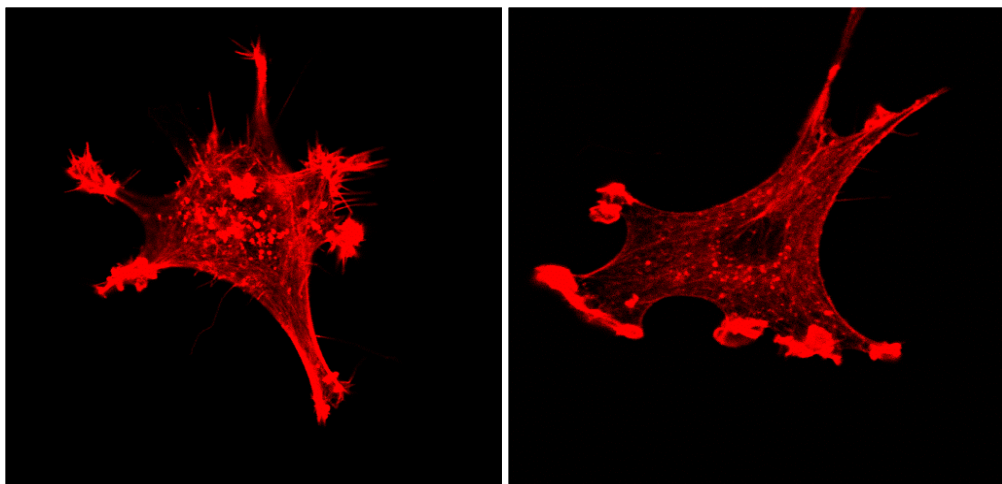




**UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN
FACULTÉ DE MÉDECINE
INSTITUT DE PATHOLOGIE CELLULAIRE
CHRISTIAN DE DUVE
UNITE DE BIOLOGIE CELLULAIRE**



Régulation de la macropinocytose constitutive dans les fibroblastes transformés par les oncogènes



Mustapha AMYERE

**Promoteur: Professeur P.J. Courtoy
Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales
Orientation: Biologie Cellulaire**

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE 1. INTRODUCTION.	7
1.1. Les différentes voies d'entrée dans l'appareil endocytaire.	7
1.1.1. Définitions.	7
1.1.2. Modalités de l'endocytose.	9
1.1.2.1. Endocytose fluide.	9
1.1.2.2. Endocytose adsorptive non spécifique.	10
1.1.2.3. Endocytose médiée par récepteurs.	10
1.1.3. La micropinocytose.	11
1.1.3.1. Micropinocytose associée à la clathrine.	11
1.1.3.2. Micropinocytose non associée à la clathrine.	12
1.1.4. Un rôle des cavéoles dans l'endocytose ?	13
1.1.5. La phagocytose.	14
1.1.6. La macropinocytose.	20
1.1.6.1. Définition et structures impliquées dans la macropinocytose.	20
1.1.6.2. Rôles de la macropinocytose.	21
1.1.6.3. Relation entre la macropinocytose et le cancer.	23
1.2. Les oncogènes v-Src et K-Ras.	24
1.2.1. L'oncogène v-Src.	24
1.2.1.1. Caractéristiques générales de la Src-kinase.	24
1.2.1.2. Structures en domaines de Src.	25
1.2.1.2.1. Le domaine SH4.	26
1.2.1.2.2. Le domaine unique.	26
1.2.1.2.3. Le domaine SH3.	26
1.2.1.2.4. Le domaine SH2.	26
1.2.1.2.5. Le domaine catalytique ou SH1.	27
1.2.1.2.6. L'extrémité C-terminale.	27
1.2.1.3. Mécanismes d'activation de Src.	27
1.2.1.3.1. Régulation par interaction intramoléculaire.	27
1.2.1.3.2. Régulation par interaction intermoléculaire.	28
1.2.1.3.3. Activation par délétion ou mutation.	28
1.2.1.4. Les membres de la famille des Src tyrosine-kinases.	28
1.2.1.5. Les substrats de Src.	29

1.2.1.6. Effets de v-Src sur le cytosquelette.	31
1.2.1.7. v-Src et l'adhésion cellulaire.	31
1.2.2. L'oncogène K-Ras.	33
1.2.2.1. Structure et activation de la petite GTPase p21 ^{Ras} .	33
1.2.2.2. Modifications post-traductionnelles de Ras.	34
1.2.2.3. Les signaux en aval de Ras.	35
1.3. Les phospho-inositide 3-kinases et leur signalisation.	37
1.3.1. Introduction: rôle des phospho-inositide 3-kinases dans la signalisation cellulaire.	37
1.3.1.1. Les phospho-inositides comme substrats et régulateurs.	37
1.3.1.2. Les PI3Ks, intermédiaires essentiels dans la signalisation cellulaire.	37
1.3.2. Structure et classification des PI3Ks des mammifères.	39
1.3.3. Synthèse des phospho-inositides dans les cellules de mammifères.	42
1.3.4. Signalisation en aval de la PI3K par des interactions lipides-protéines.	43
1.3.4.1. Les phospho-inositides, sites de liaison spécifiques pour des protéines régulatrices.	43
1.3.4.2. Domaines d'interaction des protéines avec les 3-phospho-inositides.	44
1.3.4.2.1. Les domaines SH2.	46
1.3.4.2.2. Les séquences hydrophobes et basiques.	46
1.3.4.2.3. Les domaines homologues à la pleckstrine.	46
1.3.4.2.4. Le domaine en doigt de zinc FYVE.	47
1.3.4.3. Spécificité des interactions des 3-phospho-inositides.	48
1.3.4.3.1. Le PtdIns 3P.	48
1.3.4.3.2. Le PtdIns 3,4P2.	49
1.3.4.3.3. Le PtdIns 3,5P2.	49
1.3.4.3.4. Le PtdIns 3,4,5P3.	50
1.4. Les phospholipases C.	51
1.4.1. Introduction: rôle des PLCs dans la signalisation cellulaire.	51
1.4.2. Structure en domaines des PLCs.	53
1.4.2.1. Le domaine PH.	53
1.4.2.2. Le motif EF.	54
1.4.2.3. Le domaine catalytique X/Y.	54
1.4.2.4. Les éléments régulateurs du site d'insertion.	55
1.4.2.5. Le domaine C2.	55

1.4.2.6. L'extrémité C-terminale.	56
1.4.3. Régulation de la PLC γ .	56
1.5. La dynamique de l'actine corticale et les protéines contrôlant sa polymérisation.	57
1.5.1. Fonctions générales, organisation et perturbation des microfilaments.	57
1.5.2. Les protéines régulatrices de la dynamique de l'actine corticale.	61
1.5.2.1. Dynamique et actine corticale.	61
1.5.2.2. Les protéines de polymérisation des microfilaments.	62
1.5.2.2.1. La profiline.	62
1.5.2.2.2. Le complexe Arp2/3.	63
1.5.2.3. Les protéines de fragmentation et de dépolymérisation des microfilaments.	66
1.5.2.3.1. Les deux familles de protéines de fragmentation et de dépolymérisation.	66
1.5.2.3.2. La gelsoline.	67
1.5.2.3.3. L'ADF/cofiline.	70
1.5.2.4. Les protéines de réticulation.	70
1.5.3. Rôles complémentaires du Ca ²⁺ et des phospho-inositides dans le contrôle de la dynamique de l'actine corticale.	72
1.6. Les Rho-GTPases.	74
1.6.1. Introduction.	74
1.6.2. Régulation des Rho-GTPases.	74
1.6.2.1. Cycle d'activation/inactivation des Rho-GTPases.	74
1.6.2.2. Les Rho-GEFs.	76
1.6.2.3. Les Rho-GDIs.	76
1.6.2.4. Les Rho-GAPs.	76
1.6.2.5. Perversion des Rho-GTPases par des toxines bactériennes.	77
1.6.3. Effets cellulaires et moléculaires des Rho-GTPases.	78
1.6.3.1. Effets distincts des Rho-GTPases.	78
1.6.3.2. Mécanismes généraux d'interaction des Rho-GTPases avec leurs effecteurs.	78
1.6.3.3. Signalisation en aval de Rho.	79
1.6.3.4. Signalisation en aval de Cdc42.	82
1.6.3.5. Signalisation en aval de Rac.	84
1.6.3.6. Communication entre les Rho-GTPases.	85

CHAPITRE 2. RESULTATS. 88

2.1. Publication N°1: Régulation par l'AMP-cyclique de la formation et du sort des macropinosomes dans les fibroblastes transformés par v-Src.	88
2.1.1. Résumé.	88
2.1.2. Article N°1.	89
2.2. Publication N°2: Rôle de l'activation séquentielle de la PI3K et de la PI-PLC dans la macropinocytose constitutive des fibroblastes transformés par v-Src et K-Ras.	96
2.2.1. Résumé.	96
2.2.2. Article N°2.	97

CHAPITRE 3. CONCLUSIONS. 112

3.1. Phénoménologie de la macropinocytose constitutive induite par des oncogènes.	112
3.1.1. La macropinocytose constitutive des fibroblastes transformés par v-Src est une forme d'endocytose bien distincte.	112
3.1.2. Comme v-Src, l'oncogène K-Ras induit une macropinocytose constitutive.	113
3.1.3. Les macropinosomes sont formés préférentiellement au niveau des prolongements cellulaires par le "ruffling" membranaire associé aux lamellipodes.	113
3.2. Régulation de la macropinocytose constitutive induite par des oncogènes.	114
3.2.1. Comparaison avec la phagocytose.	114
3.2.2. Comparaison avec la macropinocytose chez <i>Dictyostelium</i> .	118
3.2.3. Comparaison avec la macropinocytose constitutive des cellules dendritiques.	118
3.2.4. Relais par la PI3K de la signalisation de la macropinocytose constitutive induite par les oncogènes.	120
3.2.5. Relais par la PI-PLC en aval de la PI3K.	122
3.2.6. Relais par les Rho GTPases?	122
3.2.7. Accélération sélective par l'AMPc de la régurgitation à partir des macropinosomes.	123

CHAPITRE 4. PERSPECTIVES. 125

4.1. Polarité des régulateurs et effecteurs de la macropinocytose.	125
4.2. Rôle du calcium cytosolique.	126
4.3. Protéines régulées par le Ca ²⁺ .	128
4.4. Implication de la protéine-kinase C.	129

4.5. Implication de la phospholipase D.	131
4.6. Implication des petites protéines G (Rho, Rac et Cdc42).	135
4.7. Les régulateurs directs du cytosquelette d'actine corticale.	136
4.8. Relation entre la macropinocytose, l'adhésion et la motilité cellulaires.	137
CHAPITRE 5. RÉFÉRENCES.	139

Liste des abréviations

ADF :	actin depolymerisation factor
AMPC :	AMP cyclique
Arp :	actin-related protein
D3 :	PtdIns 3P + PtdIns 3,4P2 + PtdIns 3,5P2 + PtdIns 3,4,5P3
D4 :	PtdIns 4P + PtdIns 4,5P2
D5 :	PtdIns 5P
DAG :	diacylglycérol
DbAMP :	dibutyryl-AMP cyclique
EEA1 :	early endosomal autoantigen-1
EGF :	epidermal growth factor
FAK :	focal adhesion kinase
GAP :	GTPases-activating proteins
GDI :	guanine nucleotide dissociation inhibitors
GEF :	guanine nucleotide exchange factors
HGF :	hepatocyte growth factor
HRP :	horseradish peroxidase
IGF-1 :	insulin-like growth factor type 1
IP3 :	inositol 1,4,5-trisphosphate
IRS-1 :	insulin receptor substrate-1
K/R :	lysine/arginine-rich region
LY294002 :	2-(4-morpholinyl)-8-phényl-4H-1-benzopyrane-4-one
NCDC :	2-nitro-4-carboxyphényl-N,N-diphénylcarbamate
p110 :	sous-unité catalytique de la phosphatidylinositol 3-kinase
p85 :	sous-unité régulatrice de la phosphatidylinositol 3-kinase
PA :	acide phosphatidique
PDGF :	platelet-derived growth factor
PH :	pleckstrin homology
PI3K :	phosphatidylinositol 3-kinase
PI-PLC :	phospholipases C spécifiques des phosphatidylinositols
PI-PLD :	phospholipases D spécifiques des phosphatidylinositols
PKA :	protéine kinase A
PKC :	protéine kinase C
PLA2 :	phospholipase A2
PMA :	phorbol myristate acetate
PtdIns 3,4,5P3 :	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (ou PIP3)
PtdIns 3,4P2 :	phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate
PtdIns 3,5P2 :	phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate
PtdIns 3P :	phosphatidylinositol 3-monophosphate
PtdIns 4,5P2 :	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (ou PIP2)
PtdIns 4P :	phosphatidylinositol 4-monophosphate
PtdIns 5P :	phosphatidylinositol 5-monophosphate
PTK :	protéine tyrosine-kinase
RTK :	récepteur tyrosine-kinase
SH :	Src homology domain
Tyr :	tyrosine
U73122 :	1-[6-((17b-3-méthoxyestra-1,3,5(10)-triène-17-yl)-amino)hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione)
WASp :	Wiskott-Aldrich Syndrome protein

CHAPITRE 1. INTRODUCTION.

1.1. Les différentes voies d'entrée dans l'appareil endocytaire.

1.1.1. Définitions.

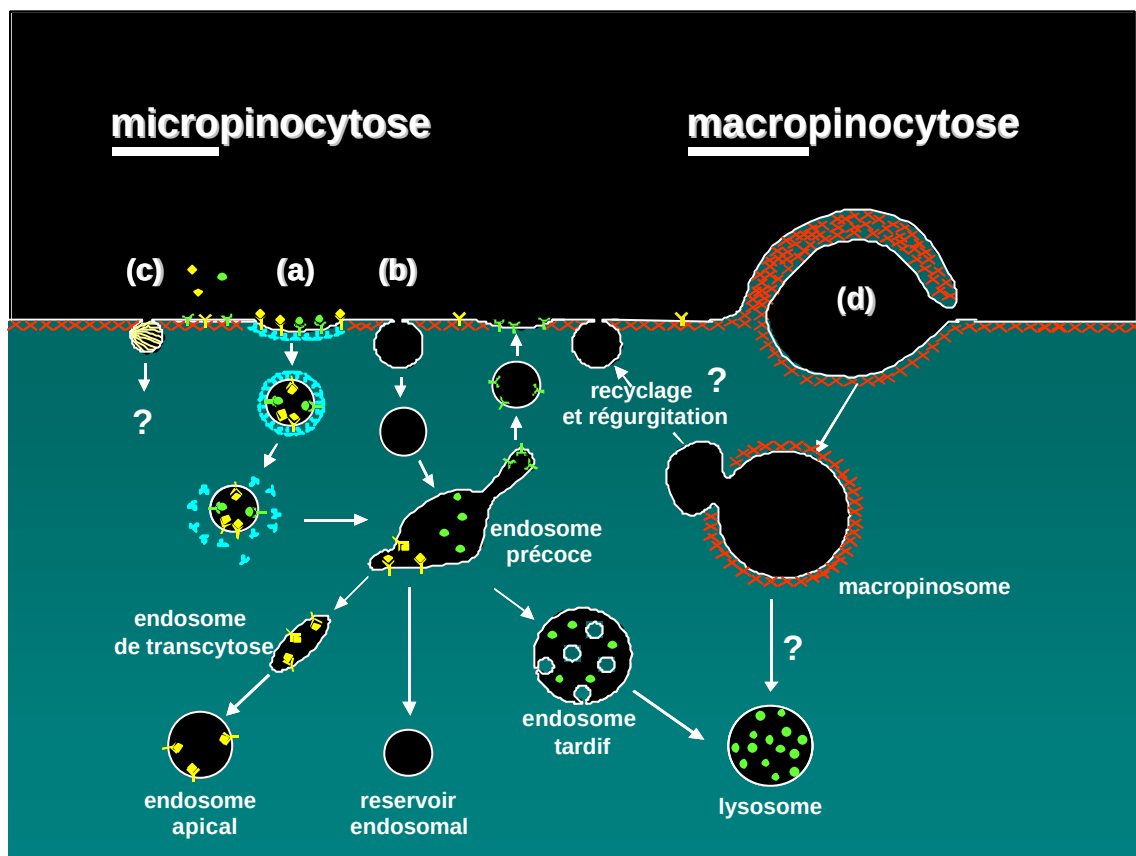
Au sens restreint que nous privilégierons dans cette thèse, l'endocytose désigne la formation de divers types de vésicules qui s'individualisent dans le cytoplasme à partir de la membrane plasmique. L'usage a (malheureusement) élargi ce terme à tout l'appareil vésiculaire intracellulaire, que le contenu et la membrane des vésicules endocytaires primaires pourront ensuite emprunter. En dehors de la mitose, toutes les cellules eucaryotes captent sans cesse par endocytose des constituants solubles du milieu extracellulaire (pinocytose) et intériorisent par la même occasion des constituants propres de leur membrane péricellulaire (Steinman *et al.*, 1983); certains captent en outre des particules (phagocytose).

On distingue deux types principaux de pinocytose en fonction de la taille des vésicules formées. La micropinocytose désigne la formation de petites vésicules d'endocytose de taille homogène (≤ 150 nm de diamètre) par invagination de la membrane plasmique et s'observe continuellement dans tous les types cellulaires. Ces vésicules peuvent être ou non tapissées d'un manteau de clathrine. La macropinocytose désigne au contraire la formation de très grosses vésicules d'endocytose de taille irrégulière, pouvant atteindre plusieurs μm de diamètre, par des évaginations membranaires à base d'actine F; cette activité est limitée à certains types cellulaires ou à certains états (Figure 1.1). La phagocytose désigne enfin l'ingestion de grosses particules dans des grosses vésicules appelées phagosomes ($> 0,5 \mu\text{m}$ de diamètre) par des protrusions membranaires également à base d'actine F qui les enveloppent étroitement, et dont la taille correspond donc exactement à leur contenu. La phagocytose est principalement le fait de cellules spécialisées, les globules blancs.

La pinocytose est une propriété qui distingue les cellules eucaryotes des cellules procaryotes. Elle est en outre indispensable à la vie eucaryote. Elle intervient en effet dans (i) l'apport de nutriments essentiels (fer, cholestérol, vitamine B12, ..., qui sont captés en association avec des protéines porteuses); (ii) la régulation de la composition (qualitative) de la membrane péricellulaire, en modulant ainsi les signaux responsables de la prolifération et de l'ancrage, ainsi que la perméabilité cellulaires; et (iii) le maintien de l'homéostasie de la surface de la membrane péricellulaire, en compensant exactement l'apport de constituants membranaires insérés par exocytose dans la membrane plasmique suite à la sécrétion

vésiculaire. L'endocytose permet aussi la reconstitution rapide des vésicules synaptiques après leur exocytose. La phagocytose assure la protection des organismes pluricellulaires contre l'invasion par divers microorganismes pathogènes (bactéries, parasites ou champignons) ainsi que l'élimination des débris cellulaires issus de l'apoptose et celle des particules inorganiques (talc, ...). Enfin, rappelons que l'endocytose est subvertie par divers agents pathogènes (toxines, virus, bactéries, parasites ou champignons), qui l'exploitent comme un cheval de Troie pour pénétrer dans leurs cellules-cibles.

Figure 1.1. Les différentes voies de la pinocytose chez les mammifères.



La micropinocytose regroupe toutes les invaginations formant des vésicules endocytaires primaires de petite taille, représentées ici du côté basolatéral de la membrane plasmique. Elle comprend l'endocytose dépendante de la clathrine (a), l'endocytose par des invaginations comparables, mais indépendante de la clathrine (b), et l'individualisation éventuelle des cavéoles en vésicules de très petite taille (environ 50 nm; c). La macropinocytose (d) débute par des évaginations et forme des vésicules de taille très variable. Ces voies endocytaires peuvent coexister dans la même cellule.

Après micropinocytose, les constituants intériorisés sont rapidement transférés (en moins de 5 minutes) dans des endosomes précoces, où s'effectue leur tri. Certains sont recyclés à la membrane plasmique par des évaginations tubulaires très développées, tandis que d'autres continuent leur parcours via les vésicules de transfert et les endosomes tardifs, vers les lysosomes. Le recyclage et le transfert de membrane aux lysosomes sont des processus essentiellement non sélectifs (voir Draye *et al.*, 1988), complétés pour certains constituants par des mécanismes d'inclusion ou d'exclusion sélectives. La membrane des endosomes tardifs présente des invaginations lumineales, formant les corps multivésiculaires. C'est au niveau des endosomes tardifs que la voie de l'endocytose rencontre la voie de sécrétion, qui y apporte les enzymes lysosomiales nouvellement synthétisées. Leur lumière est nettement acide (pH ~ 6) et l'on pense donc que la dégradation hydrolytique des molécules endocytées commence à ce stade. Les lysosomes se forment à partir des endosomes tardifs. Ce processus de conversion implique le retrait de certaines protéines membranaires spécifiques des endosomes (récepteur du mannose 6-phosphate) et une acidification plus importante. Selon les systèmes cellulaires, les macropinosomes fusionnent ou non avec les lysosomes. Quant aux phagosomes, ils fusionnent plus ou moins vite avec les lysosomes selon leur contenu. Certains constituants endocytés évitent les lysosomes et sont séquestrés dans un réservoir endosomal. Dans les cellules polarisées, enfin, certains constituants sont sélectivement transférés d'un pôle à l'autre de la cellule sans passage par les lysosomes : on parle de transcytose.

1.1.2. Modalités de l'endocytose.

On distingue trois modalités pour l'endocytose, suivant la spécificité avec laquelle le matériel extracellulaire est intériorisé.

1.1.2.1. Endocytose fluide.

Dans cette modalité qui ne présente aucune spécificité, la capture de solutés est très faible, identique pour divers traceurs, et son efficacité est strictement proportionnelle à la concentration des traceurs dans le milieu extracellulaire. L'endocytose fluide n'est pas spécifique d'une structure particulière, mais est au contraire le résultat de tous les types de structures endocytaires, à l'exception des phagosomes de type "zipper", où la membrane limitante étroitement accolée à la proie ne laisse pas de place pour l'endocytose fluide. Une étude antérieure menée au laboratoire d'accueil a clairement montré que la peroxydase de

raifort est un traceur fidèle de l'endocytose fluide dans les fibroblastes lorsqu'elle est utilisée à forte concentration. A des concentrations supérieures à 1 mg/ml dans le milieu d'incubation, la clairance de la peroxydase de raifort par des fibroblastes est en effet strictement proportionnelle à sa concentration (Cupers *et al.*, 1994) et est en outre identique à celle du "lucifer yellow" (Tyteca *et al.*, sous presse). De plus, la révélation cytochimique de la peroxydase par la diaminobenzidine polymérisée permet de mettre en évidence les structures endocytaires impliquées, tant en microscopie optique qu'en microscopie électronique (Steinman *et al.*, 1983). Dans mon travail, l'analyse biochimique de l'endocytose fluide a été basée sur des mesures d'accumulation et de régurgitation de la peroxydase de raifort.

1.1.2.2. Endocytose adsorptive non spécifique.

Dans cette seconde modalité, un soluté particulier peut s'adsorber sur une population généralement abondante de sites non spécifiques sur la membrane péricellulaire, par interaction de charge (traceurs cationisés se fixant au glycocalix riche en protéoglycannes sulfatés), interaction hydrophobe (dérivés fluorescents des lipides membranaires) ou interaction de type lectine (marquage des sucres membranaires). L'efficacité de la capture d'un traceur par endocytose adsorptive dépend de l'abondance des sites de fixation et de son avidité pour ces sites : elle varie donc en fonction du type cellulaire et de la nature du traceur. La diversité des sites de liaison impliqués exclut une régulation fine de l'endocytose adsorptive. Pour un traceur donné fortement adsorbé, la contribution relative de l'endocytose adsorptive est très supérieure à l'endocytose fluide, jusqu'à des concentrations très élevées où la saturation des sites est atteinte. En revanche, si l'avidité de la membrane pour le traceur est faible, la composante adsorptive de l'endocytose est très minoritaire par rapport à la composante fluide à concentration élevée, et peut être alors négligée. C'est le cas pour la peroxydase de raifort dans les fibroblastes.

1.1.2.3. Endocytose médiée par récepteurs.

L'endocytose par récepteurs implique la liaison spécifique, généralement de haute affinité, de ligands bien définis à un nombre limité de copies d'un seul type de récepteur transmembranaire, exposées à la surface cellulaire. Par convention de langage en biologie cellulaire, on utilise depuis Brown et Goldstein en 1986 le terme "récepteur" même si cette protéine n'a pas de fonction de signalisation transmembranaire directe (par exemple les lipoprotéines porteuses de cholestérol, ou la transferrine porteuse de fer). Ces complexes ligands-récepteurs se concentrent dans les puits mantelés et pénètrent dans des vésicules

mantelées (recouvertes de clathrine). Les ligands subissent donc une double concentration : (i) au niveau de la membrane plasmique, où ils s'associent à leurs récepteurs; et (ii) au niveau des puits mantelés, où l'adaptine de type AP2 entraîne la polymérisation du manteau de clathrine à la membrane plasmique, ce qui piège ainsi les complexes ligands-récepteurs sur une surface très restreinte de la membrane péricellulaire, destinée à l'endocytose. Au contraire de l'endocytose fluide, l'endocytose médiée par récepteurs est donc caractéristique d'un seul type de vésicule endocytaire primaire, les vésicules recouvertes de clathrine. L'endocytose liée aux récepteurs est le mécanisme le plus efficace pour la capture sélective de macromolécules présentes en faible concentration dans le milieu extracellulaire. Cette capture peut en outre être finement régulée (i) en fonction du nombre de récepteurs exprimés (régulation de l'expression génétique ou "down-régulation" par dégradation); (ii) de la fraction exposée en surface (régulation de la translocation entre le contingent exposé et le réservoir intracellulaire); voire (iii) de l'affinité de l'interaction (dimérisation, coopération positive ou négative). Dans notre travail, nous avons utilisé la transferrine marquée à l'iode 125 comme traceur de l'endocytose médiée par récepteurs.

1.1.3. La micropinocytose.

Ce terme recouvre l'ensemble des vésicules endocytaires de petite taille (typiquement inférieure à 150 nm de diamètre), qui peuvent être ou non tapissées d'un manteau de clathrine. L'individualisation des cavéoles tapissées de cavéoline en vésicules endocytaires primaires de 50 nm de diamètre reste encore controversée.

1.1.3.1. Micropinocytose associée à la clathrine.

Cette voie endocytaire, la mieux connue, désigne la formation des vésicules endocytaires primaires tapissées d'un manteau de clathrine. C'est la structure qui assure l'endocytose médiée par récepteurs, permettant à la cellule de concentrer puis d'intérioriser de manière spécifique des ligands extracellulaires tout en minimisant l'endocytose fluide concomitante obligée (puisque'il n'y a pas de vésicules endocytaires sans contenu). Ainsi, l'efficacité d'incorporation de la transferrine dans les fibroblastes par ce mécanisme est d'environ 100 fois supérieure par rapport à son entrée par endocytose fluide.

La micropinocytose associée à la clathrine est constitutive dans tous les types cellulaires, de l'amibe et de la levure à l'homme. Les puits mantelés de clathrine ("coated pits") occupent environ 2 % de la surface de la membrane plasmique. La durée de vie de ces

invaginations est courte: dans la minute qui suit leur formation, elles se détachent par épincement pour donner naissance à des vésicules recouvertes d'un manteau de clathrine ("clathrin-coated vesicles"). Très rapidement, ces vésicules perdent leur manteau et sont alors capables de fusionner avec les endosomes précoces. On a estimé que chez les fibroblastes Rat-1, l'équivalent de la surface de la cellule peut être intériorisée en une heure (Draye *et al.*, 1988). De plus, Brown et Goldstein ont calculé que les récepteurs LDL subissent dans ces cellules environ 10 cycles d'intériorisation et de recyclage par heure et que leur demi-vie très longue leur permet d'effectuer jusqu'à 1000 cycles avant d'être dégradés (Brown et Goldstein, 1986).

Plusieurs protéines de la membrane plasmique sont impliquées dans la machinerie endocytaire des puits mantelés, tels que l'adaptateur AP2 et ses partenaires directs (amphiphysine, eps15, epsine) ou indirects (dynamine, synaptojanine, ...; Marsh et McMahon, 1999). L'adaptine AP2 reconnaît les motifs di-leucine ou Y-x-x- ϕ ("tyrosine-based motif", où x est non spécifié et ϕ est un résidu hydrophobe de grande taille) dans le domaine cytoplasmique des protéines rapidement endocytées et assure ainsi leur concentration dans les puits endocytaires. Pour le récepteur de la transferrine, le motif d'endocytose est YTRF (Trowbridge *et al.*, 1993).

1.1.3.2. Micropinocytose non associée à la clathrine.

La clathrine n'est toutefois pas indispensable à la micropinocytose. En effet, chez *Saccharomyces cerevisiae*, la délétion du gène de la chaîne lourde de la clathrine ne provoque qu'une diminution partielle (d'environ 50 %) de l'accumulation endocytaire de la phéromone (facteur α) médiée par son récepteur et d'un traceur de l'endocytose fluide (le "lucifer yellow"; Payne et Schekman, 1985). De même, dans les cellules de mammifères, l'inhibition de la fonction de la clathrine par des perturbations contrôlées, qui bloquent soit son assemblage en manteau sur la membrane plasmique (déplétion potassique : Heuser et Anderson, 1989; milieu hypertonique : Daukas et Zigmond, 1985), soit l'épincement des puits mantelés (acidification du cytosol : Sandvig et van Deurs, 1991; Lamaze et Schmid, 1995) ne permet pas de bloquer complètement l'endocytose, en particulier de toxines. Les vésicules qui se forment en l'absence d'un bon fonctionnement de la clathrine transfèrent également leur contenu aux endosomes, puis aux lysosomes (Hansen *et al.*, 1993).

Une analyse quantitative rigoureuse, menée au laboratoire d'accueil sur des fibroblastes fœtaux de rat, a montré que la déplétion potassique et l'incubation en milieu hypertonique, qui ralentissent d'environ 10 fois l'endocytose du récepteur de la transferrine,

n'inhibent pas du tout l'endocytose fluide ou l'endocytose de membrane, mesurées à des intervalles courts ou après correction pour un effet sur le recyclage/régurgitation (Cupers *et al.*, 1994). Cette observation confirme que la polymérisation de la clathrine est bien indispensable pour la concentration des complexes ligands-récepteurs dans les puits mantelés puis leur endocytose sélective, et démontre qu'une machinerie distincte de la clathrine peut suffire à un flux endocytaire normal. Il n'est cependant pas encore clair si cette voie est constitutive ou induite par des manipulations expérimentales (Damke *et al.*, 1995). Le mécanisme de l'endocytose indépendante de la clathrine reste à élucider.

1.1.4. Un rôle des cavéoles dans l'endocytose ?

Une forme particulière d'endocytose indépendante de la clathrine pourrait impliquer les cavéoles. Il s'agit d'invaginations membranaires de très petite taille (50 nm de diamètre) recouvertes sur leur face cytoplasmique par un manteau spiralé formé de la polymérisation de cavéoline. Cette protéine est capable de s'insérer profondément dans la membrane et d'y stabiliser des microdomaines riches en cholestérol. L'existence des cavéoles a été initialement observée dans les cellules endothéliales, les adipocytes et les cellules musculaires lisses, mais on les trouve dans presque toutes les cellules, hormis les lymphocytes. La purification des cavéoles couplée à l'immunocytochimie a montré qu'elles sont enrichies en cholestérol, en glycolipides telle que la sphingomyéline et en protéines ancrées à la membrane par un lien glycosylphosphatidylinositol (GPI) tels que le récepteur de l'acide folique et la phosphatase alcaline placentaire. Le cholestérol est nécessaire à la formation des cavéoles. En effet, leur fonction est inhibée par la déplétion en cholestérol ou par le traitement à la filipine, qui le complexe (Schnitzer *et al.*, 1994). Les cavéoles sont caractérisées par leur insolubilité dans le triton X-100 à 4°C et leur très légère densité en gradient de flottation. Plusieurs molécules impliquées dans la signalisation cellulaire co-purifient avec les cavéoles, y compris des récepteurs couplés aux protéines G, des molécules impliquées dans la régulation du calcium cytosolique, la NO synthase, et divers intermédiaires dans la voie des tyrosine-kinases et des MAP-kinases. Ceci suggère que ces structures participent à la transduction de signaux à partir de la surface cellulaire.

Le rôle des cavéoles dans l'endocytose reste incertain. Initialement, ces structures ont été impliquées dans le transport de solutés à travers les cellules endothéliales, le phénomène de transcytose (Mellman *et al.*, 1996). Toutefois, il n'est pas clair si les cavéoles fusionnent simplement entre elles pour former les canaux transendothéliaux (Frokjaer-Jensen, 1980), ou

si des vésicules autonomes se forment à partir des cavéoles. Cette distinction n'est pas académique, car le bourgeonnement vésiculaire nécessite toute une machinerie moléculaire, dont l'association aux cavéoles n'a pas été établie.

On sait depuis longtemps que la toxine du choléra se lie à des glycolipides membranaires, se concentre dans les cavéoles et se retrouve ensuite dans les endosomes (Montesano *et al.*, 1982). Toutefois, cette toxine n'est pas exclue des puits mantelés et la nature exacte de leur porte d'entrée reste donc à clarifier. Dans un système acellulaire, Gilbert et collaborateurs (1999) ont récemment montré que des structures enrichies en toxine du choléra pouvaient s'individualiser dans des structures séparables physiquement, et que cette population vésiculaire ressemblait aux cavéoles. Toutefois, la démonstration directe de la formation de vésicules contenant la toxine du choléra à partir des cavéoles dans les cellules intactes reste à apporter.

1.1.5. La phagocytose.

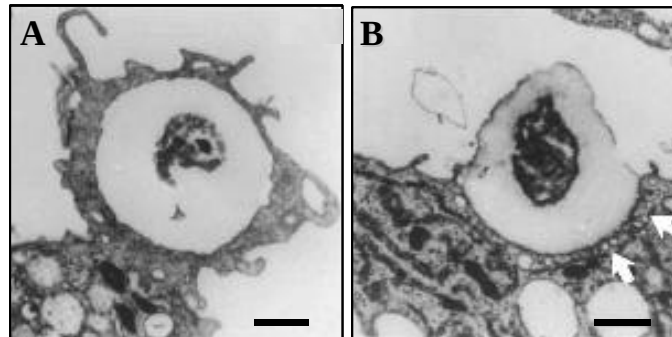
Chez les protozoaires, la phagocytose est une forme d'alimentation. Les grosses particules organiques finissent dans les lysosomes où elles sont dégradées et les produits de cette dégradation sont transférés dans le cytosol où ils sont réutilisés par la cellule. Lorsque des amibes sont cultivées dans un milieu riche en bactéries, la phagocytose suffit à leur alimentation. Chez les mammifères, on trouve des cellules phagocytaires professionnelles : les monocytes/macrophages, ainsi que les neutrophiles. Non seulement ces cellules éliminent les microorganismes pathogènes (bactéries, champignons, protozoaires) mais assurent également la présentation des antigènes dérivés, ce qui stimule la réponse immunitaire. D'autres types cellulaires ont également la capacité de phagocyter des particules : c'est le cas des cellules épithéliales de la thyroïde et de la vessie, qui peuvent phagocyter des érythrocytes *in vivo* (Aderem et Underhill, 1999).

La phagocytose est indépendante de la clathrine et nécessite la polymérisation du cytosquelette d'actine. Il s'agit d'un processus très rapide, qui dépend de l'énergie et est aboli à basse température (Cohn et Steinman, 1982). Les phagosomes subissent une série d'événements de fusion et de fission avec des vésicules appartenant à l'appareil endocytaire (endosomes et lysosomes). Cette maturation nécessite aussi l'association avec le cytosquelette d'actine et les microtubules (Allen et Aderem, 1996). Divers organismes peuvent influencer leur propre destinée, en modifiant la vitesse de maturation des phagosomes.

La phagocytose débute par l'interaction de récepteurs spécifiques sur la membrane du phagocyte avec un ligand reconnu sur la particule à phagocyter. Ce phénomène nécessite donc la transmission de signaux au départ de la surface cellulaire. Plusieurs types de récepteurs cellulaires peuvent conduire à la phagocytose. Chez les phagocytes professionnels, on trouve principalement des récepteurs pour le domaine Fc des immunoglobulines de la classe G et E (FcγR et FcεR; Silverstein *et al.*, 1977 ; Crowley *et al.*, 1997) et pour la protéine C3 du complément, qui se fixe aux complexes antigènes-anticorps (C3R; Allen et Aderem, 1996; Aderem et Underhill, 1999). Ces deux types de récepteurs sont aussi appelés récepteurs d'opsonines. Les macrophages expriment en outre un troisième type appelé récepteur éboueur ("scavenger receptor" ou SR-A). Après avoir lié le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram négatif, ce récepteur induit également des signaux intracellulaires, qui entraînent l'activation des macrophages et la production des médiateurs inflammatoires (Haworth *et al.*, 1997).

La signalisation de la phagocytose conduit à la polymérisation de l'actine au site de contact. Le mode d'intériorisation dépend du type de récepteur impliqué. Le FcγR stimule la formation de pseudopodes qui enveloppent la particule et fusionnent à leur extrémité pour former un phagosome (modèle de la fermeture éclair par lamelles externes, ou "zipper externe"; Figure 1.2). Le C3R induit au contraire la pénétration directe ou "zipper interne". Enfin, chez les mammifères, une forme particulière de phagocytose est stimulée dans des cellules épithéliales, qui ne phagocytent normalement pas, par certaines bactéries entéropathogènes telles que *Salmonella* et *Shigella*, conduisant à leur séquestration dans des "vésicules spacieuses" (modèle induit : "trigger model"; Alpuche-Aranda *et al.*, 1994). La transfection de lignées cellulaires non phagocytaires avec des vecteurs d'expression pour FcγR ou C3R rendent ces cellules compétentes pour la phagocytose de type "zipper". Ceci suggère que ces récepteurs jouent essentiellement un rôle de signalisation dans le déclenchement du processus et que la machinerie qui l'accomplit est présente au départ dans toutes les cellules (Aderem et Underhill, 1999). Cette machinerie serait directement stimulée par *Salmonella* et *Shigella*, lors de la phagocytose de type "trigger".

Figure 1.2. Différence entre la phagocytose de particules opsonisées par des IgG et par le complément.



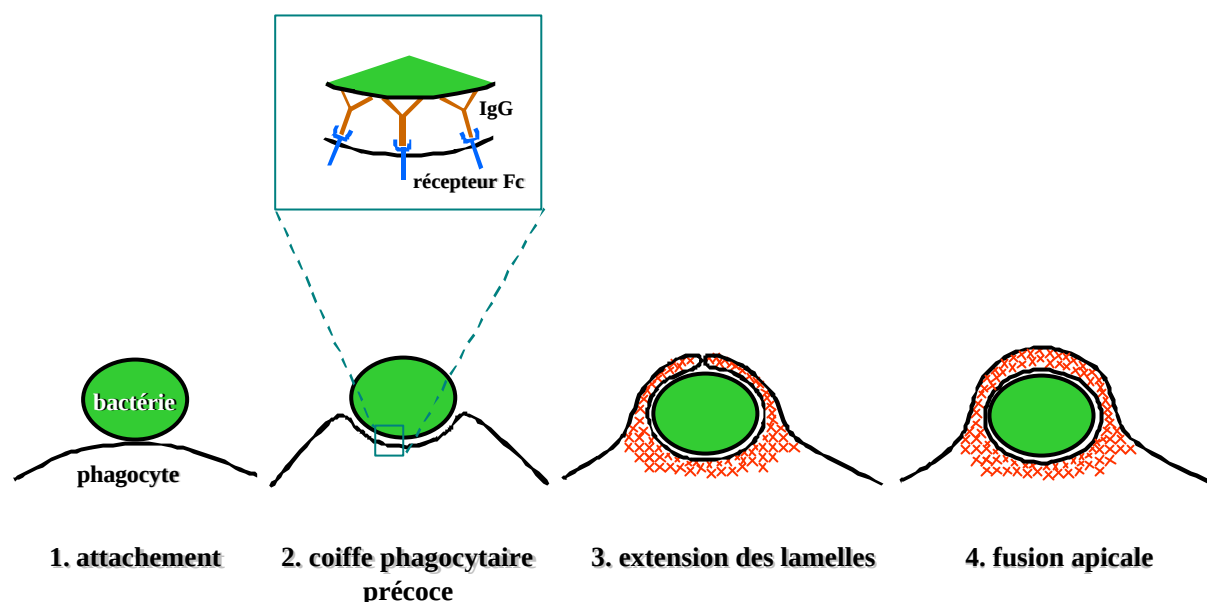
Formation de phagosomes contenant des particules opsonisées par des IgG (A) ou par le complément (B), étudiée en micrographie électronique à transmission chez les macrophages péritonéaux. Ces figures soulignent la différence de signalisation par le $\text{Fc}\gamma\text{R}$, provoquant l'évagination de lamelles enveloppant les particules, ou par C3R , qui "aspire" la particule dans la cellule. Les barres indiquent 1 μm . (Reproduit de Allen et Aderem, 1996).

Quatre étapes sont nécessaires pour la phagocytose d'une particule par le mécanisme "zipper": (i) la liaison de la particule à la surface du macrophage; (ii) l'amorce d'un contact plus étroit avec des protrusions membranaires naissantes à la base de la particule, appelées "coiffe phagocytaire initiale"; cette étape est indépendante de l'actine; (iii) l'extension de ces protrusions membranaires qui enveloppent la particule, ce qui dépend de l'actine mais est indépendant de la phospho-inositide 3-kinase (PI3K); et enfin (iv) la fusion de la membrane au sommet de ces prolongements, ce qui enferme le contenu en un phagosome autonome; cette étape nécessite aussi un remodelage de l'actine et, pour les grosses particules, dépend de la PI3K (Figure 1.3).

L'implication de plusieurs types de récepteurs, qui peuvent co-exister dans la même cellule, et le déclenchement de cascades de signalisation différentes selon les types cellulaires, rend la régulation de la phagocytose particulièrement complexe, son étude difficile, et la généralisation d'un système cellulaire à l'autre hasardeuse. Nous résumerons ici brièvement les observations suggérant l'intervention des deux oncogènes vSrc et de K-Ras , de phospho-inositide kinases, de phospholipases, du calcium, de petites GTPases (Rac1 et Cdc42 ; ARF6) et de diverses protéines régulatrices de l'actine qui seront détaillées plus loin dans l'introduction. Ce survol se limitera à introduire les notions essentielles; l'exposé développé

de ces différents acteurs probables de la macropinocytose sera fait dans les sections suivantes de l'introduction.

Figure 1.3. Intériorisation de particules opsonisées par le FcγR.



Ce schéma illustre les différentes étapes d'intériorisation d'une particule opsonisée par le FcγR selon le "zipper model", (xxx = actine). (Adapté d'après May et Machesky, 2001).

Lors de la phagocytose médiée par les FcγRs, des membres de la famille Src sont impliqués dans la phosphorylation du motif ITAM ("Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif"). Les "knock-out" simples de certains membres de la famille Src (*vide infra*), Src (Src^{-/-}) ou de Hck (Hck^{-/-}) n'ont pas d'effet sur ce type de phagocytose, mais le triple "knock-out" Hck^{-/-}, Fgr^{-/-} et Lyn^{-/-} la bloque complètement (May et Machesky, 2001). La tyrosine-kinase p72^{Syk} est activée par recrutement de ses deux domaines SH2 sur le motif ITAM phosphorylé, ce qui transmet la signalisation vers le remodelage du cytosquelette d'actine. Toutefois, si la phosphorylation en tyrosine des FcγRs activés est nécessaire chez les macrophages, elle ne l'est pas chez les neutrophiles.

Chez les monocytes THP-1, l'expression d'un "dominant-négatif" de H-Ras n'inhibe pas la phagocytose médiée par le FcγR. En revanche, l'homologue de H-Ras chez *Dictyostelium*, RasS, est nécessaire à la phagocytose. Une autre GTPase, Rap1, stimule la phagocytose chez *Dictyostelium* mais se situe en aval de la PLC dans la cascade de signalisation (Seastone *et al.*, 1999). L'homologue de Rap1 chez les mammifères est

également enrichi dans les phagosomes formés après ingestion de particules opsonisées par le complément (Caron *et al.*, 2000).

La phospho-inositide kinase la plus souvent impliquée dans la stimulation de la phagocytose est la phospho-inositide 3-kinase (PI3K). Plusieurs auteurs ont rapporté que la PI3K est activée par le FcγR et est nécessaire à l'extension des pseudopodes qui enveloppent les particules dont la taille dépasse 2 μm de diamètre (Cox *et al.*, 1999), ainsi que pour la fermeture des phagosomes formés autour des érythrocytes opsonisés (Araki *et al.*, 1996). Toutefois, la PI3K n'est pas nécessaire à la phagocytose des particules de petite taille (< 2 μm : Cox *et al.*, 1999) ni à la phagocytose chez *Dictyostelium* (Seastone *et al.*, 1999). Récemment, la phospho-inositide 4P 5-kinase Iα a également été impliquée dans la régulation de la phagocytose médiée par le FcγR. Son produit, le PtdIns (4,5)P2, s'accumule au niveau de la coiffe phagocytaire initiale et favorise la phagocytose (May et Machesky, 2001).

Certaines phospholipases participent à la signalisation de la phagocytose de particules opsonisées par les IgG. En effet, une isoforme de la phospholipase C (PLCγ) est activée en aval du FcγR et est localisée au niveau de la coiffe phagocytaire initiale. L'inhibition de la PLCγ bloque la phagocytose médiée par FcγR chez les macrophages (Botelho *et al.*, 2000) ainsi que chez *Dictyostelium* (Seastone *et al.*, 1999). L'inhibition de la phospholipase A (PLA) bloque également la phagocytose médiée par FcγR chez les macrophages, mais reste sans effet sur cette phagocytose chez les neutrophiles. Enfin, la phospholipase D (PLD) vient aussi d'être impliquée dans la régulation de la phagocytose médiée par le complément (May et Machesky, 2001).

L'activation de la PLC entraîne une élévation de la concentration du calcium cytosolique et active la protéine kinase C (PKC). Chez les neutrophiles, l'activation du FcγR s'accompagne d'une augmentation rapide de la concentration du calcium cytosolique, indispensable à la phagocytose des particules opsonisées par les IgG. En revanche, la phagocytose médiée par le complément n'induit pas un tel changement (May et Machesky, 2001). La gelsoline, modulée par le Ca²⁺, est localisée au niveau des phagosomes des macrophages. Chez les neutrophiles de souris "knock-out" pour la gelsoline (Gsn^{-/-}), la phagocytose médiée par le FcγR est inhibée mais la phagocytose médiée par le complément est normale (Serrander *et al.*, 2000). La protéine kinase Cα (PKCα) a aussi été localisée sur les phagosomes de macrophages lors de la phagocytose médiée par FcγR et C3R, mais son implication dans la régulation de cette phagocytose est controversée.

Plusieurs protéines G monomériques coordonnent le remodelage du cytosquelette d'actine lors de la phagocytose. Les GTPases Rac1 et Cdc42 sont nécessaires à l'intériorisation des particules opsonisées par les IgG ou les IgE. Chez *Dictyostelium*, la surexpression de RacC stimule fortement la phagocytose. En revanche, Rho ne semble pas nécessaire à la phagocytose médiée par FcγR (May et Machesky, 2001). Les protéines Rho, Cdc42 et Rac1 régulent la polymérisation et le mode d'organisation des microfilaments d'actine. L'expression de formes mutantes "dominantes-négatives" de Cdc42 (Cdc42N17) ou de Rac1 (Rac1N17) dans des phagocytes a permis de démontrer que ces deux protéines participent à deux étapes distinctes de la phagocytose dépendant de FcγR et FcεR. Cdc42 régule l'extension des replis membranaires autour de la coiffe phagocytaire initiale, alors que Rac1 intervient dans une étape plus tardive, en contrôlant la fusion des replis conduisant à la formation du phagosome (Massol *et al.*, 1998 ; Castellano *et al.*, 2000). Un membre de la famille ARF (ADP-Ribosylation Factor), ARF6, intervient en aval de Rac dans la phagocytose médiée par le FcγR, en interagissant avec la protéine POR-1 essentielle pour l'assemblage de l'actine et l'enveloppement de la particule opsonisée.

La phagocytose est toujours accompagnée d'un "ruffling" membranaire, produit par réarrangement du cytosquelette d'actine corticale. Ce processus sera développé dans la section 1.5. Dans la phagocytose médiée par FcγR et C3R, on note l'implication de diverses protéines, localisées sur les phagosomes. Parmi celles-ci, on trouve des protéines de nucléation et de ramification, tel que le complexe Arp2/3 et la protéine WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) qui le recrute et l'active (May et Machesky, 2001), la coronine (Maniak *et al.*, 1995), ainsi que les protéines de coupure et de dépolymérisation ADF/cofiline (Actin-Depolymerisation Factor). La délétion du gène de la cofiline chez *Dictyostelium* ou la microinjection d'anticorps dirigés contre cette protéine chez les neutrophiles bloque la phagocytose. La composition de la membrane des phagosomes a été récemment définie par l'analyse de leur protéome, après purification suite à la capture de particules de latex et l'électrophorèse bidimensionnelle (Garin *et al.*, 2001).

1.1.6. La macropinocytose.

1.1.6.1. Définition et structures impliquées dans la macropinocytose.

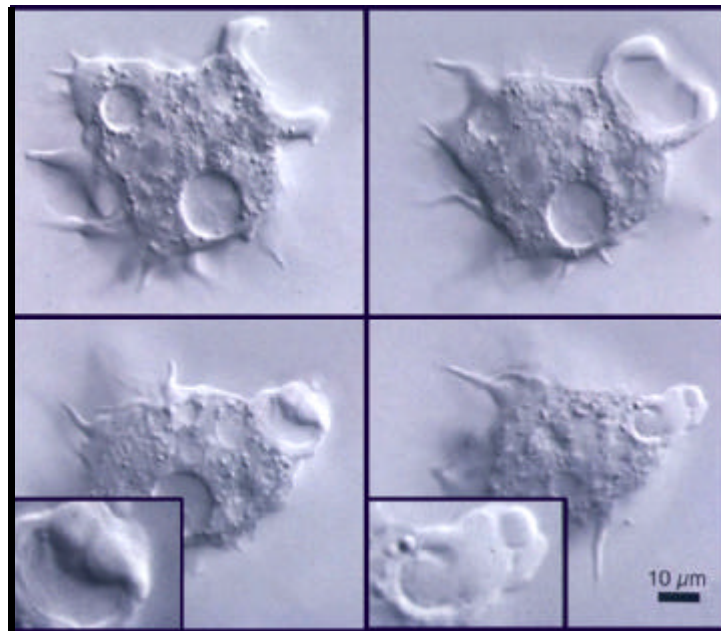
La macropinocytose, découverte par Warren Lewis en 1931 dans les macrophages, a longtemps été considérée comme une activité endocytaire accessoire, mais fait depuis quelques années l'objet d'un intérêt croissant, en particulier pour son rôle déterminant au début de la réponse immunitaire (Swanson et Watts, 1995; Robinson *et al.*, 1996). Cette voie permet l'intériorisation de grandes quantités de solutés, nécessaire à la fonction de certaines cellules spécialisées. Par ses caractéristiques morphologiques, la macropinocytose rappelle la phagocytose des particules opsonisées par des anticorps, comme si les macropinosomes étaient des phagosomes "vides". De plus, certaines bactéries invasives telles que *Salmonella typhimurium* et *Shigella flexneri* induisent leur intériorisation dans leurs cellules-cibles par une forme de phagocytose très comparable à la macropinocytose (Skoudy *et al.*, 1999).

Tandis que la micropinocytose s'observe de manière continue dans toutes les cellules, la macropinocytose est limitée à certains types cellulaires ou à certains états. Elle peut être induite en quelques minutes mais de manière transitoire par les esters de phorbol (agents promoteurs de tumeurs), et par les facteurs de croissance, qui stimulent la mitose et/ou préviennent l'apoptose (Hewlett *et al.*, 1994). En revanche, la macropinocytose est constitutive chez les amibes cultivées en conditions axéniques, telles que *Dictyostelium discoideum* (Seastone *et al.*, 1998) et *Acanthamoeba comandoni* (Hacker *et al.*, 1997, Figure 1.3), chez les cellules dendritiques immatures (Sallusto *et al.*, 1995), et après transformation des fibroblastes par les oncogènes v-Src (Veithen *et al.*, 1996) et K-Ras (comme il sera montré dans la thèse).

Les macropinosomes sont de taille irrégulière et peuvent dépasser 10 µm de diamètre (Figure 1.3). Ces grosses vacuoles prennent le plus souvent naissance au niveau de la région marginale de la cellule riche en actine corticale polymérisée, qui est à l'origine d'ondulations membranaires ou "ruffling", produisant des feuilletts amincis en protrusion vers l'extérieur de la cellule (Swanson et Watt 1995; Veithen *et al.*, 1996). Des observations en microcinématographie et en microscopie électronique à balayage montrent que ces feuilletts se prolongent puis se referment contre la membrane plasmique, générant ainsi des macropinosomes (Swanson et Watts 1995; Araki *et al.*, 1996; comme montré dans le chapitre Résultats, section 2.2).

On pense que la composition de la membrane des macropinosomes est proche de celle de la membrane péricellulaire et n'est pas enrichie en complexes ligands-récepteurs reconnus par le complexe AP2-clathrine. En effet, la stimulation de la macropinocytose ne s'accompagne pas d'une augmentation décelable de l'endocytose médiée par récepteurs (Racoosin et Swanson, 1992; Veithen *et al.*, 1996). Toutefois, certains récepteurs membranaires sont sélectivement intériorisés par macropinocytose, comme le récepteur du complément C3b dans les neutrophiles (Carpentier *et al.*, 1991), le récepteur du M-CSF dans les macrophages ("Macrophage-Colony Stimulating Factor"; Murray *et al.*, 2000) et le récepteur du mannose dans les cellules dendritiques (Sallusto *et al.*, 1995).

Figure 1.3. Formation d'un macropinosome chez *Acanthamoeba comandoni*.



On notera l'extension des protrusions lamellaires dont la fermeture progressive donne naissance à un macropinosome dont la taille dépasse ici 10 µm de diamètre. (Repris de A. Kihara, Hosei University; <http://mac2031.fujimi.hosei.ac.jp/PDB/PCD0307/htmls/34.html>).

1.1.6.2. Rôles de la macropinocytose.

Lorsqu'elle se manifeste, la macropinocytose représente la voie principale de l'endocytose fluide. Lorsque *Dictyostelium discoideum* est cultivé en conditions axéniques, la macropinocytose suffit d'ailleurs à sa nutrition (Hacker *et al.*, 1997; Seastone *et al.*, 1998). On peut donc spéculer que cette forme d'endocytose est la plus ancestrale et qu'elle a pu jouer un

rôle important dans l'évolution d'organismes primitifs vers la vie eucaryote, en permettant leur survie en absence de proies (de Duve, 1992).

Chez les macrophages, le mode d'intériorisation d'un antigène soluble semble être décisif pour déterminer la classe du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) par laquelle il sera présenté (Peppelenbosch *et al.*, 2000) : les antigènes des complexes immuns sont captés par endocytose médiée par récepteurs et présentés par le CMH de classe II tandis que les antigènes solubles libres sont captés par endocytose fluide et présentés par le CMH de classe I. Les cellules dendritiques montrent une activité d'endocytose fluide par macropinocytose particulièrement intense au stade immature. Dans la réponse immunitaire humorale, c'est donc principalement par la macropinocytose que les cellules dendritiques immatures captent les protéines solubles, pour en présenter les antigènes au stade différencié généralement par le CMH de classe II (Sallusto *et al.*, 1995; Steinman et Swanson, 1995). Ces observations suggèrent que, pour les cellules présentatrices d'antigènes, la macropinocytose permet un échantillonnage efficace de l'environnement moléculaire de la cellule ("antigen sampling").

Rappelons que de nombreux facteurs de croissance et agents promoteurs de tumeur induisent la macropinocytose de manière temporaire. La signification de cette réponse est inconnue. Dans la glande thyroïde, la macropinocytose est induite de manière transitoire au pôle apical des thyrocytes par de fortes doses de TSH, ce qui favorise peut-être la capture en grande quantité de thyroglobuline pour permettre une production accélérée d'hormones thyroïdiennes dans l'appareil endocyttaire de ces cellules (Ketelbant-Balasse et Neve, 1973). Le mécanisme qui éteint la réponse macropinocytaire, en dépit d'une exposition continue aux agents promoteurs de tumeurs et aux facteurs de croissance, n'est pas élucidé.

La macropinocytose contribue aussi à l'intériorisation, et donc à la dynamique, de la membrane péricellulaire, tant au niveau du cône de croissance des neurones (nécessaire à leur migration lors de la corticogenèse et de la régénération nerveuse périphérique) que du front de migration des cellules en mouvement (réponse chimiotactique dans la lutte antibactérienne; invasion primaire des cellules cancéreuses). En particulier, l'intériorisation de domaines membranaires structurés trop grands et trop peu déformables pour être incorporés dans les puits mantelés (cercles parfaits de 100 nm), tels que les hémi-desmosomes (disques rigides de 200 à 400 nm de diamètre), implique de grosses vacuoles qui ressemblent aux macropinosomes (Holm *et al.*, 1993; Poumay *et al.*, 1994).

Les cellules intestinales, qui ne phagocytent normalement pas, sont toutefois infectables par certaines bactéries entéropathogènes, telles que *Salmonella typhimurium* et *Shigella flexneri* malgré l'absence dans la lumière intestinale d'anticorps ou de complément qui

pourraient les opsoniser. Ces bactéries sont captées dans des phagosomes ou des "vésicules spacieuses", qui ressemblent étrangement aux macropinosomes (Alpuche-Aranda *et al.*, 1994). On pense en outre que la capture par macropinocytose d'autres agents pathogènes également non opsonisés, tels que *Chlamydia trachomatis* et *Chlamydia psittaci*, pourrait jouer un rôle-clé dans leur reconnaissance par le système immunitaire. Les cellules dendritiques, présentes en abondance au niveau des sites d'infection par ces agents, sont en effet capables d'utiliser la macropinocytose pour les capturer et les tuer. Les macropinosomes ainsi formés fusionnent avec les lysosomes contenant le CMH de classe II, ce qui permet d'initier la réponse immunitaire via les cellules T (Ojcius *et al.*, 1998).

1.1.6.3. Relation entre la macropinocytose et le cancer.

La mortalité liée au cancer, seconde cause de décès en Occident, résulte essentiellement de l'invasion du voisinage par les cellules tumorales et de leur greffe métastatique. Ces deux propriétés dépendent non seulement de la sécrétion de protéases, mais aussi d'altérations membranaires affectant la mobilité et l'adhérence des cellules transformées. La progression du cancer pourrait dépendre spécifiquement de l'endocytose pour trois propriétés essentielles: (1) la réponse cellulaire aux facteurs de croissance, par modulation du nombre de récepteurs exposés ou par translocation des complexes récepteurs/facteurs de croissance, soit vers un pôle particulier de la cellule, soit vers un compartiment intracellulaire où s'effectue la signalisation ou, au contraire, assure son extinction; (2) le détachement des cellules épithéliales de leur membrane basale, par l'intériorisation "en bloc" des hémidesmosomes (Holm *et al.*, 1993; Poumay *et al.*, 1994); et (3) la migration par redistribution d'intégrines vers le front de migration, lesquelles assurent un ancrage réversible à la matrice extracellulaire (invasion de voisinage), ou sur l'endothélium des territoires-cibles de la greffe métastatique (Bretscher, 1992). La réponse aux facteurs de croissance et la capture de nutriments essentiels qui dépendent de la micropinocytose sont nécessaires à toute survie cellulaire, et ne peuvent donc pas servir de cible spécifique contre le cancer, car elles sont communes avec les cellules non transformées. En revanche, le détachement et la migration des cellules épithéliales, qui sont à l'origine d'environ 90 % des cancers, sont caractéristiques de l'état transformé chez l'adulte et pourraient dépendre de la macropinocytose.

La macropinocytose peut être induite par le produit de deux oncogènes types, qui seront analysés en détail ci-après: Ras, introduit directement par microinjection (H-Ras; Bar-Sagi et Feramisco, 1986) ou par transformation (K-Ras; comme démontré dans la section 2.2) et Src, suite à la transformation des fibroblastes par le virus du sarcome de Rous (Veithen *et*

al., 1996). De manière remarquable, cette macropinocytose est constitutive (Veithen *et al.*, 1996; voir le chapitre «Résultats»). Rappelons ici la relation étroite entre la macropinocytose et le "ruffling" membranaire au front de migration. Ceci autorise de se poser la question de la relation entre la macropinocytose constitutive et l'invasion par les cellules cancéreuses: la macropinocytose jouerait-elle un rôle essentiel dans la progression du cancer ?

1.2. Les oncogènes v-Src et K-Ras.

Le but de notre doctorat est de comprendre le mécanisme par lequel les oncogènes v-Src ou K-Ras régulent la macropinocytose, en particulier d'identifier des intermédiaires essentiels impliqués dans la voie de signalisation de cette voie d'endocytose et de les hiérarchiser. Il importe donc de rappeler les mécanismes d'activation et de signalisation de ces deux oncogènes.

Le terme "oncogène" désigne l'ensemble des gènes régulateurs de la division cellulaire pouvant contribuer au développement du cancer. Par les protéines qu'ils codent, les oncogènes exercent un effet positif sur la division cellulaire. L'étude de leurs mécanismes d'action permet de distinguer plusieurs familles d'oncogènes, par référence au rôle physiologique de la protéine codée par le gène normal (proto-oncogène). Nous nous limiterons ici aux oncogènes v-Src et K-Ras.

