitaire.

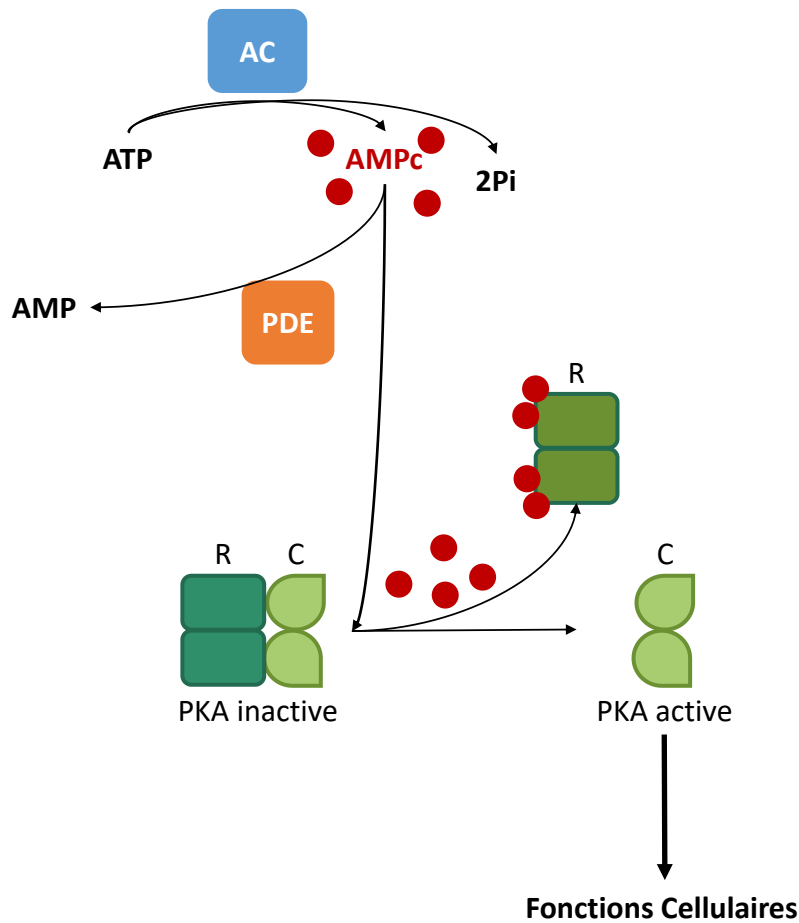
3.2.3. Protéine kinase A

La PKA est une sérine-thréonine kinase qui a des très nombreux substrats présentant le motif Arginine-Arginine-Sérine/Thréonine-Sérine. Cette kinase régule de nombreux processus cellulaires. C'est une enzyme hétéro-tétramérique composée de deux sous-unités régulatrices (R) et de deux sous-unités catalytiques (C). Il existe 4 sous-unités R : RI α , RI β , RII α et RII β codées par 4 gènes différents (respectivement *PRKAR1A*, *PRKAR1B*, *PRKAR2A* et *PRKAR2B*) et trois versions de sous-unités C : α , β et γ codées par trois gènes différents (respectivement *PRKACA*, *PRKACB* et *PRKACC*)¹¹⁶. Grâce à la base de données Human Protein Atlas, on sait que les sous-unités catalytiques α et β sont exprimées dans la plupart des tissus et que la sous-unité γ est exprimée principalement dans les tissus du système reproductif masculin. Quant aux sous-unités régulatrices, elles semblent être exprimées dans tous les tissus.

Il existe deux types de PKA, définies par leurs sous-unités régulatrices : PKA de type I contenant RI α , RI β et PKA de type II contenant RII α , RII β . Ces sous-unités régulatrices ont 4 grandes fonctions :

- Elles permettent le maintien de la forme inactive de la PKA, par insertion d'un pseudo-substrat correspondant à une séquence consensus proche du domaine catalytique.
- Après liaison de deux AMPc (un par sous-unités R), leur changement conformationnel induit une libération des sous-unités C, permettant ainsi leur activation. Elles sont donc responsables de la traduction des niveaux d'AMPc intracellulaire en activité kinase par la PKA (Figure 20).
- L'extrémité N-terminale de chaque sous-unité R sert de médiateur à la dimérisation, permettant l'assemblage de l'enzyme et est importante pour la liaison à l'AMPc.
- L'extrémité N-terminale permet également l'interaction avec les protéines d'ancrage de la PKA (*A-kinase anchoring protein*, AKAP), impliquées, comme nous le verrons, dans la compartimentation de l'activité de la PKA.

Figure 20 : Régulation de l'activité de la PKA



La liaison de deux AMPc sur chaque sous-unité régulatrice de la PKA induit un changement de conformation et permet la libération et l'activation des sous-unités catalytiques.

3.2.3.1. Régulation du cytosquelette d'actine par la PKA

Il existe plusieurs centaines de cibles de la PKA^{117,118} (<https://www.phosphosite.org/>). Ces cibles sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires. Notamment lors de la formation de la synapse immunologique, la PKA est requise pour la phosphorylation de la dynéine nécessaire pour la relocalisation du centrosome au niveau de la synapse¹¹⁹⁻¹²¹. Dans la prochaine partie, nous nous concentrerons sur l'implication de la PKA dans la régulation des cytosquelettes d'actine et de myosine.

3.2.3.1.1. Régulation du cytosquelette d'actine par la PKA

- **Monomère d'actine**

La PKA est capable de phosphoryler les monomères d'actine. Cette modification impacte leur capacité à se polymériser. Cette observation a été faite *in vitro* et n'a pas été extrapolée à la polymérisation *in vivo*¹²².

- **Profiline**

La profiline, protéine impliquée dans la régulation de la polymérisation de l'actine, peut être régulée par phosphorylation par la PKA sur différents sites.

L'interaction entre la profiline 1 et VASP promeut la polymérisation d'actine. Une première publication montre que la phosphorylation de la sérine 137 de la profiline 1 annule l'interaction entre cette dernière et VASP et par conséquent la polymérisation d'actine¹²³. Ceci a été montré dans une lignée de cellules épithéliales du rein (HEK293). Une seconde publication montre un autre site de phosphorylation de la profiline 1 par la PKA au niveau de la sérine 71¹²⁴. Cet acide aminé est situé dans le domaine d'interaction avec l'actine monomérique. La phosphorylation sur cette sérine empêche l'interaction entre la profiline et l'actine, inhibant ainsi la polymérisation d'actine. Cette observation a été faite dans une lignée de cellules épithéliales isolées à partir d'un adénocarcinome du sein (MDA-MB-231).

Dans ces deux cas rapportés de phosphorylation de la profiline par PKA, on remarque que cette modification est délétère pour la polymérisation d'actine.

- **Facteurs impliqués dans la nucléation et l'élongation des filaments d'actine**

Les facteurs impliqués dans la nucléation et l'élongation peuvent également être régulés par phosphorylation par la PKA¹¹⁶. C'est ce que nous allons détailler ci-dessous.

Ena/VASP :

La phosphorylation de la Ser-157 inhibe l'interaction entre VASP et les protéines possédant un domaine SH3 (Abl) et la profiline¹²³. Cette modification diminue la capacité de VASP à permettre la liaison et la nucléation de filaments d'actine¹²⁵.

RhoGTPases :

Rac est capable de lier directement les sous-unités régulatrices de type II de la PKA et possède donc les caractéristiques d'une AKAP. Cette interaction est dynamique et dépend de proportion de Rac liée au GTP, la liaison de Rac à ses effecteurs et des variations d'AMPc. L'interaction entre Rac-GTP et PKA RII stabilise la conformation inactive de la PKA. La compartimentation de la PKA grâce à Rac permet l'activation des effecteurs en aval de la signalisation Rac-GTP impliqués dans la division, la croissance et la prolifération cellulaire^{126,127}.

L'activation de **Cdc42** est promue par l'activation de la PKA dans les mastocytes¹²⁸ et les neurones¹²⁹. Les conditions de cette activation ne sont pas encore éclaircies car Cdc42 n'est pas directement phosphorylée par la PKA.

3.2.3.1.2. Régulation de la myosine

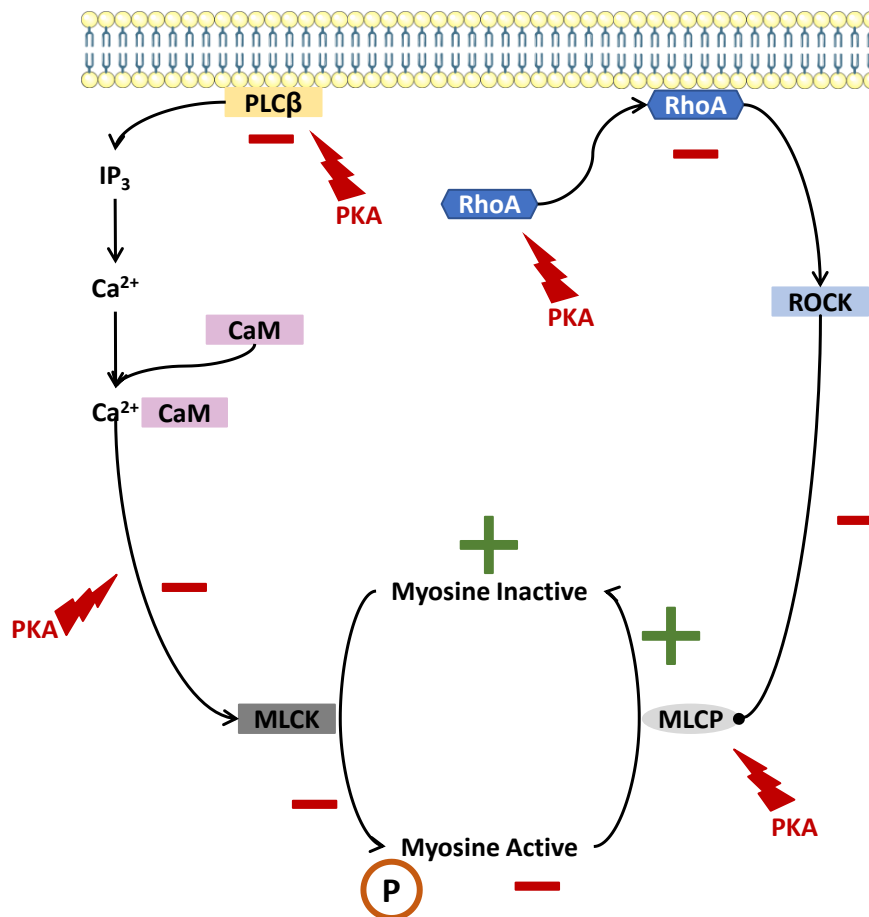
La contractilité de la myosine est importante pour la migration des cellules, notamment pour la rétraction de l'uropode. Il existe plusieurs niveaux de régulation de la myosine par phosphorylation par la PKA (Figure 21).

L'interaction entre la MLC (*myosin light chain*) et l'actine est régulée positivement par sa phosphorylation. La phosphorylation de la MLC est régulée par la MLCK (MLC kinase) et la MLCP (MLC phosphatase). MLCK se lie et est activée par le complexe calmoduline-calcium. La PKA phosphoryle la PLC β (phospholipase C- β) et les récepteurs pour l'inositol triphosphate (IP3), inhibant ainsi le relargage de calcium. En empêchant cette réponse calcique, la PKA est capable de moduler la formation du complexe calmoduline-calcium et donc l'activité de la MLCK. De plus, l'interaction entre la calmoduline et la MLCK peut être également régulée négativement par phosphorylation par la PKA de la MLCK au niveau du site d'interaction entre les deux protéines¹³⁰. De l'autre côté de l'équilibre, nous avons la MLCP qui peut être activée par la PKA de manière directe par phosphorylation de MLCP¹³¹, et de manière indirecte par phosphorylation et inhibition de la kinase dépendante de Rho, ROCK, dont le rôle est d'inhiber MLCP. L'inhibition de ROCK se fait ici par phosphorylation de RhoA par la PKA.

Par conséquent, les différentes cibles de la PKA dans la régulation de la contractilité de la myosine conduisent toutes à une diminution de la phosphorylation et donc de l'activité contractile de la myosine.

Ainsi, l'activité de la PKA est nécessaire dans de nombreux processus cellulaires tels que la régulation de la dynamique de l'actine ou encore la contractilité de la myosine. Ces régulations peuvent nécessiter une activité locale de la PKA. Cette compartimentation est permise par des protéines d'ancrage de la PKA : les AKAPs. Elles seront le sujet de la prochaine partie.

Figure 21 : Régulation de l'activité de la myosine par la PKA



L'activité de la myosine est régulée principalement par deux enzymes :

MLCK phosphoryle la MLC et permet l'activation de la myosine.

MLCP déphosphoryle la MLC, et par conséquent inhibe l'activité de la myosine

PLCβ permet le relargage de Ca²⁺ via l'IP₃, et le calcium forme alors un complexe avec la calmoduline (CaM). Ce complexe permet l'activation de MLCK. De l'autre côté, la Rho GTPase RhoA est recrutée à la membrane ce qui permet son activation et se traduit par la stimulation de la kinase ROCK. ROCK peut phosphoryler directement la myosine. En outre, la phosphorylation de MLCP par ROCK inhibe l'activité de la phosphatase en faveur de l'activité contractile de la myosine.

La PKA intervient à plusieurs niveaux de cette signalisation :

- Phosphorylation de PLCβ, inhibant le relargage de Ca²⁺ et par conséquent, l'interaction activatrice entre le complexe Ca²⁺-CaM et MLCK.
- Phosphorylation de MLCP induisant son activation.
- Phosphorylation de RhoA, empêchant ainsi son action activatrice sur ROCK à la membrane plasmique.

Les différentes cibles de la PKA dans la régulation de la contractilité de la myosine ont donc toutes pour but final de diminuer la phosphorylation et donc l'activité contractile de la myosine.

3.2.3.2. Compartimentation de l'activité de la PKA

Les *A-kinase anchoring proteins* (AKAPs) sont une famille de protéines exprimées de façon ubiquitaire. Jusqu'à présent, 41 AKAPs codées par 41 gènes ont été validées expérimentalement dans des cellules et des tissus humaines¹³². Différentes AKAPs ont été décrites dans les LTs : Ezrine, AKAP79, D-AKAP1, AKAP450, MTG8, MTG16b, AKAP95 et AKAP220 et au moins huit AKAPs ont été détectées par spectrométrie de masse dans les LTs de souris, de poids moléculaires apparents : 60, 75, 95, 120, 165, 190, 245 et 275 kDa.

Les AKAPs sont différentes entre elles par leurs séquences en acides aminés, leur structure, leur localisation au sein de la cellule et leurs interactions protéiques. Leur point commun est qu'elles interagissent avec la partie régulatrice de la PKA avec une préférence pour la PKA de type I et/ou de type II.

Les AKAPs permettent ainsi l'organisation subcellulaire de l'activité de la PKA. Chaque AKAPs possède au moins deux motifs fonctionnels (Figure 22A). Le motif de liaison à la PKA, une hélice amphipatique de 14 à 18 résidus, interagit avec des éléments hydrophobes localisés au niveau du domaine N-terminal des sous-unités régulatrices de la PKA. En plus de ce motif de liaison à la PKA, chaque AKAP possède un motif permettant de cibler la localisation du complexe AKAP-PKA dans un compartiment subcellulaire. Les AKAPs possèdent également des sites de fixation pour d'autres molécules de signalisation, permettant l'assemblage de complexes de signalisation distinct¹³³⁻¹³⁵.

Dans les lymphocytes T, les AKAPs détectées sont : ezrine, AKAP79, D-AKAP1, AKAP450, MTG8, MTG16b, AKAP95 and AKAP220¹³⁶ (Figure 22B).

Ezrine (ou AKAP78) :

Cette AKAP permet l'ancrage des PKA de type I dans les radeaux lipidiques. L'ezrine place la PKA de type I à proximité de son substrat proche du TCR, Csk (C-terminal Src kinase) jouant ainsi un rôle dans la régulation de l'activation du TCR¹³⁷. La PKA active Csk induisant la phosphorylation et l'inhibition de Lck, diminuant ainsi la signalisation TCR¹³⁸.

AKAP5 (ou AKAP79, AKAP150, AKAP75) :

L'AKAP5 se lie aux PKA de type II, la protéine kinase C (PKC) et la protéine phosphatase 2B/calcineurine. La phosphatase calcineurine régule positivement NFAT, un facteur de transcription dont le rôle est essentiel lors de l'activation des LTs. Après activation des LTs, l'association de cette AKAP liée à la calcineurine à la membrane plasmique des LTs inhibe cette dernière, et par conséquent NFAT^{139,140}.

D-AKAP1 (ou AKAP149, S-AKAP84, AKAP121):

Cette AKAP se lie aux PKA de type I et II permettant leur localisation au niveau de la membrane des mitochondries ou du réticulum endoplasmique¹⁴¹. Même si cette AKAP est exprimée dans les LTs, son rôle fonctionnel dans l'activation et la régulation des LTs n'est pas établi¹⁴².

Myeloid Translocation Gene Family (MTG):

Deux membres de la famille des MTG ont été définis comme étant des AKAPs présents dans les LTs : MTG8 et MTG16b. MTG8 est identifié comme un suppresseur de transcription¹⁴³. MTG16b est une protéine identifiée chez des patients atteints d'une leucémie aigüe mais sa fonction n'a pas été établie¹⁴⁴. Ces deux AKAPs interagissent avec la PKA de type II avec des localisations subcellulaires différentes : l'appareil de Golgi pour MTG16b et la zone Golgi/centrosome pour MTG8. Cependant, le rôle physiologique de ces AKAPs dans les LTs n'a pas été rapporté.

AKAP95 (ou AKAP8) :

L'AKAP95 lie les PKA de type α II et possède également un site de liaison à l'ADN. L'interaction entre la PKA et l'AKAP95 dépend du cycle cellulaire. Elle a été détectée au cours de la mitose lors du désassemblage de l'enveloppe nucléaire^{145,146}. Ce complexe a un rôle dans la condensation de l'ADN^{147,148}. La présence de cette AKAP a été rapportée dans les LTs mais aucun rôle fonctionnel n'a encore été décrit à ce jour¹⁴⁴.

AKAP220 :

Cette protéine d'ancrage se lie aux PKA de type I et à la protéine phosphatase I^{149,150}. Elle est retrouvée au niveau des péroxysomes, de vésicules et du centrosome. Dans la lignée

de lymphocytes T Jurkat mais pas dans les LTs primaires, il a été montré qu'elle interagissait également avec les PKA de type II¹⁵¹.

AKAP450 (ou CG-NAP, AKAP350, AKAP9):

L'AKAP450 est une protéine d'échafaudage retrouvée au niveau du centrosome et impliquée dans de nombreuses fonctions des LTs, telles que la formation de la synapse immunologique et la migration¹⁵². Cette AKAP est capable d'interagir avec de nombreuses protéines en plus de la PKA : d'autres kinases (PKC et PKN), des phosphatases (PP1, PP2A), la phosphodiesterase PDE4D, la calmoduline, la dynéine et la péricentrine. Ces interactions permettent de créer autour de cette AKAP, un microdomaine de signalisation PKA concentrant, outre cette kinase, une protéine régulatrice de l'AMPc, PDE4D, et des substrats de la PKA que sont la dynéine et la péricentrine.

3.2.3.3. Compartimentation du signal AMPc/PKA et activation des lymphocytes T

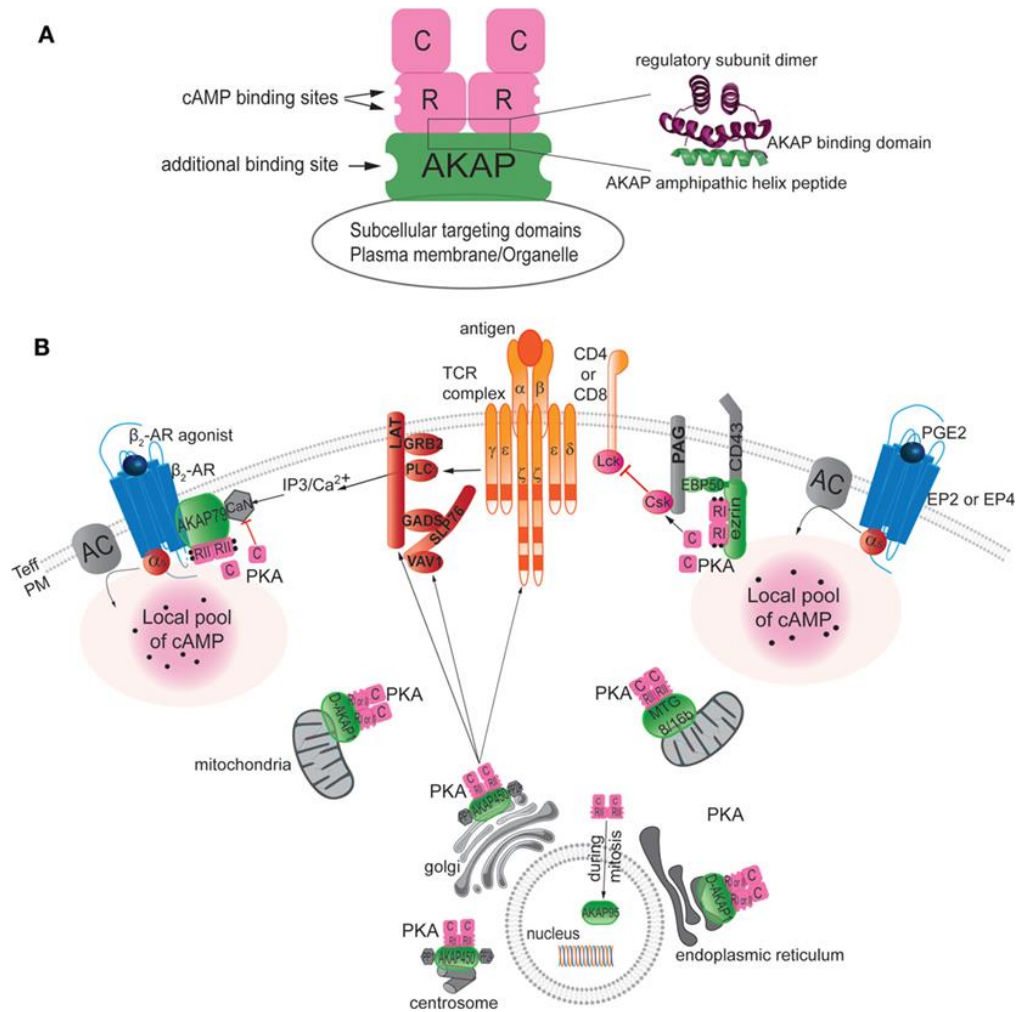
Ayant analysé les différentes cibles de l'AMPc et de la PKA, nous allons maintenant aborder les conséquences de ces événements dans les LTs. Une augmentation soutenue de l'AMPc et de l'activation de la PKA sont associées à une inhibition de l'activation et la migration des LTs¹³⁶. Parmi les substrats de la PKA au niveau de la SI figure Csk, une kinase impliquée dans l'inhibition de l'activation des LTs. Csk phosphoryle la protéine kinase Lck et inhibe ainsi la signalisation *via* le TCR. Csk est localisée à proximité de la membrane grâce à son interaction avec PAG (*Phosphoprotein Associated with Glycosphingolipid-enriched microdomain*). Cette interaction est perdue après activation du LTs. Cela implique un contrôle spatio-temporel de la PKA. Les AKAPs jouent en effet un rôle dans la régulation médiée par la PKA, puisqu'elles sont responsables de la proximité de la PKA avec des substrats spécifiques. Dans les LTs, une AKAP est impliquée dans la régulation de la dynamique de la PKA pendant la formation de la synapse immunologique, l'eitrine¹⁵³. Elle se localise au niveau du dSMAC¹⁵⁴ et recrute la PKA de type I dans les radeaux lipidiques contribuant à l'activation de Csk¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. Au bout de 10min, la PKA de type I est relocalisée au niveau du *Distal Pole Complex* (DPC), une plateforme séquestrant

des protéines inhibitrices de l'activation des LTs à l'opposé de la synapse^{158,159}. La PKA reste ainsi piégée dans le DPC jusqu'à 30min après l'activation, après quoi elle colocalise partiellement avec le TCR au niveau de la synapse, pour finalement à l'état de repos après 60min¹⁵⁹.

D'autre part, l'AMPC peut être compartimenté par une localisation subcellulaire des ACs participant à sa régulation. A cet égard, les PDE de la famille PDE4 sont localisées au niveau des radeaux lipidiques (microdomaine de la membrane plasmique). L'activation du TCR induit une augmentation d'AMPC au niveau des radeaux lipidiques et une activation de la PKA inhibant le signal TCR. Cependant, l'engagement du récepteur de co-stimulation CD28 induit le recrutement de PDE4 au niveau des radeaux lipidiques provoquant une diminution locale de la concentration en AMPC. Donc les activations locales de la production d'AMPC, de la PKA et de la PDE4 régulent, comme nous l'avons vu, *via* la kinase Csk, le signal en aval du TCR nécessaire à l'activation des LTs et à l'initiation des fonctions effectrices¹⁶⁰. Il est intéressant de noter que la PDE4B2 s'accumule au niveau de l'IS dans les cellules Jurkat, suivie d'une redistribution vers le DPC ultérieurement¹⁶¹.

L'isoforme PDE7, principalement PDE7A dans les LTs, est importante pour l'activation complète des LTs. L'utilisation d'inhibiteur de cette PDE démontre son rôle dans certaines fonctions telle que la prolifération et l'inflammation médiée par les LTs¹⁶⁰. L'isoforme PDE8 semble avoir un rôle dans la régulation de l'adhésion et de la migration des LTs. L'inhibition de PDE8 par la molécule dipyridamole inhibe la migration des LTs naïfs en réponse à la chimiokine CXCL12^{162,163}.

Figure 22 : Localisation des AKAPs dans les LTs.

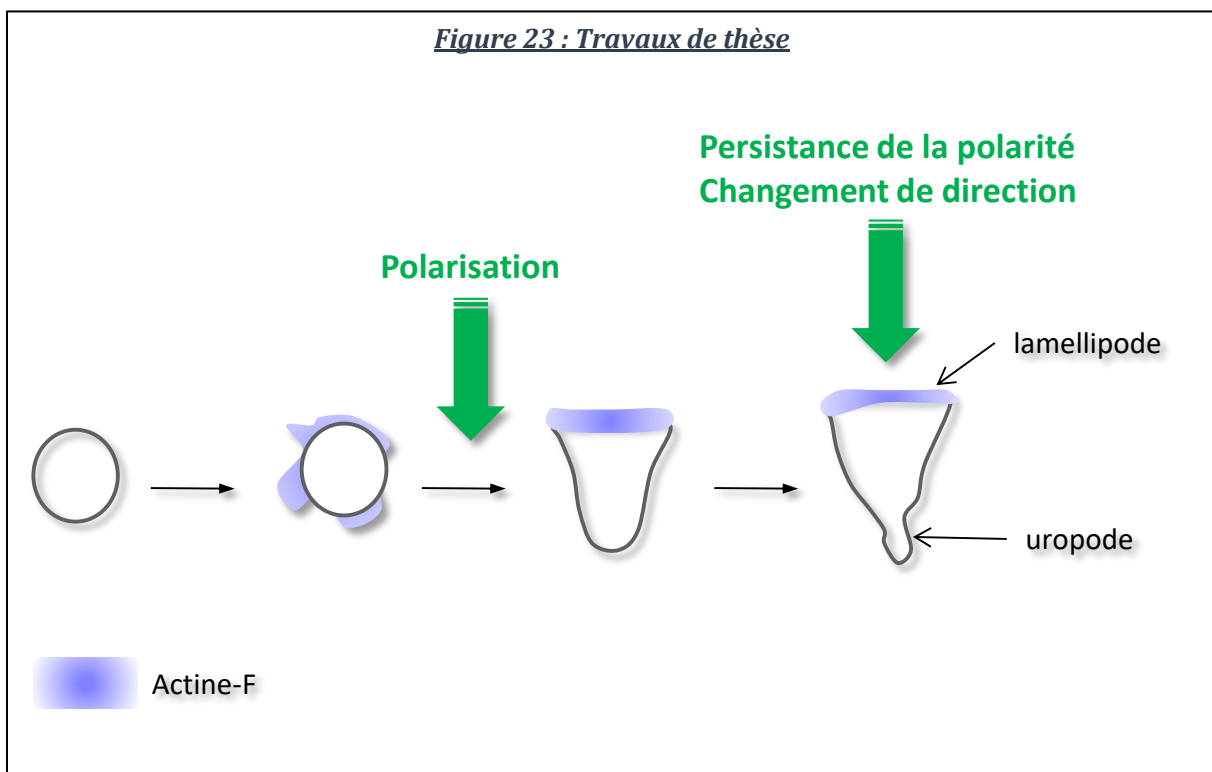


A- Schéma d'une AKAP ancrant la PKA par interaction hydrophobe entre la région hélicoïdale amphipatique de l'AKAP et la région de dimérisation N-terminale des deux sous-unités R de la PKA. (gauche). Représentation de la structure de la sous-unité régulatrice (rose) en complexe avec l'AKAP (vert) (droite).

B- Les AKAPs ciblent la PKA vers des compartiments spécifiques des LTs, notamment la membrane plasmique, les mitochondries, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, le noyau et le centrosome. La même AKAP peut se trouver dans différents compartiments (D-AKAP-1 ou AKAP450). Les AKAPs se lient à des partenaires spécifiques et par conséquent définissent des complexes supramoléculaires à des emplacements subcellulaires particuliers.

Figure tirée de Wehbi, V. L. & Taskén, K. *Molecular mechanisms for cAMP-mediated immunoregulation in T cells - role of anchored protein kinase a signaling units.* *Frontiers in Immunology* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00222> (2016).¹³⁶

Comme nous l'avons vu, en réponse aux chimiokines, les LT présentent de rapides changements morphologiques conduisant à leur polarisation puis à leur migration. Des travaux réalisés dans l'équipe avant mon arrivée suggéraient que la voie de l'AMPC était impliquée dans ces processus. Ainsi, mes travaux de thèse ont porté sur l'étude de l'implication de la voie de l'AMPC/PKA dans l'établissement de l'axe de polarité et sa régulation au cours de la migration des LTs en réponse aux chimiokines (Figure 23). Grâce à des approches d'imagerie en temps réel et à l'utilisation de biosenseurs, nous avons pu aborder ces questions de façon dynamique. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux événements dans les minutes suivant la stimulation chimiokinique et conduisant à la polarisation des LTs. Enfin, nous nous sommes concentrés sur la régulation de cet axe de polarité lors de la migration et des changements de direction des LTs.



Résultats

Mon projet de thèse a porté sur l'implication de la voie de l'AMPc dans la polarisation et la migration des LT en réponse aux chimiokines. Abordé initialement comme un tout, nous avons fait le choix, à la suite des problèmes sanitaires, de laisser de côté les résultats associés au contrôle de la polarisation et de nous concentrer sur la partie concernant la migration afin de pouvoir assurer un article dans les 3 ans impartis. Ces travaux ont permis une publication en 2021 qui sera présentée dans la partie 2 de cette section. Le financement de 4^{ème} année obtenu auprès du LABEX Who Am I, m'a donné l'opportunité de compléter mes résultats concernant l'implication de l'AMPc dans la mise en place de la polarisation. Bien que nécessitant encore des expériences, ces données devraient permettre de soumettre dans les mois à venir un article. J'ai donc choisi de le présenter sous cette forme. Pour des questions de chronologie cellulaire, les données de polarisation seront présentées dans une première partie, avant le papier concernant la migration. Enfin, dans une dernière partie, je présenterai brièvement quelques résultats obtenus en collaboration avec Pablo J. Saez (Equipe de M. Piel, Institut Curie). Ces données complètent les résultats concernant la migration induite par les chimiokines mais restent trop peu étoffés pour constituer un article.

1. ETABLISSEMENT DE L'AXE DE POLARISATION DES LYMPHOCYTES EN REPONSES AUX CHIMIOKINES

1.1. Introduction

La migration des lymphocytes T (LTs) est un prérequis pour une immuno-surveillance efficace¹⁶⁴. Pour qu'une cellule migre, la première condition est l'acquisition d'une morphologie polarisée. En réponse à une stimulation par des chimiokines, les LTs initient leur polarisation se traduisant par une augmentation de la polymérisation d'actine et l'acquisition de structures permettant la directionnalité du mouvement : un lamellipode riche en actine branchée à l'avant et un uropode impliqué dans la génération de force contractile propulsant la cellule vers l'avant, localisé à l'arrière^{26,165}.

Le rôle de l'AMPc et de la protéine kinase A (PKA, principale cible cellulaire de l'AMPc) au cours de la migration cellulaire est difficile à établir, il dépend du type cellulaire et du type de stimulation de la voie de l'AMPc. Dans les LTs, un effet négatif de l'AMPc dans la migration a été décrit. Il a en effet été montré que des agents induisant une augmentation importante et soutenue d'AMPc, telle que la forskoline, sont associés à un arrondissement des cellules et à une inhibition de la migration cellulaire¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. A l'inverse, il a été montré que des protéines d'échafaudages, les AKAPs, qui permettent une activation locale de la PKA, pourrait jouer un rôle important dans la migration des LTs. C'est notamment le cas de l'AKAP450, une AKAP de type II localisée au niveau du centrosome. Celle-ci est en effet indispensable pour la polarisation et la migration de ces cellules^{152,169}. Ces résultats suggèrent que le contrôle spatio-temporel et l'intensité du signal AMPc pourraient induire des effets opposés et doivent être pris en compte dans l'étude de son implication.

La polarisation cellulaire est définie comme la répartition asymétrique de protéines, organelles et composants du cytosquelette^{2,3}. Dans une cellule non-polarisée, il existe en réalité une asymétrie interne causée par la position du centrosome, une structure protéique impliquée dans la nucléation et la stabilisation des microtubules⁹. Au niveau de ce centrosome a été caractérisé un réseau d'actine^{78,170}. La déplétion de ce réseau semble nécessaire à l'assemblage de la synapse immunologique dans les LTs¹⁷¹.

Par l'utilisation de biosenseurs, nous avons étudié les événements de signalisation en aval de la stimulation par la chimiokine CXCL12. Nous avons caractérisé l'établissement de l'axe de polarisation et mis en évidence que celui-ci était conditionné par la position du centrosome. Enfin, notre étude a permis de montrer l'importance de la déplétion de l'actine centrosomale dans ce processus. Ces données principalement obtenues sur des populations de cellules par immunofluorescence, ont été complétées par des approches d'imagerie dynamique donnant ainsi à des informations cinétiques précises.

1.2. Matériels & Méthodes

- Culture cellulaire

Nous utilisons des CEM, lignée lymphoblastoïde humaine provenant du sang périphérique d'un individu atteint de leucémie lymphoblastique aiguë. Elles ont été cultivées dans un milieu complet : RPMI GlutaMax (SEROMED) supplémenté avec 10% SVF décomplémenté et de la pénicilline (50U.ml⁻¹), streptomycine (50U.ml⁻¹) et sodium pyruvate (1mM) provenant de Gibco.

- Réactifs

CXCL12 (SDF1- α humain recombinant) a été acheté auprès de Peprotech (300-28A) et VCAM-1 (protéine chimérique CD106 Fc) auprès de R&D Systems (862-VC-100).

▪ Anticorps

Les anticorps utilisés pour l'immunofluorescence sont : anti-péricentrine (Abcam, #28144 mouse, 1/1000 et #4448 rabbit, 1/2500), anti-Arp2 (Abcam, #47654, 1/200). L'actine est marquée avec de la phalloïdine (Life Technologies, #A12379, 1/500). Les anticorps secondaires utilisés sont des anti-lapin (Life Technologies, A10037, 1/500) et anti-souris (Life Technologies, A31573, 1/500) fabriqués dans l'âne respectivement A547 et A568.

▪ Inhibiteurs

Pour l'inhibition de l'activité de la PKA, les cellules ont été prétraitées avec 10 μ M de H89 pendant 30min à 37°C. Pour la délocalisation de la PKA des AKAP de type II, les cellules

ont été inhibées avec 10 μ M du peptide inhibiteur Ht31 ou le peptide contrôle Ht31-P pendant 30min à 37°C (don du Dr. G.Pidoux).

- **Transfection et constructions**

Les cellules ont été transfectées par nucléofection (Amaya Nucleofactor, Lonza) avec 5 μ g d'ADN pour 5×10^6 cellules en utilisant le programme C-016. Les cellules ont été utilisées le jour suivant la transfection.

La détection de l'actine-F a été réalisée par l'expression de la construction LifeAct-mCherry (don du Dr. A. Benmerah), la centrine est suivie grâce à la construction centrine-GFP (Dr A. Delouée). Pour les mesures de l'AMPc intracellulaire, les cellules ont été transfectées avec la version la plus sensible de TEpacVV¹⁷² (H187). TEpacVV est un don du Dr. K. Jalink (Netherlands Cancer Institute). Le suivi de l'activité de la PKA est permis grâce à l'expression de la construction ExRaiAKAR2 (Addgene, #161753).

- **Stimulation**

Pour les mesures de déformation, les CEM ont été déposées sur des lamelles tapissées de VCAM-1 (1 μ g/ml) et CXCL12 (1 μ g/ml) et gardées à 37°C pendant le temps indiqué. Ce type de stimulation permet que les cellules se polarisent bien dans le plan de la lamelle et donc de quantifier la déformation. Il ne permet par contre pas une cinétique précise des signaux induits après stimulation puisque le temps 0 correspond à l'ajout des cellules sur la lamelle. La stimulation des cellules peut donc être désynchronisée.