1.2.1. L'oncogène v-Src.

1.2.1.1. Caractéristiques générales de la Src-kinase.

La transmission d'un cancer par un virus a été observée pour la première fois en 1911 pour le sarcome aviaire du poulet décrit par Rous ("Rous sarcoma"). La protéine oncogénique Src (pour "sarcome"), apportée par ce virus, code une protéine multimodulaire cytoplasmique de 60 kDa (pp60^{src}) dotée d'activité tyrosine-kinase, et phosphorylable sur ses résidus tyrosine. Grâce à son caractère multimodulaire, cette est capable d'interagir de manière spécifique avec divers effecteurs et de transmettre le signal des facteurs de croissance (Figure 1.4). Cette protéine est en outre caractérisée par l'addition à son extrémité N-terminale d'un acide gras à chaîne courte (14 carbones: acide myristique) qui permet l'attachement au feuillet cytoplasmique de la membrane plasmique, essentiel à son activité oncogénique. Il faut noter que le PDGF induit à la fois la formation du "ruffling" membranaire et la translocation de la protéine Src vers la périphérie cellulaire au niveau des adhérences focales et que cette

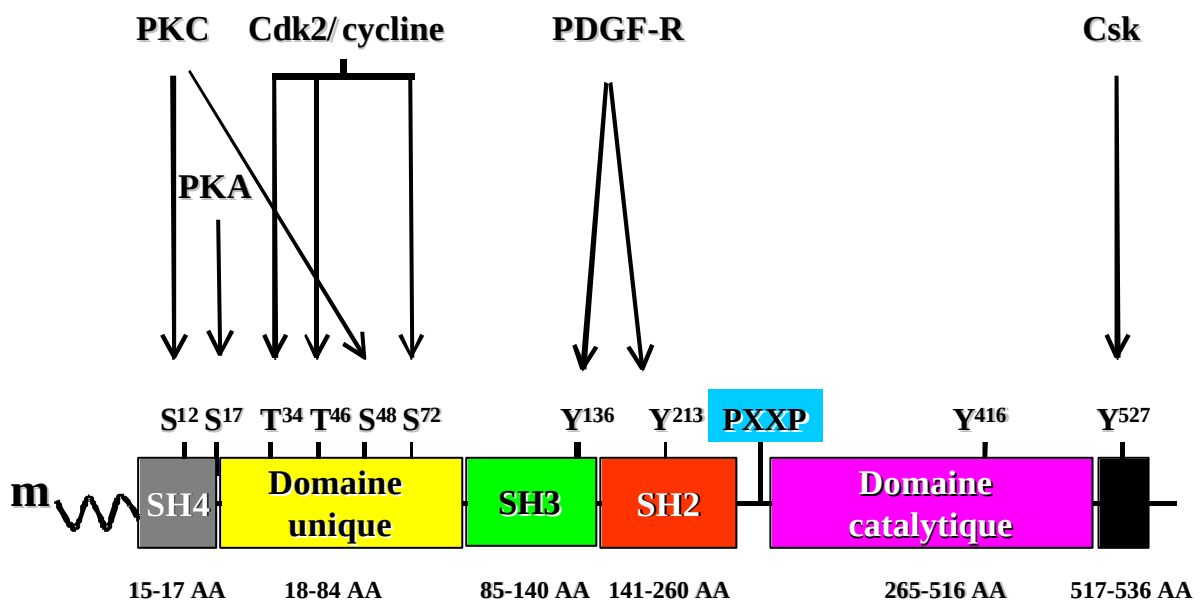
translocation est bloquée par la cytochalasine D (Fincham *et al.*, 1996). La transformation des fibroblastes par l'oncogène v-Src induit l'activation de la cascade des MAP-kinases, nécessaire à la transmission du signal mitogénique de Src.

La différence majeure entre la protéine oncogénique v-Src et son homologue cellulaire proto-oncogénique, c-Src, est à la délétion des 19 acides aminés localisés en position carboxy-terminale. Cette extrémité contient la tyrosine 527 dont le niveau de phosphorylation régule l'activité catalytique de Src (Cantley *et al.*, 1991). La protéine v-Src délétée maintient en permanence une conformation déployée, qui lui confère une activité tyrosine-kinase constitutive, responsable de ses propriétés oncogéniques.

1.2.1.2. Structures en domaines de Src.

Tous les membres de la famille Src (Src, Fyn, Yes, Fgr, Lyn, Lck, Blk, et Yrc) partagent une forte similarité structurelle et modulaire, en particulier pour des domaines homologues à Src appelés SH (pour "Src Homology").

Figure 1.4. Structure multimodulaire de la pp60^{c-Src}.



A partir de l'extrémité N-terminale, on distingue: le résidu myristoylé (m) responsable de l'attachement de la protéine à la membrane plasmique; le domaine SH4 phosphorylé sur ser¹² et ser¹⁷ par la protéine-kinase C (PKC) et la protéine kinase A (PKA) respectivement; le domaine unique phosphorylé sur plusieurs Ser/Thr par la PKC, ou par la Cdk2/cycline; les domaines SH3 et SH2 phosphorylés respectivement sur Tyr¹³⁶ et Tyr²¹³ par le récepteur du PDGF; le domaine catalytique qui s'autophosphoryle sur la Tyr⁴¹⁶ et phosphoryle des protéines-cibles; enfin, du côté C-terminal, Tyr527 phosphorylée par la tyrosine-kinase de Src ou Csk. (Modifié d'après Pawson, 1995).

1.2.1.2.1. Le domaine SH4.

Ce domaine, constitué de 15 à 17 acides aminés, porte sur la glycine N-terminale le résidu myristoylé responsable de l'ancrage de la protéine à la membrane plasmique. En outre, le domaine SH4 contient des acides aminés basiques qui peuvent subir une palmitoylation probablement impliquée dans la translocation de Src en réponse à des stimuli extracellulaires. Cette palmitoylation est réversible et nécessite une myristoylation préalable (Pawson, 1995).

1.2.1.2.2. Le domaine unique.

Ce domaine est différent pour chacun des membres de la famille, et est probablement impliqué dans les interactions de la protéine Src, soit avec des récepteurs, soit avec des protéines-cibles qui en sont les effecteurs. Quatre sites de phosphorylation en sérine ou thréonine y ont été identifiés. Ces modifications pourraient moduler les interactions protéine/protéine ou réguler l'activité catalytique de la protéine elle-même.

1.2.1.2.3. Le domaine SH3.

Ce domaine, est conservé dans une grande variété de protéines. La topologie de tous les domaines SH3 est la même: un tour d'hélice α et un tonneau β constitué de cinq brins antiparallèles qui forment deux feuillets perpendiculaires. Ce domaine a été impliqué dans plusieurs processus cellulaires, y compris la régulation négative de la protéine Src elle-même, la réorganisation du cytosquelette et le contrôle de l'adhérence cellulaire. Ce domaine reconnaît spécifiquement chez ses protéines-cibles une séquence riche en proline dans un consensus P-x-x-P (P = une proline et x = un acide aminé quelconque) où les acides aminés adjacents des résidus proline déterminent la spécificité du domaine SH3. Ceci permet de nombreuses interactions intra- et intermoléculaires de la protéine qui régulent l'activité catalytique intrinsèque de Src, sa localisation subcellulaire et en particulier son recrutement à la membrane, ainsi que le recrutement de ses substrats ou effecteurs.

1.2.1.2.4. Le domaine SH2.

Il est présent dans plusieurs protéine tyrosine-kinases. Le domaine SH2 est constitué de deux hélices α qui encadrent un feuillet β formé de cinq brins β antiparallèles dans la forme générale $\beta\alpha\beta\beta\beta\beta\alpha\beta$. Comme pour le domaine SH3, le domaine SH2 intervient dans la régulation négative de l'activité catalytique de la protéine elle-même, sa localisation subcellulaire et sa liaison avec d'autres protéines. Ce domaine se lie spécifiquement aux

polypeptides qui contiennent des résidus tyrosine phosphorylés dans un consensus précis (PTyr-Met/Val-x-Met).

1.2.1.2.5. Le domaine catalytique ou SH1.

Le domaine catalytique de la protéine Src, commun à tous les membres de la famille, phosphoryle des résidus tyrosine sur des protéines-cibles. Certains résidus de ce domaine, identiques pour tous les sites catalytiques des protéines-kinases, sont impliqués dans la fixation de ATP et la réaction de phosphotransférase. L'autophosphorylation de la Tyr⁴¹⁶ entraîne l'activation complète de Src et permet son association avec un domaine SH2 appartenant à une autre protéine. Src acquiert alors une conformation ouverte et active.

1.2.1.2.6. L'extrémité C-terminale.

Toutes les tyrosines-kinase de la famille Src présentent une région G-terminale de 15 à 19 résidus qui contient une tyrosine (en position 527 chez la souris et 529 chez l'homme) entourée de résidus conservés. Cette tyrosine est dans le consensus approprié pour l'interaction avec les domaines SH2. Quand elle est phosphorylée, la tyrosine 527/529 permet une interaction intramoléculaire avec le domaine SH2 qui stabilise Src dans une conformation fermée inactive. La délétion de cette tyrosine augmente l'activité tyrosine-kinase de Src tandis que sa phosphorylation l'abroge. La régulation négative de Src par son extrémité G-terminale l'emporte sur l'effet activateur dû à la phosphorylation de la Tyr⁴¹⁶ de son site catalytique (Schwartzberg, 1998).

1.2.1.3. Mécanismes d'activation de Src.

Trois mécanismes d'activation de la protéine Src sont prédits par sa structure tridimensionnelle: la déphosphorylation de la tyrosine C-terminale 527/529, la compétition par un ligand extrinsèque pour le domaine SH2, et l'activation par délétion ou mutation de l'extrémité C-terminale.

1.2.1.3.1. Régulation par interaction intramoléculaire.

Une fois la tyrosine 527/529 phosphorylée, la protéine pp60^{src} acquiert une configuration fermée et devient inactive. La déphosphorylation de ce résidu par une phosphotyrosine phosphatase par exemple (CD45, SHP-2 ou SH-PTP1), dissocie le domaine SH2 de la partie C-terminale, ce qui ouvre la configuration spatiale et entraîne l'activation de la protéine. Le niveau d'activité de Src résulte principalement du résultat de l'antagonisme entre

son inactivation par phosphorylation de son extrémité C-terminale par la tyrosine-kinase, p50^{Csk}, et son activation par une de ces phosphatases.

1.2.1.3.2. Régulation par interaction intermoléculaire.

Les deux domaines SH2 et SH3 de la protéine Src présentent respectivement une interaction de faible affinité avec la partie C-terminale phosphorylée et la charnière SH1-SH2. La compétition par un ligand extrinsèque d'une plus grande affinité, telles que la protéine FAK qui se lie à son domaine SH2 et la sous-unité régulatrice de la PI3K qui se lie à son domaine SH3, substitue le lien intramoléculaire de Src par un lien intermoléculaire, ce qui entraîne l'ouverture de la protéine et son activation (Thomas et Brugge, 1997).

1.2.1.3.3. Activation par délétion ou mutation.

La délétion de la partie C-terminale (qui contient la tyrosine 527), confère à l'oncoprotéine v-Src une configuration ouverte en permanence, donc constitutivement active. C'est le modèle utilisé dans notre travail (lignée Rat-1/v-Src, appelée BB16). De même, la substitution de la tyrosine en position 527 par une phénylalanine transforme la protéine normale en protéine oncogène, et entraîne la prolifération cellulaire. Il existe par ailleurs une série de mutants viraux codant pour des protéines v-Src thermosensibles, inactives à température non-permissive, mais dont l'activité tyrosine-kinase est restaurée après transfert à température permissive (pour une revue voir Wyke et Stoker, 1987).

1.2.1.4. Les membres de la famille des Src tyrosine-kinases.

Par leurs domaines d'interaction protéine/protéine, les tyrosines-kinases (PTKs) de la famille Src peuvent communiquer entre elles et avec nombre de récepteurs à activité tyrosine-kinase (RTK; voir Tableau 1.1). Ces interactions incluent l'association avec les RTKs, la phosphorylation des membres de la famille de Src, l'activation des Src PTKs, et la phosphorylation des RTKs.

Tableau 1.1. Récepteurs des tyrosine-kinases (RTKs) couplés à la famille des tyrosine-kinases Src (Src PTKs).

Récepteurs	Src PTKs	Références
PDGF-R	Src, Fyn, Yes	Kypta <i>et al.</i> , 1990, Twamley <i>et al.</i> , 1992; Kazlauskas
EGF-R	Src, Fyn, Yes	Luttrell <i>et al.</i> , 1988, Sato <i>et al.</i> , 1995, Weernink et Rijkssen 1995; Roche <i>et al.</i> , 1995
FGF-R	Src	Zhan <i>et al.</i> , 1994
CSF-1R	Src, Fyn, Yes	Courtneidge <i>et al.</i> , 1993
NGF-R	Src	Kremer <i>et al.</i> , 1991
HGF-R	Src	Faletto <i>et al.</i> , 1993, Grano <i>et al.</i> , 1996
Insuline-R	Fyn	Sun <i>et al.</i> , 1996
IGF-R	Src	Kozma et Weber 1990, Peterson <i>et al.</i> , 1996

(Modifié d'après Thomas et Brugge, 1997)

1.2.1.5. Les substrats de Src.

Les différents membres de la famille Src ont été impliqués dans plusieurs événements cellulaires y compris la réponse à des facteurs de croissance, la dynamique du cytosquelette, l'adhérence, la migration, la sécrétion, la fonction des canaux ioniques, la transcription des gènes, le cycle cellulaire, l'apoptose et la différenciation (voir le Tableau 1.2). L'analyse de ces événements a permis d'identifier les substrats spécifiquement phosphorylés par l'oncoprotéine v-Src.

Tableau 1.2. Les protéines-cibles de Src-kinase.

Protéines-cibles	Fonction	Domaine de Src responsable de la liaison
p85	adaptateur de la PtdIns3-kinase	SH3
RasGAP	GTPase activateur de Ras	?
SHPTP2/Syp	phosphotyrosine phosphatase	?
Shc	active Ras par sa liaison à Grb2, qui recrute à son tour GEF à la membrane à proximité de Ras.	SH3
PLC γ	phospholipase C spécifique des phospho-inositides	?
p62	protéine qui s'associe à RasGAP	?
p190Rho-GAP	s'associe et active Ras ^{GAP} par son domaine SH2	?
Tensine, vinculine et taline, paxilline	se lie à l'actine en réponse aux stimuli dépendant des intégrines	SH3
cortactine	se lie à l'actine corticale	SH2
AFAP110	s'associe avec les filaments d'actine	SH3, SH2
FAK	tyrosine-kinase qui se lie aux intégrines	SH2
β 1-Intégrine	formation des complexes d'adhérence en réponse à des stimuli extracellulaires	?
p130 ^{CAS}	impliquée dans la transduction des signaux dépendant des intégrines	SH2
p120CAS, β -caténine et γ -caténine	impliquées dans l'adhérence cellulaire	?
Sam68	se lie à l'ARN, impliqué probablement dans le "processing" du pro-mRNA	SH2, SH3
calpactine I, annexine II	Ca ²⁺ et liaison aux phospholipides	?

Ce tableau illustre certaines protéines-cibles de la tyrosine kinase Src, leur fonction et le domaine de la protéine Src responsable de l'interaction avec chacune de ces cibles. (D'après Tatosyan et Mizenina, 2000). ? = pas encore connu.

1.2.1.6. Effets de v-Src sur le cytosquelette.

En réponse à des stimulations extracellulaires, certaines tyrosine-kinases de la famille Src (Src, Csk, Fyn, FAK) phosphorylent diverses protéines du cytosquelette. En utilisant les mutants thermosensibles de l'oncogène v-Src, Boschek et collaborateurs en 1981 ont démontré que v-Src provoque, dans les minutes qui suivent son activation, une induction rapide de la polymérisation de l'actine sous la membrane cellulaire, ce qui est responsable de la formation du "ruffling" membranaire. Si les substrats impliqués dans la réorganisation des microfilaments ne sont pas connus, les protéines effectrices candidates incluent les PI3Ks, l'eitrine, la vinculine, la cortactine, la p190Rho-GAP et d'autres, qui sont phosphorylées sur leurs résidus tyrosine après stimulation par de nombreuses classes de récepteurs (voir Tableau 1.2).

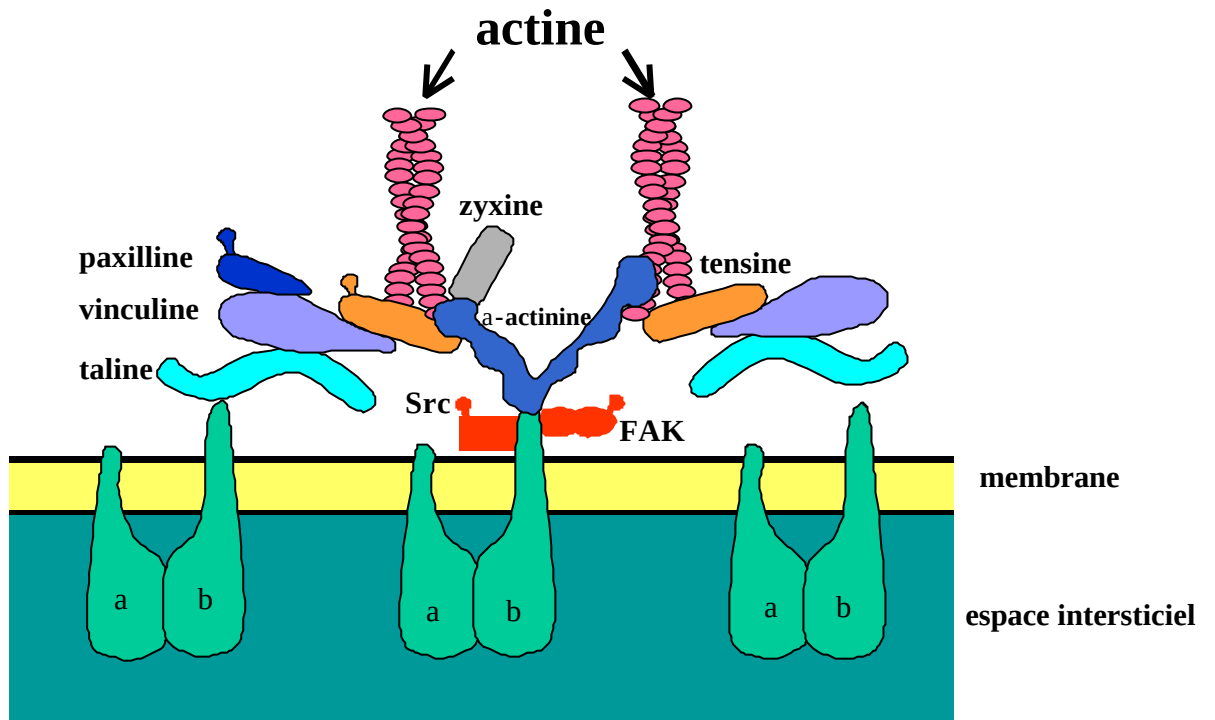
1.2.1.7. v-Src et l'adhésion cellulaire.

L'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire implique la reconnaissance de constituants bien définis de celle-ci par les intégrines. Le réseau d'actine polymérisé est connecté aux intégrines par l'intermédiaire d'un complexe comprenant la taline, la vinculine, la paxilline, la tensine, l' α -actinine et la zyxine (Figure 1.5). C'est par ce complexe que les intégrines participent à la transmission de signaux entre le milieu extracellulaire et la cellule.

En dépit de leur ancre myristoylée, c-Src à l'état inactif et v-Src inactivé par mutation sont principalement localisés dans le cytosol, au niveau de la région périnucléaire. L'activation de Src induit sa translocation aux complexes d'adhérence focaux à l'extrémité des filaments d'actine. Cette translocation ne nécessite pas l'activité catalytique de Src ni son ancrage à la membrane par myristoylation, bien que ceux-ci soient exigés pour la propagation des signaux dans l'intérieur de cellules. L'adhérence des fibroblastes par leurs plaques d'ancrage dépend de l'activation par tyrosine-phosphorylation de la Focal Adhesion-Kinase (FAK), qui dépend directement ou indirectement de Src. Dans les fibroblastes transformés par l'oncogène v-Src, la phosphorylation de FAK est accompagnée de la diminution des adhérences focales (Fincham *et al.*, 1995). Cette protéine est capable d'interagir par son coté N-terminal avec les intégrines et par ses deux domaines riches en proline ou ses tyrosines phosphorylées avec la protéine Src, ce qui provoque sa phosphorylation. La perte d'adhérence des fibroblastes "knock-out" par c-Src (c-Src^{-/-}) est rétablie par l'introduction d'un Src inactif mais dont les domaines SH2 et SH3 sont intacts. Cette observation remarquable suggère que Src ne phosphoryle pas directement le FAK, mais intervient comme recruteur à la plaque

d'ancrage d'une kinase et/ou de ses substrats, via ses domaines SH2 et SH3 (Fincham *et al.*, 1996, 2000; Jones *et al.*, 2000).

Figure 1.5. Complexe d'association des intégrines avec le cytosquelette.



La portion intracytoplasmique de la sous-unité β des intégrines est rattachée au cytosquelette d'actine, en particulier par la taline et par la vinculine (souvent utilisée comme marqueur). Cette interaction est régulée par Src et par la FAK. (Repris de <http://www.geocities.com/collegePark/Lab/1580/integrin.html>).

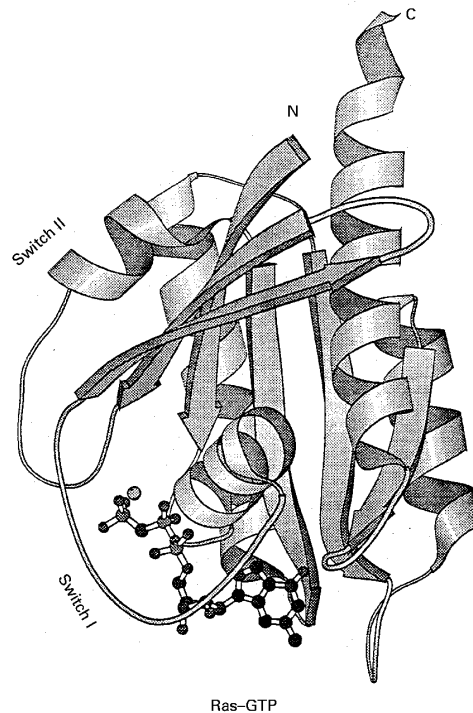
1.2.2. L'oncogène K-Ras.

1.2.2.1. *Structure et activation de la petite GTPase p21^{Ras}.*

On connaît trois membres de la famille Ras, dont les gènes chez l'homme sont respectivement localisés sur le chromosome 1 (N-ras), le chromosome 11 (H-ras) et le chromosome 12 (K-ras). Chacun de ces gènes code spécifiquement une protéine de 21 kDa constituée de 189 acides aminés hautement conservés. Quoique ces membres soient ubiquistes, H-Ras est préférentiellement exprimée dans les cellules de la peau et du muscle, N-Ras dans le thymus et les testicules et K-Ras dans le thymus et les intestins (Denhardt, 1996).

Les protéines de la famille Ras oscillent entre deux états, ou conformères, actif. ou inactif. Leur structure générale est présentée dans la Figure 1.6. La conversion par hydrolyse du GTP en GDP, assurée par leur activité catalytique intrinsèque (GTPase), est naturellement très lente, mais peut être fortement augmentée par interaction avec des protéines activatrices appelées Ras-GAP (Protéines Activatrices de GTPases), ce qui conduit à la configuration inactive. Ensuite, la réactivation par retour à la configuration liée au GTP est accélérée par des facteurs d'échange du GTP, ou GEFs, tels que Sos (Son Of Sevenless). Une troisième famille de régulateurs, les inhibiteurs de la dissociation de nucléotides ou GDIs (Guanyl nucleotide Dissociation Inhibitors) sont capables de verrouiller Ras soit à l'état actif, soit à l'état inactif, en empêchant l'action des GAPs et des GEFs.

Figure 1.6. Structure tertiaire de Ras-GTP.



Les différents membres de la superfamille Ras présentent tous une structure similaire. On note (i) une extrémité C-terminale moins structurée qui permet l'ancrage de la protéine à la membrane plasmique par farnésylation; (ii) un domaine globulaire hautement conservé (1-164 acides aminés) qui renferme plusieurs sites de liaison pour le GTP ou le GDP (12-18, 57-63, 116-119 et 144-147); (iii) deux régions interrupteurs appelées "Switch 1 et 2" (Asp30-Asp38 et Gly60-Glu76), qui changent de structure selon l'occupation par du GDP ou du GTP; et (iv) l'extrémité N-terminale, responsable d'interaction avec plusieurs protéines. Le domaine (Tyr32-Tyr40) lie de manière mutuellement exclusive la protéine GAP ou l'effecteur de Ras (Raf); le domaine 101-103 est impliqué dans la liaison de la p120Ras-GAP; l'interaction de Ras avec GEF est assurée par la région "Switch 2". (D'après Denhardt, 1996).

1.2.2.2. Modifications post-traductionnelles de Ras.

Les protéines Ras possèdent à leur extrémité C-terminale une séquence dite "C-A-A-X" (C = cystéine, A = acide aminé aliphatique, X = n'importe quel acide aminé; par exemple Cys-Val-Leu-Ser pour H-Ras). Après l'ajout d'un groupement farnésyle sur la cystéine par une farnésyle transférase, qui est la cible d'inhibiteurs pharmacologiques intéressants, une protéase spécifique vient cliver les trois derniers résidus AAX. Enfin, le carboxyle de la cystéine est méthylé par une carboxy-méthyle transférase. La protéine possède alors une extrémité C-terminale fortement hydrophobe, qui lui confère une grande affinité pour les membranes. Cette interaction hydrophobe avec la membrane est renforcée par la palmitoylation de cystéines situées quelques résidus avant la cystéine du "C-A-A-X", dans le

cas de la protéine H-Ras, N-Ras et d'une isoforme minoritaire K-RasA, ou stabilisée chez K-RasB par des liens électrostatiques supplémentaires entre plusieurs résidus chargés positivement de la protéine et les têtes phosphatées des phospholipides. Les différences d'ancrage entre les membres de la famille Ras permettent un recrutement différentiel sur des microdomaines spécifiques de la membrane plasmique et pourrait ainsi rendre compte de leur implication différente dans des processus cellulaires différents (Roy *et al.*, 1999).

1.2.2.3. Les signaux en aval de Ras.

La protéine Ras joue un rôle important dans de multiples processus cellulaires. A son état actif lié au GTP, la protéine Ras déclenche, d'une part, l'activation de la voie des MAP-kinases (une cascade de Ser/Thr-kinases cytoplasmiques activées par les mitogènes) qui aboutit à la modulation de l'expression génique, et d'autre part, participe à la réorganisation du cytosquelette d'actine en modulant l'activité de certaines petites GTPases de la famille Rho. Ceci induit le "ruffling" membranaire accompagné d'une augmentation rapide de l'accumulation d'un traceur de l'endocytose fluide (Bar-Sagi et Feramisco, 1986).

Puisque Ras est impliquée dans les voies de différenciation, de prolifération ou de mort cellulaire programmée, une mutation ponctuelle qui affecte la structure tridimensionnelle de Ras et le rend constitutivement active, engendre diverses formes de cancer chez l'organisme pluricellulaire. Chez l'homme, on a identifié des mutations dans le gène ras dans environ 50 % des cancers du colon. La majorité de ces mutations sont trouvées au niveau du gène K-ras (Bos, 1988). Dans la plupart des tumeurs humaines où ils sont impliqués, les oncogènes ras portent des mutations (substitution) au niveau des aminoacides 12, 13 ou 61 (voir Tableau 1.3). Toutes ces mutations inactivent la GTPase, ce qui maintient la configuration active, liée au GTP.

Tableau 1.3. Les différentes mutations oncogéniques du gène ras dans les tumeurs humaines.

Gène	Codon	Mutations	Substitutions
H-ras	12	GGC → GTC → GAC	gly → val → asp
	61	CAG → AAG → CGG	glu → lys → arg
K-ras	12	GGT → CGT → AGT → TGT → GAT → GTT	gly → arg → ser → cys → asp → val
	13	GGC → GAC	gly → asp
	61	CAA → CAT	glu → his
N-ras	12	GGT → AGT → GTT → GAT	gly → ser → val → asp
	13	GGT → CGT → GTT → GAT	gly → arg → val → asp

(D'après Bos, 1988)

1.3. Les phospho-inositide 3-kinases et leur signalisation.

1.3.1. Introduction: rôle des phospho-inositide 3-kinases dans la signalisation cellulaire.

1.3.1.1. Les phospho-inositides comme substrats et régulateurs.

Le phosphatidylinositol du feuillet cytosolique des membranes des cellules eucaryotes peut-être phosphorylé par plusieurs phospho-inositide-kinases de spécificités différentes, générant une grande variété de phospho-inositides impliqués dans divers processus, y compris la survie et la prolifération cellulaires, le remodelage du cytosquelette et l'activation des plaquettes sanguines, le trafic de vésicules et le transport de glucose, etc... (Fruman *et al.*, 1998). Les phospho-inositide-kinases (PtdIns-kinases) sont classées en trois grandes familles: les phospho-inositide 3-kinases (PI3Ks), les phospho-inositide 4-kinases et les phospho-inositide 5-kinases. Parmi les produits des PtdIns-kinases, on distingue chez les mammifères trois monophospho-inositides: le PtdIns 3P, le PtdIns 4P et le PtdIns 5P; trois bisphospho-inositides: le PtdIns 3,4P₂, le PtdIns 3,5P₂ et le PtdIns 4,5P₂ (ce dernier étant aussi appelé PIP₂); et un seul trisphospho-inositide, le PtdIns 3,4,5P₃ (ou PIP₃).

Ces modifications peuvent entraîner des propriétés remarquables. Le PtdIns 4,5P₂ est le substrat de la phospholipase C, qui produit deux seconds messagers, l'inositol trisphosphate (IP₃) relargué dans le cytosol, et le diacylglycérol (DAG), qui reste associé au feuillet interne de la membrane. Nous y reviendrons à la section 1.4. De plus, le PtdIns 4,5P₂ et les 3-phospho-inositides peuvent directement recruter des enzymes ou des adaptateurs spécifiques du cytosol à la membrane, ce qui modifie fortement leur activité. Il a enfin été proposé qu'en cas de production locale rapide, divers phospho-inositides recrutent une quantité importante de protéines, parmi lesquelles les protéines régulatrices de l'actine et de son attachement à la membrane, modifiant ainsi la courbure membranaire (Fruman *et al.*, 1998). Nous nous limiterons ici aux PI3Ks et à leurs produits.

1.3.1.2. Les PI3Ks, intermédiaires essentiels dans la signalisation cellulaire.

Les diverses PI3K, enzymes bifonctionnelles, présentent deux activités kinases distinctes: (i) une activité sérine-kinase, capable d'entraîner l'autophosphorylation de la sous-unité catalytique ou, pour la classe IA, la phosphorylation des sous-unités régulatrices p85 α ou p85 β ; et (ii) une activité lipide-kinase, capable de phosphoryler le phosphatidylinositol et

ses dérivés sur le groupement hydroxyle du 3^{ème} carbone de l'inositol. C'est cette seconde activité qui leur a donné leur nom générique de PI3K (Fruman *et al.*, 1998).

L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques et de "dominants-positifs" ou "-négatifs", discutée plus loin, a permis d'impliquer la PI3K dans une grande variété de processus biologiques. A court terme (en quelques minutes), cette enzyme intervient dans l'organisation générale du cytosquelette d'actine, et en particulier dans le remodelage du cytocortex, et module l'endocytose et l'exocytose. L'organisation générale du cytosquelette d'actine peut être bouleversée par la PI3K suite au recrutement à la membrane d'une multitude de protéines capables soit (i) d'entraîner une protéine-tyrosine phosphorylation, telle la protéine pp60^{c-src} qui phosphoryle la cortactine; soit (ii) d'activer la Rho-GTPase comme c'est le cas pour le facteur d'échange de Rac (Vav), ce qui provoque le "ruffling" membranaire; soit encore (iii) d'accélérer directement le remodelage de l'actine corticale, comme c'est le cas pour la gelsoline, la cofiline et la profiline (Rameh *et al.*, 1995; Bhargavi *et al.*, 1998; Royal *et al.*, 2000). Le contrôle du cytocortex par la PI3K a été bien mis en évidence par son rôle nécessaire pour la formation du "ruffling" membranaire, induit de manière rapide mais transitoire par l'IGF-1 et l'insuline dans les cellules KB (Kotani *et al.*, 1994) ou par l'HGF dans les cellules épithéliales (Royal *et al.*, 2000), et de manière constitutive par Src et Ras dans les fibroblastes (comme démontré dans notre travail).

Divers exemples illustrent l'implication des PI3Ks dans le trafic vésiculaire. D'abord, la mutation du récepteur PDGF au niveau de la tyrosine phosphorylable qui lie les PI3Ks de la classe IA par leur domaine SH2, bloque le transfert de ce récepteur aux lysosomes et sa dégradation en réponse à l'exposition au ligand (Joly *et al.*, 1995). Ensuite, la PI3K de la classe III est indispensable à la dynamique des endosomes; nous en reparlerons plus loin. Au niveau de l'exocytose, l'inhibition de la PI3K par la wortmannine ou un "dominant-négatif" bloque la translocation du transporteur de glucose Glut-4 vers la membrane en réponse à l'insuline (Cheatham *et al.*, 1994).

A plus long terme, la PI3K joue un rôle central dans la survie et la prolifération cellulaire. Tout d'abord, la PI3K empêche l'apoptose en activant l'Akt/PKB par l'intermédiaire de ses deux produits, le PtdIns 3,4P2 et le PtdIns 3,4,5P3 (Franke *et al.*, 1997). Ensuite, la transfection de cellules par une forme constitutivement active de la PI3K ("dominant-positif") stimule directement la prolifération cellulaire en induisant l'expression du gène fos par la voie des MAP-kinases (Martin, 1998). Enfin, on sait depuis une décennie que la transformation cellulaire par deux virus oncogènes (SV40 et le virus du sarcome de

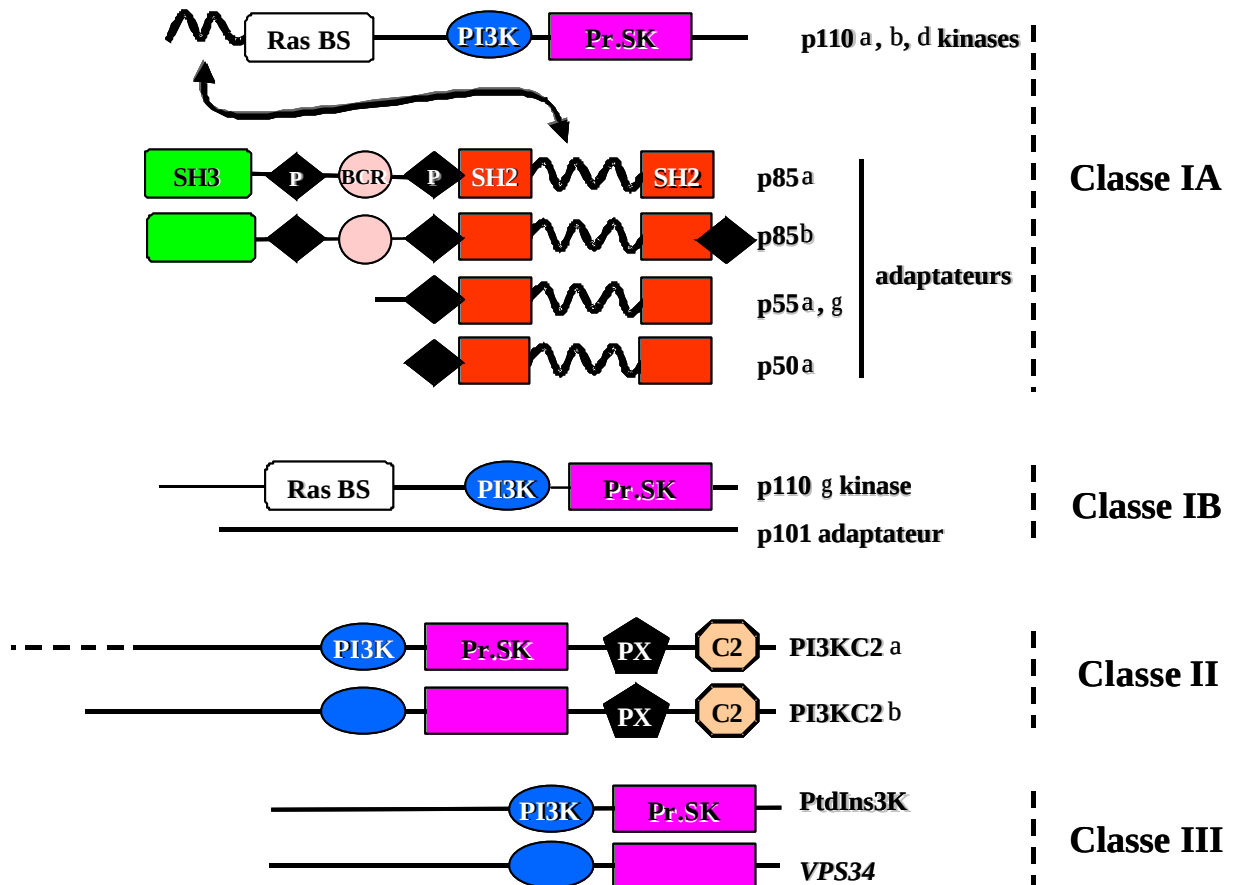
Rous), dépend de l'interaction de la PI3K avec les oncoprotéines virales correspondantes, l'antigène middle T (mT) et la pp60^{v-Src} (Cantley *et al.*, 1991).

1.3.2. Structure et classification des PI3Ks des mammifères.

Les PI3Ks sont regroupées en trois classes, en fonction de leur structure et de leur activité (Figure 1.7; Domin et Waterfield, 1997; Vanhaesebroeck *et al.*, 1997). Les enzymes de la **classe I** phosphorylent l'hydroxyle en position 3 du PtdIns, du PtdIns 4P et du PtdIns 4,5P2 pour générer respectivement le PtdIns 3P, le PtdIns 3,4P2 et le PtdIns 3,4,5P3. Cette classe inclut toutes les formes hétérodimériques dont la sous-unité catalytique présente une mobilité électrophorétique relative de ~ 110000 . Dans la classe IA des mammifères, on trouve trois isoformes de la sous-unité catalytique (p110 α , p110 β , p110 δ), qui sont associées à l'une des cinq sous-unités régulatrices différentes (p85 α , p85 β , ainsi que leurs isoformes tronquées, p55 α , p55 γ et p50 α).

La classe IA des PI3Ks, la première à avoir été clonée, est principalement impliquée dans la réponse aux récepteurs à activité tyrosine-kinase, alors que la classe IB, dont le seul représentant est composé de la sous-unité catalytique p110 γ et de la sous-unité régulatrice p101, est activée par les protéines G hétérotrimériques (Kapeller et Cantley, 1994; Stephens *et al.*, 1997). Les quatre isoformes de la sous-unité catalytique des classes IA et IB comportent successivement à partir de leur extrémité N-terminale: (i) le site qui lie la sous-unité régulatrice; (ii) le domaine d'interaction avec Ras (il faut noter que la p110 peut être activée directement par Ras); (iii) le domaine catalytique 3-phospho-inositide-kinase proprement dit; et enfin (iv) le domaine catalytique protéine sérine-kinase.

Figure 1.7. Structure multimodulaire et classification des membres de la famille des PI3Ks.



Trois classes de PI3Ks ont été identifiées chez les mammifères. La classe I est constituée des enzymes hétérodimériques (une sous-unité régulatrice et une sous-unité catalytique), les classes II et III regroupent des enzymes monomériques. Pour les deux sous-unités de la classe IA, les domaines de ces protéines apparaissent dans l'ordre suivant. Dans la sous-unité p110, on distingue le domaine d'interaction entre sous-unités (en ondulé; flèche à double tête), le domaine de liaison avec la petite GTPase Ras (**Ras BS**, pour "**R**as **B**inding **S**ite"), le 1^{er} domaine catalytique qui justifie le nom de 3-phospho-inositide-kinase (**PI3K**), le 2^{ème} domaine catalytique à activité sérine-kinase (**Pr.SK**). Dans la sous-unité adaptatrice, on distingue un domaine **SH3**, deux domaines riches en proline (losanges **P**) séparés par le motif homologue au domaine catalytique de RhoGAP (**BCR** pour "**B**reakpoint **C**luster **R**egion"), et enfin deux domaines **SH2**, séparés par le domaine d'interaction entre sous-unités. L'adaptateur p101 ne présente aucune homologie avec d'autres protéines et sa région d'interaction avec la sous-unité p110γ n'est pas encore identifiée. Les domaines **PX** et **C2** se retrouvent chez les membres de la classe II. Enfin, la classe III est homologue de la PI3K de *Saccharomyces cerevisiae*, VPS34. (Modifié d'après Fruman *et al.*, 1998).

Les diverses sous-unités régulatrices de la PI3K, dépourvues d'activité enzymatique intrinsèque, agissent en recrutant les diverses sous-unités catalytiques à la membrane, à proximité immédiate de leurs substrats et de leurs activateurs. Il s'agit donc d'**adaptateurs**, composés de plusieurs modules qui permettent des interactions protéine/protéine. Pour les isoformes p85 α et p85 β , on trouve à partir de l'extrémité N-terminale: (i) le domaine BCR (pour Breakpoint Cluster Region), une région homologue avec le domaine catalytique des Rho-GAPs; ce domaine est toutefois inactif dans ces deux sous-unités régulatrices, car les 5 résidus essentiels de Rho-GAP y sont mutés; (ii) un 1^{er} domaine riche en proline, qui reconnaît spécifiquement les domaines SH3 d'autres protéines; (iii) un domaine SH3 qui reconnaît spécifiquement des domaines riches en proline d'autres protéines dans un consensus particulier Φ -P-P- Φ -P (Φ = acide aminé aliphatique et P = proline); (iv) un 2^{ème} domaine riche en proline (P); (v) deux domaines SH2 qui lient des résidus tyrosine phosphorylés dans un consensus Y-x₁-x₂-M; pour le domaine SH2 amino-terminal, l'affinité est accrue par la présence d'une seconde méthionine ou d'une valine en x₁; et (vi) un domaine inter-SH2, qui assure l'interaction avec la partie N-terminale de la sous-unité catalytique (Figure 1.7).

A des fins de comparaison, nous citerons quelques propriétés remarquables des autres classes de la PI3K. Les enzymes de la **classe II** convertissent le PtdIns en PtdIns 3P et le PtdIns 4P en PtdIns 3,4P₂, mais semblent incapables d'utiliser le PtdIns 4,5P₂ comme substrat. Cette classe regroupe deux enzymes monomériques de grande taille, PI3KC2 α et PI3KC2 β (respectivement 210 et 170 kDa). Leur domaine PX, de fonction inconnue, présente des homologies avec certaines protéines du complexe de la NADPH oxydase, telles que p40^{phox} et p47^{phox} (Domin et Waterfield, 1997; Fruman *et al.*, 1998). Un domaine homologue au domaine C2 des protéines liant le calcium, situé près de l'extrémité C-terminale, a été impliqué dans la liaison des protéines aux vésicules lipidiques dépendante du Ca²⁺. Cependant, les résidus Asp, souvent impliqués dans la liaison du Ca²⁺, y sont absents. Récemment, il a été montré que la PI3KC2 α est constitutivement associée à la membrane du réseau trans-golgien (ou TGN) indépendamment de ses domaines PX et C2 (Domin *et al.*, 2000).

Les enzymes de la **classe III** incluent la PI3K initialement identifiée chez des mutants VPS34 (pour Vacuole Protein Sorting) de *Saccharomyces cerevisiae*, défectifs pour le transport des protéines nouvellement synthétisées du complexe de Golgi vers la vacuole, l'équivalent du lysosome chez la levure. On rencontre ces homologues chez plusieurs espèces (*Schizosaccharomyces pombe*, *Dictyostelium discoideum*, *Drosophila melanogaster*), y

compris chez les mammifères. La *Vps34* utilise exclusivement le PtdIns comme substrat. Elle est recrutée à la membrane par association à son adaptateur *Vps15p*, myristoylé à son extrémité N-terminale. Cet adaptateur manifeste également une activité de protéine Ser/Thr-kinase propre, catalysant son autophosphorylation (Fruman *et al.*, 1998). Dans les cellules de mammifères, c'est exclusivement la PI3K de la classe III, et donc le PtdIns 3P, qui est nécessaire à la fusion des endosomes (voir plus loin, section 1.3.4.2.4.).

1.3.3. Synthèse des phospho-inositides dans les cellules de mammifères.

Seules les positions 3 à 5 du phosphatidylinositol sont connues pour être phosphorylées. On pense que les positions des hydroxyles 2 et 6, qui ne sont jamais phosphorylées, sont trop proches de la membrane pour être accessibles. La Figure 1.8 montre les différentes étapes de phosphorylation qui peuvent être catalysées par les phospho-inositide-kinases *in vitro*. La majorité de ces voies ont été démontrés *in vivo*, soit par incorporation métabolique de précurseurs lipidiques radiomarqués suivie de l'identification des produits par HPLC, soit par analyse de cellules qui surexpriment des formes constitutives ("dominantes-positives" ou "-négatives") de ces enzymes. Dans les secondes qui suivent leur synthèse, les polyphospho-inositides peuvent être pris en charge par diverses phospho-inositide phosphatases qui éteignent le signal, telles que la 3-phosphatase (PTEN) et les 5-phosphatases (SHIPs). Ces phosphatases sont stimulées après un léger retard par rapport à la stimulation de la PI3K. Le PtdIns 3P, le PtdIns 3,4P2 et le PtdIns 3,4,5P3 peuvent aussi être clivés par la phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol (PI-PLC), même s'ils n'en sont pas les substrats de prédilection. Le taux de renouvellement ("turn-over") de chacun des phospho-inositides et leur concentration locale dans la cellule dépend donc à la fois de l'activité des lipides-kinases, des phosphatases et des phospholipases.

Le phosphatidylinositol contribue pour environ 10 % des phospholipides cellulaires totaux et environ 10 % de ce phosphatidylinositol est phosphorylé sur les carbones 3, 4 et/ou 5. Le niveau des PtdIns, PtdIns 3P et PtdIns 4P est constant dans les cellules quiescentes et dans les cellules activées, alors que celui des PtdIns 3,4P2 et PtdIns 3,4,5P3 varie considérablement en réponse à divers stimuli. Les constituants les plus abondants sont encadrés en noir sur la Figure 1.8. A eux seuls, le PtdIns 4P et le PtdIns 4,5P2 représentent 90 % des phospho-inositides totaux cellulaires. Le PtdIns 3P et le PtdIns 5P contribuent chacun 2 à 5 % des phospho-inositides totaux; le PtdIns 3,5P2 représente 2 % de phospho-inositides des cellules fibroblastiques. Enfin, le PtdIns 3,4P2 et le PtdIns 3,4,5P3, à peine détectables

rassemblés sous le sigle de phospho-inositides **D4**; le PtdIns 3P, le PtdIns 3,4P2, et le PtdIns 3,4,5P3, ou phospho-inositides **D3**; et le PtdIns 5P désigné par **D5**. Les effecteurs de la PI3K intervenant dans l'activation de certaines protéine tyrosine-kinases, dans les réactions d'échange de GTP au niveau des petites GTPases monomériques, dans la régulation du cytosquelette d'actine et dans le trafic membranaire sont recrutés sur les phospho-inositides D3. Dans ce groupe, les protéines en aval de la PI3K de type III impliquées dans le trafic endocytaire, comme AP2 ("Aaptor Protein complex type 2"; c-à-d l'adaptateur de la clathrine pour les puits endocytaires mantelés) et EEA1 (Early Endosomal Autoantigen-1) se lient exclusivement au PtdIns 3P (Patki *et al.*, 1997; Rapoport *et al.*, 1997). Les principales protéines intervenant dans l'endocytose et capables d'interagir en milieu acellulaire avec les 3-phospho-inositides sont reprises dans le Tableau 1.4. Toutefois, l'identification des protéines qui montrent effectivement des interactions spécifiques avec des phospho-inositides dans les cellules reste une étape nécessaire pour impliquer à coup sûr les phospho-inositide-kinases dans une voie de signalisation.

1.3.4.2. Domaines d'interaction des protéines avec les 3-phospho-inositides.

Quatre domaines protéiques capables de lier les phospho-inositides avec une grande affinité ont été identifiés: le domaine SH2, des séquences hydrophobes et basiques, les domaines homologues à la pleckstrine, et le domaine en doigt de zinc FYVE. Ces interactions sont précisées dans le Tableau 1.4.

Tableau 1.4. Exemples de protéines qui interagissent avec les phospho-inositides.

Protéines	Exemples	Domaine de liaison sur la protéine	Spécificité pour les phospho-inositides	Références
Protéine-kinases	Akt/PKB PDK1 PKC δ , ϵ , η et ξ	PH PH nd	D3 D3 D3	Franke <i>et al.</i> , 1997 Stokoe <i>et al.</i> , 1997 Toker <i>et al.</i> , 1994 Way <i>et al.</i> , 2000
Phospholipases et lipide-kinases	PLC γ 1 " PLD PI3K classe IA	PH SH2 PH SH2	D3 D3 D3 $\approx$ D4 D3	Falasca <i>et al.</i> , 1998 Bae <i>et al.</i> , 1998 Hammond <i>et al.</i> , 1997 Rameh <i>et al.</i> , 1995
Protéines régulatrices et adaptateurs du cytosquelette	gelsoline profiline cofiline α -actinine " vinculine	KR KR KR KR ? KR	D3 D3 nd D4 D3 D4	Hartwig <i>et al.</i> , 1996 Lu <i>et al.</i> , 1996 Yonezawa <i>et al.</i> , 1991 Fukami <i>et al.</i> , 1994 Greenwood <i>et al.</i> , 2000 Gilmore et Burridge, 1996
Protéines régulatrices des GTPases	Rac/Rho GEFs	PH	D3	Rameh et Cantley, 1999
Adaptateurs du trafic membranaire	AP2 EEA1	KR FYVE	D3 PtdIns 3P	Hao <i>et al.</i> , 1997 Stenmark et Aasland, 1999

Abréviations:

Protéines

PKB = protéine kinase B

PDK1 = phosphoinositide-dependent protein kinase 1.

PKC = protéine kinase C indépendante du Ca^{2+}

PLC γ 1 = phospholipase γ 1

PLD = phospholipase D

AP2 = adaptateur de la clathrine

EEA1 = "Early Endosomal Autoantigen-1"

(Adapté et mis à jour d'après Martin, 1998).

Domaines et spécificité

PH = domaine homologue à la pleckstrine

SH2 = domaine d'homologie à Src du type 2

KR = séquence hydrophobique et basique

D3 = PtdIns 3P + PtdIns 3,4P2 +
PtdIns 3,4,5P3

D4 = PtdIns 4P + PtdIns 4,5P2

$\approx$ = affinité comparable

nd = non déterminé

1.3.4.2.1. Les domaines SH2.

Les domaines SH2, déjà décrits ci-dessus, peuvent non seulement se fixer sur une courte séquence contenant une tyrosine phosphorylée dans le contexte approprié, mais aussi au phospho-inositide D3 (Rameh *et al.*, 1995; Bae *et al.*, 1998).

1.3.4.2.2. Les séquences hydrophobes et basiques.

Il s'agit de courtes séquences de 10 à 20 acides aminés, contenant environ une moitié de résidus hydrophobes et enrichies en résidus basiques, dont au moins une lysine et une arginine (d'où leur abréviation KR). On pense que ces courtes séquences peuvent fournir, d'une part, un contact hydrophobe avec les chaînes acyles des phospho-inositides et d'autre part, les interactions de charge complémentaires entre leurs résidus basiques et les groupements phosphates des 3-phospho-inositides. Des exemples de ces consensus ont été trouvés dans diverses protéines régulatrices de l'actine comme la gelsoline, la cofiline et la profiline (Martin, 1998).

1.3.4.2.3. Les domaines homologues à la pleckstrine.

Les domaines PH (pour "Pleckstrin Homology") ressemblent au domaine identifié pour la première fois chez la pleckstrine, le principal substrat de la protéine-kinase C. Ce type de domaine est constitué de longues séquences d'environ 120 acides aminés, ne présentant guère d'homologie dans la séquence primaire, mais partageant une structure tertiaire remarquable composée de deux feuillets β à trois ou quatre brins presque perpendiculaires, qui forment une poche "en sandwich", fermée par une hélice α amphipathique du côté C-terminal. Ces domaines sont responsables du recrutement à la membrane de protéines du cytosquelette (spectrine, α -actinine), de protéines d'échange du GTP qui "allument" la fonction de signalisation de diverses petites GTPases (Vav, Dbl et Tiam-1), de la protéine activatrice de l'activité GTPase de Ras qui "éteint" sa fonction (Ras-GAP), d'une grande GTPase monomérique (la dynamine), de protéines-kinases (Akt/PKB, PDK1 et PKCs) et de phospholipases (PLCs et PLDs).

En outre, le domaine PH est souvent associé, au sein de la même protéine, à d'autres motifs d'interaction protéine/protéine (p.ex. SH2, SH3, riche en proline), ce qui permet non seulement le ciblage de ces protéines à la membrane, mais aussi le recrutement d'autres protéines effectrices formant des complexes multimériques focaux, au niveau de sites bien spécifiques à l'interface de la membrane et du cytosol. Ainsi, certains phospho-inositides

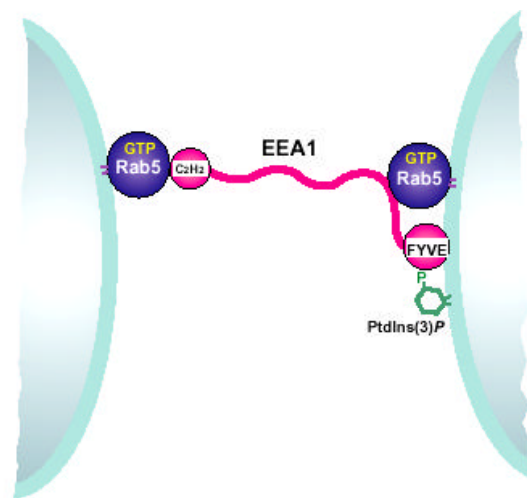
colocalisent au niveau des zones de "ruffling" et aux points de contact focaux avec des protéines régulatrices du cytosquelette d'actine (p.ex. la gelsoline) et de son ancrage (p.ex. l' α -actinine) (Fukami *et al.*, 1994; Shibasaki *et al.*, 1994; Greenwood *et al.*, 2000; Rickert *et al.*, 2000).

1.3.4.2.4. Le domaine en doigt de zinc FYVE.

L'acronyme FYVE provient des quatre premières protéines (Fab1p, YOTB, Vac1p et EEA1) où ce domaine a été identifié en simple copie (Stenmark *et al.*, 1996). Le domaine FYVE, composé d'environ 70 résidus, contient 2 sites de liaison indépendants pour du zinc incluant 8 cystéines stabilisant le "doigt de zinc". Quatre des ces cystéines appartiennent à des motifs R+HHC+xCG (où '+' est un résidu chargé positivement et 'x' n'importe quel acide aminé). Ce domaine confère aux protéines qui le contiennent la particularité de lier le PtdIns 3P et donc de s'accrocher à la membrane.

La protéine EEA1 des mammifères intervient dans la fusion, dite latérale homotypique, entre deux endosomes qui ont chacun lié du Rab5-GTP. EEA1 assure le rapprochement entre ces deux vésicules par la liaison à la protéine Rab5-GTP sur le premier endosome via le doigt de zinc appelé C2H2 de son extrémité N-terminale, et par deux interactions de son extrémité C-terminale avec le deuxième endosome d'une part par son domaine FYVE, qui reconnaît spécifiquement le PtdIns 3P, et d'autre part par une région de 30 acides aminés qui se lie directement à Rab5-GTP (Figure 1.9). La fusion proprement dite nécessitera l'intervention d'autres facteurs comme les protéines rabaptine-5, rabex-5 et les SNAREs (pour "Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion Attachment Receptor"; Stenmark et Aasland, 1999).

Figure 1.9. Modèle des interactions entre la protéine EEA1, Rab5 et le PtdIns 3P.



Pour l'explication des interactions, voir le paragraphe précédent. (D'après Stenmark *et al.*, 1999).

1.3.4.3. Spécificité des interactions des 3-phospho-inositides.

L'interaction préférentielle avec leurs protéines-cibles respectives de quatre 3-phospho-inositides distincts (PtdIns 3P, PtdIns 3,4P2, PtdIns 3,5P2; et PtdIns 3,4,5P3), produits de manière inégale, et sans doute en des sites différents, par les divers membres de PI3Ks, permet sans doute de mieux différencier les rôles très diversifiés des PI3Ks dans de multiples processus cellulaires et d'orienter chacun de ces produits dans telle ou telle voie de signalisation cellulaire.

1.3.4.3.1. Le PtdIns 3P.

Le PtdIns 3P est présent de manière constitutive dans toutes les cellules de mammifères et de levures. *In vitro*, il peut en principe être produit par phosphorylation du PtdIns catalysée par les trois classes de PI3Ks (I, II et III). Toutefois, dans les cellules des mammifères, le PtdIns 3P est principalement produit par la PI3K de classe III. Les cibles du PtdIns 3P sont généralement des protéines impliquées dans le trafic endocytaire précoce, et qui contiennent soit un domaine FYVE comme la protéine EEA1 (Simonsen *et al.*, 1998), soit un domaine KR comme AP2 (Hao *et al.*, 1997).

1.3.4.3.2. Le PtdIns 3,4P2.

Comme le montre la Figure 1.8, le PtdIns 3,4P2 est synthétisé à partir du PtdIns 4P par les PI3Ks de classe I. La PI3K de classe II peut également synthétiser le PtdIns 3,4P2 à partir du PtdIns 4P, indépendamment de la synthèse du PtdIns 3,4,5P3. Le PtdIns 3,4 P2 peut aussi être généré par phosphorylation de PtdIns 3P par la PIP4K. Enfin, bien que les PIP5Ks phosphorylent préférentiellement le PtdIns 3P en position 5, leur spécificité est plus large que suggérée par leur nom, et ils sont aussi capables de produire le PtdIns 3,4P2 à partir du PtdIns 3P (Fruman *et al.*, 1998, 1999; Rameh et Cantley, 1999). La contribution respective de ces quatre voies de synthèse à la production du PtdIns 3,4P2 n'est pas encore connue.

La cible la mieux caractérisée du PtdIns 3,4P2 est la protéine-kinase B (Akt/PKB), impliquée dans la voie de signalisation qui contrôle la survie cellulaire. Cette sérine/thréonine-kinase interagit par son domaine PH avec les phospho-inositides selon l'ordre de préférence PtdIns 3,4P2 >> PtdIns 3,4,5P3 >> PtdIns 4,5P2. Le mécanisme proposé pour l'activation de la protéine Akt/PKB est indirect, chaque étape faisant intervenir un domaine PH et deux phospho-inositides D3 différents. En un premier temps, la PDK1 est recrutée à la membrane par son domaine PH et, une fois activée par le PtdIns 3,4,5P3, phosphoryle à son tour Akt/PKB au niveau de sa thréonine 308 et de sa sérine 473. Le changement conformationnel de la protéine Akt/PKB ainsi phosphorylée permet la fixation à la membrane de son domaine PH sur du PtdIns 3,4P2. La kinase PDK1 peut aussi phosphoryler la p70 S6-kinase et certains membres de la famille des PKCs. Par ailleurs, Akt/PKB phosphoryle également la glycogène synthase-kinase 3 (ou GSK-3) et la phosphofructokinase *in vivo*, ce qui implique la PI3K dans la gluconéogenèse et la glycolyse (Downward, 1998; Rameh et Cantley, 1999).

1.3.4.3.3. Le PtdIns 3,5P2.

Dans les fibroblastes de souris, le PtdIns 3,5P2 est synthétisé principalement par deux phosphorylations successives. La PI3K génère d'abord le PtdIns 3P à partir du PtdIns, et elle est suivie par de la PtdIns 3P 5-kinase qui produit le PtdIns 3,5P2 (Whiteford *et al.*, 1997; Tolias *et al.*, 1998). Dans les cellules de mammifères, le taux de PtdIns 3,5P2 diminue modérément en réponse à un choc hyperosmotique et augmente avec le choc hypoosmotique. *In vitro*, le PtdIns 3,5P2 peut également être généré par phosphorylation du PtdIns 5P

catalysée par la PI3K de la classe IA (Rameh *et al.*, 1997). Aucune cible directe pour le PtdIns 3,5P2 n'a encore été trouvée.

1.3.4.3.4. Le PtdIns 3,4,5P3.

Seule la classe I de la PI3K peut utiliser le PtdIns 4,5P2 comme substrat pour produire le PtdIns 3,4,5P3. L'interaction des domaines SH2 de la sous-unité régulatrice des PI3Ks de la classe IA avec des tyrosines phosphorylées en réponse à des facteurs de croissance induit ainsi une augmentation rapide du taux du PtdIns 3,4,5P3. La classe IA de la PI3K peut aussi être directement activée au niveau de sa sous-unité catalytique par Ras (Rodriguez-Viciano, *et al.*, 1994). De son côté, la classe IB peut-être activée par interaction directe avec les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G hétérotrimériques (Fruman *et al.*, 1998). Il a enfin été rapporté que la PtdIns P 5-kinase α et β est capable de phosphoryler successivement le PtdIns 3P pour produire le PtdIns 3,4,5P3 (Tolias *et al.*, 1998). Il va de soi que la concentration effective de chacun des phospho-inositides dépend aussi de l'activité de leur phosphatase spécifique, dont la régulation reste assez obscure.