Pour des mesures précises de la cinétique des signaux de fluorescence, les cellules ont été déposées sur des lamelles tapissées de VCAM-1 (1 μ g/ml) puis, après 5min d'adhésion, CXCL12 (200ng/ml) a été ajouté dans le milieu, permettant ainsi une stimulation simultanée de toutes les cellules.

- **Immunofluorescence**

Après le temps indiqué de stimulation, les cellules ont été fixées avec de la paraformaldéhyde 4% pendant 20min à température ambiante. Les cellules sont ensuite perméabilisées pendant 20min avec du PBS-BSA- Saponine (1x/0,5%/ 0,1%). Incubation pendant 45min avec l'anticorps primaire, rinçage puis incubation 45min avec l'anticorps secondaire dans du PBS-BSA- Saponine (1x/0,5%/ 0,1%). Les images de microscopie ont été acquises avec un microscope à champ large, Nikon Eclipse TE2000-U et une caméra CMOS camera (ORCA-flash4.0 LT, Hamamatsu). Pour la morphologie, il s'agit d'un objectif

20x/0.75. Enfin, pour l'immunofluorescence, on utilise un objectif 100x/0.5-1.3 à immersion à huile.

- **Imagerie dynamique**

Les expériences d'imagerie dynamique ont été réalisées avec le microscope précédemment décrit.

Pour le suivi de l'AMPC, de l'activité PKA et du calcium, un objectif 40x/1.30 à immersion à huile a été utilisé. Les expériences d'imagerie dynamiques sont toutes effectuées dans un milieu salin (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 11mM glucose, 10 mM Hepes ; pH 7.4). La stimulation a été effectuée par adjonction dans le milieu de CXCL12 (200ng/μl)

Les LTs ont été transfectés avec le plasmide TEpacVV (AMPC) ou ExRaiAKAR2 (activité de la PKA) la veille de l'expérience. Environ 100 000 cellules ont été rincées puis déposées sur une lamelle tapissée de VCAM-1.

▪ AMPC

Le biosenseur TEpacVV¹⁷² se base sur le fonctionnement de la protéine Epac1 (Figure 24). Pour ce biosenseur, le domaine de liaison à Rap a été muté afin que son expression n'impacte pas le comportement de la cellule transfectée. En absence d'AMPC, le biosenseur adopte une conformation repliée permettant le transfert d'énergie entre les fluorophores Turquoise (ex433nm et em475nm) et Venus (ex500nm et em527nm). Cette énergie peut être mesurée par FRET ou transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (ex433nm et em527nm). Lorsque le niveau d'AMPC augmente, le changement de conformation de la sonde induit un éloignement des deux fluorophores et donc une diminution du transfert d'énergie. Trois images ont été acquises toutes les 10sec : la lumière transmise, la mesure de l'AMPC (canal Turquoise : ex433nm/em475nm et canal FRET : ex433nm/em527nm). Le ratio $R = \frac{I_{exTurquoise/emTurquoise}}{I_{exTurquoise/emVenus}}$ est calculé avec MetaFluor® après soustraction du bruit de fond. Une augmentation du ratio correspond à une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPC.

▪ Activité PKA

Le biosenseur ExRaiAKAR2¹⁷³ fonctionne selon le principe de permutation circulaire de la GFP (Figure 25). La GFP est fusionnée avec un peptide substrat de la PKA et un domaine FHA1. Au sein de la séquence de la GFP est ajouté un linker peptidique modifiant les

caractéristiques d'excitation de cette dernière. En absence d'activité PKA, une excitation à 405nm permet une émission à 515nm. En cas d'activation de la PKA, le substrat est phosphorylé permettant l'interaction avec le domaine FHA1. Ce changement de conformation permet à la GFP d'être excitée cette fois à 480nm pour une même longueur d'onde l'émission. Trois images ont été acquises toutes les 10sec : la lumière transmise, la mesure de l'activité PKA (ex480nm/em515nm et ex405nm/em515nm). Le ratio $R = \frac{I_{480/515}}{I_{405/515}}$ est calculé avec MetaFluor® après soustraction du bruit de fond. Une augmentation du ratio correspond à une augmentation de l'activité de la PKA.

Figure 24 : Fonctionnement de la sonde TEpacVV

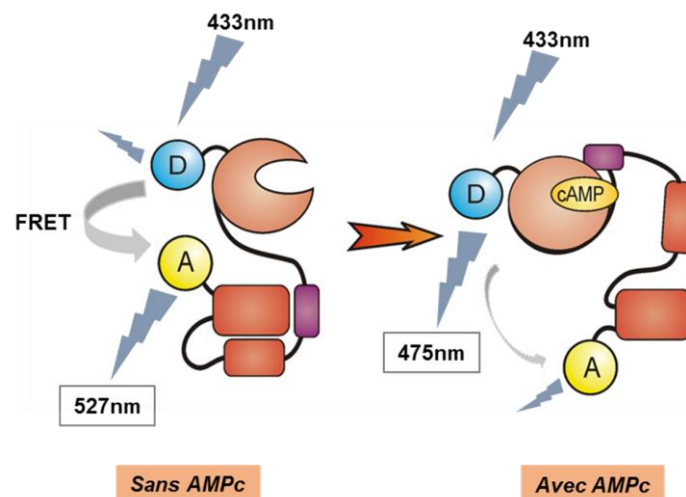


Illustration tirée de : Klarenbeek, J., Goedhart, J., van Batenburg, A., Groenewald, D. & Jalink, K. Fourth-generation Epac-based FRET sensors for cAMP feature exceptional brightness, photostability and dynamic range: Characterization of dedicated sensors for FLIM, for ratiometry and with high affinity. *PLoS ONE* **10**, (2015) ¹⁷²

Figure 25 : Fonctionnement de la sonde ExRaiAKAR2

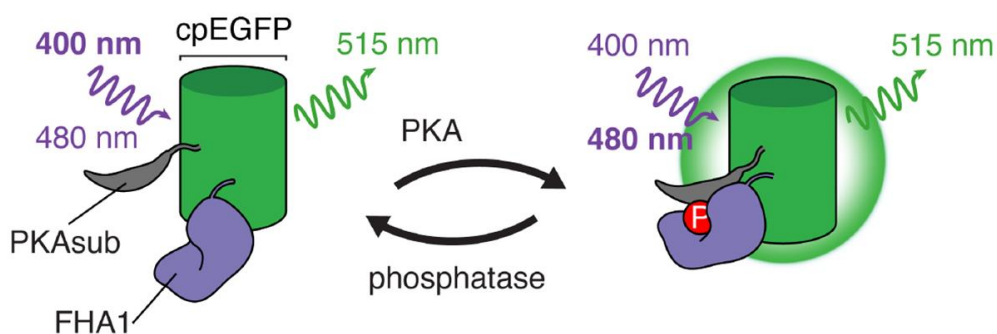


Illustration tirée de : Zhang, J.-F. et al. An ultrasensitive biosensor for high-resolution kinase activity imaging in awake mice. *PLoS ONE* **17**, 39–46. ¹⁷³

- Calcium (Fura2/AM)

Imagerie : Pour les expériences de mesure conjointe d'AMPC et de calcium, les cellules ont été chargées avec 200 nM de Fura-2/AM pendant 20 min à 37°C. Pour ces expériences, cinq images sont acquises toutes les 10s. En plus des 2 images acquises pour TEpacVV, une excitation a été réalisée alternativement à 350 et 380 nm et l'émission enregistrée à 510 nm. Le rapport (Exc 350, Em510/Exc380, Em510) a été calculé avec MetaFluor (Roper Scientific) après soustraction du fond. Une augmentation du ratio traduit une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire.

Spectrofluorimétrie : Cette technique permet de mesurer les variations du Calcium sur une population cellulaire. $1,5 \cdot 10^6$ cellules sont chargées avec du Fura-2/AM pendant 20 minutes à 37°C. Après rinçage, le culot est repris dans 1ml et placé dans une cuvette. L'excitation est effectuée toutes les 5 secondes alternativement à 350 et 380nm, l'émission étant à 510nm. Le ratio entre ces deux valeurs est mesuré par le logiciel Cary Eclipse. Les cellules sont stimulées après ajout dans la cuvette de $200 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ de chimiokine.

- Actine corticale et centrosome

Pour le marquage de l'actine corticale, les LTs ont été incubés 1h à 37°C en présence de 250nM de SiRActin (SpiroChrome). Après l'incubation, la SiRActin est rincée avec du. Ce protocole permet de marquer seulement l'actine déjà polymérisée dans les cellules non stimulées, à savoir l'actine corticale.

- **Analyse d'image**

- Roundness

Ce paramètre est quantifié avec ImageJ et correspond à : $\frac{4 \times \text{area}}{\pi \times (\text{major axis})^2}$. Il est égal à 1 lorsque la cellule est ronde et tend vers 0 lorsque la cellule est polarisée.

- Quantification des délais

Les délais ont été quantifiés entre calculant le temps écoulé entre deux événements, le temps de stimulation est connu précisément grâce à la stimulation synchrone. Pour les augmentations d'AMPC ou d'activité de la PKA, nous avons pris le premier point > 1 après normalisation, correspondant au début de l'augmentation. Pour la déformation, nous

avons le premier point correspondant au début de la diminution de la roundness. De la même manière pour la diminution de l'actine centrosomale, nous avons pris le premier point correspondant au début de la déplétion.

- Quantification de la position du centrosome

Les CEM transfectées avec de la centrine-GFP et marquées avec de la SiRActin ont été déposées sur une lamelle tapissée de VCAM-1 pendant 5min avant d'ajouter CXCL12. Les images ont été acquises toutes les 10sec. Ensuite, nous sélectionnons l'image correspondant à l'ouverture du cortex d'actine puis nous récoltons les coordonnées : du centrosome, du centre de la cellule et de l'ouverture du cortex d'actine. Grâce à ces informations, nous sommes capables de calculer l'angle entre les axes ouverture/centre et centrosome/centre.

- Quantification de l'actine centrosomale

La quantification de l'actine ou de Arp2 associé au centrosome a été par la mesure des intensités intégrées dans un cercle de rayon 1,5 μ m et ayant pour centre, le centrosome.

- **Statistiques**

Les tests statistiques utilisées pour la comparaison des données sont précisés dans les légendes des figures. Elles ont été réalisées avec le logiciel GraphPad.

1.3. Résultats

1.3.1. Effet de la stimulation des LTs par la chimiokine CXCL12

1.3.1.1. Déformation

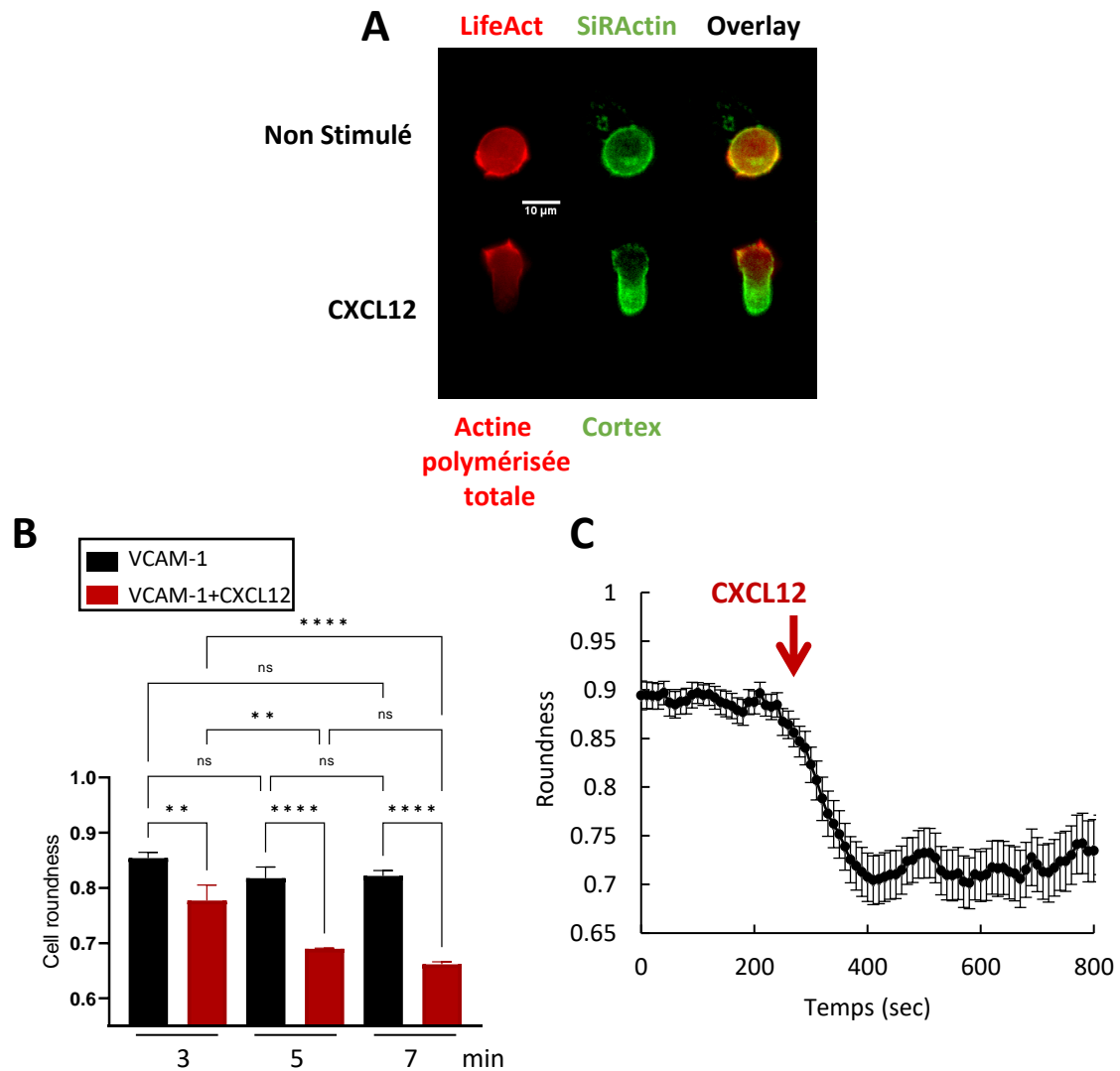
La stimulation par des chimiokines induit une déformation rapide des LTs suivie par la mise en place de la polarisation, asymétrie permettant le mouvement avec un lamellipode (riche en actine branchée) à l'avant et un uropode à l'arrière.

Au repos (i.e. en absence de stimulation), les CEM, une lignée de lymphocytes T, sont arrondis avec un cortex d'actine homogène au niveau de la membrane. Le changement morphologique induit par la chimiokine conduit à une polarisation caractérisée par la rupture du cortex d'actine permettant la formation d'un lamellipode à l'avant associée avec une accumulation d'actine nouvellement polymérisée (Figure 26A).

Ce changement de forme peut être quantifié par la mesure de la rondeur ou roundness. Cette valeur mesure la proximité de la forme d'un objet avec celle d'un cercle parfait, définie entre 0 et 1 (1 correspondant à un cercle parfait).

Cette mesure a été faite sur des cellules stimulées, déposées sur un tapis de VCAM-1 ou VCAM-1 + CXCL12 pendant une durée de 3, 5 ou 7min (Figure 26B). On remarque sur des cellules non stimulées que la roundness est autour de 0.85. Cette valeur reste constante quel que soit le temps pendant lequel les cellules ont adhéré. Par contre, sur un tapis de VCAM-1 + CXCL12, la roundness décroît progressivement, un plateau semblant être atteint de 7min (Figure 26B). Il est cependant difficile par ce type de stimulation de quantifier précisément la cinétique de déformation étant donné que, dans cette configuration, on ne connaît pas le moment exact de la stimulation. En effet, le temps 0 correspondant au dépôt des cellules et non à l'instant de stimulation. D'autre part, ce temps pouvant varier d'une cellule à l'autre, la stimulation est asynchrone. C'est la raison pour laquelle nous avons fait des mesures en dynamique, cette fois avec une stimulation synchrone où les cellules sont déposées sur un tapis de VCAM-1 puis stimulées en direct avec la chimiokine CXCL12. Ce système est contraignant car les cellules se déforment souvent non pas dans le plan de la lamelle, mais en majorité vers le haut. Cependant, on observe, pour les cellules se déformant dans la plan, une diminution immédiate de la stimulation sur la morphologie cellulaire avec un maximum de déformation atteint environ 3min après l'adjonction de la chimiokine (Figure 26C).

Figure 25 : La stimulation des LTs avec la chimiokine CXCL12 induit leur déformation et leur polarisation



A- Exemple de CEM déposée sur un tapis de VCAM-1 (haut) ou VCAM-1/CXCL12 (bas), transfectée avec LifeAct-mCherry (actine totale polymérisée) et marquée avec SiRActin (cortex d'actine).

B- Mesure de la roundness de CEM déposées 3, 5 ou 7min sur un tapis de VCAM-1 ou de VCAM-1 + CXCL12. Résultats correspondant à la moyenne \pm SE de 3 expériences indépendantes avec 448-1722 cellules/conditions/expérience. Analyse statistique : test ANOVA à un facteur avec un post-hoc test de Tukey. **** : $p < 0,0001$, ** : $p < 0.01$ et ns = non significatif.

C- Mesure de la roundness en imagerie dynamique. Les CEM sont déposées sur un tapis de VCAM-1 puis stimulées avec 200ng/ml de CXCL12. (n=48 cellules)

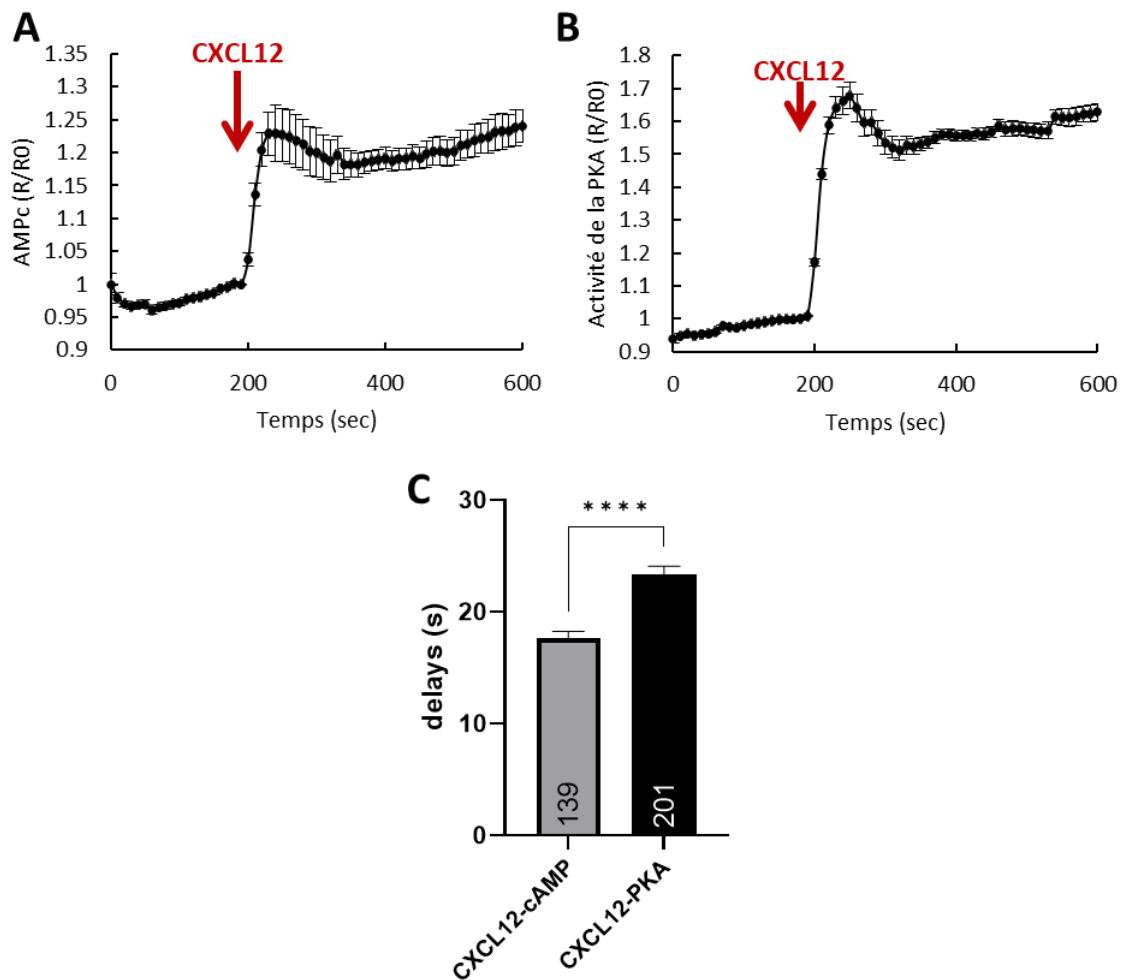
1.3.1.2. AMPc et PKA

Dans l'équipe, il avait été montré que tout traitement affectant la voie de l'AMPc inhibait la migration des LTs et induisait un arrondissement des cellules (résultats non publiés). Ces résultats suggéraient fortement que la voie de l'AMPc était impliquée dans la réponse aux chimiokines.

Nous avons dans un premier temps regardé si la stimulation des LTs par CXCL12 était capable de moduler le niveau d'AMPc. Grâce au biosenseur TEpacVV se basant sur le principe de FRET, nous avons pu mesurer en imagerie dynamique les variations de ce second messenger au cours du temps. La stimulation des CEM déposées sur un tapis de VCAM-1 induit une augmentation rapide de l'AMPc intracellulaire (Figure 27A). Un des principaux effecteurs de l'AMPc est la protéine kinase A (PKA). La liaison de molécules d'AMPc permet en effet l'activation de cette kinase¹⁷⁴. Grâce à un biosenseur de l'activité de la PKA, ExRaiAKAR2 basé sur le principe de permutation circulaire de la GFP, nous avons suivi en temps réel les variations de son activité en réponse à CXCL12. Après stimulation des CEM, on remarque une augmentation rapide de l'activité de la PKA (Figure 27B).

Des données obtenues avec TEpacVV ou ExRaiAKAR2, nous avons pu extraire les délais entre la stimulation chimiokinique et l'augmentation d'AMPc ou l'activation de la PKA. Les valeurs obtenues, 18 ± 1 sec (n=139 cellules) et 23 ± 1 s (n=201 cellules) respectivement, montrent que ces signaux sont déclenchés très rapidement et de façon séquentielle comme attendu (Figure 27C).

Figure 26 : La stimulation des LTs avec la chimiokine CXCL12 induit une augmentation de l'AMPC et de l'activité de la PKA



A- CEM transfectées avec TEpacVV déposées sur un tapis de VCAM-1 et stimulées avec 200ng/ml de CXCL12. La courbe représente la moyenne \pm SE de réponses obtenues à partir de 6 expériences indépendantes avec 6 à 59 cellules / expérience.

B- CEM transfectées avec ExRaiAKAR2, déposées sur un tapis de VCAM-1 et stimulées avec 200ng/ml de CXCL12. La courbe représente la moyenne \pm SE de réponses obtenues à partir de 6 expériences indépendantes avec 11 à 46 cellules / expérience

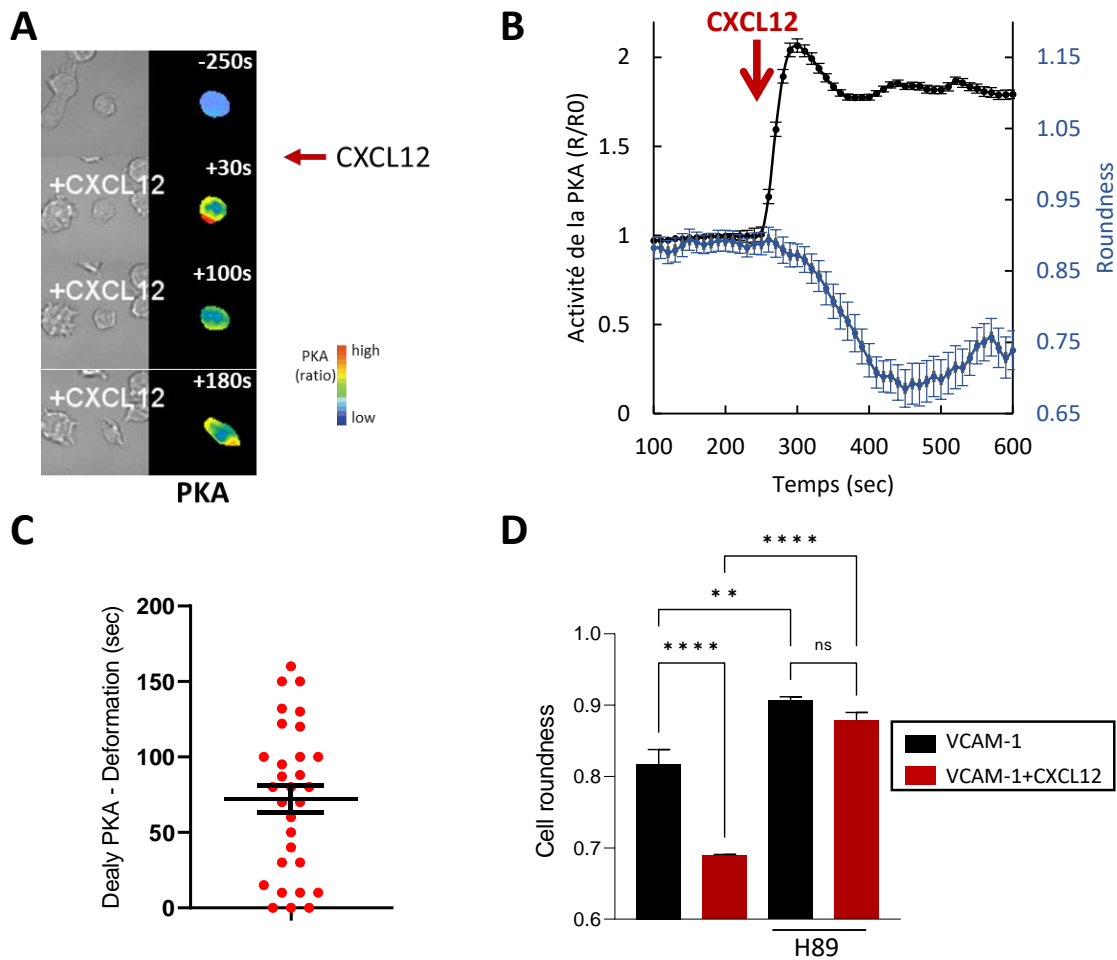
C- Quantification des délais entre l'addition de CXCL12 et l'augmentation d'AMPC ou de l'activité PKA. Analyse statistique t-test, **** : $p < 0,0001$ (n = 139 et 201 cellules)

1.3.2. Implication de la PKA dans la déformation et la polarisation des LTs

Comme illustré en Figure 28A et quantifié sur de nombreuses cellules en Figure 28B, l'activation de la PKA précède la polarisation des cellules. Ces mesures concomitantes de l'activité de la kinase et de la roundness, nous ont permis de calculer le délai moyen entre ces deux événements, soit 72 ± 9 sec (n=30 cellules) (Figure 28C). Pour établir le lien de causalité entre l'activité de la PKA et la déformation des LTs en réponse aux chimiokines, nous avons analysé les conséquences de l'inhibition de l'activité PKA sur la déformation. Pour cela, les CEM ont été prétraitées avec un inhibiteur pharmacologique de la PKA, l'H89, puis déposées sur des lamelles tapissées de VCAM-1 (non-stimulées) ou de VCAM-1/CXCL12 (stimulées) pendant 5min. Les cellules ont ensuite été fixées et marquées à la phalloïdine. Sur les cellules non-stimulées, on remarque que l'inhibition de la PKA induit un arrondissement des LTs, suggérant une activité basale de cette enzyme. D'autre part, la déformation observée après la stimulation CXCL12 est inhibée dans les cellules prétraitées avec H89 (Figure 28C).

Nous mettons donc en évidence dans cette partie que la stimulation par CXCL12 induit, à la suite de l'augmentation d'AMPc, une activation accrue de la PKA nécessaire à la déformation et à la polarisation des LTs.

Figure 27 : L'activation de la PKA est impliquée dans la déformation des LTs en réponse à CXCL12



A- Exemple d'une cellule transfectées avec ExRaiAKAR2, déposée sur un tapis de VCAM-1 et stimulée avec 200ng/ml de CXCL12. Les niveaux d'activité de la PKA sont codés en fausses couleurs, rouge = haut niveau et bleu = bas niveau d'activité PKA.

B- Mesure simultanée de l'activité PKA (bleu) et de la roundness (rouge) de cellules transfectées avec ExRaiAKAR2

C- Quantification du délai entre l'augmentation de l'activité PKA et la déformation (n = 30 cellules)

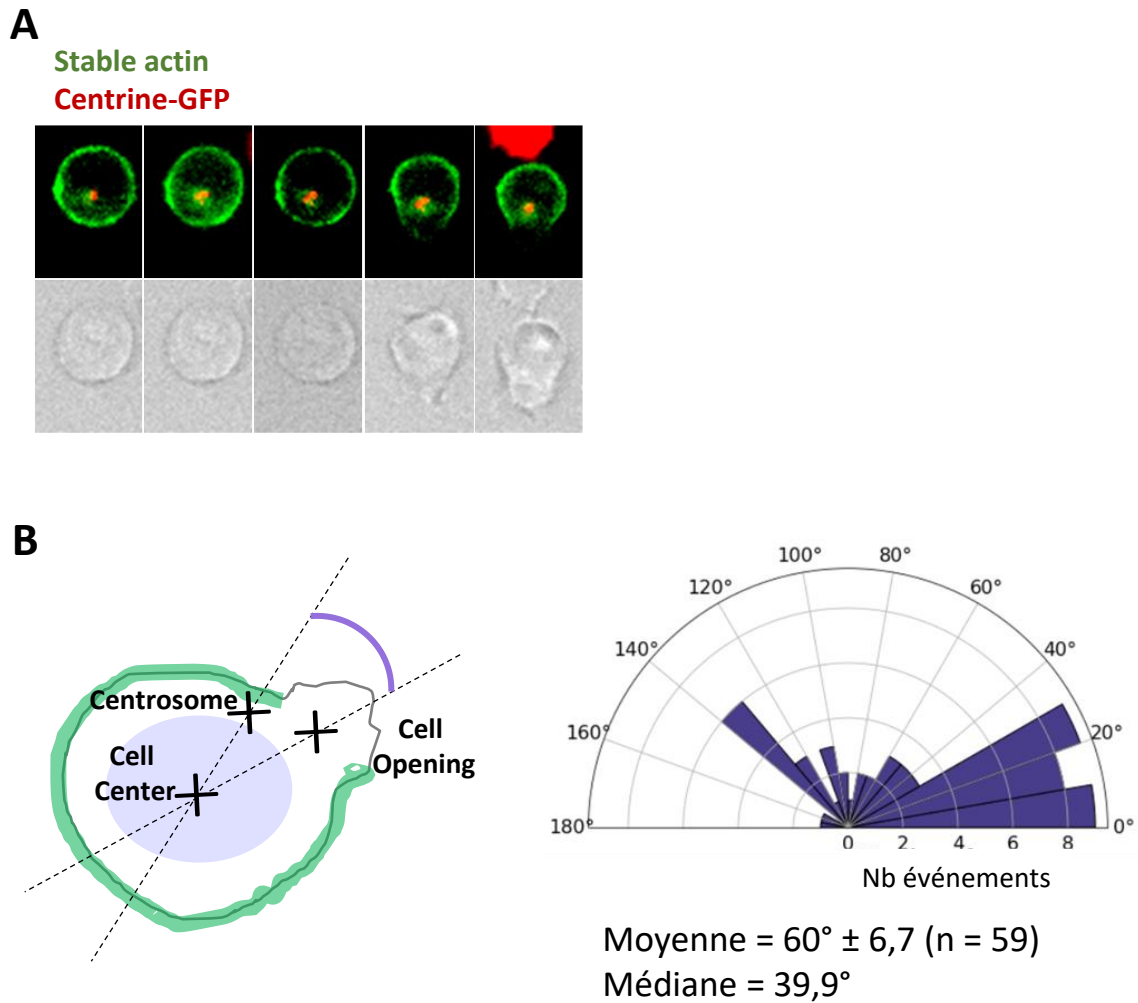
D- Mesure de la roundness de CEM traitées ou non avec l'inhibiteur de la PKA, H89 (10 μ M) et déposées sur un tapis de VCAM-1 (noir) ou VCAM-1 + CXCL12 (rouge) pendant 5min. Résultats correspondent à la moyenne \pm SE de 3 expériences indépendantes avec 666 à 1475 cellules / condition / expérience. Analyse statistique : : test ANOVA à un facteur avec un post-hoc test de Tukey. **** : p < 0,0001, ** : p < 0.01 et ns = non significatif.

1.3.3. Positionnement du centrosome au cours de la polarisation

Intéressons-nous maintenant à l'établissement de l'axe de polarisation. Nous nous demandons si le lieu de rupture du cortex d'actine, première étape visible de formation du lamellipode, se fait de manière aléatoire ou s'il est prédéfini par l'organisation cellulaire. Un des éléments majeurs d'asymétrie dans une cellule est le centrosome. Nous avons donc suivi la rupture du cortex d'actine et la déformation relativement à la position du centrosome au sein des CEM stimulées par CXCL12.

Ainsi, les cellules ont été transfectées avec la centrine-GFP et l'actine corticale a été marquée avec de la SiRActin selon un protocole particulier expliqué dans la section « matériels et méthodes ». Comme illustré sur l'exemple présenté en Figure 29A, on remarque que la rupture de la cage se fait dans une zone proche du centrosome. Une quantification était donc nécessaire afin de caractériser cette observation. Pour cela, nous avons calculé l'angle entre les axes passant par (1) le centre de la cellule et l'ouverture du cortex et (2) le centre de la cellule et le centrosome. L'ouverture du cortex d'actine semble se faire préférentiellement à proximité du centrosome avec une moyenne de $60 \pm 6,7^\circ$ et une médiane de $39,9^\circ$ (n=59) (Figure 29B). Ces résultats suggèrent donc que le centrosome pourrait conditionner la position de l'axe de polarisation.

Figure 28 : La rupture du cortex d'actine a lieu selon un axe défini par la position du centrosome



A- Exemple d'ouverture du cortex d'actine en réponse à CXCL12 (200ng/ml) d'une cellule transfectée avec la centrine-GFP et marquée la SiRActin (cortex d'actine)

B- Quantification de l'ouverture du cortex d'actine par rapport à la position du centrosome. Gauche : schéma explicatif de la quantification. Droite : mesure de l'angle formé par les axes Centre de la cellule- Ouverture et centre de la cellule-centrosome. Résultats obtenus à partir de 59 cellules issues de 12 expériences indépendantes.

1.3.4. Actine autour du centrosome et PKA

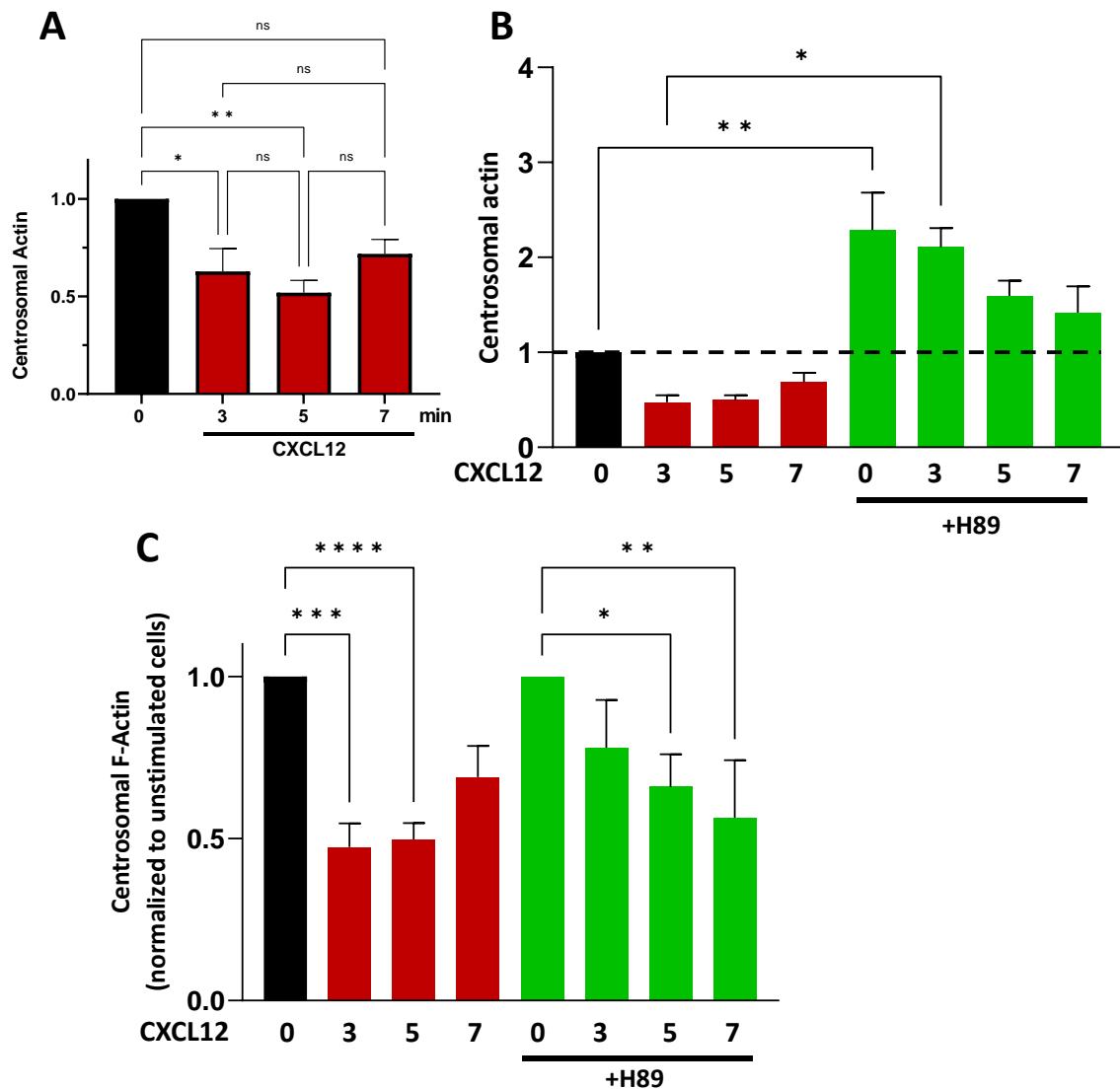
Le centrosome est défini comme étant le principal centre organisateur des microtubules (MTOC)⁹. Cependant des études montrent également son implication dans la régulation du cytosquelette d'actine⁷⁸. D'autre part, des publications mettent en

évidence qu'il existe un réseau d'actine autour du centrosome et que celui-ci doit être dépolymérisé afin de permettre la relocalisation du centrosome vers la synapse après stimulation du TCR ou du BCR^{175,176}.