Outre PDK1 et les PKCs, diverses protéines-cibles en aval de la PI3K contiennent au moins un domaine qui se fixe au PtdIns 3,4,5P3. Certaines s'y lient par leur domaine PH: GRP1, PLC β , PLC γ , PLC δ , Vav2 (Martin, 1998; Rameh et Cantley, 1999). Toutefois, le domaine PH des PLC β et δ lie essentiellement le PtdIns 4,5P2. D'autres protéines interagissent avec le PtdIns 3,4,5P3 par leur domaine SH2. C'est le cas de la sous-unité régulatrice de la PI3K de la classe IA elle-même. Par ce mécanisme, le PtdIns 3,4,5P3 a été impliqué dans la régulation négative de cette PI3K (Rameh *et al.*, 1995). Enfin, d'autres protéines se lient au PtdIns 3,4,5P3 par leurs domaines hydrophobes et basiques : c'est le cas des protéines régulatrices ou d'ancrage du cytosquelette, telles que la gelsoline, la profiline, la cofiline, l' α -actinine et la vinculine (Martin, 1998). La PI3K est donc un intermédiaire obligatoire dans plusieurs processus cellulaires, du fait de la capacité de ses produits d'interagir directement avec une multitude de cibles différentes impliquées dans des voies de signalisation cellulaire variées.

1.4. Les phospholipases C.

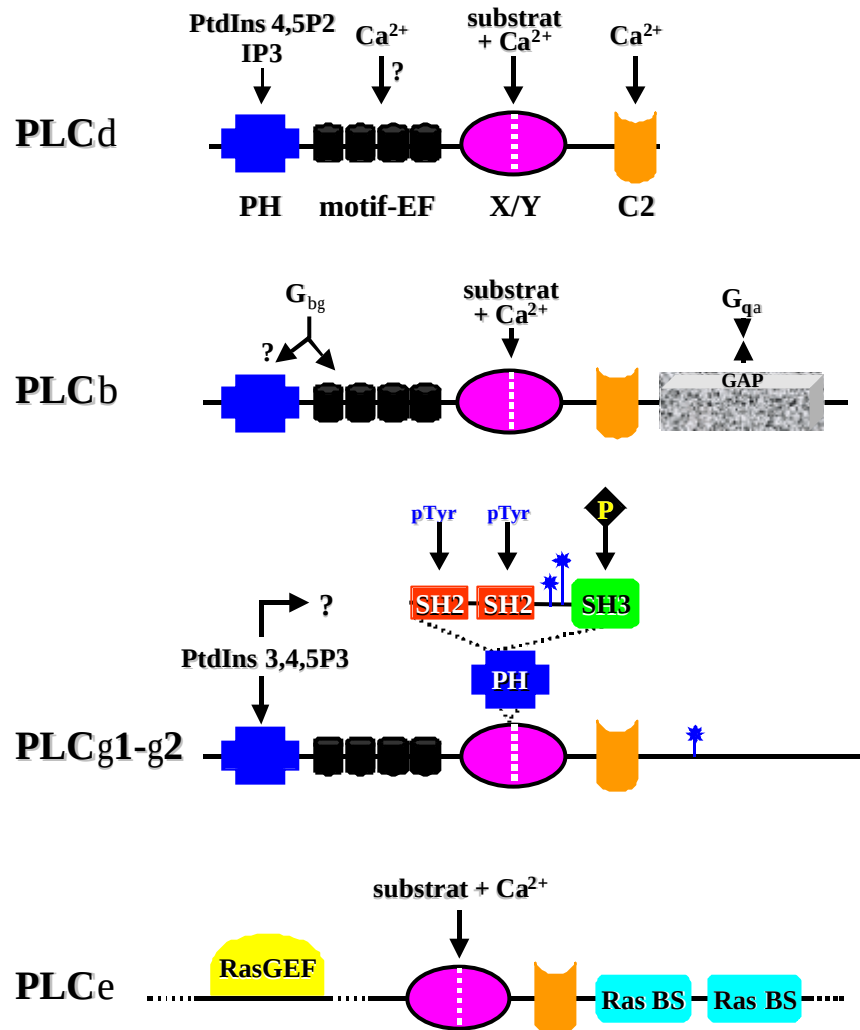
1.4.1. Introduction: rôle des PLCs dans la signalisation cellulaire.

Comme la PI3K, les phospholipases spécifiques des phospho-inositides (PI-PLC , ou plus simplement PLC) ont été impliquées dans de nombreuses voies de signalisation chez les cellules eucaryotes. Nous nous concentrerons sur la PLC γ 1, qui influence le mouvement et le chimiotactisme, est activée par les protéine tyrosine-kinases de la famille Src, intervient dans la transformation cellulaire et conduit à l'entrée dans le cycle cellulaire via l'expression du gène c-fos (Carpenter et Ji, 1999).

Chez les eucaryotes supérieurs, la PLC est responsable de la régulation intracellulaire en réponse à des hormones. Son activation entraîne le clivage du PtdIns 4,5P₂ en diacylglycérol (DAG) et en inositol trisphosphate (IP₃). Ces deux produits sont d'importants seconds messagers pour l'activation de différentes isoformes des PKCs et de la régulation de la concentration du Ca²⁺ intracellulaire, respectivement, modulant ainsi de nombreux événements intracellulaires (Singer *et al.*, 1997). Cette signalisation liée au DAG et à l'IP₃ est transitoire, les deux seconds messagers étant rapidement convertis respectivement en acide phosphatidique et en inositol, réutilisés pour régénérer le phosphatidylinositol.

La Figure 1.10 présente les diverses isozymes de PLC qui ont été identifiées chez les mammifères: les PLC β 1-4, les PLC γ 1-2, les PLC δ 1-4, et la PLC ϵ , qui vient d'être découverte (Lopez *et al.*, 2001). Les classes β et ϵ sont activées par les récepteurs couplés aux protéines G, tandis que la classe γ est activée à la fois par les récepteurs à activité protéine tyrosine-kinase et par d'autres protéine tyrosine-kinases tels que des membres de la famille Src. La régulation de la classe δ n'est pas encore bien caractérisée (Singer *et al.*, 1997). On sait toutefois qu'à la différence des classes β et γ , une augmentation de la concentration en calcium est suffisante pour activer la PLC de la classe δ , même en l'absence d'activateurs extracellulaires.

Figure 1.10. Structure et organisation des PLCs.



Ce schéma compare les modules conservés (domaine PH, motif EF, site catalytique dépendant du calcium, domaine C2), en relation avec leurs ligands dans les quatre familles de phospholipases C impliquées dans la signalisation cellulaire. Les pointillés désignent ce que l'on appelle le site d'insertion, développé pour la PLCγ. Dans cette classe, ce site renferme un domaine PH dans lequel sont insérés deux domaines SH2 qui reconnaissent des tyrosines phosphorylées d'autres protéines, deux tyrosines phosphorylables (p-Tyr) et un domaine SH3 qui reconnaît des séquences riches en proline. Les positions des résidus tyrosines phosphorylées identifiées sur la PLCγ1 des mammifères sont également indiquées par une étoile. Le losange P désigne les domaines riches en proline. L'extension C-terminale de la PLCβ est responsable de son interaction avec les phospholipides membranaires et la sous-unité α de la protéine G, dont elle stimule l'activité GTPase (GAP). Les points d'interrogation indiquent des interactions hypothétiques. La classe PLCε contient à son extrémité N-terminale un domaine homologue au site catalytique du facteur d'échange du GTP (RasGEF) et à son extrémité C-terminale deux sites de liaison de Ras (Ras-BS pour Ras-Binding Site). Son site d'interaction avec les protéines G hétérotrimériques n'est pas encore localisé. (Adapté de Katan, 1998; Lopez *et al.*, 2001).

1.4.2. Structure en domaines des PLCs.

Les membres de chaque classe des PLCs présentent une structure multimodulaire (Figure 1.10) incluant des domaines communs aux trois classes, parmi lesquels on distingue deux domaines fortement conservés X et Y, qui forment ensemble le site catalytique de la protéine, un domaine PH du côté N-terminal, le motif EF et, du côté C-terminal, un domaine d'homologie C2 liant le calcium, parfois décrit comme "l'élément étendu du domaine Y". Nous analyserons plus loin chacun de ces domaines en détail.

Trois éléments semblent en outre essentiels à la régulation de la PLC γ : un domaine SH3, deux domaines SH2 et des sites de tyrosine-phosphorylation. En effet, de nombreux facteurs de croissance qui se fixent sur des récepteurs dotés d'activité protéine tyrosine-kinase peuvent causer à la fois la translocation rapide de la PLC γ vers des sites spécifiques au niveau de la membrane et sa phosphorylation sur des résidus de tyrosine. De plus, la mutation des récepteurs du PDGF et de l'EGF au niveau de leurs tyrosines impliquées dans l'interaction avec le domaine SH2 de la PLC γ prévient l'activation de cette dernière et supprime la voie de signalisation de ces récepteurs (Singer *et al.*, 1997). A son tour, le domaine SH3 de la PLC γ permet son interaction avec les domaines riches en proline de protéines du cytosquelette (Bargi *et al.*, 1993).

La PLC ϵ a été récemment identifiée (Lopez *et al.*, 2001). En plus de son activité phospholipase commune à toutes les PI-PLCs, la PLC ϵ est capable d'interagir à la fois avec les protéines G hétérotrimériques, qui la stimulent comme dans le cas de la PLC β , et surtout avec la petite GTPase Ras, dont elle régule l'activité en constituant un facteur d'échange du GTP. En effet, (i) elle contient, à son extrémité N-terminale, un domaine homologue au site catalytique du facteur d'échange du GTP de Ras, RasGEF; (ii) elle présente, au niveau de son extrémité C-terminale, un motif répété en deux exemplaires homologue au site de liaison de la petite GTPase Ras trouvé sur plusieurs protéines (Ras-BS, pour "Ras-binding site"), ce qui suggère une interaction directe; et (iii) elle active la voie des MAP-kinases. Par ailleurs, la délétion des deux domaines Ras-BS de la PLC ϵ inhibe son activité de phospholipase, ce qui suggère que ces domaines ont aussi un rôle dans le maintien de sa conformation active.

1.4.2.1. Le domaine PH.

Le domaine PH de la PLC δ 1 est nécessaire et suffisant pour la liaison de la protéine à la membrane plasmique, à proximité de son substrat; l'activation de cette enzyme par une

hormone (p.ex. l'angiotensine-II) ou par un ionophore du calcium entraîne seulement sa redistribution au sein de la membrane plasmique (Varnai et Balla, 1998). Le domaine PH de la PLC δ 1 se lie au PtdIns 4,5P2 et surtout à l'IP3 avec une affinité très supérieure à celle du domaine PH de la pleckstrine, de la dynamine et de la spectrine (Bottomley *et al.*, 1998). L'activation de cette enzyme provoque à la fois une diminution locale du PtdIns 4,5P2, qui est consommé, et l'augmentation de la production de IP3. Ce dernier, fixant le domaine PH de la PLC δ 1, décroche ainsi de la membrane cette enzyme qui l'a produite. Il s'agit donc d'une rétrorégulation négative ou "feed-back négatif" (Williams, 1999).

En revanche, la PLC γ 1 serait essentiellement cytosolique dans les cellules quiescentes et son domaine PH peut, lui, se lier avec une affinité particulièrement élevée au PtdIns 3,4,5P3, ce qui entraîne la translocation de la PLC γ 1 à la membrane (Falasca *et al.*, 1998). Il s'agit sans doute du mécanisme par lequel la PI3K active la PLC γ .

Le domaine PH de la PLC β n'interagit ni avec le PtdIns 4,5P2 ni avec le PtdIns 3,4,5P3 mais plutôt avec des lipides membranaires neutres telle que la phosphatidylcholine. Il ne permet donc pas ce même genre d'interaction et semble au contraire impliqué dans l'interaction directe avec les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G hétérotrimériques (Wang *et al.*, 1999).

1.4.2.2. Le motif EF.

Entre le domaine PH et la moitié X du domaine catalytique se trouve un motif EF qui lie deux ions de Ca^{2+} , mais cette liaison n'affecte pas l'activité des PLCs. Chez la PLC δ 1, ce motif interagit avec le côté C-terminal de la protéine et sa délétion inactive la PLC δ 1, ce qui suggère un rôle dans le maintien d'une conformation active de l'enzyme (Nakashima *et al.*, 1995).

1.4.2.3. Le domaine catalytique X/Y.

Ce domaine est responsable du clivage des substrats comme le PtdIns, le PtdIns 4P et le PtdIns 4,5P2, avec une nette préférence pour ce dernier, et utilise le Ca^{2+} comme co-facteur. Chez toutes les PLCs des mammifères, ce domaine est constitué de deux fragments homologues conservés désignés X et Y, séparés par un site d'insertion ("linker insertion"), impliqué dans la régulation de son activité.

1.4.2.4. Les éléments régulateurs du site d'insertion.

Sur les PLCs de la classe γ , on trouve entre les domaines X et Y une région supplémentaire particulièrement développée, ou site d'insertion, qui rend compte de la régulation de ces enzymes. Ce site contient en effet un domaine PH dans lequel sont insérés deux domaines SH2, deux tyrosines phosphorylables et un domaine SH3. La PLC γ peut donc être recrutée à la membrane et activée en réponse à des stimuli extracellulaires, à la fois par son domaine PH reconnaissant le PtdIns 3,4,5P3 et par ses deux domaines SH2, recrutés sur des protéines tyrosine-phosphorylées (Pawson, 1995; Singer *et al.*, 1997).

Ce sont les domaines SH2 qui jouent le rôle essentiel dans l'activation de la PLC γ , par son recrutement sur les récepteurs à activité protéine tyrosine-kinase autophosphorylés ou leurs substrats, conduisant à sa propre phosphorylation sur des résidus tyrosines (indiqués par les étoiles noires sur la Figure 1.10). Il semble toutefois, qu'en absence d'une interaction stable de son domaine SH2 avec un récepteur à activité protéine tyrosine-kinase tel que celui du PDGF, la seule phosphorylation des résidus tyrosines de la PLC γ ne soit pas suffisante pour son activation (Katan, 1998). En outre, le domaine SH2 de la PLC γ est aussi capable de lier le PtdIns 3,4,5P3 de manière compétitive avec les résidus tyrosines phosphorylés d'autres protéines membranaires. Le PtdIns 3,4,5P3 interagit donc à la fois avec les domaines SH2 et PH, ce qui favorise le recrutement et la stabilisation de la PLC γ à la membrane plasmique (Bae *et al.*, 1998; Falasca *et al.*, 1998; Rameh *et al.*, 1998). Toutefois, en cas de phosphorylation complète de la PLC γ 1 par un excès de facteur de croissance, son activation ne dépend plus de l'activité de la PI3K (Carpenter et Ji, 1999). Il n'a pas encore été démontré clairement si la liaison du domaine SH3 de la PLC γ 1 avec des domaines riches en proline d'autres protéines affecte sa régulation *in vivo* (Williams, 1999).

1.4.2.5. Le domaine C2.

Le domaine C2 de la PLC δ 1 lie trois ions de Ca^{2+} . Ce domaine est conservé dans diverses protéines, y compris la phospholipase A2, la PKC β et la PKC δ , où ce domaine joue un rôle dans la translocation de ces enzymes à la membrane, initiée par une augmentation de la concentration en Ca^{2+} , et leur interaction avec les phospholipides membranaires de manière calcium-dépendante. Aucun rôle similaire n'a toutefois été montré pour les PLCs. Ce domaine aurait un rôle structural, en favorisant la stabilité des PLCs des mammifères (Williams, 1999).

1.4.2.6. L'extrémité C-terminale.

Cette extrémité est propre aux isozymes PLC β . Elle contient une proportion élevée de résidus arginine et lysine, groupés dans deux régions impliquées dans l'interaction avec les phospholipides membranaires ou avec son activateur, la sous-unité q α de la protéine G. Une fois activée, cette extrémité présente une activité de GAP spécifique de la sous-unité Gq α , ce qui a pour conséquence de limiter la durée d'activation de la PLC β par cette sous-unité.

1.4.3. Régulation de la PLC γ .

Nous nous concentrerons sur la régulation de la PLC γ , car elle est la seule classe des PLCs impliquée dans la signalisation au départ de récepteurs protéine-tyrosine kinases activés, qui peuvent induire la macropinocytose de manière transitoire. Comme nous l'avons vu, la composition de la PLC γ en différents modules spécialisés dans divers types d'interactions (protéine/protéine et protéine/lipide) contribue à sa translocation rapide aux sites appropriés au niveau de la membrane plasmique. Elle est donc un intermédiaire dans la signalisation cellulaire, non seulement en aval de certains récepteurs protéine-tyrosine kinases, mais aussi de la PI3K.

Malgré la similitude de leur structure et de leur mécanisme d'activation, la PLC γ 1 et la PLC γ 2 montrent un comportement nettement distinct en réponse à des stimuli extracellulaires et sont donc impliquées dans des voies de signalisation différentes. Dans les cellules RBL-2H3 (dérivées de mastocytomes), la PLC γ 1 est principalement cytosolique à l'état de repos, alors que la PLC γ 2 est surtout concentrée dans la région périnucléaire à proximité des saccules golgiens. La stimulation par le rassemblement au récepteur des IgE (Fc ϵ R1) active les deux isoformes γ 1 et γ 2 et entraîne leur phosphorylation à la fois en sérine et en tyrosine. Toutefois, seule la PLC γ 1 est transloquée à la région de la membrane riche en lamellipodes, alors que la PLC γ 2 n'est pas redistribuée (Barker *et al.*, 1998).

Ces deux isoformes se distinguent aussi par leur relation avec la PI3K. La wortmannine inhibe la phosphorylation en sérine et en tyrosine ainsi que la translocation de la PLC γ 1 vers les zones de "ruffling" membranaire, mais reste sans effet appréciable sur la phosphorylation, l'activation et la localisation subcellulaire de la PLC γ 2. Ces observations montrent que la PI3K est en amont de la PLC γ 1 et suggèrent l'implication des deux isozymes de la PLC γ dans des voies de signalisations différentes (Barker *et al.*, 1998).

Bar-Sagi et ses collaborateurs (1993) ont montré que, dans les cellules fibroblastiques, le domaine SH3 de la PLC γ 1 est capable de s'associer au cytosquelette d'actine. Il est maintenant clairement établi que le "ruffling" membranaire dépend d'une réorganisation du cytosquelette d'actine et est contrôlé par la PI3K. L'étude de la dynamique de l'actine et, en particulier la compréhension du rôle des produits des régulateurs majeurs, la PI3K et la PI-PLC, et de leurs interactions avec les différents composants du cytosquelette nous éclairera sur les mécanismes de formation des macropinosomes et la régulation de la macropinocytose.

Les petites GTPases de la famille Rho intègrent divers stimuli et orientent des réponses différenciées du cytosquelette d'actine, en modulant des régulateurs distincts de diverses protéines régulatrices de l'actine. Pour des raisons de clarté d'exposé, nous présentons d'abord ces dernières avant les Rho-GTPases pour pouvoir mieux expliquer comment les petites GTPases contrôlent ces divers régulateurs et effecteurs l'actine.

1.5. La dynamique de l'actine corticale et les protéines contrôlant sa polymérisation.

1.5.1. Fonctions générales, organisation et perturbation des microfilaments.

Le cytosquelette définit l'ensemble des réseaux protéiques structurés du cytosol. Il est composé des microtubules, des filaments intermédiaires et des microfilaments d'actine. Les microtubules et les microfilaments d'actine sont respectivement impliqués dans la génération des mouvements cellulaires à distance longue (par ex. l'ondulation des cils et des flagelles) et à distance courte (par ex. le glissement des sarcomères). Microtubules et microfilaments sont également essentiels aux trafics vésiculaires qui traversent le cytoplasme de toutes les cellules eucaryotes, respectivement pour les transferts à distance longue (par ex, le mouvement saltatoire des endosomes) ou courte (par ex. la fusion des endosomes avec les lysosomes). De fait, le cytosquelette d'actine est nécessaire à de nombreuses étapes du trafic vésiculaire, tant dans l'appareil sécrétoire (échange entre le réticulum endoplasmique rugueux et l'appareil de Golgi, exocytose) que dans l'appareil endocytaire (micropinocytose chez la

levure, macropinocytose, phagocytose, fusion entre les endosomes ou les phagosomes et les lysosomes).

L'actine, absente du monde procaryote, est l'une des protéines les plus abondantes des cellules eucaryotes. La concentration cellulaire en monomère d'actine est comprise entre 2 et 8 mg/ml, soit entre 50-200 μ M. Dans les cellules fibroblastiques qui nous intéressent, environ la moitié de l'actine est à l'état polymérisé dans les microfilaments (ou actine F, pour "filamenteuse"), et l'autre moitié est sous forme de monomères (ou actine G, pour "globulaire": 41 kDa). Les microfilaments d'actine ont de 5 à 9 nm de diamètre et sont constitués par l'enroulement en hélice de 2 chaînes d'actine polymérisée. Ces microfilaments sont flexibles et polaires. Ils présentent en effet une extrémité dite "barbelée" ou ("barbed end"), d'après l'aspect des barbes des épis de blé et une extrémité dite "pointue" (ou "pointed end"), d'après l'aspect orienté en pointe de flèche de ces microfilaments après décoration par la myosine. L'extrémité barbelée est aussi appelée extrémité (+), car la vitesse d'élongation y est rapide et l'extrémité pointue est aussi appelée extrémité (-), car la vitesse d'élongation y est faible, voire négative (dépolymérisation).

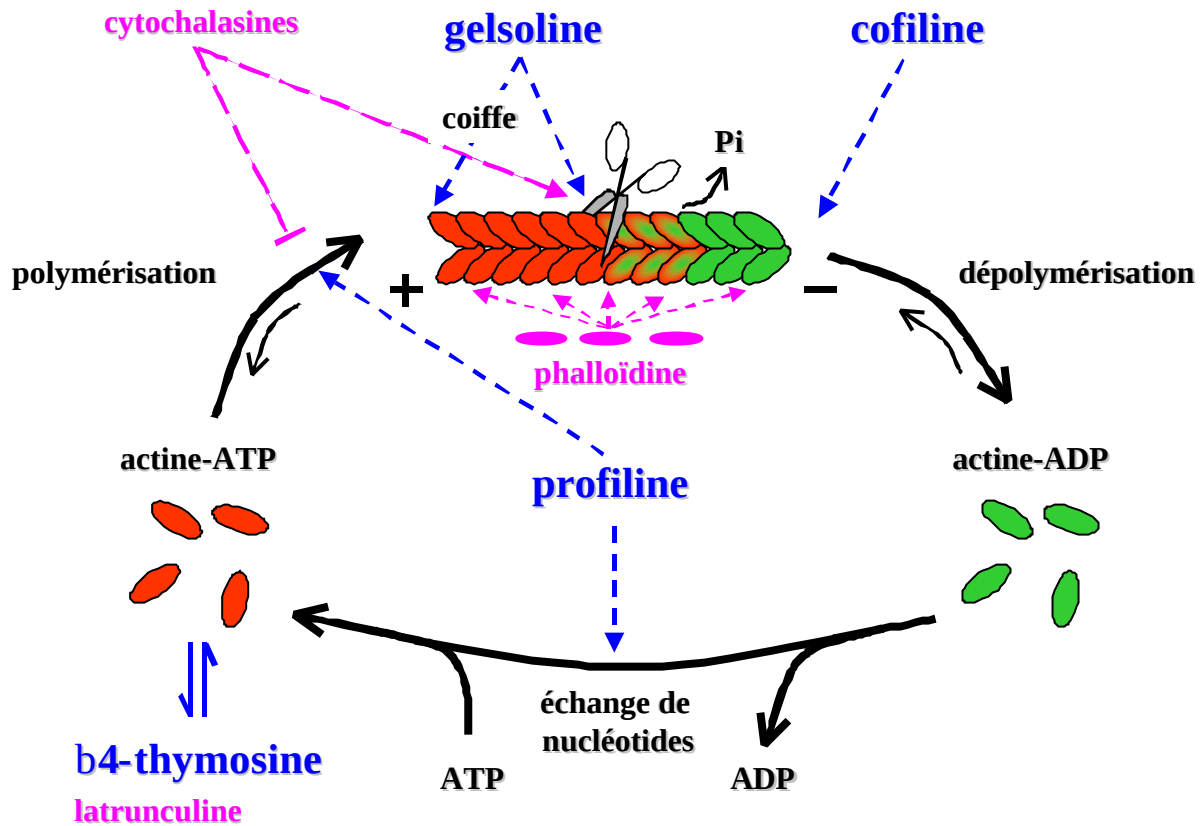
Dans les fibroblastes, le cytosquelette d'actine présente deux formes d'organisation bien distinctes dans leur localisation, leur régulation par les facteurs de croissance, et les voies de signalisation impliquées: (i) les câbles de tension (ou "stress fibers"), qui traversent la cellule et la rigidifient; et (ii) les réseaux d'actine corticale (ou cytocortex), qui animent la membrane plasmique. Au niveau du cytocortex, les filaments d'actine peuvent en outre former des protrusions, en longs faisceaux soit perpendiculaires à la membrane, les filipodes, soit en feuillettes membranaires, les lamelles participant au "ruffling". Ces deux formes d'organisation sont dynamiques et leur activité est contrôlée non seulement par la concentration en calcium, mais aussi par un grand nombre de protéines régulatrices.

Le moyen classique d'impliquer les filaments d'actine dans un processus biologique est l'emploi d'inhibiteurs spécifiques de sa polymérisation, tels que les cytochalasines et la latrunculine, ou de sa dépolymérisation comme la phalloïdine (Figure 1.11). Les cytochalasines bloquent la polymérisation de l'actine en se fixant à l'extrémité en croissance rapide des microfilaments (+, "barbed end"), ce qui prévient l'ajout de nouveaux monomères d'actine G (Yahara *et al.*, 1982). De plus, certaines cytochalasines peuvent provoquer la coupure des microfilaments (Urbanik et Ware, 1989). Ces deux propriétés rapprochent les cytochalasines des gelsolines. La latrunculine séquestre l'actine G, comme le fait la β 4-thymosine (Coue *et al.*, 1987; Weber *et al.*, 1992 ; Spector *et al.*, 1999). La phalloïdine se fixe

le long des microfilaments d'actine en formant un complexe stable avec l'actine-ADP/Pi, ce qui inhibe la libération du phosphate, prévient la dissociation de l'actine G à l'extrémité (-), et stabilise ainsi les microfilaments en inhibant leur dépolymérisation.

Dans des cellules fixées et perméabilisées, on peut aussi utiliser la phalloïdine couplée à un fluorochrome pour mettre en évidence l'actine F par la microscopie à fluorescence. Dans les fibroblastes Rat-1 contrôles, où la macropinocytose est un phénomène exceptionnel, l'examen en microscopie confocale après marquage des cellules par la phalloïdine-rhodamine montre essentiellement des câbles de tension bien individualisés, souvent colinéaires entre cellules voisines dans le prolongement l'une de l'autre. En revanche, la transformation des cellules par les oncogènes v-Src et K-Ras, qui entraînent une macropinocytose constitutive, s'accompagne de la disparition de ces câbles de tension et d'un recrutement marqué vers l'actine corticale, concomitant à l'apparition du "ruffling" membranaire (comme démontré dans la section 2.2).

Figure 1.11. Le cycle de polymérisation/dépolymérisation de l'actine, sa régulation et ses perturbations.



Cette figure distingue les trois états de l'actine: l'actine-ATP (rouge), le complexe actine-ADP/Pi (bariolé rouge et vert) et l'actine-ADP (vert). Par convention, on désigne comme extrémité (+), ou "barbed end", l'extrémité des microfilaments à croissance rapide; et l'extrémité (-) ou "pointed end", celle qui tend à perdre ses monomères. Les monomères d'actine sont donc continuellement ajoutés à l'extrémité (+) et relargués à l'extrémité (-), comme dans un tapis roulant. Dans les microfilaments, l'ATP est hydrolysé en ADP et Pi. C'est la dissociation du Pi qui permet aux monomères d'actine-ADP de se détacher de l'extrémité (-). Les monomères d'actine-ADP doivent être reconditionnés en actine-ATP avant de pouvoir se fixer à l'extrémité (+) du microfilament.

Plusieurs protéines régulent le cycle de polymérisation/dépolymérisation de l'actine. La **profiline** accélère l'addition à l'extrémité (+) des monomères d'actine-ATP non séquestrés par la β 4-thymosine (*vide infra*). La **gelsoline** coupe les microfilaments d'actine et coiffe l'extrémité (+) du fragment distal qu'elle produit. La dissociation à l'extrémité (-) est catalysée par la **cofiline**, qui se lie à l'actine-ADP et la décroche du microfilament. La profiline accélère également l'échange d'ADP pour l'ATP au niveau des monomères d'actine. Ceux-ci peuvent être réversiblement séquestrés par la **β 4-thymosine**, qui inhibe donc la polymérisation.

Le cycle de polymérisation/dépolymérisation peut aussi être inhibé par trois types de poisons. Les **cytochalasines** coiffent l'extrémité (+) des microfilaments, ce qui empêche l'ajout de monomères, tandis que la **phalloïdine** se fixe le long des microfilaments, les stabilisent et empêche ainsi leur dépolymérisation. La **latrunculine** séquestre l'actine-ATP comme le fait la β 4-thymosine. (Modifié d'après Pollard, Guidebook to the cytoskeleton and motor proteins, Oxford University Press, 1999).

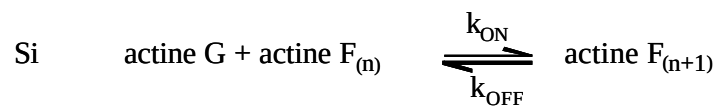
1.5.2. Les protéines régulatrices de la dynamique de l'actine corticale.

1.5.2.1. Dynamique et actine corticale.

Plusieurs protéines se liant à l'actine agissent de façon coordonnée pour organiser la dynamique de l'actine au niveau du cytocortex, et animer ainsi les mouvements de la surface cellulaire, tels que le "ruffling", la macropinocytose, la phagocytose et la motilité cellulaire. La dynamique du remodelage du cytocortex est le résultat de deux phénomènes concomitants opposés: (i) l'organisation des microfilaments par l'addition de monomères d'actine et la ramification des filaments; et (ii) la destruction de ces réseaux par dépolymérisation et coupure.

La polymérisation de l'actine peut s'opérer de trois manières: la création de microfilaments *de novo* ou nucléation, la croissance linéaire de microfilaments préexistants ou élongation, et leur extension dendritique ou ramification. Trois mécanismes peuvent accélérer le recrutement de l'actine corticale: (i) la création de nouveaux sites de nucléation; (ii) la génération de nouvelles extrémités (+) à polymérisation rapide par la coupure de filaments existants; et (iii) le démasquage des extrémités (+) existantes. Ces deux derniers mécanismes sont interdépendants.

Du point de vue thermodynamique, les microfilaments d'actine s'allongent lorsque la concentration critique est dépassée, cette concentration pouvant être modulée par diverses protéines régulatrices. La concentration critique (C_c) définit la concentration en monomères d'actine pour laquelle la vitesse de son association à l'extrémité (+) est égale à la vitesse de sa dissociation à l'extrémité (-). Elle correspond donc à la situation d'équilibre dynamique des microfilaments d'actine.



$$\text{alors, } V_{\text{ON}} = k_{\text{ON}} \times [\text{actine G}] \times [\text{actine F}_{(n)}]$$

$$V_{\text{OFF}} = k_{\text{OFF}} \times [\text{actine F}_{(n+1)}]$$

$$\text{A l'équilibre,} \quad V_{\text{ON}} = V_{\text{OFF}}$$

$$\text{alors,} \quad k_{\text{ON}} \times [\text{actine G}_{\text{equ}}] \times [\text{actine F}_{(n)}] = k_{\text{OFF}} \times [\text{actine F}_{(n+1)}]$$

et, en simplifiant, puisque $[\text{actine F}_{(n)}] = [\text{actine F}_{(n+1)}]$, tous deux représentant la même structure de polymérisation : $k_{\text{ON}} \times [\text{actine G}_{\text{equ}}] = k_{\text{OFF}}$,

$$\text{c-à-d } [\text{actine G}_{\text{equ}}] = C_c = k_{\text{OFF}}/k_{\text{ON}}$$

où k_{OFF} = constante de vitesse de dissociation, exprimée en s^{-1} ,

et k_{ON} = constante de vitesse d'association, exprimée en $\text{s}^{-1} \times \text{M}^{-1}$.

La concentration critique peut donc être diminuée, soit par l'augmentation de l'affinité des monomères et donc de la vitesse d'association à l'extrémité (+) du microfilament (c'est le cas de la profiline), soit par le ralentissement de la vitesse de dissociation à l'extrémité (-) du microfilament (c'est le cas de la phalloïdine).

Nous présenterons d'abord les protéines qui accélèrent l'addition de monomères d'actine et favorisent l'élongation des microfilaments, comme la profiline, ou leur ramification, comme le complexe Arp2/3. Ensuite, nous discuterons les protéines qui entraînent la désorganisation du cytocortex en coupant les microfilaments, comme la gelsoline, ou en accélérant leur dépolymérisation, comme la cofiline.

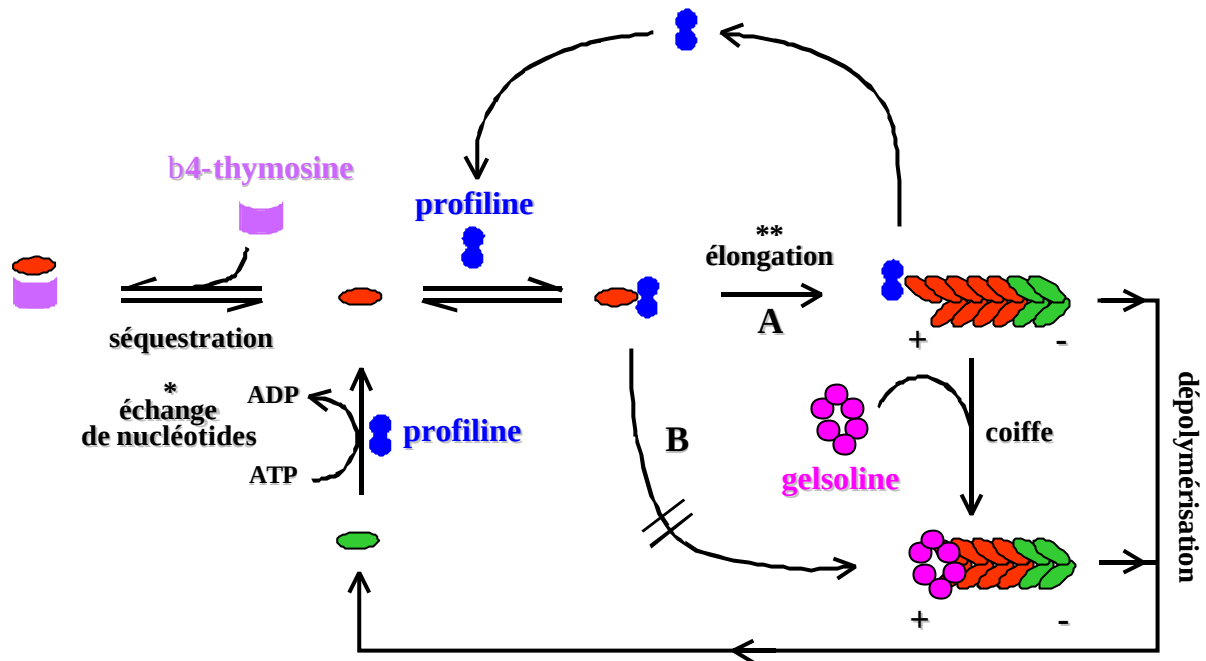
1.5.2.2. Les protéines de polymérisation des microfilaments.

1.5.2.2.1. La profiline.

La profiline est une protéine globulaire ubiquiste d'environ 15 kDa, très soluble dans le cytoplasme (jusqu'à une concentration de 80 μ M). On lui connaît trois fonctions. Premièrement, la profiline se lie aux monomères d'actine dont elle accélère l'échange de nucléotides en diminuant d'environ 1000 fois l'affinité pour l'ADP, ce qui a permis de la comparer aux facteurs d'échange des GTPases (Figure 1.12). Indirectement, lorsque les extrémités (+) des microfilaments sont coiffées par la gelsoline, la profiline favorise donc la séquestration des monomères libres d'actine-ATP par la β 4-thymosine (* sur Fig 1.12). Deuxièmement, lorsque les extrémités (+) des microfilaments sont libres, leur affinité pour l'actine G-ATP couplée à la profiline est décuplée, ce qui favorise l'élongation en diminuant la concentration critique de 10 fois (** sur Fig 1.12). Dans ce cas, la profiline joue le rôle de transporteur d'actine G, déplacée du réservoir de séquestration actine/ β 4-thymosine vers l'extrémité (+) du microfilament. La profiline se dissocie ensuite facilement du monomère d'actine après sa polymérisation (Figure 1.12). Troisièmement, la profiline interagit aussi avec le complexe Arp2/3 (*vide infra*), ce qui favorise la ramification.

L'interaction de la profiline avec les phospho-inositides D3 ou D4, non seulement la recrute à la membrane plasmique mais stimule en outre son activité d'échange ADP/ATP: on peut conclure que ce double mécanisme doit accélérer l'élongation et la ramification des microfilaments du cytocortex. La profiline, qui est activée par Src et par Ras autant que par les facteurs de croissance via la PI3K, occupe donc une fonction importante dans la signalisation vers le cytocortex d'actine.

Figure 1.12. Rôle de la profiline dans la dynamique de l'actine.



La profiline accélère la réaction d'échange d'ADP pour l'ATP, ce qui augmente le contingent des monomères d'actine compétents pour la polymérisation. Le sort des monomères d'actine-ATP dépend de la disponibilité des extrémités (+) des microfilaments. Si ces extrémités sont libres (A), la profiline joue le rôle de transporteur des monomères d'actine-ATP vers ces extrémités et accélère l'élongation. Si les extrémités (+) sont coiffées par la gelsoline (B), l'ajout de monomère à cette extrémité est impossible, et les monomères d'actine-ATP sont rapidement séquestrés par la $\beta 4$ -thymosine. (Modifié d'après http://zk.bwh.harvard.edu/projects/actin_dynamics/actin_dynamics.html).

1.5.2.2.2. Le complexe Arp2/3.

Le complexe ubiquiste Arp2/3 est composé de sept sous-unités, chacune présente en une seule copie: les deux protéines liant l'actine Arp2 et Arp3 (pour "Actin-related protein") et cinq protéines associées (p40, p34, p21, p20 et p16; Figure 1.13.A). La fixation latérale du complexe Arp2/3 sur les microfilaments d'actine génère des embranchements, ce qui induit une ramification dendritique avec une angulation caractéristique de 70 degrés. En outre, ce complexe peut lier la profiline, ce qui accélère l'élongation de ces embranchements. L'activité du complexe Arp2/3 est stimulée par les membres de la famille de protéines WASp/Scar.

La famille des WASp/Scar est impliquée dans la régulation du cytosquelette. On lui connaît 5 membres. Le membre fondateur est la protéine WASp (pour Wiskott-Aldrich Sndrome protein). Son expression est restreinte aux cellules hématopoïétiques humaines, et elle est mutée dans le syndrome de Wiskott-Aldrich, une maladie liée au chromosome X

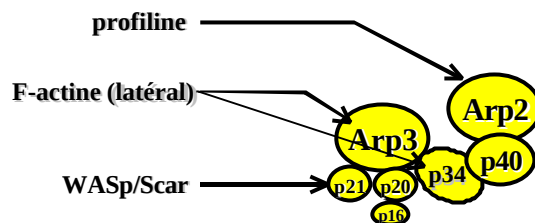
caractérisée par un déficit des plaquettes sanguines et des lymphocytes. Il existe deux homologues ubiquistes de WASp: N-WASp et Scar1 (ou WAVE pour "WASp-like Verproline-homologous protein"), ainsi que la protéine Scar de *Dictyostelium discoideum* et la protéine Las17p/Bee1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

La protéine WASp contient une multitude de domaines d'interaction avec des protéines-cibles (Figure 1.13.B). Elle s'associe (i) par son extrémité N-terminale aux phosphoinositides D3; (ii) par sa partie centrale à diverses protéines-cibles comme les petites GTPases Cdc42 ou Rac (via le domaine CRIB), les protéines Src-kinases et la profiline (via le domaine polyproline); et (iii) par son extrémité C-terminale aux monomères d'actine et au complexe Arp2/3 (Figure 1.13.C). Les membres de la famille WASp/Scar sont donc recrutés à la membrane par les phosphoinositides D3 et stimulent à leur tour la formation de nouveaux filaments d'actine et surtout leur ramification, en y recrutant puis en activant le complexe Arp2/3 (Belisle et Abo, 2000).

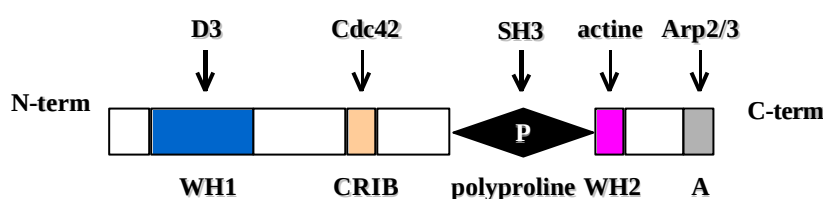
Le complexe Arp2/3-WASp/Scar possède donc les propriétés attendues d'un régulateur de l'actine réticulée, qui est abondante dans les extensions lamellaires du cytocortex, plutôt que de l'actine fasciculée, organisation constitutive des câbles de tension transcellulaires. Ce complexe est en effet concentré dans les zones de "ruffling" (Figure 1.14), ce qui suggère un rôle dans la formation de ces protrusions (Svitkina *et al.*, 1997; Welch *et al.*, 1998). Puisque les produits de la PI3K sont aussi concentrés à ce niveau (Rickert *et al.*, 2000), on peut comprendre que le recrutement de WASp/Scar sur les phospho-inositides se fasse préférentiellement à cet endroit, et participe dès lors à l'extension des lamellipodes en y activant le complexe Arp2/3.

Figure 1.13. Organisation du complexe Arp2/3, de ses activateurs WASp/Scar et leurs interactions avec les filaments d'actine et leurs protéines-cibles.

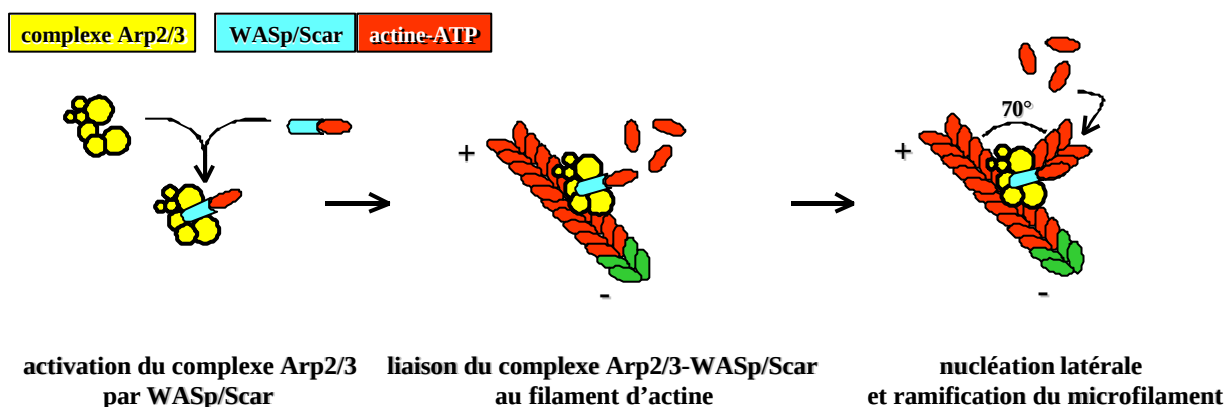
A. Interactions au sein du complexe Arp2/3 et avec ses partenaires.



B. Structure multimodulaire de la protéine WASp en relation avec ses partenaires.

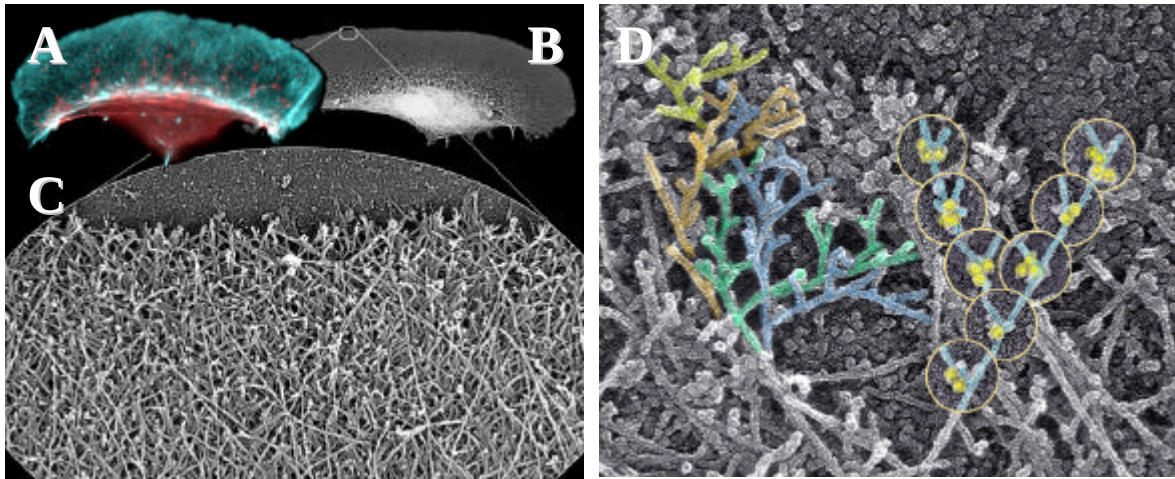


C. Rôle du complexe Arp2/3 et de WASp/Scar dans la ramification dendritique.



A. Interactions entre les différents constituants du complexe Arp2/3 et avec leurs protéines effectrices. **B.** Structure multimodulaire et interactions de la protéine WASp humaine. A partir de l'extrémité N-terminale, on distingue successivement (i) le domaine WH1 (pour "WASP homology 1"), qui présente une structure secondaire proche de celle des domaines PH et interagit avec le PtdIns 3,4,5P3 (D3); (ii) le domaine CRIB (pour "Cdc42/Rac Interactive Binding"), qui reconnaît spécifiquement les protéines Rac et Cdc42; (iii) le domaine polyproline (riche en résidus prolines rassemblées en 4 à 9 petits groupes, représenté par le losange P), qui lie les domaines SH3; (iv) le domaine WH2 (WASP Homology 2) proche de l'extrémité C-terminale, qui est responsable de l'interaction avec l'actine; (v) le domaine A (riche en résidus acides), qui interagit avec le complexe Arp2/3. Ces divers domaines peuvent donc recruter WASp/Scar à la membrane. **C.** Modèle hypothétique de l'activation du complexe Arp2/3 par son association à WASp/Scar, favorisant la fixation latérale du complexe sur le microfilament. Le résultat final est la ramification dendritique de filaments préexistants sous la membrane plasmique. (Modifié d'après Svitkina et Borisy, 1999; et Pollard *et al.*, 2001).

Figure 1.14. Organisation du cytosquelette des kératocytes d'épiderme de poisson, montrée par la microscopie à fluorescence et électronique.



En **A**, double marquage en fluorescence d'une cellule spécialisée qui montre un lamellipode géant à son front de migration; l'actine est en bleu et la myosine II est en rouge. En **B**, image en microscopie électronique d'une cellule semblable. En **C**, l'image agrandie de B au niveau du lamellipode montre un réseau dense de microfilaments d'actine ramifiés. En **D**, un très fort grossissement révèle le détail de la ramification dendritique, mise en évidence par diverses pseudo-couleurs, et souligne la localisation du complexe Arp2/3 au niveau des embranchements, en jaune. (Repris de la couverture du J. Cell Biol. 139:397-415, 2000 et <http://www.borisylab.nwu.edu/pages/supplemental/kerat.html#images>).

1.5.2.3. Les protéines de fragmentation et de dépolymérisation des microfilaments.

1.5.2.3.1. Les deux familles de protéines de fragmentation et de dépolymérisation.

Une première famille, celle des gelsolines, comprend plusieurs protéines d'environ 84 kDa, dont les principaux représentants sont la gelsoline, la villine et l'adséverine. La gelsoline est largement distribuée et principalement localisée dans le cytoplasme des cellules au repos; la villine est concentrée dans les microvillosités des cellules épithéliales; l'adséverine est surtout abondante dans les cellules sécrétoires. Ces protéines, composées de six domaines homologues, sont spécialisées dans la coiffe, la fragmentation et la nucléation (Figure 1.15). Leur interaction avec l'actine requiert une augmentation locale de la concentration cytosolique en calcium libre qui doit dépasser 10^{-6} M. Ceci peut-être obtenu par l'activation de la PLC, qui produit l'IP3 responsable de la libération du calcium à partir du réticulum endoplasmique. A ces membres de la famille des gelsolines s'ajoutent des protéines constituées de seulement trois domaines (par ex. CapG, aussi connue sous le nom de gCap39, et CapZ), ayant seulement une fonction de coiffe mais non de fragmentation.

Une deuxième famille, dont les prototypes sont l'ADF et la cofiline, est constituée de petites protéines d'environ 21 kDa, qui possèdent une structure tridimensionnelle analogue aux deux premiers domaines de la gelsoline, à savoir les domaines 1 et 2 qui sont capables de se lier à l'extrémité (+) et sur le côté des microfilaments, ainsi qu'aux phospho-inositides D3. La gelsoline et la cofiline entrent d'ailleurs en compétition pour leur fixation sur les filaments d'actine (Van Troys *et al.*, 1997).

1.5.2.3.2. La gelsoline.

La gelsoline, une protéine ubiquiste, doit son nom à sa propriété de pouvoir cliver à elle seule l'actine F, et de convertir ainsi en cuvette un gel acellulaire en sol. La fonction de la gelsoline est régulée par l'interaction intramoléculaire entre ses parties N- et C-terminales. En présence d'une concentration faible en calcium, les deux domaines sont rapprochés, ce qui masque les sites de reconnaissance pour l'actine. En revanche, une élévation de la concentration en calcium induit un changement de conformation qui ouvre la jonction entre les parties N- et C-terminales, chaque moitié pouvant alors lier l'actine de façon indépendante (Burtnick *et al.*, 1997). La gelsoline ainsi activée coupe les microfilaments d'actine et coiffe les extrémités (+) nouvellement exposées des fragments distaux, ce qui augmente le nombre de microfilaments et en diminue la taille (Figure 1.16. 2A et 2B).

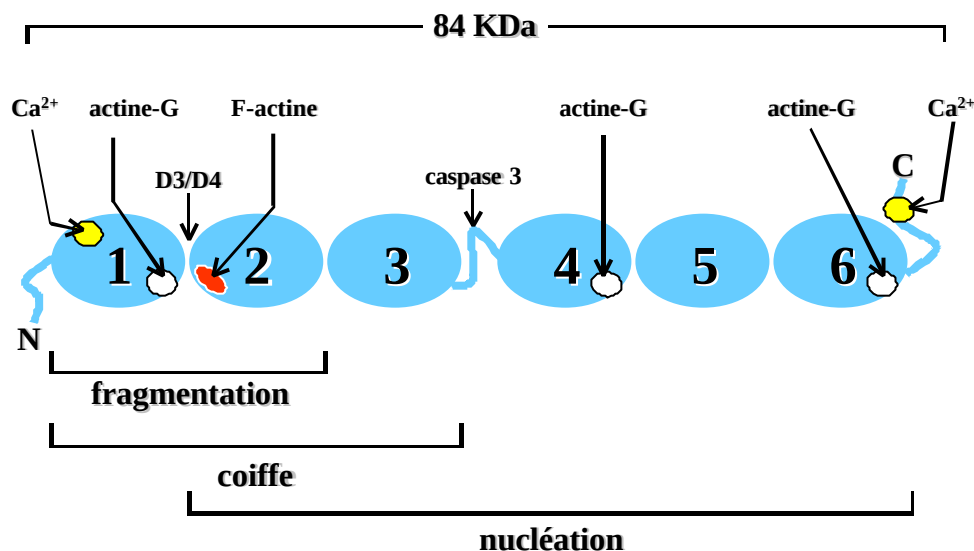
Toutefois, en réponse à des stimuli extracellulaires, la cellule synthétise des phospho-inositides D3 ou D4 qui inhibent et/ou séquestrent la gelsoline, ce qui décoiffe les microfilaments d'actine ("uncapping"). La libération de ces nouvelles extrémités (+) permet leur élongation. La gelsoline peut aussi lier les monomères et les oligomères d'actine, et créer ainsi de nouveaux sites de nucléation.

La surexpression de la gelsoline induite par un inhibiteur de l'activité tyrosine-kinase des membres de la famille Src, ou une mutation ponctuelle qui augmente sa liaison aux phospho-inositides, abroge la transformation cellulaire induite par les oncogènes v-Src et Ha-Ras (de Arruda *et al.*, 1992 ; Kwon *et al.*, 1997). Ceci suggère fortement l'implication de la gelsoline en aval de ces oncogènes. L'inactivation de la gelsoline chez les fibroblastes de souris "knock-out" pour la gelsoline ($Gsn^{-/-}$) ralentit la motilité cellulaire, le "ruffling" membranaire et l'endocytose fluide, et s'accompagne d'une surexpression de cinq fois de la protéine Rac. La surexpression stable de la gelsoline dans les fibroblastes $Gsn^{-/-}$ reverse la surexpression de Rac et restaure un phénotype normal (Azuma *et al.*, 1998). Toutefois, les cellules dendritiques de souris $Gsn^{-/-}$ montrent un "ruffling" membranaire et une activité de macropinocytose comparable à celle des cellules contrôles, et elles présentent normalement

leurs antigènes aux complexes majeurs d'histocompatibilité des classes I et II (West *et al.*, 1999). La discordance entre les effets de l'absence de la gelsoline sur les deux types cellulaires n'est pas expliquée.

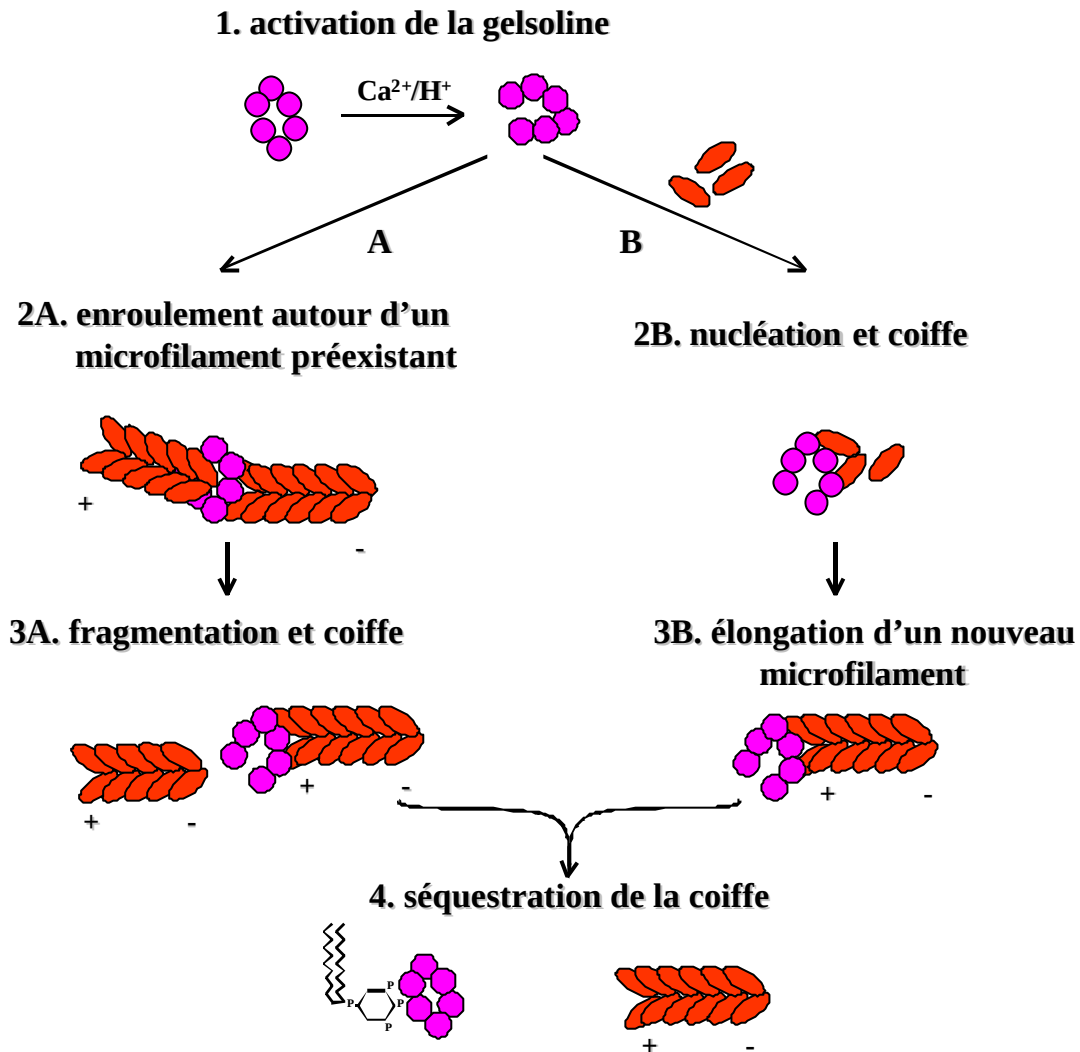
On a donc pu suggérer que la gelsoline est en aval de Rac dans la voie de signalisation des facteurs de croissance vers l'actine, et que la surexpression de Rac en l'absence de la gelsoline pourrait assurer une sorte de compensation de la cellule pour animer le cytocortex. D'autre part, le fonctionnement normal des cellules dendritiques *Gsn*^{-/-} suggère soit que les voies de signalisation puissent changer d'un type cellulaire à l'autre, soit que le niveau d'expression de la cofiline dans ces cellules est suffisant pour permettre le "ruffling" en absence de la gelsoline.

Figure 1.15. Les domaines fonctionnels de la gelsoline et l'interaction avec ses partenaires.



Ce schéma montre les domaines associés aux trois fonctions connues de la gelsoline : coiffe, fragmentation et nucléation. L'activité de coiffe est assurée par les domaines 1, 2 et 3. L'activité de fragmentation est due aux domaines 1 et 2, alors que l'activité de nucléation est liée aux domaines 2 à 6. Deux sites de liaison du calcium sont identifiés sur la gelsoline : le premier au niveau du premier domaine et le second à l'extrémité C-terminale de la protéine. Le deuxième domaine de la gelsoline fixe les microfilaments ; ce site de liaison chevauche celui permettant l'interaction avec les phospho-inositides D3 et D4, qui est compris entre les domaines 1 et 2. L'affinité de la gelsoline pour les phospho-inositides est supérieure à celle des microfilaments, ce qui explique la capacité des phospho-inositides de décrocher la gelsoline des microfilaments ("uncapping"). Les domaines 1, 4 et 6 peuvent chacun fixer un monomère d'actine. La caspase 3, une protéase impliquée dans l'exécution de l'apoptose, coupe la gelsoline au niveau de la charnière comprise entre les domaines 3 et 4. Ce clivage génère une gelsoline tronquée dont l'activité devient indépendante du calcium, et qui est responsable de la destruction complète du cytosquelette d'actine pendant l'apoptose. (Repris de http://zk.bwh.harvard.edu/projects/severing_capping/index.html).

Figure 1.16. Modèle d'interaction de la gelsoline avec l'actine.



Ce schéma souligne le rôle central de la gelsoline dans la réorganisation de l'actine. A faible concentration en Ca^{2+} (cellule au repos), la gelsoline se présente comme un anneau fermé et est inactive. Quand la concentration intracellulaire en Ca^{2+} atteint le micromolaire, ou à un $\text{pH} < 6,5$, la gelsoline s'ouvre et devient active. Elle peut en effet s'enrouler autour d'un microfilament d'actine qu'elle coupe, et dont elle coiffe l'extrémité (+) du fragment distal (ce qui est schématisé en A). La gelsoline se lie aussi aux monomères d'actine et peut initier la nucléation de microfilaments qui s'allongent lentement à partir de leur extrémité (-) (ce qui est schématisé en B). Une production locale de phosphoinositides D3 et D4 décroche la gelsoline des microfilaments d'actine, et la recrute à la membrane. (Modifié d'après Kwiatkowski, 1999).