Nous avons donc suivi les variations de ce réseau d'actine après stimulation chimiokine, lors des étapes précoces de polarisation (avant la migration) des LTs. Les cellules déposées sur un tapis de VCAM-1, ont été stimulées pendant 3, 5 ou 7min de manière synchrone avec CXCL12 et la quantité d'actine a été mesurée dans la zone péri-centriolaire correspondant à une zone de 3µm de diamètre centrée sur le centrosome. On observe une diminution rapide de l'actine dans cette zone (Figure 30A). Dans notre contexte, après 5min de stimulation, la réduction d'actine centrosomale semble être maximale.

Nous avons vu précédemment une implication de la PKA dans la polarisation des LTs en réponse aux chimiokines. Nous avons voulu voir dans quelle mesure cette enzyme pouvait être impliquée dans les variations d'actine centrosomale. C'est pourquoi nous avons comparé l'actine centrosomale avant et après stimulation chimiokinique dans des CEM prétraitées avec l'inhibiteur de la PKA, H89. Au niveau basal, on observe autour du centrosome avec 3 fois plus d'actine centrosomale dans les cellules prétraitées avec H89 suggérant que dans des cellules non stimulées, une activité basale de la PKA est responsable du niveau d'actine autour du centrosome (Figure 30B). D'autre part, après stimulation avec CXCL12, la diminution observée dans les cellules contrôle est ralentie dans les cellules dont la PKA est inhibée (Figure 30C). Cependant, même s'il existe une diminution d'actine centrosomale lorsque la PKA est inhibée, le niveau d'actine centrosomale reste toujours au-dessus du niveau basal des cellules non-traitées (Figure 30B, ligne pointillée).

Figure 29 : La stimulation des LTs par CXCL12 induit une déplétion de l'actine centrosomale impliquant l'activité de la PKA



A- Mesure de l'actine centrosomale dans des CEM déposées sur des lamelles tapissées de VCAM-1 et stimulées avec 100ng/ml de CXCL12 pendant 3, 5 ou 7min. Résultats correspondent à la moyenne \pm SE de 4-5 expériences indépendantes avec 26 à 92 cellules / condition / expérience. Analyse statistique : test ANOVA à un facteur avec un post-hoc test de Tukey. : ** : $p < 0.01$ et ns = non significatif.

B & C- Mesure de l'actine centrosomale dans des CEM traitées ou non avec H89, déposées sur des lamelles tapissées de VCAM-1 et stimulées avec 100ng/ml de CXCL12 pendant 3, 5 ou 7min. La ligne noire représente le niveau basal d'actine au centrosome. Résultats correspondent à la moyenne \pm SE de 3-8 expériences indépendantes avec 26 à 165 cellules / condition / expérience. Analyse statistique : test ANOVA à un facteur avec un post-hoc test de Tukey. : * : $p < 0.05$.

B- Valeurs normalisées par rapport à la moyenne des cellule non traitées et non-stimulées (barre noire) C- Pour chaque condition, les valeurs normalisées par rapport à la moyenne des cellules non-stimulées.

L'actine totale (phalloïdine) et le centrosome (péricentrine) sont marqués dans ces cellules.

Nous avons également suivi de façon dynamique les variations de l'actine centrosomale dans des cellules prétraitées avec H89 ou DMSO pour contrôle. Pour cela, les CEM ont été transfectées avec LifeAct-mCherry et centrine-GFP. Nous avons lors de ces expériences, suivi simultanément 1) la quantité d'actine centrosomale, 2) la déformation des cellules et 3) l'ouverture du cortex d'actine.

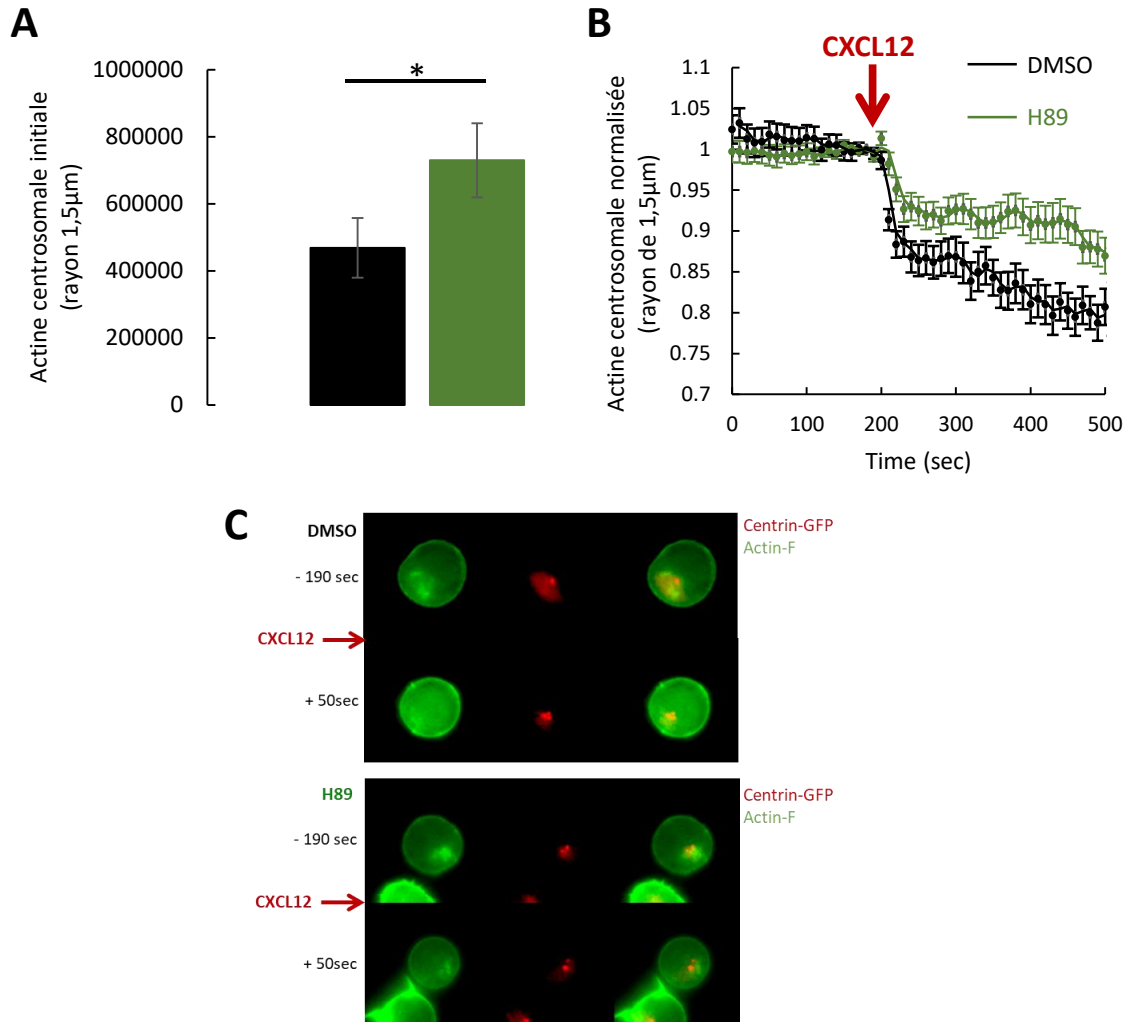
Dans ces expériences, comme dans celles décrites en Figure 31, la quantité initiale d'actine autour du centrosome est plus élevée dans les cellules prétraitées avec l'H89 (Figure 31A). Afin de comparer les cinétiques de variations d'actine centrosomale après stimulation dans les deux conditions, les valeurs ont été normalisées relativement à l'intensité mesurée au moment de la stimulation. La diminution d'actine centrosomale observée après stimulation avec CXCL12 dans les cellules contrôle (DMSO) est atténuée dans les cellules prétraitées avec l'inhibiteur de la PKA (Figure 31B et C).

De ces données, nous avons pu également en déduire différents délais :

- le délai entre la stimulation et le début de la diminution d'actine autour du centrosome est de $44,4 \pm 10$ sec (n=16)
- le délai entre le début de la diminution d'actine centrosomale et le début de la déformation : $65,6 \pm 16,3$ sec (n=16)
- le délai entre le début de la diminution d'actine centrosomale et l'ouverture du cortex d'actine membranaire : $90,6 \pm 13,5$ sec (n=17)

On remarque que ces événements se déroulent rapidement après la stimulation par CXCL12 des CEM.

Figure 30 : Implication de la PKA dans la dynamique de l'actine centrosomale en réponse à CXCL12



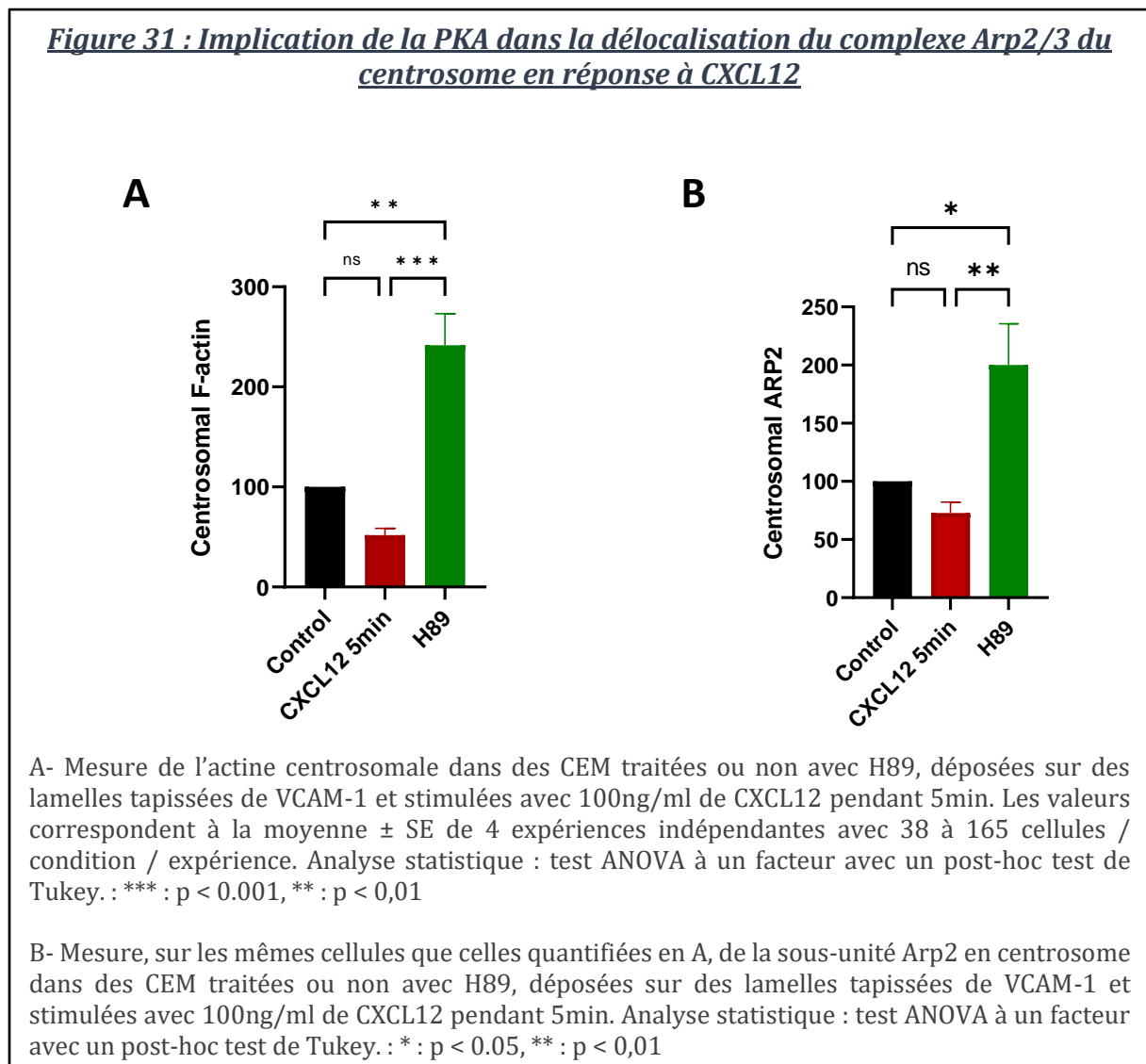
A- Valeur initiale d'intensité de l'actine autour du centrosome (rayon 1,5μm). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SE de 60 à 61 cellules issues de 6 expériences. Analyse statistique, T-Test, * : $p < 0.05$.

B- Mesure dynamique de l'actine centrosomale dans des cellules transfectées avec LifeAct-mCherry et centrine-GFP, traitées avec H89 (vert) ou DMSO (noire). Les cellules sont ensuite déposées sur une lamelle tapissée de VCAM-1 et stimulées avec 200ng/ml de CXCL12. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SE de 65 à 68 cellules issues de 6 expériences indépendantes

C- Exemple de cellules traitées avec DMSO (haut) ou H89 (bas) avant et après stimulation CXCL12.

Par une étude du protéome centrosomale avant et après stimulation du BCR, Obino *et al.*¹⁷⁷ ont montré qu'en plus de l'actine, le complexe Arp2/3 était également déplété. Ce complexe est impliqué dans la polymérisation d'actine et sa déplétion pourrait rompre un équilibre entre polymérisation et dépolymérisation de l'actine dans la zone du

centrosome en faveur de la dépolymérisation. C'est pourquoi nous avons quantifié la sous-unité Arp2 autour du centrosome à l'état basal, après stimulation par CXCL12 et après inhibition de la PKA. De la même manière que ce qui est observé avec l'actine (Figure 32A), la sous-unité Arp2 est déplétée après stimulation (Figure 32B). De plus l'inhibition de l'activité de la PKA dans des cellules non stimulées, induit également une accumulation de cette sous-unité au centrosome (Figure 32). L'analyse au niveau de cellules individuelles montre que quelque soient les conditions, les niveaux de F-actine au niveau du centrosome sont directement corrélés à la quantité d'Arp2 en ce site (Figure 32).



La stimulation des LTs par CXCL12 induit une diminution de l'actine et du complexe Arp2/3 autour du centrosome. La PKA semble jouer un rôle clé dans la régulation des niveaux d'actine et d'Arp2/3 au centrosome : dans des cellules au repos,

l'inhibition de cette kinase induit une accumulation de ces composants au centrosome ; inversement son activation par CXCL12 induit une réduction de ces deux protéines.

L'activation de la PKA après stimulation par CXCL12 permet donc une régulation locale du niveau d'actine polymérisée autour du centrosome. Ce processus pourrait impliquer une activité compartimentée de la PKA, c'est ce que nous allons étudier dans la prochaine partie.

1.3.5. AKAP de type II et actine centrosomale

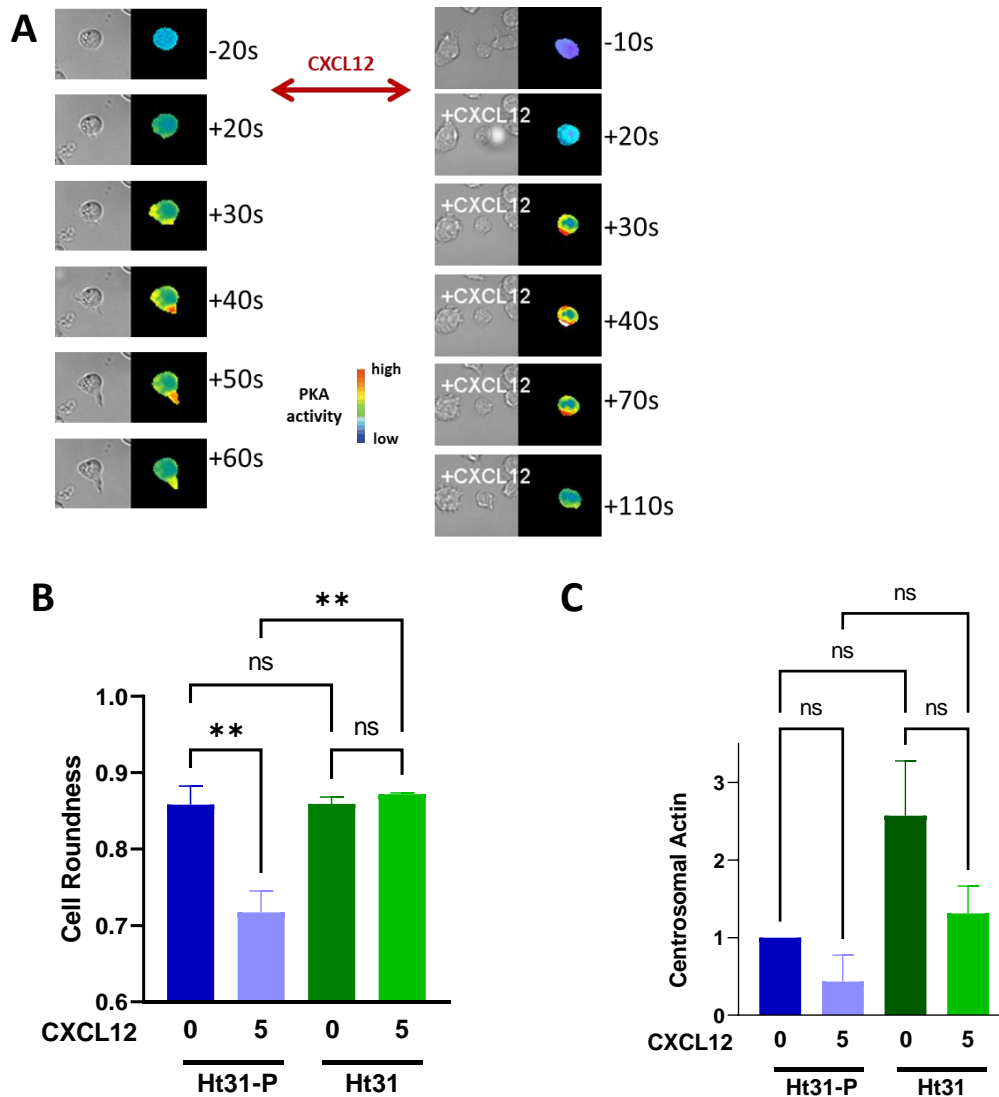
La compartimentation du signal PKA au sein des cellules est permise par les AKAP (protéines d'ancrage de la PKA). L'AKAP450 (ou CG-NAP) est particulièrement intéressante puisqu'elle possède un ancrage au niveau du centrosome et qu'elle a été décrite comme ayant un rôle clé dans la migration des LT¹⁶⁹.

Dans un premier temps, nous avons suivi l'activité de la PKA au niveau subcellulaire grâce au biosenseur ExRaiAKAR2. Comme illustré en Figure 33A, après stimulation, on observe dans certains cas des points chauds d'activité de la PKA, en un pôle correspondant au futur site de formation du lamellipode. Cependant, pour des raisons techniques de recouvrement de fluorophores, nous n'avons pas été capables de les corrélés avec la position du centrosome.

Dans un second temps, nous avons utilisé un peptide inhibiteur de l'ancrage de la PKA sur les AKAP de type II (liant les sous-unités régulatrices de la PKA de type II) dont fait partie l'AKAP450. Cet inhibiteur, Ht-31, va se lier aux AKAP au niveau du site de liaison avec la PKA et ainsi empêcher la compartimentation de cette enzyme¹⁷⁸. Nous avons quantifié l'effet de la délocalisation de la PKA des AKAP de type II sur la déformation et les variations d'actine au centrosome après stimulation CXCL12. Pour cela, les cellules ont été préalablement incubées avec le peptide inhibiteur (Ht-31) ou un peptide contrôle (Ht-31-P) pendant 30 minutes. On observe que la déformation observée après stimulation des cellules traitées avec le peptide contrôle est inhibée dans les cellules prétraitées avec Ht-31 (Figure 33B). D'autre part, l'inhibiteur d'AKAP induit, dans des cellules non stimulées, une augmentation importante d'actine au niveau du centrosome et réduit (mais n'inhibe pas) la décroissance induite par CXCL12 (Figure 33C). Ces résultats suggèrent qu'une

AKAP de type II telle que l'AKAP450 serait impliquée dans la régulation de l'actine centrosomale et serait nécessaire pour la mise en place de la polarisation.

Figure 32 : Compartimentation de l'activité PKA au cours de la polarisation en réponse à CXCL12



A- Exemple de cellules transfectées avec ExRaiAKAR2 et observation de la répartition subcellulaire de l'activité de la PKA en réponse à CXCL12 (200ng/ml)

B- Mesure de la roundness de CEM traitées avec Ht31 ou Ht-31-P puis déposées 5min sur un tapis de VCAM-1 ou de VCAM-1 + CXCL12. Résultats obtenus à partir de 3 expériences indépendantes avec 227 à 930 cellules / condition / expérience. Analyse statistique : test ANOVA à un facteur avec un post-hoc test de Tukey. **: $p < 0,01$ et ns = non significatif.

C- Mesure de l'actine centrosomale de CEM traitées avec Ht31 ou Ht-31-P (10 μ M) puis déposées 5min sur un tapis de VCAM-1 ou de VCAM-1 + CXCL12. Résultats obtenus à partir de 3 expériences indépendantes 2 à 4 expériences indépendantes avec 18 à 79 cellules / condition / expérience. Analyse statistique : test ANOVA à un facteur avec un post-hoc test de Tukey. **: $p < 0,01$ et ns = non significatif.

L'actine totale (phalloïdine) et le centrosome (péricentrine) sont marqués dans ces cellules.

Les données actuelles encore préliminaires ne permettent pas cependant de conclure que l'Ht31 inhibe la compartimentalisation du signal PKA observée ni que l'effet de l'Ht31 observé implique l'AKAP450.

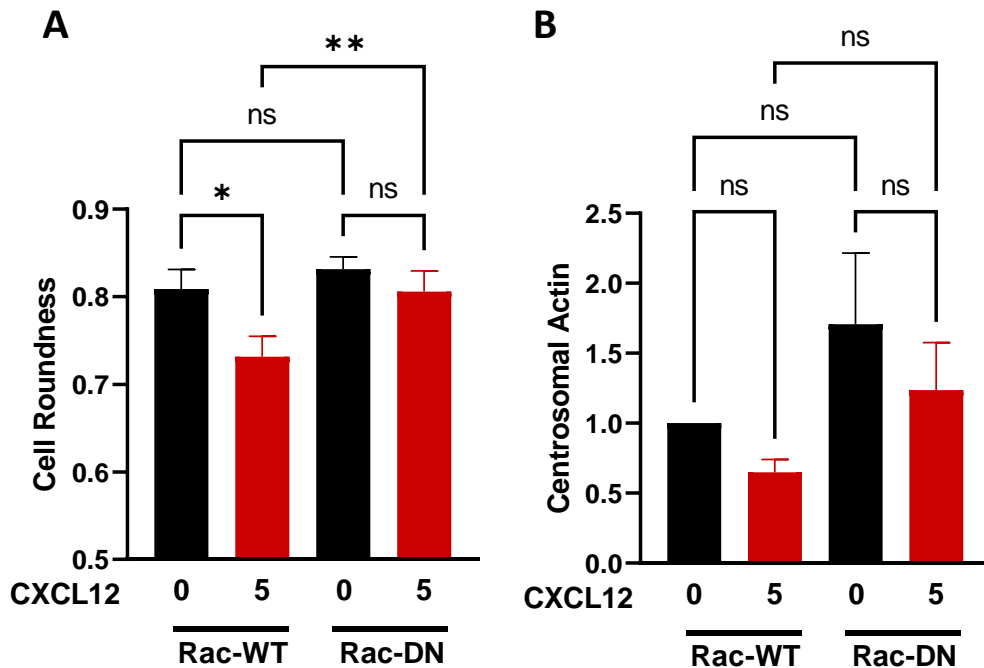
1.3.6. Importance de la diminution d'actine centrosomale pour la polarisation

Les expériences précédentes mettent en évidence une diminution de l'actine centrosomale précédant la polarisation des LTs en réponse aux chimiokines. Une publication récente montre que le réseau d'actine autour du centrosome forme une barrière de diffusion prévenant l'entrée et la sortie de protéines dans cette zone¹⁷⁷. De plus les auteurs de la publication concernant la formation de la synapse dans les lymphocytes B ont fait une analyse du protéome du centrosome avant et après stimulation. De nombreuses protéines sont déplétées (comme l'actine ou le complexe Arp2/3) du centrosome ou au contraire y sont recrutées. Une protéine en particulier nous intéresse, DOCK2, elle est enrichie au centrosome après la stimulation du BCR. Il s'agit d'une protéine activatrice de la RhoGTPase Rac1 décrite pour être impliquée dans la formation du lamellipode¹⁷⁹. Notre hypothèse est qu'après la stimulation et l'augmentation d'AMPc puis de l'activité de la PKA, la diminution de l'actine centrosomale permettrait le recrutement de DOCK2 au centrosome permettant ainsi l'activation locale de Rac1 conduisant ainsi à la formation du lamellipode.

Afin de tester l'implication potentielle de Rac1, une forme dominante-négative (DN) ou sauvage (WT pour *wild type*) ont été transfectées dans les CEM. Nous avons ensuite quantifié la déformation et les variations d'actine centrosomale à l'issue de différents traitements. Dans les cellules exprimant la forme WT de Rac1, on remarque que la stimulation induit une déformation des CEM comme précédemment observé dans les cellules sans surexpression de Rac. Au contraire, les cellules exprimant la forme DN de Rac1 ne présentent plus de déformations après addition de CXCL12 (Figure 34A). Quant à l'actine centrosomale, on remarque dans un premier temps qu'au niveau basal, lorsque les cellules sont déposées sur un tapis de VCAM-1, les cellules exprimant la forme DN de Rac1 présentent une quantité d'actine au centrosome 2 fois plus élevée que les cellules

WT (Figure 34B). D'autre part, après stimulation CK, la réduction d'actine est moindre dans les cellules exprimant Rac1-DN mais surtout reste toujours à un niveau supérieur que dans les cellules exprimant Rac-WT.

Figure 33 : Implication de l'activité de Rac1 dans la régulation de l'actine centrosomale et la polarisation des LTs



A- Mesure de la roundness de CEM transfectées avec Rac1-WT ou Rac1-DN puis déposées 5min sur un tapis de VCAM-1 ou de VCAM-1 + CXCL12. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SE de 3 expériences indépendantes avec 105 à 725 cellules / condition / expérience. Analyse statistique : test ANOVA à un facteur avec un post-hoc test de Tukey. : ns = non significatif.

B- Mesure de l'actine centrosomale de CEM transfectées avec Rac1-WT ou Rac1-DN puis déposées 5min sur un tapis de VCAM-1 ou de VCAM-1 + CXCL12. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SE de 3 expériences avec 23 à 66 cellules / condition / expérience. Analyse statistique : test ANOVA à un facteur avec un post-hoc test de Tukey. : **: $p < 0,01$, * : $p < 0,05$, ns = non significatif.

L'actine totale (phalloïdine) et le centrosome (péricentrine) sont marqués dans ces cellules.

1.4. Discussion

Cette étude a permis de mettre en évidence une série d'événements apparaissant rapidement et séquentiellement après la stimulation des LTs par la chimiokine CXCL12. Nous observons en effet une augmentation rapide de l'AMPc intracellulaire suivie d'une activation de la PKA suivie d'une déplétion d'actine au niveau du centrosome et la polarisation des LTs suivant un axe prédéfini par la position de ce dernier (Figure 36). Ces différentes étapes sont résumées dans la Figure 35.

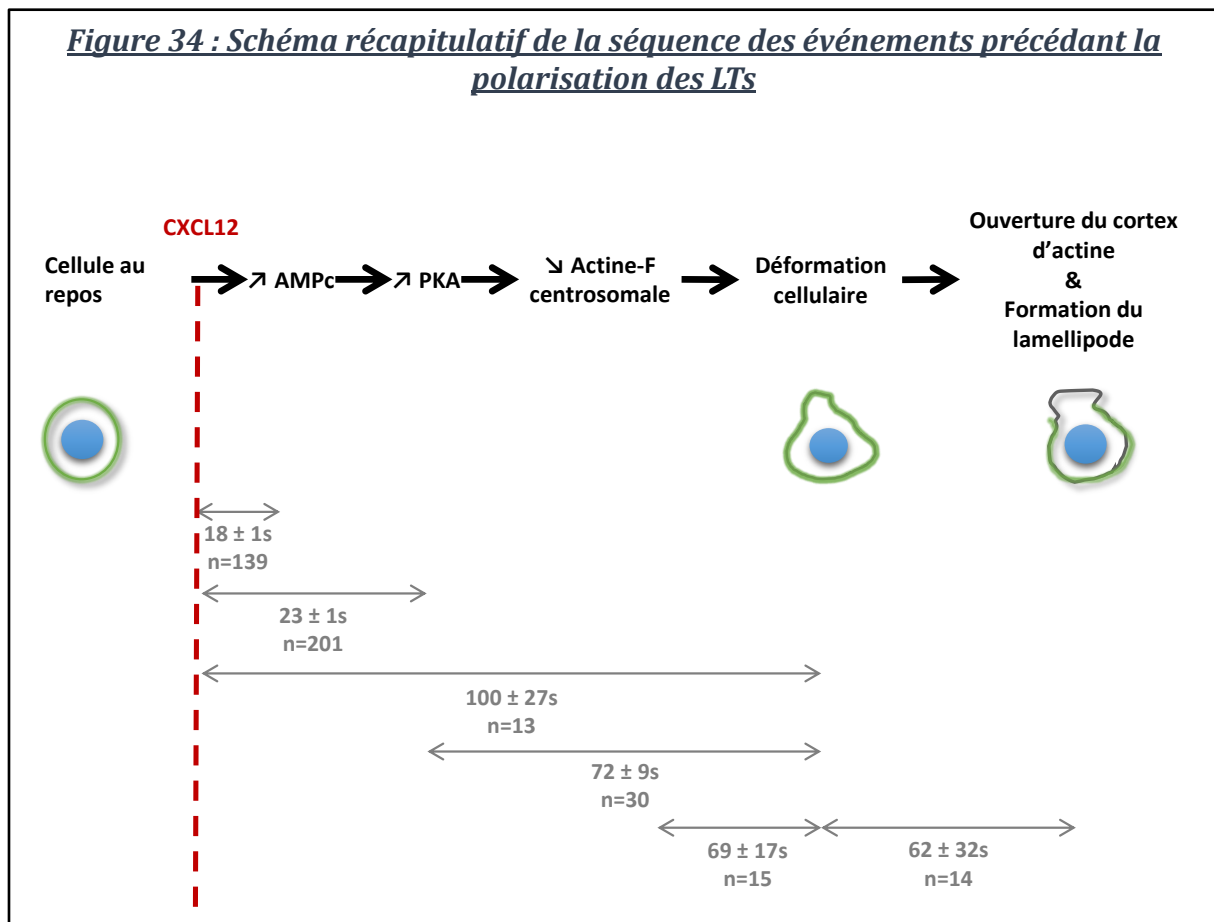
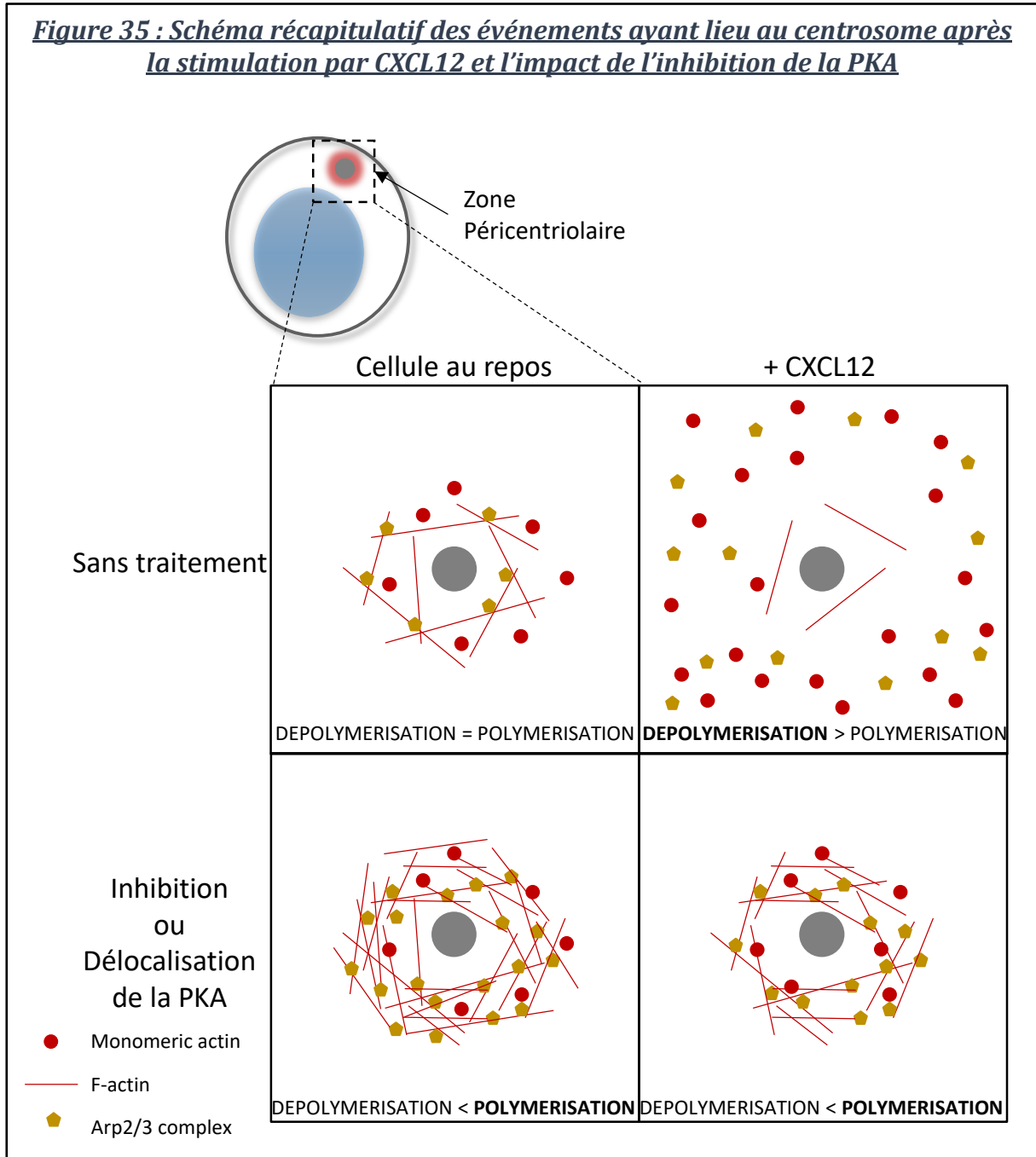


Figure 35 : Schéma récapitulatif des événements ayant lieu au centrosome après la stimulation par CXCL12 et l'impact de l'inhibition de la PKA



Le fait que les chimiokines induisent une augmentation d'AMPc est étonnant. En effet, les résultats de la littérature suggèrent que CXCR4, récepteur de la chimiokine CXCL12, est couplé à des protéines G trimériques de sous-unité G α i connue pour inhiber les ACs et donc diminuer la production d'AMPc^{40,105}. Cependant, certaines ACs peuvent être activées par une augmentation du calcium intracellulaire. Notre hypothèse propose que l'augmentation de calcium déclenchée par CXCR4 soit impliquée dans l'activation d'une ou plusieurs ACs calcium-dépendantes induisant ainsi un pic d'AMPc. Des résultats préliminaires (ANNEXE 1) suggèrent que l'augmentation d'AMPc précédant la déformation et la polarisation des LTs résulte d'une augmentation du calcium en amont. Le calcium permettrait, de façon directe ou indirecte, l'activation d'adénylates cyclases particulières, calcium-dépendantes, cytosoliques et indépendantes des protéines G trimériques (AC10)¹⁰⁵ ou membranaires (AC1,3,8)¹⁸⁰. Il faudrait maintenant identifier quelles ACs sont présentes dans les LTs puis déterminer leur implication dans ce processus en les invalidant par l'utilisation d'ARN interférence.