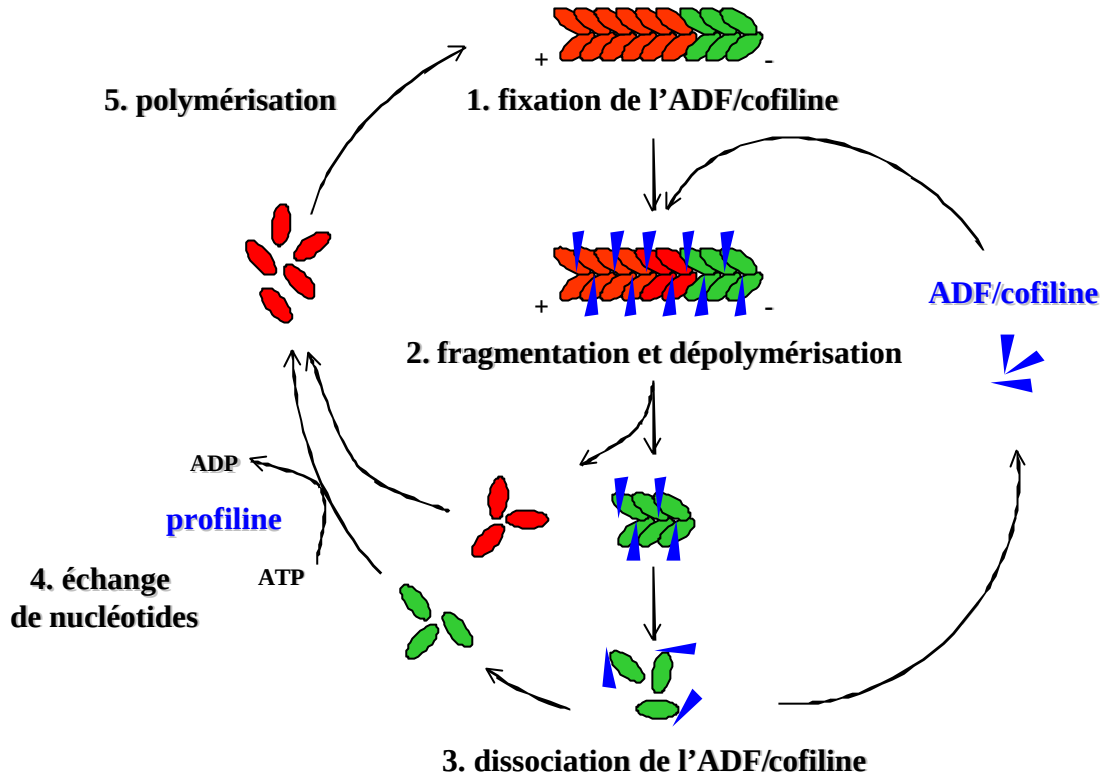
1.5.2.3.3. L'ADF/cofiline.

Cette famille comprend deux isoformes: l'ADF (pour "Actin Depolymerizing Factor") et la cofiline, généralement associées en complexe. Dans les cellules au repos, l'ADF/cofiline est localisée de manière diffuse dans le cytosol. En réponse à une stimulation, l'ADF/cofiline se déplace vers le cytocortex associé aux zones de "ruffling" membranaire. L'ADF/cofiline favorise la libération du phosphate du complexe actine-ADP/Pi incorporé dans les microfilaments, ce qui accélère la dissociation de l'actine-ADP à partir de l'extrémité (-), et accroît le contingent des monomères d'actine-ADP (Figure 1.17). En outre, l'ADF/cofiline liée aux microfilaments peut les fragmenter, comme le fait la gelsoline, générant ainsi de nouvelles extrémités (+) et (-). L'activité de dépolymérisation de l'ADF/cofiline est inhibée, soit par sa liaison aux phospho-inositides, soit par la phosphorylation de son résidu sérine en position 3 par la LIM kinase-1, elle-même activée par Rac et les PKCs. Chez *Dictyostelium discoideum*, la surexpression de la cofiline accélère le mouvement cellulaire et la formation du "ruffling" membranaire. Chez la levure, cette protéine est surtout localisée au niveau des invaginations de la membrane plasmique. Elle jouerait un rôle dans la régulation osmotique en contrôlant l'endocytose fluide (Lappalainen et Drubin, 1997 ; Bamburg, 1999).

1.5.2.4. Les protéines de réticulation.

Les protéines de réticulation ont pour fonction de réunir les filaments d'actine en un réseau organisé, soit sous forme de faisceaux parallèles orientés dans la même polarité et étroitement serrés (10-20 nm), comme dans les filipodes, soit en faisceaux de filaments de polarité opposée et plus espacés (30-60 nm), comme dans les fibres de tension contractiles, soit encore en réseaux lâches, basés sur des interconnexions, principalement au niveau du cortex cellulaire non différencié. Parmi les protéines de réticulation, on retrouve la filamine, l' α -actinine, la cortactine et les MARCKSs (pour "Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrates").

Figure 1.17. Les trois effets de l'ADF/cofiline favorisant la dépolymérisation de l'actine.



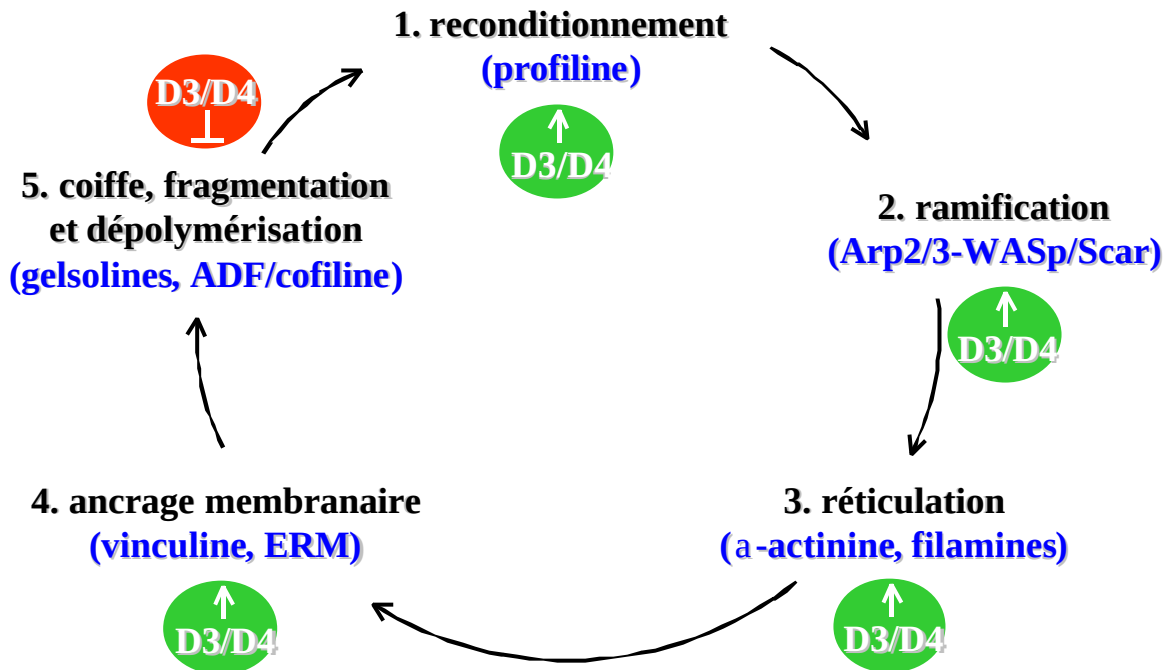
Ce schéma résume les rôles de l'ADF/cofiline. Celle-ci se lie de manière coopérative à certains microfilaments d'actine, ce qui définit deux populations de microfilaments, selon qu'ils sont décorés par l'ADF/cofiline (donneurs de monomères) ou non (filaments nus, accepteurs de monomères). La stabilité et la dynamique de ces deux populations sont très différentes: un filament donneur se dépolymérise 30 fois plus rapidement à son l'extrémité (-) qu'un filament accepteur. L'ADF/cofiline provoque la fragmentation puis la dépolymérisation des microfilaments d'actine, tant dans la partie composée d'actine-ADP que d'actine-ATP. L'actine-ATP peut alors être directement réutilisée sans reconditionnement. Par ailleurs, l'ADF/cofiline lie des monomères d'actine-ADP dont elle inhibe la réaction d'échange de nucléotides, catalysée par la profiline, et les séquestre sous forme de complexe ADF/cofiline-actine-ADP. (Modifié d'après Carlier *et al.*, 1999).

1.5.3. Rôles complémentaires du Ca^{2+} et des phospho-inositides dans le contrôle de la dynamique de l'actine corticale.

Outre les Rho-GTPases, les effets coordonnés du calcium et des phospho-inositides contrôlent la dynamique du cytosquelette d'actine. Suite à l'activation de la PLC par des stimuli extérieurs, le clivage du PtdIns 4,5P2 génère deux seconds messagers, l'IP3 et le DAG. L'IP3 libéré dans le cytosol provoque la libération du calcium à partir du réticulum endoplasmique, ce qui entraîne une augmentation rapide de la concentration cytosolique en calcium. Le calcium active les protéines de la famille de gelsoline, qui scindent les filaments d'actine et/ou coiffent les extrémités (+) libres. Toutefois, la stimulation de la gelsoline est brève, puisque l'élévation de la concentration du calcium n'est que transitoire. Après le retrait de la gelsoline, les multiples fragments engendrés par celle-ci pourront servir d'amorce à l'élongation d'un réseau de microfilaments d'une complexité croissante. D'autre part, la libération du DAG active plusieurs isoformes de PKCs, dépendantes ou non du calcium, ce qui active plusieurs voies de signalisation, y compris celles qui aboutissent à un remodelage du cytosquelette (Way *et al.*, 2000).

De leur côté, les phospho-inositides produits par la PI3K favorisent en général l'assemblage des filaments d'actine et leur réticulation au niveau du cytocortex, par le recrutement à la membrane plasmique d'une multitude de protéines telles que les protéines de nucléation et de ramification (par ex. le complexe Arp2/3), les protéines de coiffe et de fragmentation (par ex. la famille de gelsolines) et les protéines de dépolymérisation. On comprend aisément que le décoiffage des extrémités des microfilaments d'actine favorise la formation des lamellipodes, par coopération entre l'élongation accélérée par la profiline et la ramification assurée par le complexe Arp2/3. Par ailleurs, la synthèse de phospho-inositides prévient la dépolymérisation de l'actine, par l'inhibition de l'activité de la famille des gelsolines et de l'ADF/cofiline (Figures 1.17 et 1.18).

Figure 1.18. Effet coordonné des phospho-inositides sur les propriétés des protéines régulatrices du cytosquelette d'actine.



Les phospho-inositides D3 et D4 neutralisent par séquestration plusieurs protéines qui pourraient désorganiser le cytosquelette d'actine (cercle rouge). Ils libèrent ainsi les microfilaments des protéines à fonction unique de coiffe (CapZ et CapG), des protéines de coiffe et de fragmentation (gelsoline, adséverine et villine), et des protéines de fragmentation et de dépolymérisation (ADF/cofiline). Au contraire, ces phospho-inositides favorisent la polymérisation de l'actine (cercles verts) en stimulant la réaction d'échange de nucléotides catalysée par la profiline (par interaction directe avec celle-ci), ainsi que la nucléation et la ramification assurée par le complexe Arp2/3 (par interaction directe avec leur stimulateur WASp/Scar). Le cytosquelette d'actine est enfin réticulé par l'α-actinine et les filamines et attaché à la membrane par un ensemble de protéines d'ancrage comme la vinculine et la famille ERM (pour Ezrine, Radixine, et Moésine). Ces facteurs d'ancrage sont aussi recrutés sur la membrane plasmique par les phospho-inositides D3 et D4. (Schéma créé d'après <http://zkc.bwh.harvard.edu/projects/signaling/index.html>).

1.6. Les Rho-GTPases.

1.6.1. Introduction.

La superfamille des petites GTPases (monomériques) comprend chez les mammifères plus de 80 membres, regroupés en six familles: Ras, Rho, Rab, Ran, Rad et Arf. Parmi celles-ci, les Rho-GTPases interviennent dans de multiples propriétés telles que la morphologie cellulaire générale; la pinocytose, la phagocytose et la motilité cellulaire; la régulation de la transcription des gènes par JNK ("c-Jun N-terminal kinase") et la progression dans le cycle cellulaire (relais de Ras). On distingue quinze membres des Rho-GTPases chez les mammifères: Rho (A, B et C), Rac (1, 2 et 3), Cdc42 (Cdc42Hs et G25K), Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7, Rnd3/RhoE, RhoD, RhoG, TC10 et TTF (Kjøller et Hall, 1999 ; Bishop et Hall, 2000). Ces protéines sont de taille comparable (entre 190 et 195 acides aminés) et de structure similaire (40-95 % d'identité).

Les petites protéines G de la famille Rho coordonnent l'organisation dynamique du cytosquelette d'actine. A l'état activé, Cdc42 induit la formation des filipodes, Rac augmente la polymérisation ramifiée de l'actine entraînant la formation de protrusions lamellaires ("ruffling" membranaire, formation de macropinosomes et de phagosomes) et Rho induit l'assemblage des fibres intracellulaires déjà polymérisées en câbles de tension, qui permettent à la cellule d'exercer les forces de traction nécessaires à sa migration.

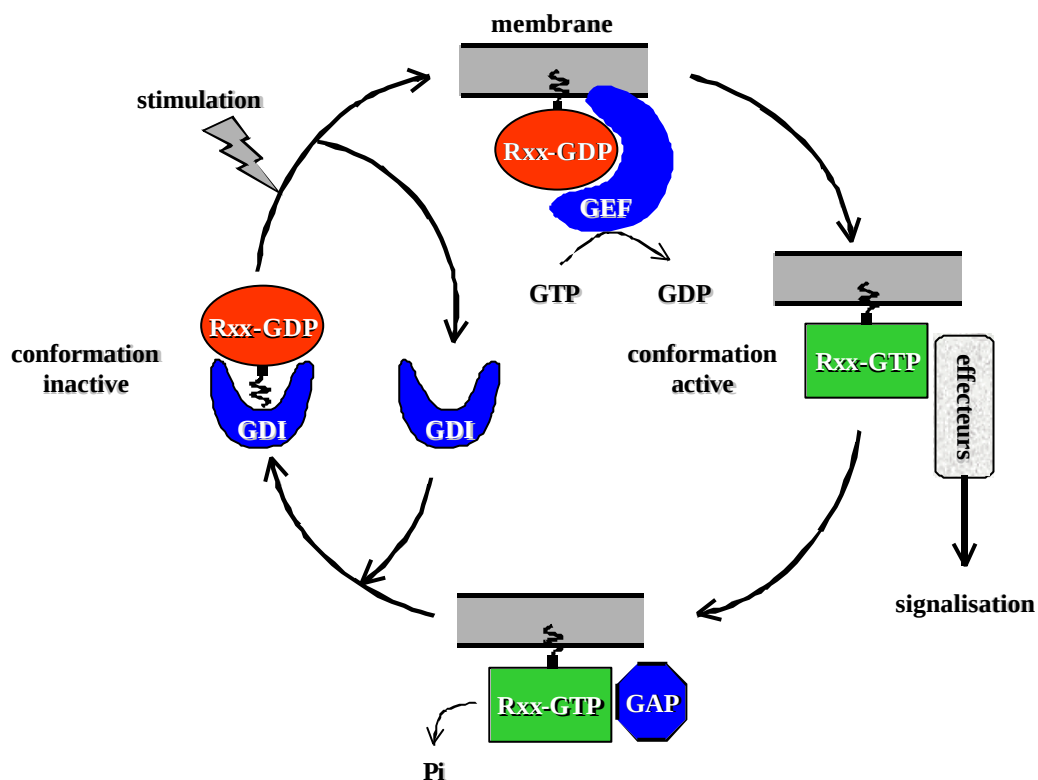
1.6.2. Régulation des Rho-GTPases.

1.6.2.1. Cycle d'activation/inactivation des Rho-GTPases.

Comme toutes les petites GTPases, les Rho-GTPases présentent deux conformations: l'une active, liée au GTP, et l'autre inactive, liée au GDP. L'activité des Rho-GTPases est modulée par trois classes de régulateurs: les GEFs ("Guanine nucleotide Exchange Factors"), qui les activent en accélérant la réaction d'échange de leur GDP pour du GTP, les GAPs ("GTPases Activating Proteins"), qui inhibent leur fonction cellulaire en activant leur propriété intrinsèque de GTPase naturellement lente, et les GDIs ("Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors"), qui les maintiennent à l'état inactif en inhibant la dissociation de leur GDP catalysée par les GEFs (Figure 1.20). La fonction des Rho-GTPases dans la cellule nécessite leur insertion dans le feuillet interne de la membrane plasmique par une ancre

lipidique (généralement géranylgeranyle pour Rho, Rac et Cdc42), attachée de manière covalente près de leur extrémité C-terminale. Un moyen classique d'impliquer une Rho-GTPase particulière dans un processus cellulaire est l'analyse de transfectants surexprimant soit une forme constitutivement inactive (par ex. la substitution chez Rac de Ser¹⁷ par Asn¹⁷, qui abolit la liaison du GTP): on parle de "dominants-négatifs"; soit une forme constitutivement active (par ex. la substitution chez Rac de Gly¹² par Val¹², qui abolit son activité GTPase intrinsèque): on parle de "dominants-positifs".

Figure 1.20. Le cycle d'activation/inactivation des Rho-GTPases.



Ce schéma montre les interactions des membres de la famille des Rho-GTPases (symbolisées par Rxx) avec leurs régulateurs. Dans une cellule au repos, Rxx est séquestrée dans le cytosol par le GDI qui reconnaît spécifiquement le groupement isoprényle de la forme inactive liée au GDP (Rxx-GDP). Lors d'une stimulation, GDI se décroche de Rxx-GDP, qui peut dès lors s'ancrer à la membrane plasmique par son extrémité isoprénylée, à proximité du facteur d'échange de nucléotides qui lui est propre (GEF). Le remplacement de son GDP par du GTP active Rxx (Rxx-GTP), en induisant un changement conformationnel qui favorise son association avec ses effecteurs, ce qui relaye la signalisation cellulaire. La liaison de la protéine GAP sur Rxx, qui accélère sa réaction intrinsèque d'hydrolyse du GTP en GDP, l'inactive et éteint par conséquent le signal. La protéine Rxx-GDP est ensuite piégée dans le cytosol par le GDI. (D'après Olofsson, 1999).

1.6.2.2. Les Rho-GEFs.

Les GEFs sont les activateurs de la fonction de signalisation des protéines G. Chez les mammifères, on en a identifié plus de 30, tous caractérisés par la présence d'un domaine homologue à celui de l'oncogène Dbl, appelé DH ("Dbl Homology domain"), qui catalyse la réaction d'échange GTP/GDP. Ce domaine est toujours adjacent à un domaine PH, qui peut-être recruté par des phospho-inositides au niveau de la membrane plasmique. La spécificité de cette interaction conduit parfois à des effets opposés. Ainsi, la liaison du PtdIns 4,5P2 au domaine PH de Vav, un GEF spécifique de Rac, inhibe son activité alors que la liaison du PtdIns 3,4,5P3 la stimule (Han *et al.*, 1998). En outre, la phosphorylation des GEFs **sur** une tyrosine (par ex. chez Vav), ou une thréonine (par ex. chez Tiam1), peut participer à leur activation. Le niveau d'activité des GEFs résulte donc de deux fonctions coopératives, la liaison aux phospho-inositides et leur phosphorylation (Kjøller et Hall, 1999). Enfin, on trouve chez les GEFs d'autres motifs d'interaction protéine/protéine (par ex. des domaines SH2 et SH3), qui interviennent dans leur localisation subcellulaire.

1.6.2.3. Les Rho-GDIs.

Les Rho-GDIs sont au contraire des inhibiteurs de la fonction de signalisation des protéines G. Ces facteurs encore mal connus, dont 3 membres seulement ont été décrits, s'associent préférentiellement à l'extrémité isoprénylée de la forme inactive des Rho-GTPases, et empêchent en outre la libération du GDP. Le masquage de l'ancre isoprénylée séquestre les Rho-GTPases dans le cytosol, ce qui les maintient à l'état inactif. Lors d'une stimulation par des facteurs de croissance, la dissociation des Rho-GDIs démasque l'ancre isoprénylée des Rho-GTPases encore inactives, ce qui permet leur recrutement à la membrane et leur activation par les GEFs (Scita *et al.*, 2000; Michaelson *et al.*, 2001).

1.6.2.4. Les Rho-GAPs.

Les Rho-GAPs sont également des inhibiteurs de la fonction de signalisation des protéines G. Les 16 membres connus de cette famille accélèrent l'activité GTPase intrinsèque des protéines G, ce qui raccourcit leur état actif et atténue par conséquent leur signalisation cellulaire. Certaines Rho-GAPs ont été impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et dans l'adhérence cellulaire. Dans les fibroblastes transformés par v-Src, la tyrosine-phosphorylation de la p190Rho-GAP provoque son association avec la p120Ras-GAP, complexe qui active Rho-GAP, inactive par conséquent Rho, et entraîne la disparition des câbles de tension (Fincham *et al.*, 1999; Scita *et al.*, 2000). Ce mécanisme, en relâchant la

tension sur la membrane péricellulaire, facilite sans doute la macropinocytose constitutive produite dans ces cellules par v-Src (suggéré par les résultats de notre travail).

1.6.2.5. Perversion des Rho-GTPases par des toxines bactériennes.

Le cycle d'activation/inactivation des Rho-GTPases peut être perverti à plusieurs niveaux par diverses toxines bactériennes. Certaines traversent spontanément les membranes et inhibent les Rho-GTPases par des additions covalentes qui empêchent leur activation par les GEFs. Ainsi, les C3 exo-enzymes catalysent l'ADP-ribosylation de RhoA/B/C sur l'Asn⁴¹. C'est par ce mécanisme que la C3-transférase, une toxine bactérienne produite par *Clostridium botulinum*, inhibe Rho. De même, les glycosyltransférases catalysent la O-glycosylation de Rho en Thr³⁵, et celle de Rac et de Cdc42 en Thr³⁷ (c'est le cas de la toxine B de *Clostridium difficile*, spécifique de Rac et de Cdc42). D'autres, au contraire, activent les Rho-GTPases en inhibant leur activité GTPase intrinsèque, soit par déamidation de Rho en Gln⁶³ ou de Rac et de Cdc42 en Gln⁶¹ [c'est le cas de la toxine CNF ("Cytotoxic Necrotising Factor") d'*Escherischia coli*], soit par transglutamination sur la Gln⁶³ de Rho ou sur la Gln⁶¹ de Rac et Cdc42 [par ex. la toxine DNT ("DermoNecrotic Toxin") de *Bordetella pertussis*].

D'autres toxines encore sont directement injectées par les bactéries qui les produisent dans le cytosol des cellules infectées. Ces toxines miment la fonction soit des GAPs ("GAP-like", par ex. YopE de *Yersinia pseudotuberculosis*), soit des GEFs ("GEF-like", par ex. SopE de *Salmonella typhimurium*; pour une revue, voir Lerm *et al.*, 2000). C'est le mécanisme exploité par certaines bactéries entéropathogènes pour réorganiser le cytosquelette de cellules-cibles telles que les entérocytes qui ne phagocytent normalement pas, de manière à induire leur pénétration par une sorte de macropinocytose. Cette forme inhabituelle de phagocytose ne nécessite en effet pas le mécanisme habituel de contact direct multiple, de type "fermeture-éclair", utilisé pour la capture de particules opsonisées par des anticorps ou recouvertes par le complément. C'est ainsi que *Salmonella typhimurium* injecte la toxine SopE qui agit comme un GEF et active Rac et Cdc42, ce qui induit la formation du "ruffling" membranaire et la macropinocytose. Cette bactérie est alors intériorisée par des "vésicules spacieuses", équivalentes aux macropinosomes. Le processus est ensuite arrêté par l'injection ultérieure d'une autre toxine appelée SptP, qui agit comme une GAP, et inactive Rac et Cdc42 (Hardt *et al.*, 1998; Lerm *et al.*, 2000).

1.6.3. Effets cellulaires et moléculaires des Rho-GTPases.

1.6.3.1. Effets distincts des Rho-GTPases.

La fonction principale de Rho-GTPases est de coordonner le type d'organisation du cytosquelette d'actine. L'acide lysophosphatidique, produit à partir de l'acide phosphatidique par la phospholipase A2, est un activateur de diverses fonctions cellulaires y compris la rétraction de neurites, l'agrégation de plaquettes, et la prolifération cellulaire. L'acide lysophosphatidique induit la formation et la contraction des câbles de tension ainsi que leur association à la matrice extracellulaire par les plaques d'adhérence: ces effets dépendants de Rho sont inhibés par la C3-transférase de *Clostridium botulinum*. Divers facteurs de croissance (PDGF, EGF ou insuline) induisent le "ruffling" membranaire: cet effet est aboli par l'expression d'une forme "dominante-négative" de Rac. Enfin, la formation des filipodes induite par la bradykinine est inhibée par l'expression d'une forme "dominante-négative" de Cdc42. Ces diverses expériences mènent à la conclusion que Rho, Rac et Cdc42 interviennent dans trois voies de signalisation distinctes à partir de divers récepteurs membranaires et mènent respectivement à la formation des câbles de tension, du "ruffling" membranaire et des filipodes (Hall, 1998).

1.6.3.2. Mécanismes généraux d'interaction des Rho-GTPases avec leurs effecteurs.

La comparaison de la structure des Rho-GTPases, déterminée par diffraction aux rayons X, met en évidence un changement conformationnel selon que le cristal a été obtenu à partir d'une protéine liée au GDP ou au GTP. Cette différence affecte principalement deux boucles, appelées "Switch regions" I et II, par lesquelles elles interagissent avec leurs cibles spécifiques. Ces changements de conformation contribuent sans doute à permettre aux protéines effectrices de distinguer entre la forme active ou inactive. L'utilisation de mutations ponctuelles a montré que les différentes protéines-cibles des Rho-GTPases interagissent le plus souvent au niveau de la boucle I. Des études de structure par résonance magnétique nucléaire des différentes protéines-cibles ont identifié les motifs responsables de cette interaction, par exemple le motif CRIB (pour Cdc42/Rac-Interactive Binding) et un motif du côté N-terminal de la protéine appelé REM (pour "Rho Effector homology"), constitué de

trois fermetures-éclair à leucines ("leucine zipper") appelées HR1; ce motif lie exclusivement Rho (Tableau 1.5).

En règle générale, les cibles des Rho-GTPases présentent, à l'état non stimulé, une conformation fermée dans laquelle le domaine fonctionnel est masqué par un domaine régulateur. L'interaction avec une Rho-GTPase liée au GTP ouvre la cible, ce qui permet au domaine fonctionnel d'exercer son effet (c'est le cas pour ROK, Dia et WASP). Le changement de conformation d'une Rho-GTPase, suite à l'hydrolyse de son GTP, entraîne la dissociation de son effecteur qui reprend alors la conformation fermée, inactive. Toutefois dans le cas de PAK 1-3, la fixation de Rho-GTP stimule son activité Ser/Thr-kinase; l'autophosphorylation qui en résulte maintient une forme active qui devient indépendante de l'interaction avec la Rho-GTPase qui l'avait "allumée". Signalons enfin que l'interaction avec Rho-GTP ne conduit pas nécessairement à une activation: ainsi la DAG-kinase est inhibée par cette interaction (Bishop et Hall, 2000).

1.6.3.3. Signalisation en aval de Rho.

L'activation de Rho rassemble les microfilaments préexistants, conduisant à la formation de câbles de tension si les intégrines sont stimulées par interaction avec leur ligand dans la matrice extracellulaire. On peut donc conclure que les effecteurs de Rho régulent la fonction des protéines de réticulation. Dans les cellules non musculaires, l'activité de la myosine II, composée de deux chaînes lourdes et quatre chaînes légères (Mynosin Light Chains ou MLC), est régulée par la phosphorylation de la MLC stimulée par Rho, ce qui provoque un changement conformationnel de la myosine et favorise son association avec les microfilaments (Burridge, 1999).

Les trois cibles principales de Rho-GTP, requises pour l'assemblage et la contraction des câbles de tension ainsi que pour l'adhérence cellulaire sont la p140mDia ("mammalian homolog of *Drosophila Diaphanous*"), les protéines ROKs ("Rho associated Kinase"), et la PtdIns 4P5-kinase (Figure 1.21). Parmi les autres effecteurs de la protéine Rho, citons à titre d'exemple: PKN/PRK1, PRK2, la citron-kinase, MBS, la DAG-kinase, la PLD, la rhopiline, la rhotékinase et la kinectine. Nous reviendrons sur la PLD dans les perspectives.

La protéine p140mDia joue le rôle d'adaptateur en liant Rho-GTP au cytosquelette d'actine. Une fois activée par Rho-GTP, p140mDia recrute à son tour la profiline, ce qui stimule l'élongation des microfilaments d'actine et la constitution des câbles de tension.

Les ROKs (p164ROK α et p160ROK β), deux sérine/thréonine-kinases, activées par liaison à Rho-GTP, phosphorylent la MLC, et inactivent par phosphorylation sa phosphatase

(MLC Phosphatase ou MLCP). Ces deux effets concordants entraînent l'activation de la myosine et la rétraction des câbles de tension. Une autre cible de ROK est la sérine-kinase appelée LIMK. Celle-ci possède un domaine d'interaction protéine/protéine appelé LIM, (pour *l-11*, *isl-1*, *mec-3*, les premiers gènes qui codent pour les protéines où l'on a identifié ce motif), contenant une séquence consensus riche en cystéines formant deux doigts à zinc. La LIM-kinase s'associe avec les filaments d'actine par son extrémité C-terminale qui contient le domaine catalytique, et elle inhibe par phosphorylation la cofiline, ce qui stabilise les microfilaments.

Enfin, Rho est capable de lier et d'activer la PtdIns 4P 5-kinase, qui synthétise le PtdIns 4,5P2 ou PIP2. D'une part, le PIP2 séquestre la gelsoline, ce qui libère les extrémités (+) des microfilaments et permet le recrutement de la profiline; la polymérisation de l'actine est donc favorisée. D'autre part, le PIP2 fixe la vinculine, qui permet l'ancrage des microfilaments à la membrane plasmique et favorise par conséquent la formation des plaques d'adhérence focale en continuité avec les câbles de tension. Ceci assure l'ancrage de la cellule à la matrice extracellulaire (Bishop et Hall, 2000).

Tableau 1.5. Interactions entre les Rho-GTPases et leurs effecteurs potentiels.

Effecteurs potentiels des Rho-GTPases	Type de protéine	Fonction	Motif de liaison	Rho-GTPase(s) partenaire(s)		
				Rho	Rac	Cdc42
PKN/PRK1, PRK2	Ser/Thr-kinase	?	REM	Rho	-	-
p70 S6-kinase	"	traduction	-	-	Rac	Cdc42
PAK1, 2, 3	"	JNK/actine	CRIB	-	Rac	?
PAK4	"	actine	CRIB	-	-	Cdc42
MRCK α , MRCK β	"	actine	CRIB	-	-	Cdc42
						Cdc42
PtdIns 4P 5-kinase	lipide-kinase	PtdIns 4,5P2/actine		Rho	Rac	-
PI3K	"	D3	-	-	Rac	Cdc42
DAG-kinase	"	PA	-	Rho	Rac	-
PLD	lipase	PA	-	Rho	Rac	Cdc42
PLC β 2	"	DAG/IP3	-	-	Rac	Cdc42
Dia1, Dia2	Protéine de trame	actine	-	Rho	-	-
WASP, N-WASP	"	"	CRIB		-	Cdc42
WAVE/Scar	"	"	CRIB	-	Rac	-
p67 ^{phox}	"	NADPH oxidase	-	-	Rac	-

Ce tableau illustre certains effecteurs potentiels des Rho-GTPases, leur fonction et leur motif d'interaction avec les Rho-GTPases: REM ("Rho Effector Homology") et CRIB ("Cdc42/Rac-Interactive Binding"). (Modifié d'après Bishop et Hall, 2000).

Abréviations:

PKN = Protein Kinase N

PAK = p21-Activated Kinase

JNK = "c-jun N-terminal Kinase".

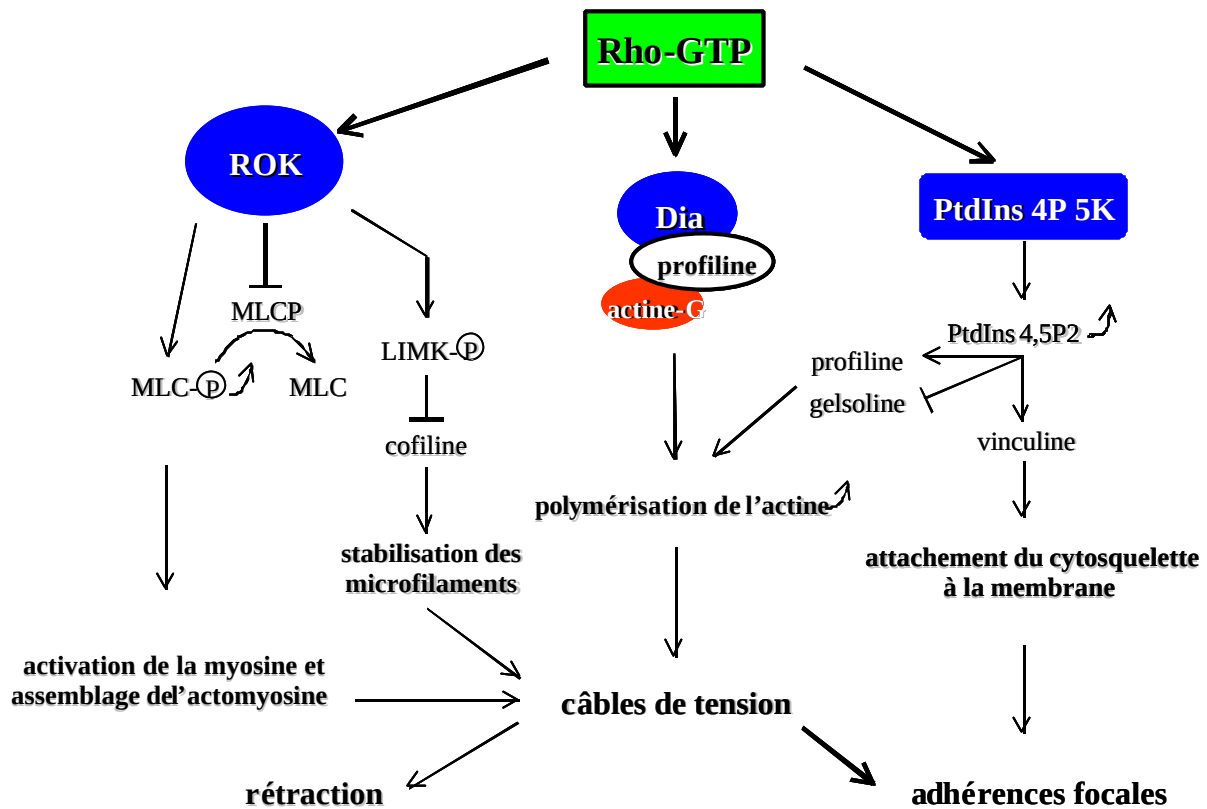
MRCK = "Myotonic dystrophy kinase-Related Cdc42-binding Kinase"

PLD = Phospholipase D

Dia = "mammalian homolog of *Drosophila* Diaphanous"

p67^{phox} = facteur cytosolique impliqué dans l'activation de la NADPH oxidase

Figure 1.21. Les voies de signalisation induites par Rho.



Cette figure introduit les trois cibles de Rho-GTP et souligne comment leurs effets convergent pour créer des câbles d'actine transcellulaires, stimuler leur tension mécanique et favoriser leur association aux plaques d'adhérence focale. Pour les détails des cascades de signalisation, voir le texte ci-dessus. (Modifié d'après Bishop et Hall, 2000).

1.6.3.4. Signalisation en aval de Cdc42.

Deux cibles de Cdc42 sont impliquées dans la formation des filopodes (Figure 1.22): les p21-activated-kinases (ou PAKs) et N-WASP, déjà décrite. La famille des PAKs rassemble des Ser/Thr-kinases impliquées dans la cascade de signalisation en aval à la fois de Cdc42 et de Rac, dans l'induction de filopodes et des lamelles associées au "ruffling" respectivement. Les PAKs se lient *in vitro* à ces deux GTPases avec une certaine spécificité. Ainsi, PAK1 et PAK3 se lient tous deux à Cdc42 et à Rac; PAK2 en revanche bloque sélectivement l'activité GTPase intrinsèque de Rac mais non celle de Cdc42, alors que PAK4 reconnaît exclusivement Cdc42. PAK1 exerce deux effets opposés sur les microfilaments corticaux et centraux: d'une part, elle active par phosphorylation la LIM-kinase, qui inactive par phosphorylation la cofiline et stabilise ainsi les microfilaments, sans doute

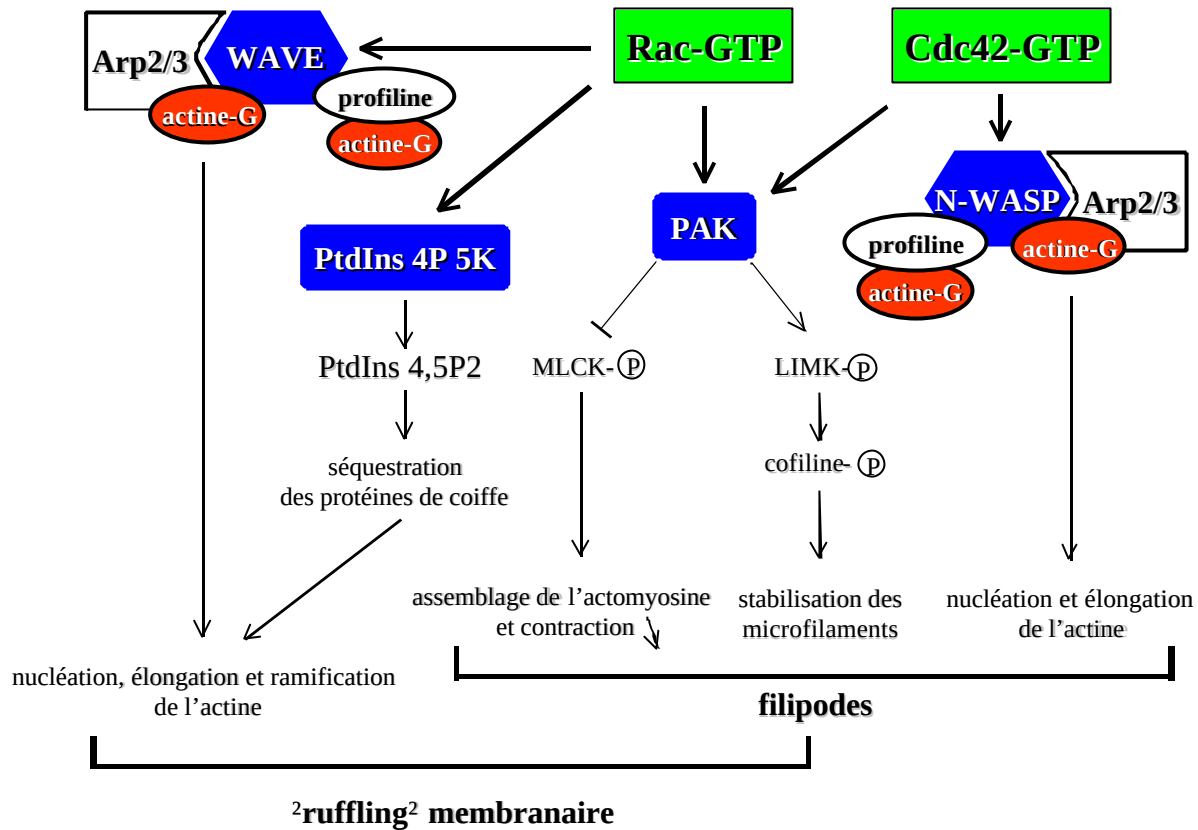
préférentiellement au niveau du cytocortex où se forment les filipodes; et d'autre part, elle inactive par phosphorylation la MLC-kinase, ce qui diminue la phosphorylation de la MLC et réduit ainsi l'assemblage de l'actomyosine au niveau des câbles de tension (Bishop et Hall, 2000).

Par ailleurs, les PAKs sont impliquées dans la signalisation par les récepteurs de l'EGF et du PDGF. En effet, elles contiennent à leur extrémité N-terminale un domaine riche en proline, capable d'interagir avec la protéine NCK qui contient trois motifs SH3 et un motif SH2. Cette protéine NCK joue ainsi le rôle de protéine adaptatrice, en connectant les PAKs et divers récepteurs tyrosine-kinases, ce qui relie les voies de signalisation stimulées par ces récepteurs à celles déclenchées par les GTPases (Galisteo *et al.*, 1996).

Une autre cible de Cdc42 est N-WASP, avec laquelle Cdc42 interagit directement par son domaine CRIB, et participe ainsi au recrutement à la membrane plasmique du complexe profiline/N-WASP/Arp2/3/actine-G. Ceci a pour conséquence de stimuler la nucléation et l'élongation des microfilaments (Bishop et Hall, 2000). Beaucoup d'autres effecteurs de Cdc42 sont impliqués dans la réorganisation du cytocortex d'actine et la motilité cellulaire (MRCKs, C1P4, LIMK1, Bni1p, Bnr1p, Ack, IQ-GAP, MLK2.3, MSE55 et MEKK4). Parmi ceux-ci, les MRCKs (ou Myotonic dystrophy kinase-Related Cdc42-binding Kinases), des Ser/Thr-kinases multimodulaires, contiennent une région N-terminale d'interaction avec Cdc42 et Rac analogue à celle des PAKs, un domaine PH, un domaine riche en cystéines analogue à celui trouvé dans la région régulatrice des PKCs, et un domaine kinase similaire à la Rho-kinase. Les MRCKs, recrutées au niveau du cytocortex par leur région N-terminale, y activent par phosphorylation la MLC et sont ainsi impliquées dans la motilité des filipodes (Leung *et al.*, 1998).

Enfin, la p70 S6-kinase, une autre Ser/Thr-kinase activée par des facteurs de croissance, s'associe à Rac et à Cdc42. L'activation de la p70 S6-kinase est bloquée par les formes "dominantes-négatives" de ces deux petites GTPases. La p70 S6-kinase peut être inhibée de manière expérimentale par la rapamycine, qui abroge la formation des câbles de tension induite par l'acide lysophosphatidique. Tout ceci suggère que la p70 S6-kinase participe aussi à leur formation, sans que l'on sache très bien comment elle agit.

Figure 1.22. Les voies de signalisation induites par Cdc42 et Rac.



Cette figure souligne l'intrication des voies de signalisation de Rac et de Cdc42 vers les filipodes et les zones de "ruffling" membranaire, deux types de protrusions qui coexistent souvent dans les cellules stimulées. Le contrôle de Rac par Cdc42 a été démontré en réponse à la bradykinine mais sa généralisation reste incertaine. Pour le détail des cascades de signalisation, voir le texte. (Modifié d'après Bishop et Hall, 2000).

1.6.3.5. Signalisation en aval de Rac.

Les GTPases Rac sont des relais intracellulaires essentiels pour l'intégration des signaux contrôlant la croissance, la division et la migration cellulaire. Dans la signalisation en aval de Rac, on trouve deux groupes d'effecteurs impliqués dans la réorganisation de l'actine corticale conduisant à la formation des lamelles membranaires et à leur activité de "ruffling". Les effecteurs communs (partagés avec Cdc42) comprennent certaines PAKs, les MRCKs et la p70 S6-kinase déjà décrites sous Cdc42, ainsi que la PI3K, MLK3, MEKK4 et IQ-GAP. Les effecteurs exclusifs de Rac sont la PtdIns 4P 5-kinase de type I, POR-1 et p140Sra-1. Nous nous concentrerons sur certains représentants de chaque catégorie.

PAK est nécessaire et suffisante pour la macropinocytose des fibroblastes NIH3T3 stimulés par le PDGF, et elle a été localisée au niveau des zones de "ruffling" membranaire (Dharmawardhane *et al.*, 2000). Rac, comme Rho, induit la phosphorylation de la LIMK via PAK. Il s'agit d'un relais essentiel, car une mutation inactivant la LIMK empêche la réorganisation du cytosquelette d'actine induite par Rac et par Cdc42. Puisque la cible majeure de la LIMK est la cofiline, ceci suggère que la phosphorylation de la cofiline est nécessaire à la voie de signalisation de ces Rho-GTPases. Nous avons déjà vu que PAK est capable d'inactiver par phosphorylation la MLC-kinase, diminuant ainsi le taux de la MLC phosphorylée, ce qui réduit l'assemblage de l'actomyosine (Bishop et Hall, 2000). On peut donc comprendre que Rac favorise la disparition des câbles de tension.

La cible propre de Rac la mieux caractérisée est la PtdIns 4P 5-kinase. Sous la forme liée au GDP, Rac peut former un complexe par interaction directe avec Rho-GDI et avec la PtdIns 4P 5-kinase. Cette dernière peut aussi interagir avec la DAG-kinase (Tolias *et al.*, 1998). En réponse à une stimulation par le PDGF, le complexe Rac-GDP/Rho-GDI/PtdIns 4P 5-kinase/DAG-kinase est recruté à la membrane, et la DAG-kinase produit l'acide phosphatidique (PA) qui stimule en retour la PtdIns 4P 5-kinase à produire le PtdIns 4,5P₂ (Jackowski et Rock, 1989). Ce phospho-inositide peut jouer deux rôles distincts: la dissociation du complexe Rac/Rho-GDI, ce qui favorise l'activation de Rac et augmente la polymérisation de l'actine, et le décoiffage ("uncapping") des microfilaments.

La protéine WAVE ou Scar1, est un autre effecteur sélectif de Rac. Lorsqu'elle est localisée au niveau des zones de "ruffling" membranaire, Wasp/Scar y recrute une multitude de protéines parmi lesquelles les monomères d'actine, le complexe Arp2/3 et la profiline, ce qui favorise la nucléation, et la ramification et l'élongation des microfilaments corticaux (Svitkina et Borisy, 1999).

1.6.3.6. Communication entre les Rho-GTPases.

La coordination du cytosquelette d'actine nécessite des régulateurs souvent opposés pour la formation des câbles de tension d'une part, et celle des filipodes et lamelles membranaires d'autre part. Ceci explique une communication "(cross-talk)": (i) entre les diverses Rho-GTPases; (ii) dans leur signalisation en amont; et (iii) dans leurs relais en aval. La nature exacte de cette communication n'est pas encore bien établie et peut d'ailleurs varier entre les types cellulaires. Un exemple peu représentatif est l'activation séquentielle de Cdc42, Rac puis de Rho dans les fibroblastes Swiss 3T3 activés par la bradykinine. Cette stimulation induit d'abord une activation rapide de Cdc42, qui active à son tour Rac

(rappelons que les lamelles soutenant le "ruffling" sont souvent associées aux filipodes). Après 10 à 15 minutes, Rac induit l'activation de Rho. Dans la majorité des types cellulaires, il a été montré au contraire un antagonisme entre Rho et Rac/Cdc42 (Aspenström, 1999; Kjøller et Hall, 1999).

La coordination entre les Rho-GTPases dépend en outre de régulateurs en amont des Rho-GTPases. Ainsi, la réorganisation du cytosquelette d'actine après transformation des fibroblastes par v-Src nécessite l'inactivation de Rho (via l'activation de la p190Rho-GAP) et l'activation de Rac et Cdc42 (via l'activation de leur GEF; Fincham *et al.*, 1999). De même, Ras est capable d'inactiver Rho (via l'activation du complexe p120Ras-GAP/p190Rho-GAP; McGlade *et al.*, 1993) et d'activer Rac et Cdc42 (via la PI3K qui active leur GEFs). Ces deux exemples illustrent l'antagonisme entre Rho et Rac/Cdc42. Dans d'autres circonstances, Ras inactive les trois Rho-GTPases à la fois: l'inactivation de Rho vient d'être décrite; celle de Rac et de Cdc42 résulte de l'activation de leur GAP, la RalBP.

Dans notre travail, nous avons noté que la transformation des fibroblastes Rat-1 par les oncogènes v-Src et K-Ras induit à la fois la disparition des câbles de tension (suggérant l'inhibition de Rho) et la polymérisation de l'actine au niveau du cytocortex produisant les filipodes et des lamelles membranaires responsables du "ruffling" et productrices des macropinosomes (indiquant l'activation de Cdc42/Rac). Des inhibiteurs pharmacologiques et la forme "dominante-négative" de la PI3K entraînent la réversion du phénotype transformé (comme notre travail le démontre). Ceci montre le rôle-clé de la PI3K comme coordinateur en aval de ces oncogènes, et sans doute en amont de Rho et Rac.

Dans les cellules dendritiques immatures isolées de la rate, la macropinocytose constitutive requiert Rac et l'élimination des câbles de tension par la toxine B de *Clostridium difficile* ne suffit pas pour induire la macropinocytose (West *et al.*, 2000). Ceci suggère que l'élimination des câbles de tension est sans doute une étape nécessaire pour relâcher la tension de la membrane (Raucher et Sheetz, 2000), mais pas suffisante pour former les macropinosomes. La macropinocytose serait donc surtout régulée par Rac qui permet la réorganisation ramifiée des microfilaments au niveau du cytocortex, et induit ainsi la formation du "ruffling" indispensable pour former les macropinosomes. De son côté, le groupe de Mellman a montré que la microinjection du "dominant-négatif" de Cdc42 abroge la macropinocytose constitutive des cellules dendritiques immatures isolées de la moelle osseuse, tandis que la microinjection du "dominant-positif" de Cdc42 dans les cellules dendritiques matures suffit pour induire la macropinocytose (Garrett *et al.*, 2000). Ceci

montre que Cdc42 est nécessaire et suffisant pour induire la macropinocytose dans les cellules dendritiques et suggère qu'elle est en amont de Rac, comme cela a été montré en réponse à la bradykinine (Figure 1.22). En outre, Rac et Cdc42 partagent plusieurs effecteurs communs, ce qui explique leur implication simultanée dans plusieurs processus cellulaires. En accord avec ces observations, l'induction simultanée chez les fibroblastes Rat-1, par les deux oncogènes ν Src et K-Ras, des filipodes et des lamellipodes caractéristiques des cellules en mouvement, ainsi que du "ruffling" membranaire et de la macropinocytose constitutive, suggère une relation étroite entre la mobilité cellulaire et la macropinocytose.

CHAPITRE 2. RESULTATS.

2.1. Publication N°1: Régulation par l'AMP-cyclique de la formation et du sort des macropinosomes dans les fibroblastes transformés par v-Src.

2.1.1. Résumé.

La transformation stable des fibroblastes Rat-1 par l'oncogène v-Src induit une macropinocytose constitutive, qui se traduit par un doublement de la vitesse d'accumulation d'un traceur de l'endocytose fluide (la peroxydase de raifort) par rapport aux cellules parentales non transformées. Des analogues de l'AMP-cyclique (le dibutyryl AMP-cyclique et le 8-bromo-AMP-cyclique) et un activateur pharmacologique de l'adénylate-cyclase (la forskoline) diminuent en partie (de 35 %) l'accumulation de ce traceur dans les cellules transformées, sans l'influencer dans les cellules Rat-1 contrôles. A la différence des inhibiteurs pharmacologiques de la PI3K (wortmannine) et de la PI-PLC (NCDG), le traitement des fibroblastes transformés par v-Src par le dibutyryl AMP-cyclique ne ramène donc pas le niveau d'accumulation de la peroxydase à celui des cellules contrôles et n'empêche pas la formation des macropinosomes, montrée par la capture d'un traceur fluorescent en microscopie confocale. L'analyse détaillée de la cinétique d'endocytose dans les cellules transformées confirme que le dibutyryl AMP-cyclique ne ralentit l'accumulation de la peroxydase qu'après des intervalles supérieurs à 5 minutes. Ceci s'explique par le fait que le dibutyryl AMP-cyclique accélère la vitesse d'efflux du traceur d'endocytose fluide (régurgitation), sans affecter le recyclage de la transferrine. Cette analyse suggère également que les macropinosomes formés ne fusionnent pas rapidement avec les endosomes qui contiennent la transferrine. En conclusion, la transformation des fibroblastes Rat-1 par l'oncogène v-Src induit spécifiquement la macropinocytose sans affecter la micropinocytose, ce qui confirme qu'il s'agit bien de deux voies d'endocytose distinctes. Par ailleurs, l'AMP-cyclique n'affecte ni la micropinocytose ni la formation des macropinosomes mais accélère sélectivement la régurgitation à partir des macropinosomes.

Regulation of macropinocytosis in v-Src-transformed fibroblasts: cyclic AMP selectively promotes regurgitation of macropinosomes

Alex Veithen, Mustapha Amyere, Patrick Van Der Smissen, Philippe Cupers and Pierre J. Courtroy

Cell Biology Unit, University of Louvain Medical School and Christian de Duve Institute of Cellular Pathology (ICP), Avenue Hippocrate, 75, 1200 Brussels, Belgium

*Author for correspondence (e-mail: courtroy@cell.ucl.ac.be)

Accepted 6 June; published on WWW 30 July 1998

SUMMARY

Stable transformation of Rat-1 fibroblasts by the v-Src oncoprotein results into the constitutive formation of macropinosomes. In the present report, we found that macropinosomes do not fuse with transferrin-containing endosomes and investigated the effects of cyclic AMP as a regulator of macropinocytosis in this cell system. The permeant analogs dibutyryl cyclic AMP and 8-bromo-cyclic AMP, as well as the pharmacological activator of adenylate cyclase forskolin, similarly decreased by about 35% the net endocytic accumulation of the fluid-phase tracer horseradish peroxidase at intervals >5 minutes in v-Src-transformed cells but not in the non-transformed parental Rat-1 cell line. However, and in contrast to the phospholipase C inhibitor 2-nitro-4-carboxyphenyl-N,N-diphenylcarbamate or the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin, dibutyryl cyclic AMP neither returned the peroxidase accumulation rate of v-Src-

transformed cells to that of parental Rat-1/control cells, nor prevented macropinosome formation, as shown by confocal microscopy. Detailed analysis of the kinetics of tracer entry and efflux in transformed cells revealed that dibutyryl cyclic AMP inhibited peroxidase accumulation only after intervals >5 minutes, due to accelerated peroxidase regurgitation, but did not alter the rate of transferrin recycling. Taken together, these data indicate that, in v-Src-transformed fibroblasts, macropinocytosis and micropinocytosis serve different pathways and that cyclic AMP affects neither micropinocytosis nor the formation of macropinosomes, but selectively promotes regurgitation therefrom.

Key words: Macropinocytosis, v-Src, cAMP, Fluid-phase endocytosis, Regurgitation

INTRODUCTION

Macropinocytosis designates the formation of large primary endocytic vesicles, upon closure of membrane ruffles (reviewed by Swanson and Watts, 1995). Whereas macropinosomes are constitutively formed in a limited number of cells, such as dendritic cells (Sallusto et al., 1995; Norbury et al., 1997) or oncogene-transformed fibroblasts (Bar-Sagi and Feramisco, 1986; Veithen et al., 1996), their occurrence is dramatically but transiently stimulated in a large variety of cell types by phorbol esters (Swanson, 1989; Keller and Niggli, 1993), growth factors (Racoosin and Swanson, 1989, 1992; Dowrick et al., 1993; Hewlett et al., 1994), thyroid-stimulating hormone (Deery and Heath, 1993), and the chemotactic peptide fMLP (Carpentier et al., 1991; Keller, 1990). The fate of macropinosomes is also variable. They readily fuse with endosomes in macrophages (Racoosin and Swanson, 1993), but follow a distinct route in EGF-stimulated A431 cells (Hewlett et al., 1994).

After having long been regarded as a curiosity of unknown significance, macropinocytosis is receiving a growing interest for at least three reasons. First, recent reports have evidenced a key role for macropinocytosis in antigen presentation by class

II and even class I MHC complexes in dendritic cells (Sallusto et al., 1995; Robinson et al., 1996; Norbury et al., 1997). Second, *Salmonella typhi* and *Shigella flexneri* trigger the formation of macropinosomes so as to promote their internalisation (Francis et al., 1993; Alpuche-Aranda et al., 1994, 1995; Mills and Finlay, 1994; Dehio et al., 1995), a phenomenon underlining the importance of macropinocytosis as a gateway for pathogen invasion (reviewed by Swanson and Bear, 1995). Third, macropinocytosis could be involved in the endocytic withdrawal of large structured membrane domains, such as hemi-desmosomes (Holm et al., 1993; Poumay et al., 1994).

In parallel, the molecular mechanisms that regulate macropinocytosis are being unravelled. In particular, signal-transducing proteins such as phosphatidylinositol 3-kinase (Kotani et al., 1994, 1995; Wennström et al., 1994; Araki et al., 1996), the small GTPases Rac (Ridley et al., 1992; Kotani et al., 1995), Ras (Bar-Sagi and Feramisco, 1986) and Arf-6 (Radhakrishna et al., 1996), as well as the heat shock protein 27 (Lavoie et al., 1993), can all induce membrane ruffling and macropinocytosis. Although interactions between these various regulators are poorly understood, they are regarded to reorganise cortical actin and thereby promote the formation of

membrane ruffles that fuse to generate macropinocytic vesicles. A repressor of this regulatory machinery presumably exists, since macropinocytosis induced by growth factors is rapidly down-regulated. Interestingly, elevation of the intracellular adenosine 3':5'-cyclic monophosphate (cAMP) concentration prevents the stimulation of membrane ruffling and pinocytosis induced by growth factors (Miyata et al., 1989).

In this work, we have investigated whether cAMP, a general second messenger, could indeed play the role of a physiological repressor of macropinocytosis in v-Src-transformed fibroblasts, a convenient model of constitutive macropinocytosis (Veithen et al., 1996). Surprisingly, experimental manipulations that elevated intracellular cAMP did not prevent the formation of macropinosomes in these cells, but decreased the accumulation of the fluid-phase tracer horseradish peroxidase (HRP), due to a selective acceleration of regurgitation from macropinosomes. Macropinosomes did not intermix content with transferrin-containing endosomes and the transferrin recycling rate was not affected by cAMP. These observations show that, in oncogene-transformed fibroblasts, micropinocytosis and macropinocytosis serve distinct pathways, governed by different regulatory machineries.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Parental Rat-1 cells (Rat-1/control) and Rat-1 cells transformed by the B77 subclone of Rous Sarcoma Virus (Rat-1/BB16), kindly provided by Dr G. Rousseau (ICP, Belgium), were grown at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco BRL, MD, USA) supplemented by 20 mM glucose, 4 mM glutamine, 10 mM NaHCO₃, 10 mM Hepes, 10 µg/ml streptomycin, 66 µg/ml penicillin and 10% (v/v) foetal calf serum (FCS, Gibco) under 8% CO₂ and usually seeded at ~10⁶ cells on 9.6 cm² Petri dishes (for biochemical experiments), or at ~50,000 cells on 1.1 cm² glass coverslips (for confocal microscopy). Before each experiment, cells were rinsed twice with FCS-free DMEM and preincubated therein for 30 minutes before the addition of endocytic tracers, to avoid interference by short-lived growth factor effects.

Confocal microscopy

Cells were incubated for 7 minutes in DMEM containing 1 mg/ml Texas Red-neutral dextran 70,000 (Molecular Probes, OR, USA) alone, or combined with 10 µg/ml fluorescein-transferrin (Molecular Probes), as indicated. After extensive washing at 4°C, cells were fixed by 4% formaldehyde (w/v) in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, for 15 minutes. Coverslips mounted in Mowiol were examined by fluorescence and by interferential contrast microscopy with an Axiovert microscope (Zeiss, Germany) coupled to MRC 1024 confocal scanning equipment (Bio-Rad, CA, USA).

Alternatively, cells were plated in 8-well Labtek coverglass-based culture chambers (Nalgene-Nunc, IL, USA), immersed in 1 mg/ml fluorescein-dextran 70,000 (Molecular Probes) and immediately examined without washing by time-lapse recording at 15 second intervals, so that movement of individual macropinosomes could be followed. This approach is similar to that used to follow macropinosome formation in *Dictyostelium* by Hacker et al. (1997).

Fluid-phase endocytosis of peroxidase

Cells were incubated in DMEM supplemented with 1-4 mg/ml HRP (type 2, Boehringer Mannheim, Germany). After the indicated intervals, cells were transferred to 4°C and extensively washed: 3

times 30 seconds with 3 ml of PBS-Ca²⁺ (137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 3.6 mM CaCl₂ and 0.74 mM MgSO₄, pH 6.5), once for 5 minutes in DMEM containing 10% outdated FCS and 3 times with PBS-Ca²⁺. Cells were surface-digested at 4°C for 1 hour in DMEM supplemented with 0.3% (w/v) pronase and pelleted in a benchtop microfuge (Beckman, CA, USA) for 1 minute at 4°C. The pellet was rinsed twice with PBS-Ca²⁺ and lysed in 0.01% (v/v) Triton X-100 (Serva Biochemicals, NJ, USA). HRP activity in the lysate was measured by the stopped colorimetric assay using ortho-dianisidine as a substrate as described by Cupers et al. (1994), normalized to a 1 mg/ml extracellular concentration and expressed with respect to cell protein (Smith et al., 1985) using bovine serum albumin as a standard.

For experiments using 2-nitro-4-carboxyphenyl-*N,N*-diphenylcarbamate (NDC) or wortmannin, stock solutions were made in dimethylsulfoxide. The final concentration in dimethylsulfoxide never exceeded 0.1% (v/v), at which level there was no effect on basal uptake of HRP.

Peroxidase regurgitation

For pulse-chase experiments, cells were incubated at 37°C in DMEM supplemented by HRP for 5 or 10 minutes, washed at 4°C as described above, and reincubated at 37°C for the indicated intervals. Thereafter, cells were rapidly washed 3 times with PBS-Ca²⁺ at 4°C, pronase-digested, lysed and assayed for HRP activity and protein content. Results were expressed as the residual fraction of the intracellular amount of HRP at the initial chase time and were adjusted by least-squares fitting with SYSTAT 5.2. software (SYSTAT Inc., USA) to an exponential decay equation as previously described:

$$Q_t/Q_0 = 1 - Q_r/Q_0(1 - e^{-kt}),$$

where Q_t represents the intracellular amount of HRP at chase time t , Q_0 the amount of HRP at the initiation of chase, Q_r the amount of regurgitable HRP, and k the rate constant of regurgitation (Cupers et al., 1994).