L'inhibiteur de l'activité de la PKA, H89, que nous avons utilisé dans cette partie est un inhibiteur pharmacologique de la PKA mais également de la PKG avec des constantes d'inhibition respectivement de $0.048 \pm 0.008\mu\text{M}$ et $0.48 \pm 0.13\mu\text{M}$ ¹⁸¹. L'effet inhibiteur de H89 repose sur un effet antagoniste compétitif de l'ATP au niveau du site de liaison de la sous-unité catalytique de la PKA^{182,183}. Il est nécessaire de confirmer nos résultats par l'utilisation d'un inhibiteur plus sélectif. En effet, l'action inhibitrice de ce composé est dépendante de la concentration en ATP¹⁸³. De plus, pour des concentration similaire, H89 pourrait également avoir des effets sur les canaux ioniques, RhoA, et d'autres kinases telles que ROCK¹⁸⁴. C'est pour ces raisons que nous allons refaire nos expériences en utilisant un peptide synthétique inhibiteur de la PKA, PKI¹⁸⁵.

Nos résultats suggèrent que tant dans les cellules au repos que dans les cellules stimulées par CXCL12, l'activité de la PKA semble jouer un rôle majeur dans la régulation de l'actine centrosomale. En effet une inhibition globale de son activité ou la délocalisation de cette kinase du centrosome (effet présupposé de l'Ht31 mais non validé) induit une accumulation d'actine dans les cellules non stimulées. A l'inverse, l'activation de la PKA suite à la stimulation induit une diminution de ce pool d'actine. La quantité d'actine centrosomale semble être donc inversement corrélée au niveau d'activité de la PKA au niveau du centrosome.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de la PKA, il serait nécessaire de caractériser les cibles de la PKA dans notre contexte. Une hypothèse est l'implication de la profiline. Pour rappel, la profiline est une protéine clé dans la régulation de la polymérisation de l'actine. Elle est capable de lier l'actine monomérique et différentes protéines impliquées dans la régulation de l'actine (formines...). La profiline aide à maintenir un pool d'actine-G utilisable pour la polymérisation. Des études montrent que la phosphorylation par la PKA de la profiline cause une diminution de l'élongation de filaments d'actine soit par altération de l'interaction entre la profiline et VASP¹²³, soit en inhibant l'interaction entre la profiline et l'actine-G¹²⁴. De plus, la profiline a été localisée au niveau du centrosome dans des cellules en interphase¹⁸⁶. Dans des cellules au repos, il semble exister un équilibre entre polymérisation et dépolymérisation d'actine au niveau du centrosome. Notre hypothèse serait que la phosphorylation par la PKA après la stimulation chimiokinique de la profiline inhiberait sa capacité à lier l'actine-G et à la rendre disponible pour la formation du lamellipode. Cet événement pourrait rompre cet équilibre en faveur de la dépolymérisation de l'actine centrosomale. Une autre manière plus efficace de caractériser les cibles potentielles de la PKA serait de faire une analyse comparée du protéome et du phosphoprotéome de centrosomes isolés à partir de cellules avant et après la stimulation avec CXCL12.

Il serait également intéressant de caractériser l'AKAP responsable de cette activité locale de la PKA. Des données dans la littérature suggèrent une implication de l'AKAP450 dans la migration des LTs. Cette AKAP450 est localisée au niveau du centrosome. Or ce n'est pas la seule AKAP dont la cible est le centrosome, l'AKAP220 est également ancrée au centrosome. A l'instar de l'AKAP450, cette AKAP est spécifique de la PKA de type II¹³⁵. L'inhibition par le peptide Ht31 peut donc également cibler cette AKAP. Cette AKAP interagit avec la protéine d'échafaudage IQGAP1 (IQ domain GTPase activating protein), interagissant avec de nombreuses protéines impliquées dans la morphologie et la migration cellulaire, telles que l'actine, la calmoduline, Rac et Cdc42. Une étude montre que l'interaction entre l'AKAP220 et IQGAP participe à l'intégration et au traitement des signaux de calcium et d'AMPC permettant une mobilisation locale des protéines impliquées dans l'établissement de l'axe de polarisation et la migration cellulaire¹⁸⁷. Afin de tester l'implication de l'AKAP450, nous nous proposons de surexprimer dans les cellules une forme tronquée de l'AKAP450 correspondant uniquement au domaine d'adressage de cette AKAP au centrosome. L'expression de ce domaine devrait empêcher

l'adressage au centrosome de toute protéine liée à cette AKAP. Dans ces conditions, notre signal PKA est-il toujours compartimenté ? les chimiokines induisent-elles toujours une déformation des cellules ?

Nous avons observé une corrélation entre le niveau d'actine au centrosome et la capacité des cellules à se déformer en réponse à CXCL12. En effet, tout traitement maintenant le niveau de ce pool d'actine élevé, semble également inhiber la polarisation. Pour compléter ces résultats et tenté d'établir un lien de causalité entre ces deux événements, nous nous proposons d'augmenter et de maintenir artificiellement à un niveau élevé l'actine centrosomale. Ceci sera réalisé en surexprimant la forme centrine-VCA-GFP comme précédemment décrit ¹⁸⁸. Les cellules sont-elles dans ces conditions toujours capables de se déformer ?

Le lien entre la diminution d'actine centrosomale et la capacité des cellules à former un lamellipode est encore obscur. On peut cependant penser que le réseau d'actine autour du centrosome pourrait servir de barrière empêchant l'entrée ou la sortie de protéine⁷⁹. Sa dépolymérisation en libérant des protéines jusqu'alors « piégées » dans cette zone pourrait permettre une augmentation locale de protéines nécessaire à la formation du lamellipode dans cette région de la cellule. Ce pourrait en particulier être le cas de l'actine-G et de Arp2. Il serait donc intéressant de suivre le devenir des protéines déplétées du centrosome notamment le complexe Arp2/3. Nous pourrions pour cela utiliser une construction, Arp2-Dendra2¹⁸⁹, photoconvertibles. Le suivi après stimulation chimiokine des protéines Arp2 photoconverties au niveau du centrosome serait très informatif. Les retrouve-t-on au niveau du lamellipode ?

Inversement, Obino *et al.*, ont montré que d'autres protéines étaient au contraire recrutées au niveau du centrosome après diminution de la cage d'actine. C'est en particulier le cas de DOCK2. Faute d'outils, nous n'avons pas été capables pour le moment de localiser DOCK2 au cours de la stimulation. Cependant, sachant que cette protéine permet l'activation de la RhoGTPase Rac1, nous avons testé l'effet d'un mutant dominant-négatif de Rac1 et montré l'implication de Rac1 dans la régulation de l'actine centrosomale tant au niveau basal qu'après stimulation chimiokine. De plus, les cellules exprimant la forme mutante ne sont plus capables de se polariser en réponse à CXCL12. Bien que devant être complétés, les résultats de cette étude suggèrent qu'après stimulation chimiokine le trio PKA, actine et centrosome joue un rôle majeur dans la mise en place du lamellipode.

2. VARIATIONS DE L'AMPC ET REMODELAGE DU CYTOSQUELETTE AU COURS DE LA MIGRATION DES LTS

2.1. Introduction

La motilité rapide et aléatoire des LTS est une conditionnée par des facteurs chimiques (principalement des chimiokines) et physiques (contraintes structurelles) spécifiques à ces environnements confinés. Même en absence d'obstacles physiques, une migration aléatoire est observée¹⁹⁰, suggérant l'existence de facteurs intrinsèques à la cellule régulant la directionnalité.

Nous avons vu dans la partie précédente que la voie de l'AMPC et de la PKA était impliquée dans la polarisation initiale des LTS en réponse aux chimiokines. Cette polarisation est caractérisée par l'acquisition d'un avant, le lamellipode et d'un arrière, l'uropode. Au cours de la migration des LTS, un remodelage continu du cytosquelette s'opère notamment à chaque fois que la cellule change de direction¹⁹¹. En effet la cellule ralentit puis rétracte son lamellipode, induisant ainsi une perte transitoire de la polarisation¹⁹². Un lamellipode se reforme ensuite le long d'un nouvel axe.

L'implication de l'AMPC est confuse dans ce contexte. De fait, l'effet négatif de l'AMPC est connu dans les LTS, soutenu par des études montrant qu'une augmentation importante des niveaux d'AMPs induits par des agents tels que la forskoline, les inhibiteurs de phosphodiesterase ou la prostaglandine E2 favorisent l'arrondissement des cellules et l'inhibition de leur migration¹⁹³⁻¹⁹⁶. En revanche, des études dans d'autres types cellulaires montre que l'AMPC pourrait jouer un rôle plus complexe par le biais de sa compartimentation¹⁹⁷⁻¹⁹⁹.

Dans le papier présenté ci-après, nous avons étudié les voies de signalisation contrôlant la trajectoire de migration des LTS. Nous démontrons que des augmentations spontanées et transitoires d'AMPC au niveau du front de migration sont suffisantes pour entraîner la réorganisation des LTS et leur changement de trajectoire.

cAMP Bursts Control T Cell Directionality by Actomyosin Cytoskeleton Remodeling

Morgane Simao ¹, Fabienne Régnier ¹, Sarah Taherally ^{1, 2}, Achille Fraisse ^{1, 3}, Rachida Tacine ¹, Marie Fraudeau ^{1, 4}, Adam Benabid ^{1, 5}, Vincent Feuillet ^{1, 6}, Mireille Lambert ¹, Jérôme Delon ¹, Clotilde Randriamampita ¹

1 : Institut Cochin, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale : U1016, Centre National de la Recherche Scientifique : UMR8104, Université de Paris : UM3

2 : Institut Jacques Monod, Centre National de la Recherche Scientifique : UMR_7592, Université de Paris

3 : Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard - Lyon I

4 : Institut de Recherche Servier

5 : Institut Pasteur de Paris

6 : Centre d'Immunologie de Marseille – Luminy, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale : UMR_S 1104, Aix Marseille Université : UM2

Publié en mai 2021 dans *Frontiers in Cell and Developmental Biology*.



cAMP Bursts Control T Cell Directionality by Actomyosin Cytoskeleton Remodeling

OPEN ACCESS

Edited by:

Balbino Alarcón,
Consejo Superior de Investigaciones
Científicas (CSIC), Spain

Reviewed by:

Yeh-Shiu Chu,
National Yang-Ming University, Taiwan
Won Fen Wong,
University of Malaya, Malaysia

*Correspondence:

Clotilde Randriamampita
clotilde.randriamampita@inserm.fr

†Present address:

Sarah Taheraly,
PSL Research University, Institut
Curie, INSERM, Paris, France
Marie Fraudeau,
Institut de Recherche Servier, Croissy,
France
Adam Benabid,
Department of Cell Biology, Institute
for Biomedical Engineering, Faculty of
Medicine, RWTH Aachen University,
Aachen, Germany
Vincent Feuillet,
Aix Marseille Université, CIML,
INSERM, CNRS, Marseille, France

Specialty section:

This article was submitted to
Cell Growth and Division,
a section of the journal
Frontiers in Cell and Developmental
Biology

Received: 24 November 2020

Accepted: 22 April 2021

Published: 20 May 2021

Citation:

Simao M, Régnier F, Taheraly S,
Fraisse A, Tacine R, Fraudeau M,
Benabid A, Feuillet V, Lambert M,
Delon J and Randriamampita C
(2021) cAMP Bursts Control T Cell
Directionality by Actomyosin
Cytoskeleton Remodeling.
Front. Cell Dev. Biol. 9:633099.
doi: 10.3389/fcell.2021.633099

Morgane Simao¹, Fabienne Régnier¹, Sarah Taheraly^{††}, Achille Fraisse^{1,2},
Rachida Tacine¹, Marie Fraudeau^{††}, Adam Benabid^{††}, Vincent Feuillet^{††},
Mireille Lambert¹, Jérôme Delon¹ and Clotilde Randriamampita^{1*}

¹ Université de Paris, Institut Cochin, INSERM, CNRS, Paris, France, ² Master de Biologie, École Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard Lyon I, Université de Lyon, Lyon, France

T lymphocyte migration is an essential step to mounting an efficient immune response. The rapid and random motility of these cells which favors their sentinel role is conditioned by chemokines as well as by the physical environment. Morphological changes, underlain by dynamic actin cytoskeleton remodeling, are observed throughout migration but especially when the cell modifies its trajectory. However, the signaling cascade regulating the directional changes remains largely unknown. Using dynamic cell imaging, we investigated in this paper the signaling pathways involved in T cell directionality. We monitored cyclic adenosine 3'-5' monophosphate (cAMP) variation concomitantly with actomyosin distribution upon T lymphocyte migration and highlighted the fact that spontaneous bursts in cAMP starting from the leading edge, are sufficient to promote actomyosin redistribution triggering trajectory modification. Although cAMP is commonly considered as an immunosuppressive factor, our results suggest that, when transient, it rather favors the exploratory behavior of T cells.

Keywords: lymphocyte, migration, cAMP, actomyosin, chemokine

INTRODUCTION

Fast and random motility of T lymphocytes is a prerequisite to perform efficient immune surveillance, as these cells need to scan the widest possible area in a short time within secondary lymphoid organs (Krummel et al., 2016). This motility is conditioned by the chemical (mainly chemokines) and physical (structural constraints) parameters specifically found in these confined environments. Even in the absence of physical obstacles, random migration is observed (see (Real et al., 2004) for instance), suggesting the existence of cell-intrinsic factors regulating the cell directionality.

T cells stimulated by chemokines lose their round shape within a few minutes, to acquire a clear polarized shape with a front, the lamellipodium, and a rear, the uropod. This asymmetry, required for their migration, is achieved by a rapid modification of their cytoskeleton (Moreau et al., 2018). In fact, chemokine stimulation triggers a rapid increase in polymerized actin (Real et al., 2007), especially branched actin which accumulates at the cell front giving the lamellipodium some highly dynamic properties adapted to the research strategy of T lymphocytes. Conversely, stable actin and actomyosin allow to maintain the structural shape of the cell body and to promote its contractility (Dupré et al., 2015; Chugh and Paluch, 2018). During T cell migration, continuous remodeling of

the cytoskeleton, such as the actin network, has to take place, especially each time cells modify their trajectory. Indeed, in this case, the cell slows down and its lamellipodium retracts, leading to the transient loss of cell asymmetry before being reestablished along another axis. Calcium has been clearly identified as the stop signal leading to lamellipodium retraction and migration inhibition when T cells encounter an antigen-presenting cell (Donnadieu et al., 1994; Dong et al., 2017). However, the signaling pathway involved in shape changes of chemokine-stimulated T cells during trajectory changes, remains unclear.

The role of cAMP upon migration remains confused depending on the cell types or the experimental conditions. In T lymphocytes, a negative effect of cAMP pathway has been known for a long time and is supported by different studies showing that agents inducing large increases in cAMP levels, such as forskolin, inhibitors of phosphodiesterases or prostaglandin E₂, promote cell rounding and migration inhibition (Valitutti et al., 1993; Oppenheimer-Marks et al., 1994; Layseca-Espinosa et al., 2003; Dong et al., 2006). Interestingly, in other cell types, cAMP seems to play a more complex role in cell migration through its compartmentalization. In fibroblasts or epithelial cells, an increase of cAMP-activated protein kinase (PKA) activity at the leading edge has been reported to promote cell migration (Howe et al., 2005; Lim et al., 2008; McKenzie et al., 2020). Conversely, in neutrophils, local increases in cAMP promote uropod retraction through the regulation of the non-muscle myosin II by PKA (Liu et al., 2010). The development of powerful biosensors makes it possible to measure cAMP (Klarenbeek et al., 2011) at the subcellular level even in small cells such as lymphocytes and with a good temporal resolution, and therefore to revisit the role of cAMP in T cell migration.

Using dynamic cell imaging, we here investigate the signaling pathways involved in trajectory control during T cell migration. We demonstrate that transient spontaneous increases in intracellular cAMP are sufficient to drive T cell actomyosin reorganization, leading to paths modifications.

MATERIALS AND METHODS

Cells

CEM T cells were cultured in RPMI 1640, supplemented with 10% FCS, 2 mM L-Glutamine, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin. When specified, cells were transfected by nucleofection (Amaxa Nucleofactor, Lonza) with 5 µg DNA for 5 millions of cells using the C-016 program. The cells were used the day after nucleofection.

Reagents

CXCL12 (recombinant human SDF1-α) was purchased from Peptrotech (300-28A) and VCAM-1 (CD106 Fc chimera protein) from R&D Systems (862-VC-100). Calcium measurements were performed with Fura-2/AM (Molecular Probes, F1225). DMACM-caged 8-Br-cAMP was purchased from Biolog (D044). Nucleus labeling was performed with Hoechst (Molecular Probes, H1399). F-actin detection was performed by expressing the LifeAct-mCherry construct (gift from Dr. A. Benmerah). Myosin

IIA was followed by expressing tagged form of Myosin Heavy Chain 9 (MyH9-GFP, gift from PJ Saez). Stable actin detection was performed with SiRActin (TebuBio, SC001) or with mRFP-Utrophin-CH (Addgene #64358).

Live Imaging Acquisition

For migration experiments, glass coverslips were coated with 1 µg/ml CXCL12 and 1 µg/ml VCAM-1 overnight at 4°C. After rinsing, coverslips were kept in mammalian saline buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, and 11 mM glucose) supplemented with 5% FCS. Cells were deposited on coverslips just before image acquisition started. Live imaging experiments were performed at 37°C with a wide-field Nikon TE2000, equipped with a CMOS camera (ORCA-flash4.0 LT, Hamamatsu). Images were acquired every 10 s with Metafluor software.

Actin, Myosin, and Nucleus

For total polymerized actin detection, cells were transfected with LifeAct-mCherry construct. For stable actin detection, cells were transfected with Utrophin-CH-RFP. For non-muscle Myosin IIA detection, cells were transfected with MyH9-GFP construct. For stable actin labeling, cells were incubated for 1 h with 250 nM SiRActin in complete medium at 37°C. After rinsing, cells were deposited on coated coverslips. Nucleus labeling was performed with 4 min incubation, using 2 µg/ml Hoechst. Distribution of compounds was followed by 650 nm Excitation/700 nm Emission for SiRActin, 560 nm Excitation/645 nm Emission for LifeAct-mCherry, 485 nm Excitation/525 nm Emission for MyH9-GFP and 360 nm Excitation/440 nm Emission for Hoechst.

cAMP Measurements

For cAMP measurements, cells were transfected with the most sensitive version of TEpacVV [H187 (Klarenbeek et al., 2015)]. TEpacVV was a gift from Dr. K. Jalink (Netherlands Cancer Institute). Experiments were performed 24 h after transfection, as previously described (Conche et al., 2009). Briefly, when cAMP increases, the probe undergoes a conformational change that allows a decrease of energy transfer between a turquoise molecule (Excitation 436 nm, Emission 470 nm) and two Venus molecules (Excitation 500 nm, Emission 535 nm) (Klarenbeek et al., 2011); the energy transfer can be measured as a change in FRET (Excitation 436 nm, Emission 535 nm). Three images were acquired every 10 s: visible, Turquoise channel and FRET channel. The ratio $R = \text{Turquoise}/\text{FRET}$, which gives an estimate of cAMP concentration, was calculated with MetaFluor (Roper Scientific) after background subtraction. An increase of this ratio corresponds to an increase in cAMP concentration.

Calcium Measurements

For calcium experiments, cells were loaded with 500 nM Fura-2/AM for 20 min at 37°C. Excitation was performed alternatively at 350 and 380 nm and emission recorded at 510 nm. The ratio (Exc 350, Em510/Exc380, Em510) was calculated with MetaFluor (Roper Scientific) after background subtraction. For combined cAMP and Ca measurements, TEpacVV-transfected cells were

loaded only with 200 nM Fura-2/AM in order to minimize the crosstalk between the four fluorescence signals.

Image Analysis

Cell Roundness

This parameter was quantified with ImageJ software and corresponds to: $\frac{4 \times \text{area}}{\pi \times (\text{major axis})^2}$. It is equal to 1 for a round cell and < 1 for a polarized one.

Front/Back Ratios

With Metamorph software, a 6–9 pixels wide scanline along the cell axis was drawn. The front/back ratio was then calculated by dividing the intensity at the front edge to the one measured at the back one.

Angles

Angle measurements were performed with ImageJ by drawing lines along the polarization axes observed between two consecutive lamellipodia formation.

Pearson Coefficient

In cells transfected with MyH9-GFP and labeled with SiRActin, Pearson Coefficient was measured on Fiji (ImageJ software, version 1.51 u) by using a macro containing the Coloc2 plugin. This coefficient measures the degree of overlap between two stainings and was used to quantify the degree of colocalization between MyH9-GFP and SiRActin staining. A Pearson Coefficient value of 0 means that there is no colocalization between the two stainings. By contrast, a Pearson Coefficient value of 1 means that there is a perfect colocalization between MyH9-GFP and SiRActin.

Kymographs

Kymographs have been performed with Metamorph software by drawing a line as wide as the cell along the migration axis.

Cross-Correlation

Cross-correlation was used to study the correlation between cAMP variations and cell shape (roundness). The Pearson correlation coefficient (ρ) between two time courses was computed as a function of time lag (τ):

$$\rho(\tau) = \frac{\sum[(x(i) - \bar{x}) \times (y(i \mp \tau) - \bar{y})] 1}{\sqrt{\sum (x(i) - \bar{x})^2 \times \sum (y(i \mp \tau) - \bar{y})^2}}$$

with x and y variables and \bar{x} and \bar{y} variable means.

Local Leading Edge Release of cAMP

CEM were incubated with 20 μ M DMACM-caged 8-Br-cAMP for 3 h at 37°C. SiRActin (250 nM) was added to the medium during the last hour. Cells were rinsed and deposited on VCAM-1/CXCL12 coated coverslips for 30 min at 37°C. The experiment was performed by using an iMIC TILL Photonics microscope equipped with two cameras EMCCD (ANDOR Technology) and 60x objective (numerical aperture: 1.49) + 1.5 zoom. Images were acquired every 5 s. After four image acquisitions, the release of

DMACM-caged 8-Br-cAMP was performed with a 405 nm laser (Toptica iBAEM 110 mV, 1 ms illumination, 100% power) by adjusting a 7 μ m diameter region at the level of the leading edge of a migrating cell. For control experiments, a similar protocol was followed except that the cells were incubated with DMSO instead of caged-cAMP for the same duration.

Traction Force Microscopy

Traction force microscopy experiments were performed with the help of Cell Biomechanics facility of Cochin Institute.

Hydrogel Preparation

Hydrogels (~700Pa) were prepared with acrylamide (3%, Sigma #A4058), bis-acrylamide (0.3%, Sigma #M1533-25), streptavidin-acrylamide (Invitrogen, S21379) and Flash Red 0.2 μ m fluorescent beads (Bangs Laboratories, FSFR002). Streptavidin-acrylamide was used at 1/100,000 molecular ratio to acrylamide as previously described (Saitakis et al., 2017). After activation with TEMED and ammonium persulfate, 11 μ l of the polymerization mix was added on a non-functionalized 12 mm diameter coverslip. A functionalized glass coverslip coated with silane (Sigma, 17-1330-01) was placed on top. Polymerization was performed at room temperature for 30 min.

Mechanical Properties of the Polyacrylamide Gels

Gels were unmolded by removing the non-functionalized coverslip. We then checked whether the bead distribution on the top surface was suitable for traction forces measurement (~2000 beads per 512 \times 512 pixels field). The Young Modulus was then calculated according to (Gross and Kress, 2017). In brief, tungsten carbide spheres with known radius (0.4 and 0.6 mm) and density (15,630 g/l) were deposited on the hydrogel surface. We then measured the gel deformation induced by the bead by acquiring z-images of the fluorescent beads embedded in the gel, focusing on the bottom and the top of the gel with an indentation of 0.2 μ m. By using ImageJ, we measured the gel height and the collapse distance of the sphere. The Young Modulus was calculated by using a R code based on (Gross and Kress, 2017) (available on demand).

Functionalization of Hydrogel Surface

We used the specific biotin-streptavidin binding and anti-Fc/Fc binding to form a sandwich of macromolecules for the functionalization of polyacrylamide gels. All gel surfaces were incubated with 10 μ g/ml of a goat anti-human IgG Fc biotinylated antibody (Abcam: ab97223) in PBS-BSA 0.2% overnight at 4°C. Gels were then incubated with 10 μ g/ml recombinant human VCAM-1/CD106 Fc chimera in PBS-BSA 0.2% for 2 h at 37°C. We were not able to experimentally assess the VCAM-1 surface density, but theoretically calculated the density of streptavidin molecules on the gel. For this we used the three assumptions enunciated in Saitakis et al. (2017). In brief, (1) the volume of the hydrated gel (with culture medium) that we were able to calculate with the thickness and the coverslip diameter, is approximately 40% bigger than the initial volume of the polymerization mix (Hynd et al., 2007). (2) All the streptavidin-acrylamide molecules within the

polymerization mix polymerized within the gel. (3) Biotinylated anti-Fc antibody can access the first 10 nm of the gel (10 nm is the approximated size of the streptavidin molecule) due to their own size and the size of the pore reported in the literature (Trappmann et al., 2012). We then calculated that the theoretical surface density of streptavidin-acrylamide is 25 molecules/ μm^2 .

Traction Force Measurements

Traction force microscopy experiments were performed with 20x objective (numerical aperture 0.75) and 1.5 zoom. CXCL12-stimulated (100 ng/ml) cells were deposited on a VCAM-1-coated gel for 30 min at 37°C. Transmitted light and corresponding fluorescent images of beads and actin were acquired every 10 s using the MetaMorph software.

Force Image Analysis

We first aligned images of the fluorescent beads to correct the drift by using the ImageJ plugin Stack Reg. The forces were calculated by the method described in Martiel et al. (2015). Basically, the displacement field was calculated by Particle Image Velocimetry (PIV) plugin implemented in ImageJ. The PIV was performed through an iterative process. For each iteration, the displacement was calculated by the normalized correlation coefficient algorithm, so that an individual interrogation window was compared with a larger searching window. Each subsequent iteration took into account the displacement field measured previously. The resulting final grid size for the displacement field was $5.04 \mu\text{m} \times 5.04 \mu\text{m}$ with more than six beads per interrogation window on average. With the displacement field obtained by PIV analysis, the traction force field was reconstructed by the Fourier transform traction cytometry (FTTC) method (Martiel et al., 2015) with FTTC ImageJ plugin. The regularization parameter was set at 8×10^{-11} for all traction force reconstructions.

After this calculation, the forces along the cell body were isolated. The cell length was normalized by establishing that the cell front corresponds to 0% and the back to 100%. When specified (Figures 1C, 2D,E), the forces along the cell axis were pooled.

Statistics

The statistical tests used for sample comparison are specified in the figure legends. In the figures, ns: not significant. They were performed with GraphPad software or RStudio.

RESULTS

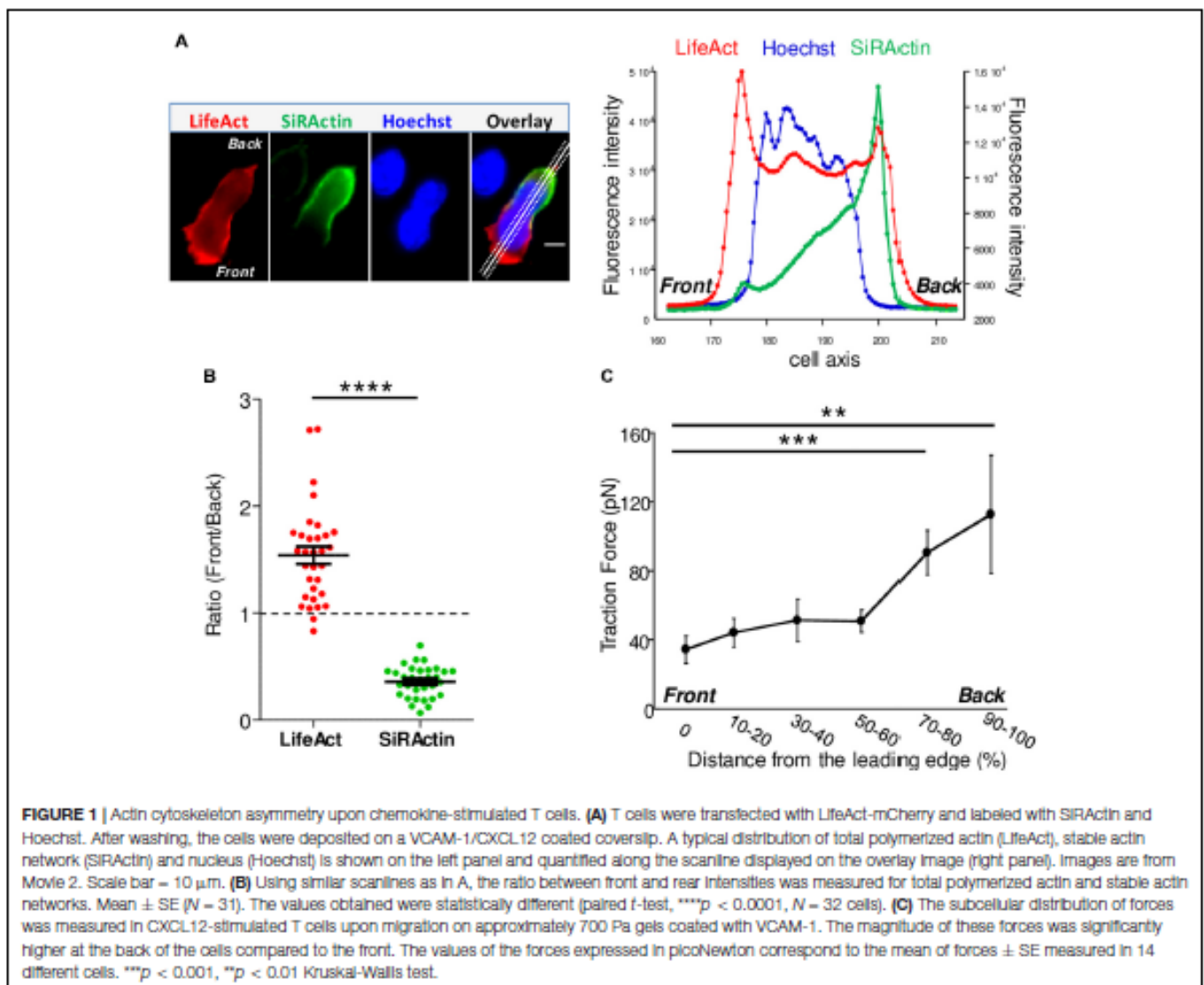
Remodeling of Actin Cytoskeleton in Chemokine-Stimulated T Lymphocytes

Upon chemokine stimulation, T cells lose their symmetrical shape and become polarized. This modification can be visualized by depositing CEM T cells, a lymphoblastic cell line which expresses CXCR4, the receptor of the CXCL12 chemokine (C-X-C motif chemokine 12 or stromal cell derived factor 1), on a glass coverslip coated with the integrin VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) and CXCL12. In these conditions,

cells randomly migrate at a speed of $6.19 \pm 0.03 \mu\text{m}/\text{min}$ ($N = 80$ cells) (illustrated in **Supplementary Movie 1**). In order to follow in real time and at the subcellular level cytoskeleton reorganization, T cells were transfected with mCherry-tagged LifeAct, a peptide able to bind to F-Actin. As shown in **Figure 1A**, polymerized actin is observed mainly at the front of the cell which corresponds to newly polymerized actin, as previously described (Real et al., 2007). In order to distinguish this pool from stable actin which constitutes the main pool of F-actin in unstimulated cells, SiRActin [a fluorescent cell-permeable F-Actin binding compound (Milroy et al., 2012; Lukinavicius et al., 2014)] was used. Resting cells were incubated for 1 h with SiRActin, rinsed and then stimulated so that the newly polymerized actin was not labeled. In these conditions, we clearly observed that, contrary to total polymerized actin, the stable actin network was restricted to the back of the cell behind the nucleus (**Figure 1A** and **Supplementary Movie 2**). The distribution of the two actin networks was quantified by drawing a scanline along the antero-posterior axis of the cell and then by measuring the ratio of intensities between the front and the back as shown in the example presented in **Figure 1A**. A ratio superior to 1 indicates an accumulation at the cell front. A statistical difference was measured between the localization of these two actin networks: total polymerized actin accumulates at the cell front while stable actin mainly accumulates at the back (**Figure 1B**). We next wondered whether the polarization of actin networks could be correlated with a mechanical asymmetry during T cell migration. To answer this question, we used the dynamic Traction Force Microscopy technique (Nerger et al., 2017) which allows the forces developed by the cells upon migration on polyacrylamide (PAA) gels to be measured. T lymphocytes are fast-moving cells, therefore they are expected to develop low forces on their substrate. For this reason, we used soft PAA gels of about 700 Pa and measured how T cells were able to displace fluorescent beads embedded within the PAA gel while they migrate. As quantified in **Figure 1C** and illustrated in **Supplementary Figures 1A,C** and T cells clearly imprint centripetal forces with a maximum intensity at the back of the cells and minimal intensity at the front, as previously observed in neutrophils (Jannat et al., 2011). The intensity of the forces we measured was very low, i.e., 100 times smaller than what was measured in neutrophils on gels with comparable stiffness (Jannat et al., 2011). We can therefore conclude that, during migration, T lymphocytes adhere mainly, but poorly, where stable actin accumulates.

Actomyosin Relocalization Upon Trajectory Modification

The asymmetrical distribution of SiRActin remains stable upon migration. We thus investigated its behavior when cells retract their lamellipodium. This step is specifically required when cells round up and eventually change their direction. The example presented in **Supplementary Figures 2A,B** (kymograph and corresponding thumbnails) summarizes the different steps: upon migration, stable actin remains accumulated at the back of the cell (step 1) and (step 3); the retraction of the lamellipodium is accompanied by the relocalization of stable actin at the front



where it rapidly accumulates (step 2) and (step 4). If the cell changes its direction (step 2), the stable actin will migrate entirely to this point which will constitute the new back of the migrating cell, as shown on the kymograph (**Supplementary Figure 2A**, red arrow). Conversely, if the cells round up (step 4) (yellow arrow), the stable actin will progressively redistribute homogeneously all around the cell membrane (step 5). The complete series of images is displayed in **Supplementary Movie 3**. The distribution of the stable actin is quantified on a series of cells during these different steps (**Figure 2A**): while, as previously shown in **Figure 1B**, it is clearly accumulated at the back upon migration ($R = 0.35 \pm 0.01$, $N = 85$ events from 60 different cells), a transient accumulation at the front is observed during lamellipodium retraction ($R = 1.89 \pm 0.13$, $N = 53$ events from 28 different cells) before it disperses around the membrane ($R = 0.98 \pm 0.04$, $N = 19$ events from 16 different cells) when the cell rounds up. A similar relocalization of stable actin was observed when, having developed two lamellipodia, a cell retracts one of them (**Supplementary Figure 2C**). To

confirm the results we obtained with SiRActin, we used another marker of stable actin, Utrophin-CH (Melak et al., 2017). In this case, a relocalization of stable actin network similar to the one detected with SiRActin is also observed upon lamellipodium retraction (**Supplementary Figures 3A,B**). Interestingly, non-muscle myosin-IIA [the main myosin isoform in T lymphocytes (Jacobelli et al., 2004)] displays a distribution similar to that of SiRActin as attested by Myosin Heavy Chain 9 (MyH9) localization upon migration, retraction and in round cells (**Figure 2B**). Indeed, MyH9 clearly accumulates at the cell back upon migration ($R = 0.58 \pm 0.03$, $N = 77$ events from 42 different cells), relocates to the cell front during lamellipodium retraction ($R = 2.09 \pm 0.13$, $N = 69$ events from 36 different cells) while it distributes uniformly when the cell rounds up ($R = 1.02 \pm 0.06$, $N = 20$ events from 17 different cells). In these three configurations, a colocalization is observed between SiRActin and MyH9 distributions as shown in the example presented in **Supplementary Figure 2B** and **Supplementary Movie 4**. The strong correlation between the two markers is

attested by Pearson Coefficient (PC) ≥ 0.7 (PC = 0.70 ± 0.02 , $N = 39$ events from 24 migratory cells; PC = 0.71 ± 0.03 , $N = 32$ events from 21 cells retracting their lamellipodium; PC = 0.74 ± 0.05 , $N = 7$ events from 7 cells rounding up) (Figure 2C). This result suggests that the stable actin network detected by SiRActin mainly corresponds to actomyosin. Lamellipodium retractions were associated with a modification of the cell shape: the cell rounds up before it eventually elongates in another direction. We therefore measured simultaneously over time, the relocalization of SiRActin to the lamellipodium (measurement of the front/back ratio along the cell axis) together with the cell roundness and quantified the delay between the two events. We observed that the accumulation of actin at the front starts at 8.7 ± 4.0 s ($N = 38$ cells) before the cells begin to round up, suggesting that the relocalization of the stable actin might drive the retraction of the lamellipodium. Finally, we examined whether the relocalization of stable actin was accompanied by a redistribution of the forces developed by the cells. As shown in Figure 2D and illustrated in Supplementary Figures 1B,C, once again the distribution of high intensity forces is similar to that of stable actin: upon retraction, contrary to migratory conditions, centripetal forces at the level of the lamellipodium, reached intensities similar to those observed at the back of the cell. The intensities at the cell front were statistically higher than those observed in migrating cells, while no differences were observed at the back (Figure 2E). Once the cells have rounded, forces can no longer be measured (Supplementary Figure 1D).

cAMP Variations Upon Trajectory Modification

We next wondered what the signaling pathway which triggers changes of direction and the simultaneous redistribution of the stable actin might be. Calcium has recently been associated with pausing upon confinement-induced T cell migration (Dong et al., 2017). Although, in our conditions, calcium (Ca) transients could sometimes be observed upon migration, they were neither systematic (Supplementary Figure 4A), nor associated with change of direction (Supplementary Figure 4B). We therefore focused on cAMP which has also been described as playing a role during migration (Howe, 2004). We used the very sensitive FRET biosensor, TEpacVv (Klarenbeek et al., 2011, 2015) to follow intracellular cAMP levels. As shown in the example presented in Figure 3A and Supplementary Movie 5, cAMP levels remained low upon migration, except at very specific moments when the cell stopped and eventually changed its direction. This can be visualized on the associated kymograph by the red zones corresponding to high cAMP levels. By zooming in on a change of direction (Figure 3A, white dotted rectangle), it appears that the cAMP increase starts at the cell front before invading the whole cell (Figure 3B). By combining cAMP and Ca measurements, we were able to demonstrate that no Ca variations could be detected in cells presenting some cAMP transients upon change of direction (Supplementary Figure 4C). The cellular heterogeneity in cAMP ratio was quantified by drawing scanlines along the antero-posterior axis of migrating cells. The front to back ratios were compared in cells which

migrate, retract their lamellipodia or round up. While this ratio is equal to 1.00 ± 0.02 ($N = 32$ cells) upon migration, it increases up to 1.30 ± 0.03 ($N = 32$ cells) when the cells retract their lamellipodium before decreasing back to 1.00 ± 0.04 ($N = 8$ cells) once the cells have rounded up, meaning that lamellipodium retraction is associated with a local increase of cAMP at the cell front (Figure 3C). In our experimental conditions, some cells failed to migrate and went on repetitive elongation/retraction cycles (Figures 3D–F). Interestingly, these cells displayed cAMP oscillations (see Supplementary Figure 5A for two examples) with a very similar period from cell to cell (211.8 ± 11.7 s, $N = 29$ cells, Supplementary Figure 5B) and which is very regular for a given cell (Supplementary Figure 5C). These oscillations were associated with morphological changes corresponding to elongation/retraction cycles during which the level of cAMP starts to rise in the lamellipodium before invading the whole cell when it rounds up (Figure 3D and zoom in Figure 3E). The complete series of images is displayed in Supplementary Movie 6. In these cells, the antero-posterior ratio of cAMP was 1.05 ± 0.03 ($N = 35$ cells) upon elongation, increased to 1.38 ± 0.05 ($N = 35$ cells) upon retraction, before decreasing to 0.99 ± 0.03 ($N = 32$ cells) in round cells (Figure 3F). These values were very similar to those measured in migrating cells (Figure 3C). In order to quantify the coupling between cAMP level and the shape of the cells, the roundness was measured simultaneously with cAMP as in the example presented in Figure 4A (left panel). Clearly, the two parameters oscillate at the same frequency. However, an offset of 50 s is necessary in this example to synchronize cAMP levels and roundness (Figure 4A, right panel). A cross-correlation analysis was performed for a series of cells (see methods for details) and reveals that the most significant positive correlation between the two parameters (0.36 ± 0.05 , $N = 17$ cells) is obtained with a 40–50 s temporal offset (Figure 4B). In other words, this result shows that cells start to round up 40 to 50 s after cAMP begins to rise.