Transferrin recycling

Iron-saturated transferrin (Sigma, MO, USA) was labelled by ¹²⁵I iodine (100 mCi/ml, Amersham, UK) as described by McFarlane (1958) to a specific radioactivity of ~250 cpm/ng protein. Cells were incubated for 10 minutes in DMEM containing 50 nM ¹²⁵I-transferrin, washed extensively at 4°C and reincubated at 37°C for the indicated intervals. Thereafter, cells were rapidly washed 3 times with PBS-Ca²⁺ at 4°C, pronase-digested and lysed in Triton X-100 as described above. The radioactivity associated with the pellet and the supernatant were taken as measures of intracellular and surface-bound transferrin, respectively. Results were expressed as the residual fraction of intracellular transferrin at the initial chase time and were adjusted to the same exponential decay equation as described for fluid regurgitation.

RESULTS

In v-Src-transformed fibroblasts, macropinosomes are preferentially formed at the tip of peripheral extensions and do not readily fuse with endosomes

We recently reported that fluid-phase endocytosis, monitored in biochemistry and morphology by HRP uptake, is stimulated upon v-Src-transformation of Rat-1 fibroblasts, due to the constitutive formation of macropinocytic vesicles (Veithen et al., 1996). First, we examined whether macropinocytosis was affected by cell confluence. The level of intracellular HRP accumulation per cell after 30 minutes of uptake at 4 mg/ml HRP in the medium was constant between 30,000 and 150,000 cells/cm², both in control Rat-1 fibroblasts (272±8 ng HRP/mg

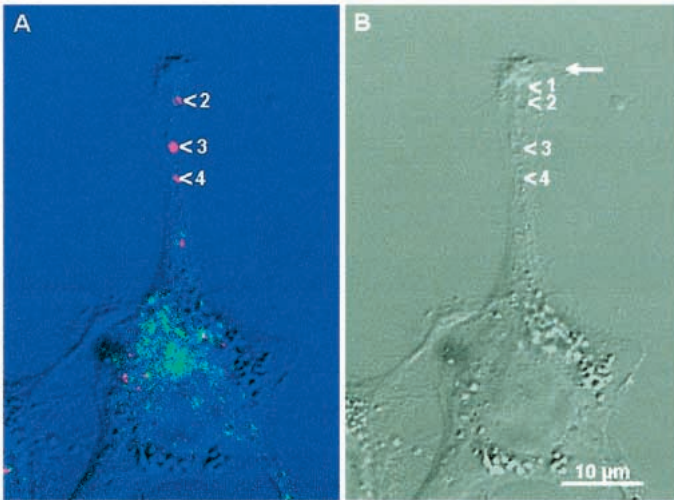


Fig. 1. Double labelling of macropinosomes and endosomes in v-Src-transformed fibroblasts. Rat-1/BB16 cells were incubated at 37°C for 7 minutes in DMEM containing 1 mg/ml Texas Red-dextran and 10 μ g/ml fluorescein-transferrin, washed, fixed and examined by fluorescence (A) and interferential contrast microscopy (B). Macropinosomes, numbered from 1 to 4, are formed at the tip of a peripheral extension showing extensive ruffling (arrow) and migrate slowly towards the cell body. Macropinosomes numbered 2, 3 and 4 are labelled by Texas Red-dextran, while number 1 is not, presumably because it was formed during the short interval between tracer removal and complete cell cooling. Endosomes containing fluorescein-transferrin are concentrated near the nucleus. Notice the absence of detectable double labelling of macropinosomes and endosomes.

cell protein; mean $\pm$ s.e.m. of 12 dishes) and v-Src-transformed Rat-1 fibroblasts (540 $\pm$ 6 ng HRP/mg cell protein), and corresponded to clearance values of 136 $\pm$ 4 and 270 $\pm$ 3 nl/mg cell protein/hour, respectively. Thus, micropinocytosis and macropinocytosis were both independent of cell confluence in our experimental conditions.

To examine whether macropinosomes would readily fuse with endosomes in v-Src-transformed fibroblasts as they do in macrophages, fibroblasts were pulsed for 7 minutes with 1 mg/ml Texas Red-dextran, as a tracer of fluid-phase endocytosis, together with 10 μ g/ml transferrin, as a tracer for receptor-mediated endocytosis. Large profiles that were strongly and homogeneously labelled by Texas Red-dextran (Fig. 1A), and corresponding by interferential contrast imaging as light-lucent cytoplasmic vesicles with a diameter >1 μ m (Fig. 1B), were frequently observed in v-Src-transformed cells. These macropinosomes were preferentially formed at the ruffling end of long cellular extensions where they remained poorly mobile over a few minutes time-scale, but after $\sim$ 30 minutes of chase, had either disappeared, or had slowly migrated towards the cell body (data not shown). Thus, their motility contrasted with the irregular saltatory motion that is typical of endosomes. Moreover, transferrin-containing endosomes, appearing as multiple small dots, were not detected in the peripheral extensions but were concentrated in the perinuclear region of the cell body. There was no labelling of these endosomes by 1 mg/ml Texas Red-dextran at the detection level used. However, if cells were doubly incubated

with 1 mg/ml of both Texas Red-dextran and fluorescein-transferrin, so that the latter would also behave as a fluid-phase tracer, all macropinosomes appeared yellow, indicating that they contained both probes (data not shown). When macropinosomes were loaded with Texas Red-dextran for 5 minutes, then chased for 20 minutes in tracer-free medium, and cells incubated for 5 further minutes with fluorescent-transferrin, remaining macropinosomes had largely moved towards the cell body, but still did not merge with transferrin-labelled endosomes (data not shown).

In v-Src-transformed fibroblasts, cAMP decreases peroxidase accumulation but does not prevent the formation of macropinosomes

To investigate whether cAMP affects macropinocytosis, we first examined the effects of its permeant analogs 2'-O-dibutyryl-adenosine 3':5'-cyclic monophosphate (db-cAMP) and 8-bromo-adenosine 3':5'-cyclic monophosphate (8-Br-cAMP), as well as of the adenylate cyclase activator forskolin, on the net accumulation of the fluid-phase tracer HRP in normal and v-Src-transformed fibroblasts (Fig. 2A). Whereas treatment of transformed cells with the usual concentrations of these three agents caused a comparable $\sim$ 35% decrease of HRP accumulation after a 30 minute pulse, it had no effect on non-transformed fibroblasts. That an elevation of intracellular cAMP decreased accumulation of an endocytic fluid-phase tracer selectively in v-Src-transformed fibroblasts was suggestive of an interference with macropinocytosis.

Although clearly significant ($P<0.001$), inhibition of HRP accumulation in the transformed cells was only partial, as it did not return to the level of non-transformed cells. This contrasts with the full abrogation of the difference between transformed and non-transformed cells by 100 μ M NCDC or by 100 nM wortmannin (Fig. 2A). These drugs, respectively, inhibit phospholipase C and phosphatidylinositol 3-kinase, which are potentially implicated in the stimulation of macropinocytosis (Veithen et al., 1996; Araki et al., 1996). To exclude the possibility that the partial inhibition reflected an incomplete effect, cells were preincubated with higher concentrations of db-cAMP (Fig. 2B), or for a longer interval (data not shown). Inhibition of HRP accumulation induced by db-cAMP became detectable at 0.1 mM and reached its maximal from 0.5 to 2 mM, never exceeding the level intermediate between transformed and non-transformed cells.

One simple interpretation of these results would be that high intracellular concentrations of cAMP reduce by half the formation rate or the average size of macropinosomes in v-Src-transformed cells. To test this hypothesis, the effects of db-cAMP on the formation of macropinosomes was analysed by confocal microscopy, using Texas Red-dextran as a fluid-phase tracer (Fig. 3). When fibroblasts had been pretreated with 1 mM db-cAMP, the location, abundance and size of macropinosomes appeared comparable to those of non-treated cells (Fig. 3A and B vs Fig. 1). The abundance of macropinosomes in v-Src transformed fibroblasts was further estimated by counting large (>0.5 μ m) fluorescent circles after a 30 minute uptake of the fluid-phase tracer Texas Red-dextran in five fields, each showing about 50 cells. The analysis disclosed no significant difference in the absence of db-cAMP treatment (4.66 $\pm$ 0.49 macropinosomes/cell) and after such treatment (4.39 $\pm$ 0.23 macropinosomes/cell). In contrast,

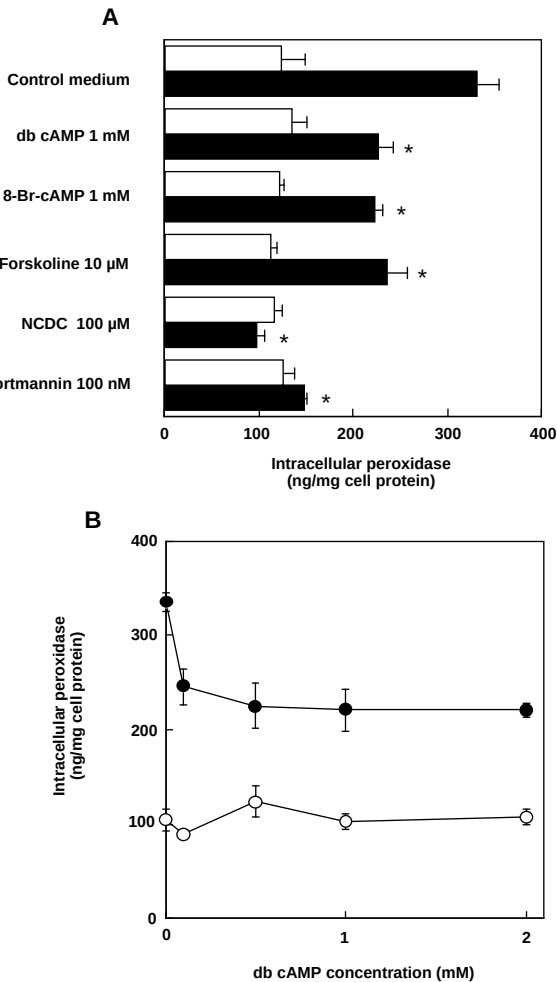


Fig. 2. cAMP partially inhibits peroxidase accumulation in v-Src-transformed fibroblasts. Rat-1/control cells (open symbols) and Rat-1/BB16 cells (filled symbols) were first incubated at 37°C for 30 minutes in DMEM containing the various indicated agents (A) or the indicated db-cAMP concentrations (B). They were then incubated in the same media supplemented with 4 mg/ml of HRP for 30 minutes. Cells were cooled down to 4°C, washed extensively (see Materials and Methods) and their content in HRP (normalized to 1 mg/ml) and protein were determined. Values are means $\pm$ s.d. of 4-12 culture dishes, pooled from 2-4 experiments. * P <0.001, as compared to control medium by Student's t -test.

dextran-labelled vacuoles could only exceptionally be observed after treatment by NCDC (Fig. 3C and D) or wortmannin (Fig. 3E and F), demonstrating that these drugs had essentially abolished the formation of macropinosomes. These results led us to examine the possibility that cAMP affected macropinocytosis at a stage distinct from the formation of macropinosomes.

cAMP stimulates fluid regurgitation but not receptor recycling in v-Src-transformed fibroblasts

Since the level of inhibition by cAMP of HRP accumulation after a 30 minute pulse appeared not to result from a comparable decrease of its sequestration into macropinosomes, we characterized cAMP effects on the kinetics of endocytic processing of HRP. First, a detailed analysis of the kinetics of

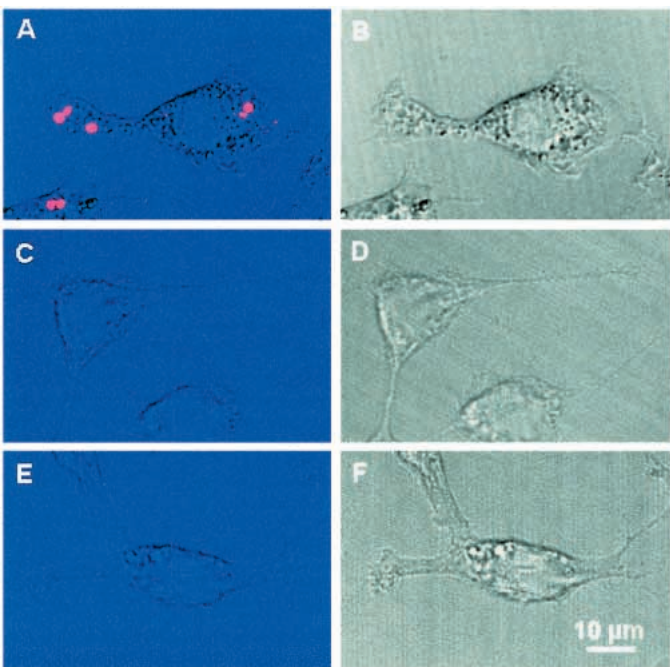


Fig. 3. cAMP does not abolish the formation of macropinocytic vesicles in v-Src-transformed fibroblasts. Rat-1/BB16 cells were incubated at 37°C for 30 minutes in DMEM containing 1 mM db-cAMP (A,B), 100 μ M NCDC (C,D) or 100 nM wortmannin (E,F) and then for 7 minutes in the same media supplemented with 1 mg/ml of Texas Red-dextran. Cells were washed at 4°C and fixed in formaldehyde. The same optical fields are shown either by confocal fluorescence microscopy (A,C,E) or by interferential contrast microscopy (B,D,F). This experiment has been reproduced 3 times.

uptake revealed that the effect of db-cAMP varied with the interval of HRP accumulation: inhibition was obvious after pulses of >5 minutes (Fig. 4A), but cAMP had no effect for pulses of <5 minutes (Fig. 4B). This discrepancy cannot be accounted for by a delay in the increase of intracellular cAMP concentration since, in all cases, cells were preincubated for at least 30 minutes with db-cAMP before HRP addition to the incubation medium. In non-transformed Rat-1 fibroblasts, db-cAMP had no effect on the level of HRP accumulation from 5 to 30 minutes of pulse, which was about 2.5 lower than in their v-Src-transformed counterparts.

Thus, the possibility was considered that a decrease by db-cAMP of HRP accumulation in v-Src-transformed fibroblasts after a lag of ~5 minutes could reflect a stimulation of regurgitation, as previously observed in primary cultures of rat foetal fibroblasts upon potassium depletion, incubation in hypertonic media (Cupers et al., 1994) or equilibration with 2 μ M monensin (Cupers et al., 1997). We therefore compared by pulse-chase experiments the kinetics of regurgitation in v-Src-transformed cells that were treated or not by db-cAMP (Fig. 5A). After a 5 minute pulse, the regurgitation rate, estimated by the k parameter of the adjustment equation, was about doubled after treatment with db-cAMP (0.19 ± 0.02 minute⁻¹ vs 0.11 ± 0.02 min⁻¹ in untreated conditions). The effect on the regurgitable fraction was less important ($40 \pm 1\%$ after treatment with db-cAMP vs $32 \pm 2\%$ in control cells). Similar observations were made for regurgitation analyses performed

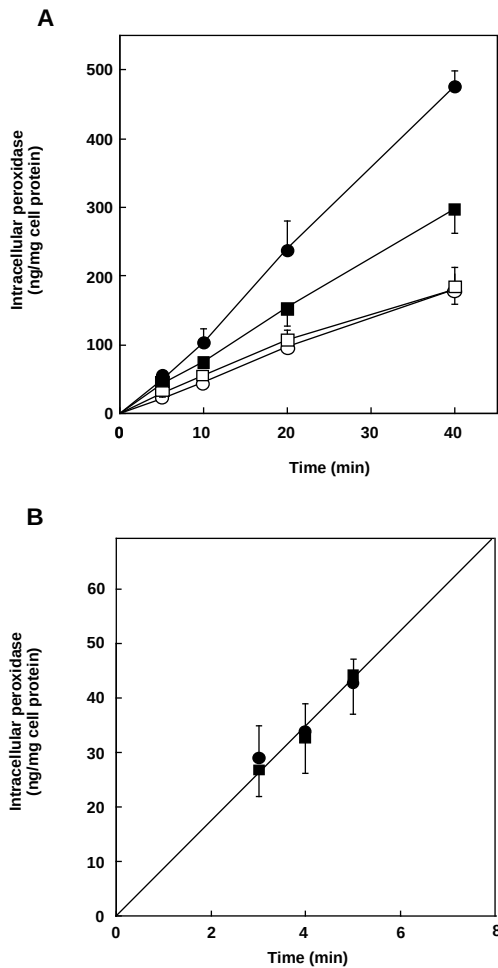


Fig. 4. Effects of db-cAMP on the kinetics of peroxidase accumulation in v-Src-transformed fibroblasts. Rat-1/control cells (○, □) and Rat-1/BB16 cells (●, ■) were incubated at 37°C for 30 minutes in DMEM with (□, ■) or without (○, ●) 1 mM db-cAMP and then for the indicated times in the same media supplemented with 1 mg/ml of HRP. (A) Long-term pulses; (B) short-term pulses. Values are means $\pm$ s.d. of 5-6 dishes, pooled from 2 separated experiments.

after a 10 minute pulse (data not shown). These results directly demonstrate that cAMP selectively interferes with fluid-phase regurgitation from macropinosomes in v-Src-transformed cells.

In contrast, pulse-chase analysis using transferrin as a tracer of receptor-mediated endocytosis revealed that cAMP did not influence its recycling (Fig. 5B). Both in db-cAMP-treated and non-treated v-Src-transformed fibroblasts, >90% of the transferrin taken up during a 10 minute pulse was released within a 1-hour chase, with a similar efflux rate of 0.20 minute^{-1} .

DISCUSSION

In v-Src-transformed fibroblasts, macropinosomes are continuously generated at ruffling zones, which are

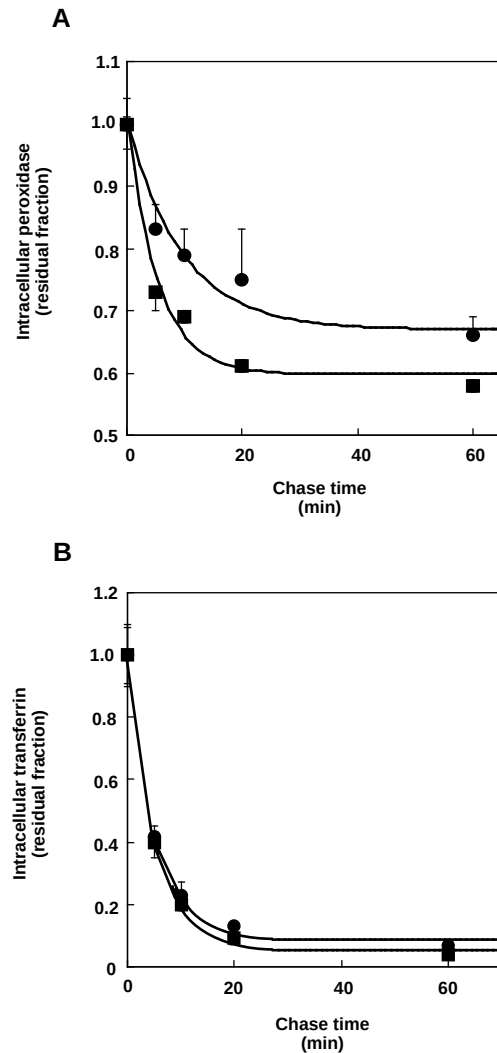


Fig. 5. db-cAMP stimulates peroxidase regurgitation but not transferrin recycling in v-Src-transformed fibroblasts. Rat-1/BB16 cells were incubated at 37°C for 30 minutes in DMEM with (■) or without (●) 1 mM db-cAMP and pulsed in the same media containing 4 mg/ml of HRP for 5 minutes (A) or 50 nM ^{125}I -transferrin for 10 minutes. Cells were rapidly washed at 4°C and chased for the indicated times at 37°C in DMEM containing or not 1 mM db-cAMP. Values are means $\pm$ s.d. of 4 dishes, expressed as the residual fraction of intracellular amount of tracer at the end of the pulse and were fitted to an exponential decay. Absolute 100% values for control and db-cAMP-treated cells, respectively, were 50 ± 1 and 45 ± 2 ng HRP/mg of cell protein (after normalization to 1 mg/ml extracellular concentration); and 420 ± 40 and 340 ± 30 fmoles of intracellular transferrin/mg of cell protein; surface-bound transferrin was 227 ± 32 and 199 ± 36 fmoles/mg of cell protein.

preferentially located at the tip of long cellular extensions (Veithen et al., 1996). This structural feature, combined with the use of fluorescent probes coupled to interferential contrast imaging, makes it convenient to follow their fate in living or fixed cells. Despite the fact that, by definition, fluid-phase tracers label both macro- and micropinocytic routes, a formal distinction between macropinosomes (about 1 micrometer in diameter) and primary micropinocytic vesicles (about 100

nanometers in diameter) using short-pulses of tracer is generally easy, based on the principle that a 10-fold difference in size will result in a 1,000-fold difference in tracer load. Accordingly, an appropriate setting of detection level allows one to selectively extract the former and ignore the latter, which require much higher concentrations of the fluid-phase tracer to be detected (Hewlett et al., 1994). When using longer pulses of fluid-phase tracer, however, the distinction between macropinosomes and vesicular endosomes (about 300-500 nm in diameter) filled by the tracer brought by multiple primary micropinocytic vesicles is more difficult. The difference may even be further attenuated if maturing macropinosomes shrink (Swanson and Watts, 1995).

Recently formed macropinosomes are rather immobile over a few minutes time-scale, and either disappear or exhibit a slow net centripetal movement, but do not appear to release their content into perinuclear transferrin-containing endosomes. Their origin, dynamics and fate are thus distinct from the micropinocytic apparatus, which can be demonstrated using low concentrations of transferrin, indicating that they depend on different molecular machineries.

Although several studies have reported that cAMP can influence endocytosis, the effects of this second messenger on endocytic processes are pleiotropic and seem to depend on the cellular context. Indeed, an increase in intracellular cAMP stimulates clathrin-independent micropinocytosis at the apical pole of polarized MDCK cells (Eker et al., 1994), inhibits the basal rate of pinocytosis in alveolar macrophages (Pataki et al., 1995) and abrogates the growth factor-induced stimulation of pinocytosis in KB and A431 cells (Miyata et al., 1989). Since it has been clearly demonstrated that stimulation of A431 cells by growth factors selectively induces macropinocytosis in these cells (Hewlett et al., 1994), we hypothesized that the inhibitory effect of cAMP could reflect a repression of this particular endocytic pathway.

In the present work, we have investigated this possibility on macropinocytosis in v-Src-transformed fibroblasts. Although cAMP significantly decreased the net accumulation of the fluid-phase tracer HRP, specifically in these cells and not in their non-transformed counterparts, macropinosome formation was apparently not affected and the effect depended on the interval of tracer accumulation. In addition, treatment with db-cAMP stimulated fluid regurgitation in v-Src-transformed cells, without affecting the rate of transferrin recycling. Taken together, these results lead us to propose that the effect of cAMP on endocytosis in v-Src-transformed cells corresponds mainly, if not exclusively, to a stimulation of fluid regurgitation selectively from macropinosomes. The extent to which regulation of constitutive macropinocytosis in transformed fibroblasts can be extrapolated to constitutive macropinocytosis in dendritic cells, or to transient macropinocytosis induced in other cells by growth factors or phorbol esters, remains to be examined.

Our observations clearly contrast with the reported inhibitory effects of cAMP on endocytosis in growth factor-stimulated cells or in non-stimulated alveolar macrophages, observations that were attributed to a direct inhibition of endocytic vesicle formation. In both growth factor-stimulated A431 and KB cells, the suppression by cAMP of endocytosis stimulation was accompanied by a decrease of membrane ruffling (Miyata et al., 1989), which is regarded as the

prerequisite of macropinosome formation (Swanson and Watts, 1995; Araki et al., 1996; Hacker et al., 1997). In addition, in growth factor-stimulated KB cells, cAMP was reported not to increase, but actually decrease fluid regurgitation (Miyata et al., 1989). One could, however, argue that this decrease might correspond to an effect on regurgitation from endosomes rather than from macropinosomes, since cAMP inhibited regurgitation of HRP that had been taken up *before* stimulation of macropinocytosis by growth factors. Similarly, in non-stimulated alveolar macrophages, cAMP decreased by about 50% the accumulation of the fluid-phase tracer FITC-dextran, without detectable effect on regurgitation (Pataki et al., 1995), but whether these observations reflect a decrease of micropinocytosis or a selective inhibition of macropinocytosis in these cells remains to be clarified.

A selective stimulation of regurgitation from macropinosomes in v-Src-transformed fibroblasts raises the questions of the underlying mechanism and, in particular, of the actual fate of macropinosomes in these cells. Whether formed in macrophages upon stimulation by phorbol esters and M-CSF or in A431 cells stimulated by EGF, macropinosomes migrate to the central region of the cell, and concomitantly part of the fluid content taken up by macropinocytosis is released back to the extracellular medium (Swanson, 1989; Racoosin and Swanson, 1993; Hewlett et al., 1994). This regurgitation is believed to be mediated by small vesicles that would bud from macropinosomes and fuse with the pericellular membrane (Swanson, 1989). Alternatively, macropinosomes formed in macrophages can fuse with other organelles such as endosomes, lysosomes and phagolysosomes (Racoosin and Swanson, 1993; Berthiaume et al., 1995). Part of the material ultimately regurgitated by macropinosomes may thus actually transit via other endocytic organelles before release.

Such an indirect regurgitation route appears unlikely in A431 cells or in v-Src-transformed fibroblasts, since macropinosomes formed in these cells do not apparently fuse with endosomes or lysosomes (Hewlett et al., 1994; this report). A simpler mechanism would be the direct fusion of macropinosomes back to the cell surface. Although this mechanism has only seldom been observed in macrophages (Swanson and Watts, 1995), it could play a more important role in other cell types. In HeLa cells overexpressing the GTPase Arf-6, macropinosomes formed upon AIF4 induction remain in the peripheral cytoplasm where membrane ruffling occurs and where they appear to rapidly regurgitate their entire fluid content (Radhakrishna et al., 1996). The absence of significant migration of such macropinosomes and the rapidity of their regurgitation would suggest a direct fusion, without vesicular intermediate, with the cell surface where they originated. The denomination 'retroendocytosis', first introduced in another context (Aulinskas et al., 1981), would be best applied to this process. Although the contribution of indirect versus direct regurgitation from macropinosomes in v-Src-transformed fibroblasts remains to be elucidated, we suggest that one of these phenomena is triggered by cAMP.

We thank Prof. P. Baudhuin for advice and continuous support, and Mrs T. Lac and N. Delfasse for technical assistance. This work was supported by a training grant of the 'Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture' (to A.V.) as well as by grants 3.4536.96, 3.4599.97 and 9.4531.94 of the Belgian Fund for

Scientific Research, grants 42 and 44 of the Framework of Interuniversity Attraction Pole and grant 94-99/172 of the 'Communauté Française de Belgique' (concerted research actions).

REFERENCES

- Alpuche-Aranda, C. M., Racoosin, E. L., Swanson, J. A. and Miller, S. I.** (1994). *Salmonella* stimulates macrophage macropinocytosis and persists within spacious phagosomes. *J. Exp. Med.* **179**, 601-608.
- Alpuche-Aranda, C. M., Berthiaume, E. P., Mock, B., Swanson, J. A. and Miller, S. I.** (1995). Spacious phagosome formation within mouse macrophages correlates with *Salmonella* serotype pathogenicity and host susceptibility. *Infect. Immun.* **63**, 4456-4462.
- Araki, N., Johnson, M. T. and Swanson, J. A.** (1996). A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J. Cell Biol.* **135**, 1249-1260.
- Aulinskas, T. H., Van Der Westhuyzen, D. R., Bierman, E. L., Gevers, W. and Coetzee, G. A.** (1981). Retro-endocytosis of low-density lipoprotein by cultured bovine aortic smooth muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta* **664**, 255-265.
- Bar-Sagi, D. and Feramisco, J. R.** (1986). Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by Ras proteins. *Science* **233**, 1061-1068.
- Berthiaume, E. P., Medina, C. and Swanson, J. A.** (1995). Molecular size-fractionation during endocytosis in macrophages. *J. Cell Biol.* **129**, 989-998.
- Carpentier, J.-L., Lew, D. P., Paccaud, J.-P., Gil, R., Iacopetta, B., Kazatchine, M., Stendahl, O. and Pozzan, T.** (1991). Internalization pathway of C3b receptors in human neutrophils and its transmodulation by chemoattractant receptors stimulation. *Cell Regul.* **2**, 41-55.
- Cuppers, P., Veithen, A., Kiss, A., Baudhuin, P. and Courtoy, P. J.** (1994). Clathrin polymerisation is not required for bulk phase endocytosis in rat fetal fibroblast. *J. Cell Biol.* **127**, 725-735.
- Cuppers, P., Veithen, A., Hoekstra, D., Baudhuin, P. and Courtoy, P. J.** (1997). Endosomal flow sorting : three unrelated procedures similarly uncouple fluid, bulk-membrane and receptor trafficking in rat foetal fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 661-664.
- Deery, W. J. and Heath, J. P.** (1993). Phagocytosis induced by thyrotropin in cultured thyroid cells is associated with myosin light chain dephosphorylation and stress fiber disruption. *J. Cell Biol.* **122**, 21-37.
- Dehio, C., Prévost, M.-C. and Sansonetti, P. J.** (1995). Invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri* induces tyrosine phosphorylation of cortactin by a pp60^{c-src}-mediated signalling pathway. *EMBO J.* **14**, 2471-2482.
- Dowrick, P. P., Kenworthy, P., McCann, B. and Warn, R.** (1993). Circular ruffle formation and closure lead to macropinocytosis in hepatocyte growth factors/scatter factor-treated cells. *Eur. J. Cell Biol.* **61**, 44-53.
- Eker, P., Holm, P. K., van Deurs, B. and Sandvig, K.** (1994). Selective regulation of apical endocytosis in polarized Madin-Darby canine kidney cells by mastoparan and cAMP. *J. Biol. Chem.* **269**, 18607-18615.
- Francis, C. L., Ryan, T. A., Jones, B. D., Smith, S. J. and Falkow, S.** (1993). Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature* **364**, 639-642.
- Hacker, U., Albrecht, R. and Maniak, M.** (1997). Fluid-phase uptake by macropinocytosis in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* **110**, 105-112.
- Hewlett, L. J., Prescott, A. R. and Watts, C.** (1994). The coated pit and macropinocytosis pathways serve distinct endosome populations. *J. Cell Biol.* **124**, 689-703.
- Holm, P. K., Hansen, S. H., Sandvig, K. and van Deurs, B.** (1993). Endocytosis of desmosomal plaques depends on intact actin filaments and leads to a nondegradative compartment. *Eur. J. Cell Biol.* **62**, 362-371.
- Keller, H. U.** (1990). Diacylglycerol and PMA are particularly effective stimulators of fluid-phase pinocytosis in human neutrophils. *J. Cell. Physiol.* **145**, 465-471.
- Keller, H. U. and Niggli, V.** (1993). The PKC-inhibitor Ro 31-8220 selectively suppresses PMA- and diacylglycerol-induced fluid pinocytosis and actin polymerisation in polymorphonuclear neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**, 1111-1116.
- Kotani, K., Yonezawa, K., Hara, K., Ueda, H., Kitamura, Y., Sakaue, H., Ando, A., Chavanieu, A., Calas, B., Grigorescu, F. et al.** (1994). Involvement of phosphoinositide 3-kinase in insulin- or IGF-1-induced membrane ruffling. *EMBO J.* **13**, 2313-2321.
- Kotani, K., Hara, K., Kotani, K., Yonezawa, K., Ueda, H. and Kasuga, M.** (1995). Phosphoinositide 3-kinase as an upstream regulator of the small GTP-binding protein Rac in the insulin signaling of membrane ruffling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 985-990.
- Lavoie, J. N., Hickey, E., Weber, L. and Landry, J.** (1993). Modulation of actin microfilament dynamics and fluid-phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J. Biol. Chem.* **268**, 24210-24214.
- McFarlane, A. S.** (1958). Efficient trace labelling of proteins with iodine. *Nature* **183**, 53.
- Mills, S. D. and Finlay, B. B.** (1994). Comparison of *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* invasion, intracellular growth and localization in cultured human epithelial cells. *Microb. Pathog.* **17**, 409-423.
- Miyata, Y., Nishida, E., Koyasu, S., Yahara, I. and Sakai, H.** (1989). Regulation by intracellular Ca²⁺ and cyclic AMP of the growth factor-induced ruffling membrane formation and stimulation of fluid-phase endocytosis and exocytosis. *Exp. Cell Res.* **181**, 454-462.
- Norbury, C. C., Chambers, B. J., Prescott, A. R., Ljunggren, H. G. and Watts, C.** (1997). Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **27**, 280-288.
- Pataki, G., Czopf, L., Jilling, T., Marczin, N., Catravas, J. and Matalon, S.** (1995). Regulation of fluid-phase endocytosis in alveolar macrophages. *Am. J. Physiol.* **269**, L520-L526.
- Poumay, Y., Roland, I. H., Leclercq-Smekens, M. and Leloup, R.** (1994). Basal detachment of the epidermis using dispase: tissue spatial organization and fate of integrin $\alpha 6$ - $\beta 4$ and hemi-desmosomes. *J. Invest. Dermatol.* **102**, 111-117.
- Racoosin, E. L. and Swanson, J. A.** (1989). Macrophage colony-stimulating factor (rM-CSF) stimulates pinocytosis in bone marrow-derived macrophages. *J. Exp. Med.* **170**, 1635-1648.
- Racoosin, E. L. and Swanson, J. A.** (1992). M-CSF-induced macropinocytosis increases solute endocytosis but not receptor-mediated endocytosis in mouse macrophages. *J. Cell Sci.* **102**, 867-880.
- Racoosin, E. L. and Swanson, J. A.** (1993). Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *J. Cell Biol.* **121**, 1011-1020.
- Radhakrishna, H., Klausner, R. D. and Donaldson, J. G.** (1996). Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF-6 GTPase. *J. Cell Biol.* **134**, 935-947.
- Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. and Hall, A.** (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-410.
- Robinson, M. S., Watts, C. and Zerial, M.** (1996). Membrane dynamics in endocytosis. *Cell* **84**, 13-21.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. and Lanzavecchia, A.** (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: down-regulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**, 389-400.
- Smith, P. K., Krhon, R. I., Hermanson, G. T., Malia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Gorke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C.** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
- Swanson, J. A.** (1989). Phorbol esters stimulate macropinocytosis and solute flow through macrophages. *J. Cell Sci.* **94**, 135-142.
- Swanson, J. A. and Bear, S. C.** (1995). Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol.* **5**, 89-92.
- Swanson, J. A. and Watts, C.** (1995). Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* **5**, 424-428.
- Veithen, A., Cuppers, P., Baudhuin, P. and Courtoy, P. J.** (1996). v-Src induces constitutive macropinocytosis in rat fibroblasts. *J. Cell Sci.* **109**, 2005-2012.
- Wennström, S., Siegbahn, A., Yokote, K., Arvidsson, A.-K., Heldin, C. H., Mori, S. and Claesson-Welsh, L.** (1994). Membrane ruffling and chemotaxis transduced by PDGF β -receptor require the binding site for phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene* **9**, 651-660.

2.2. Publication N°2: Rôle de l'activation séquentielle de la PI3K et de la PI-PLC dans la macropinocytose constitutive des fibroblastes transformés par v-Src et K-Ras.

2.2.1. Résumé.

Notre travail montre d'abord que la macropinocytose est initiée par la fermeture de protrusions lamellaires produites par la dynamique de l'actine au niveau du cytocortex, ou "ruffling". Dans les fibroblastes Rat-1, la transformation par les oncogènes v-Src ou K-Ras ou la transfection stable par un vecteur d'expression de p85 α , (entraînant une activation "dominante-positive") induisent (i) une macropinocytose constitutive (mesurée par une accélération de l'endocytose fluide de peroxydase) et la formation de macropinosomes (visualisés par la capture de dextran fluorescent); (ii) la disparition des câbles de tension, (visualisés par la phalloïdine-rhodamine); et (iii) le recrutement de l'actine corticale associée au "ruffling" membranaire (visualisé par microcinématographie et par microscopie à balayage). Ces changements sont corrélés avec l'activation de PI3K et celle de la PI-PLC, mesurées par la quantification *in situ* et *in vitro* des produits de PI3K (les 3-phospho-inositides) et *in situ* de la PI-PLC (l'inositol 1,4,5 trisphosphate). En revanche, ces altérations sont abolies par le traitement des fibroblastes transformés par v-Src avec des inhibiteurs pharmacologiques de la PI3K et de la PI-PLC, ou par transfection stable avec un vecteur d'expression de la p85 α dépourvue de son domaine d'interaction avec la sous-unité catalytique p110, (entraînant une inactivation "dominante-négative"). Enfin, l'activation de la PI3K dans les fibroblastes transformés par l'oncogène v-Src et dans le "dominant-positif" de cette enzyme stimule l'activité de la PI-PLC, alors que cette dernière est inhibée après traitement avec des inhibiteurs de la PI3K ou chez le "dominant-négatif". Toutefois, dans les fibroblastes transformés, l'inhibiteur de la PI-PLC n'entraîne pas d'inhibition de la PI3K. Ces résultats suggèrent qu'une activation permanente et séquentielle de la PI3K et de la PI-PLC est compatible avec la viabilité et la prolifération cellulaires et est nécessaire pour la réorganisation du cytosquelette d'actine, le "ruffling" membranaire et la macropinocytose, propriétés constitutives des fibroblastes transformés par des oncogènes.

Constitutive Macropinocytosis in Oncogene-transformed Fibroblasts Depends on Sequential Permanent Activation of Phosphoinositide 3-Kinase and Phospholipase C

Mustapha Amyere,* Bernard Payraastre,[†] Ulrike Krause,[‡] Patrick Van Der Smissen,* Alex Veithen,* and Pierre J. Courtoy*[§]

*Cell and [†]Hormone Units, Université Catholique de Louvain and Christian de Duve Institute of Cellular Pathology, 1200 Brussels, Belgium; and [‡]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 326, 31059 Toulouse, France

Submitted May 18, 2000; Revised July 6, 2000; Accepted July 12, 2000
Monitoring Editor: Joan S. Brugge

Macropinocytosis results from the closure of lamellipodia generated by membrane ruffling, thereby reflecting cortical actin dynamics. Both transformation of Rat-1 fibroblasts by v-Src or K-Ras and stable transfection for expression of dominant-positive, wild-type phosphoinositide 3-kinase (PI3K) regulatory subunit p85 α constitutively led to stress fiber disruption, cortical actin recruitment, extensive ruffling, and macropinosome formation, as measured by a selective acceleration of fluid-phase endocytosis. These alterations closely correlated with activation of PI3K and phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC), as assayed by 3-phosphoinositide synthesis in situ and in vitro and inositol 1,4,5 trisphosphate steady-state levels, respectively; they were abolished by stable transfection of v-Src-transformed cells for dominant-negative truncated p85 α expression and by pharmacological inhibitors of PI3K and PI-PLC, indicating a requirement for both enzymes. Whereas PI3K activation resisted PI-PLC inhibition, PI-PLC activation was abolished by a PI3K inhibitor and dominant-negative transfection, thus placing PI-PLC downstream of PI3K. Together, these data suggest that permanent sequential activation of both PI3K and PI-PLC is necessary for the dramatic reorganization of the actin cytoskeleton in oncogene-transformed fibroblasts, resulting in constitutive ruffling and macropinocytosis.

INTRODUCTION

Macropinocytosis refers to the formation of large, irregular primary endocytic vesicles by the closure of lamellipodia generated at ruffling membrane domains (for review, see Swanson and Watts, 1995). This phenomenon, therefore, is basically different from the endocytic recapture of the limiting membrane from large secretory granules after regulated secretion (Thilo, 1985). Although macropinocytosis was the first discovered form of nonparticulate endocytosis, i.e., pinocytosis (Lewis, 1931), research has focused for decades on receptor-mediated endocytosis in view of its specificity, physiopathological implications, and regulation by a multiprotein machinery of increasing complexity (for a recent review, see Marsh and McMahon, 1999). In addition to supporting receptor-mediated endocytosis, clathrin-coated micropinocytic pits certainly contribute a substantial frac-

tion of fluid-phase endocytosis, if not its totality (Cupers *et al.*, 1994).

Recently, however, macropinocytosis has received increasing attention. From a fundamental point of view, macropinocytosis depends directly on membrane-cytoskeleton interactions, thereby reflecting cortical actin dynamics and possibly cell motility. From a functional perspective, macropinocytosis may account for total nutrient supply in axenic strains of the amoeba *Dictyostelium discoideum* (Hacker *et al.*, 1997), for sampling of foreign antigens by immature dendritic cells (Sallusto *et al.*, 1995) to be presented by class II or even class I major histocompatibility complexes (Norbury *et al.*, 1995), and for the burst of uptake of the thyroid hormone precursor thyroglobulin in response to acute thyroid-stimulating hormone stimulation (Ketelbant-Balasse *et al.*, 1973; Ericson *et al.*, 1983). Presumably, macropinocytosis has also been subverted by pathogens such as *Salmonella* and *Shigella* that trigger their uptake to float in spacious phagosomes (Alpuche-Aranda *et al.*, 1994), and it may be used by *Chlamydia* for entry into dendritic cells (Ojcius *et al.*, 1998).

[§] Corresponding author. E-mail address: courtoy@cell.ucl.ac.be.

Interestingly, the regulation of macropinocytosis and phagocytosis in *D. discoideum* are different (Seastone *et al.*, 1999).

In most cell types, macropinocytosis is a transient response to phorbol esters (Swanson, 1989) or growth factors such as insulin, platelet-derived growth factor (PDGF), or macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) (Racoosin and Swanson, 1992), i.e., it vanishes rapidly despite continuous stimulation. In contrast, this activity is constitutive in axenic strains of *Dictyostelium* (Hacker *et al.*, 1997; Seastone *et al.*, 1999), in macrophages and dendritic cells (Swanson and Watts, 1995), and in v-Src-transformed fibroblasts (Veithen *et al.*, 1996, 1998). In the latter cells, topological origin, kinetics of intracellular movement, and sensitivity to a variety of pharmacological agents clearly distinguish macropinosomes from endosomes labeled by receptor-mediated endocytosis of transferrin (Veithen *et al.*, 1998). Bar-Sagi and Feramisco (1986) have reported that microinjection of Ras into fibroblasts also produces ruffling and the appearance of large pinocytic vacuoles, presumably macropinosomes. Conversely, microinjection in Ras-transformed cells of anti-Ras antibodies abrogated ruffling and large pinocytic vacuole formation (Bar-Sagi *et al.*, 1987). It is uncertain whether signaling machineries are identical for transient and constitutive macropinocytosis.

Constitutive macropinocytosis is abolished by pharmacological inhibitors of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) in v-Src-transformed fibroblasts (Veithen *et al.*, 1998) and by targeted PI3K gene disruption in *Dictyostelium* (Zhou *et al.*, 1998). Because transient signaling downstream of PDGF involves both PI3K and PI-PLC (Falasca *et al.*, 1998; Rameh *et al.*, 1998), it was tempting to suggest that the pathway from Src and Ras to constitutive macropinocytosis also depends on PI3K and PI-PLC and requires their permanent activation. This, in turn, would activate Rac, a key regulator of cytoskeletal actin dynamics.

Despite Src being a key regulator of the actin cytoskeleton, its downstream signaling is still unclear (Thomas and Brugge, 1997; Penuel and Martin, 1999). Reactivation of thermosensitive mutants of v-Src rapidly induces extensive reorganization of the actin cytoskeleton, including induction of membrane ruffling and stress fiber breakdown (Boschek *et al.*, 1981), which precede the loss of focal adhesion (Meijne *et al.*, 1997). Src phosphorylates several cytoskeletal targets, including cortactin (Dehio *et al.*, 1995) and focal adhesion kinase (Meijne *et al.*, 1997). Alternatively, v-Src could indirectly control the cytoskeleton by activation of PI3K upon interaction of its SH3 domain with the regulatory subunit of PI3K (Liu *et al.*, 1993). Whether these two pathways cross-talk, and/or which predominantly controls the actin cytoskeleton, are unknown at present.

Among its multiple downstream signaling pathways, Ras, like Src, signals to Rac via PI3K (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1997). Ras coimmunoprecipitates with and directly activates PI3K (Sjölander *et al.*, 1991; Rodriguez-Viciano *et al.*, 1997). Microinjection of the constitutively activated V12 Ras mutant produces profound alterations of the cytoskeleton, including membrane ruffling, that are abolished by wortmannin or dominant-negative Rac. In contrast, ruffling produced by constitutively active Rac is not sensitive to wortmannin (Kotani *et al.*, 1995; Nobes *et al.*, 1995).

The heterodimeric PI3K enzymes are divided in three classes (Fruman *et al.*, 1998). Class IA mammalian enzymes are made of a catalytic subunit, p110, that can be activated by Ras and a regulatory or adaptor subunit, p85, that includes two SH2 domains and one SH3 domain and that can be translocated to the plasma membrane by Src. In turn, the regulatory subunit recruits the PI3K catalytic subunit at the plasma membrane, where it catalyzes the phosphorylation of the hydroxyl group on the third carbon of the inositol ring of inositol lipids, producing the D3 phosphoinositides subgroup, mainly phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate [PtdIns(3,4)P₂] and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate [PtdIns(3,4,5)P₃] (Martin, 1998). As shown with the insulin signaling cascade leading to GLUT1 translocation, overexpression of wild-type p85 α leads to a dominant-positive phenotype, whereas overexpression of a truncated form unable to interact with the catalytic subunit results in a dominant-negative phenotype (Hara *et al.*, 1994).

PI-PLC can also be activated by plasma membrane recruitment to generate the second messengers inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃), which increases the cytosolic calcium concentration, and diacylglycerol, which activates PKC isoenzymes. Among various PI-PLC subclasses, PLC γ isoforms include a large internal region containing two SH2 domains and one SH3 domain that mediate its interaction with tyrosine kinase-linked receptors and possibly Src kinases as well as their products. In addition, PLC γ 1, but not PLC γ 2, preferentially associates with membrane ruffles and can be activated directly by PI3K lipid products (Barker *et al.*, 1998). PtdIns(3,4,5)P₃ activates PLC γ isoforms in vitro upon interaction with their SH2 domains (Bae *et al.*, 1998), and overexpression of a constitutively active PI3K increases intracellular IP₃ levels, whereas, conversely, PLC γ 1 activation is blocked by PI3K inhibitors in mast cells (Barker *et al.*, 1998). However, although these observations suggest a sequential activation of PI3K and PLC γ 1, the existence of independent PI3K and PLC γ 1 pathways in response to PDGF activation has been suggested in endothelial cells (Rönnstrand *et al.*, 1999).

Thus, multiple, possibly interacting, pathways documented for transient responses in other systems could be permanently activated to account for constitutive ruffling and macropinocytosis of oncogene-transformed cells. In this paper, we have explored signaling pathways that should be activated by v-Src and K-Ras to reorganize the actin cytoskeleton and result in constitutive macropinocytosis. Macropinocytosis was characterized by morphological approaches and quantified by biochemical assays. We used two unrelated pharmacological inhibitors of both PI3K and PI-PLC, measured these enzyme activities, and established two stable PI3K transfectants. The first transfectant, to express in control cells wild-type p85 α and generate a dominant-positive phenotype, served to test whether PI3K activation would be sufficient for constitutive macropinocytosis. The other transfectant, to express in v-Src-transformed cells a truncated p85 α and generate a dominant-negative phenotype, was used to test whether PI3K activation by the oncogene is indeed necessary for constitutive macropinocytosis. We found that transduction signaling leading to constitutive macropinocytosis in oncogene-transformed fibroblasts de-

pends on permanent sequential activation of PI3K and PI-PLC.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Parental Rat-1 cells (Rat-1/control) and Rat-1 cells transformed by the B77 subclone of Rous sarcoma virus (Rat-1/v-Src) were obtained from Dr. Guy Rousseau (Christian de Duve Institute of Cellular Pathology; these cell lines were originally transferred to this institute by Dr. John Wyke, The Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, UK). The endocytic properties of these cell lines have been characterized (Veithen *et al.*, 1996, 1998). Rat-1 cells infected by the Kirsten sarcoma virus (Rat-1/K-Ras) were kindly provided by Dr. John Wyke and subcloned in our laboratory based on the transformed phenotype. Two such clones provided identical results. The various cell lines were grown at 37°C in DMEM (Life Technologies, Grand Island, NY) supplemented with 20 mM glucose, 4 mM glutamine, 10 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, 10 µg/ml streptomycin, 66 µg/ml penicillin, and 10% (vol/vol) FCS (Life Technologies) under 8% CO₂. They were usually seeded for biochemical experiments at ~10⁶ cells on 8-cm² Petri dishes and at 30,000 to 40,000 cells/cm² on either glass chambers (Lab-Tek, Life Technologies, Nunc, Roskilde, Denmark) or glass coverslips for confocal microscopy. We have shown previously that the fluid-phase endocytic uptake of peroxidase in Rat-1/control and Rat-1/v-Src cells is independent of the cell density in the range used for our studies (Veithen *et al.*, 1998). Before each experiment, cells were rinsed twice with FCS-free DMEM and preincubated therein for 30 min before the addition of endocytic tracers to avoid interference by short-lived growth factor effects.

Transfection

To obtain cell lines stably transfected with the wild-type (Wp85α) or mutant (Δp85α) regulatory subunit of bovine PI3K, cells were cotransfected with 10 µg of Wp85α or Δp85α expression plasmids (under the control of the SRα promoter; kindly provided by Dr. Wataru Ogawa, Kobe University, Kobe, Japan) (Hara *et al.*, 1994; Kotani *et al.*, 1994) and 1 µg of pSVTKNEO β selection plasmid with the use of the Lipofectamine method as recommended by the manufacturer (Life Technologies). Stable lines were selected by exposure to 0.5 mg/ml geneticin (G418; Life Technologies) and subcloned by limiting dilution.

Scanning Electron Microscopy

Cells cultured overnight on glass (50,000 cells/coverslip) were washed briefly with PBS followed by 0.14 M cacodylate and then fixed for 20 min at room temperature by the slow addition of 4% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate until a final 2% glutaraldehyde concentration was reached. After two washes in 0.14 M cacodylate, cells were postfixed in 2% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer for 1 h at 4°C, dehydrated in a graded ethanol series, and critical point-dried (CPD 020 unit, Balzers Union, Liechtenstein). A 10-nm gold film was sputter-coated, and specimens were observed at 80 kV in a CM12 electron microscope (Philips, Eindhoven, the Netherlands) with the use of the secondary electron detector. Images were stored in digital form with the use of the SIS analysis software, version 2.1 (Soft-Imaging Software, Münster, Germany).

Confocal Microscopy

After filling by a brief incubation in 1 mg/ml Texas Red–dextran, macropinosomes in living cells were studied with an Axiovert confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) coupled to MRC 1024 confocal scanning equipment (Bio-Rad, Richmond, CA) with the use of both bright-field contrast and fluorescence images. Gen-

eral cell structure images were captured by the transmission bright-field detectors with the use of the blue light channel, instead of phase contrast, to prevent weakening of the emission light from the fluorochromes by the contrast ring of the objective. Observation was made with a Zeiss plan-apochromat 63X/1.40 oil differential interference contrast objective, without the use of a polarizer, analyzer, or the corresponding Wollaston prism. This mode corresponds to a bright-field image without phase or differential interference contrast. To achieve satisfactory contrast, classic Koehler illumination was complemented by a supplementary diaphragm (differential interference contrast, 0.3–0.4/0.9) in the condenser turret of the Axiovert confocal microscope. The formation of macropinosomes at ruffling zones was followed by time-lapse recording at 10-s interval.

For actin cytoskeleton staining, cells were plated on glass coverslips, fixed in formaldehyde, permeabilized with Triton X-100, and incubated with 1 µg/ml rhodamine–phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR) for 15 min at 4°C with 0.1% BSA in PBS-Ca²⁺ (137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 3.6 mM CaCl₂, 3 mM MgCl₂, pH 7.3) in the dark. After extensive washing (five times) with PBS, coverslips were mounted in Mowiol (Calbiochem, San Diego, CA) with 2.5% DABCO (Janssen, Beerse, Belgium) and examined with the confocal microscope.

Fluid-Phase Endocytosis of Peroxidase

After the indicated intervals in DMEM supplemented with 4 mg/ml HRP (type 2; Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), cells were rapidly transferred to 4°C by immersion in PBS-Ca²⁺ and washed extensively (three rapid washes with 3 ml of PBS-Ca²⁺, one wash for 5 min in 1 ml of DMEM containing 10% outdated FCS, and three rapid washes with 3 ml of PBS-Ca²⁺). Cells were surface-digested at 4°C for 1 h in DMEM supplemented with 0.15% (wt/vol) pronase (Sigma Chemical, St. Louis, MO) and pelleted in a benchtop microfuge (Beckman, Fullerton, CA) for 10 min at 4°C. The pellet was washed twice by resuspension/sedimentation in PBS-Ca²⁺ and finally lysed in 0.01% (vol/vol) Triton X-100 (Serva Biochemicals, Heidelberg, Germany). HRP activity in the lysate was measured by a stopped colorimetric assay with the use of *ortho*-dianisidine as a substrate (Cuppers *et al.*, 1994), normalized to a 1 mg/ml extracellular concentration (to provide data equivalent to clearance values, expressed in nl/mg cell protein), and divided by the cell protein content measured by the bicinchoninic acid procedure with BSA as a standard (Smith *et al.*, 1985). Endogenous peroxidase activity, equivalent to ~15 ng HRP/mg cell protein, was subtracted from all values as blank.

For experiments with cytochalasin E, wortmannin, 2-nitro-4-carboxyphenyl *N,N*-diphenylcarbamate (NDC) (all Sigma), LY294002, and U73122 (both Calbiochem), all stock solutions were made in DMSO. The final concentration in this solvent never exceeded 0.2% (vol/vol), at which concentration DMSO affected neither the quantitative intracellular uptake of HRP nor the qualitative labeling with Texas Red–dextran.

Receptor-mediated Endocytosis of Transferrin

Iron-saturated human transferrin (Sigma) was radiolabeled with [¹²⁵I]iodine (100 mCi/ml; Amersham, Buckinghamshire, UK) as described (McFarlane, 1958) to a specific radioactivity of 500–1100 cpm/ng protein. Cells were incubated at 37°C in DMEM containing 2 µg/ml [¹²⁵I]-transferrin, washed extensively at 4°C, surface-digested with pronase, pelleted, rinsed, and lysed in Triton X-100 as described above. The radioactivities associated with the pellet and the supernatant were taken as measures of intracellular and surface-bound transferrin, respectively. Intracellular [¹²⁵I]-transferrin content was divided by pronase-releasable counts to yield endocytosis efficiency (Wiley and Cunningham, 1982).

Pulse-Chase Experiments

For pulse-chase experiments, cells were incubated at 37°C in DMEM supplemented with HRP for 30 min or with transferrin for 7 min,

washed briefly at 4°C, and reincubated at 37°C for the indicated intervals. Thereafter, cells were transferred rapidly to 4°C, washed extensively as described above, digested with pronase, pelleted, lysed, and assayed for HRP activity or radioactivity and protein content. Results were expressed as the residual fraction of the intracellular amount of tracer at the initiation of the chase and adjusted by least-squares fitting to an exponential decay equation as reported previously (Cupers *et al.*, 1994).

Western Blotting

Cells were solubilized in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% Nonidet P-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, a mixture of aprotinin, leupeptin, and pepstatin (5 mg/ml each), 1 mM Na₂VO₄, and 1 mM NaF, boiled for 3 min in Laemmli buffer with 0.1 M DTT, and separated on 7.5% polyacrylamide gels. Proteins were transferred from the gel to a polyvinylidene difluoride membrane (Boehringer Mannheim) during 16 h at 250 mA in 100 mM Tris, 16 mM glycine, and 20% methanol. After blocking for ~2 h in 50 mM Tris, 90 mM NaCl, and 2 mM CaCl₂, pH 8, containing 5% (wt/vol) BSA, the membrane was incubated overnight at 4°C under gentle shaking with 1 µg/ml in the same buffer containing 1% BSA and a 1:1000 dilution of rabbit anti-rat p85 antiserum (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Bound antibodies were detected with ¹²⁵I-protein A (30 mCi/mg, 1 µCi/blot; Amersham) and then washed. Dried polyvinylidene difluoride membranes were exposed for 1–2 d to a phosphor screen, and the signal was detected with a PhosphorImager and quantified with ImageQuant (both from Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

In Situ Assay of PI3K

This assay was based on metabolic labeling of lipids in living cells, followed by HPLC analyses of 3-phosphoinositides. Cells (~20 million per 150-cm² Petri dish) were incubated in phosphate-free DMEM containing 0.5% FCS and 250 µCi/ml [³²P]orthophosphate (9000 Ci/mmol; Amersham) for 6 h at 37°C in the presence or absence of inhibitors. Cells were washed briefly in PBS at 4°C and harvested with 3.75 ml of 2.4 N HCl, and the dish was further rinsed with 3 ml of methanol. Lipids of these combined fluids were extracted with 4.5 ml of chloroform, dried under N₂, and then separated by thin-layer chromatography on silica gel-coated plates (Merck, Darmstadt, Germany) with the use of chloroform:acetone:methanol:acetic acid:water (80:30:26:24:14, vol/vol). The spots corresponding to PtdIns(3,4)P₂ and PtdIns(3,4,5)P₃ were identified by staining with iodine vapor, scraped off, deacylated, and analyzed with HPLC on a SAX column (Whatman, Maidstone, United Kingdom), as described (Gratacap *et al.*, 1998).

In Vitro Assay of PI3K

Cells were solubilized on ice with 500 µl of lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.2, 50 mM β-glycerophosphate, 50 mM KF, 5 mM NaPPi, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.2% Triton X-100, 1 mM DTT, 1% Nonidet P-40, 0.5 µM microcystin, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml aprotinin, 1 mM benzamidin, 0.2 mM PMSF, 4 µg/ml trypsin inhibitor, 1 µg/ml pepstatin, 2 mM Na₂VO₄). To test for insulin sensitivity, control cells were incubated with 100 nM insulin for exactly 1 min. After 10 s of agitation, the lysate was frozen as aliquots in liquid N₂. For the analysis, thawed samples were centrifuged at 4°C (20 min at 10,000 × g). An aliquot of the supernatant (corresponding to 1 mg of protein) was immunoprecipitated in the presence of lysis buffer for 2 h with 3 µg of rabbit anti-IRS-1 (Upstate Biotechnology) preabsorbed to 20 µl of protein A-Sepharose (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The immunoprecipitate was washed three times with PBS containing 1 mM Na₂VO₄, including 1% Nonidet P-40 in the first washing. PI3K activity was finally measured as described (Krause *et al.* 1996).

In Situ Assay of PI-PLC

This activity was assayed by quantification of intracellular IP₃ levels, as recommended by the manufacturer (New England Nuclear Life Science, Boston, MA). Briefly, cells were preincubated at 37°C in DMEM supplemented with 10% FCS overnight, washed rapidly with PBS-Ca²⁺, and transferred for 1 h to DMEM without serum in the presence or absence of the indicated inhibitors; the last 10 min occurred with 10 mM added LiCl. The reaction was terminated by aspirating the medium off the cells and adding 20% (wt/vol) ice-cold trichloroacetic acid. Cells were scraped off on ice, vortexed, and centrifuged at 1000 × g for 10 min. The supernatant was further incubated for 15 min at room temperature. After trichloroacetic acid was removed by extraction with trichlorotrifluoroethane:triethylamine (3:1), IP₃ in cell extracts was determined by a competitive radioligand-binding assay with the use of a standard membrane receptor preparation and 0.4 µCi/ml [³H]IP₃. After 1 h of binding on ice, membranes were recovered by centrifugation at 2000 × g for 20 min and dissolved with 0.15 M NaOH, and radioactivity was determined in a scintillation counter. IP₃ concentration was determined in triplicate based on a standard curve and expressed as pmol/mg protein.