In order to measure to what extent this event triggers a modification of cell trajectory, we measured the angle formed between the polarization axes observed between two consecutive lamellipodia separated by cAMP-induced lamellipodium retraction. As displayed on Figure 3G, the cells preferentially repolarize with an angle between 90° and 180° (Mean of 108.4 ± 4.7 ; $N = 111$ repolarization events from 37 cells) showing that cAMP transients favor directional changes.

Control of Stable Actin Relocalization by cAMP

To address the direct link between cAMP increase and stable actin recruitment, the two parameters were monitored simultaneously. As shown in the example presented in Figure 5A and in Supplementary Movie 7, a local increase of cAMP can first be observed in the lamellipodium which is followed by a recruitment of stable actin at this position. This observation has been quantified over time by measuring the front/back ratio for cAMP along a scanline together with the stable actin recruitment (Figure 5A, right panel) and the time lag was measured (gray arrow). The delay between the two events was 40.5 ± 3.6 s ($N = 39$

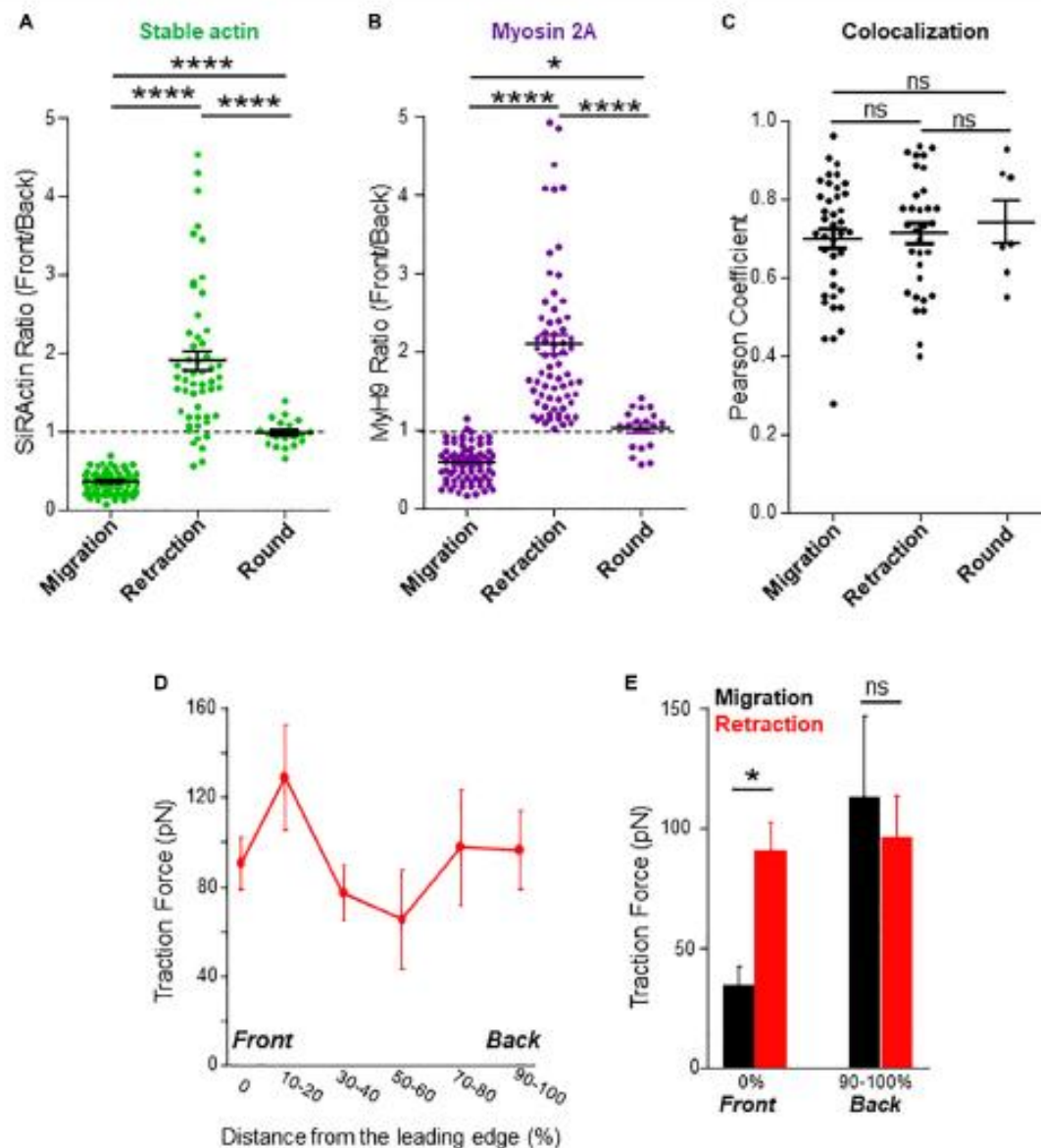


FIGURE 2 | Stable actin relocalization. **(A)** The front to back ratio of SiRActin intensities were measured by drawing a scanline along the cell axis of cells upon migration, while the lamellipodium retracted and once the cell had rounded up. Values correspond to the mean \pm SE of 85 events from 80 different cells (migration), 53 events from 28 different cells (lamellipodium retraction) and 19 rounding events from 16 different cells (after retraction). Statistical analysis was performed through a one way ANOVA test with a Tukey post-test. **** $p < 0.0001$. **(B)** The front to back ratio of Myr19-GFP intensities were measured by drawing a scanline along the cell axis of cells upon migration, while the lamellipodium retracted and once the cell had rounded up. Values correspond to the mean \pm SE of 77 events from 42 different cells (migration), 69 events from 36 different cells (lamellipodium retraction) and 20 rounding events from 17 different cells (after retraction). Statistical analysis was performed through a one way ANOVA test with a Tukey post-test. **** $p < 0.0001$, * $p < 0.05$. **(C)** In cells transfected with Myr19-GFP and labeled with SiRActin, Pearson coefficient was measured upon migration, while the lamellipodium retracted and once the cell had rounded up. Values correspond to the mean \pm SE of 39 events from 24 different cells (migration), 32 events from 21 different cells (lamellipodium retraction) and seven rounding events from seven different cells (after retraction). Statistical analysis was performed through a one way ANOVA test with a Tukey post-test. ns: not significant. **(D)** Subcellular distribution of forces was measured in CXCL12-stimulated T lymphocytes upon lamellipodium retraction on approximately 700 Pa gels coated with VCAM-1. The values of the forces expressed in piconewton correspond to the mean of forces \pm SE measured in eight different cells retracting their lamellipodium. **(E)** Comparison of the values of the forces measured in 14 migrating cells (black) or in eight cells retracting their lamellipodium (red) at their front (0%) or their back (90–100%). * $p < 0.05$ Kruskal-Wallis test.

retraction events from 21 different cells, **Figure 5B**). This result indicates that the local increase in cAMP appears first, followed by the recruitment of stable actin. In order to establish with

certainly the causal link between the two events, we artificially generated a local increase in cAMP in the lamellipodium by using a caged form of the nucleotide (DMACM-caged 8-Br-cAMP).

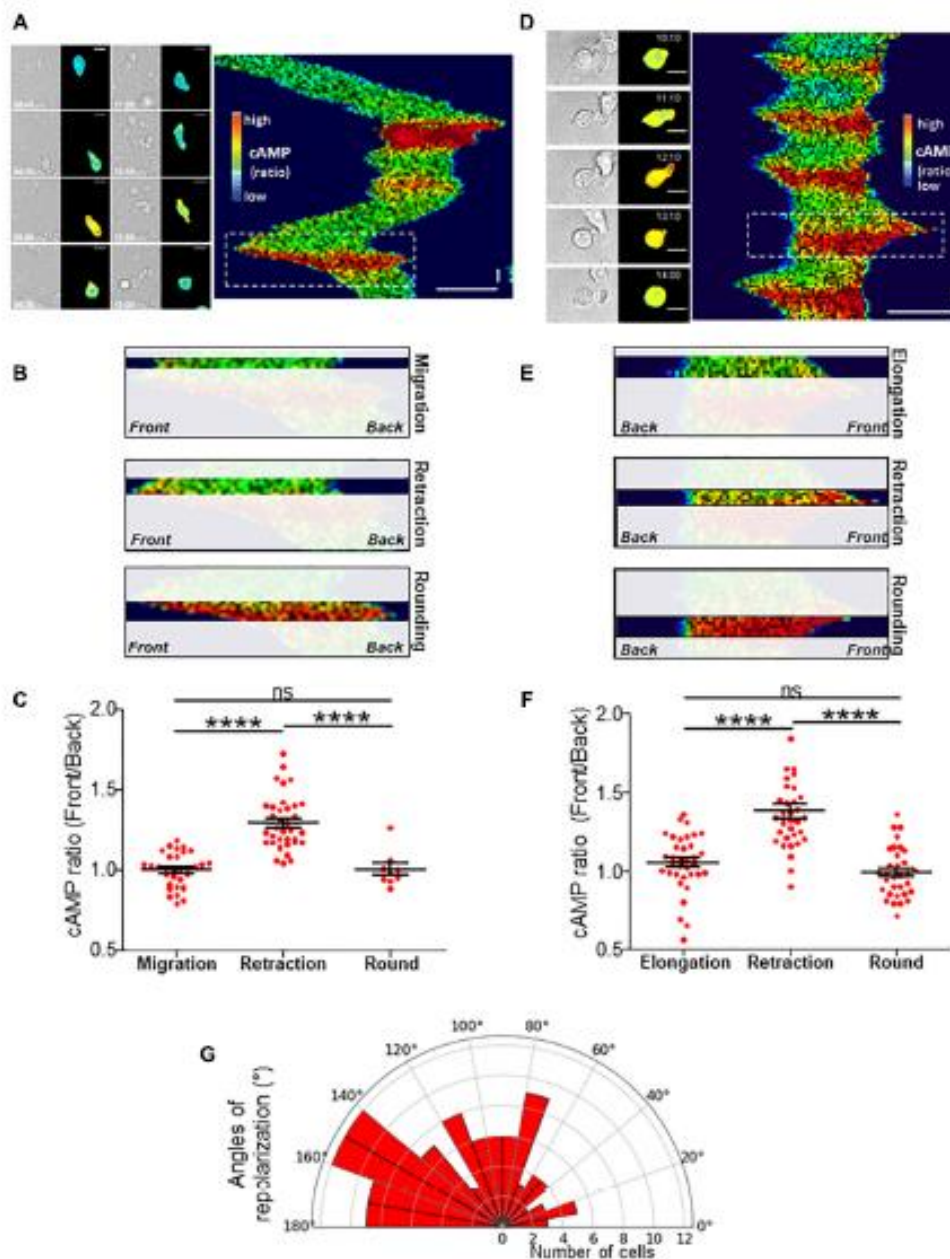
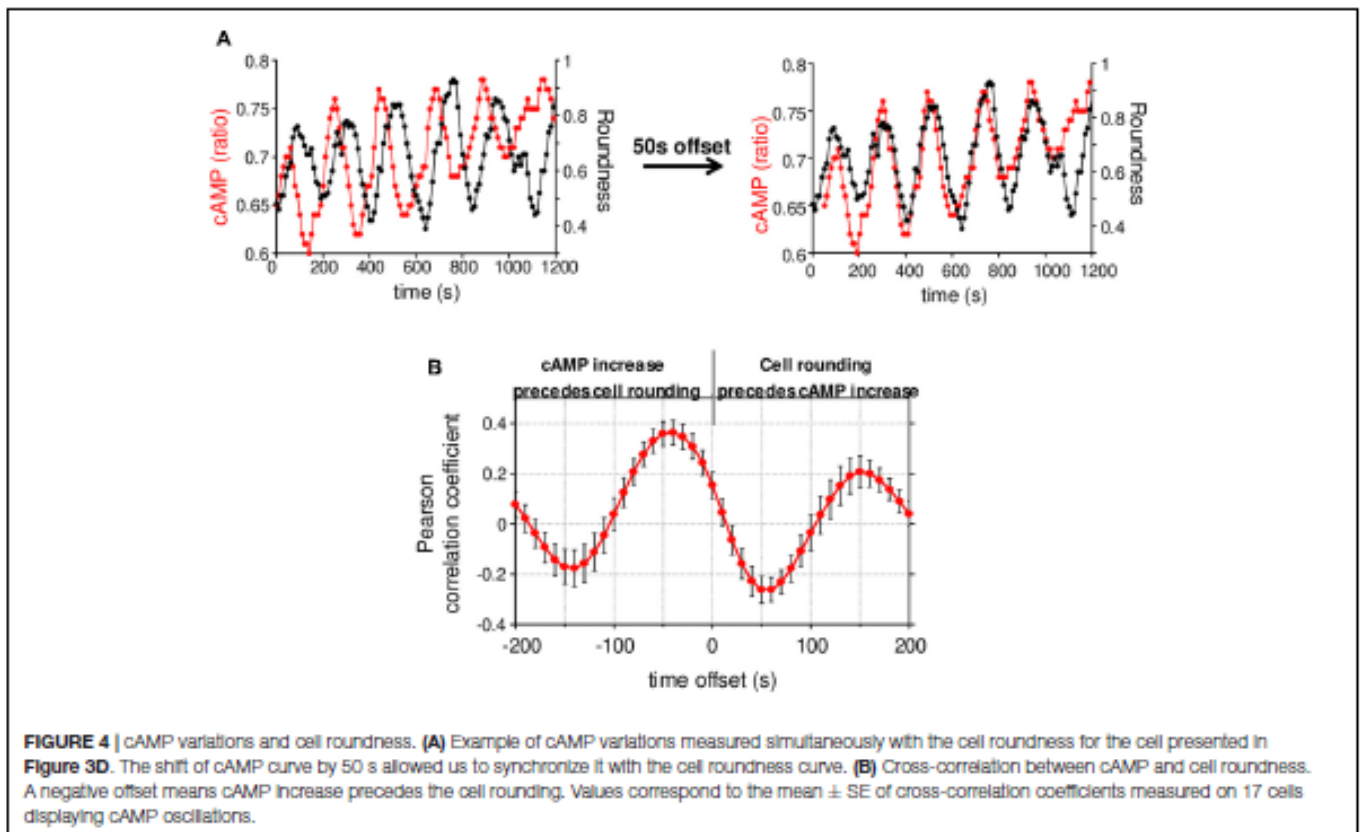


FIGURE 3 | cAMP variations upon migration. **(A)** Example of a TEPacVW-transfected T cell migrating on a CXCL12/VCAM-1-coated coverslip. The corresponding kymograph was established along the antero-posterior axis of the cell. The x axis corresponds to the average cAMP level along the cell while the y axis corresponds to time. cAMP levels were coded in false colors. The complete series of images is shown in **Supplementary Movie 5**. Horizontal scale bar = 10 μm , vertical scale bar = 1 min. **(B)** Zoom of the zone corresponding to the white rectangle in the kymograph presented in **(A)** illustrating that the increase of cAMP starts from the front before invading the whole cell. **(C)** Ratios of cAMP level from the front to the back of the cell were measured by drawing scanlines along antero-posterior axis in migrating cells, cells retracting their lamellipodium or after they rounded up. Values correspond to the mean \pm SE of 32 events (migration), 36 events (retraction), 8 values (round cells after retraction) from 11 different cells. Statistical analysis was performed through a one way ANOVA test with a Tukey post-test. **** $p < 0.0001$. **(D)** Example of cAMP variations measured in a TEPacVW-transfected T cell displaying elongation/retraction cycles on a CXCL12/VCAM-1-coated coverslip. During recording, the cell presents 5 such cycles as displayed on the kymograph. The complete series of images is displayed in **Supplementary Movie 6**. Horizontal scale bar = 10 μm , vertical scale bar = 1 min. **(E)** Zoom of the zone corresponding to the white rectangle in the kymograph presented in **(D)** illustrating that the increase of cAMP starts at the front before invading the whole cell. **(F)** Ratios of front to back cAMP levels measured in cells displaying elongation/retraction cycles. Values correspond to the mean \pm SE of 35 values (elongation), 35 values (lamellipodium retraction) and 32 values (round cells after retraction) from 9 different cells. Statistical analysis was performed through a one way ANOVA test with a Tukey post-test. **** $p < 0.0001$. **(G)** Polar distribution of repolarization angles. Values correspond to the angle formed between polarization axes observed between two consecutive lamellipodia separated by cAMP-induced lamellipodium retraction. Width of sectors = 10°. Values correspond to 111 measurements performed on 37 different cells.



Unfortunately, this compound is weakly fluorescent and the release of a coumarin analog in addition to 8-Br-cAMP upon DMACM-caged 8-Br-cAMP uncaging, prevents us to measure simultaneously with our FRET biosensor, the rise in cAMP we trigger in these conditions. However, we can expect that the use of this compound allowed us to generate a transient rise in cAMP after illumination at 405 nm as we observed in a previous study (Conche et al., 2009) and to analyze its consequences on the distribution of stable actin, together with cell roundness. Illumination of the leading edge on a 7 μ m diameter region induces the recruitment of SiRActin and a lamellipodium retraction when cells have been incubated with caged 8-Br-cAMP (**Figure 5C** and **Supplementary Movie 8**), but not in control conditions (**Supplementary Movie 9**). The frequency of retraction upon laser illumination was significantly higher in cells which had been loaded with caged-cAMP compared to control cells (**Figure 5D**). The retraction events observed in control cells probably correspond to illumination-induced or spontaneous retraction events. After cAMP-induced retraction, cells remain round or form a new lamellipodium in another direction (**Supplementary Movie 8**). As shown in **Figure 5E**, the accumulation of stable actin starts 35.2 ± 5.5 s ($N = 23$ cells) after cAMP release, while the lamellipodium begins to retract after 48.8 ± 6.5 s ($N = 21$ cells). This result demonstrates that a local increase in cAMP is sufficient to induce the recruitment of stable actin and the subsequent retraction of the lamellipodium. Interestingly, by generating an artificial increase in cAMP, the delays measured between

the three steps (increase in cAMP/relocalization of stable actin/retraction of the lamellipodium) were very similar to those measured in chemokine-stimulated cells (**Figure 5F**), suggesting the involvement of a similar sequence of events in the two configurations and pointing out to cAMP as the upstream initial trigger of the whole sequence of cytoskeletal-driven morphological alterations responsible for directional changes in T cell migration.

DISCUSSION

T cell migration conditions an efficient immune response. The rapid and random displacement of these cells constitutes an important property for an optimization strategy for foreign antigen detection. Although anatomical constraints might impose T cell trajectory, we focus here on the influence of the chemical environment, i.e., chemokine, on T cell migration. We demonstrate that cell intrinsic factors are sufficient to promote random migration upon chemokine stimulation. Our results highlight a three step time sequence of signaling events, summarized in **Figure 5F**. Altogether, our results demonstrate that during T cell migration, a pool of actin corresponding to actomyosin displays an asymmetrical distribution. Surprisingly, this pool is mobile and sets the cell polarity: while it is restricted to the back of the cell upon migration, it is recruited at the lamellipodium upon cell rounding. We have shown that this redistribution is triggered by a rise in cAMP which starts at

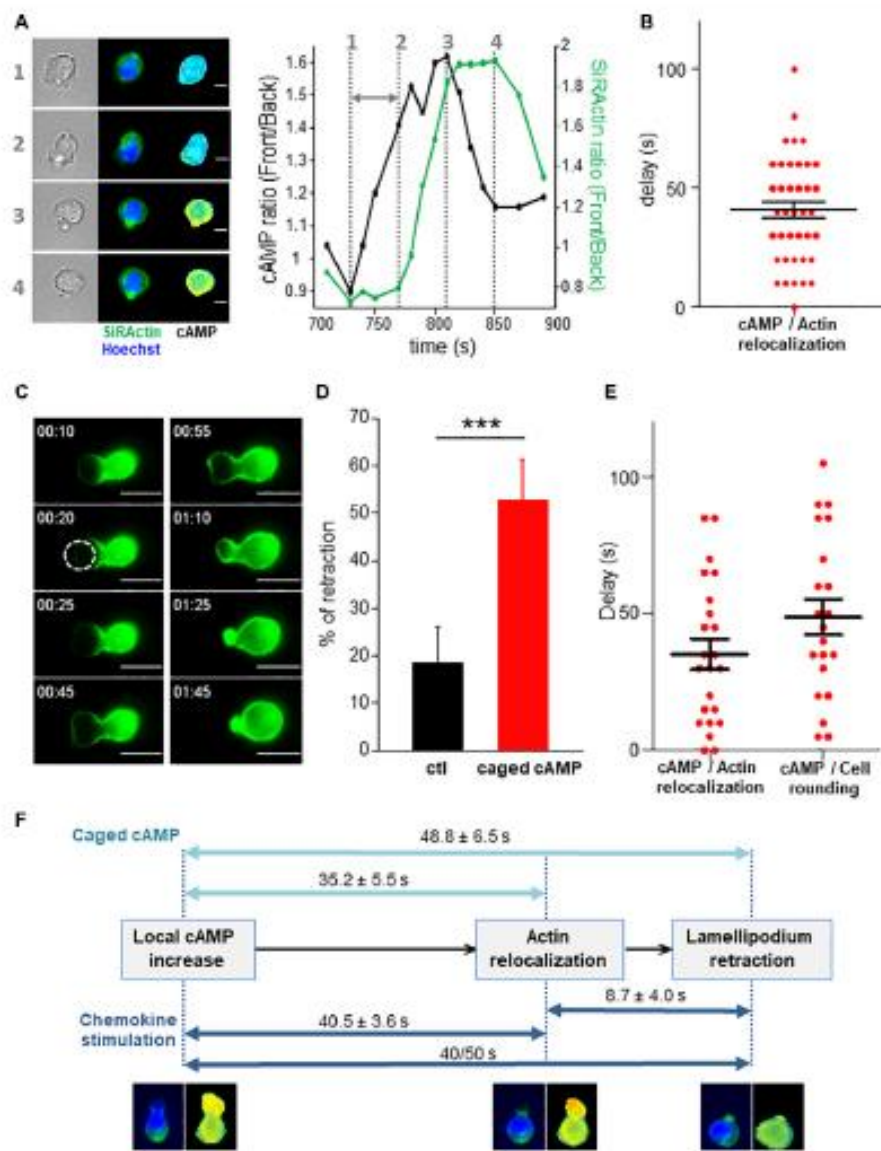


FIGURE 5 | cAMP increase drives stable actin relocalization. **(A)** Example of stable actin distribution recorded simultaneously with cAMP variations. The quantification of the two events is shown on the graph and the delay between the two is indicated by the gray arrow. The numbers show the times of the 4 steps. The complete series of images is shown in **Supplementary Movie 7**. Scale bar = 10 μ m. **(B)** Delays between the beginning of cAMP increase and SIRActin relocalization measured as shown in **(A)**. Values correspond to the mean \pm SE of delays corresponding to 39 retraction events from 21 different cells. **(C)** Example of rounding up and actin relocalization induced by local release of cAMP after illumination at 405 nm. The cell was incubated previously with DMACM-caged 8-Br-cAMP and labeled with SIRActin. The size of the laser spot is indicated by the white circle. The complete series of images is shown in **Supplementary Movie 8**. Scale bar = 10 μ m. **(D)** For each experiment, the frequency of lamellipodium retraction taking place within 2 min after illumination was quantified in cells pre-incubated with DMSO (ctl) or caged cAMP. Values correspond to the mean of nine independent experiments (6–21 cells/experiments). *** $p < 0.001$ paired t-test. **(E)** The delay between cAMP release and stable actin relocalization or increase of the roundness value was measured. For each cell, relocalization of SIRActin was measured over time as well as the roundness. The delay corresponds to the moment at which the values start to increase. Values correspond to the mean \pm SE of 23 cells for actin relocalization and 21 for the roundness. **(F)** Summary of the three sequential steps leading to cell rounding: local increase in cAMP, recruitment of stable actin at the cell front cell, retraction of the lamellipodium leading to the rounding up of the cells. The delays measured in the different experiments are indicated. Dark blue: observation of migrating cells, light blue: artificial increase of cAMP induced by local photo-release of caged-cAMP.

the cell front before invading the whole cell. Interestingly, the cAMP-induced lamellipodium retraction is followed by the repolarization of the cells in another direction with a mean angle of about 110° and therefore promotes the exploratory behavior of the cells.

We may wonder what triggers cAMP bursts observed during T cell migration. The cells displaying repetitive elongation/retraction cycles as observed in some of our experiments might be a good model to address this issue. cAMP oscillations indicate that cells are able to synthesize and

degrade cAMP at high frequency (2.5 min). Surprisingly, the oscillation period is very similar from cell to cell, which suggests a universal cell-intrinsic cross-talk between adenylate cyclases and phosphodiesterases, the enzymes which, respectively, synthesize and degrade cAMP. One interesting possibility would be that cell deformation by itself, i.e., membrane stretching, could be the driving force of cAMP bursts. Indeed, the increase in membrane tension generated during migration (Pontes et al., 2017), might drive a cAMP increase, as suggested in other systems (Alenghat et al., 2009; McKenzie et al., 2020). In this context, the cAMP-induced recruitment of actomyosin would reduce this stretch by retracting the lamellipodium, and therefore inhibit the synthesis of cAMP. In parallel, cAMP increase *via* protein kinase A, one of the main targets of cAMP (Torres-Quesada et al., 2017), could activate phosphodiesterases (Gancedo, 2013) [such as PDE4 highly expressed in T cells (Sheth et al., 1997)] thus accelerating the cAMP decrease.

The link between cAMP and local recruitment of stable actin is another puzzling observation. As summarized in Figure 5F, a 40–50 s delay is necessary for stable actin to increase at the front after cAMP rise, suggesting that the link between the two events involves a multi-step signaling cascade which might involve PKA. Furthermore, upon lamellipodium retraction, we have observed a restricted zone of stable actin accumulation although the cAMP increase finally invades the whole cell. This suggests that a signal is generated very locally after cAMP increases. An interesting possibility would be the involvement of A Kinase anchoring proteins (AKAP), a family of proteins which would be able to convert the diffusible signal brought by cAMP into spatially restricted PKA activity (Dema et al., 2015).

Finally, the local recruitment of actomyosin at the lamellipodium results in its retraction within few seconds. Upon neutrophil migration, local increases in cAMP observed at the back of the cell have been reported to induce uropod retraction due to the regulation of non-muscle myosin IIA activity by PKA (Liu et al., 2010). Therefore, while cAMP promotes cell migration in neutrophils, it promotes exploratory behavior in T cells. Indeed, the local increase in cAMP is observed at the T cell front and promotes lamellipodium retraction (and then a change of trajectory) rather than at neutrophil back to promote uropod retraction (and therefore favoring migration). Furthermore, in T cells, retraction is due to cAMP-induced actomyosin relocalization rather than an increase in actomyosin activity as observed in neutrophils.

cAMP is generally considered as a messenger which dampens immune responses (Mosenden and Tasken, 2011). However, this statement must be qualified according to the characteristics of the cAMP increase. Indeed, for T cell activation, although high and sustained cAMP rises have been reported to inhibit TCR signaling such as calcium increase, Ick activation or IL2 production (Henney and Lichtenstein, 1971; Tamir et al., 1996; Vang et al., 2001; Hermann-Kleiter et al., 2006; Daher et al., 2019), we have previously shown that T cell adhesion to antigen-presenting cells triggers a transient increase in cAMP which lowers the antigen detection threshold and therefore favors T cell responses (Conche et al., 2009). Concerning migration, similarly, high and sustained cAMP rises triggered by pharmacological

drugs, PGE2 or β -adrenergic receptors stimulation, are known to inhibit T cell motility (Valitutti et al., 1993; Oppenheimer-Marks et al., 1994; Layseca-Espinosa et al., 2003; Dong et al., 2006). However, our present study highlights on the contrary that transient bursts in cAMP, by remodeling the actin cytoskeleton, might favor the exploratory behavior of T cells, a crucial step to mounting an efficient immune response. It might therefore be important to revisit the immunosuppressive effect of cAMP. Indeed, spatiotemporal and intensity control of cAMP signal is crucial for T cell properties: although sustained rise of cAMP may be inhibitory, transient increase of this messenger may, conversely, favor T cell responses.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MS, FR, ST, AF, RT, MF, AB, VE, JD, and CR performed experiments and analyzed data. ML helped with the experimental design of Traction Force Microscopy experiments. AF wrote R code for gel rigidity measurements. MS, JD, and CR designed experiments and wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by Cochin Institute (PIC Program), Association pour la Recherche contre le Cancer (PJA 20131200379), CNRS, INSERM and Université de Paris. MS was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank G. Bismuth for helpful discussions and comments on the manuscript, Anna Mularski for helpful advice on Traction Force Microscopy, J. L. Martiel and Q. Tseng for ImageJ plugins for Traction Force Microscopy and advice, K. Jalink for TEpacVV construct, P. Saez for MyH9 construct, A. Benmerah for LifeAct construct, and the IMAG'IC facility for technical advice on local uncaging.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.633099/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Alenghat, F. J., Tytell, J. D., Thodeti, C. K., Derrien, A., and Ingber, D. E. (2009). Mechanical control of cAMP signaling through integrins is mediated by the heterotrimeric Galphas protein. *J. Cell. Biochem.* 106, 529–538. doi: 10.1002/jcb.22001
- Chugh, P., and Paluch, E. K. (2018). The actin cortex at a glance. *J. Cell Sci.* 131:jcs186254. doi: 10.1242/jcs.186254
- Conche, C., Boulla, G., Trautmann, A., and Randriamampita, C. (2009). T cell adhesion primes antigen receptor-induced calcium responses through a transient rise in adenosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Immunity* 30, 33–43. doi: 10.1016/j.immuni.2008.10.020
- Daher, C., Vimeux, L., Stoeva, R., Peranzoni, E., Bismuth, G., Wieduwild, E., et al. (2019). Blockade of beta-adrenergic receptors improves CD8(+) T-cell priming and cancer vaccine efficacy. *Cancer Immunol. Res.* 7, 1849–1863. doi: 10.1158/2326-6066.CCR-18-0833
- Dema, A., Perets, E., Schulz, M. S., Deak, V. A., and Klussmann, E. (2015). Pharmacological targeting of AKAP-directed compartmentalized cAMP signalling. *Cell. Signal.* 27, 2474–2487. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.09.008
- Dong, H., Osmanova, V., Epstein, P. M., and Brocke, S. (2006). Phosphodiesterase 8 (PDE8) regulates chemotaxis of activated lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 713–719. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.04.143
- Dong, T. X., Othy, S., Greenberg, M. L., Jairaman, A., Akunwafo, C., Leverrier, S., et al. (2017). Intermittent Ca(2+) signals mediated by Orai1 regulate basal T cell motility. *eLife* 6:e27827. doi: 10.7554/eLife.27827
- Donnadiou, E., Bismuth, G., and Trautmann, A. (1994). Antigen recognition by helper T cells elicits a sequence of distinct changes of their shape and intracellular calcium. *Curr. Biol.* 4, 584–595. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00130-5
- Dupré, L., Houmadi, R., Tang, C., and Rey-Barroso, J. (2015). T Lymphocyte migration: an action movie starring the actin and associated actors. *Front. Immunol.* 6:586. doi: 10.3389/fimmu.2015.00586
- Gancedo, J. M. (2013). Biological roles of cAMP: variations on a theme in the different kingdoms of life. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 88, 645–668. doi: 10.1111/brv.12020
- Gross, W., and Kress, H. (2017). Simultaneous measurement of the Young's modulus and the Poisson ratio of thin elastic layers. *Soft Matter* 13, 1048–1055. doi: 10.1039/c6sm02470j
- Henney, C. S., and Lichtenstein, L. M. (1971). The role of cyclic AMP in the cytolytic activity of lymphocytes. *J. Immunol.* 107, 610–612.
- Hermann-Kleiter, N., Thuille, N., Pfeilhofer, C., Gruber, T., Schafer, M., Zitt, C., et al. (2006). PKC θ and PKA are antagonistic partners in the NF-AT transactivation pathway of primary mouse CD3+ T lymphocytes. *Blood* 107, 4841–4848. doi: 10.1182/blood-2005-10-4044
- Howe, A. K. (2004). Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochim. Biophys. Acta* 1692, 159–174. doi: 10.1016/j.bbamcr.2004.03.005
- Howe, A. K., Baldor, L. C., and Hogan, B. P. (2005). Spatial regulation of the cAMP-dependent protein kinase during chemotactic cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 14320–14325. doi: 10.1073/pnas.0507072102
- Hynd, M. R., Frampton, J. P., Burnham, M. R., Martin, D. L., Dowell-Mesfin, N. M., Turner, J. N., et al. (2007). Functionalized hydrogel surfaces for the patterning of multiple biomolecules. *J. Biomed. Mater. Res. A* 81, 347–354. doi: 10.1002/jbm.a.31002
- Jacobelli, J., Chmura, S. A., Buxton, D. B., Davis, M. M., and Krummel, M. F. (2004). A single class II myosin modulates T cell motility and stopping, but not synapse formation. *Nat. Immunol.* 5, 531–538. doi: 10.1038/ni1065
- Jannat, R. A., Dembo, M., and Hammer, D. A. (2011). Traction forces of neutrophils migrating on compliant substrates. *Biophys. J.* 101, 575–584. doi: 10.1016/j.bpj.2011.05.040
- Klarenbeek, J., Goedhart, J., van Batenburg, A., Groenewald, D., and Jalink, K. (2015). Fourth-generation epac-based FRET sensors for cAMP feature exceptional brightness, photostability and dynamic range: characterization of dedicated sensors for FLIM, for ratiometry and with high affinity. *PLoS One* 10:e0122513. doi: 10.1371/journal.pone.0122513
- Klarenbeek, J. B., Goedhart, J., Hink, M. A., Gadella, T. W., and Jalink, K. (2011). A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range. *PLoS One* 6:e19170. doi: 10.1371/journal.pone.0019170
- Krummel, M. F., Bartumeus, F., and Gerard, A. (2016). T cell migration, search strategies and mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 193–201. doi: 10.1038/nri.2015.16
- Layseca-Espinosa, E., Baranda, L., Alvarado-Sanchez, B., Portales-Perez, D., Portillo-Salazar, H., and Gonzalez-Amaro, R. (2003). Rolipram inhibits polarization and migration of human T lymphocytes. *J. Invest. Dermatol.* 121, 81–87. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12301.x
- Lim, C. J., Kain, K. H., Tkachenko, E., Goldfinger, L. E., Gutierrez, E., Allen, M. D., et al. (2008). Integrin-mediated protein kinase A activation at the leading edge of migrating cells. *Mol. Biol. Cell* 19, 4930–4941. doi: 10.1091/mbc.e08-06-0564
- Liu, L., Das, S., Losert, W., and Parent, C. A. (2010). mTORC2 regulates neutrophil chemotaxis in a cAMP- and RhoA-dependent fashion. *Dev. Cell* 19, 845–857. doi: 10.1016/j.devcel.2010.11.004
- Lukinavicius, G., Reymond, L., D'Este, E., Masharina, A., Gottfert, F., Ta, H., et al. (2014). Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton. *Nat. Methods* 11, 731–733. doi: 10.1038/nmeth.2972
- Martiel, J. L., Leal, A., Kurzawa, L., Ballard, M., Wang, L., Vignaud, T., et al. (2015). Measurement of cell traction forces with ImageJ. *Methods Cell Biol.* 125, 269–287. doi: 10.1016/bs.mcb.2014.10.008
- McKenzie, A. J., Svec, K. V., Williams, T. F., and Howe, A. K. (2020). Protein kinase A activity is regulated by actomyosin contractility during cell migration and is required for durotaxis. *Mol. Biol. Cell* 31, 45–58. doi: 10.1091/mbc.e19-03-0131
- Melak, M., Plessner, M., and Grosse, R. (2017). Actin visualization at a glance. *J. Cell Sci.* 130, 525–530. doi: 10.1242/jcs.189068
- Milroy, L. G., Rizzo, S., Calderon, A., Ellinger, B., Erdmann, S., Mondry, J., et al. (2012). Selective chemical imaging of static actin in live cells. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 8480–8486. doi: 10.1021/ja211708z
- Moreau, H. D., Piel, M., Voituriez, R., and Lennon-Dumenil, A. M. (2018). Integrating physical and molecular insights on immune cell migration. *Trends Immunol.* 39, 632–643. doi: 10.1016/j.it.2018.04.007
- Mosenden, R., and Tasken, K. (2011). Cyclic AMP-mediated immune regulation—overview of mechanisms of action in T cells. *Cell. Signal.* 23, 1009–1016. doi: 10.1016/j.cellsig.2010.11.018
- Nerger, B. A., Siedlik, M. J., and Nelson, C. M. (2017). Microfabricated tissues for investigating traction forces involved in cell migration and tissue morphogenesis. *Cell. Mol. Life. Sci.* 74, 1819–1834. doi: 10.1007/s00018-016-2439-z
- Oppenheimer-Marks, N., Kavanaugh, A. F., and Lipsky, P. E. (1994). Inhibition of the transendothelial migration of human T lymphocytes by prostaglandin E2. *J. Immunol.* 152, 5703–5713.
- Pontes, B., Monzo, P., Gole, L., Le, A., Roux, L., Kosmalska, A. J., et al. (2017). Membrane tension controls adhesion positioning at the leading edge of cells. *J. Cell Biol.* 216, 2959–2977. doi: 10.1083/jcb.201611117
- Real, E., Faure, S., Donnadiou, E., and Delon, J. (2007). Cutting edge: atypical PKCs regulate T lymphocyte polarity and scanning behavior. *J. Immunol.* 179, 5649–5652. doi: 10.4049/jimmunol.179.9.5649
- Real, E., Kaiser, A., Raposo, G., Amara, A., Nardin, A., Trautmann, A., et al. (2004). Immature dendritic cells (DCs) use chemokines and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, but not DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin, to stimulate CD4+ T cells in the absence of exogenous antigen. *J. Immunol.* 173, 50–60. doi: 10.4049/jimmunol.173.1.50
- Saitakis, M., Dogniaux, S., Goudot, C., Bufi, N., Asnacios, S., Maurin, M., et al. (2017). Different TCR-induced T lymphocyte responses are potentiated by stiffness with variable sensitivity. *eLife* 6:e23190. doi: 10.7554/eLife.23190
- Sheth, S. B., Chaganti, K., Bastepe, M., Ajuria, J., Brennan, K., Biradavolu, R., et al. (1997). Cyclic AMP phosphodiesterases in human lymphocytes. *Br. J. Haematol.* 99, 784–789. doi: 10.1046/j.1365-2141.1997.4803282.x
- Tamir, A., Granot, Y., and Isakov, N. (1996). Inhibition of T lymphocyte activation by cAMP is associated with down-regulation of two parallel mitogen-activated protein kinase pathways, the extracellular signal-related kinase and c-jun N-terminal kinase. *J. Immunol.* 157, 1514–1522.
- Torres-Quesada, O., Mayrhofer, J. E., and Stefan, E. (2017). The many faces of compartmentalized PKA signalosomes. *Cell. Signal.* 37, 1–11. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.05.012