RESULTS

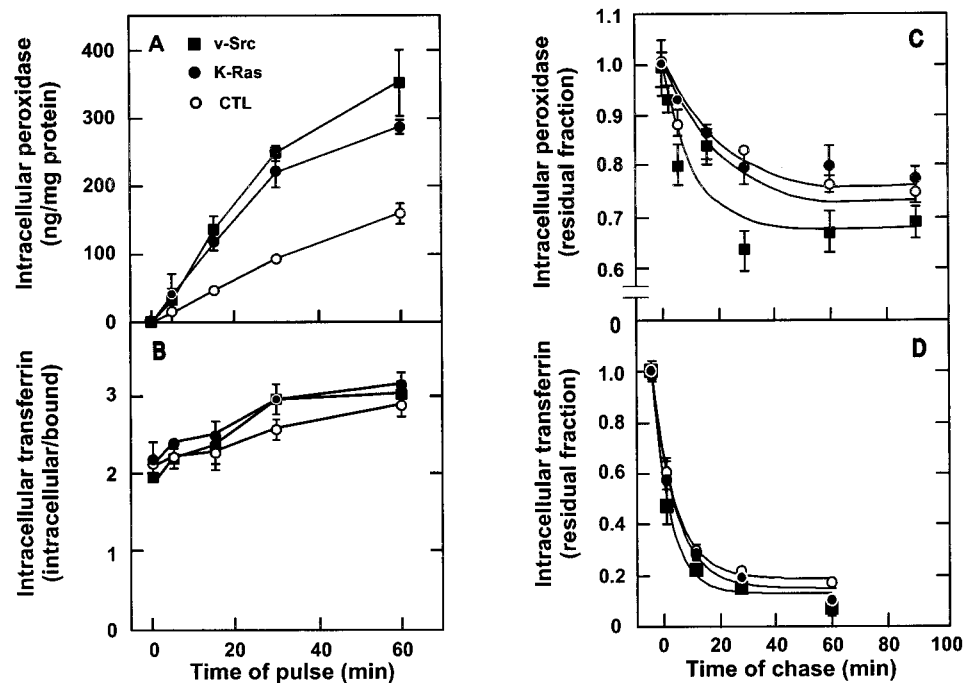
v-Src and K-Ras Constitutively and Selectively Accelerate Fluid-Phase Endocytosis in Fibroblasts

We have previously reported, in experiments with both a thermosensitive and a thermostable variant of pp60^{src}, that v-Src causes constitutive macropinocytosis in Rat-1 fibroblasts (Veithen *et al.*, 1996, 1998). The analysis was first extended to subcloned K-Ras-transformed Rat-1 cells. Fluid-phase endocytosis, followed by the intracellular accumulation of HRP in serum-deprived cells, was similarly accelerated approximately twofold by either v-Src or K-Ras (Figure 1A). The difference was already evident after 5 min of uptake, arguing against an effect by inhibition of fluid-phase efflux (i.e., regurgitation). This was confirmed by pulse-chase experiments, in which efflux was comparable in K-Ras-transformed fibroblasts and even moderately accelerated in v-Src-transformed fibroblasts (Figure 1C). Thus, both oncogene products accelerate fluid-phase entry. This effect was selective for fluid-phase endocytosis, because pathways of receptor-mediated endocytosis of transferrin were only marginally affected by v-Src and K-Ras, both in entry (Figure 1B) and efflux (Figure 1D). Although Src kinase was recently reported to accelerate receptor-mediated endocytosis of EGF, its effect was also marginal in fibroblasts after intervals of uptake of >1 min, as used in the present study (Wilde *et al.*, 1999). A selective stimulation of fluid-phase endocytosis is suggestive of macropinocytosis.

Production of Macropinosomes by Constitutive Ruffling and Their Fate in Transformed Fibroblasts

In contrast to the spindle-shaped parental Rat-1 fibroblasts, v-Src- and K-Ras-transformed Rat-1 fibroblasts generally exhibited one major or a few elongated cellular extensions that showed active ruffling at their tips. By scanning electron microscopy, these active zones generated curling lamellipodia (Figure 2). With bright-field contrast and time-lapse recording, individual lamellipodia were most conveniently studied at the tips of these cellular extensions, where they were shown to fold back against one another and isolate large fluid droplets that rounded up within 10 to 20 s, i.e.,

Figure 1. Constitutive stimulation of fluid-phase, but not receptor-mediated, endocytosis by v-Src and K-Ras. Control (○), v-Src-transformed (■), or K-Ras-transformed (●) Rat-1 fibroblasts were transferred for 30 min in DMEM without serum and then incubated in DMEM supplemented with 4 mg/ml HRP for the indicated intervals of pulse (A) or 30 min (C) or with 50 nM ^{125} I-transferrin and 1% BSA for the indicated intervals of pulse (B) or 7 min (D). Cells in C and D were briefly washed at 4°C and reincubated in DMEM at 37°C for the indicated intervals of chase. Finally, cells were washed extensively at 4°C and surface-digested with pronase. Values of intracellular accumulation of HRP were normalized as indicated in MATERIALS AND METHODS. Intracellular ^{125} I-transferrin accumulation was divided by pronase-releasable counts (considered as surface-bound) to yield receptor-mediated endocytosis efficacy. In C and D, residual intracellular contents normalized as described above were expressed as percentages of corresponding values at the end of the chase, and curves were fitted to monoexponential decays. Values shown are means $\pm$ SD of three dishes from one experiment. Kinetics of uptake and chase was reproduced at least three times and twice, respectively.



macropinosomes (Figure 3). At the peripheral ruffling zones, macropinosomes were generated one after the other, about every 1 min, producing linear alignments along the slender cellular extensions. Macropinosomes then showed a slow centripetal movement along the cellular extension, at a rate of $\sim 1 \mu\text{m}/\text{min}$ at $\sim 25^\circ\text{C}$. This kinetics is comparable to that reported for the lucent pinocytic vesicles generated at the growth cone of isolated dorsal root ganglion neurons (Nakai, 1956) or for photobleached actin filaments at lamellipodia (Condeelis, 1993). Infrequently, macropinosomes could fuse with one another; again, the fusion product rapidly rounded up, indicating external tension or internal pressure.

Filling of light-lucent vesicles by Texas Red-dextran could readily be seen by confocal microscopy in v-Src-transformed (Figure 4B) and K-Ras-transformed Rat-1 fibroblasts (comparable image; our unpublished results), directly demonstrating their endocytic nature. The combination of a short pulse with the appropriate setting of fluorescence detection allowed us to limit detection to macropinosomes and to leave endosomes essentially undetected (Veithen *et al.*, 1998). Texas Red-dextran-labeled macropinosomes were exceptional in the parental Rat-1 cells (Figure 4A).

Constitutive Macropinocytosis in Transformed Fibroblasts Depends on Actin Cytoskeleton Reorganization

In control Rat-1 fibroblasts, F-actin was mostly associated with longitudinal stress fibers that were colinear when cells were aligned (Figure 5A). In v-Src-transformed (Figure 5B) and K-Ras-transformed Rat-1 fibroblasts (Figure 5E), stress

fibers had disappeared and F-actin was mostly recruited to ruffling membrane domains. Upon incubation for 30 min in $1 \mu\text{M}$ cytochalasin E, one of the most potent members of this family of inhibitors, both stress fibers and F-actin at the ruffling zones became fragmented (our unpublished results). Whereas intracellular accumulation of peroxidase in parental Rat-1 fibroblasts was not affected by cytochalasin E, it was severely inhibited in v-Src- and K-Ras-transformed cells, almost to the level of their nontransformed counterpart (Figure 6).

Constitutive Macropinocytosis in Transformed Fibroblasts Depends on PI3K Activity

The difference in intracellular peroxidase accumulation between v-Src- or K-Ras-transformed fibroblasts and their nontransformed counterpart was abrogated within less than 1 h upon pharmacological inhibition of PI3K by wortmannin and LY294002 (Figure 7, A and B). The inhibition was dose-dependent and complete at 100 nM wortmannin and $20 \mu\text{M}$ LY294002. Although receptor-mediated endocytosis of transferrin was reported to be sensitive to wortmannin in various cell types (Spiro *et al.*, 1996), it was not appreciably affected by the two PI3K inhibitors in the three cell lines analyzed in this study (Figure 7C).

Effect of Dominant-Positive and Dominant-Negative p85 α

Because bovine regulatory subunit p85 α can interact with the p110 PI3K catalytic subunit from various species, we

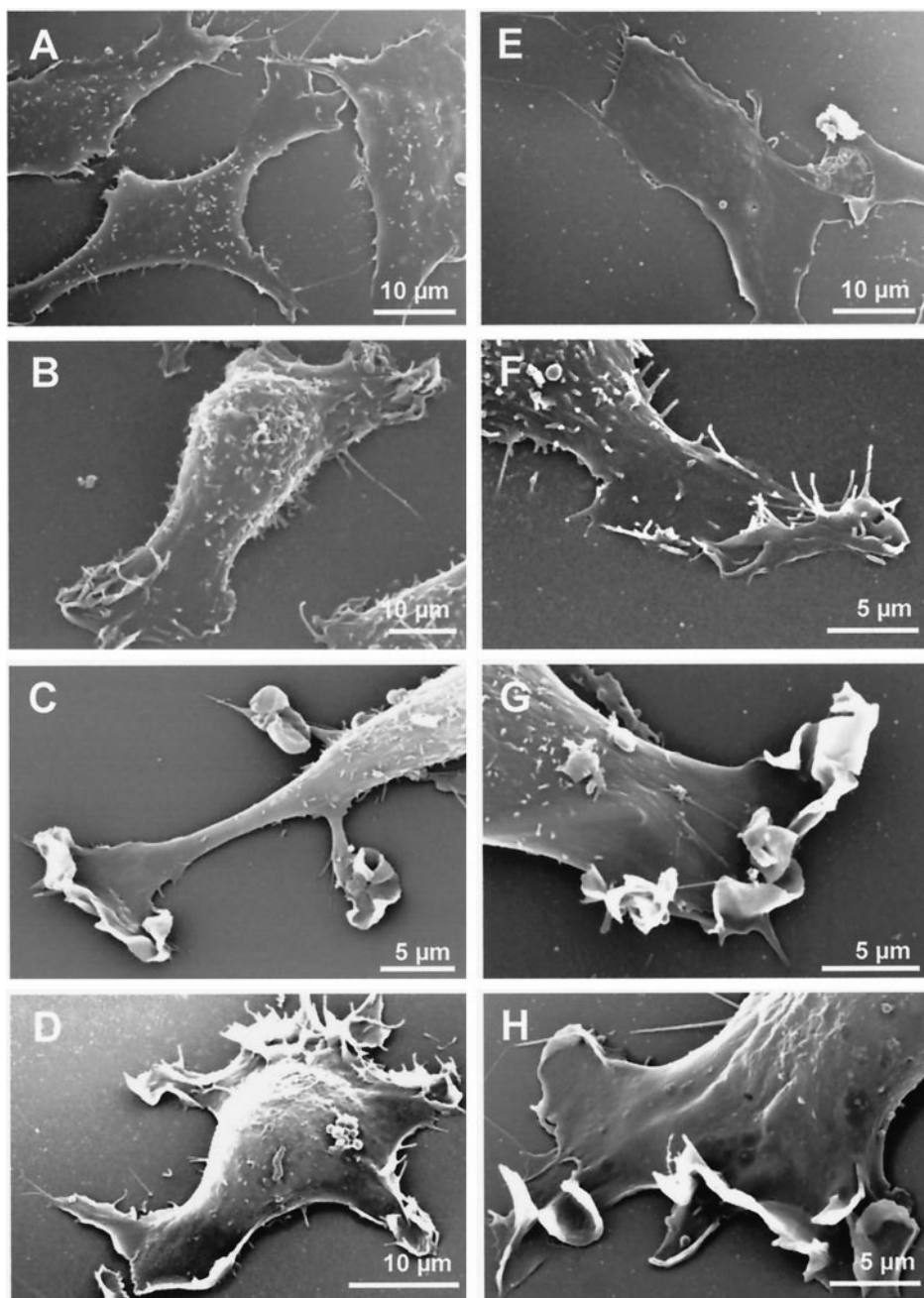


Figure 2. Scanning electron microscopy. (A) Control Rat-1 fibroblasts; (B and F) v-Src fibroblasts; (C and G) K-Ras fibroblasts; (D and H) Wp85 α fibroblasts; (E) v-Src/ Δ p85 α fibroblasts.

stably transfected the parental Rat-1 fibroblasts with a plasmid coding for wild-type bovine p85 α to generate dominant-positive cells (referred to as Wp85 α). We also stably transfected v-Src-transformed Rat-1 fibroblasts with an expression vector for a truncated bovine p85 α subunit whose domain of interaction with the catalytic PI3K subunit was deleted to generate dominant-negative cells (v-Src/ Δ p85 α). As a result, the intensity of p85 demonstrated by Western blotting increased $\sim$ 2.5-fold both in Wp85 α cells compared with nontransfected control fibroblasts and in v-Src/ Δ p85 α cells compared with nontransfected v-Src fibroblasts (Figure

8). These values suggest a moderate overexpression of exogenous p85 in the stable transfectants, as anticipated for viable constructs, but do not allow us to accurately establish the relative level of exogenous and endogenous p85, because it cannot be ascertained whether antibodies raised against endogenous (rat) p85 recognize with equivalent efficiency exogenous (bovine) p85. Interestingly, transformation by Src and Ras enhanced p85 expression by itself ($\sim$ 2.3- and 1.5-fold, respectively).

Both stable transfectants showed dramatic phenotypic alterations. Rat-1 cells stably transfected for wild-type

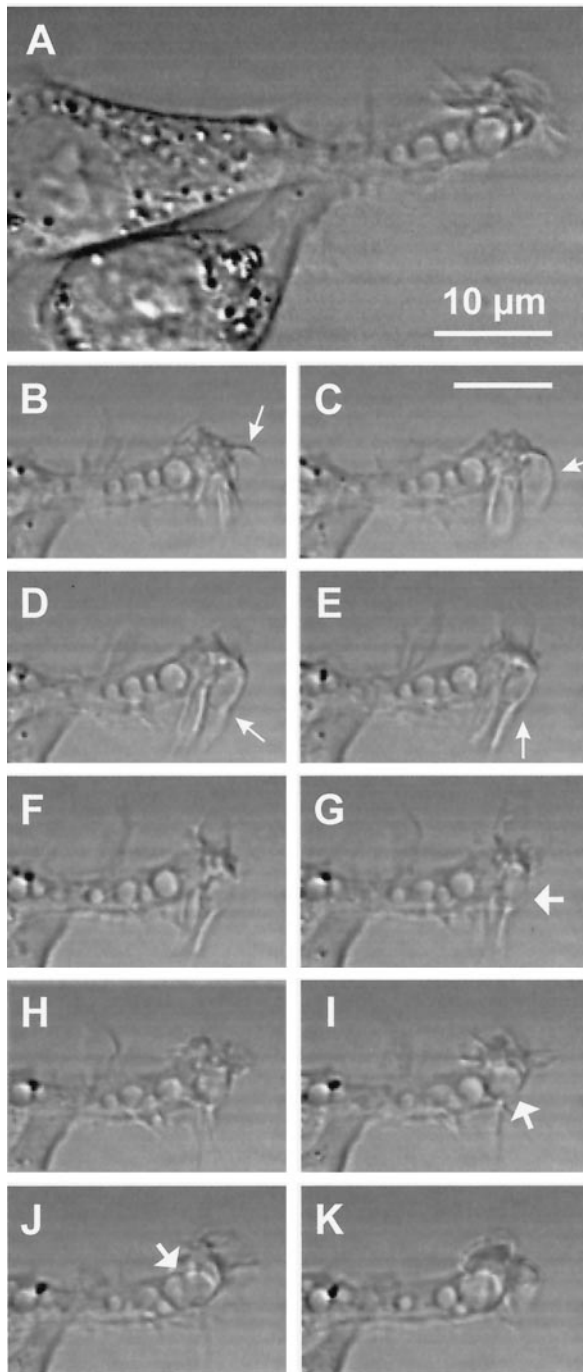


Figure 3. Formation of a macropinosome by membrane ruffling in a v-Src-transformed fibroblast. (A) Bright-field contrast image of overlapping cellular extensions from two adjacent v-Src fibroblasts. The extension in the focal plane contains four round electron-lucent vacuoles of irregular size, and its tip shows active ruffling. The 10 smaller images below are taken from the same field at 10-s intervals. At the ruffling membrane, a large lamellipodium (arrows in B–E) appears to fold back and to generate an ovoid macropinosome (arrow in G), which rounds up within ~10 s (H), then docks to (I) and fuses with (J) a preexisting macropinosome. The fused organelle similarly rounds up within 10 s (K). Bars, 10 μ m.

bovine p85 α expression (Wp85 α) assumed a round cell body, devoid of stress fibers (Figure 5C), but showing one major or several cellular extensions, with extensive ruffling (Figure 2, D and H) and active macropinosome generation, even more than in v-Src-transformed cells (Figure 4C). This was reflected by a strong increase of peroxidase accumulation without a change in peroxidase efflux (Figure 9).

In contrast, v-Src-transformed Rat-1 fibroblasts stably transfected for expression of truncated bovine p85 α (v-Src/ Δ p85 α) assumed an abnormally flat and spread-out appearance, rigidified by an extensive array of parallel stress fibers (Figure 5D), and no longer showed ruffling (Figure 2E) and macropinosome formation (Figure 4D). This was reflected by a similar level of peroxidase accumulation as in the original Rat-1 fibroblasts (see Figure 11A).

Interestingly, the effect of Src and dominant-positive p85 α transfection on the actin cytoskeleton could be reversed within 30–60 min by pharmacological inhibitors of either PI3K (100 nM wortmannin; Figure 5F) or PI-PLC (100 μ M NCDC; our unpublished results). This was paralleled by a strong decrease of the population of cells showing active membrane ruffling upon wortmannin ($16 \pm 8\%$ of the fraction observed in untreated v-Src cells, $2 \pm 4\%$ for Wp85 α cells) or NCDC ($32 \pm 14\%$ of the fraction in untreated v-Src cells, $10 \pm 8\%$ for Wp85 α cells) administration. In addition, the PI-PLC inhibitors NCDC and U73122 suppressed macropinocytosis in v-Src-transformed fibroblasts and in Wp85 α cells (Figure 10, A–C), without detectable effect on receptor-mediated endocytosis of transferrin. These rapid inhibitions indicated that active cytoskeleton remodeling, membrane ruffling, and macropinocytosis did not depend on (indirect) changes in gene expression but depended directly on permanent activation of PI3K and PI-PLC in these cells. This prediction was tested directly by corresponding enzyme assays.

Assays of PI3K

PI3K activity was first measured by an in situ assay, based on incorporation of ^{32} P, lipid extraction, and phosphoinositide analysis by HPLC, and compared with macropinocytosis, measured by the difference in peroxidase accumulation with control cells (Figure 11A). In Rat-1 and the dominant-negative construct v-Src/ Δ p85 α , ^{32} P incorporation into PtdIns(3,4)P₂ was low, and no incorporation could be detected at the position of PtdIns(3,4,5)P₃. In contrast, incorporation into PtdIns(3,4)P₂ was increased ~7-fold upon v-Src transformation, 4-fold upon K-Ras transformation, and >25-fold in the dominant-positive construct Wp85 α , and there was a signal of corresponding relative intensity at the position of PtdIns(3,4,5)P₃ in these cells. We have verified that ^{32} P incorporation into PtdIns(3,4)P₂ was abrogated by wortmannin and LY294002 in Src-transformed cells and by wortmannin in Wp85 α cells (all <5% of untreated cells). In contrast, this assay in Src cells was not affected by NCDC, a PI-PLC inhibitor that also abrogates macropinocytosis (Veithen *et al.*, 1998; see below). In addition, NCDC had no effect in an in vitro PI3K assay on two recombinant isoforms (the class I_A member p110 α /p85 α and the class I_B member p110 γ ; R. Stein, personal communication). This finding indicates that PI3K and PI-PLC are both involved in the sig-

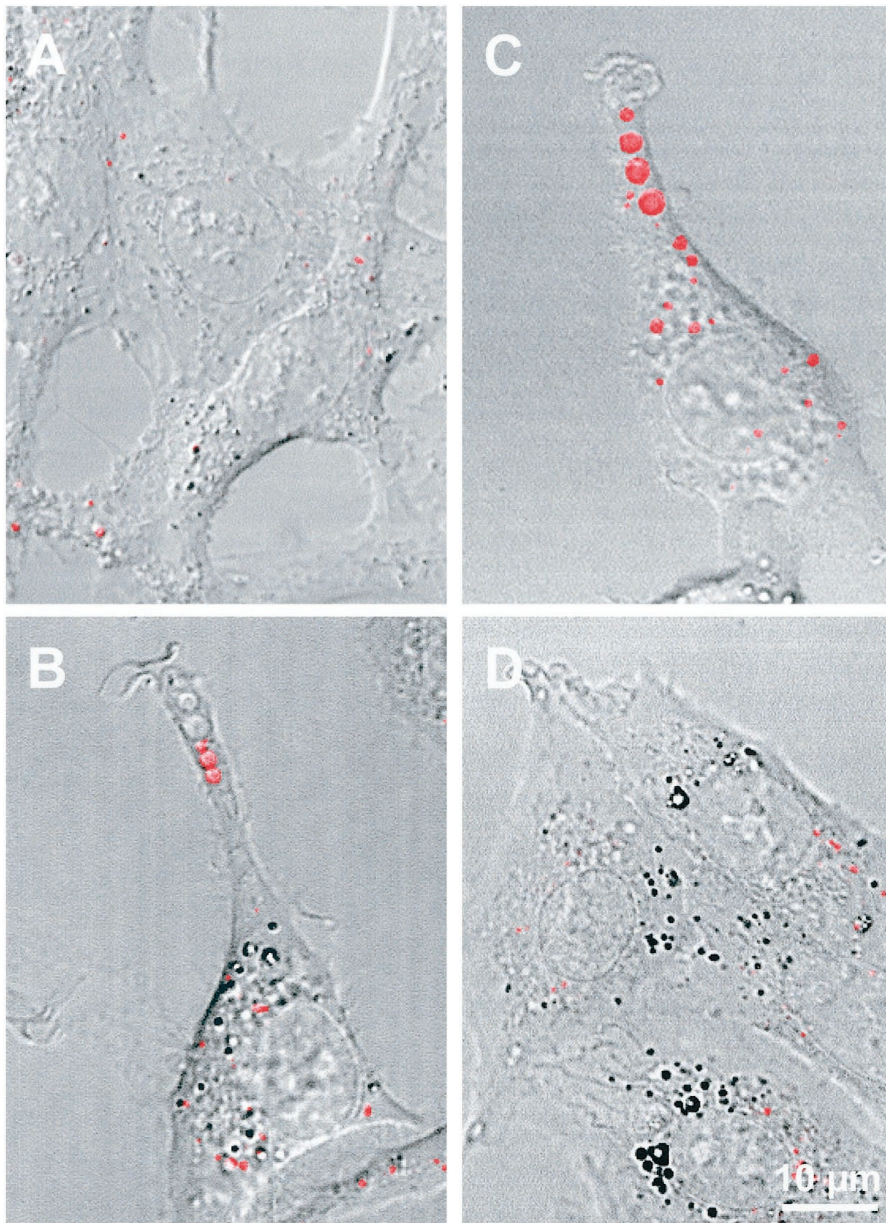


Figure 4. Filling of macropinosomes by a fluorescent fluid-phase tracer. The indicated cells were incubated for 7 min in DMEM supplemented with 1 mg/ml Texas Red-dextran, washed, and examined immediately in the confocal microscope by fluorescence and bright-field imaging. Fused images are presented. Extensions with ruffled ends that contain several aligned macropinosomes are evident in v-Src (B) and especially Wp85 α (C) fibroblasts. They are not seen in control (A) and v-Src/ Δ p85 α (D) fibroblasts. The two nonfluorescent distal macropinosomes in B were presumably formed after washing (see also Veithen *et al.*, 1998).

naling pathway leading to actin cytoskeleton remodeling in transformed cells.

Because Rat-1 fibroblasts respond to insulin, and rodent and bovine p85 α interact similarly with insulin-responsive substrate-1 (IRS-1), activation of PI3K was also explored by immunoprecipitation of IRS-1 followed by measurement of PI3K activity in the immunoprecipitate. This alternative *in vitro* assay, presented at Figure 11B, shows that PI3K recruitment at the plasma membrane, as retrieved by coimmunoprecipitation with IRS-1, was increased ~17-fold upon transformation with v-Src and 20-fold in the dominant-positive construct Wp85 α , but it was abolished in v-Src-transformed cells by the dominant-negative construct v-Src/ Δ p85 α .

Activation of PI-PLC and Its Relation with PI3K

The activity of PI-PLC was also measured *in situ* by quantification of intracellular levels of its product IP₃. In addition, because PDGF signaling involves PI3K and PI-PLC in sequential order (Falasca *et al.*, 1998) and inhibitors of both enzymes abrogate constitutive macropinocytosis in transformed fibroblasts (Veithen *et al.*, 1998), we finally explored their relation in the signaling cascade with the use of this assay. Activation of PI-PLC in v-Src-transformed fibroblasts and Wp85 α cells was demonstrated directly by a fivefold increase in IP₃ level, as measured by a radioreceptor assay (Figure 12). In these two cell lines, PI-PLC activation was

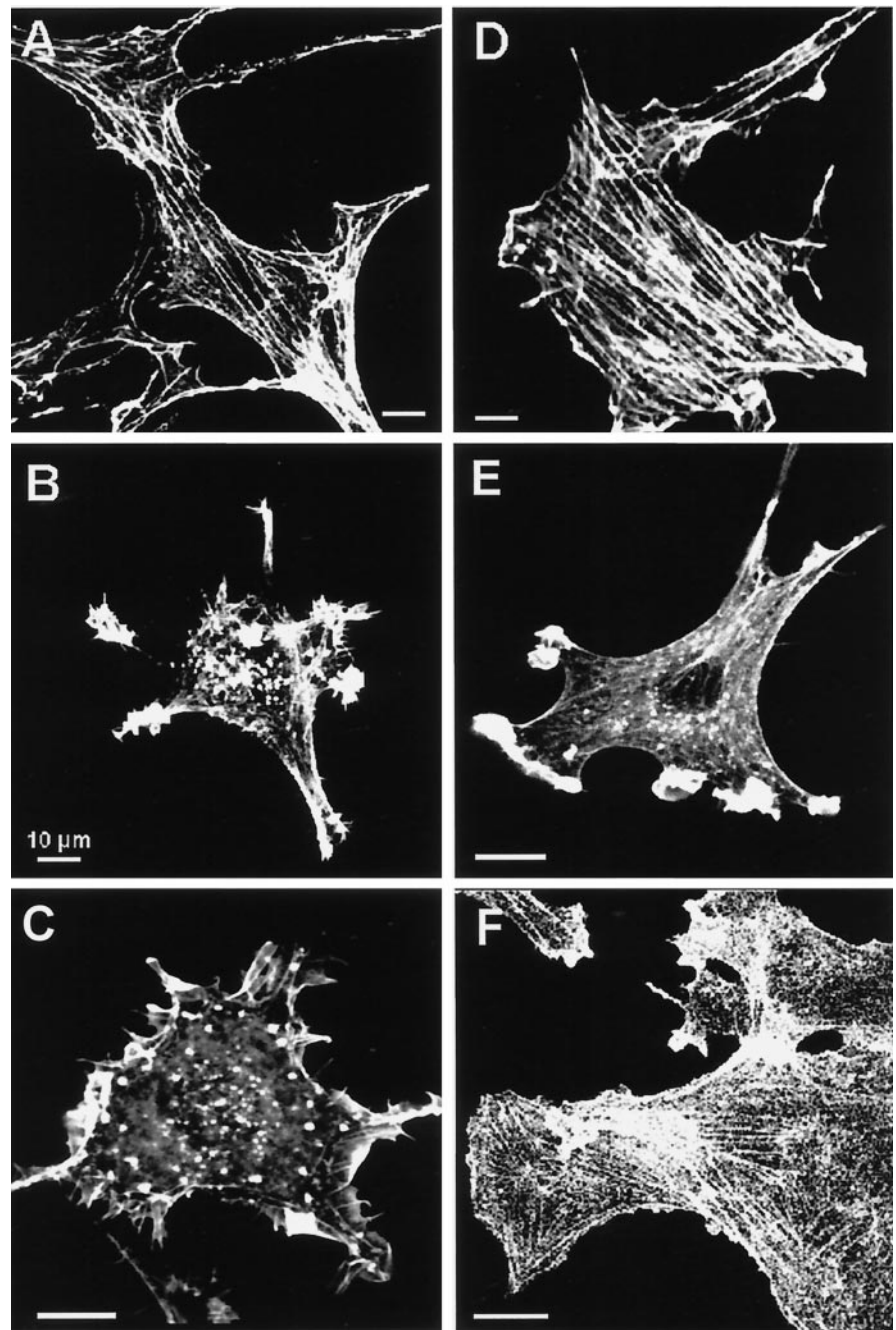


Figure 5. Actin cytoskeleton reorganization. F-actin was decorated with rhodamine-phalloidin in untreated control (A), v-Src (B), K-Ras (E), Wp85 α (C), v-Src/ Δ p85 α (D), or wortmannin-treated (100 nM for 30 min) Wp85 α (F) fibroblasts. Stress fibers are almost absent in v-Src (B), K-Ras (E), and Wp85 α (C) fibroblasts but reappear in these cells within 30 min after PI3K inhibition by wortmannin (F) and are prominent in stable v-Src/ Δ p85 α transfectants (D). Bars, 10 μ m.

suppressed not only by NCDC but also by wortmannin. PI-PLC activation was also suppressed by the dominant-negative construct of PI3K. These data demonstrate that PI-PLC is activated upon recruitment on PI3K products and thus place PI-PLC downstream of PI3K in the same signaling cascade of oncogene-induced constitutive macropinocytosis.

DISCUSSION

We have previously reported that v-Src causes constitutive macropinocytosis in Rat-1 fibroblasts (Veithen *et al.*, 1996, 1998). In

their pioneering study, Bar-Sagi and Feramisco (1986) had shown that microinjection of the constitutively activated oncoprotein H-Ras, a palmitoylated and farnesylated molecule that partitions into rafts (Roy *et al.*, 1999), produces lasting membrane ruffling and the appearance of large pinocytic vacuoles. The present study extends their observations to another activated oncogene, K-Ras. Because the latter, like v-Src, is rich in polybasic stretches and is not recruited on caveolar domains (Roy *et al.*, 1999), signaling through caveolae does not appear to be required for the stimulation of ruffling and pinocytosis. Our data further clarify the sig-

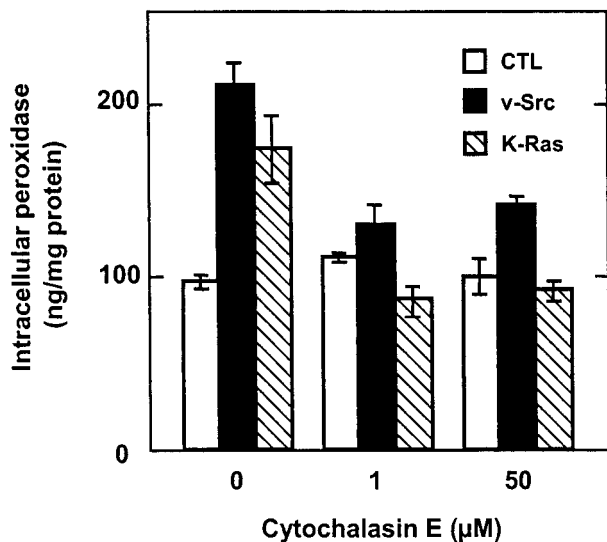


Figure 6. Constitutive macropinocytosis is abrogated by cytochalasin E in transformed fibroblasts. Control (white bars), v-Src (black bars), and K-Ras (hatched bars) fibroblasts were preincubated for 30 min in DMEM without serum supplemented with the indicated concentrations of cytochalasin E and then incubated for another 30 min in the same medium supplemented with 4 mg/ml HRP. Peroxidase accumulation is calculated as in Figure 1. Values are means $\pm$ SD of three dishes.

nificance of their observations by demonstrating that K-Ras enhances pinocytosis as a result of constitutive macropinocytosis. The analysis of its signaling pathway also provides a molecular linkage with v-Src-induced constitutive macropinocytosis (Veithen *et al.*, 1996, 1998).

Macropinocytosis, an integrated end point of membrane-cytoskeleton interactions, is currently receiving considerable

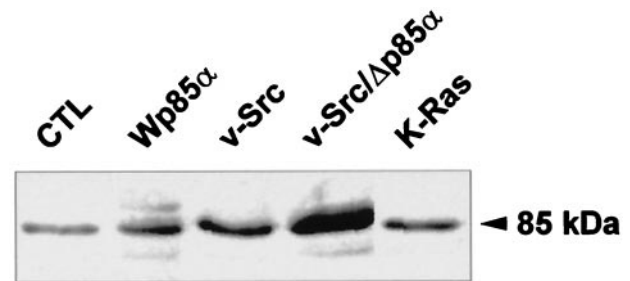


Figure 8. p85 expression. Equal loads of the indicated cell lysates were analyzed by Western blotting with a polyclonal antiserum against rat p85.

attention as a tool to decipher their molecular regulations. A common theme in signaling cascades is the recruitment of various regulatory or effector proteins at the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane, either by protein-lipid interactions on D3 phosphoinositides via pleckstrin-homology, lysine/arginine-rich, or SH2 domains (Martin, 1998; Rameh and Cantley, 1999), or by protein-protein interactions via SH2, SH3, or proline-rich domains (Pawson, 1995). By analogy with the signaling pathway downstream of PDGF (Falasca *et al.*, 1998), we tested the hypothesis that v-Src and K-Ras similarly recruit and activate PI3K and PI-PLC.

This interpretation was supported by several lines of evidence from other experimental systems. First, PI3K functions upstream of Rac, because stimulation by PDGF and insulin of the Rac exchange factor depends on PI3K (Hawkins *et al.*, 1995), and because PI3K inhibition by wortmannin or LY294002 prevents induction of membrane ruffling by PDGF or activated Ras but not by activated Rac (Kotani *et al.*, 1994; Wennström *et al.*, 1994; Nobes and Hall, 1995; Rodriguez-Viciana *et al.*, 1997). Second, Src and Ras

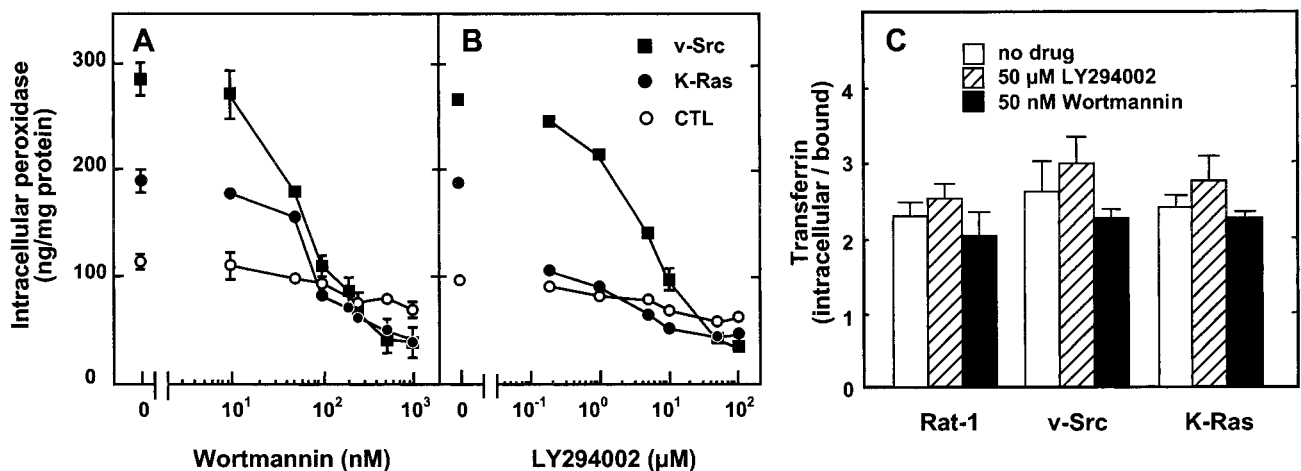
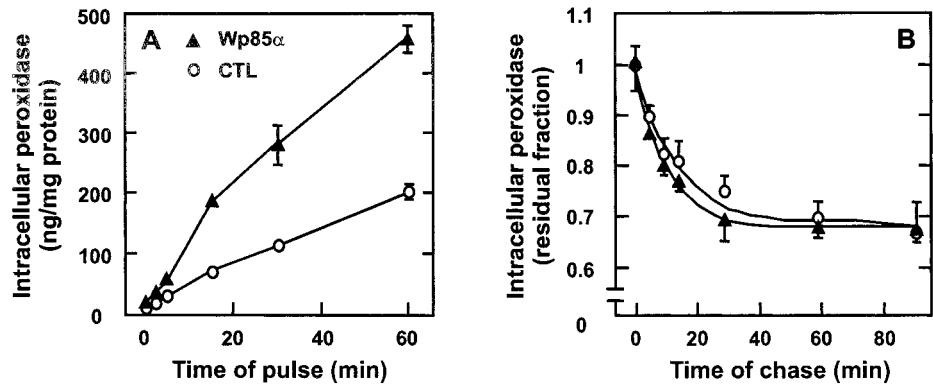


Figure 7. Constitutive macropinocytosis, but not receptor-mediated endocytosis, is abrogated by pharmacological inhibition of PI3K in transformed fibroblasts. Control (○), v-Src (■), and K-Ras (●) fibroblasts were preincubated for 30 min in DMEM without serum supplemented with the indicated concentrations of wortmannin or LY294002 and then incubated for another 30 min in the same medium with 4 mg/ml added HRP (A and B) or for 10 min with 50 nM added ¹²⁵I-transferrin and 1% BSA (C). Intracellular tracer accumulation is calculated as in Figure 1. Values are means $\pm$ SD of three dishes. The concentration-dependence of the effects of PI3K inhibitors on control and v-Src-transformed fibroblasts was reproduced at least three times.

Figure 9. Stable Wp85 α transfection of control Rat-1 fibroblasts accelerates fluid-phase endocytosis. Control (○) or Wp85 α fibroblasts (▲) were preincubated for 30 min in DMEM without serum, further incubated for the indicated times of pulse in the same medium containing HRP (A) or for 30 min with HRP, washed, and then chased for the indicated times in DMEM (B). Intracellular tracer accumulation is calculated as in Figure 1. Values are means $\pm$ SD of four dishes.



interact directly with PI3K. Third, the D3 subgroup of PI3K products serves as site-specific membrane signals to directly recruit various cytosolic proteins and generate protein complexes at the interface with the cytoplasm. Among the many proteins that preferentially bind to the D3 subgroup are PLC γ 1, some guanine nucleotide exchange factors, and various regulators of the actin cytoskeleton (Falasca *et al.*, 1998; Martin, 1998). All of these constituents are of potential importance for macropinocytosis.

Our study demonstrates that v-Src and K-Ras produce constitutive macropinocytosis by permanently activating PI3K, resulting in a manyfold enrichment of 3-phosphoinositides at the total cellular level, which may reflect much higher concentrations in active membrane domains. This increase closely correlates with a profound reorganization of the actin cytoskeleton, active ruffling, and macropinocytosis, the most dramatic response being found for the dominant-positive Wp85 α fibroblasts. Conversely, cytoskeleton reorganization and macropinocytosis were abrogated by wortmannin and LY294002 and by the dominant-negative

expression of the PI3K adaptor subunit p85 α , which is competent for being recruited at the plasma membrane but was unable to recruit the PI3K catalytic subunit p110. In contrast to its direct role in the constitutive formation of macropinosomes in oncogene-transformed fibroblasts, Murray *et al.* (2000) recently reported that PI3K was not required for the accelerated formation of endocytic vesicles in M-CSF-stimulated macrophages but was necessary for their subsequent centripetal movement and increase of size, presumably by homotypic fusion. This discrepancy emphasizes that different machineries may operate in constitutive versus transiently stimulated macropinocytosis.

The signaling pathway downstream of PI3K involves multiple arms. Among these, PLC γ 1, but not PLC γ 2, is recruited directly at plasma membrane ruffles, and a sequential signaling via PI3K lipid products to PLC γ 1 has been demonstrated for the response of mast cells to stimulation by immunoglobulin E receptor cross-linking (Barker *et al.*, 1998). In addition, recruitment by protein-protein interactions is also possible, as indicated by coimmunoprecipitation

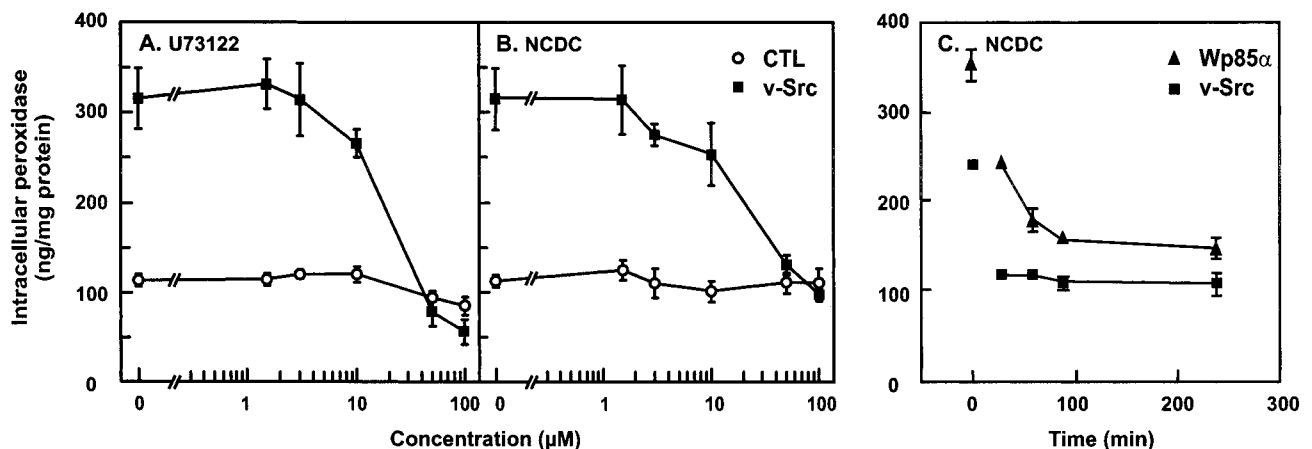


Figure 10. PI-PLC inhibitors abrogate constitutive macropinocytosis in v-Src-transformed and Wp85 α stably transfected fibroblasts. (A and B) Control or Src fibroblasts were preincubated for 30 min in DMEM without serum supplemented with the indicated concentrations of inhibitors and then incubated for another 30 min in the same medium with 4 mg/ml added HRP. (C) Rat-1/v-Src and Rat-1/Wp85 α fibroblasts were preincubated for the indicated times with 100 μ M NCDC, and HRP was added for the last 30 min of incubation. Values are means $\pm$ SD of four dishes. The concentration-dependence of the effects of PI-PLC inhibitors on control and v-Src-transformed fibroblasts was reproduced at least three times.

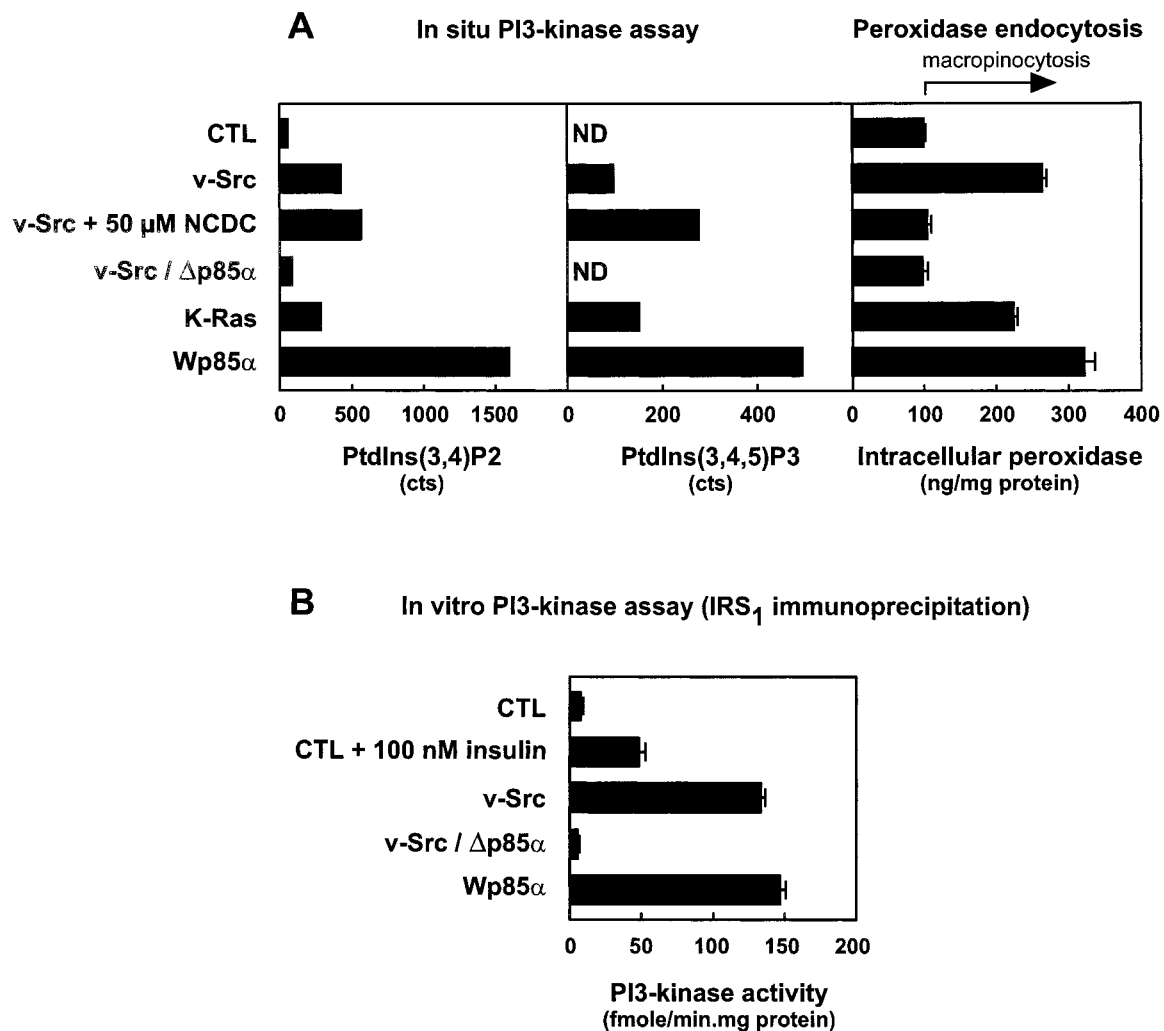


Figure 11. PI3K activity correlates with constitutive macropinocytosis. (A) PI3K was assayed in situ and compared with peroxidase accumulation. The indicated cells were incubated for 6 h in phosphate-free DMEM containing 0.5% dialyzed FCS and 250 μ Ci/ml [^{32} P]orthophosphate. Inhibitors were added 30 min before this incubation and maintained throughout. After a brief wash, cell lipids were extracted and phosphoinositides were analyzed by HPLC and expressed in absolute counts. ND, not detectable. Data for PtdIns(3,4)P2 levels are from one experiment representative of two to five experiments. Counts of PtdIns(3,4,5)P3 are from the same experiment, which provided the best resolution of this minor compound. These values are compared with macropinocytosis, measured after cells were incubated for 30 min in DMEM without serum in the presence or absence of the inhibitors and then for another 30 min with HRP, as in Figure 1. Values are means $\pm$ SEM of 16 to 89 dishes compiled from all experiments performed for this paper. (B) PI3K was assayed in vitro in the indicated cell lines after IRS-1 immunoprecipitation. Values are means $\pm$ SEM of five to nine dishes per condition.

of PI3K and PI-PLC. Plasma membrane translocation would allow PLC γ 1 to be intimately associated with the signal transduction complexes and to be activated by phosphorylation as well as by recruitment close to its substrate PtdIns(4,5)P2. However, independent PI3K and PLC γ 1 pathways in response to PDGF receptor activation have been suggested (Rönnstrand *et al.*, 1999).

We first report in this work that PI-PLC is constitutively activated in v-Src-transformed fibroblasts and upon PI3K activation by dominant-positive Wp85 α transfection. This was shown by a major increase in IP3 levels and its abrogation by the PI-PLC inhibitor NCDC. Second, PI-PLC activation depends on PI3K products, because it was suppressed

by wortmannin and upon dominant-negative Δ p85 α transfection. Third, PI3K and PI-PLC are both mandatory intermediates in constitutive ruffling and macropinocytosis, because both activities can be suppressed by pharmacological inhibitors of each of these enzymes. In conclusion, early signaling depends on the sequential activation of PI3K, which is blocked by wortmannin, and then of PI-PLC, which is inhibited by NCDC. Once activated upon plasma membrane recruitment, PI-PLC produces the cytosolic messenger IP3, which triggers Ca $^{2+}$ release from intracellular stores and thereby affects the actin cytoskeleton.

Actin cytoskeleton dynamics is controlled by the small GTPases Rac, Rho, and Cdc42 (Schmidt and Hall, 1998). Like

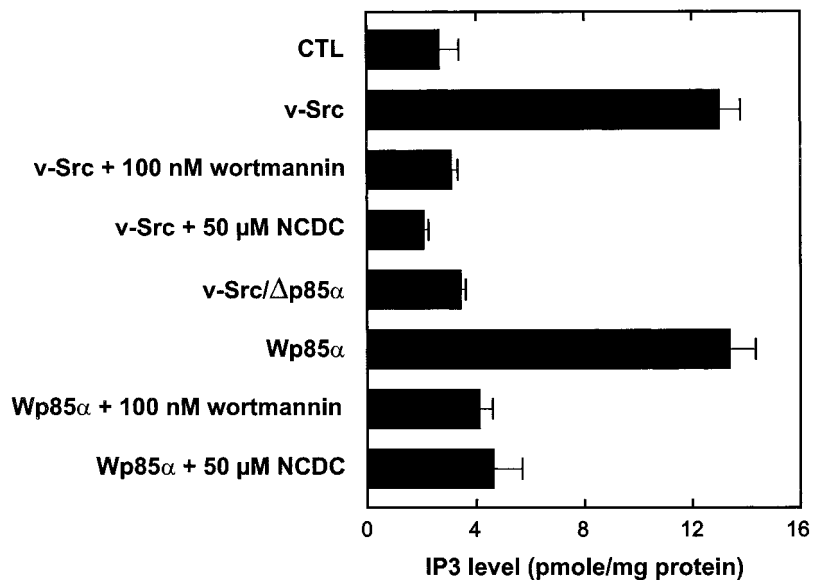


Figure 12. PI-PLC is downstream of PI3K in the same signaling pathway to constitutive macropinocytosis. In situ phospholipase activity was determined by intracellular IP₃ levels with the use of a competitive radioligand-binding assay. The indicated cells were preincubated at 37°C for 1 h with DMEM without serum supplemented with the indicated concentrations of inhibitors. All values are means $\pm$ SEM of four dishes pooled from two separate experiments.

the plasma membrane recruitment and activation of PI-PLC, conversion of Rac from its inactive, GDP-bound form to its active, GTP-bound form upon PI3K activation (Leevers *et al.*, 1999) is attributed to the recruitment on D3 phosphoinositides of a guanine nucleotide exchange factor (Carpenter *et al.*, 1997; Hall, 1998), possibly through the pleckstrin-homology domain of the guanine nucleotide exchange factor Vav (Han *et al.*, 1998). In addition, Rac in its activated form can physically associate with PI3K, an association enhanced upon PDGF exposure. In turn, Rac activates PtdIns(4)P 5-kinase to produce PtdIns(4,5)P₂, which competes with gelsolin, resulting in F-actin uncapping (Carpenter *et al.*, 1997).

Our results illustrate the striking inverse relationship between cortical actin recruitment supporting ruffling and macropinocytosis, which presumably depend on Rac, and the formation of stress fibers, which depends on Rho (Hall, 1998). Two mechanisms have been proposed to explain how Src leads to the rapid disappearance of actin stress fibers, one linked to its tyrosine kinase activity and the other involving a PI3K relay. In the first mechanism, Rho can be rapidly inactivated by Src as a result of tyrosine phosphorylation of p190, which triggers its association with its inactivator p120RasGAP (Fincham *et al.*, 1999). Alternatively, PI3K activation, demonstrated directly in the present study, was reported to be necessary and sufficient for insulin-stimulated stress fiber breakdown, as shown by wortmannin inhibition and expression of constitutively active p110 PI3K subunit (Martin *et al.*, 1996). How PI3K products control Rho is currently unknown.

Finally, 3-phosphoinositides can also directly recruit and modulate various regulators of the actin cytoskeleton through interaction via their domains rich in basic and hydrophobic sequences, including gelsolin, profilin, cofilin, and vinculin (Martin, 1998). In knockout mice, gelsolin was found to be necessary for the growth factor-stimulated macropinocytosis in fibroblasts (Azuma *et al.*, 1998) but was not essential for phorbol myristyl acetate-stimulated and constitutive macropinocytosis in dendritic cells (West *et al.*, 1999). Increasing the number of free barbed ends available

for filament elongation would support membrane ruffling. In addition, because Rho rigidifies nontransformed cells by promoting the formation of actin stress fibers (Hall, 1998), its inactivation should both decrease physical constraints against membrane movement and increase actin availability for the cytocortex. Interestingly, lamellipodia extension triggered by PDGF correlates with a decrease in membrane tension, and this response is blocked by the PI-PLC inhibitor U73122 (Raucher and Sheetz, 2000).

Like phagocytosis, macropinocytosis in mammalian cells clearly depends on actin polymerization at the plasma membrane. Direct dependence of macropinocytosis on actin is in marked contrast with clathrin-dependent micropinocytosis, which was affected neither by cytochalasins (Figure 6) (Gaidarov *et al.*, 1999) nor by PI3K inhibitors in our experimental system. However, whereas it is clear that PI3K controls pseudopod extension, its requirement for their fusion is still controversial, and it may vary with the particle size (Araki *et al.*, 1996; Cox *et al.*, 1999; Swanson *et al.*, 1999). In addition, whereas PI3K inhibition suppresses macropinocytosis in *Dictyostelium* (Seastone *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998), it does not affect phagocytosis in these cells (Seastone *et al.*, 1999), suggesting that these two processes requiring cortical actin polymerization could be differentially regulated.

ACKNOWLEDGMENTS

We are particularly grateful to Dr. W. Ogawa (Kobe, Japan) for providing Wtp85α and Δp85α plasmids, to Dr. R. Stein and Ms F. Savoy (Ludwig Institute for Cancer Research, London, United Kingdom) for testing the absence of interaction of NCDC on recombinant PI3Ks in an in vitro assay, and to Dr. B. Vanhaesebroeck (Ludwig Institute for Cancer Research, London, United Kingdom) for helpful discussions. The outstanding technical help and secretarial assistance of F. N'Kuli, M. Leruth, and Y. Marchand are greatly appreciated. This work was supported by grants from the Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS) and Concerted Research Actions (Communauté Française de Belgique) as well as from Inter-university Attraction Poles (Belgian State). M.A. holds a Ph.D. student fellowship of the FNRS.

REFERENCES

- Alpuche-Aranda, C.M., Racoosin, E.L., Swanson, J.A., and Miller, S.I. (1994). *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J. Exp. Med.* 179, 601–608.
- Araki, N., Johnson, M.T., and Swanson, J.A. (1996). A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J. Cell Biol.* 135, 1249–1260.
- Azuma, T., Witke, W., Stossel, T.P., Hartwig, J.H., and Kwiatkowski, D.J. (1998). Gelsolin is a downstream effector of Rac for fibroblast motility. *EMBO J.* 17, 1362–1370.
- Bae, Y.S., Cantley, L.G., Chen, C.S., Kim, S.R., Kwon, K.S., and Rhee, S.G. (1998). Activation of phospholipase C- γ by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 273, 4465–4469.
- Barker, S.A., Caldwell, K.K., Pfeiffer, J.R., and Wilson, B.S. (1998). Wortmannin-sensitive phosphorylation, translocation, and activation of PLC γ 1, but not PLC γ 2, in antigen-stimulated RBL-2H3 mast cells. *Mol. Biol. Cell* 9, 483–496.
- Bar-Sagi, D., and Feramisco, J.R. (1986). Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by *ras* proteins. *Science* 233, 1061–1068.
- Bar-Sagi, D., McCormick, F., Milley, R.J., and Feramisco, J.R. (1987). Inhibition of cell surface ruffling and fluid-phase pinocytosis by microinjection of anti-*ras* antibodies into living cells. *J. Cell. Physiol.* 5(suppl), 69–73.
- Boschek, C.B., Jockusch, B.M., Friis, R.R., Back, R., Grundman, E., and Bauer, H. (1981). Early changes in the distribution and organization of microfilament proteins during cell transformation. *Cell* 24, 175–184.
- Carpenter, C.L., Tolias, K.F., Couvillon, A.C., and Hartwig, J.H. (1997). Signal transduction pathways involving the small G proteins Rac and CDC42 and phosphoinositide kinases. *Adv. Enzyme Regul.* 37, 377–390.
- Condeelis, J. (1993). Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 411–444.
- Cox, D., Tseng, C.C., Bjekic, G., and Greenberg, S. (1999). A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J. Biol. Chem.* 274, 1240–1247.
- Cuppers, P., Veithen, A., Kiss, A., Baudhuin, P., and Courtoy, P.J. (1994). Clathrin polymerization is not required for bulk-phase endocytosis in rat fetal fibroblasts. *J. Cell Biol.* 127, 725–735.
- Dehio, C., Prévost, M.-C., and Sansonetti, J. (1995). Invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri* induces tyrosine phosphorylation of cortactin by a pp60^{c-src}-mediated signaling pathway. *EMBO J.* 14, 2471–2482.
- Ericson, L.E., Ring, K.M., and Öfverholm, T. (1983). Selective macropinocytosis of thyroglobulin in rat thyroid follicles. *Endocrinology* 113, 1746–1753.
- Falasca, M., Logan, S.K., Lehto, V.P., Baccante, G., Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (1998). Activation of phospholipase C γ by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J.* 17, 414–422.
- Fincham, V.J., Chudleigh, A., and Frame, M.C. (1999). Regulation of p190 Rho-GAP by v-Src is linked to cytoskeletal disruption during transformation. *J. Cell Sci.* 112, 947–956.
- Fruman, D.A., Meyers, R.E., and Cantley, L.C. (1998). Phosphoinositide kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 481–507.
- Gaidarov, I., Santini, F., Warren, R.A., and Keen, J.H. (1999). Spatial control of coated-pit dynamics in living cells. *Nat. Cell Biol.* 1, 1–7.
- Gratacap, M.P., Payrastra, B., Viala, C., Mauco, G., Plantavid, M., and Chap, H. (1998). Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent stimulation of phospholipase C- γ 2 is an early key event in Fc γ RIIA-mediated activation of human platelets. *J. Biol. Chem.* 273, 24314–24321.
- Hacker, U., Albrecht, R., and Maniak, M. (1997). Fluid-phase uptake by macropinocytosis in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* 110, 105–112.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509–514.
- Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R.D., Murali Krishna, U., Falck, J.R., White, M.A., and Broek, D. (1998). Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* 279, 558–560.
- Hara, K., *et al.* (1994). 1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7415–7419.
- Hawkins, P.T., *et al.* (1995). PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr. Biol.* 5, 393–403.
- Ketelbant-Balasse, P., Rodesch, F., Neve, P., and Pasteels, J.M. (1973). Scanning electron microscope observations of apical surfaces of dog thyroid cells. *Exp. Cell Res.* 79, 111–119.
- Kotani, K., Hara, K., Kotani, K., Yonezawa, K., and Kasuga, M. (1995). Phosphoinositide 3-kinase as an upstream regulator of the small GTP-binding protein Rac in the insulin signaling of membrane ruffling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 985–990.
- Kotani, K., *et al.* (1994). Involvement of phosphoinositide 3-kinase in insulin- or IGF-1-induced membrane ruffling. *EMBO J.* 13, 2313–2321.
- Krause, U., Rider, M.H., and Hue, L. (1996). Protein kinase signaling pathway triggered by cell swelling and involved in the activation of glycogen synthase and acetyl-CoA carboxylase in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 271, 16668–16673.
- Leevers, S.J., Vanhaesebroeck, B., and Waterfield, M.D. (1999). Signaling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take center stage. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 219–225.
- Lewis, W.H. (1931). Pinocytosis. *Johns Hopkins Hosp. Bull.* 49, 17–27.
- Liu, X., Marengere, L.E.M., Koch, C.A., and Pawson, T. (1993). The v-Src SH3 domain binds phosphatidylinositol 3'-kinase. *Mol. Cell Biol.* 13, 5225–5232.
- Marsh, M., and McMahon, H.T. (1999). The structural era of endocytosis. *Science* 285, 215–220.
- Martin, S.S., Rose, D.W., Saltiel, A.R., Klippel, A., Williams, L.T., and Olefsky, J.M. (1996). Phosphatidylinositol 3-kinase is necessary and sufficient for insulin-stimulated stress fiber breakdown. *Endocrinology* 137, 5045–5054.
- Martin, T.F.J. (1998). Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 231–264.
- McFarlane, A.S. (1958). Efficient trace labeling of proteins with iodine. *Nature* 183, 53.
- Meijne, A.M.L., Ruuls-Van Stalle, L., Feltkamp, C.A., McCarthy, J.B., and Roos, E. (1997). v-Src-induced cell shape changes in rat fibroblasts require new gene transcription and precede loss of focal adhesions. *Exp. Cell Res.* 234, 477–485.
- Murray, J., Wilson, L., and Kellie, S. (2000). Phosphatidylinositol-3' kinase-dependent vesicle formation in macrophages in response to macrophage colony stimulating factor. *J. Cell Sci.* 113, 337–348.
- Nakai, J. (1956). Dissociated dorsal root ganglia in tissue culture. *Am. J. Anat.* 99, 81–99.