- Trappmann, B., Gautrot, J. E., Connelly, J. T., Strange, D. G., Li, Y., Oyen, M. L., et al. (2012). Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate. *Nat. Mater.* 11, 642–649. doi: 10.1038/nmat3339
- Valitutti, S., Dessing, M., and Lanzavecchia, A. (1993). Role of cAMP in regulating cytotoxic T lymphocyte adhesion and motility. *Eur. J. Immunol.* 23, 790–795. doi: 10.1002/eji.1830230403
- Vang, T., Torgersen, K. M., Sundvold, V., Saxena, M., Levy, F. O., Skalhegg, B. S., et al. (2001). Activation of the COOH-terminal Src kinase (Csk) by cAMP-dependent protein kinase inhibits signaling through the T cell receptor. *J. Exp. Med.* 193, 497–507. doi: 10.1084/jem.193.4.497

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Simao, Régnier, Taherly, Fraisse, Tacine, Fraudeau, Benabid, Feuillet, Lambert, Delon and Randriamampita. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary Material

Figure S1

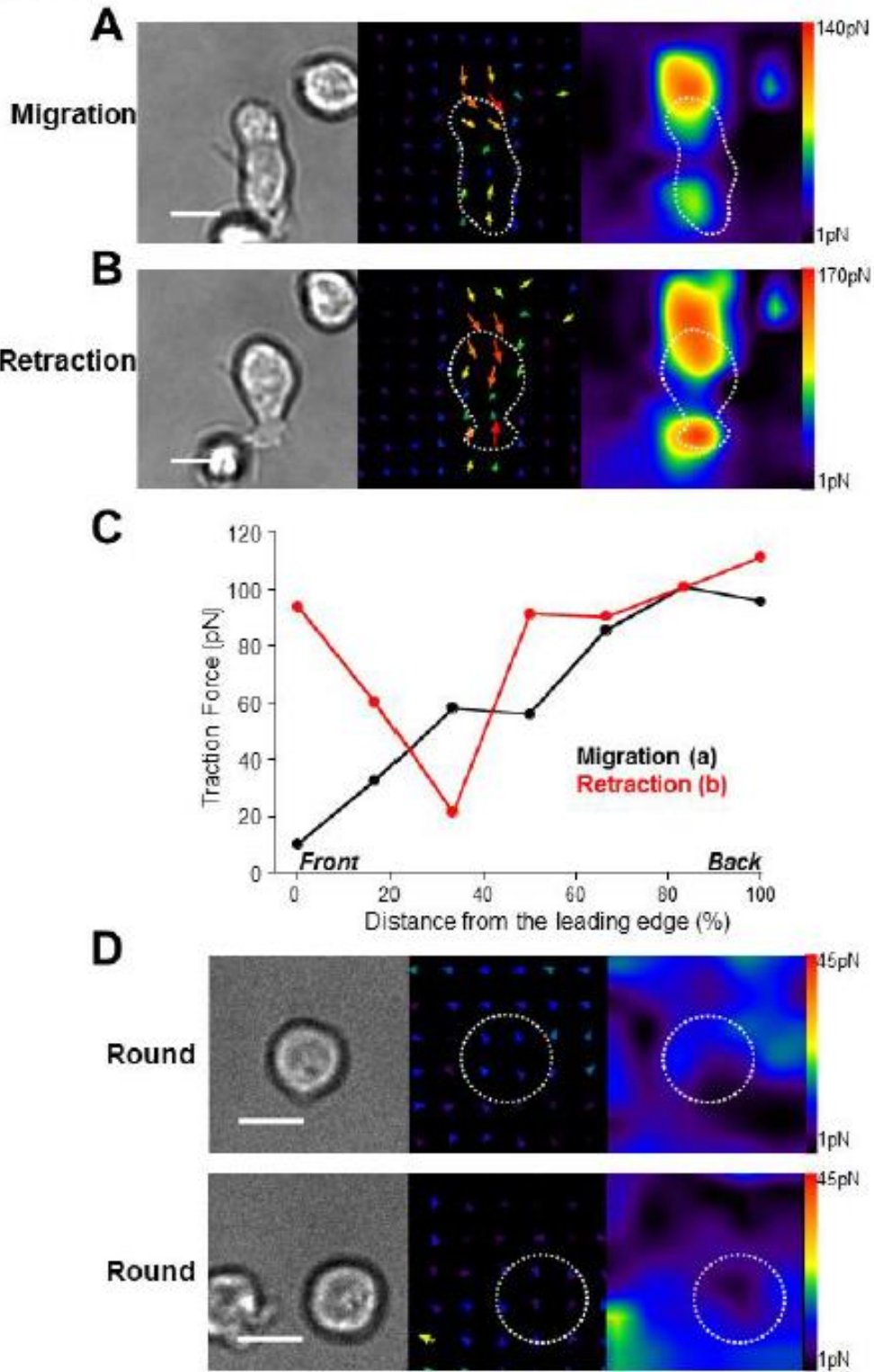


Figure S1: Example of Traction Force Microscopy

A- CXCL12-stimulated cell migrating (left panel: transmitted light picture) on VCAM-1 coated gel develops centripetal forces (vectorplot, center panel) whose magnitude is at a maximum at the back (Heatmap, right panel). The cell outline is indicated by a white dotted line. Note that the size of the gel area deformed by the cell is larger than the cell itself. The color code indicates the traction force intensity in picoNewton.

B- The same cell as in (A) is retracting its lamellipodium. Although the forces are still centripetal (vectorplot, center panel), similar intensities can be measured at the back and at the cell front (Heatmap, right panel). As in (A) the size of the gel area deformed by the cell is larger than the cell itself. The cell outline is indicated by a white dotted line.

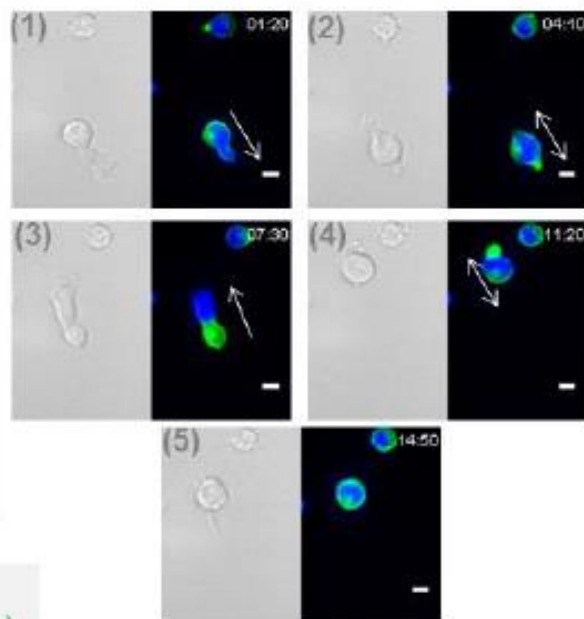
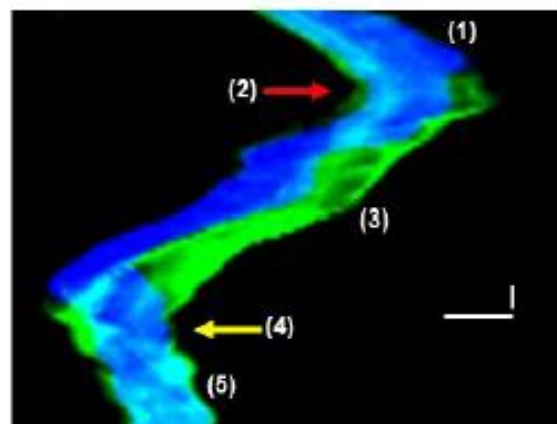
C- Quantification of the forces along the cell presented in (A & B) upon migration and retraction of its lamellipodium.

D- Two examples of cells which no longer imprint forces on the gel after lamellipodium retraction. Vectorplot in the center and Heatmap on the right.

Scale bar = 10 μ m

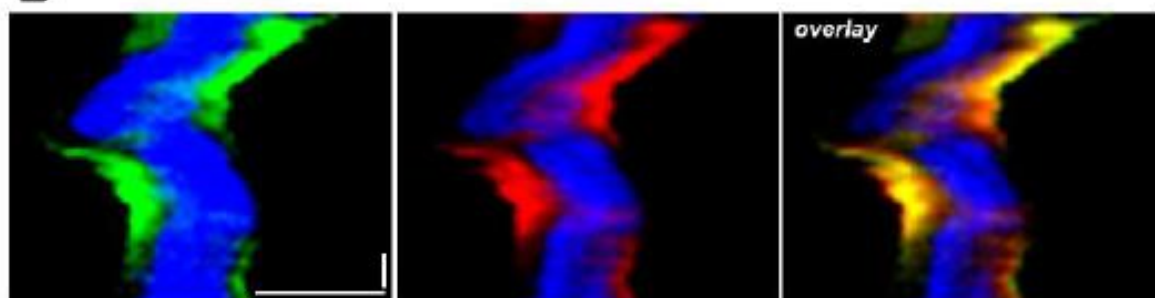
Figure S2

A



Nucleus (Hoechst)
Stable actin (SiR-Actin)
Myosin IIA (MyH9-GFP)

B



C

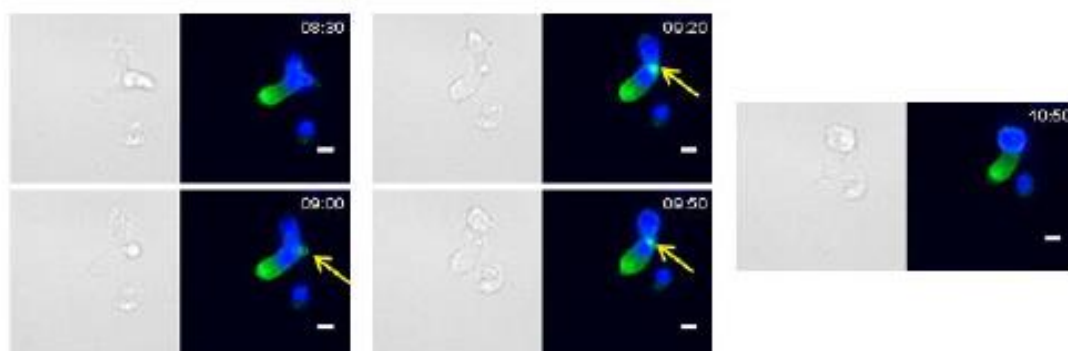


Figure S2: Stable actin and non-muscle myosin IIA relocalization upon lamellipodium retraction

Supplementary Material

A- A typical example of stable actin distribution (SiRActin) and nucleus localization (Hoechst) is shown on the kymograph. The x axis corresponds to the average SiRActin intensity along the cell while the y axis corresponds to time. Numbers indicate the different steps: (1) and (3): the cell is migrating. (2), red arrow: it changes its direction. (4), yellow arrow: the cell rounds up. (5): the cell remains round. The associated images are shown on the right panel and the complete series of images in Movie S3. Horizontal scale bar = 10 μ m, vertical scale bar = 1min.

B- A typical example of stable actin (SiRActin), Myosin IIA (MyH9-GFP) distributions and nucleus localization (Hoechst) is shown on the kymographs. The x axis corresponds to the average SiRActin, MyH9-GFP or Hoechst intensities along the cell while the y axis corresponds to time. The complete series of images is shown in Movie S4. Horizontal scale bar = 10 μ m, vertical scale bar = 1min.

C- Example of a cell developing two simultaneous lamellipodia. The local recruitment of stable actin (yellow arrow) allows the retraction of one of them.

Figure S3

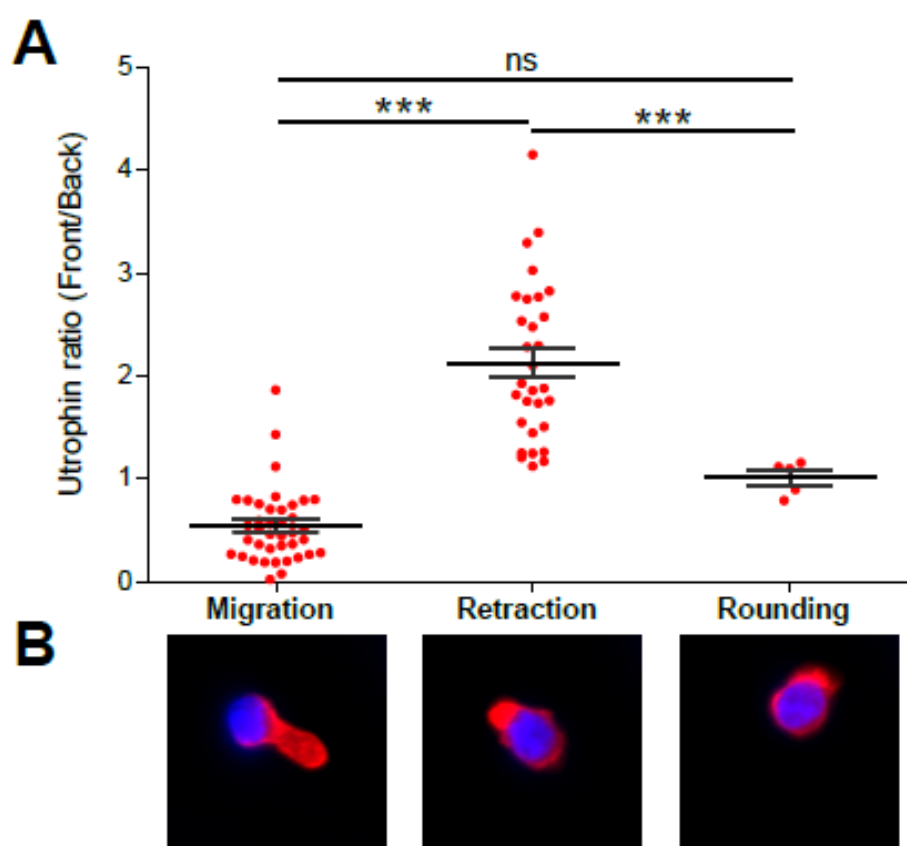


Figure S3: Utrophin relocalization upon lamellipodium retraction

A- In cells transfected with the Utr-CH-RFP construct, the front to back ratio intensities were measured by drawing a scanline along the axis of cells upon migration, while the lamellipodium retracted and once the cell had rounded up. Values correspond to the mean \pm SE of 39 events from 32 different cells (migration), 30 events from 23 different cells (lamellipodium retraction) and 5 rounding events from 5 different cells (after retraction). Statistical analysis was performed through a 1way ANOVA test with a Tukey post-test. **** $p < 0.0001$.

B- Example of Utrophin (in red) distribution during migration, lamellipodium retraction and in round cells. Nucleus is labeled with DAPI (in blue).

Figure S4

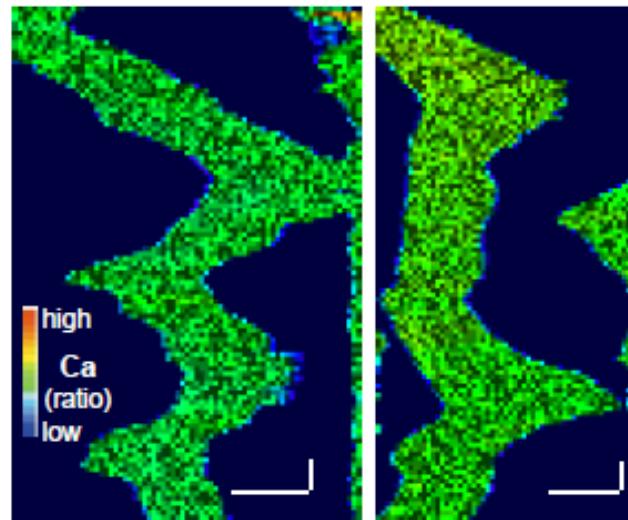
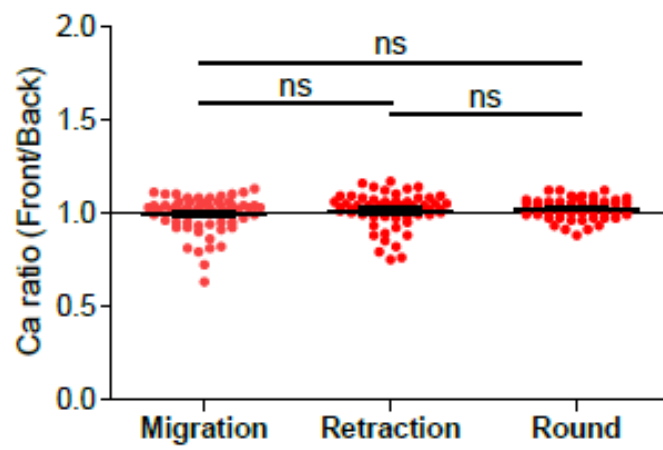
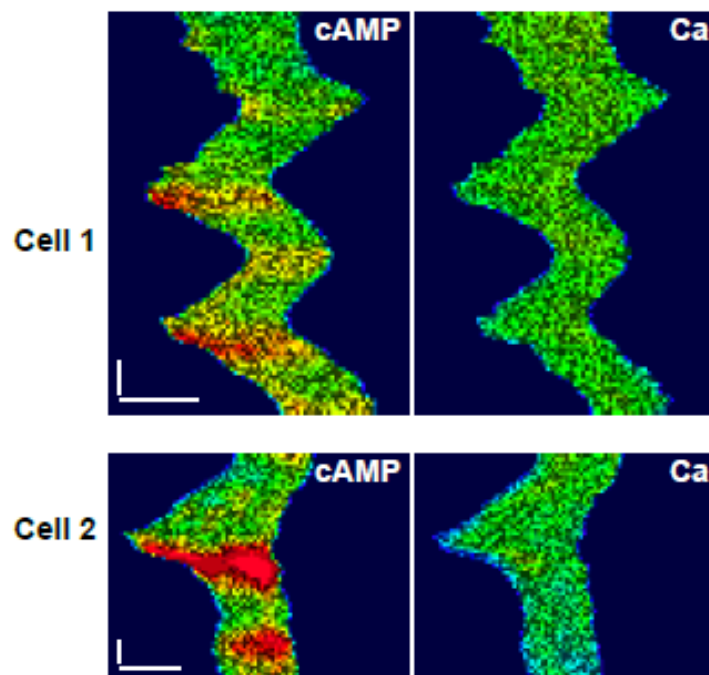
A**B****C**

Figure S4: Calcium levels during migration

A- Kymographs of two examples of calcium measurements in Fura-2-loaded T cells deposited on CXCL12/VCAM-1 coated coverslips. No variation in Calcium could be detected. Calcium level is coded in false color. Horizontal scale bar = 10 μ m, vertical scale bar = 1min.

B- Ratios between the front and the back levels of Calcium have been measured by drawing scanlines along the cell axis in cells migrating, retracting their lamellipodium or rounding up (after retraction). 57-59 values \pm SE from 14 different cells.

C- Kymographs of two examples of simultaneous cAMP (TEpacVV) and Calcium (Fura-2) recordings. Although some cAMP increase could be observed when cells changed direction, no calcium variations appeared. Horizontal scale bar = 10 μ m, vertical scale bar = 1min.

Figure S5

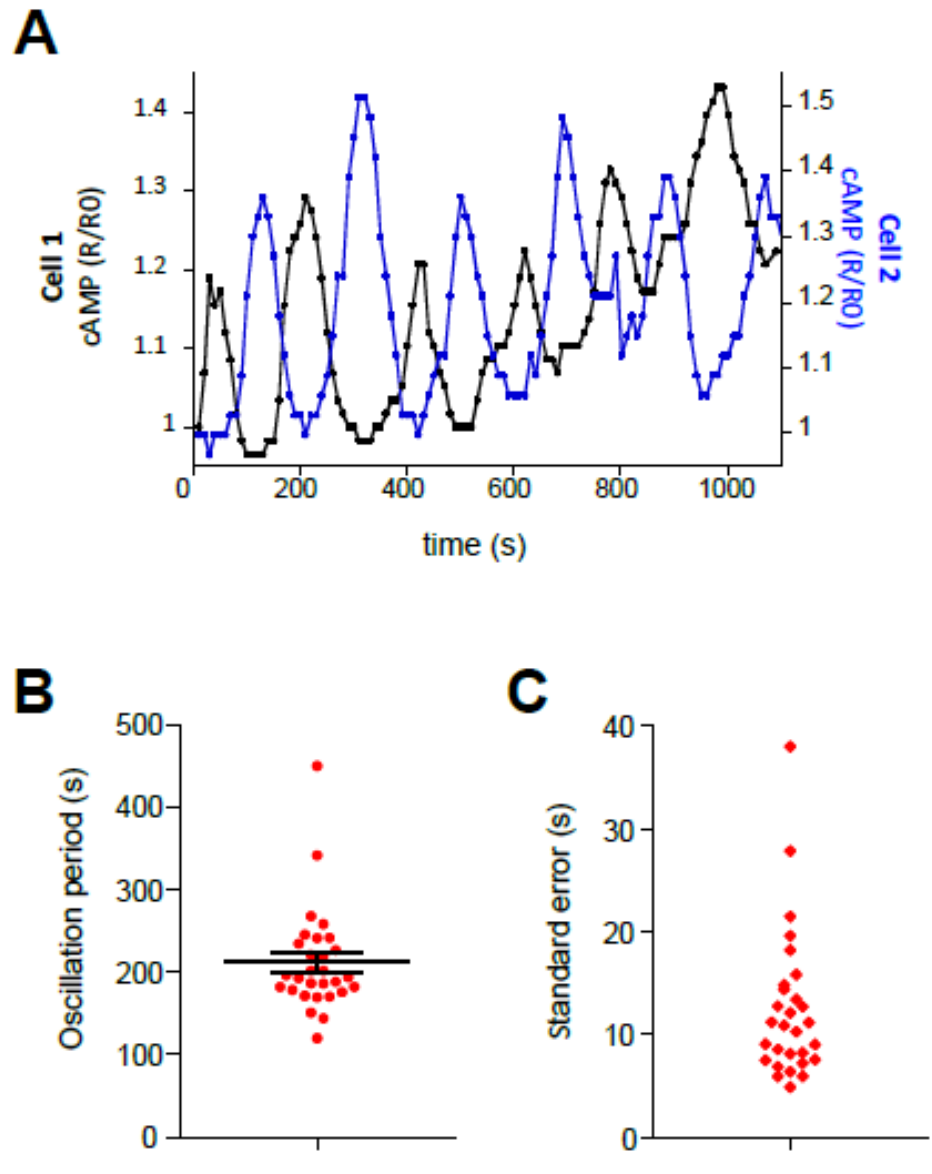


Figure S5: cAMP oscillations upon elongation/retraction cycles

A- Example of two different TEpacVV-transfected cells displaying cAMP oscillations. cAMP values have been normalized to the initial ratio (R0).

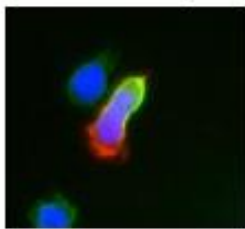
B- Distribution of cAMP oscillating periods. The mean \pm SE corresponds to the average period measured in 29 cells displaying 3-14 oscillations. Each dot represents one cell. Note the low dispersion of the period among the different cells.

C- For each cell displaying 3-14 cAMP oscillations, the delay between 2 cAMP peaks was measured and the average period calculated. The regularity of the oscillations was assessed by calculating the

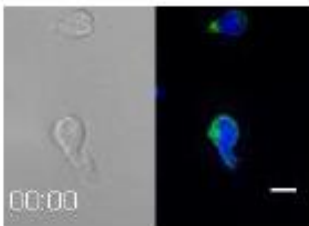
standard error around their average. The small dispersion of the values indicates that, for a given cell, the oscillations are very regular.

Movie S1: Random migration on VCAM-1 / CXCL12 coated coverslip

Transmitted light images of T lymphocytes migrating randomly. Scale bar = 10 μ m.

Movie S2: Asymmetry of actin networks upon chemokine-stimulated T cells

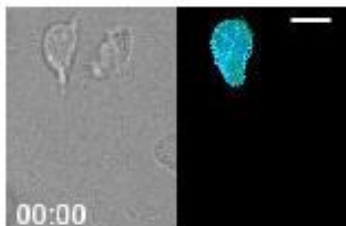
Example of a T cell transfected with LifeAct-mCherry and labelled with SiRActin and Hoechst deposited on a VCAM-1/CXCL12-coated coverslip and observed. Image analysis of this cell in Fig 1A. Scale bar = 10 μ m.

Movie S3: Stable actin relocation

Example of a T lymphocyte labelled with SiRActin and Hoechst deposited on a VCAM-1/CXCL12-coated coverslip and monitored upon migration. The corresponding kymograph is shown in Fig S2A. Scale bar = 10 μ m.

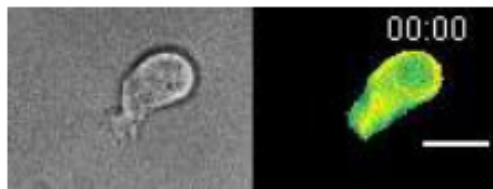
Movie S4: Non-muscle Myosin IIA relocation

Example of a T lymphocyte transfected with MyH9-GFP and labelled with SiRActin and Hoechst deposited on a VCAM-1/CXCL12-coated coverslip and monitored upon migration. The corresponding kymograph is shown in Fig S2B. Scale bar = 10 μ m.

Movie S5: cAMP variations upon migration

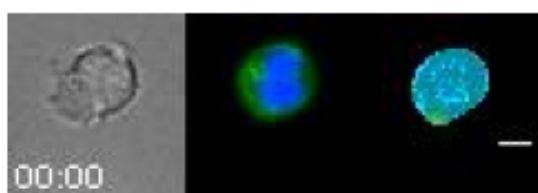
TEpacVV-transfected T cell migrating on a CXCL12/VCAM-1-coated coverslip. cAMP is coded in false colors. The corresponding kymograph is shown in Fig 3A. Scale bar = 10 μ m.

Movie S6: cAMP oscillations upon elongation/retraction cycles



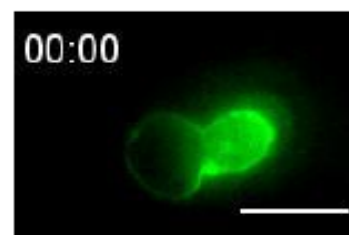
TEpacVV-transfected T cell migrating on a CXCL12/VCAM-1 coated coverslip. cAMP is coded in false colors. The corresponding kymograph is shown in Fig 3D. Scale bar = 10 μ m.

Movie S7: cAMP increase and stable actin relocalization



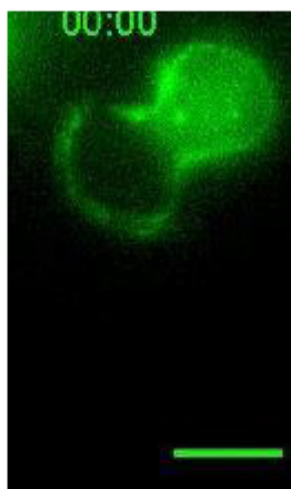
TEpacVV-transfected T cell loaded with SiRActin deposited on a CXCL12/VCAM-1-coated coverslip. Detailed images in Fig 5A. cAMP is coded in false colors. Scale bar = 10 μ m.

Movie S8: Effect of caged-cAMP photo-release on stable actin relocalization and cell rounding



The cell was incubated previously in DMACM-caged 8-Br-cAMP and labeled with SiRActin. At 20s, it was illuminated at 405nm on a spot of 7 μ m diameter (white circle). Detailed images in Fig 4C. Scale bar = 10 μ m.

Movie S9: Effect of laser illumination on stable actin distribution



The cell was incubated previously in DMSO (1/500) and labeled with SiRActin. At 20s, it was illuminated at 405nm on a spot of 7 μ m diameter (white circle). Scale bar = 10 μ m.

2.2. Discussion

Les résultats présentés dans cet article mettent en évidence une séquence d'événements de signalisation en trois étapes. Nous montrons qu'au cours de la migration des LTs un réseau d'actine correspondant à de l'actomyosine présente une distribution asymétrique. Ce réseau est mobile et semble contrôler l'axe de polarisation de la cellule. En effet, il est recruté à l'avant de la cellule, au niveau du lamellipode lors de l'arrondissement. Cette redistribution est déclenchée par une augmentation locale et transitoire de l'AMPC à l'avant de la cellule. L'AMPC envahit ensuite toute la cellule. Cette rétraction du lamellipode est suivie par une repolarisation de la cellule suivant un nouvel axe, favorisant ainsi le comportement exploratoire des LTs. Des questions restent cependant irrésolues et sont présentées dans la discussion de l'article.

3. MIGRATION ET CHANGEMENT DE DIRECTION DANS UN MILIEU CONFINE

3.1. Matériels & Méthodes

- Culture cellulaire

Nous utilisons des CEM, lignée lymphoblastoïde humaine provenant du sang périphérique d'un individu atteint de leucémie lymphoblastique aiguë. Elles ont été cultivées dans un milieu complet : RPMI GlutaMax (SEROMED) supplémenté avec 10% SVF décomplémenté et de la pénicilline (50U.ml⁻¹), streptomycine (50U.ml⁻¹) et sodium pyruvate (1mM) provenant de Gibco.

- Transfection et constructions

Les cellules ont été transfectées par nucléofection (Amaxa Nucleofactor, Lonza) avec 5µg d'ADN pour 5×10^6 cellules en utilisant le programme C-016. Les cellules ont été utilisées le jour suivant la transfection.

La détection de l'actine-F a été réalisée par l'expression de la construction LifeAct-mCherry (don du Dr. A. Benmerah). Pour les mesures de l'AMPc intracellulaire, les cellules ont été transfectées avec la version la plus sensible de TEpacVV¹⁷² (H187). TEpacVV est un don du Dr. K. Jalink (Netherlands Cancer Institute).

- Migration dans les microcanaux

Les expériences de microcanaux ont été réalisées comme décrit dans ²⁰⁰. Du PDMS a été utilisé pour fabriquer des microcanaux à partir de moules fabriquées sur-mesure. Les microcanaux ont été recouverts de fibronectine de plasma bovin (10µg.ml⁻¹, Sigma Aldrich) pendant 1h à température ambiante, lavé 3 fois en PBS avant l'incubation avec le milieu de culture des CEM pendant au moins 1h à 37°C et 5% de CO₂ avant l'ajout des cellules. Les cellules sont ajoutées à une concentration de 60.10^6 /ml dans 10µl de milieu. Les cellules sont laissées pendant 30min avant l'ajout de 2ml de milieu avec ou sans CXCL12 (100ng/ml, Peprotech, 300-28A).

- AMPc

Les images de microscopie ont été acquises avec un microscope à champ large, Nikon Eclipse TE2000-U et une caméra CMOS camera (ORCA-flash4.0 LT, Hamamatsu). Pour le suivi de l'AMPc un objectif 40x/1.30 à immersion à huile a été utilisé. Le fonctionnement de la sonde TEpacVV a été expliqué dans la partie 1 des résultats.

- Suivi de la migration des CEM

Les images des cellules marquées avec du Hoechst ($2\mu\text{g.ml}^{-1}$, 4min) ont été acquises avec un microscope inversé DMi0 (Leica) à 37°C avec une atmosphère de 5% de CO₂, avec un objectif de 10x (NA 0,4).

- Suivi des réseaux d'actines

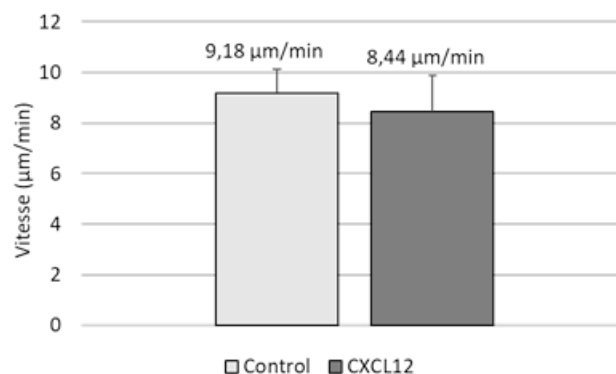
Les images des cellules transfectées avec LifeAct m-Cherry et marquées avec du Hoechst ($2\mu\text{g.ml}^{-1}$, 4min) et de la SiRactin (250nM, 1h) ont été acquises avec un microscope confocal spinning disk CSU X1 (Leica) à 37°C avec une atmosphère de 5% de CO₂, avec un objectif de 63x (NA 1,4).