- Nobes, C.D., and Hall, A. (1995). Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53–62.
- Nobes, C.D., Hawkins, P., Stephens, L., and Hall, A. (1995). Activation of the small GTP-binding proteins rho and rac by growth factor receptors. *J. Cell Sci.* 108, 225–233.
- Norbury, C.C., Hewlett, L.J., Prescott, A.R., Shastri, N., and Watts, C. (1995). Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity* 3, 783–791.
- Ojcus, D.M., Bravo de Alba, Y., Kanellopoulos, J.M., Hawkins, R.A., Kelly, K.A., Rank, R.G., and Dautry-Varsat, A. (1998). Internalization of *Chlamydia* by dendritic cells and stimulation of *Chlamydia*-specific T cells. *J. Immunol.* 160, 1297–1303.
- Pawson, T. (1995). Protein modules and signaling networks. *Nature* 373, 573–580.
- Penuel, E., and Martin, G.S. (1999). Transformation by v-Src: Ras-MAPK and PI3K-mTOR mediate parallel pathways. *Mol. Biol. Cell* 10, 1693–1703.
- Racoosin, E.L., and Swanson, J.A. (1992). M-CSF-induced macropinocytosis increases solute endocytosis but not receptor-mediated endocytosis in mouse macrophages. *J. Cell Sci.* 102, 867–880.
- Rameh, L.E., and Cantley, L.G. (1999). The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J. Biol. Chem.* 274, 8347–8350.
- Rameh, L.E., Rhee, S.G., Spokes, K., Kazlauskas, A., Cantley, L.C., and Cantley, L.G. (1998). Phosphoinositide 3-kinase regulates phospholipase C γ -mediated calcium signaling. *J. Biol. Chem.* 273, 23750–23757.
- Raucher, D., and Sheetz, M.P. (2000). Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *J. Cell Biol.* 148, 127–136.
- Rodríguez-Viciana, P., Warne, P.H., Khwaja, A., Marte, B.M., Papin, D., Das, P., Waterfield, M.D., Ridley, A., and Downward, J. (1997). Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* 89, 457–467.
- Rönstrand, L., Siegbahn, A., Rorsman, C., Johnell, M., Hansen, K., and Heldin, C.H. (1999). Overactivation of phospholipase C- γ 1 renders platelet-derived growth factor β -receptor-expressing cells independent of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway for chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 274, 22089–22094.
- Roy, S., Luetterforst, R., Harding, A., Apolloni, A., Etheridge, M., Stang, E., Rolls, B., Hancock, J.F., and Parton, R.G. (1999). Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat. Cell Biol.* 1, 98–105.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182, 389–400.
- Schmidt, A., and Hall, M.N. (1998). Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 305–338.
- Seastone, D.J., Lee, E., Bush, J., Knecht, D., and Cardelli, J. (1998). Overexpression of a novel Rho family GTPase, RacC, induces unusual actin-based structures and positively affects phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell* 9, 2891–2904.
- Seastone, D.J., Zhang, L., Buczynski, G., Rebstein, P., Weeks, G., Spiegelman, G., and Cardelli, J. (1999). The small M₁ Ras-like GTPase Rap1 and the phospholipase C pathway act to regulate phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell* 10, 393–406.
- Sjölander, A., Yamamoto, K., Huber, B.E., and Lapetina, E.G. (1991). Association of p21ras with phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7908–7912.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- Spiro, D.J., Boll, W., Kirchhausen, T., and Wessling-Resnick, M. (1996). Wortmannin alters the transferrin receptor endocytic pathway in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell* 7, 355–367.
- Swanson, J.A. (1989). Phorbol esters stimulate macropinocytosis and solute flow through macrophages. *J. Cell Sci.* 94, 135–142.
- Swanson, J.A., Johnson, M.T., Beningo, K., Post, P., Mooseker, M., and Araki, N. (1999). A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. *J. Cell Sci.* 112, 307–316.
- Swanson, J.A., and Watts, C. (1995). Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 5, 424–428.
- Thilo, L. (1985). Selective internalization of granule membrane after secretion in mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1711–1715.
- Thomas, S.M., and Brugge, J.S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 513–609.
- Veithen, A., Amyere, M., Van Der Smissen, P., Cupers, P., and Courtoy, P.J. (1998). Regulation of macropinocytosis in v-Src-transformed fibroblasts: cyclic AMP selectively promotes regurgitation of macropinosomes. *J. Cell Sci.* 111, 2329–2335.
- Veithen, A., Cupers, P., Baudhuin, P., and Courtoy, P.J. (1996). v-Src induces constitutive macropinocytosis in rat fibroblasts. *J. Cell Sci.* 109, 2005–2012.
- Wennström, S., Hawkins, P., Cooke, F., Hara, K., Yonezawa, K., Kasuga, M., Jackson, T., Claesson-Welsh, L., and Stephens, L. (1994). Activation of phosphoinositide 3-kinase is required for PDGF-stimulated membrane ruffling. *Curr. Biol.* 4, 385–393.
- West, M.A., Antoniou, A.N., Prescott, A.R., Azuma, T., Kwiatkowski, D.J., and Watts, C. (1999). Membrane ruffling, macropinocytosis and antigen presentation in the absence of gelsolin in murine dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 29, 3450–3455.
- Wilde, A., Beattie, E.C., Lem, L., Riethof, D.A., Liu, S.-H., Mobley, W.C., Soriano, P., and Brodsky, F.M. (1999). EGF receptor signaling stimulates SRC kinase phosphorylation of clathrin, influencing clathrin redistribution and EGF uptake. *Cell* 96, 677–687.
- Wiley, H.S., and Cunningham, D.D. (1982). The endocytotic rate constant: a cellular parameter for quantitating receptor-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.* 257, 4222–4229.
- Zhou, K., Pandol, S., Bokoch, G., and Traynor-Kaplan, A.E. (1998). Disruption of *Dictyostelium* PI3K genes reduces [³²P]phosphatidylinositol 3,4 bisphosphate and [³²P]phosphatidylinositol trisphosphate levels, alters F-actin distribution and impairs pinocytosis. *J. Cell Sci.* 111, 283–294.

CHAPITRE 3. CONCLUSIONS.

3.1. Phénoménologie de la macropinocytose constitutive induite par des oncogènes.

3.1.1. La macropinocytose constitutive des fibroblastes transformés par v-Src est une forme d'endocytose bien distincte.

La macropinocytose est une forme d'endocytose structurellement et fonctionnellement distincte de la micropinocytose. En effet, la localisation en microscopie confocale d'un traceur de l'endocytose fluide, le dextran, et d'un traceur de l'endocytose médiée par récepteurs, la transferrine, montre leur ségrégation totale après 5 minutes de capture simultanée dans les fibroblastes transformés par v-Src. Les macropinosomes prennent principalement naissance au niveau des prolongements cellulaires et se déplacent lentement vers le péricaryon, à une vitesse d'environ 1 $\mu\text{m}/\text{min}$, alors que l'on sait que la transferrine est généralement intériorisée à partir de l'ensemble de la périphérie cellulaire par les petites vésicules mantelées et qu'elle progresse très vite, par mouvements saltatoires, vers la région périnucléaire qu'elle atteint en effet en 5 minutes dans les fibroblastes transformés (Veithen *et al.*, 1998). De plus, toutes les perturbations pharmacologiques de la macropinocytose utilisées dans notre travail (la cytochalasine E, la wortmannine et LY294002, le NCDC et l'U73122, ainsi que le dibutylryl AMPcylque) n'ont pas eu d'effet appréciable sur l'endocytose médiée par récepteurs.

Dans les cellules du carcinome épidermoïde humain A431 qui surexpriment fortement le récepteur EGF, la liaison de l'EGF à son récepteur stimule c-Src qui phosphoryle à son tour la chaîne lourde de la clathrine en Tyr¹⁴⁷⁷. Ceci favorise le recrutement et l'assemblage du complexe clathrine/adaptateur AP2, et accélère la formation des vésicules mantelées (Wilde *et al.*, 1999). La première partie du doctorat de M. Mettlen vient de montrer que c'est également le cas pour v-Src/tsLA31 dans les cellules épithéliales MDCK. Toutefois, les observations répétées dans notre laboratoire au cours des 5 dernières années montrent clairement que ce mécanisme n'est pas opérant ou est insignifiant dans les fibroblastes

transformés par v-Src/tsLA29. La différence entre ces divers systèmes expérimentaux n'est pas comprise.

3.1.2. Comme v-Src, l'oncogène K-Ras induit une macropinocytose constitutive.

Dans le cadre de mon travail, j'ai montré que l'oncogène K-Ras induit également la macropinocytose constitutive dans les fibroblastes. Bar-Sagi et Feramisco avaient déjà rapporté en 1986 que la microinjection de l'oncogène H-Ras induit le "ruffling" membranaire et l'apparition de grosses vacuoles pinocytaires. Mon travail établit une relation de causalité entre ces deux observations. On peut donc proposer que les vacuoles observées par Bar-Sagi et Feramisco étaient des macropinosomes. On notera enfin que v-Src et K-Ras sont tous deux ancrés à la membrane, où ils sont peut-être recrutés aux mêmes microdomaines (Roy *et al.*, 1999). En revanche, ces deux oncogènes n'ont guère d'effet sur l'endocytose médiée par le récepteur de la transferrine chez les fibroblastes Rat-1.

3.1.3. Les macropinosomes sont formés préférentiellement au niveau des prolongements cellulaires par le ²ruffling² membranaire associé aux lamellipodes.

En collaboration avec le Dr. P. Van Der Smissen, j'ai montré que, chez les fibroblastes transformés par les oncogènes v-Src et K-Ras, l'étape initiale de la formation des macropinosomes est l'apparition du "ruffling" membranaire, préférentiellement au niveau des prolongements du front de migration cellulaire, les lamellipodes. J'ai en outre pu directement visualiser que les ondulations lamellaires, riches en actine F ("ruffles"), se prolongent puis se rabattent contre la membrane plasmique pour engendrer des macropinosomes. Chez les fibroblastes d'embryons de poulet infectés par un mutant thermosensible (*td-ts*) du virus de sarcome de Rous, on observe du "ruffling" membranaire à la périphérie de la majorité des cellules déjà 15 minutes après l'activation thermique de v-Src (Boschek *et al.*, 1981).

A l'état inactivé, v-Src est principalement localisée dans la région périnucléaire, où elle semble recruté par son extrémité N-terminale myristoylée et par des interactions protéine/protéine via les domaines SH2 et SH3. Quand elle s'active, v-Src s'autophosphoryle en Tyr⁴¹⁶, se relocalise vers la membrane plasmique, et y phosphoryle ses divers substrats

parmi lesquels la sous-unité régulatrice de la PI3K (p85) et la "Focal Adhesion Kinase" ou FAK (p125). Ceci entraîne d'une part la disparition des câbles de tension et la diminution de l'adhérence cellulaire, et stimule d'autre part le remodelage de l'actine corticale (Fincham *et al.*, 1995).

Comme pour v-Src, l'activation de Ras induit sa translocation du cytosol vers le feuillet interne de la membrane plasmique, où elle est ancrée par son extrémité C-terminale farnesylée. Ras a été impliquée dans la formation du "ruffling" via la cascade de signalisation Ras→PI3K→Rac→ruffling membranaire (Bar-Sagi et Feramisco, 1986; Kotani *et al.*, 1994; Ridley, 1994; Joneson *et al.*, 1996).

3.2. Régulation de la macropinocytose constitutive induite par des oncogènes.

3.2.1. Comparaison avec la phagocytose.

Si la preuve directe de l'intervention de l'actine dans la formation des vésicules de micropinocytose reste à apporter (Lamaze *et al.*, 1997), on sait clairement que la phagocytose dépend de l'actine corticale. La signalisation au cytocortex en regard de la proie implique généralement la PI3K et parfois la PLC. Chez les macrophages, toutes les observations concordent à montrer que la PI3K est nécessaire à la phagocytose de particules de grande taille (> 2,5 µm de diamètre), en intervenant dans deux étapes de la formation du phagosome : (i) l'extension des pseudopodes (Cox *et al.*, 1999) et (ii) la fermeture des phagosomes (Araki *et al.*, 1996). En outre, l'inhibition de la PLC bloque la phagocytose de bactéries non opsonisées chez *Dictyostelium* (Seastone *et al.*, 1999) et la phagocytose médiée par le FcγR chez les macrophages (Botelho *et al.*, 2000). *Listeria monocytogenes* induit son endocytose dans les cellules épithéliales (Mengaud *et al.*, 1996) par une interaction entre l'internaline B de la bactérie et la Ecadhérine. Ce processus s'accompagne d'une activation de la PI3K, qui entraîne l'association de la PLCγ1 avec des protéines tyrosine-phosphorylées. Toutefois, si l'intériorisation de *L. monocytogenes* est bloquée par des inhibiteurs de la PI3K, elle résiste à des inhibiteurs de la PLC (Bierne *et al.*, 2000).

Chez les cellules de mammifères, il existe de nombreuses similitudes entre la macropinocytose et la phagocytose (voir le Tableau 3.1). On considère d'ailleurs que les phagosomes "spacieux" dans lesquels est captée *Salmonella typhimurium* sont l'équivalent de

macropinosomes (Alpuche-Aranda *et al.*, 1994). Notre travail a montré que le "ruffling" et la macropinocytose constitutifs dans les fibroblastes transformés par v-Src et K-Ras sont tous deux abolis par les inhibiteurs pharmacologiques de la PI3K et de la PLC et dans la construction "dominante-négative" de la PI3K réalisée chez les fibroblastes transformés par v-Src. A l'inverse, le "ruffling" et la macropinocytose sont fortement activés après création d'une construction "dominante-positive" de la PI3K chez les fibroblastes non transformés. De plus, la macropinocytose s'accompagne d'une activation importante et permanente de la PI3K et de la PLC, mise en évidence par leur dosage *in situ*. Enfin, cette activation permanente est séquentielle : PI3K→PLC (Amyere *et al.*, 2000). En effet, l'inhibition pharmacologique de la PI3K ou la construction du "dominant-négatif" chez des fibroblastes transformés par v-Src abolit non seulement le "ruffling" et la macropinocytose, mais aussi l'activation de la PLC. A l'inverse, l'activation de la PI3K par v-Src, par K-Ras et par la construction "dominante-positive" de la PI3K dans des cellules non transformées, qui stimule non seulement le "ruffling" membranaire et la macropinocytose mais aussi la PLC, résiste à des inhibiteurs de la PLC.

Tableau 3.1: Comparaison entre de la régulation de la macropinocytose et de la phagocytose, chez *Dictyostelium* et les cellules de mammifères. (FcR = phagocytose médiée par le FcγR ou FcεR; CR = phagocytose médiée par les récepteurs du complément ; (+) = relais nécessaire ; (-) = suppresseur ; (0) = pas d'effet).

		Phagocytose			Macropinocytose		Références
		Dictyostelium	FcR	CR	Dictyostelium	Mammifères	
Tyrosine-kinases	c-Src v-Src		+			+	Hunter <i>et al.</i> , 1993 Veithen <i>et al.</i> , 1996
	Syk		+				Crowley <i>et al.</i> , 1997
	Hck		+				Fitzer-Attas <i>et al.</i> , 2000
	FAK		0				Watson <i>et al.</i> , 2001
	ensemble des tyrosine-kinases	0	+	+			Seastone <i>et al.</i> , 1999 Kusner <i>et al.</i> , 1996 Sanchez-Mejorada et Rosales, 1998
Kinase et phosphatase des PtdIns	PI3K	-	0/+ +		+	+	Seastone <i>et al.</i> , 1999 Cox <i>et al.</i> , 1999 Araki <i>et al.</i> , 1996 Amyere <i>et al.</i> , 2000 Zhou <i>et al.</i> , 1998
	SHIP		-	-			Cox <i>et al.</i> , 2001
Phospholipases et PA-phosphohydrolase	PLC	+	+			+	Seastone <i>et al.</i> , 1999 Botelho <i>et al.</i> , 2000 Amyere <i>et al.</i> , 2000 Bleme <i>et al.</i> , 2000
	PLD		+	+			Exton <i>et al.</i> , 1997 Fallman <i>et al.</i> , 1992
	PLA2		+				Lennartz <i>et al.</i> , 1997
	PAP-1		+				Exton <i>et al.</i> , 1997
Ser/Thr-kinases	PKC	+	+	+			Seastone <i>et al.</i> , 1999 Allen et Aderem, 1996 Della Bianca <i>et al.</i> , 1990
	PKA	0					Seastone <i>et al.</i> , 1999
	PAK1					+	Dharmawardhane <i>et al.</i> , 2000
GTPases et leurs régulateurs	H-Ras K-Ras					+	Bar-Sagi et Feramisco, 1986 Amyere <i>et al.</i> , 2000
	Ras		0				Sanchez-Mejorada et Rosales, 1998
	RasGEFB				+		Wilkins <i>et al.</i> , 2000
	RasS	+			+		Chubb <i>et al.</i> , 2000
	Rap1	+		+	-		Seastone <i>et al.</i> , 1999 Caron <i>et al.</i> , 2000
	Rho		0	+			Caron et Hall, 1998
	Cdc42		+	0		+	Caron et Hall, 1998 Garrett <i>et al.</i> , 2000
	Rac1	+		0	+	+	Dumontier <i>et al.</i> , 2000; Palmieri <i>et al.</i> , 2000 Caron et Hall, 1998 West <i>et al.</i> , 2000
	RacC	+			-		Seastone <i>et al.</i> , 1998

Tableau 3.1 (suite).

		Phagocytose			Macropinocytose		Références
		Dictyostelium	FcR	CR	Dictyostelium	Mammifères	
GTPases	ARF6		+			+	Greenberg, 1999 Radhakrishna <i>et al.</i> , 1996
	Rab7	+			+		Buczynski <i>et al.</i> , 1997
	RabD				+		Bush <i>et al.</i> , 1996
	RabB	+			0		Harris et Cardelli, en préparation
	protéine G (sous-unité b)	+	0	0			Peracino <i>et al.</i> , 1998 Della Bianca <i>et al.</i> , 1993 Hiemstra <i>et al.</i> , 1992
Régulateurs du cytosquelette	Ca²⁺	0	0 + 0	0			Seastone <i>et al.</i> , 1999 Serrander <i>et al.</i> , 2000 Kobayashi <i>et al.</i> , 1995 Della Bianca <i>et al.</i> , 1990
	actine	+	+	+	+	+	Hacker <i>et al.</i> , 1997 Allison <i>et al.</i> , 1971 Greenberg, 1995
	gelsoline		+	+			Serrander <i>et al.</i> , 2000
	profiline	-			+		Temesvari <i>et al.</i> , 2000
	cofiline	-	+				Konzok <i>et al.</i> , 1999 Nagaishi <i>et al.</i> , 1999
	Arp2/3		+	+			May <i>et al.</i> , 2000
	Scar	+	+		+		Seastone <i>et al.</i> , en préparation
	WASP		+				Lorenzi <i>et al.</i> , 2000
	coronine	+			+	+	Maniak <i>et al.</i> , 1995 De Hostos, 1999
	MARCKS		0	0		0	Carballo <i>et al.</i> , 1999
	ABP120	+			+		Cox <i>et al.</i> , 1996
	taline	+					Niewohner <i>et al.</i> , 1997
	a-actinine	0				+	Rivero <i>et al.</i> , 1999 Araki <i>et al.</i> , 2000
	microtubules		0	+		+	Racoosin et Swanson, 1992 Aderem et Underhill, 1999
	myosine (IB, IC, ID et IK)	+			+		Schwarz <i>et al.</i> , 2000 Jung <i>et al.</i> , 1996 ; Temesvari <i>et al.</i> , 1996 Novak <i>et al.</i> , 1995 ; Dai <i>et al.</i> , 1999

3.2.2. Comparaison avec la macropinocytose chez *Dictyostelium*.

Chez *Dictyostelium*, la phagocytose et la macropinocytose présentent toutefois une régulation opposée (Tableau 3.1). En effet, en cas d'abondance de bactéries, *Dictyostelium* se nourrit exclusivement par phagocytose; à l'inverse, lors de la culture en conditions axéniques, la famine induit la macropinocytose (Clarke et Kayman, 1987). De plus, trois différences dans la régulation de la phagocytose et de la macropinocytose ont été clairement mises en évidence chez cette amibe par le laboratoire de Cardelli (Seastone et al., 1998 et 1999): (i) La protéine Rap1, abolie le phénotype transformé des fibroblastes NIH3T3 en réponse à K $\bar{t}$ -Ras par inhibition de la signalisation en aval de la PLC, y stimule la phagocytose mais inhibe la macropinocytose (Seastone *et al.*, 1999). (ii) Il en va de même pour la petite GTPase RacC, dont la surexpression stimule la phagocytose, mais inhibe la macropinocytose (Seastone *et al.*, 1998). (iii) Enfin, la wortmannine bloque la formation des macropinosomes, mais n'affecte pas la phagocytose chez *Dictyostelium*. On conclura de tout ceci que la macropinocytose et la phagocytose sont deux voies d'endocytose morphologiquement similaires, sans doute utilisant la même machinerie régulatrice de l'actine, mais qui peuvent obéir à des régulations distinctes selon le type cellulaire.

3.2.3. Comparaison avec la macropinocytose constitutive des cellules dendritiques.

Les cellules dendritiques jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire. Au stade immature, lorsque les cellules dendritiques sont distribuées à la périphérie de l'organisme, l'endocytose fluide est fortement accélérée, ce qui permet une capture très active et donc l'échantillonnage des antigènes solubles qui seront ensuite apprêtés en vue de leur présentation. Ensuite, pendant que ces cellules poursuivent leur processus de maturation, elles ralentissent leur endocytose en migrant vers les organes lymphoïdes, où elles présentent les peptides antigéniques par le complexe majeur d'histocompatibilité de la classe II aux cellules T naïves (Sallusto *et al.*, 1995).

Les cellules dendritiques présentent naturellement une activité constitutive de "ruffling", tant au stade immature qu'au stade mature, mais une macropinocytose constitutive au seul stade immature. Les macropinosomes formés sont structurellement comparables à ceux des fibroblastes transformés par les oncogènes. Le traitement des cellules dendritiques

immature par la toxine B de *Clostridium difficile*, qui inhibe tous les membres de la famille des Rho-GTPases, bloque la macropinocytose constitutive. Ceci suggère qu'au moins une Rho-GTPase est nécessaire à cette activité (pour une revue, voir Nobes et Marsh, 2000). La microinjection dans les cellules dendritiques immatures dérivées de la rate d'une forme "dominante-négative" de la protéine Rac (N17Rac1), ou le prétraitement de ces cellules avec la wortmannine abroge cette macropinocytose, mais sans affecter le "ruffling" membranaire (West *et al.*, 2000 ; Garrett *et al.*, 2000). En revanche, la microinjection dans les cellules dendritiques immatures de la C3-transférase, qui inhibe spécifiquement Rho, n'affecte pas la macropinocytose. Tous ceci suggère que, chez les cellules dendritiques immatures, (i) au contraire de Rho, la PI3K et Rac sont nécessaires à la macropinocytose constitutive; (ii) la régulation de la macropinocytose et celle du "ruffling" membranaire sont distinctes, à la différence de la macropinocytose constitutive des fibroblastes Rat-1 transformés par v-Src et K-Ras où ces deux activités semblent étroitement couplées (Veithen *et al.*, 1998; Amyere *et al.*, 2000); et (iii) la PI3K et Rac sont impliqués dans une étape en aval du "ruffling", probablement dans le processus de fusion qui génère les macropinosomes.

En outre, dans les cellules dendritiques elles-mêmes, la signalisation peut varier selon l'origine des cellules: tantôt elle dépend de Cdc42, tantôt elle n'en dépend pas. Dans les cellules dendritiques immatures dérivées de la moelle osseuse, Cdc42 semble nécessaire et suffisant à induire la macropinocytose (Garrett *et al.*, 2000). En effet, la microinjection d'une forme "dominante-négative" de la protéine Cdc42 à leur stade mature accélère l'endocytose fluide en réactivant la macropinocytose, c-à-d en revenant au stade immature. En revanche, dans les cellules dendritiques dérivées de la rate au stade immature, la microinjection d'une forme "dominante-négative" de la protéine Cdc42 n'affecte pas la macropinocytose. De plus, à leur stade mature qui ne montre normalement plus de macropinocytose, la microinjection d'une forme "dominante-positive" de la protéine Rac ne restaure pas cette activité. Ces observations suggèrent que la machinerie de la macropinocytose reste disponible après maturation dans les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse, mais ne l'est plus dans les cellules dendritiques dérivées de la rate. De plus, Rac n'est pas le (seul) facteur limitant de la macropinocytose constitutive, puisqu'il est incapable à lui seul d'induire cette activité dans les cellules dendritiques matures dérivées de la rate: d'autres régulateurs encore inconnus sont donc nécessaires (West *et al.*, 2000). Le rôle respectif de Rho, Rac et Cdc42 dans la voie de signalisation de la macropinocytose induite par v-Src et K-Ras est une perspective évidente de mon travail.

3.2.4. Relais par la PI3K de la signalisation de la macropinocytose constitutive induite par les oncogènes.

Nous avons commencé notre analyse par l'utilisation de deux inhibiteurs pharmacologiques structuellement et fonctionnellement distincts, qui bloquent tous deux spécifiquement l'activité lipide-kinase de la PI3K. La wortmannine est un inhibiteur irréversible, qui se lie de manière covalente à une lysine dans le domaine catalytique lipide-kinase de la protéine; le LY294002, analogue à la quercétine, exerce une inhibition compétitive réversible pour le site de liaison de l'ATP (Stein et Waterfield, 2000). Le traitement des fibroblastes transformés par ν Src et K-Ras avec ces deux inhibiteurs abroge la macropinocytose constitutive et restaure les câbles de tension comparables à ceux trouvés dans les fibroblastes contrôles.

La classe IA de la PI3K, la plus étudiée, a été impliquée dans le "ruffling" membranaire induit de manière transitoire par l'insuline et les facteurs de croissance dans les cellules CHO (Kotani *et al.*, 1994). ν Src peut activer la PI3K en recrutant à la membrane la sous-unité régulatrice p85, laquelle à son tour recrute la sous-unité catalytique p110, c-à-d conduit la PI3K au voisinage de ses substrats au niveau de la membrane. Src recrute la p85 par deux domaines distincts: (i) par son domaine SH3, qui se lie au domaine riche en proline de la p85 (Liu *et al.*, 1993), et (ii) par son domaine SH2, qui se lie à une tyrosine phosphorylée sur la p85 (Haefner *et al.*, 1995). Au contraire, la protéine Ras présente un site d'interaction avec la p110 et peut donc la recruter et l'activer directement (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1994). Ces deux mécanismes rendent bien compte du rôle commun de la PI3K dans la signalisation immédiatement en aval de ces deux oncogènes vers la macropinocytose constitutive.

La construction de transfectants stables de la PI3K a été utilisée dans un double but. D'abord, nous avons voulu compléter les expériences pharmacologiques en examinant si la PI3K est bien nécessaire à la macropinocytose constitutive des fibroblastes transformés par ν Src. Dans ce but, nous avons recherché si cette macropinocytose était abolie par une construction "dominante-négative", obtenue après transfection stable des fibroblastes Rat-1/ ν Src avec un vecteur d'expression (pcD-SR α - Δ p85) constitué d'une forme tronquée du gène de la p85 α bovine (codant pour la protéine Δ p85, dépourvue de domaine d'interaction avec la p110), sous le contrôle du promoteur fort SR α . Cette protéine devrait se lier aux mêmes sites

du feuillet interne de la membrane péricellulaire que la p85 endogène et donc entrer en compétition avec celle-ci, tout en étant incapable de recruter la p110 à la membrane plasmique. Ensuite, tester si l'activation de la PI3K est suffisante pour induire la macropinocytose chez les fibroblastes non transformés. Ceci serait vérifié si la macropinocytose était induite de manière constitutive dans la lignée contrôle (Rat-1/CTL) après transfection avec le plasmide pcD-SR α -Wp85 contenant le cDNA complet (Wp85) en aval de ce même promoteur SR α . Les détails du plasmide (pcD-X), du promoteur eucaryotique SR α et le clonage de cDNA sauvage et muté de la p85 α ont été rapportés par l'équipe de Ogawa, qui nous a aimablement fourni les plasmides (Takebe *et al.*, 1988; Hara *et al.*, 1994; Kotani *et al.*, 1994).

Grâce à la collaboration du Dr. B. Payraastre, nous avons pu vérifier, par la mesure de l'incorporation du ^{32}P dans les phospho-inositides et leur séparation par HPLC, que la synthèse de PtdIns 3,4 P2 et PtdIns 3,4,5 P3 est fortement inhibée non seulement par la wortmannine et le LY294002 comme attendu, mais aussi dans la construction "dominante-négative" (Δ p85) et qu'elle est stimulée dans la construction "dominante-positive" (Wp85). De plus, l'immunoprécipitation du substrat du récepteur de l'insuline (IRS-1) entraîne la co-immunoprécipitation d'une activité PI3K mesurée *in vitro* par la conversion de phospho-inositides en phospho-inositides 3P, non seulement en réponse à l'insuline mais aussi à v-Src. Cette activité disparaît chez le "dominant-négatif" et apparaît chez le "dominant-positif". Ceci suggère que la PI3K fait partie d'un complexe multiprotéique contenant IRS-1.

Nous avons observé que l'effet du "dominant-négatif" (Δ p85) dans les cellules transformées par v-Src provoque la réapparition des fibres de tension, la raréfaction de l'actine au niveau du cytocortex, et la disparition du "ruffling" et de la macropinocytose. En revanche, le "dominant-positif" (Wp85) fait disparaître les câbles de tension et provoque au niveau du cytocortex un recrutement d'actine F responsable de la formation du "ruffling" membranaire et d'une macropinocytose similaire à celle observée dans les fibroblastes transformés. L'ensemble de ces observations démontre que la PI3K est nécessaire au remodelage de l'actine corticale conduisant à la macropinocytose et que son activation est suffisante pour induire cette réponse.

3.2.5. Relais par la PI-PLC en aval de la PI3K.

Puisque l'activation de la PI3K est nécessaire et suffisante pour induire la macropinocytose constitutive, les phospho-inositides D3 produit par cette enzyme au niveau de la membrane plasmique, doivent y recruter et activer diverses protéines effectrices. Parmi celles-ci, la PLC γ peut-être recrutée par interaction avec le PtdIns 3,4,5P3, soit par son domaine SH2, soit par son domaine PH (Bae *et al.*, 1998; Rameh *et al.*, 1998; Falasca *et al.*, 1998). Notre travail a permis d'impliquer effectivement les phospholipases spécifiques du phosphatidylinositol (ou PI-PLC), en aval de la PI3K dans la signalisation de la macropinocytose chez les fibroblastes. En effet, l'activation de la PI3K par v-Src et le "dominant-positif" de cette enzyme s'accompagne d'une activation de la PI-PLC, démontrée par la production accrue d'IP3. De plus, les inhibiteurs pharmacologiques de la PI-PLC (NCDC et U73122) bloquent la macropinocytose dans les cellules transformées par l'oncogène v-Src et dans le "dominant-positif" de la PI3K, sans inhiber cette enzyme. On sait que l'activation de la PLC entraîne le clivage du PtdIns4,5 P2 en DAG et en IP3, ce qui active la PKC sur la membrane et provoque l'augmentation du calcium cytosolique, respectivement. La suite logique est d'examiner si la macropinocytose nécessite ces deux voies de signalisation en aval de la PLC, c-à-d dépend à la fois d'une activation de la PKC et d'une augmentation du Ca²⁺. Ceci sera développé dans les perspectives.

3.2.6. Relais par les Rho GTPases?

Il existe une relation étroite entre la PI3K, les Rho-GTPases, la réorganisation du cytosquelette d'actine et le "ruffling" membranaire. En effet, les inhibiteurs pharmacologiques de la PI3K bloquent le "ruffling" membranaire induit de manière transitoire par l'insuline, l'HGF ou le PDGF mais reste sans effet sur le "ruffling" constitutif induit par un "dominant-positif" de Rac. Ces observations placent donc Rac en aval et sous le contrôle de la PI3K dans la voie de signalisation du ruffling membranaire (Kotani *et al.*, 1994). La PI3K a donc un rôle central dans la régulation de l'activité de Rac, responsable du "ruffling" membranaire. La petite GTPase Rac est principalement activée par les facteurs d'échange GEFs. Ceci peut-être assuré directement par les produits de la PI3K, qui recrutent à la membrane une GEF (Vav) par son domaine PH et indirectement, suite à une stimulation de l'activité tyrosine kinase de la protéine Lck par interaction avec le domaine riche en proline de la p85. Dans notre travail,

le "ruffling" membranaire producteur de macropinosomes est observé en permanence chez les fibroblastes transformés par v-Src et K-Ras ou chez le "dominant-positif" de la PI3K mais est exceptionnel dans les cellules Rat-1 contrôles et dans le "dominant-négatif", où le PtdIns 3,4,5P3 n'est pas détecté et où il est aboli par les inhibiteurs de la PI3K et de la PI-PLC.

Le marquage de l'actine avec la phalloïdine-rhodamine montre en revanche des câbles de tension qui traversent de bord en bord les cellules contrôles et le "dominant-négatif". Ces câbles disparaissent chez les fibroblastes transformés par les oncogènes et le "dominant-positif". Ces observations suggèrent fortement que la macropinocytose nécessite l'inactivation de la protéine Rho. v-Src phosphoryle la protéine p190Rho-GAP, ce qui induit son association avec la protéine p120Ras-GAP, qui inactive Rho (Fincham *et al.*, 1999). De son côté, la protéine Ras-GTP est capable de se lier directement à la p120Ras-GAP, ce qui conduit à l'inactivation Rho (Meijne *et al.*, 1997). Il sera donc intéressant de tester si l'inactivation de Rho est en soit suffisante pour produire la macropinocytose.

3.2.7. Accélération sélective par l'AMPc de la régurgitation à partir des macropinosomes.

Bien que la formation des vésicules de pinocytose et l'efflux à partir de celles-ci (régurgitation) soient des processus constitutifs, ils peuvent être régulés de manière très différente selon les types cellulaires. Dans les cellules MDCK, l'augmentation du contenu cellulaire en AMPc par activation de la protéine kinase A (PKA) s'accompagne d'une stimulation de la pinocytose indépendante de la clathrine, sélectivement au pôle apical de la cellules (Eker *et al.*, 1994). Au contraire, dans une autre lignée épithéliale, les cellules T84, l'activation de la PKA provoque une diminution de la pinocytose (Bradbury et Bridges, 1992).

Chez les fibroblastes transformés par v-Src, nous avons observé que ni l'activation de la cyclase (par la forskoline) ni l'utilisation d'un analogue de l'AMPc (le dibutyryl AMPc) n'affectent la formation des macropinosomes, mais que l'AMPc accélère sélectivement la régurgitation à partir des macropinosomes (Veithen *et al.*, 1998). En effet, nos observations montrent que l'augmentation du niveau d'AMPc intracellulaire dans les fibroblastes Rat-1 contrôles n'affecte ni la vitesse de l'endocytose fluide proprement dite (mesurée à des temps de capture très courts), ni celle de l'endocytose médiée par le récepteur de la transferrine. En revanche, elle réduit de moitié le niveau d'accumulation globale d'un traceur de l'endocytose

fluide dans les fibroblastes transformés par v-Src, sans modifier la formation des macropinosomes, en stimulant sélectivement la régurgitation dans ces cellules. Cet effet pourrait être sélectif de la macropinocytose constitutive. En effet, dans les cellules A431, l'AMPC inhibe presque complètement le "ruffling" et la stimulation transitoire de l'accumulation d'un traceur de l'endocytose fluide induite par l'EGF ou par l'insuline. De plus, l'AMPC inhibe la régurgitation de la peroxydase stimulée par EGF ou par l'insuline, mais ce traitement n'a aucun effet sur la régurgitation dans les cellules non stimulées (Miyata *et al.*, 1989).

Chez les cellules de neuroblastome humain SH-EP, la forskoline et le dibutyryl AMPc induisent tous deux la disparition des câbles de tension, ce qui se traduit par l'arrondissement cellulaire (Dong *et al.*, 1998). Le mécanisme a été élucidé : l'AMPC active la PKA, qui inactive RhoA par phosphorylation en ser¹⁸⁸, ce qui diminue sa liaison avec la protéine-cible ROK α et conduit à la disparition des câbles de tension et l'arrondissement des cellules. Toutefois, l'absence d'effet de l'AMPC sur l'endocytose fluide dans les fibroblastes contrôles (ni sur la capture, ni sur l'efflux) suggère que ce second messager n'est pas suffisant pour induire la macropinocytose. Dans les fibroblastes transformés par v-Src, l'augmentation de l'AMPC n'accélère pas la formation des macropinosomes, ce qui pourrait s'expliquer si l'effet de l'AMPC était masqué par celui de Src. Par ailleurs, la combinaison d'une accélération de l'efflux et d'une inactivation de Rho sous l'effet de l'AMPC, pourrait indiquer que la diminution de la tension de la membrane péricellulaire favorise l'exocytose de vésicules de régurgitation à partir des macropinosomes, mais non des vésicules de recyclage contenant la transferrine à partir des endosomes.

CHAPITRE 4. PERSPECTIVES.

4.1. Polarité des régulateurs et effecteurs de la macropinocytose.

Dans les cellules Swiss 3T3, l'activation d'une forme thermosensible de v-Src induit sa translocation rapide du cytosol vers la membrane plasmique; ceci démontre que l'ancre myristoylée de Src ne suffit pas à son insertion à la membrane plasmique et que son activité enzymatique de tyrosine-kinase est en outre requise. De plus, la cytochalasine D (un inhibiteur de la polymérisation de l'actine) empêche cette translocation (Fincham *et al.*, 1996). Ceci laisse à penser que la "plate-forme" membranaire sur laquelle Src activée pourra être recrutée dépend elle-même des microfilaments d'actine corticaux. Le recrutement à la membrane plasmique de la PI3K, de la PLC, et de divers régulateurs directs du cytosquelette d'actine, tels que Rac, Wasp/Scar, Arp2/3, etc, ..., a été longuement discuté dans l'introduction. Notre première hypothèse est que, dans les fibroblastes transformés par v-Src et par K-Ras, ainsi que dans la construction "dominante-positive" de la PI3K, Src et les divers régulateurs du cytosquelette d'actine corticale sont en outre restreints à des domaines polarisés de la membrane plasmique, en particulier au front de migration et dans les domaines où le remodelage de l'actine corticale est intense. Notre seconde hypothèse est que leur recrutement polarisé se fait en cascade et que chaque étape de la cascade dépend de l'activité de l'acteur concerné ou de l'acteur en amont.

Pour tester la première hypothèse, il conviendra de localiser les protéines d'intérêt par immunofluorescence et de rechercher leur association éventuelle par double marquage. Ces expériences seront réalisées dans les fibroblastes transformés par v-Src thermosensible (Rat-1/tsLA29), prétraités ou non avec des inhibiteurs de la polymérisation de l'actine, des tyrosine-kinases, de la PI3K et de la PI-PLC. Pour obtenir des informations plus quantitatives, l'association physique de Src avec la PI3K, voire avec la PLC, devrait être recherchée par co-immunoprécipitation. A cet effet, nous avons déjà construit des "dominants-positifs" et "négatifs" de la PI3K étiquetés par l'épitope-HA, ce qui facilitera son immunoprécipitation ainsi que sa localisation subcellulaire. Enfin, on recherchera une association étroite entre les sites de translocation préférentielle de ces régulateurs et la réorganisation locale du cytosquelette d'actine corticale, ainsi que la formation des macropinosomes à partir des domaines où le remodelage du cytocortex est le plus intense. A cet effet, on utilisera l'actine-

GFP qui permet de suivre, *in vivo* et en temps réel, la dynamique des microfilaments sous l'effet de l'activation de Src et sa dépendance de la PI3K et de la PI-PLC.

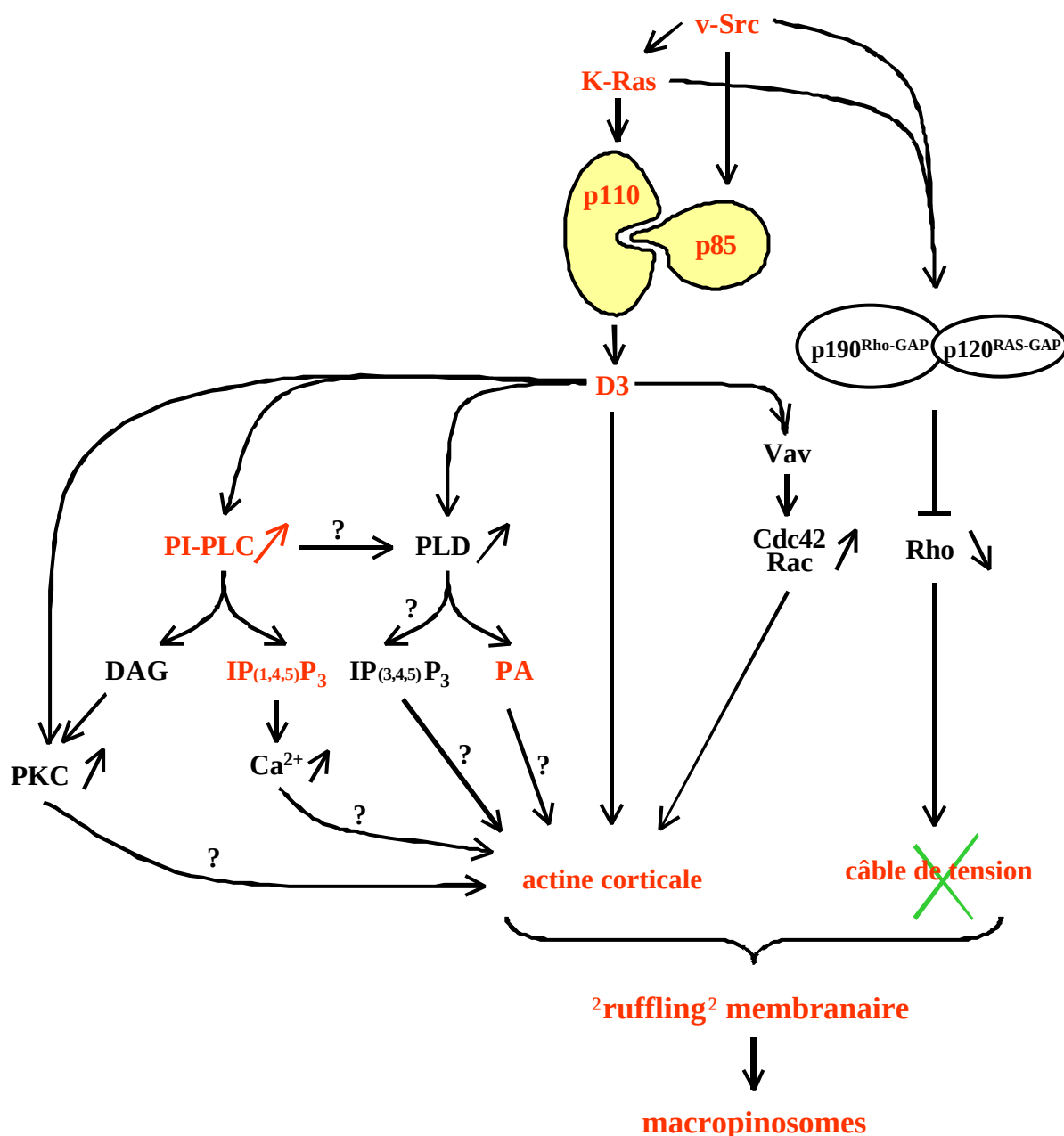
4.2. Rôle du calcium cytosolique.

L'implication de la PI-PLC en aval de la PI3K dans la régulation du "ruffling" membranaire et de la macropinocytose suggère un rôle probable du calcium dans la signalisation de ces activités (pour un modèle hypothétique général, voir Figure 4.1). En effet, l'inositol-trisphosphate, produit par la PI-PLC, élève la concentration cytosolique du calcium, régulateur-clé du cytosquelette d'actine. De plus, l'extension des filopodes au niveau du cône de croissance des neurones, en réponse à la stimulation des intégrines par le peptide RGD qui est leur ligand minimal, est corrélée avec une élévation locale et transitoire du Ca^{2+} libre dans ces prolongements *tubulaires* (Gomez *et al.*, 2001). Par extension aux prolongements *lamellaires*, il est raisonnable de proposer l'hypothèse qu'une concentration préférentielle du Ca^{2+} libre à leur niveau est nécessaire à l'activité du "ruffling" conduisant à la formation des macropinosomes. Cette hypothèse est confortée par des résultats préliminaires obtenus par imagerie cellulaire du Ca^{2+} , en utilisant l'indicateur fluorescent Fura-2 dans les fibroblastes transformés par v-Src (collaboration avec les Dr. P. Gailly et P. Gilon, UCL).

Pour examiner si l'élévation de la concentration cytosolique du calcium est nécessaire pour le "ruffling" et la macropinocytose, on testera l'effet du BAPTA-AM, un chélateur du Ca^{2+} activable dans les cellules, sur la macropinocytose des fibroblastes transformés par v-Src et par K-Ras ou "dominant-positif" de la PI3K. Si la chélation contrôlée du Ca^{2+} cytosolique libre abroge ces deux activités, on vérifiera si cette inhibition est bien spécifique de la macropinocytose (qui dépend de l'actine), et n'affecte pas la micropinocytose (qui dépend de la clathrine), en analysant en parallèle l'endocytose médiée par le récepteur de la transferrine. D'autres modulateurs de la concentration cytosolique du Ca^{2+} en aval de la PLC, qui empêchent la formation des réserves de Ca^{2+} sensibles à l'IP3 au niveau du réticulum endoplasmique tels que la thapsigargine (effet irréversible) et l'acide cyclopiazonique (effet réversible), pourront également être testés. A l'inverse, on peut induire une élévation artificielle de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} , en traitant les fibroblastes contrôles par des ionophores du calcium, tel que le A23187 : ceci accélère en effet la capture de peroxydase (Veithen, thèse de doctorat). De manière plus spécifique, on pourrait explorer si la microinjection d'IP3 suffit à induire le "ruffling" et la formation des macropinosomes.

Pour préciser la topologie et la périodicité éventuelle d'élévations de la concentration cytosolique du Ca^{2+} , on devrait ensuite poursuivre l'utilisation des indicateurs fluorescents. Enfin, dans le but de vérifier si les relais de signalisation impliquent bien la cascade attendue $\text{Src} \rightarrow \text{PI3K} \rightarrow \text{PLC} \rightarrow \text{réticulum endoplasmique}$, on recourra à l'imagerie cellulaire du calcium de fibroblastes transformés, prétraités ou non par les inhibiteurs pharmacologiques correspondants à chacune des étapes concernées.

Figure 4.1: Modèle hypothétique de la signalisation de la macropinocytose constitutive chez les fibroblastes transformés par v-Src et K-Ras (documenté, postulé).



4.3. Protéines régulées par le Ca^{2+} .

Parmi les protéines dont l'activité est régulée par le Ca^{2+} , on devrait s'intéresser à celles contrôlant la polymérisation de l'actine, comme la gelsoline (voir Figure 1.16) et les PKCs que nous discuterons plus loin. Les études du rôle de la gelsoline montrent des résultats discordants selon le système cellulaire. En effet, le "knock-out" de la gelsoline ($\text{Gsn}^{-/-}$) inhibe la motilité cellulaire, le "ruffling" membranaire et l'endocytose fluide des fibroblastes (Azuma *et al.*, 1998), mais ne semble pas affecter le "ruffling" membranaire et la macropinocytose des cellules dendritiques (West *et al.*, 1999). Cette discordance n'est pas expliquée. On pense que la gelsoline peut être recrutée à la membrane, soit par une interaction directe protéine/protéine puisqu'elle co-immunoprécipite avec c-Src (Chellaiah *et al.*, 1998; notons que cet immunoprécipité présente aussi une activité PI3K élevée), soit par interaction protéine/phospho-inositides D3 via son domaine K/R (voir Tableau 1.4).

Pour examiner si la gelsoline est nécessaire à la macropinocytose constitutive résultant des oncogènes, on pourrait soit transformer des fibroblastes immortalisés de souris $\text{Gsn}^{-/-}$ avec v-Src ou K-Ras, ou, plus simplement, microinjecter dans les fibroblastes Rat-1 transformés un peptide compétiteur, qui empêche la fixation de la gelsoline sur les phospho-inositides (Janmey *et al.*, 1992; peptide mis à notre disposition). Pour étudier le mécanisme d'activation locale de la gelsoline et/ou rechercher son recrutement à la membrane, on localisera par immunofluorescence la gelsoline et les phospho-inositides D3 (qui peuvent à présent être marqués directement par des anticorps; Rickert *et al.*, 2000), et on déterminera sa répartition entre un culot membranaire et le surnageant à haute vitesse (cytosol), dans les cellules prétraitées ou non avec des inhibiteurs des tyrosine-kinase, de la PI3K et de la PI-PLC. Ceci permettrait de mettre en évidence si la translocation de la gelsoline à la membrane plasmique et sa co-localisation éventuelle avec les phospho-inositides D3 dépendent ou non de la cascade $\text{Src} \rightarrow \text{PI3K} \rightarrow \text{PLC}$. Enfin, la co-immunoprécipitation avec la gelsoline après activation de la forme thermosensible de v-Src (Chellaiah *et al.*, 1998) pourrait permettre d'identifier ses partenaires, et de tester si ces interactions dépendent de cette cascade.

4.4. Implication de la protéine-kinase C.

La protéine kinase C (PKC) désigne une famille de Ser/Thr-kinases caractérisées par un domaine régulateur variable de 40 kDa à l'extrémité N-terminale, un domaine charnière flexible et un domaine catalytique conservé de 45 kDa à l'extrémité C-terminale. Chez les mammifères, la famille des PKCs comprend 12 isoformes, réparties en trois classes selon leur mode d'activation (Toker *et al.*, 1994; Way *et al.*, 2000). La classe c (pour conventionnelle) est composée des isoformes α , β I, β II, β III et γ , qui peuvent toutes être activées par le Ca^{2+} , le DAG, la lysophosphatidylcholine, la phosphatidylsérine et les acides gras insaturés. La classe n (pour nouvelle) est composée des isoformes δ , ϵ , η et θ qui sont insensibles au Ca^{2+} mais peuvent être activées par le DAG et la phosphatidylsérine; les isoformes ϵ et η peuvent de plus être activées par le PtdIns3,4,5 P3, et l'isoforme ϵ , par les acides gras insaturés. Enfin, la classe a (pour atypique) est composée des isoformes ι , λ et ζ , toutes insensibles au Ca^{2+} , au DAG et aux esters de phorbol, mais pouvant être activées par la phosphatidylsérine, les acides gras insaturés et le PtdIns3,4,5 P3; la PKC ζ pourrait aussi être activée par l'acide phosphatidique. L'expression et la localisation subcellulaire des différentes isoformes de PKC varient en fonction du type cellulaire. Si les isoformes α , β I, β II, δ et ζ (représentant donc les 3 classes) semblent ubiquistes, l'isoforme θ semble prédominante dans le muscle, et l'isoforme η est fortement exprimée dans la peau et les poumons. L'isoforme γ semble retrouvée uniquement dans le système nerveux central (Way *et al.*, 2000).

La PKC a de nombreux effecteurs (plus d'une centaine), impliqués dans de nombreux processus cellulaires y compris le "ruffling" membranaire, la phagocytose et l'adhérence cellulaire, etc.... La régulation des interactions membrane/cytosquelette semble d'ailleurs un effet important de la signalisation de la PKC (Jaken, 1996). La PKC module en particulier diverses protéines associées au cytosquelette d'actine, telles que la vinculine, la taline et les MARCKSs (pour "myristoylated alanine-rich protein kinase C-substrates"). Les MARCKSs peuvent être phosphorylés par les isoformes α , δ ou ϵ avec une haute affinité, mais non par l'isoforme ζ . Les PKCs peuvent aussi interagir avec la paxilline par l'intermédiaire du domaine LIM de ce substrat. De plus, les PKCs de la classe n interviennent dans la déphosphorylation de la cofiline induite par le PMA (Djafarzadeh and Niggli, 1997).

Tout ceci suggère que des PKCs des trois familles peuvent être impliquées en amont de ces effecteurs du cytocortex, après leur activation soit par la PI3K via le PtdIns3,4,5 P3, soit par la PLC via le Ca^{2+} ou le DAG. Puisque la PI3K et la PI-PLC sont des relais précoces

dans la signalisation vers le cytocortex de la macropinocytose constitutive des cellules transformées, il convient donc de tester si la PKC est effectivement nécessaire à cette activité et, dans ce cas, par quel relais elle est activée. Alex Veithen a montré que deux inhibiteurs classiques de la PKC, la staurosporine et le Ro31-8220, n'ont pas d'effet aux concentrations usuelles sur l'accumulation de peroxydase après 30 minutes de capture par les fibroblastes Rat-1 contrôles ou transformés par v-Src (Veithen, 1997). Il a aussi observé que le PMA stimule cette accumulation dans les fibroblastes Rat-1 mais l'inhibe chez les fibroblastes transformés par v-Src. Si cette accumulation à un temps fixe reflète fidèlement la macropinocytose (ce qui reste à confirmer par la microscopie), ces résultats suggèrent que la PKC peut participer à la signalisation de la macropinocytose transitoire induite de manière artificielle par les esters de phorbol, mais ne serait pas nécessaire à la macropinocytose constitutive des cellules transformées. Une inhibition par le PMA de la macropinocytose induite par v-Src est plus surprenante et suggérerait un antagonisme entre la voie activée par v-Src et celle activée par la PKC dans les cellules non transformées. On pourrait alors penser que la PKC contrôlerait un niveau d'intégration intermédiaire, tel que celui des Rho-GTPases, qui peut orienter le cytosquelette vers des configurations distinctes.

L'analyse d'autres systèmes, comme les cellules transformées par K-Ras ou les "dominants-négatifs" et "-positifs" de la PI3K, ainsi que l'utilisation d'autres inhibiteurs ou activateurs spécifiques des trois classes de la PKC pourraient clarifier son rôle dans la macropinocytose constitutive. L'analyse d'effet d'inhibiteurs de la PKC sur l'organisation du cytosquelette d'actine de "dominants-positifs" ou "-négatifs" des Rho-GTPases devrait clarifier si la PKC fonctionne en amont ou en aval de ces petites protéines G. En parallèle, l'effet de toxines activatrices ou inhibitrices des Rho-GTPases sur la réponse au PMA dans les fibroblastes transformés pourrait permettre de mieux comprendre son mécanisme d'action.

Une cible en aval de la PKC particulièrement intéressante est la phospholipase D (PLD). Par son extrémité N-terminale, celle-ci peut interagir directement avec la PKC (Park *et al.*, 1998). On sait en outre que des inhibiteurs de la PKC inactivent la PLD, alors qu'une stimulation de la PKC par le PMA l'active (pour une revue voir Exton, 1998). L'intervention de la PLD dans la signalisation de la macropinocytose est discutée à la section suivante.

4.5. Implication de la phospholipase D.

La phospholipase D a pour substrat principal la phosphatidylcholine (PC; d'où son appellation PC-PLD), qu'elle l'hydrolyse en acide phosphatidique (PA) et en choline. Elle est largement distribuée dans les cellules de mammifères et ses deux isoformes connues, (PC-PLD1 et PC-PLD2) semblent insensibles au Ca^{2+} . Elle peut également hydrolyser la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS) ainsi que le phosphatidylinositol, du moins dans certains tissus (pour une revue récente, voir Liscovitch *et al.*, 2000). L'activité de la PLD est stimulée par divers agonistes, tels que le PDGF et l'EGF dans les fibroblastes Rat-1 et Swiss 3T3, l'insuline et le PMA chez les myoblastes L6 et le fMLP chez les neutrophiles. Ces divers agonistes stimulent aussi une réponse macropinocytaire transitoire. La surexpression de la $\text{PLC}\gamma 1$ dans les fibroblastes NIH 3T3 potentialise l'activation de la PLD par le PDGF, et cette activation est bloquée par des inhibiteurs des protéine tyrosine-kinases (Lee *et al.*, 1994). Toutefois, la phagocytose médiée par le $\text{Fc}\gamma\text{R}$ active la PLD comme relais dans une cascade de signalisation qui ne semble pas nécessiter la PLC: $\text{Fc}\gamma\text{R} \rightarrow \text{PI3K} \rightarrow \text{PLD} \rightarrow \text{PAP} \rightarrow \text{PKC} \rightarrow \text{PLA2} \dots \text{actine}$ (pour une revue, voir Lennartz, 1999).

Grâce à leur domaine PH, les deux isoformes de la PLD sont recrutées à la membrane sur certains phospho-inositides tel que le PtdIns4,5 P_2 ; ce dernier est d'ailleurs nécessaire à l'activation de la PLD *in vitro*. Les études sur l'activation de la PLD1 recombinante exprimée dans les cellules d'insectes Sf9 ont démontré la possibilité d'une interaction directe avec la $\text{PKC}\beta 1$, RhoA-GTP, et la petite GTPase ARF-GTP, et ont suggéré la présence de sites séparés sur la PLD pour ces divers partenaires, chacun participant à son activation (Hammond *et al.*, 1997). De plus, l'inhibition de Rho par la toxine C3 de *Clostridium botulinum* ou par la toxine B de *Clostridium difficile* inhibe la PLD, ce qui suggère que l'interaction avec Rho-GTP est bien nécessaire à l'activation de la PLD.

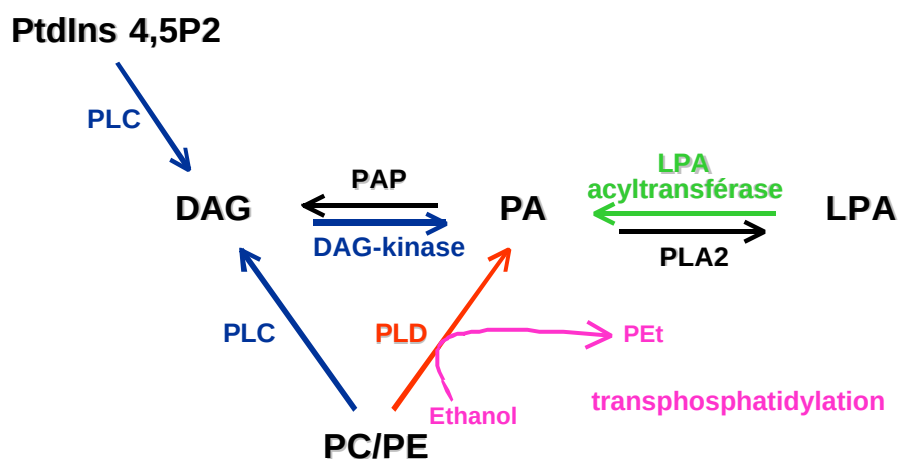
Le PA est un lipide quantitativement mineur, surtout connu comme intermédiaire commun à la synthèse des autres phospholipides, tels que le DAG, via la PA-phosphohydrolase, et l'acide lysophosphatidique ou LPA par la PLA2 (Figure 4.2). Trois voies métaboliques principales impliquant le PA ont été décrites (Figure 4.2):

- l'hydrolyse par la PLC de certains phospholipides, comme le PC ou le phosphatidylinositol (PI) et ses dérivés, conduit à la formation du DAG, qui est ensuite phosphorylé par la DAG-kinase en PA;
- l'hydrolyse par la PLD du PC ou du PE produit directement le PA;
- l'acylation par la LPA acyltransférase du LPA produit, par ex., par la phospholipase A2.

Par ailleurs, le PA peut être hydrolysé par la PA-phosphohydrolase (PAP), qui génère le DAG, ce qui active la PKC. L'importance relative de ces divers mécanismes est très différente d'un type cellulaire à l'autre.

En présence d'alcools primaires (par ex. l'éthanol ou le n-butanol), la PLD catalyse une réaction de transphosphatidyltion, qui forme du phosphatidylalcool à la place du PA. Cette réaction est spécifique de la PLD. Elle permet non seulement de quantifier son activité dans les cellules mais aussi de supprimer sa production de PA. Celui-ci peut toutefois être encore produit à partir du DAG par la DAG-kinase ou à partir du LPA par la LPA acyltransférase.

Figure 4.2. Les voies de synthèse et de dégradation du PA et son détournement vers le phosphatidyléthanol par transphosphatidyltion.



Ce schéma distingue les trois voies de synthèse du PA: (1) par la PLC suivie de la DAG-kinase (en bleu); (2) par la PLD (en rouge); (3) et par la LPA-acyltransférase (en vert). A son tour, le PA est converti en DAG par la PA-phosphohydrolase (PAP) ou en LPA par la PLA2. En présence d'éthanol, la PLD convertit la PC ou la PE en phosphatidyléthanol (PEt) en lieu et place du PA (en fuchsia).

Le PA affecte à son tour diverses cibles. Il inhibe l'activité PI3K *in vitro* (IC50 entre 10 et 20 μ M), ce qui laisse penser qu'il pourrait assurer un mécanisme de régulation en retour ("feed-back négatif") PI3K→PLD —| PI3K. Un tel mécanisme pourrait expliquer le caractère transitoire de la macropinocytose induite par les facteurs de croissance ou les esters de phorbol. On a également proposé que la cytotoxicité de certains phospho-inositides pourrait être contrôlée grâce à la production du PA par la PLD (Lauener *et al.*, 1995). Le PA active en outre la PtdIns 4P5-kinase qui produit le PtdIns4,5P2, ainsi que la PLC γ 1 qui l'hydrolyse (Lennartz, 1999). De plus le PA active par recrutement à la membrane trois isoformes de la PKC (α , ϵ et ζ ; Nishizuka, 1986). Enfin, chez les plaquettes sanguines, le PA est capable de mimer l'effet de la thrombine et du PDGF dans la formation des câbles de tension, ce qui suggère son rôle dans la polymérisation de l'actine; la cytochalasine n'affecte pas l'activité de la PLD.

On a récemment identifié trois PLDs spécifiques des phospho-inositides (PI-PLDs). Au contraire des PC-PLDs, ces PI-PLDs sont sensibles au Ca^{2+} et la majorité de leur contingent cellulaire est en outre localisé au niveau du cytosol. Il est vraisemblable qu'elles participent à la régulation des taux des phospho-inositides *in vivo*. La PI-PLDa et PI-PLDb ont une nette préférence pour le PtdIns3,4,5 P3 >> PtdIns3 P ou PtdIns4 P > PtdIns4,5 P2 > PtdIns3,4 P2. En revanche, la PI-PLDc hydrolyse préférentiellement PtdIns3 P > PtdIns3,4,5 P3 > PtdIns4 P > PtdIns3,4 P2 > PtdIns4,5 P2. Les PI-PLDa et PI-PLDb hydrolysent le PtdIns3,4,5 P3, produit essentiel de la PI3K, en PA et un nouveau messager: l'inositol 3,4,5 P3 (Ching *et al.*, 1999). Les inhibiteurs pharmacologiques de la PI3K inhibent d'ailleurs l'activité de ces deux PI-PLDs.