3.2. Résultats et Conclusion

Comme nous l'avons vu en introduction, la migration des lymphocytes T peut être schématiquement contrôlée de trois façons : les chimiokines, S1P et le confinement. L'étude présentée précédemment est centrée sur la mobilité induite par les chimiokines et a mis clairement en évidence un rôle clé de l'AMPc dans la directionnalité des LTs grâce à un contrôle du réseau d'actomyosine. Dans ce système de migration, les cellules n'étaient soumises à aucune contrainte physique alors qu'*in vivo*, la plupart de tissus sont caractérisés par une forte densité cellulaire et une matrice extracellulaire riche. La migration cellulaire dans des milieux physiologiques se produit donc dans un environnement confiné complexe^{201,202}. Il nous a donc semblé intéressant de caractériser l'implication de l'AMPc et du réseau d'actomyosine dans la migration des LTs induite par le confinement. C'est pourquoi, nous avons entamé, en 2019, une collaboration avec Pablo J. Saez qui était à l'époque à l'institut Curie dans l'équipe de Matthieu Piel. Cette équipe a développé une méthode permettant d'étudier la migration cellulaire en une dimension dans un environnement confiné, les microcanaux²⁰⁰.

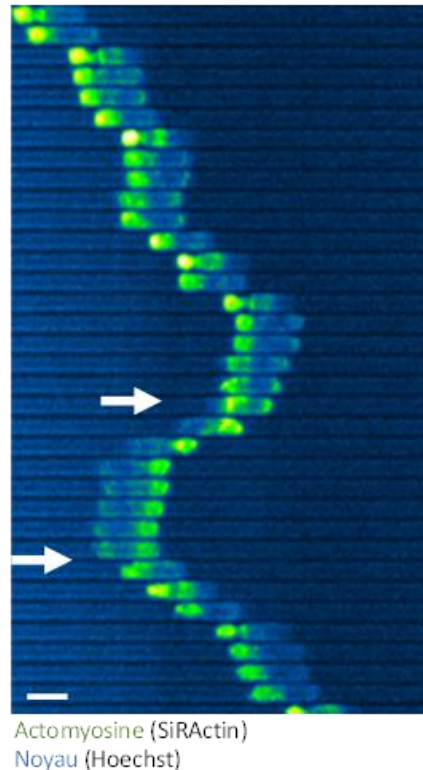
Dans un premier temps il a fallu s'assurer que nos cellules étaient capables d'entrer et de migrer dans les microcanaux. Nous avons dû tester différentes largeurs de microcanaux. En effet, une largeur trop faible empêche les cellules d'entrer et inversement, pour une largeur trop élevée, l'absence de forces de friction fait que les cellules ne migrent pas mais « flottent ». Nous avons pu montrer que la largeur optimale est $7\mu\text{m}$. De façon étonnante, dans ces canaux, la vitesse de migration est identique en présence ou en absence de stimulation avec CXCL12 (Figure 37). Nous avons dans un second temps suivi la répartition du cortex d'actine. Sa distribution est similaire à celle observée dans un système de migration induite par les chimiokine en absence de confinement : l'actomyosine marquée par la SiRActin est localisée à l'arrière de la cellule. De façon intéressante, au cours des changements de direction, on remarque une redistribution de cette actine qui se relocalise au niveau de l'avant de la cellule lorsque celle-ci change de sens comme nous l'avons observé précédemment (Figure 38).

Figure 36 : Migration des lymphocytes T dans les microcanaux



Des CEM ont été déposées dans les microcanaux pendant 30min. Le noyau des cellules migrantes a été suivi avec TrackMate (ImageJ), nous avons alors extrait les vitesses de 69 cellules pour la condition contrôle et 40 cellules pour la condition CXCL12. Les moyennes de vitesse de chaque condition sont noté au-dessus des histogrammes.

Figure 37 : Réorganisation du cytosquelette lors de la migration des LTs dans des microcanaux



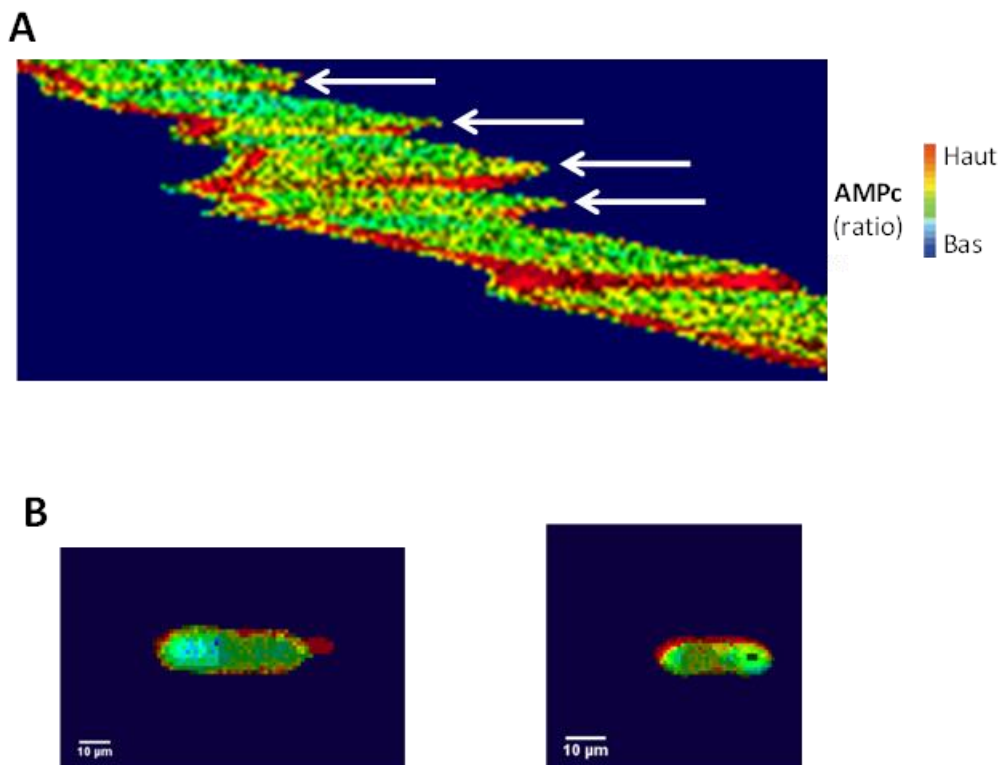
Exemple de CEM marqué avec Hoescht (noyau) et déposée dans les microcanaux pendant 30min. Les flèches blanches désignent un changement de direction. Le trait blanc en bas à gauche désigne l'échelle = 10 μ m.

Dans un second temps, nous avons voulu voir si dans les microcanaux, les changements de direction spontanés étaient, comme dans notre étude précédente, associés à des variations d'AMPc. Comme présenté dans les kymographes (Figure 3A), des variations transitoires d'AMPc associés à des changements de direction ont pu être observés dans certains cas (Figure 39A). Cependant nous nous sommes heurtés à un problème technique dû à une interférence entre le matériau des microcanaux, le PDMS et la sonde de FRET, TEpacVV (Figure 39B). Les contours des CEM transfectées montrent constamment des niveaux d'AMPc apparemment élevés. Cet artefact a rendu difficile une étude subcellulaire plus poussée de la répartition de ce second messager.

Ces quelques expériences suggèrent cependant que :

- Lors de la migration induite par les chimiokines comme lors de celle déclenchée par le confinement, des augmentations spontanées d'AMPC sont capables de contrôler la directionnalité des lymphocytes T.
- Les augmentations spontanées d'AMPC observées lors des changements de direction, ne sont pas dû à la signalisation en aval des récepteurs aux chimiokines mais relèvent plutôt d'un mécanisme cellulaire intrinsèque de production/dégradation d'AMPC.

Figure 38 : Variations de l'AMPC au cours de la migration des LTs dans les microcanaux



Des CEM transfectées avec TEpacVV ont été déposées dans les microcanaux pendant 30min. A - Kymographe fait en traçant une ligne le long de l'axe antéro-postérieur de la cellule montrant les niveaux moyens d'AMPC en fonction du temps. Les niveaux d'AMPC sont codés en fausses couleurs. La barre horizontale = 10µm et la barre verticale = 1min. Les flèches blanches désignent un arrêt de migration.

B - Exemples de cellules transfectées avec TEpacVV. On observe que sur les bords des cellules les niveaux d'AMPC sont élevés.

Discussion Générale

La migration des LTs est nécessaire pour une immunosurveillance efficace. En effet, ces cellules doivent balayer la zone la plus large possible en peu de temps au sein des organes lymphoïdes secondaires. Dans ce cadre, mes travaux de thèse ont permis de caractériser, dans un premier temps, certaines étapes précoces et les éléments conditionnant l'établissement de l'axe de polarisation dans le LTs en réponses aux chimiokines. Ces travaux ont également permis de mettre en évidence une séquence d'événement de signalisation ayant lieu au cours de la migration des LTs impliquant l'AMPc et aboutissant à un remodelage du cytosquelette ainsi qu'à un changement de trajectoire de migration.

Dans un premier temps, je vais m'attarder sur la régulation de l'actine centrosomale, bien caractérisée dans le contexte de la synapse immunologique mais encore peu documentée dans le cas des chimiokines. Ensuite, je chercherai à comprendre les fonctions possibles de ce réseau d'actine centrosomale dans l'établissement de la polarisation cellulaire. Enfin, je vais revenir sur le rôle immunosuppresseur de l'AMPc généralement admis et discuter de comment nos travaux amènent à une vision plus nuancée.

1. COMMENT L'ACTINE CENTROSOMALE EST-ELLE REGULÉE ?

Nous avons observé une diminution d'un réseau d'actine se localisant au niveau du centrosome en réponse aux chimiokines. Ce phénomène a été bien caractérisé dans le contexte de la formation de la synapse immunologique mais était jusqu'alors inconnu dans le cas de la stimulation par les chimiokines. On peut imaginer que les voies de signalisation impliquées dans les deux configurations soient cependant les mêmes.

Des études récentes ont montré l'existence d'un réseau d'actine entourant le centrosome dans les lymphocytes B (LBs)^{176,203}. Une des fonctions de ce réseau est l'ancrage du centrosome au noyau par l'intermédiaire du complexe LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton)¹⁷⁶. Le réseau d'actine centrosomale est régulé de façon dynamique par des cycles de polymérisation et de dépolymérisation. Pour la polarisation du centrosome vers la synapse, l'équilibre penche en faveur de la dépolymérisation, entraînant une diminution de l'actine centrosomale et facilitant le décrochage du centrosome du noyau. Dans les LBs, ceci se produit par un recrutement réduit du complexe Arp2/3 qui se relocalise au niveau de la synapse¹⁷⁶ *via* une protéine spécifique des cellules du lignage hématopoïétique, homologue de la cortactine, HS1.

Des études récentes ont montré une déplétion d'actine centrosomale dans les LTs et LBs dans les étapes précoces de la formation de la synapse et ont mis en évidence l'implication de multiples voies en plus de celle impliquant la déplétion d'Arp2/3 dans les LBs¹⁷⁶.

- Voie de la PKC δ

Cette kinase est activée en aval de l'engagement du TCR et a été proposée pour réguler l'actine-F. Après le déclenchement du TCR, PKC δ phosphoryle la protéine adaptatrice du cytosquelette, la paxilline. La paxilline s'associe au centrosome où elle contribue à la translocation du centrosome vers l'IS des cellules T en favorisant une libération locale de la F-actine par un mécanisme inconnu. Il est probable que la paxilline se lie directement ou indirectement à un ou plusieurs régulateurs de l'actine.

- Protéasome

Récemment, un autre mécanisme régulant l'actine centrosomale a été mis en évidence, il s'agit du système ubiquitine-protéasome (UPS)^{175,204}. L'UPS est une voie de dégradation des protéines cytosoliques. Ce système est constitué d'ubiquitine ligases qui ciblent les protéines à dégrader par l'ajout d'ubiquitines sur les substrats du protéasome. Un pool de protéasome est associé au centrosome comme le témoigne la présence de sous-unités du protéasome et de ses substrats autour du centrosome²⁰⁵. Dans les LTs, une analyse protéomique des centrosomes a mis en évidence un enrichissement local de composants du protéasome²⁰⁶. Il a été observé que le pool centrosomal d'une sous-unité du protéasome, 19S RP, augmente au début de la formation des SI, pour revenir progressivement à la ligne de base avec la maturation des SI¹⁷⁵. De plus, le centrosome ne parvient pas à se polariser vers la SI dans les cellules T prétraitées par des inhibiteurs du protéasome et que la mauvaise localisation du centrosome dans ces cellules est accompagnée d'une accumulation de F-actine au niveau du centrosome, ce qui confirme le rôle du protéasome centrosomal dans la formation de la SI.

La déplétion d'actine au centrosome peut s'expliquer par la déplétion de protéines impliquées dans la synthèse de et l'élongation de filaments, comme Arp2/3 ou WASH. Ces deux protéines pourraient être des cibles du protéasome au centrosome²⁰⁷. Elles sont d'ailleurs déplétées lors de la formation de la SI^{175,177}.

Une nouvelle protéine a été identifiée comme jouant un rôle dans l'assemblage de la SI, le composant du complexe du syndrome de Bardet-Biedl, BBS1¹⁷⁵. BBS ou BBSome est un complexe régulant la formation des cils primaires. La déplétion de l'actine centrosomale est inhibée lorsque BBS1 est déplétée des LTs. La persistance de ce réseau d'actine au centrosome est associée à une accumulation de WASH. BBS1 agit comme un adaptateur de la dynéine, la couplant avec la sous-unité 19S du protéasome permettant son transport au niveau du centrosome. La diminution du recrutement de cette sous-unité du protéasome au niveau des centrosomes des LTs déficients en BBS1 est associée à une augmentation des protéines polyubiquitinylées dans cette même zone.

Ces différentes études montrent que, dans les LBs comme dans les LTs, la déplétion de l'actine centrosomale est médiée par le protéasome permettant la polarisation des centrosomes vers l'IS. Dans notre contexte de polarisation des LTs induite par les chimiokines, on observe une déplétion de l'actine centrosomale associée à une déplétion du complexe Arp2/3. Il est possible que ce dernier soit une cible du protéasome, sa

déplétion romprait alors la balance entre polymérisation dépolymérisation en faveur de la dépolymérisation. La cinétique de déplétion de l'actine centrosomale après stimulation chimiokinique est de 3min (cf Partie 1 des résultats). Cette déplétion pourrait être causées par une activation du protéasome et une dégradation de protéines impliquées dans la dynamique de l'actine. En effet il a été montré *in vitro* que le délai entre la reconnaissance de la protéine à dégrader et sa dégradation il s'écoule environ 1min²⁰⁸. D'un autre côté, cette hypothèse irait contre notre hypothèse de libération d'éléments permettant la formation du lamellipode (Arp2/3, actine-G...).

2. QUELLES FONCTIONS POUR L'ACTINE CENTROSOMALE ?

Le centrosome est caractérisé comme étant le principal centre organisateur des microtubules et plus récemment comme étant un site de polymérisation de filaments d'actine^{170,203}. Des protéines impliquées dans la régulation de l'actine-F ont été retrouvées associées au centrosome, telles que Arp2/3¹⁷⁷, WASP²⁰³ ou encore la profiline¹⁸⁶. Le contrôle de la formation des filaments d'actine liés au centrosome peut être considéré dans le contexte de la formation de protrusion et de la directionnalité au cours de la migration cellulaire. Il doit donc exister une organisation coordonnée de l'actine et des microtubules. La stimulation de la migration augmente la formation de filaments d'actine impliqués dans la formation de protrusions tel que le lamellipode mais également la formation de microtubules vers l'avant de la cellule²⁰⁹.

L'actine centrosomale permet entre autres l'ancrage du centrosome au noyau^{210,211}. Une nouvelle fonction de ce réseau d'actine a été récemment mise en évidence au centrosome. En effet, les changements de densité de ce réseau pourraient conditionner la formation et la croissance des microtubules émanant du centrosome. Ce phénomène a été caractérisé lors de la mitose, un pool d'actine centrosomale est déplété autour des centrosomes en début de mitose²¹². Les filaments d'actine centrosomaux perturbent les premières étapes de l'élongation des microtubules.

Des données montrent une implication de la profiline, en plus de son rôle dans la dynamique de l'actine, dans la régulation de la dynamique des microtubules. La profiline influence la nucléation de microtubules. Il a été observé que la profiline se localise au centrosome et, suite à sa déplétion, une nucléation accrue des microtubules centrosomaux a été démontrée. La profiline sert donc de régulateur négatif de la nucléation des microtubules¹⁸⁶. Il est possible que la perte de la profiline entraîne une diminution de la quantité d'actine disponible dans cette région et que par conséquent la polymérisation d'actine contrôlée dans cette zone soit également diminuée²¹³. Dans ce cas, une diminution de l'encombrement résultant de la réduction des filaments d'actine permettrait une meilleure nucléation des microtubules à partir du centrosome²¹⁴.

On peut donc émettre l'hypothèse que la stimulation par les chimiokines permettrait le recrutement d'actine ou d'actine liée à la profiline au niveau de la

membrane de cellules en cours de polarisation. Suite à ce recrutement, la concentration d'actine et d'actine-profiline dans le reste de la cellule, notamment au centrosome, pourrait être diminuée. Par conséquent, la nucléation et l'élongation de microtubules à partir du centrosome pourrait être accrue.

La PKA pourrait également réguler cette connexion entre les deux réseaux et la profiline. Il a été rapporté en effet que cette kinase est capable de phosphoryler la profiline induisant une diminution de la polymérisation de l'actine^{123,124}. L'activation de la PKA en réponse aux chimiokines pourrait phosphoryler la profiline rompant ainsi la balance entre polymérisation et dépolymérisation en faveur de la dépolymérisation de l'actine centrosomale. De la même manière que dans l'hypothèse précédente, la diminution de l'actine centrosomale réduirait l'encombrement stérique permettant ainsi la nucléation et l'élongation de microtubule à partir du centrosome.

3. L'AMPc, UN FACTEUR FAVORISANT OU INHIBANT LA REPOSE IMMUNE ?

Nous avons montré qu'une augmentation d'AMPc précède la polarisation initiale et la repolarisation (changement de trajectoire) des LTs au cours de leur migration. D'un autre côté, le rôle immunosuppresseur de l'AMPc est largement caractérisé. Dans cette partie nous allons tenter de comprendre et de poser des hypothèses pour expliquer le rôle complexe de l'AMPc dans les LTs et dans d'autres systèmes cellulaires.

Dans le cas de la signalisation *via* le TCR, il semble maintenant important de prendre en compte les caractéristiques de l'augmentation d'AMPc capable de déclencher un effet inhibiteur. En effet, ce sont des augmentations soutenues e massives de ce messager qui sont associées à une inhibition de la signalisation du TCR, de l'augmentation calcique, de l'activation de Ick ou encore de la production d'Il2²¹⁵⁻²¹⁸. En revanche, il a été montré qu'une augmentation transitoire de l'AMPc favorise la réponse des LTs en abaissant le seuil de détection de l'antigène après l'adhésion d'un LT sur une CPA²¹⁹.

Le constat est similaire au cours de la migration cellulaire. Une augmentation importante et soutenue *via* des composés pharmacologiques, la prostaglandine E₂ ou la stimulation des récepteurs β -adrénergique inhibe la motilité^{195,196,220,221}. Nous avons montré a contrario dans ce travail, que des augmentations transitoires et locales d'AMPc pourraient, en remodelant le cytosquelette d'actine, favoriser au contraire le comportement exploratoire des LTs (Figure 40).

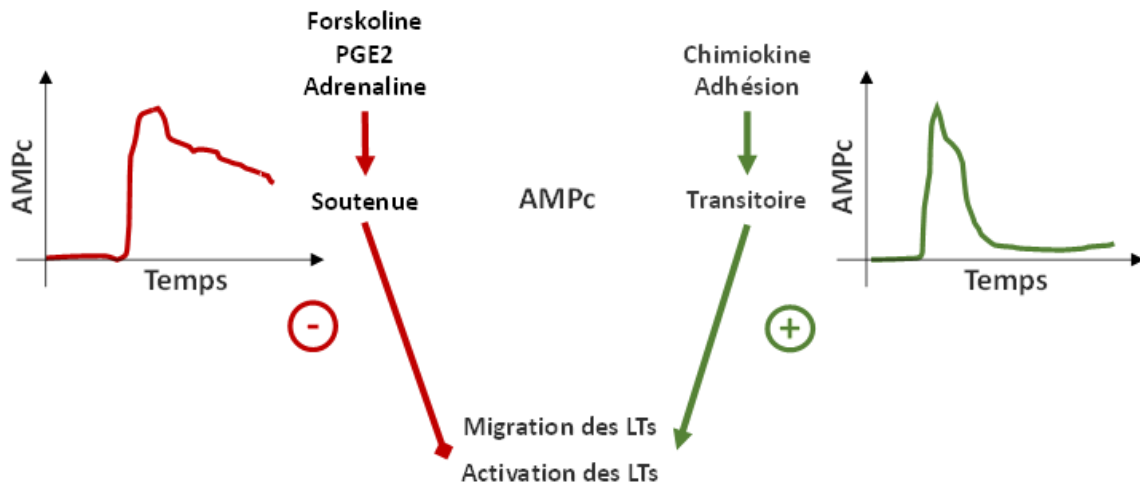
Il semble donc que, comme cela a été largement décrit pour le calcium, le contrôle spatial et temporel ainsi que l'intensité du signal AMPc est crucial et peut déclencher dans les lymphocytes T des effets totalement opposés.

Comment ce signal est-il régulé? Au cours de la migration de fibroblastes, il a été montré qu'une augmentation de la tension membranaire à l'avant des cellules en migration²²² pourrait augmenter l'AMPc et l'activité PKA comme décrit dans d'autres systèmes^{197,223}. On peut imaginer un tel processus dans les lymphocytes T. Dans ce contexte, le recrutement de l'actomyosine induit par l'AMPc réduirait cette tension en rétractant le lamellipode et donc inhiberait la synthèse d'AMPc générant ainsi un pic transitoire de ce messager. En parallèle l'augmentation de l'activité de la PKA *via* l'AMPc

pourrait activer des PDEs telles que PDE4 exprimée dans les LTs, accélérant ainsi la diminution de l'AMPc²²⁴.

D'autre part, nous avons observé qu'une augmentation locale d'AMPc permettait le recrutement d'actomyosine. Les AKAPs forment des plateformes de signalisation concentrant la PKA, des cibles de la PKA mais, également des enzymes régulatrices de l'AMPc telles que les PDEs (dégradant l'AMPc) et les ACs (synthétisant l'AMPc). Les AKAPs pourraient donc permettre d'engendrer un signal AMPc non pas diffus mais local.

Figure 40 : Caractéristiques des variations d'AMPC influencent la réponse des LTs



Des augmentations soutenues d'AMPC causées par des agents tels que la forskoline, PGE2 ou l'adrénaline inhibent la migration et l'activation des LTs, contrairement à des augmentations transitoires induites par des chimiokines ou l'adhésion.

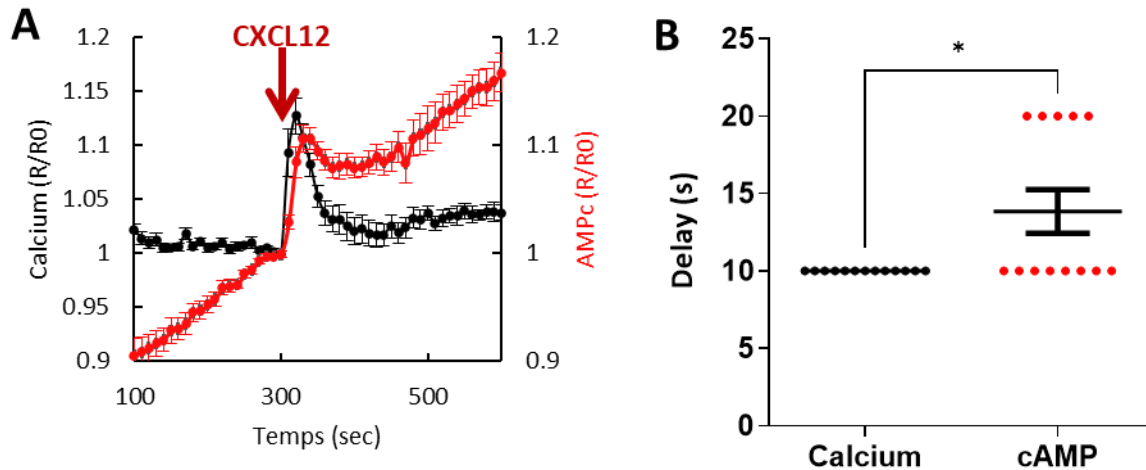
Conclusion Générale

Ce travail de thèse nous a permis de mieux caractériser la cascade de signalisation déclenchée dans les LTs lors de la stimulation par les chimiokines et de comprendre les interconnexions entre la voie de l'AMPC et le cytosquelette au cours de la polarisation et la migration des lymphocytes T.

Il serait intéressant de revisiter l'effet immunosuppresseur de l'AMPC et de prendre en compte la régulation spatio-temporelle de ce messenger. Bien qu'une augmentation soutenue de l'AMPC puisse peut-être inhibitrice, une augmentation transitoire de ce messenger peut, inversement, favoriser les réponses des lymphocytes T.

Annexe

La stimulation des LTs par CXCL12 induit une augmentation du calcium intracellulaire impliquée dans l'augmentation d'AMPc.



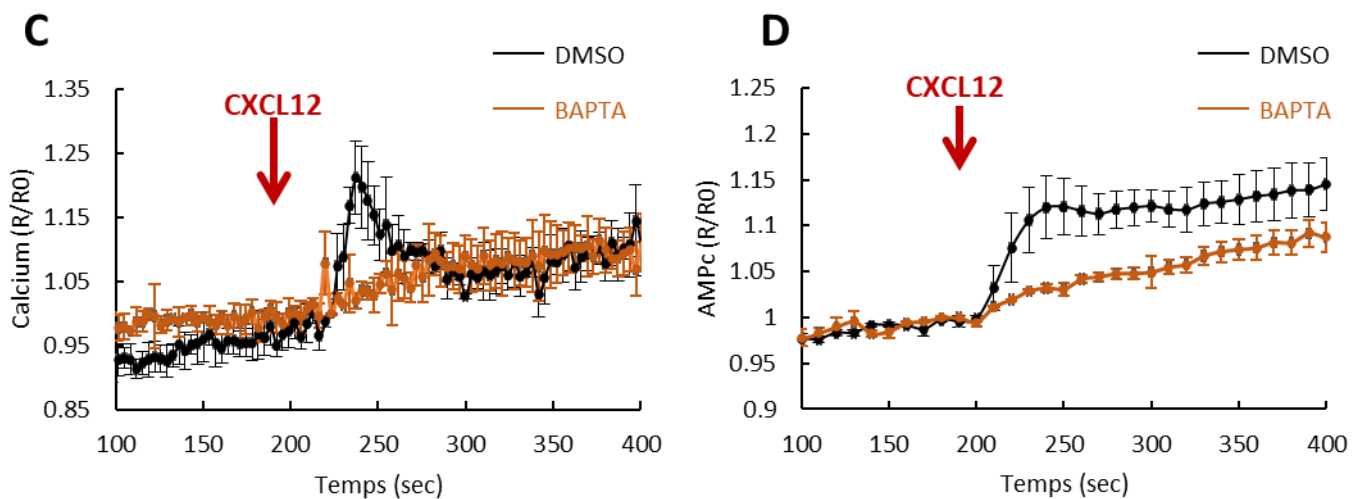
Légende :

A- CEM transfectées avec TEpacVV et incubées avec du Fura2/AM déposées sur un tapis de VCAM-1 et stimulées avec 200ng/ml de CXCL12. Les courbes représentent la moyenne \pm SE de réponses obtenues dans 3 expériences indépendantes (n = 13 cellules)

B- Quantification des délais entre la stimulation CXCL12 et l'augmentation d'AMPc ou de calcium. Analyse statistique t-test, * : $p < 0,05$ (n = 13 cellules)

Notre hypothèse propose que l'augmentation de calcium soit impliquée dans l'activation d'une ou plusieurs ACs calcium-dépendantes induisant ainsi un pic d'AMPc. Pour tester ceci, nous avons effectué des mesures conjointes de ces deux seconds messagers. Les LTs ont été transfectés avec la construction TEpacVV puis incubés en présence de Fura-2/AM à une faible concentration de 200nM afin de minimiser les interférences entre les signaux de fluorescence. Nous observons que la stimulation chimiokinique induit une augmentation transitoire du calcium intracellulaire suivie par une augmentation d'AMPc (Figure 3A). La mesure des délais entre la stimulation avec CXCL12 et les augmentations des deux seconds messagers montre qu'il existe un décalage significatif entre l'augmentation du calcium (10sec) et celle de l'AMPc ($13,8 \pm 1.40$ sec)

(Figure 3B). Cependant, la majorité des mesures se trouve au même niveau à savoir à 10sec, correspondant à notre premier point d'acquisition. Ce biais est dû à l'échantillonnage qui n'est pas assez important. On devrait refaire ces mesures conjointes de variations d'AMPC et de calcium avec un délai de 5sec au lieu de 10sec entre chaque point d'acquisition. Ceci nous permettrait de voir plus précisément le délai entre les réponses AMPC et calcium et de savoir si ces deux signaux apparaissent effectivement séquentiellement comme suggéré par nos premières expériences.



Légende :

C- Les CEM ont été incubées en présence de BAPTA/AM ou DMSO. Après rinçage, les cellules sont chargées en Fura2/AM, 0,5 μ M pendant 20min. Les cellules sont ensuite stimulées avec 200ng/ml de CXCL12. La mesure du calcium a été faite par spectrofluorimétrie. Les courbes correspondent à la moyenne \pm SE de 2 expériences indépendantes. Les traces individuelles ont été normalisées par rapport à la valeur de ratio au moment de la stimulation.

D- CEM transfectées avec TEpacVV, traitées ou non avec le chélateur calcique, BAPTA/AM (20 μ M), déposées sur un tapis de VCAM-1 et stimulées avec 200ng/ml de CXCL12. Les courbes représentent la moyenne \pm SE des réponses obtenues lors de 4 expériences indépendantes (6 à 19 cellules / expériences / conditions).

Afin de tester le lien de causalité entre l'augmentation du calcium et celle d'AMPC, nous avons analysé l'effet d'un chélateur du calcium intracellulaire, le BAPTA/AM sur la réponse AMPC. Dans un premier temps, nous avons testé l'efficacité de ce chélateur sur l'inhibition de la réponse calcique à CXCL12. Immédiatement après la stimulation, le niveau de calcium augmente transitoirement dans les cellules incubées avec du DMSO. La chélation du calcium par le BAPTA/AM amortit cette augmentation. Le BAPTA constitue donc un bon outil pour tester le rôle du calcium dans l'augmentation d'AMPC. Les cellules

CEM transfectées avec TEpacVV ont été incubées en présence de 20 μ M de BAPTA/AM ou de DMSO pour contrôle puis déposées sur une lamelle de verre et stimulées avec 200ng/ml de CXCL12. Dans les conditions contrôle, on observe une augmentation immédiate du niveau d'AMPC (Figure 3C). Cependant, dans les CEM incubées en présence de BAPTA/AM, la stimulation n'a que très peu d'effet sur le niveau d'AMPC. La chélation du calcium empêche donc l'augmentation rapide d'AMPC après stimulation par CXCL12. Ce résultat appuie notre hypothèse selon laquelle le pic calcique déclenche l'augmentation d'AMPC possiblement par l'intermédiaire d'une AC calcium-dépendante.

Bibliographie

1. Nicholson, L. B. The immune system. *Essays Biochem* **60**, 275–301 (2016).
2. Piroli, M. E., Blanchette, J. O. & Jabbarzadeh, E. Polarity as a physiological modulator of cell function. *Frontiers in Bioscience - Landmark* **24**, 451–462 (2019).
3. Campanale, J. P., Sun, T. Y. & Montell, D. J. Development and dynamics of cell polarity at a glance. *J Cell Sci* **130**, 1201–1207 (2017).
4. Buckley, C. E. & St Johnston, D. Apical–basal polarity and the control of epithelial form and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1–19 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00465-y> (2022).
5. Zallen, J. A. Planar Polarity and Tissue Morphogenesis. *Cell* vol. 129 1051–1063 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.050> (2007).
6. Jones, C. & Chen, P. Planar cell polarity signaling in vertebrates. *BioEssays* vol. 29 120–132 Preprint at <https://doi.org/10.1002/bies.20526> (2007).
7. Devenport, D. The cell biology of planar cell polarity. *Journal of Cell Biology* vol. 207 171–179 Preprint at <https://doi.org/10.1083/jcb.201408039> (2014).
8. Ladoux, B., Mège, R. M. & Trepap, X. Front-Rear Polarization by Mechanical Cues: From Single Cells to Tissues. *Trends in Cell Biology* vol. 26 420–433 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.02.002> (2016).
9. Bornens, M. & Azimzadeh, J. Origin and evolution of the centrosome. *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 607 119–129 Preprint at https://doi.org/10.1007/978-0-387-74021-8_10 (2007).
10. Manneville, J.-B. & Etienne-Manneville, S. Positioning centrosomes and spindle poles: looking at the periphery to find the centre. *Biol Cell* **98**, 557–565 (2006).
11. Kimura, K. & Kimura, A. A novel mechanism of microtubule length-dependent force to pull centrosomes toward the cell center. *Bioarchitecture* **1**, 74–79 (2011).
12. Zhu, J., Burakov, A., Rodionov, V. & Mogilner, A. Finding the cell center by a balance of dynein and myosin pulling and microtubule pushing: A computational study. *Mol Biol Cell* **21**, 4418–4427 (2010).
13. Maly, V. I. & Maly, I. v. Symmetry, stability, and reversibility properties of idealized confined microtubule cytoskeletons. *Biophys J* **99**, 2831–2840 (2010).
14. Baratt, A., Arkhipov, S. N. & Maly, I. v. An experimental and computational study of effects of microtubule stabilization on T-cell polarity. *PLoS One* **3**, (2008).
15. Arkhipov, S. N. & Maly, I. v. Contribution of whole-cell optimization via cell body rolling to polarization of T cells. *Phys Biol* **3**, 209–219 (2006).
16. Maly, I. v. Systems biomechanics of centrosome positioning: A conserved complexity. *Commun Integr Biol* **4**, 230–235 (2011).
17. Jimenez, A. J. *et al.* Acto-myosin network geometry defines centrosome position. *Current Biology* **31**, 1206–1220.e5 (2021).
18. Masopust, D. & Schenkel, J. M. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat Rev Immunol* **13**, 309–320 (2013).
19. Fu, H., Wang, A., Mauro, C. & Marelli-Berg, F. J 422 *T lymphocyte trafficking: molecules and mechanisms*. *Frontiers in Bioscience* vol. 18 (2013).
20. Krummel, M. F., Bartumeus, F. & Gérard, A. T cell migration, search strategies and mechanisms. *Nature Reviews Immunology* vol. 16 193–201 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri.2015.16> (2016).

21. Thauland, T. J. & Parker, D. C. Diversity in immunological synapse structure. *Immunology* vol. 131 466–472 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03366.x> (2010).
22. Chloéguedj, C., Abraham, N., Jullié, D. J. & Randriamampita, C. T cell adhesion triggers an early signaling pole distal to the immune synapse. (2016) doi:10.1242/jcs.182311.
23. Stinchcombe, J. C. *et al.* Centriole polarisation to the immunological synapse directs secretion from cytolytic cells of both the innate and adaptive immune systems. *BMC Biol* **9**, 45 (2011).
24. Hashimoto-Tane, A. *et al.* Dynein-Driven Transport of T Cell Receptor Microclusters Regulates Immune Synapse Formation and T Cell Activation. *Immunity* **34**, 919–931 (2011).
25. Yi, J. *et al.* Centrosome repositioning in T cells is biphasic and driven by microtubule end-on capture-shrinkage. *Journal of Cell Biology* **202**, 779–792 (2013).
26. Friedl, P. & Weigelin, B. Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat Immunol* **9**, 960–969 (2008).
27. Weninger, W., Biro, M. & Jain, R. Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. *Nat Rev Immunol* **14**, 232–246 (2014).
28. Renkawitz, J. *et al.* Nuclear positioning facilitates amoeboid migration along the path of least resistance. **568**, 546–550.
29. Dupré, L., Houmadi, R., Tang, C. & Rey-Barroso, J. T lymphocyte migration: An action movie starring the actin and associated actors. *Front Immunol* **6**, (2015).
30. Baeyens, A. A. L. & Schwab, S. R. Finding a Way Out: S1P Signaling and Immune Cell Migration. *Annu Rev Immunol* **7**, (2020).
31. Krummel, M. F., Friedman, R. S. & Jacobelli, J. Modes and mechanisms of T cell motility: Roles for confinement and Myosin-IIA. *Curr Opin Cell Biol* **30**, 9–16 (2014).
32. Kameritsch, P. & Renkawitz, J. Principles of Leukocyte Migration Strategies. *Trends in Cell Biology* vol. 30 818–832 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.06.007> (2020).
33. Lämmermann, T. *et al.* Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* **453**, 51–55 (2008).
34. Friedl, P., Entschladen, F., Conrad, C., Niggemann, B. & Zänker, K. S. CD4⁺ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize β 1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion. *Eur J Immunol* **28**, 2331–2343 (1998).
35. Hughes, C. E. & Nibbs, R. J. B. A guide to chemokines and their receptors. **285**, 2944–2971.
36. Miyazaki, H., Takabe, K. & Andrew Yeudall, W. Chemokines, chemokine receptors and the gastrointestinal system. *World J Gastroenterol* **19**, 2847–2863 (2013).
37. Cotton, M. & Claing, A. G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration. *Cell Signal* **21**, 1045–1053 (2009).
38. Cojoc, M. *et al.* Emerging targets in cancer management: Role of the CXCL12/CXCR4 axis. *Onco Targets Ther* **6**, 1347–1361 (2013).
39. Kucia, M. *et al.* CXCR4–SDF-1 Signalling, Locomotion, Chemotaxis and Adhesion. *J Mol Histol* **35**, 233–245 (2003).
40. Laufer, J. M. & Legler, D. F. Beyond migration—Chemokines in lymphocyte priming, differentiation, and modulating effector functions. *Journal of Leukocyte Biology* vol. 104 301–312 Preprint at <https://doi.org/10.1002/JLB.2MR1217-494R> (2018).

41. Bromley, S. K., Mempel, T. R. & Luster, A. D. Orchestrating the orchestrators: Chemokines in control of T cell traffic. *Nature Immunology* vol. 9 970–980 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nif.213> (2008).
42. Griffith, J. W., Sokol, C. L. & Luster, A. D. Chemokines and chemokine receptors: Positioning cells for host defense and immunity. *Annual Review of Immunology* vol. 32 659–702 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120145> (2014).
43. Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview Lymphocyte trafficking and chemokines. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02183.x.
44. Schaks, M., Giannone, G. & Rottner, K. Actin dynamics in cell migration. **63**, 483–495.
45. Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C. & Plastino, J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev* **94**, 235–263 (2014).
46. Goley, E. D. & Welch, M. D. The ARP2/3 complex: An actin nucleator comes of age. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 7 713–726 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrm2026> (2006).
47. Chugh, P. & Paluch, E. K. The actin cortex at a glance. *J Cell Sci* **131**, (2018).
48. Pollard, T. D. Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, 1–18 (2016).
49. Nürnberg, A., Kitzing, T. & Grosse, R. Nucleating actin for invasion. **11**, 177–187.
50. Molinie, N. & Gautreau, A. The Arp2/3 Regulatory System and Its Deregulation in Cancer. **98**, 24.
51. Goode, B. L. & Eck, M. J. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annual Review of Biochemistry* vol. 76 593–627 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142647> (2007).
52. Alberts, A. S. Identification of a Carboxyl-terminal Diaphanous-related Formin Homology Protein Autoregulatory Domain. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 2824–2830 (2001).
53. Paul, A. S. & Pollard, T. D. Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins. *Cell Motility and the Cytoskeleton* vol. 66 606–617 Preprint at <https://doi.org/10.1002/cm.20379> (2009).
54. Karlsson, R. & Dráber, P. Profilin—A master coordinator of actin and microtubule organization in mammalian cells. *Journal of Cellular Physiology* vol. 236 7256–7265 Preprint at <https://doi.org/10.1002/jcp.30379> (2021).
55. Rotty, J. D. *et al.* Profilin-1 Serves as a gatekeeper for actin assembly by Arp2/3-Dependent and -Independent pathways. *Dev Cell* **32**, 54–67 (2015).
56. Funk, J. *et al.* Profilin and formin constitute a pacemaker system for robust actin filament growth. *Elife* **8**, (2019).
57. Nishida, E. Opposite Effects of Cofilin and Profilin from Porcine Brain on Rate of Exchange of Actin-Bound Adenosine 5'-Triphosphate. *Biochemistry* **24**, 1160–1164 (1985).
58. Cao, W., Goodarzi, J. P. & de La Cruz, E. M. Energetics and Kinetics of Cooperative Cofilin-Actin Filament Interactions. *J Mol Biol* **361**, 257–267 (2006).
59. Mizuno, K. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cellular Signalling* vol. 25 457–469 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.11.001> (2013).
60. Edwards, M. *et al.* Capping protein regulators fine-tune actin assembly dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 15 677–689 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrm3869> (2014).

61. Yang, C. *et al.* Mammalian CARMIL inhibits actin filament capping by capping protein. *Dev Cell* **9**, 209–221 (2005).
62. McIntosh, B. B. & Ostap, E. M. Myosin-I molecular motors at a glance. jcs.186403 doi:10.1242/jcs.186403.
63. Hartman, M. A. & Spudich, J. A. The myosin superfamily at a glance. *J Cell Sci* **125**, 1627–1632.
64. Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R. S. & Horwitz, A. R. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. **10**, 778–790.
65. Beach, J. R. *et al.* Nonmuscle myosin II isoforms coassemble in living cells. *Current Biology* **24**, 1160–1166 (2014).
66. Shutova, M. S., Spessott, W. A., Giraud, C. G. & Svitkina, T. Endogenous species of mammalian nonmuscle myosin IIA and IIB include activated monomers and heteropolymers. *Current Biology* **24**, 1958–1968 (2014).
67. Betapudi, V. Life without double-headed non-muscle myosin II motor proteins. *Frontiers in Chemistry* vol. 2 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00045> (2014).
68. Sanders, A. A. W. M. & Kaverina, I. Nucleation and dynamics of Golgi-derived microtubules. *Frontiers in Neuroscience* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00431> (2015).
69. Petry, S. & Vale, R. D. Microtubule nucleation at the centrosome and beyond. *Nature Cell Biology* vol. 17 1089–1093 Preprint at <https://doi.org/10.1038/ncb3220> (2015).
70. Garcin, C. & Straube, A. Microtubules in cell migration. *Essays Biochem* **63**, 509–520 (2019).
71. Kopf, A. *et al.* Microtubules control cellular shape and coherence in amoeboid migrating cells. *Journal of Cell Biology* doi:10.1083/jcb.201907154.
72. Woodruff, J. B., Wueseke, O. & Hyman, A. A. Pericentriolar material structure and dynamics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* vol. 369 Preprint at <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0459> (2014).
73. Colin, A., Singaravelu, P., Théry, M., Blanchoin, L. & Gueroui, Z. Actin-Network Architecture Regulates Microtubule Dynamics. *Current Biology* **28**, 2647-2656.e4 (2018).
74. Wittmann, T., Bokoch, G. M. & Waterman-Storer, C. M. Regulation of leading edge microtubule and actin dynamics downstream of Rac1. *Journal of Cell Biology* **161**, 845–851 (2003).
75. Szikora, S. *et al.* The formin DAAM is required for coordination of the actin and microtubule cytoskeleton in axonal growth cones. *J Cell Sci* **130**, 2506–2519 (2017).
76. Svitkina, T. M. Ultrastructure of the actin cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology* vol. 54 1–8 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.02.007> (2018).
77. Huda, S. *et al.* Microtubule guidance tested through controlled cell geometry. *J Cell Sci* **125**, 5790–5799 (2012).
78. Farina, F. *et al.* The centrosome is an actin-organizing centre. *Nat Cell Biol* **18**, 65–75 (2016).
79. Actin filaments act as a size-dependent diffusion barrier around centrosomes. *bioRxiv Cell Biology* doi:10.1101/2021.10.21.465377.
80. Nolz, J. C. *et al.* The WAVE2 complex regulates T cell receptor signaling to integrins via Abl- and CrkL-C3G-mediated activation of Rap1. *Journal of Cell Biology* **182**, 1231–1244 (2008).

81. Charras, G. & Paluch, E. Blebs lead the way: How to migrate without lamellipodia. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 9 730–736 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrm2453> (2008).
82. Ikenouchi, J. & Aoki, K. A Clockwork Bleb: cytoskeleton, calcium, and cytoplasmic fluidity. *FEBS J* (2021) doi:10.1111/febs.16220.
83. Paluch, E. K. & Raz, E. The role and regulation of blebs in cell migration. *Current Opinion in Cell Biology* vol. 25 582–590 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.05.005> (2013).
84. Charras, G. T., Hu, C. K., Coughlin, M. & Mitchison, T. J. Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *Journal of Cell Biology* **175**, 477–490 (2006).
85. Paluch, E. K. & Raz, E. The role and regulation of blebs in cell migration. *Current Opinion in Cell Biology* vol. 25 582–590 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.05.005> (2013).
86. Robertson, T. F. *et al.* Lymphocyte egress signal sphingosine-1-phosphate promotes erm-guided, bleb-based migration. *Journal of Cell Biology* **220**, (2021).
87. Sánchez-Madrid, F. & Serrador, J. M. Bringing up the rear: Defining the roles of the uropod. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrm2680> (2009).
88. Morin, N. A. *et al.* Nonmuscle myosin heavy chain IIA mediates integrin LFA-1 de-adhesion during T lymphocyte migration. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 195–205 (2008).
89. Smith, L. A., Aranda-Espinoza, H., Haun, J. B., Dembo, M. & Hammer, D. A. Neutrophil traction stresses are concentrated in the uropod during migration. *Biophys J* **92**, L58 (2007).
90. Rougerie, P. & Delon, J. Rho GTPases: Masters of T lymphocyte migration and activation. **142**, 1–13.
91. Faroudi, M. *et al.* Critical roles for Rac GTPases in T-cell migration to and within lymph nodes. *Blood* **116**, 5536–5547 (2010).
92. Nombela-Arrieta, C. *et al.* Differential requirements for DOCK2 and phosphoinositide-3-kinase γ during T and B lymphocyte homing. *Immunity* **21**, 429–441 (2004).
93. Vicente-Manzanares, M. *et al.* Control of lymphocyte shape and the chemotactic response by the GTP exchange factor Vav. *Blood* **105**, 3026–3034 (2005).
94. Gérard, A., Mertens, A. E. E., van der Kammen, R. A. & Collard, J. G. The Par polarity complex regulates Rap1- and chemokine-induced T cell polarization. *Journal of Cell Biology* **176**, 863–875 (2007).
95. Hind, L. E., Vincent, W. J. B. & Huttenlocher, A. Leading from the Back: The Role of the Uropod in Neutrophil Polarization and Migration. **38**, 161–169.
96. Haddad, E. *et al.* The interaction between Cdc42 and WASP is required for SDF-1-induced T-lymphocyte chemotaxis. *Blood* **97**, 33–38 (2001).
97. Watanabe, N. *et al.* p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO Journal* **16**, 3044–3056 (1997).
98. Sakata, D. *et al.* Impaired T lymphocyte trafficking in mice deficient in an actin-nucleating protein, mDia1. *Journal of Experimental Medicine* **204**, 2031–2038 (2007).
99. Amano, M., Nakayama, M. & Kaibuchi, K. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton* vol. 67 545–554 Preprint at <https://doi.org/10.1002/cm.20472> (2010).

100. Newell-Litwa, K. A. Cell Migration: PKA and RhoA Set the Pace. **21**, 3.
101. Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R. L. & Hahn, K. M. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. **440**, 1069–1072.
102. Sassone-Corsi, P. The Cyclic AMP pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, 1–4 (2012).
103. Duan, B. *et al.* Distinct Roles of Adenylyl Cyclase VII in Regulating the Immune Responses in Mice. **185**, 335–344.
104. Taskén, K., Taskén, T. & Stokka, A. J. *The molecular machinery for cAMP-dependent immunomodulation in T-cells*. *476 Biochemical Society Transactions* vol. 34 (2006).
105. Schmid, A., Meili, D. & Salathe, M. Soluble adenylyl cyclase in health and disease. **1842**, 2584–2592.
106. Tresguerres, M., Levin, L. R. & Buck, J. Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase. **79**, 1277–1288.
107. Geng, W. *et al.* Cloning and characterization of the human soluble adenylyl cyclase. **288**, C1305–C1316.
108. Essayan, D. M. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **108**, 671–680 (2001).
109. Cheng, X., Ji, Z., Tsalkova, T. & Mei, F. Epac and PKA: A tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **40**, 651–662 (2008).
110. Grandoch, M., Roscioni, S. S. & Schmidt, M. The role of Epac proteins, novel cAMP mediators, in the regulation of immune, lung and neuronal function. *Br J Pharmacol* **159**, 265–284 (2010).
111. An Adenosine 3',5'-Monophosphate-dependant Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle | Elsevier Enhanced Reader. <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0021925819342048?token=AFD12AE7ADDAD2E0CC780698C73D227A02154E43AF12BBC20421DBB48137A305843A127CE027CD2DE0F10BC42DFA1B5F&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220620140647>.
112. Shirshv, S. v. Role of Epac proteins in mechanisms of cAMP-dependent immunoregulation. *Biochemistry (Moscow)* vol. 76 981–998 Preprint at <https://doi.org/10.1134/S000629791109001X> (2011).
113. Giorgetti, A., Nair, A. v., Codega, P., Torre, V. & Carloni, P. Structural basis of gating of CNG channels. *FEBS Lett* **579**, 1968–1972 (2005).
114. Jiang, Y. *et al.* Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* **417**, 515–522 (2002).
115. Biel, M. & Michalakakis, S. Cyclic nucleotide-gated channels. *Handbook of Experimental Pharmacology* vol. 191 111–136 Preprint at https://doi.org/10.1007/978-3-540-68964-5_7 (2009).
116. Howe, A. K. Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1692**, 159–174 (2004).
117. Giansanti, P., Stokes, M. P., Silva, J. C., Scholten, A. & Heck, A. J. R. Interrogating cAMP-dependent kinase signaling in jurkat T cells via a protein kinase A Targeted Immune-precipitation phosphoproteomics approach. *Molecular and Cellular Proteomics* **12**, 3350–3359 (2013).
118. Wojcechowskyj, J. A., Lee, J. Y., Seeholzer, S. H. & Doms, R. W. Quantitative phosphoproteomics of CXCL12 (SDF-1) signaling. *PLoS One* **6**, (2011).
119. Lim, W. M., Ito, Y., Sakata-Sogawa, K. & Tokunaga, M. CLIP-170 is essential for MTOC repositioning during T cell activation by regulating dynein localisation on the cell surface. *Sci Rep* **8**, (2018).

120. Yi, J. *et al.* Centrosome repositioning in T cells is biphasic and driven by microtubule end-on capture-shrinkage. *Journal of Cell Biology* **202**, 779–792 (2013).
121. Hashimoto-Tane, A. *et al.* Dynein-Driven Transport of T Cell Receptor Microclusters Regulates Immune Synapse Formation and T Cell Activation. *Immunity* **34**, 919–931 (2011).
122. Ohta, Y., Akiyama, T., Nishida, E. & Sakai, H. Protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase induce opposite effects on actin polymerizability. *FEBS Lett* **222**, 305–310 (1987).
123. Gau, D., Veon, W., Shroff, S. G., Roy, P. & Fowler, V. M. The VASP-profilin1 (Pfn1) interaction is critical for efficient cell migration and is regulated by cell-substrate adhesion in a PKA-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry* **294**, 6972–6985 (2019).
124. Wang, F. *et al.* Ser71 Phosphorylation Inhibits Actin-Binding of Profilin-1 and Its Apoptosis-Sensitizing Activity. *Front Cell Dev Biol* **9**, (2021).
125. Lambrechts, A. *et al.* cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of EVL, a Mena/VASP relative, regulates its interaction with actin and SH3 domains. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 36143–36151 (2000).
126. Bachmann, V. A. *et al.* Reciprocal regulation of PKA and Rac signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 8531–8536 (2013).
127. Bachmann, V. A., Bister, K. & Stefan, E. Interplay of PKA and Rac: Fine-tuning of Rac localization and signaling. *Small GTPases* vol. 4 247–251 Preprint at <https://doi.org/10.4161/sgtp.27281> (2013).
128. Feoktistov, I., Goldstein, A. E. & Biaggioni, I. Cyclic AMP and protein kinase A stimulate Cdc42: Role of A2 adenosine receptors in human mast cells. *Mol Pharmacol* **58**, 903–910 (2000).
129. Leemhuis, J. *et al.* Rho GTPases and Phosphoinositide 3-Kinase Organize Formation of Branched Dendrites. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 585–596 (2004).
130. Rigor, R. R., Shen, Q., Pivetti, C. D., Wu, M. H. & Yuan, S. Y. Myosin Light Chain Kinase Signaling in Endothelial Barrier Dysfunction. *Med Res Rev* **33**, 911–933 (2013).
131. Álvarez-Santos, M. D., Álvarez-González, M., Estrada-Soto, S. & Bazán-Perkins, B. Regulation of Myosin Light-Chain Phosphatase Activity to Generate Airway Smooth Muscle Hypercontractility. *Front Physiol* **11**, 701 (2020).
132. Omar, M. H. & Scott, J. D. AKAP Signaling Islands: Venues for Precision Pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences* vol. 41 933–946 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.09.007> (2020).
133. Diviani, D. & Scott, J. D. AKAP signaling complexes at the cytoskeleton. 7.
134. Kennedy, E. J. & Scott, J. D. Selective Disruption of the AKAP Signaling Complexes. in *cAMP Signaling* (ed. Zaccolo, M.) vol. 1294 137–150 (Springer New York).
135. Omar, M. H. & Scott, J. D. AKAP Signaling Islands: Venues for Precision Pharmacology. **41**, 933–946.
136. Wehbi, V. L. & Taskén, K. Molecular mechanisms for cAMP-mediated immunoregulation in T cells - role of anchored protein kinase a signaling units. *Frontiers in Immunology* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00222> (2016).
137. Ruppelt, A. *et al.* Inhibition of T Cell Activation by Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate Requires Lipid Raft Targeting of Protein Kinase A Type I by the A-Kinase Anchoring Protein Ezrin. *The Journal of Immunology* **179**, 5159–5168 (2007).

138. Tasken, K. & Ruppelt, A. Negative regulation of T-cell receptor activation by the cAMP-PKA-Csk signalling pathway in T-cell lipid rafts. *Frontiers in Bioscience* vol. 11 2929–2939 Preprint at <https://doi.org/10.2741/2022> (2006).
139. Coghlan, V. M. *et al.* Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science* (1979) **267**, 108–111 (1995).
140. Kashishian, A. *et al.* AKAP79 inhibits calcineurin through a site distinct from the immunophilin-binding region. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 27412–27419 (1998).
141. Huang, L. J. S. *et al.* NH2-terminal targeting motifs direct dual specificity A-kinase-anchoring protein 1 (D-AKAP1) to either mitochondria or endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology* **145**, 951–959 (1999).
142. Huang, L. J. S., Durick, K., Weiner, J. A., Chun, J. & Taylor, S. S. Identification of a novel protein kinase A anchoring protein that binds both type I and type II regulatory subunits. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 8057–8064 (1997).
143. Fukuyama, T. *et al.* MTG8 proto-oncoprotein interacts with the regulatory subunit of type II cyclic AMP-dependent protein kinase in lymphocytes. *Oncogene* **20**, 6225–6232 (2001).
144. Schillace, R. v., Andrews, S. F., Liberty, G. A., Davey, M. P. & Carr, D. W. Identification and Characterization of Myeloid Translocation Gene 16b as a Novel A Kinase Anchoring Protein in T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* **168**, 1590–1599 (2002).
145. Eide, T. *et al.* Molecular cloning, chromosomal localization, and cell cycle-dependent subcellular distribution of the A-kinase anchoring protein, AKAP95. *Exp Cell Res* **238**, 305–316 (1998).
146. Landsverk, H. B. *et al.* Regulation of anchoring of the RII α regulatory subunit of PKA to AKAP95 by threonine phosphorylation of RII α : Implications for chromosome dynamics at mitosis. *J Cell Sci* **114**, 3255–3264 (2001).
147. Collas, P., le Guellec, K. & Taskén, K. The A-kinase-anchoring protein AKAP95 is a multivalent protein with a key role in chromatin condensation at mitosis. *Journal of Cell Biology* **147**, 1167–1179 (1999).
148. Steen, R. L., Cubizolles, F., le Guellec, K. & Collas, P. A kinase-anchoring protein (AKAP)95 recruits human chromosome-associated protein (hCAP)-D2/Eg7 for chromosome condensation in mitotic extract. *Journal of Cell Biology* **149**, 531–536 (2000).
149. Schillace, R. v. & Scott, J. D. Association of the type 1 protein phosphatase PP1 with the A-kinase anchoring protein AKAP220. *Current Biology* **9**, 321–324 (1999).
150. Schillace, R. v., Voltz, J. W., Sim, A. T. R., Shenolikar, S. & Scott, J. D. Multiple Interactions within the AKAP220 Signaling Complex Contribute to Protein Phosphatase 1 Regulation. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 12128–12134 (2001).
151. Schillace, R. v. & Carr, D. W. The role of protein kinase A and A-kinase anchoring proteins in modulating T-cell activation: Progress and future directions. *Critical Reviews in Immunology* vol. 26 113–131 Preprint at <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v26.i2.20> (2006).
152. Verma, N. K., Chalasani, M. L. S., Scott, J. D. & Kelleher, D. CG-NAP/Kinase Interactions Fine-Tune T Cell Functions. *Frontiers in Immunology* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02642> (2019).
153. García-Ortiz, A. & Serrador, J. M. Erm proteins at the crossroad of leukocyte polarization, migration and intercellular adhesion. *International Journal of*

154. Roumier, A. *et al.* The membrane-microfilament linker ezrin is involved in the formation of the immunological synapse and in T cell activation. *Immunity* **15**, 715–728 (2001).
155. Bergman, M. *et al.* The human p50(csk) tyrosine kinase phosphorylates p56(lck) at Tyr-505 and down regulates its catalytic activity. *EMBO Journal* **11**, 2919–2924 (1992).
156. Brdička, T. *et al.* Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase Csk and is involved in regulation of T cell activation. *Journal of Experimental Medicine* **191**, 1591–1604 (2000).
157. Cornez, I. & Taskén, K. Spatiotemporal control of cyclic AMP immunomodulation through the PKA-Csk inhibitory pathway is achieved by anchoring to an Ezrin-EBP50-PAG scaffold in effector T cells. *FEBS Letters* vol. 584 2681–2688 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.056> (2010).
158. Mosenden, R., Moltu, K., Ruppelt, A., Berge, T. & Taskén, K. Effects of Type I Protein Kinase A Modulation on the T Cell Distal Pole Complex. *Scand J Immunol* **74**, 568–573 (2011).
159. Zhou, W., Vergara, L. & König, R. T cell receptor induced intracellular redistribution of type I protein kinase A. *Immunology* **113**, 453–459 (2004).
160. Bjørge, E., Moltu, K. & Taskén, K. Phosphodiesterases as targets for modulating T-cell responses. *Handb Exp Pharmacol* **204**, 345–363 (2011).
161. Arp, J. *et al.* Regulation of T-Cell Activation by Phosphodiesterase 4B2 Requires Its Dynamic Redistribution during Immunological Synapse Formation. *Mol Cell Biol* **23**, 8042–8057 (2003).
162. Basole, C. P. *et al.* PDE8 controls CD4+ T cell motility through the PDE8A-Raf-1 kinase signaling complex. *Cell Signal* **40**, 62–72 (2017).
163. Epstein, P. M., Basole, C. & Brocke, S. The Role of PDE8 in T Cell Recruitment and Function in Inflammation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* vol. 9 936 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.636778> (2021).
164. Krummel, M. F., Bartumeus, F. & Gérard, A. T cell migration, search strategies and mechanisms. *Nature Reviews Immunology* vol. 16 193–201 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri.2015.16> (2016).
165. Sánchez-Madrid, F. & del Pozo, M. A. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO Journal* vol. 18 501–511 Preprint at <https://doi.org/10.1093/emboj/18.3.501> (1999).
166. Dong, H., Osmanova, V., Epstein, P. M. & Brocke, S. Phosphodiesterase 8 (PDE8) regulates chemotaxis of activated lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **345**, 713–719 (2006).
167. Layseca-Espinosa, E. *et al.* Rolipram inhibits polarization and migration of human T lymphocytes. *Journal of Investigative Dermatology* **121**, 81–87 (2003).
168. Valitutti, S., Dessing, M. & Lanzavecchia, A. Role of cAMP in regulating cytotoxic T lymphocyte adhesion and motility. *Eur J Immunol* **23**, 790–795 (1993).
169. el Homasany, B. S. E. D. *et al.* The Scaffolding Protein CG-NAP/AKAP450 Is a Critical Integrating Component of the LFA-1-Induced Signaling Complex in Migratory T Cells. *The Journal of Immunology* **175**, 7811–7818 (2005).
170. Inoue, D. *et al.* Actin filaments regulate microtubule growth at the centrosome. *EMBO Journal* doi:10.15252/emboj.201899630.

171. Cassioli, C. & Baldari, C. T. Lymphocyte Polarization During Immune Synapse Assembly: Centrosomal Actin Joins the Game. *Frontiers in Immunology* vol. 13 362 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.830835> (2022).
172. Klarenbeek, J., Goedhart, J., van Batenburg, A., Groenewald, D. & Jalink, K. Fourth-generation Epac-based FRET sensors for cAMP feature exceptional brightness, photostability and dynamic range: Characterization of dedicated sensors for FLIM, for ratiometry and with high affinity. *PLoS One* **10**, (2015).
173. Zhang, J.-F. *et al.* An ultrasensitive biosensor for high-resolution kinase activity imaging in awake mice. **17**, 39–46.
174. Howe, A. K. Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. **1692**, 159–174.
175. Cassioli, C. *et al.* The Bardet-Biedl syndrome complex component BBS1 controls T cell polarity during immune synapse assembly. *J Cell Sci* **134**, (2021).
176. Obino, D. *et al.* Actin nucleation at the centrosome controls lymphocyte polarity. **7**, 10969.
177. Obino, D. *et al.* Actin nucleation at the centrosome controls lymphocyte polarity. *Nat Commun* **7**, (2016).
178. Vijayaraghavan, S., Goueli, S. A., Davey, M. P. & Carr, D. W. Protein kinase A-anchoring inhibitor peptides arrest mammalian sperm motility. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 4747–4752 (1997).
179. Kunisaki, Y. *et al.* DOCK2 is a Rac activator that regulates motility and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol* **174**, 647 (2006).
180. Hanoune, J. & Defer, N. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* vol. 41 145–174 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.41.1.145> (2001).
181. Chijiwa, T. *et al.* Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 5267–5272 (1990).
182. Engh, R. A., Girod, A., Kinzel, V., Huber, R. & Bossemeyer, D. Crystal structures of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in complex with isoquinolinesulfonyl protein kinase inhibitors H7, H8, and H89. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 26157–26164 (1996).
183. Murray, A. J. Pharmacological PKA inhibition: All may not be what it seems. *Science Signaling* vol. 1 Preprint at <https://doi.org/10.1126/scisignal.122re4> (2008).
184. Lochner, A. & Moolman, J. A. The many faces of H89: A review. *Cardiovascular Drug Reviews* vol. 24 261–274 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1527-3466.2006.00261.x> (2006).
185. de Boer, A. R., Letzel, T., Lingeman, H. & Irth, H. Systematic development of an enzymatic phosphorylation assay compatible with mass spectrometric detection. *Anal Bioanal Chem* **381**, 647–655 (2005).
186. Nejedlí, M. *et al.* The actin regulator profilin 1 is functionally associated with the mammalian centrosome. (2020) doi:10.26508/lsa.202000655.
187. Logue, J. S. *et al.* AKAP220 protein organizes signaling elements that impact cell migration. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 39269–39281 (2011).
188. Monfregola, J., Napolitano, G., D’Urso, M., Lappalainen, P. & Ursini, M. V. Functional characterization of Wiskott-Aldrich syndrome protein and scar homolog (WASH), a bi-modular nucleation-promoting factor able to interact with biogenesis of

- lysosome-related organelle subunit 2 (BLOS2) and γ -tubulin. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 16951–16957 (2010).
189. Lešková, A., Kusá, Z., Labajová, M., Krausko, M. & Jásik, J. The photoconvertible fluorescent protein dendra2 tag as a tool to investigate intracellular protein dynamics. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1992 201–214 (Humana Press Inc., 2019).
 190. Real, E. *et al.* Immature Dendritic Cells (DCs) Use Chemokines and Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1, But Not DC-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin, to Stimulate CD4 + T Cells in the Absence of Exogenous Antigen . *The Journal of Immunology* **173**, 50–60 (2004).
 191. Moreau, H. D., Piel, M., Voituriez, R. & Lennon-Duménil, A. M. Integrating Physical and Molecular Insights on Immune Cell Migration. *Trends in Immunology* vol. 39 632–643 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.007> (2018).
 192. Dupré, L., Houmadi, R., Tang, C. & Rey-Barroso, J. T lymphocyte migration: An action movie starring the actin and associated actors. *Frontiers in Immunology* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00586> (2015).
 193. Dong, T. X. *et al.* Intermittent Ca²⁺ signals mediated by orai1 regulate basal T cell motility. *Elife* **6**, (2017).
 194. Layseca-Espinosa, E. *et al.* Rolipram inhibits polarization and migration of human T lymphocytes. *Journal of Investigative Dermatology* **121**, 81–87 (2003).
 195. Oppenheimer-Marks, N., Kavanaugh, A. F. & Lipsky, P. E. Inhibition of the transendothelial migration of human T lymphocytes by prostaglandin E₂. *J Immunol* **152**, 5703–13 (1994).
 196. Valitutti, S., Dessing, M. & Lanzavecchia, A. Role of cAMP in regulating cytotoxic T lymphocyte adhesion and motility. *Eur J Immunol* **23**, 790–795 (1993).
 197. McKenzie, A. J., Svec, K. v, Williams, T. F. & Howe, A. K. Protein kinase A activity is regulated by actomyosin contractility during cell migration and is required for durotaxis. **31**, 45–58.
 198. Liu, L., Das, S., Losert, W. & Parent, C. A. mTORC2 Regulates Neutrophil Chemotaxis in a cAMP- and RhoA-Dependent Fashion. **19**, 845–857.
 199. Howe, A. K., Baldor, L. C. & Hogan, B. P. Spatial regulation of the cAMP-dependent protein kinase during chemotactic cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14320–5 (2005).
 200. Vargas, P., Terriac, E., Lennon-Duménil, A. M. & Piel, M. Study of cell migration in microfabricated channels. *Journal of Visualized Experiments* e51099 (2014) doi:10.3791/51099.
 201. Paul, C. D., Hung, W. C., Wirtz, D. & Konstantopoulos, K. Engineered Models of Confined Cell Migration. *Annual Review of Biomedical Engineering* vol. 18 159–180 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071114-040654> (2016).
 202. Lauffenburger, D. A. & Horwitz, A. F. Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell* vol. 84 359–369 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81280-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81280-5) (1996).
 203. Farina, F. *et al.* The centrosome is an actin-organizing centre. *Nat Cell Biol* **18**, 65–75 (2016).
 204. Ibañez-Vega, J., del Valle Batalla, F., Saez, J. J., Soza, A. & Yuseff, M. I. Proteasome dependent actin remodeling facilitates antigen extraction at the immune synapse of B cells. *Front Immunol* **10**, (2019).

205. Vora, S. M. & Phillips, B. T. The benefits of local depletion: The centrosome as a scaffold for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Cell Cycle* vol. 15 2124–2134 Preprint at <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1196306> (2016).
206. Martin-Cofreces, N. B. *et al.* The chaperonin CCT controls T cell receptor–driven 3D configuration of centrioles. *Sci Adv* **6**, (2020).
207. Hao, Y. H. *et al.* Regulation of WASH-dependent actin polymerization and protein trafficking by ubiquitination. *Cell* **152**, 1051–1064 (2013).
208. Bard, J. A. M., Bashore, C., Dong, K. C. & Martin, A. The 26S Proteasome Utilizes a Kinetic Gateway to Prioritize Substrate Degradation. *Cell* **177**, 286–298.e15 (2019).
209. Meiring, J. C. M., Shneyer, B. I. & Akhmanova, A. Generation and regulation of microtubule network asymmetry to drive cell polarity. *Current Opinion in Cell Biology* vol. 62 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.10.004> (2020).
210. Bornens, M. Is the centriole bound to the nuclear membrane? *Nature* **270**, 80–82 (1977).
211. Burakov, A. v. & Nadezhdina, E. S. Association of nucleus and centrosome: magnet or velcro? *Cell Biol Int* **37**, 95–104 (2013).
212. Matthews, H. K. *et al.* Changes in Ect2 Localization Couple Actomyosin-Dependent Cell Shape Changes to Mitotic Progression. *Dev Cell* **23**, 371–383 (2012).
213. Skruber, K. *et al.* Arp2/3 and Mena/VASP Require Profilin 1 for Actin Network Assembly at the Leading Edge. *Current Biology* **30**, 2651–2664.e5 (2020).
214. Plessner, M., Melak, M., Chinchilla, P., Baarlink, C. & Grosse, R. Nuclear F-actin formation and reorganization upon cell spreading. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 11209–11216 (2015).
215. Henney, C. S., Bourne, H. R. & Lichtenstein, L. M. The role of cyclic 3',5' adenosine monophosphate in the specific cytolytic activity of lymphocytes. *J Immunol* **108**, 1526–1534 (1972).
216. Inhibition of T lymphocyte activation by cAMP is associated with down-regulation of two parallel mitogen-activated protein kinase pathways, the extracellular signal-related kinase and c-Jun N-terminal kinase - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8759733/>.
217. Hermann-Kleiter, N. *et al.* PKC θ and PKA are antagonistic partners in the NF-AT transactivation pathway of primary mouse CD3+ T lymphocytes. *Blood* **107**, 4841–4848 (2006).
218. Daher, C. *et al.* Blockade of β -adrenergic receptors improves CD8+ T-cell priming and cancer vaccine efficacy. *Cancer Immunol Res* **7**, 1849–1863 (2019).
219. Conche, C., Boulla, G., Trautmann, A. & Randriamampita, C. T Cell Adhesion Primes Antigen Receptor-Induced Calcium Responses through a Transient Rise in Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate. **30**, 33–43.
220. Dong, H., Osmanova, V., Epstein, P. M. & Brocke, S. Phosphodiesterase 8 (PDE8) regulates chemotaxis of activated lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **345**, 713–719 (2006).
221. Layseca-Espinosa, E. *et al.* Rolipram inhibits polarization and migration of human T lymphocytes. *Journal of Investigative Dermatology* **121**, 81–87 (2003).
222. Pontes, B. *et al.* Membrane tension controls adhesion positioning at the leading edge of cells. *Journal of Cell Biology* **216**, 2959–2977 (2017).
223. Alenghat, F. J., Tytell, J. D., Thodeti, C. K., Derrien, A. & Ingber, D. E. Mechanical control of cAMP signaling through integrins is mediated by the heterotrimeric G α s protein. *J Cell Biochem* **106**, 529–538 (2009).

224. Gancedo, J. M. Biological roles of cAMP: Variations on a theme in the different kingdoms of life. *Biological Reviews* **88**, 645–668 (2013).
225. Ryniawec, J. M. & Rogers, G. C. Centrosome instability: when good centrosomes go bad. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 78 6775–6795 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03928-1> (2021).
226. Bromley, S. K. *et al.* The immunological synapse. *Annual Review of Immunology* vol. 19 375–396 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.375> (2001).
227. Hailman, E., Burack, W. R., Shaw, A. S., Dustin, M. L. & Allen, P. M. Immature CD4+CD8+ thymocytes form a multifocal immunological synapse with sustained tyrosine phosphorylation. *Immunity* **16**, 839–848 (2002).
228. Richie, L. I. *et al.* *Imaging Synapse Formation during Thymocyte Selection: Inability of CD3 to Form a Stable Central Accumulation during Negative Selection.* *Immunity* vol. 16 (2002).
229. Friedl, P., den Boer, A. T. & Gunzer, M. Tuning immune responses: Diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nature Reviews Immunology* vol. 5 532–545 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri1647> (2005).
230. Brossard, C. *et al.* Multifocal structure of the T cell - Dendritic cell synapse. *Eur J Immunol* **35**, 1741–1753 (2005).
231. Delon, J. & Germain, R. N. Information transfer at the immunological synapse. *Current Biology* **10**, R923–R933 (2000).
232. Guedj, C., Abraham, N. & Randriamampita, C. L'antisynapse : présynapse et garde-fou de l'activation lymphocytaire ? *médecine/sciences* **32**, 1053–1056 (2016).
233. Mastrogiovanni, M., Juzans, M., Alcover, A. & di Bartolo, V. Coordinating Cytoskeleton and Molecular Traffic in T Cell Migration, Activation, and Effector Functions. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.591348> (2020).
234. SenGupta, S., Parent, C. A. & Bear, J. E. The principles of directed cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 22 529–547 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00366-6> (2021).
235. Wettschureck, N. & Offermanns, S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological Reviews* vol. 85 1159–1204 Preprint at <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2005> (2005).
236. Nürnberg, A., Kitzing, T. & Grosse, R. Nucleating actin for invasion. *Nat Rev Cancer* **11**, 117–187 (2011).
237. Pritchard, R. H., Shery Huang, Y. Y. & Terentjev, E. M. Mechanics of biological networks: From the cell cytoskeleton to connective tissue. *Soft Matter* vol. 10 1864–1884 Preprint at <https://doi.org/10.1039/c3sm52769g> (2014).
238. Akhmanova, A. & Steinmetz, M. O. Tracking the ends: A dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 9 309–322 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrm2369> (2008).
239. Pollard T.D. & Kholodenko, B. N. Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell* **7**, (2003).
240. Raftopoulou, M. & Hall, A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Developmental Biology* vol. 265 23–32 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.06.003> (2004).