L'implication de la PLD dans la signalisation en aval de v-Src n'est pas encore bien comprise. La transformation des fibroblastes BALB/c 3T3 par v-Src induit une augmentation du taux de DAG indépendamment de la PLC, par activation séquentielle de la PLD et de la PA-phosphohydrolase ou PAP (Song *et al.*, 1991). La signalisation de v-Src vers la PLD impliquerait les petites GTPases Ras et Ral (Jiang *et al.*, 1995). Dans une expérience préliminaire d'incorporation métabolique de ^{32}P suivie de l'extraction et de séparation des lipides par TLC, nous avons observé une forte augmentation du taux de PA dans les fibroblastes Rat-1 transformés par v-Src.

Les divers arguments développés ci-dessus font de la PLD un régulateur potentiel de la macropinocytose (voir Figure 4.1). Nous proposons de tester l'hypothèse de l'implication

des deux familles de PLD (PC-PLDs et PI-PLDs) dans une cascade de signalisation hypothétique de la macropinocytose constitutive induite par v-Src et K-Ras: v-Src/K-Ras→PI3K→PLC→PLD→...actine. Cette séquence est différente de la signalisation de la phagocytose, car elle dépend d'un relais [par](#) la PLC mais n'impliquerait pas la PKC (Veithen, 1997). Pour tester si la macropinocytose dépend du PA produit soit par les PC-PLDs, soit par les PI-PLDs, on traitera les fibroblastes transformés par v-Src et K-Ras avec des concentrations croissantes d'éthanol ou de butanol pour inhiber la production du PA en détournant sa production par transphosphatidylolation, et on en suivra l'effet sur l'accumulation de peroxydase en biochimie, et sur le "ruffling" membranaire et la macropinocytose en morphologie. Une inhibition de ces phénomènes suggérerait l'implication de la PLD. Dans ce cas, on serait amené à mesurer la production du PA en présence et en absence d'alcools [primaires](#) en relation avec l'intensité de la macropinocytose. En outre, on pourra apprécier le rôle respectif de la PC-PLD et de la PI-PLD grâce à deux inhibiteurs spécifiques récemment découverts de la PC-PLD (CT-115308 et CT-110378). Ces derniers abrogent la capacité de K-Ras ou de HRas à transformer les fibroblastes (Finney *et al.*, 2000). On pourrait par ailleurs tester l'activation des PI-PLDs en relation avec la macropinocytose par la quantification en HPLC de l'inositol (3,4,5)P3 dans les fibroblastes contrôles ou transformés, ainsi que chez les "dominants-positifs" et "-négatifs" de la PI3K.

Dans le cas où la transphosphatidylolation n'affecterait pas l'endocytose fluide, on tentera d'inhiber les autres enzymes qui peuvent produire le PA, telles que la DAG-kinase et la LPA acyltransférase par les inhibiteurs pharmacologiques correspondants. Ces diverses approches répondront à la question de l'implication du PA dans la macropinocytose. Enfin, l'effet d'inhibiteurs de la tyrosine-kinase, de la PI3K et de la PLC sur l'activité des PLDs mesurée *in situ* grâce au niveau de production du PA dans les cellules transformées par Src et par Ras, ainsi que dans les "dominants-négatifs" et "-positifs" de la PI3K permettrait de hiérarchiser la PLD dans la cascade de signalisation de la macropinocytose constitutive.

4.6. Implication des petites protéines G (Rho, Rac et Cdc42).

Notre travail a clairement mis en évidence, dans les fibroblastes transformés par v-Src et K-Ras, une relation inverse entre la présence de câbles de tension et le "ruffling" membranaire générateur des macropinosomes. L'organisation du cytosquelette d'actine est intégrée par les Rho-GTPases: Rho favorise les câbles de tension tandis que Rac oriente vers le "ruffling" membranaire. Ces observations suggèrent donc l'inhibition de Rho et l'activation de Rac en aval des deux oncogènes (voir Figure 4.1).

Ces Rho-GTPases sont sous le contrôle de la PI3K, elle-même activée par v-Src et par K-Ras. En effet, les inhibiteurs pharmacologiques de la PI3K bloquent le "ruffling" membranaire induit de manière transitoire par les facteurs de croissance (Swanson, 1989 ; Racoosin et Swanson, 1992). Toutefois, ces inhibiteurs restent sans effet sur le "ruffling" constitutif induit par un "dominant-positif" de Rac (Kotani *et al.*, 1994). Ces deux observations placent donc Rac en aval et sous le contrôle de la PI3K dans la voie de signalisation du "ruffling" membranaire (Kotani *et al.*, 1994).

La petite GTPase Rac est activée par les facteurs d'échange GEFs. L'activation de Rac à la membrane plasmique peut être assurée par la PI3K, à la fois de manière directe par les phospho-inositides D3, qui recrutent à la membrane une GEF (Vav) via son domaine PH et, de manière indirecte, par stimulation de l'activité tyrosine kinase de la protéine Lck via son interaction avec le domaine riche en proline de la p85. La tyrosine phosphorylation de Vav par Lck augmente son activité et par conséquent l'activation de Rac (Han *et al.*, 1997).

Chez les fibroblastes Rat-1 contrôles, le marquage de l'actine avec la phalloïdine-rhodamine montre des câbles de tension qui traversent les cellules de part en part. Ces câbles disparaissent chez les fibroblastes transformés par v-Src et K-Ras et le "dominant-positif" de la PI3K (Wp85) et réapparaissent dans son "dominant-négatif" (v-Src/ Δ p85) ou sous l'effet d'inhibiteurs de la PI3K et de la PI-PLC. La corrélation parfaite entre la macropinocytose et la disparition des câbles de tension suggère fortement que la formation de macropinosomes nécessite l'inactivation de la protéine Rho. En effet, la disparition des câbles de tension permet le relâchement de la membrane plasmique, qui semble nécessaire à la production des macropinosomes (Raucher et Sheetz, 2000), et pourrait augmenter le contingent d'actine G et de régulateurs disponibles pour l'élaboration du cytocortex, qui anime cette membrane. Il est

donc intéressant de tester si l'inactivation de Rho est nécessaire, voire suffisante à produire la macropinocytose constitutive.

Pour moduler l'activité de Rho, Rac et Cdc42, une première approche est la transfection transitoire visant à surexprimer les formes constitutivement actives ou inactives de chacune des Rho-GTPases (les vecteurs respectifs ont été fournis par le docteur A. Hall). En parallèle, on testera l'effet de diverses toxines activatrices ou inhibitrices de Rho, Rac ou Cdc42 (pour une revue, voir Lerm *et al.*, 2000). Dans le même but, on pourrait utiliser certaines bactéries comme "seringue biologique" pour injecter dans les fibroblastes contrôles, transformés ou transfectés, certaines toxines telle que la toxine de *Yersinia* Yop E (GAP-like des Rho-GTPases) et Spt P de *Salmonella* (GAP-like de Rac et Cdc42). De telles expériences sont programmées en collaboration avec l'unité MIPA. Dans ces différentes conditions, on combinera la mesure de l'accumulation du traceur de l'endocytose fluide (HRP), avec l'analyse en microscopie confocale du cytosquelette d'actine, du "ruffling" et de la production des macropinosomes. Le niveau d'activation des diverses petites GTPases peut être suivi par "pull-down assay". Par exemple, l'activation de Rac peut être évaluée par la mesure de sa liaison sous forme GTP à la PAK-GST (West *et al.*, 2000). Puisque le "ruffling" et la macropinocytose sont des phénomènes locaux, on recherchera aussi par immunofluorescence la colocalisation éventuelle entre les phospho-inositides D3 (marqués par des anticorps ; Rickert *et al.*, 2000) et les diverses Rho-GTPases, voire leurs activateurs.

4.7. Les régulateurs directs du cytosquelette d'actine corticale.

De nombreuses protéines régulent directement ou indirectement l'actine corticale. Dans la signalisation en aval des Rho-GTPases, nous nous intéresserons particulièrement à la *cortactine* dont plusieurs propriétés intéressantes font un candidat potentiel dans la régulation de la macropinocytose. Il s'agit d'une protéine multimodulaire d'environ 80 kDa: elle comprend à son extrémité N-terminale plusieurs copies en tandem d'un motif de 37 acides aminés permettant sa liaison à l'actine, un domaine riche en proline et une extrémité C-terminale qui contient un domaine SH3. On y trouve aussi plusieurs sites de phosphorylation en tyrosine et en sérine/thréonine. La cortactine est capable d'assembler ("bundling") les microfilaments d'actine, ce qui peut engendrer les câbles de tension. La phosphorylation de la cortactine par c-Src *in vitro* inhibe cette activité de manière proportionnelle au taux de phosphorylation (Huang *et al.*, 1997). En revanche, la cortactine est activée par Csk, une

kinase qui inhibe Src en le phosphorylant. Dans les souris "knock-out" Csk^{-/-}, la phosphorylation de la cortactine par Src est corrélée avec la disparition des câbles de tension, alors que, chez le double mutant Csk^{-/-} et Src^{-/-}, la cortactine est dispersée dans la cellule et les câbles de tension se forment normalement. Par ailleurs, après sa phosphorylation par c-Src ou encore en réponse à la stimulation par le FGF, les intégrines, la thrombine ou le calcium, la cortactine se redistribue vers les microfilaments d'actine corticaux, particulièrement dans les zones de "ruffling" (pour une revue, Thomas et Brugge, 1997). De manière particulièrement intéressante, l'invasion des cellules épithéliales par *Shigella flexneri* stimule la phosphorylation en tyrosine de la cortactine par c-Src et s'accompagne du recrutement de la cortactine dans les zones de "ruffling" et au niveau des phagosomes spacieux contenant cette bactérie (Dehio *et al.*, 1995).

On peut donc proposer que la cortactine fonctionne au niveau du cytocortex comme un adaptateur, capable d'interagir par son site de tyrosine phosphorylation avec le domaine SH2 de Src ou de la sous-unité régulatrice de la PI3K. Il sera donc intéressant de rechercher par immunofluorescence la translocation de la cortactine à la membrane plasmique, en réponse soit à v-Src, soit à K-Ras, lequel n'a pas d'activité tyrosine-kinase propre. Nous vérifierons ensuite par les inhibiteurs pharmacologiques appropriés si cette translocation dépend de l'activité tyrosine-kinase, de la PI3K et/ou de la PI-PLC. On pourrait aussi suivre cette translocation, voire le recrutement de la cortactine sur les macropinosomes en formation, par transfection avec la cortactine-GFP (Weed *et al.*, 1998 ; Kaksonen *et al.*, 2000).

4.8. Relation entre la macropinocytose, l'adhésion et la motilité cellulaires.

Le relâchement de la membrane plasmique peut être obtenu non seulement par la disparition des câbles de tension mais aussi par la diminution de l'adhérence cellulaire aux points de contact focaux, où s'ancrent ces câbles de tension. Les points de contact focaux sont composés d'intégrines et des connecteurs à l'actine (par ex. la taline, la vinculine, la tensine et l' α -actinine) et des diverses protéines adaptatrices (par ex. la paxilline, Grb2, Shc) qui permettent le recrutement de protéines tyrosine-kinases impliquées dans la signalisation cellulaire (par ex. FAK, Src, Csk etc...).

La phosphorylation de FAK par v-Src diminue son niveau de tyrosine-phosphorylation en position 397 en réponse au rassemblement des intégrines par la matrice

extracellulaire. Ceci a pu être démontré grâce à un anticorps qui reconnaît spécifiquement la tyrosine phosphorylée en cette position. Toutefois, la mutagenèse dirigée Tyr397/Phe ne bloque pas la transformation par v-Src. Ceci suggère que la FAK joue un rôle de balance entre l'assemblage et le désassemblage des complexes focaux (McLean *et al.*, 2000). Une mutation qui inactive v-Src (tsLA29-KD²⁹⁵) réduit la motilité des fibroblastes et leur étalement sur le plastique. Tout ceci montre que le couple Src/FAK joue un rôle central dans la connection des filaments d'actine à la matrice extracellulaire.

Le marquage en fluorescence de l'actine, des macropinosomes, ainsi que de la vinculine, de la paxilline et de la FAK, sous forme phosphorylée ou non, permettrait de voir s'il existe une corrélation entre la réorganisation du cytosquelette d'actine, les sites d'adhérence cellulaire et ceux où se forment les macropinosomes dans les cellules transformées par v-Src et K-Ras. Pour rechercher si l'adhérence module en effet la macropinocytose constitutive, on traitera les fibroblastes transformés par K-Ras et le "dominant-positif" de la PI3K avec des d'inhibiteurs des tyrosine-kinases. Enfin, l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques de la PI3K, et des "dominants-négatifs" et "-positifs" de la PI3K pourrait clarifier si les produits de cette enzyme sont impliqués dans la délocalisation de certaines protéines du complexe d'adhérence cellulaire et vérifier si cette délocalisation module la macropinocytose.

Toutes les conditions testées à ce jour au laboratoire qui induisent la macropinocytose constitutive s'accompagnent aussi d'une motilité cellulaire accélérée (Anna Platek, communication personnelle). La motilité cellulaire est étudiée soit sur une population confluente par la vitesse du comblement des plages dénudées, soit, à l'échelle individuelle, par le traçage cellulaire en chambre de "Dunn". Les complexes d'adhérence jouent un rôle important dans la motilité cellulaire. En effet, la migration implique à la fois l'ancrage au substrat par des complexes d'adhérence à l'avant de la cellule, pour stabiliser la projection du corps cellulaire, et la dissociation de ces complexes à l'arrière de la cellule, pour en autoriser le déplacement. Il sera donc intéressant de comparer par microcinématographie la relation topologique entre les zones actives dans le déplacement cellulaire, le "ruffling" et la formation des macropinosomes.

CHAPITRE 5. RÉFÉRENCES.

- Aderem, A. and Underhill, D.M.** 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **17**:593-623.
- Aguirre-Ghiso, J.A., Frankel, P., Farias, E.F., Lu, Z., Jiang, H., Olsen, A., Feig, L.A., de Kier-Joffe, E.B. and Foster, D.A.** 1999. RalA requirement for vSrc- and vRas-induced tumorigenicity and overproduction of urokinase-type plasminogen activator: involvement of metalloproteases. *Oncogene* **18**:4718-4725.
- Allen, L.-A. and Aderem, A.** 1996. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med.* **184**:627-637.
- Allison, A. C., Davies, P. and De Petris, S.** 1971. Role of contractile microfilaments in macrophage movement and endocytosis. *Nat. New Biol.* **232**(31):153-155.
- Alpuche-Aranda, C.M., Racoosin, E.L., Swanson, J.A. and Miller, S.I.** 1994. *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J. Exp. Med.* **179**:601-608.
- Amyere, M., Payrastre, B., Krause, U., Van Der Smissen, P., Veithen, A. and Courtoy P.J.** 2000. Constitutive macropinocytosis in oncogene-transformed fibroblasts depends on sequential permanent activation of phosphoinositide 3-kinase and phospholipase C. *Mol. Biol. Cell* **11**:3453-3467.
- Araki, N., Johnson, M.T. and Swanson, J.A.** 1996. A role for phospho-inositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J. Cell Biol.* **135**:1249-1260.
- Araki N, Hatae T, Yamada T, Hirohashi S** 2000. Actinin-4 is preferentially involved in circular ruffling and macropinocytosis in mouse macrophages: analysis by fluorescence ratio imaging. *J. Cell Sci.* **113**:3329-3340.
- Aspenström, P.** 1999. The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* **246**:20-25.
- Azuma, T., Witke, W., Stossel, T.P., Hartwig, J.H. and Kwiatkowski, D.** 1998. Gelsolin is a downstream effector of rac for fibroblast motility.. *EMBO J.* **17**:1362-1370.
- Bae, Y.S., Cantley, L.G., Chen, C.-S., Kim, S.-R., Kwon, K.-S. and Rhee, S.G.** 1998. Activation of phospholipase C- γ by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **273**:4465-4469.
- Bamburg, J.R.** 1999. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**:185-230.

- Barker, S.A., Caldwell, K.K., Pfeiffer, J.R. and Wilson, B.S.** 1998. Wortmannin-sensitive phosphorylation, translocation, and activation of PLC γ 1, but not PLC γ 2, in antigen-stimulated RBL-2H3 mast cells. *Mol. Biol. Cell* **9**:483-496.
- Bar-Sagi, D. and Feramisco, J.R.** 1986. Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins. *Science* **233**:1061-1068.
- Bar-Sagi, D., Rotin, D., Batzer, A., Mandiyan, V. and Schlessinger, J.** 1993. SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules. *Cell* **74**:83-91.
- Belisle, B. and Abo, A.** 2000. N-formyl peptide receptor ligation induces rac-dependent actin reorganization through G β gamma subunits and class Ia phosphoinositide 3kinases. *J. Biol. Chem.* **275**:26225-26232.
- Bhargavi, V., Chari, V.B. and Singh, S.S.** 1998. Phosphatidylinositol 3kinase binds to profilin through the p85 alpha subunit and regulates cytoskeletal assembly. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **46**:241-248.
- Bierne, H., Dramsi, S., Gratacap, M. P., Randriamampita, C., Carpenter, G., Payrastre, B. and Cossart P.** 2000. The invasion protein InIB from *Listeria monocytogenes* activates PLC-gamma1 downstream from PI 3-kinase. *Cell Microbiol.* **2**:465-476.
- Bishop, A.L. and Hall, A.** 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* **348**:241-255.
- Bos, J.L.** 1988. The *ras* gene family and human carcinogenesis. *Mutat. Res.* **195**:255-271.
- Boschek, C.B., Jockusch, B.M., Friis, R.R., Back, R., Grundmann, E. and Bauer, H.** 1981. Early changes in the distribution and organization of microfilament proteins during cell transformation. *Cell* **24**:175-184.
- Botelho, R. J., Teruel, M., Dierckman, R., Anderson, R., Wells, A. York, J. D., Meyer, T. and Grinstein, S** 2000. Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *J. Cell Biol.* **151**: 1353-1368.
- Bottomley, M.J., Salim, K. and Panayotou, G.** 1998. Phospholipid-binding protein domains. *Biochim. Biophys. Acta.* **1436**:165-183.
- Bradbury, N.A., Bridges, R.J.** 1992. Endocytosis is regulated by protein kinase A, but not protein kinase C in a secretory epithelial cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**:1173-1180.
- Bretscher, M.S.** 1992. Cells can use their transferrin receptors for locomotion. *EMBO J.* **11**:383-389.
- Brown, M. S. and Goldstein, J. L.** 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**:34-47.
- Buczynski, G., Bush, J., Zhang, L., Rodriguez-Paris, J. and Cardelli, J.** 1997. Evidence for a recycling role for Rab7 in regulating a late step in endocytosis and in retention of lysosomal enzymes in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell* **8**:1343-1360.
- Burridge, K.** 1999. Crosstalk between Rac and Rho. *Science* **283**:2028-2029.

- Burtneck, L.D., Koepf, E.K., Grimes, J., Jones, E.Y., Stuart, D.I., McLaughlin, P.J. and Robinson, R.C.** 1997. The crystal structure of plasma gelsolin: implications for actin severing, capping, and nucleation. *Cell* **90**:661-670.
- Bush, J., Temesvari, L., Rodriguez-Paris, J., Buczynski, G. and Cardelli, J.** 1996. A role for a Rab4-like GTPase in endocytosis and in regulation of contractile vacuole structure and function in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell* **7**:1623-1638.
- Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R. and Soltoff, S.** 1991. Oncogenes and signal transduction. *Cell* **64**:281-302.
- Carballo, E., Pitterle, D. M., Stumpo, D. J., Sperling, R. T. and Blackshear, P. J** 1999. Phagocytic and macropinocytic activity in MARCKS-deficient macrophages and fibroblasts. *Am. J. Physiol.* **277**:C163-173.
- Carlier, M.F., Ressad, F. and Pantaloni, D.** 1999. Control of actin dynamics in cell motility. Role of ADF/cofilin. *Biol. Chem.* **274**:33827-33830.
- Caron, E. and Hall, A.** 1998. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* **282**:1717-1721.
- Caron, E., Self, A. J. and Hall, A.** 2000. The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin α M β 2 by LPS and other inflammatory mediators. *Curr. Biol.* **10**:974-978.
- Carpenter, G. and Ji, Q.S.** 1999. Phospholipase C- γ as a signal-transducing element. *Exp. Cell Res.* **253**:15-24.
- Carpentier, J.L., Lew, D.P., Paccaud, J.P., Gil, R., Iacopetta, B., Kazatchkine, M., Stendahl, O. and Pozzan, T.** 1991. Internalization pathway of C3b receptors in human neutrophils and its transmodulation by chemoattractant receptors stimulation. *Cell Regul.* **2**:41-55.
- Castellano, F., Montcourrier, P., Chavrier, P.** 2000. Membrane recruitment of Rac1 triggers phagocytosis. *J. Cell Sci.* **113**:2955-2961.
- Cheatham, B., Vlahos, C.J., Cheatham, L., Wang, L., Blenis, J. and Kahn, C.R.** 1994. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol. Cell. Biol.* **14**:4902-4911.
- Chellaiah, M., Fitzgerald, C., Alvarez, U. and Hruska, K.** 1998. c-Src is required for stimulation of gelsolin-associated phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* **273**:11908-119016.
- Ching, T. T., Wang, D. S., Hsu, A. L., Lu, P. J. and Chen, C. S.** 1999. Identification of multiple phosphoinositide-specific phospholipases D as new regulatory enzymes for phosphatidylinositol 3,4, 5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **274**:8611-8617.
- Chubb, J. R., Wilkins, A., Thomas, G. M. and Insall, R. H.** 2000. The *Dictyostelium* RasS protein is required for macropinocytosis, phagocytosis and the control of cell movement. *J. Cell Sci.* **113**:709-719.

- Clarke M, Kayman SC.** 1987. The axenic mutations and endocytosis in Dictyostelium. *Methods Cell Biol.* **28**:157-176.
- Cohn, Z.A. and Steinman, R.M.** 1982. Phagocytosis and fluid-phase pinocytosis. Dans: *Membrane Recycling*. Ciba Fdn Symp. 92, Pitman Books Ltd, London, pp.15-34.
- Coue, M., Brenner, S.L., Spector, I. and Korn, E.D.** 1987. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett.* **213**:316-318.
- Courtoy, P. J., Quintart, J. and Baudhuin, P.** 1984. Shift of equilibrium density induced by 3,3'-diaminobenzidine cytochemistry: a new procedure for the analysis and purification of peroxidase-containing organelles. *J. Cell Biol.* **98**:870-876.
- Cox, D., Wessels, D., Soll, D. R., Hartwig, J. and Condeelis, J.** 1996. Re-expression of ABP-120 rescues cytoskeletal, motility, and phagocytosis defects of ABP-120- Dictyostelium mutants. *Mol. Biol. Cell* **7**:803-823.
- Cox, D., Tseng, C.C., Bjekic, G. and Greenberg, S.** 1999. A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J. Biol. Chem.* **274**:1240-1247.
- Cox, D., Dale, B. M., Kashiwada, M., Helgason, C. D. and Greenberg S.** 2001. A regulatory role for Src homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP) in phagocytosis mediated by Fc gamma receptors and complement receptor 3 (alpha(M)beta(2); CD11b/CD18). *J. Exp. Med.* **193**:61-71.
- Crowley, M.T., Costello, P.S., Fitzer-Attas, C.J., Turner, M., Meng, F., Lowell, C., Tybulewicz, V.L. and DeFranco, A.L.** 1997. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcγ receptors on macrophages. *J. Exp. Med.* **186**:1027-1039.
- Cupers, P., Veithen, A., Kiss, A., Baudhuin, P. and Courtoy, P.J.** 1994. Clathrin polymerization is not required for bulk-phase endocytosis in rat fetal fibroblasts. *J. Cell Biol.* **127**:725-735.
- Dai, J., Ting-Beall, H. P., Hochmuth, R. M., Sheetz, M. P. and Titus, M. A.** 1999. Myosin I contributes to the generation of resting cortical tension. *Biophys. J.* **77**:1168-1176.
- Damke, H., Baba, T., van der Blik, A.M. and Schmid, S.L.** 1995. Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *J. Cell Biol.* **131**, 69-80.
- Daukas, G. and Zigmond, S. H.** 1985. Inhibition of receptor-mediated but not fluid-phase endocytosis in polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol.* **101**:1673-1679.
- de Arruda, M.V., Bazari, H., Wallek, M. and Matsudaira, P.** 1992. An actin footprint on villin. Single site substitutions in a cluster of basic residues inhibit the actin severing but not capping activity of villin. *J. Biol. Chem.* **267**:13079-13085.
- de Duve, C.** 1992. Endocytosis in the emergence of eucaryotic life. Dans: *Endocytosis* (P.J. Courtoy, éd.), NATO ASI Series, vol.H62, pp.449-457, Springer-Verlag, Berlin.
- de Hostos EL.** 1999. The coronin family of actin-associated proteins. *Trends Cell Biol.* **9**:345-350.

- Della Bianca, V., Grzeskowiak, M. and Rossi, F.** 1990. Studies on molecular regulation of phagocytosis and activation of the NADPH oxidase in neutrophils. IgG- and C3b-mediated ingestion and associated respiratory burst independent of phospholipid turnover and Ca²⁺ transients. *J. Immunol.* **144**:1411-1417.
- Della Bianca, V., Grzeskowiak, M., Dusi, S. and Rossi, F.** 1993. Transmembrane signaling pathways involved in phagocytosis and associated activation of NADPH oxidase mediated by Fc gamma Rs in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **53**:427-438.
- Dehio, C., Prevost, M. C. and Sansonetti, P.J.** 1995. Invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri* induces tyrosine phosphorylation of cortactin by a pp60c-src-mediated signalling pathway. *EMBO J.* **14**:2471-2482.
- Denhardt, D.T.** 1996. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem. J.* **318**:729-747.
- Dharmawardhane, S., Schurmann, A., Sells, M.A., Chernoff, J., Schmid, S.L. and Bokoch, G.M.** 2000. Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1. *Mol. Biol. Cell* **11**:3341-3352.
- Djafarzadeh, S. and Niggli, V.** 1997. Signaling pathways involved in dephosphorylation and localization of the actin-binding protein cofilin in stimulated human neutrophils. *Exp. Cell Res.* **236**:427-435.
- Domin, J. and Waterfield, M.D.** 1997. Using structure to define the function of phospho-inositide 3-kinase family members. *FEBS Lett.* **410**:91-95.
- Domin, J., Gaidarov, I., Smith, M.E., Keen, J.H. and Waterfield, M.D.** 2000. The class II phosphoinositide 3-kinase PI3K-C2alpha is concentrated in the trans-Golgi network and present in clathrin-coated vesicles. *J. Biol. Chem.* **275**:11943-11950.
- Dong, J.-M., Leung, T., Manser, E. and Lim, L.** 1998. cAMP-induced Morphological Changes Are Counteracted by the Activated RhoA Small GTPase and the Rho Kinase ROK. *J. Biol. Chem.* **273**:22554-22562.
- Downward, J.** 1998. Lipid-regulated kinases: some common themes at last. *Science* **279**:673-674.
- Draye, J.-P., Courtoy, P. J., Quintart, J. and Baudhuin, P.** 1988. A quantitative model of traffic between plasma membrane and secondary lysosomes: evaluation of inflow, lateral diffusion, and degradation. *J. Cell Biol.* **107**:2109-2115.
- Dumontier, M., Hocht, P., Mintert, U. and Faix, J.** 2000. Rac1 GTPases control filopodia formation, cell motility, endocytosis, cytokinesis and development in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* **113**:2253-22565.
- Eker, P., Holm, P.K., van Deurs, B. and Sandvig, K.** 1994. Selective regulation of apical endocytosis in polarized Madin-Darby canine kidney cells by mastoparan and cAMP. *J. Biol. Chem.* **269**:18607-18615.
- English, D.** 1996. Phosphatidic acid: a lipid messenger involved in intracellular and extracellular signalling. *Cell Signal.* **8**:341-347.

- Exton, J.H.** 1997. New developments in phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **272**:15579-15582.
- Exton, J. H.** 1998. Phospholipase D. *Biochim. Biophys. Acta.* **1436**:105-115.
- Falasca, M., Logan, S.K., Lehto, V.P., Baccante, G., Lemmon, M.A. and Schlessinger, J.** 1998. Activation of phospholipase C γ by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J.* **17**:414-422.
- Fallman, M., Gullberg, M., Hellberg, C. and Andersson, T.** 1992. Complement receptor-mediated phagocytosis is associated with accumulation of phosphatidylcholine-derived diglyceride in human neutrophils. Involvement of phospholipase D and direct evidence for a positive feedback signal of protein kinase. *J. Biol. Chem.* **267**:2656-26563.
- Fincham, V.J., Wyke, J.A. and Frame, M.C.** 1995. v-Src-induced degradation of focal adhesion kinase during morphological transformation of chicken embryo fibroblasts. *Oncogene* **10**:2247-2252.
- Fincham, V.J. Unlu M. Brunton V.G. Wyke J.A. and Frame M.C.** 1996. Translocation of Src kinase to the cell periphery is mediated by the actin cytoskeleton under the control of the Rho family of small G proteins. *J.Cell Biol.* **135**:1551-1564.
- Fincham, V.J., Chudleigh, A. and Frame, M.C.** 1999. Regulation of p190 Rho-GAP by v-Src is linked to cytoskeletal disruption during transformation. *J. Cell Sci.* **112**:947-956.
- Fincham, V.J., Brunton, V.G. and Frame, M.C.** 2000. The SH3 domain directs acto-myosin-dependent targeting of v-Src to focal adhesions via phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol. Cell. Biol.* **17**:6518-6536.
- Finney, R. E., Bonham, L., Wang, N., Leung, D., de Vries, P. and White, T.** 2000. Phosphatidylcholine specific phospholipase-D (PC-PLD) expression is associated with human cancers and is required for proliferation of tumor cell lines. *Clin. Cancer Res.* **6**, Suppl., abstract 167.
- Fitzer-Attas, C. J., Lowry, M., Crowley, M. T., Finn, A. J., Meng, F., DeFranco, A. L. and Lowell, C. A.** 2000. Fc γ receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J. Exp. Med.* **191**:669-682.
- Franke, T.F., Kaplan, D.R. and Cantley, L.C.** 1997. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* **88**:435-437.
- Frokjaer-Jensen, J.** 1980. Three-dimensional organization of plasmalemmal vesicles in endothelial cells. An analysis by serial sectioning of frog mesenteric capillaries. *J. Ultrastruct. Res.* **73**:9-20.
- Fruman, D.A., Meyers, R.E. and Cantley, L.C.** 1998. Phospho-inositide kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:481-507.
- Fruman, D.A., Rameh, L.E. and Cantley, L.C.** 1999. Phospho-inositide binding domains: embracing 3-phosphate. *Cell* **97**:817-820.
- Fukami, K., Endo, T., Imamura, M. and Takenawa, T.** 1994. Alpha-actinin and vinculin are PIP2-binding proteins involved in signaling by tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **269**:1518-1522.

- Galisteo, M.L., Chernoff, J., Su, Y.C., Skolnik, E.Y. and Schlessinger, J.** 1996. The adaptor protein Nck links receptor tyrosine kinases with the serine-threonine kinase Pak1. *Biol. Chem.* **271**:20997-21000.
- Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J. F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C. and Desjardins, M.** 2001. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J. Cell Biol.* **152**:165-180.
- Garrett, W.S., Chen, L.M., Kroschewski, R., Ebersold, M., Turley, S., Trombetta, S., Galan, J.E. and Mellman, I.** 2000. Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell* **102**:325-334.
- Gewirtz, A. T. and Simons, E. R.** 1997. Phospholipase D mediates Fc gamma receptor activation of neutrophils and provides specificity between high-valency immune complexes and fMLP signaling pathways. *J. Leukoc. Biol.* **61**:522-528.
- Gilbert, A., Paccaud, J.P., Foti, M., Porcheron, G., Balz, J. and Carpentier, J.L.** 1999. Direct demonstration of the endocytic function of caveolae by a cell-free assay. *J. Cell Sci.* **112**:1101-1110.
- Gomez, T. M., Robles, E., Poo, M. and Spitzer, N. C.** 2001. Filopodial calcium transients promote substrate-dependent growth cone turning. *Science* **291**:1983-1987.
- Greenberg, S.** 1995. Signal transduction of phagocytosis. *Trends Biochem. Sci.* **5**:93-97.
- Greenberg, S.** 1999. Modular components of phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* **66**:712-717.
- Greenwood, J.A., Theibert, A.B., Prestwich, G.D. and Murphy-Ullrich, J.E.** 2000. Restructuring of focal adhesion plaques by PI 3-kinase. Regulation by PtdIns (3,4,5)-p(3) binding to alpha-actinin. *J. Cell Biol.* **150**:627-642.
- Hacker, U., Albrecht, R. and Maniak, M.** 1997. Fluid-phase uptake by macropinocytosis in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* **110**:105-112.
- Haefner, B., Baxter, R., Fincham, V.J., Downes, C.P. and Frame, M.C.** 1995. Cooperation of Src homology domains in the regulated binding of phosphatidylinositol 3kinase. A role for the Src homology 2 domain. *Biol. Chem.* **270**:7937-7943.
- Hall, A.** 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514.
- Hammond, S.M., Jenco, J.M., Nakashima, S., Cadwallader, K., Gu, Q., Cook, S., Nozawa, Y., Prestwich, G.D., Frohman, M.A. and Morris, A.J.** 1997. Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C-alpha. *J. Biol. Chem.* **272**:3860-3868.
- Han, J., Das, B., Wei, W., Van Aelst, L., Mosteller, R. D., Khosravi-Far, R., Westwick, J. K., Der, C. J. and Broek, D.** 1997. Lck regulates Vav activation of members of the Rho family of GTPases. *Mol. Cell Biol.* **17**:1346-1353.

- Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R.D., Krishna, U.M., Falck, J.R., White, M.A. and Broek, D.** 1998. Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* **279**:558-560.
- Hansen, S.H., Sandvig, K. and van Deurs, B.** 1993. Molecules internalized by clathrin-independent endocytosis are delivered to endosomes containing transferrin receptors. *J. Cell Biol.* **123**:89-97.
- Hara, K., Yonezawa, K., Sakaue, H., Ando, A., Kotani, K., Kitamura, T., Kitamura, Y., Ueda, H., Stephens, L., Jackson, T.R., Hawkins, P.T., Dhand, R., Clark, A.E., Holman, G.D., Waterfield, M.D. and Kasuga, M.** 1994. 1-phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **91**:7415-7419.
- Hardt, W.D., Chen, L.M., Schuebel, K.E., Bustelo, X.R. and Galan, J.E.** 1998. *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* **93**:815-826.
- Haworth, R., Platt, N., Keshav, S., Hughes, D., Darley, E., Suzuki, H., Kurihara, Y., Kodama, T. and Gordon, S.** 1997. The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock. *J. Exp. Med.* **186**:1431-1439.
- Heuser, J.E. and Anderson, R.G.** 1989. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J. Cell Biol.* **108**:389-400.
- Hewlett, L.J., Prescott, A.R. and Watts, C.** 1994. The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *J. Cell Biol.* **124**:689-703.
- Hiemstra, P. S., Annema, A., Schippers, E. F. and van Furth, R.** 1992. Pertussis toxin partially inhibits phagocytosis of immunoglobulin G-opsonized *Staphylococcus aureus* by human granulocytes but does not affect intracellular killing. *Infect. Immun.* **60**:202-205.
- Holm, P.K., Hansen, S.H., Sandvig, K. and van Deurs, B.** 1993. Endocytosis of desmosomal plaques depends on intact actin filaments and leads to a nondegradative compartment. *Eur. J. Cell Biol.* **62**:362-371.
- Huang, C., Ni, Y., Wang, T., Gao, Y., Haudenschield, C. C. and Zhan, X.** 1997. Down-regulation of the filamentous actin cross-linking activity of cortactin by Src-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **272**:13911-13915.
- Hunter, S., Huang, M. M., Indik, Z. K. and Schreiber, A. D.** 1993. Fc gamma RIIA-mediated phagocytosis and receptor phosphorylation in cells deficient in the protein tyrosine kinase Src. *Exp. Hematol.* **21**:1492-1497.
- Jaken, S.** 1996. Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**:168-173.
- Jackowski, S. and Rock, C.O.** 1989. Stimulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phospholipase C activity by phosphatidic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **268**:516-524.
- Janmey, P. A., Lamb, J., Allen, P. G. and Matsudaira PT.** 1992. Phosphoinositide-binding peptides derived from the sequences of gelsolin and villin. *J. Biol. Chem.* **267**:11818-11823.

- Jiang, H., Lu, Z., Luo, J.Q., Wolfman, A. and Foster, D.A.** 1995. Ras mediates the activation of phospholipase D by v-Src. *J. Biol. Chem.* **270**:6006-6009.
- Jimenez, C., Jones, D.R., Rodriguez-Viciana, P., Gonzalez-Garcia, A., Leonardo, E., Wennstrom, S., von Kobbe, C., Toran, J.L., R.-Borlado, L., Calvo, V., Copin, S.G., Albar, J.P., Gaspar, M.L., Diez, E., Marcos, M.A., Downward, J., Martinez-A., C., Merida, I. and Carrera, A.C.** 1998. Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *EMBO J.* **17**:743-753.
- Joly, M., Kazlauskas, A. and Corvera, S.** 1995. Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required at a postendocytic step in platelet-derived growth factor receptor trafficking. *J. Biol. Chem.* **270**:13225-13230.
- Jones, R.J., Brunton, V. G. and Frame, M. C.** 2000. Adhesion-linked kinases in cancer; emphasis on Src, focal adhesion kinase and PI 3-kinase. *Eur. J. Cancer* **36**:1595-1606.
- Joneson, T., White, M.A., Wigler, M.H. and Bar-Sagi, D.** 1996. Stimulation of membrane ruffling and MAP kinase activation by distinct effectors of RAS. *Science* **271**:810-812.
- Jung, G., Wu, X. and Hammer JA.** 1996. Dictyostelium mutants lacking multiple classic myosin I isoforms reveal combinations of shared and distinct functions. *J. Cell Biol.* **133**:305-323.
- Kaksonen, M., Peng, H. B. and Rauvala H.** 2000. Association of cortactin with dynamic actin in lamellipodia and on endosomal vesicles. *J. Cell Sci.* **113**:4421-4426.
- Kapeller, R. and Cantley, L.C.** 1994. Phosphatidylinositol 3-kinase. *Bioessays* **16**:565-576.
- Kaplan, G.** 1977. Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages *Scand. J. Immunol.* **6**:797-807.
- Katan, M.** 1998. Families of phospho-inositide-specific phospholipase C: structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* **1436**:5-17.
- Ketelbant-Balasse, P. and Neve, P.** 1973. Ultrastructural study of the thyroid gland in a case of myxoedema. Comparison with ultimobranchial follicles of the rat's thyroid. *Ann. Endocrinol. (Paris)* **34**:762-765.
- Kjøller, L. and Hall, A.** 1999. Signaling to Rho GTPases. *Exp. Cell Res.* **253**:166-179.
- Kobayashi, K., Takahashi, K. and Nagasawa, S.** 1995. The role of tyrosine phosphorylation and Ca²⁺ accumulation in Fc gamma-receptor-mediated phagocytosis of human neutrophils. *J. Biochem. (Tokyo)* **117**:1156-1161.
- Konzok, A., Weber, I., Simmeth, E., Hacker, U., Maniak, M. and Muller-Taubenberger, A.** 1999. DAip1, a Dictyostelium homologue of the yeast actin-interacting protein 1, is involved in endocytosis, cytokinesis, and motility. *J. Cell Biol.* **146**:453-464.
- Kotani, K., Yonezawa, K., Hara, K., Ueda, H., Kitamura, Y., Sakaue, H., Ando, A., Chavanieu, A., Calas, B., Grigorescu, F., Nishiyama, M., Waterfield, M.D. and Kasuga, M.** 1994. Involvement of phospho-inositide 3-kinase in insulin- or IGF-1-induced membrane ruffling. *EMBO J.* **13**:2313-2321.

- Kozawa, O., Blume-Jensen, P., Heldin, C.H. and Ronnstrand, L.** 1997. Involvement of phosphatidylinositol 3'-kinase in stem-cell-factor-induced phospholipase D activation and arachidonic acid release. *Eur. J. Biochem.* **248**:149-155.
- Kusner, D. J., Hall, C. F. and Schlesinger, L. S.** 1996. Activation of phospholipase D is tightly coupled to the phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* or opsonized zymosan by human macrophages. *J. Exp. Med.* **184**:585-595.
- Kwiatkowski, D.J.** 1999. Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**:103-108.
- Kwon, H.J., Yoshida, M., Nagaoka, R., Obinata, T., Beppu, T. and Horinouchi, S.** 1997. Suppression of morphological transformation by radicicol is accompanied by enhanced gelsolin expression. *Oncogene* **15**:2625-2631.
- Lamaze, C. and Schmid, S.L.** 1995. The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**:573-580.
- Lamaze, C., Fujimoto, L. M., Yin, H. L. and Schmid, S. L.** 1997. The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **272**:20332-20335.
- Lappalainen, P. and Drubin, D.G.** 1997. Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. *Nature* **388**:78-82.
- Lauener, R., Shen, Y., Duronio, V. and Salari, H.** 1995. Selective inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase by phosphatidic acid and related lipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**:8-14.
- Lee, Y.H., Kim, H.S., Pai, J.K., Ryu, S.H. and Suh, P.G.** 1994. Activation of phospholipase D induced by platelet-derived growth factor is dependent upon the level of phospholipase C-gamma 1. *Biol. Chem.* **269**:26842-26847.
- Lennartz, M. R., Yuen, A. F., Masi, S. M., Russell, D. G., Buttle, K. F. and Smith, J. J.** 1997. Phospholipase A2 inhibition results in sequestration of plasma membrane into electronlucent vesicles during IgG-mediated phagocytosis. *J. Cell Sci.* **110**:2041-2052.
- Lennartz MR.** 1999. Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **31**:415-430.
- Lerm, M., Schmidt, G. and Aktories, K.** 2000. Bacterial protein targeting Rho GTPases. *FEMS Microbiol. Lett.* **188**:1-6.
- Leung, T., Chen, X.Q., Tan, I., Manser, E. and Lim, L.** 1998. Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol. Cell. Biol.* **18**:130-140.
- Li, G., D'Souza-Schorey, C., Barbieri, M.A., Cooper, J.A. and Stahl, P.D.** 1997. Uncoupling of membrane ruffling and pinocytosis during Ras signal transduction. *J. Biol. Chem.* **272**:10337-10340.
- Liu, X., Marengere, L.E., Koch, C.A. and Pawson, T.** 1993. The v-Src SH3 domain binds phosphatidylinositol 3'-kinase. *Mol. Cell. Biol.* **13**:5225-5232.

- Lopez, I., Mak, E.C., Ding, J.R., Hamm, H.E. and Lomasney, J.W.** 2001. A novel bifunctional phospholipase C that is regulated by G alpha(12) and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **276**:2758-2765.
- Lorenzi R, Brickell PM, Katz DR, Kinnon C, Thrasher AJ.** 2000. Wiskott-Aldrich syndrome protein is necessary for efficient IgG-mediated phagocytosis. *Blood* **95**:2943-2946.
- Maniak, M., Rauchenberger, R. Albercht, R., Murphy, J. and Gerisch, G.** 1995. Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualised by a green fluorescent protein Tag. *Cell* **83**: 915-924.
- Marsh, M. and McMahon, H. T.** 1999. The structural era of endocytosis. *Science* **285**:215-220.
- Martin, T.F.J.** 1998. Phospho-inositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**:231-264.
- Massol, P., Montcourrier, P., Guillemot, J-C., Chavrier, P.** 1998. Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. *EMBO J.* **17**:6219-6229.
- May, R. C., Caron, E., Hall. A. and Machesky, L. M.** 2000. Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcgammaR or CR3. *Nat. Cell Biol.* **2**:246-248.
- May, R. C and Machesky, L. M.** 2001. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **114**:1061-1077.
- McGlade, J., Brunkhorst, B., Anderson, D., Mbamalu, G., Settleman, J., Dedhar, S., Rozakis-Adcock, M., Chen, L.B. and Pawson, T.** 1993. The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion. *EMBO J.* **12**:3073-3081.
- McLean, G.W., Fincham, V.J. and Frame, M.C.** 2000. v-Src induces tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase independently of tyrosine 397 and formation of a complex with Src. *J. Biol. Chem.* **275**:23333-23339.
- Meijne, A.M.L., Ruuls-Van Stalle, L., Feltkamp, C.A., McCarthy, J.B., and Roos, E.** 1997. v-Src-induced cell shape changes in rat fibroblasts require new gene transcription and precede loss of focal adhesions. *Exp. Cell Res.* **234**:477-485.
- Mellman, I.** 1996. Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**:575-625.
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R-M. and Cossart, P.** 1996. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of L. monocytogenes into epithelial cells. *Cell* **84**:923-932.
- Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M. and Philips, M.R.** 2001. Differential localization of Rho GTPases in live cells: Regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J. Cell Biol.* **152**:111-126.
- Miyata, Y., Nishida, E., Koyasu, S., Yahara, I. and Sakai, H.** 1989. Regulation by intracellular Ca²⁺ and cyclic AMP of the growth factor-induced ruffling membrane formation and stimulation of fluid-phase endocytosis and exocytosis. *Exp. Cell Res.* **181**:454-462.

- Montesano, R., Roth, J., Robert, A. and Orci, L.** 1982. Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalisation of cholera and tetanus toxins. *Nature* **296**, 651-653.
- Murray, J., Wilson, L. and Kellie, S.** 2000. Phosphatidylinositol-3' kinase-dependent vesicle formation in macrophages in response to macrophage colony stimulating factor. *J. Cell Sci.* **113**:337-348.
- Nagaishi, K., Adachi, R., Matsui, S., Yamaguchi, T., Kasahara, T. and Suzuki K.** 1999. Herbimycin A inhibits both dephosphorylation and translocation of cofilin induced by opsonized zymosan in macrophagelike U937 cells. *J. Cell Physiol.* **180**:345-354.
- Nakanishi, H., Brewer, K. A. and Exton, J. H.** 1993. Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **268**:13-16.
- Nakashima, S., Banno, Y., Watanabe, T., Nakamura, Y., Mizutani, T., Sakai, H., Zhao, Y., Sugimoto, Y. and Nozawa, Y.** 1995. Deletion and site-directed mutagenesis of EF-hand domain of phospholipase C-delta 1: effects on its activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **211**:365-369.
- Niewohner, J., Weber, I., Maniak, M., Muller-Taubenberger, A. and Gerisch, G.** 1997. Talin-null cells of Dictyostelium are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis. *J. Cell Biol.* **138**:349-361.
- Nishizuka, Y.** 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**:305-312.
- Novak, K. D., Peterson, M. D., Reedy, M. C. and Titus, M. A.** 1995. Dictyostelium myosin I double mutants exhibit conditional defects in pinocytosis. *J. Cell Biol.* **131**:1205-1221.
- Ojcius, D.M., Bravo de Alba, Y., Kanellopoulos, J.M., Hawkins, R.A., Kelly, K.A., Rank, R.G. and Dautry-Varsat, A.** 1998. Internalization of Chlamydia by dendritic cells and stimulation of Chlamydia-specific T cells. *J. Immunol.* **160**:1297-1303.
- Olofsson, B.** 1999. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* **11**:545-554.
- Palmieri, S. J., Nebl, T., Pope, R. K., Seastone, D. J., Lee, E., Hinchcliffe, E. H., Sluder, G., Knecht, D., Cardelli, J. and Luna, E. J.** 2000. Mutant Rac1B expression in Dictyostelium: effects on morphology, growth, endocytosis, development, and the actin cytoskeleton. *Cell. Motil. Cytoskeleton* **46**:285-304.
- Park, S.K., Min, D.S. and Exton, J.H.** 1998. Definition of the protein kinase C interaction site of phospholipase D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**:364-367.
- Patki, V., Virbasius, J., Lane, W.S., Toh, B.H., Shpetner, H.S. and Corvera, S.** 1997. Identification of an early endosomal protein regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **94**:7326-7330.
- Pawson, T.** 1995. Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**:573-580.
- Payne, G.S. and Schekman, R.** 1985. A test of clathrin function in protein secretion and cell growth. *Science* **230**:1009-1014.

- Peracino, B., Borleis, J., Jin, T., Westphal, M., Schwartz, J. M., Wu, L., Bracco, E. Gerisch, G., Devreotes, P. and Bozzaro, S.** 1998. G protein beta subunit-null mutants are impaired in phagocytosis and chemotaxis due to inappropriate regulation of the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **141**:1529-1537.
- Peppelenbosch, M.P., DeSmedt, M., Pynaert, G., van Deventer, S.J. and Grooten, J.** 2000. Macrophages present pinocytosed exogenous antigen via MHC class I whereas antigen ingested by receptor-mediated endocytosis is presented via MHC classII. *J. Immunol.* **165**:1984-1991.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L., and Mullins, R.D.** 2001. Actin dynamics. *J. Cell Sci.* **114**:3-4.
- Poumay, Y., Roland, I.H., Leclercq-Smekens, M. and Leloup, R.** 1994. Basal detachment of the epidermis using dispase: tissue spatial organization and fate of integrin alpha 6 beta 4 and hemidesmosomes. *J. Invest. Dermatol.* **102**:111-117.
- Racoosin, E.L. and Swanson, J.A.** 1992. M-CSF-induced macropinocytosis increases solute endocytosis but not receptor-mediated endocytosis in mouse macrophages. *J. Cell Sci.* **102**:867-880.
- Radhakrishna, H., Klausner, R. D. and Donaldson, J. G.** 1996. Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF6 GTPase. *J. Cell Biol.* **134**:935-947.
- Rameh, L.E. and Cantley, L.C.** 1999. The role of phospho-inositide 3-kinase lipid products in cell function. *J. Biol. Chem.* **274**:8347-8350.
- Rameh, L.E., Chen, C.S. and Cantley, L.C.** 1995. Phosphatidylinositol (3,4,5)P3 interacts with SH2 domains and modulates PI 3-kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins. *Cell* **83**:821-830.
- Rameh, L.E., Tollas, K.F., Duckworth, B.C. and Cantley, L.C.** 1997. A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* **390**:192-196.
- Rameh, L.E., Rhee, S.G., Spokes, K., Kazlauskas, A., Cantley, L.C. and Cantley, L.G.** 1998. Phospho-inositide 3kinase regulates phospholipase Cγ-mediated calcium signaling. *J. Biol. Chem* **273**:23750-23757.
- Rameh, L. E., Cantley, L. C.** 1999. The role of phosphoinositide 3kinase lipid products in cell function. *J. Biol. Chem.* **274**:8347-8350.
- Rapoport, I., Miyazaki, M., Boll, W., Duckworth, B., Cantley, L.C., Shoelson, S. and Kirchhausen, T.** 1997. Regulatory interactions in the recognition of endocytic sorting signals by AP-2 complexes. *EMBO J.* **16**:2240-2250.
- Raucher, D. and Sheetz, M.P.** 2000. Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *J. Cell Biol.* **148**:127-136.
- Rickert, P., Weiner, O.D., Wang, F., Bourne, H.R. and Servant, G.** 2000. Leukocytes navigate by compass: roles of PI3Kgamma and its lipid products. *Trends Cell Biol.* **10**:466-473.
- Ridley, A.J.** 1994. Membrane ruffling and signal transduction. *Bioessays* **16**:321-327.

- Rivero, F., Furukawa, R., Fechheimer, M. and Noegel, A. A.** 1999. Three actin cross-linking proteins, the 34 kDa actin-bundling protein, alpha-actinin and gelation factor (ABP-120), have both unique and redundant roles in the growth and development of *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* **112**:2737-27351.
- Robinson, M.S., Watts, C. and Zerial, M.** 1996. Membrane dynamics in endocytosis. *Cell* **84**:13-21.
- Rodriguez-Viciana, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D. and Downward, J.** 1994. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* **370**:527-532.
- Roy, S., Luetterforst, R., Harding, A., Apolloni, A., Etheridge, M., Stang, E., Rolls, B., Hancock, J.F., and Parton, R.G.** 1999. Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat. Cell Biol.* **1**:98-105.
- Royal, I., Lamarche-Vane, N., Lamorte, L., Kaibuchi, K. and Park, M.** 2000. Activation of cdc42, rac, PAK, and rho-kinase in response to hepatocyte growth factor differentially regulates epithelial cell colony spreading and dissociation. *Mol. Biol. Cell* **11**:1709-1725.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. and Lanzavecchia, A.** 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**:389-400.
- Sanchez-Mejorada, G. and Rosales, C.** 1998. Fcgamma receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in monocytes is independent of Ras. *J. Biol. Chem.* **273**:27610-27619.
- Sandvig, K. and van Deurs, B.** 1991. Endocytosis without clathrin. A minireview. *Cell Biol. Int. Rep.* **15**:3-8.
- Schnitzer, J.E., Oh, P., Pinney, E. and Allard, J.** 1994. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J. Cell Biol.* **127**:1217-1232.
- Schwartzberg, P.L.** 1998. The many faces of Src: multiple functions of a prototypical tyrosine kinase. *Oncogene* **17**:1463-1468.
- Schwarz, E. C., Neuhaus, E. M., Kistler, C., Henkel, A. W. and Soldati, T.** 2000. *Dictyostelium* myosin IK is involved in the maintenance of cortical tension and affects motility and phagocytosis. *J. Cell Sci.* **113**:621-633.
- Scita, G., Tenca, P., Frittoli, E., Tocchetti, A., Innocenti, M., Giardina, G. and Di Fiore, P.P.** 2000. Signaling from ras to rac and beyond: not just a matter of GEFs. *EMBO J.* **19**:2393-2398.
- Seastone, D.J., Lee, E., Bush, J., Knecht, D. and Cardelli, J.** 1998. Overexpression of a novel Rho family GTPase, RacC, induces unusual actin-based structures and positively affects phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell* **9**:2891-2904.

- Seastone, D.J., Zhang, L., Buczynski, G., Rebstein, P., Weeks, G., Spiegelman, G., Cardelli, J.** 1999. The small Mr Ras-like GTPase Rap1 and the phospholipase C pathway act to regulate phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell* **10**:393-406.
- Serrander, L. Sharkman, P., Rasmussen, B., Witke, W., Lew, D. P., Krause, K. H., Stendahl, O. and Nüsse, O.** 2000. Selective inhibition of IgG-mediated phagocytosis in gelsolin-deficient murine neutrophils. *J. Immunol.* **165**: 2451-2457.
- Shibasaki, F., Fukami, K., Fukui, Y. and Takenawa, T.** 1994. Phosphatidylinositol 3-kinase binds to alpha-actinin through the p85 subunit. *Biochem. J.* **302**:551-557.
- Silverstein, S.C., Steinman, R.M. and Cohn, Z.A.** 1977. Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **46**:669-722.
- Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J.M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B.H., Murphy, C., Zerial, M. and Stenmark, H.** 1998. EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* **394**:494-498.
- Singer, W.D., Brown, H.A. and Sternweis, P.C.** 1997. Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annu. Rev. Biochem.* **66**:475-509.
- Skoudy, A., Nhieu, G.T., Mantis, N., Arpin, M., Mounier, J., Gounon, P. and Sansonetti, P.** 1999. A functional role for ezrin during *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J. Cell Sci.* **112**:2059-2068.
- Song, J.G., Pfeffer, L.M. and Foster, D.A.** 1991. v-Src increases diacylglycerol levels via a type D phospholipase-mediated hydrolysis of phosphatidylcholine. *Mol. Cell. Biol.* **11**:4903-4908.
- Spector, I., Braet, F., Shochet, N.R. and Bubb, M.R.** 1999. New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microsc Res Tech.* **47**:18-37.
- Stein, R.C. and Waterfield, M.D.** 2000. PI3-kinase inhibition: a target for drug development?. *Mol. Med. Today* **6**:347-357.
- Steinman, R.M. and Swanson, J.** 1995. The endocytic activity of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **182**:283-288.
- Steinman, R.M., Gutchinov, B., Witmer, M.D. and Nussenzweig, M.C.** 1983. Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *J. Exp. Med.* **157**:613-627.
- Stenmark, H. and Aasland, R.** 1999. FYVE-finger proteins effectors of an inositol lipid. *J. Cell Sci.* **112**:75-83.
- Stenmark, H., Aasland, R., Toh, B.H. and D'Arrigo, A.** 1996. Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *J. Biol. Chem.* **271**:24048-24054.
- Stephens, L.R., Eguinoa, A., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Cooke, F., Coadwell, J., Smrcka, A.S., Thelen, M., Cadwallader, K., Tempst, P. and Hawkins, P.T.** 1997. The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* **89**:105-114.

- Svitkina, T.M. and Boris, G.G.** 1999. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol.* **145**:1009-1026.
- Svitkina, T.M., Verkhovsky, A.B., McQuade, K.M. and Boris, G.G.** 1997. Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation. *J. Cell Biol.* **139**:397-415.
- Swanson, J.A. and Watts C.** 1995. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* **5**: 424-428.
- Swanson, J.A., Johnson, M.T., Beningo, K., Post, P., Mooseker, M. and Araki, N.** 1999. A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. *J. Cell Sci.* **112**:307-316.
- Takahashi, K., Sasaki, T., Mammoto, A., Takaishi, K., Kameyama, T., Tsukita, S. and Takai Y.** 1997. Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J. Biol. Chem.* **272**:23371-23375.
- Takebe, Y., Seiki, M., Fujisawa, J., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K., Yoshida, M. and Arai N.** 1988. SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol. Cell. Biol.* **8**:466-472.
- Tatosyan, A.G. and Mizenina, O.A.** 2000. Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochemistry (Mosc.)* **65**:49-58.
- Temesvari, L., Zhang, L., Fodera, B., Janssen, K. P., Schleicher, M. and Cardelli, J. A.** 2000. Inactivation of ImpA, encoding a LIMPII-related endosomal protein, suppresses the internalization and endosomal trafficking defects in profilin-null mutants. *Mol Biol Cell* **11**:2019-2031.
- Thomas, S.M. and Brugge, J.S.** 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **13**:513-609.
- Thomas, S.M., Soriano, P. and Imamoto, A.** 1995. Specific and redundant roles of Src and Fyn in organizing the cytoskeleton. *Nature* **376**:267-2671.
- Toker, A., Meyer, M., Reddy, K.K., Falck, J.R., Aneja, R., Aneja, S., Parra, A., Burns, D.J., Ballas, L.M. and Cantley, L.C.** 1994. Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3. *J. Biol. Chem.* **269**:32358-32367.
- Tolias, K.F., Rameh, L.E., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Chen, J., Prestwich, G.D., Cantley, L.C. and Carpenter, C.L.** 1998. Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5kinases synthesize the novel lipids phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate and phosphatidylinositol 5-phosphate. *J. Biol. Chem.* **273**:18040-18046.
- Trowbridge, I. S., Collawn, J. F. and Hopkins, C. R.** 1993. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**:129-161.
- Tyteca, D., Mettlen, M., Van Der Smissen, P., Van Bambeke, F., Tulkens, P. M., Mingeot-Leclerq, M-P. and Courtoy, P. J.** Azithromycin, a lysosomotropic antibiotic, impairs endocytosis but not phagocytosis in cultured macrophages. *J. Cell Sci.* (sous presse).

- Urbanik, E. and Ware, B.R.** 1989. Actin filament capping and cleaving activity of cytochalasins B, D, E, and H. *Arch. Biochem. Biophys.* **269**:181-187.
- Vanhaesebroeck, B., Leeyers, S.J., Panayotou, G. and Waterfield, M.D.** 1997. Phospho-inositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem. Sci.* **22**:267-272.
- Van Troys, M., Dewitte, D., Verschelde, J.L., Goethals, M., Vandekerckhove, J. and Ampe, C.** 1997. Analogous F-actin binding by cofilin and gelsolin segment 2 substantiates their structural relationship. *J. Biol. Chem.* **272**:32750-32758.
- Varnai, P. and Balla, T.** 1998. Visualization of phospho-inositides that bind pleckstrin homology domains: calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-[³H]inositol-labeled phospho-inositide pools. *J. Cell Biol.* **143**:501-510.
- Veithen, A.** 1997. v-Src induit la macropinocytose dans les fibroblastes de rat. Thèse de doctorat.
- Veithen, A., Cupers, P., Baudhuin, P. and Courtoy, P.J.** 1996. v-Src induces constitutive macropinocytosis in rat fibroblasts. *J. Cell Sci.* **109**:2005-2012.
- Veithen, A., Amyere, M., Van Der Smissen, P., Cupers, P. and Courtoy, P.J.** 1998. Regulation of macropinocytosis in v-Src-transformed fibroblasts: cyclic AMP selectively promotes regurgitation of macropinosomes. *J. Cell Sci.* **111**:2329-2335.
- Wang, T., Pentyala, S., Rebecchi, M.J. and Scarlata, S.** 1999. Differential association of the pleckstrin homology domains of phospholipases C-beta 1, C-beta 2, and C-delta 1 with lipid bilayers and the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins. *Biochemistry* **38**:1517-1524.
- Watson, J. M., Harding, T. W., Golubovskaya, V., Morris, J. S., Hunter, D., Li, X., Haskill, J. S. and Earp, H. S.** 2001. Inhibition of the calcium-dependent tyrosine kinase (cdtk) blocks monocyte spreading and motility. *J. Biol. Chem.* **276**:3536-3542.
- Way, K.J., Chou, E. and King, G.L.** 2000. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**:181-187.
- Weber, A., Nachmias, V.T., Pennise, C.R., Pring, M. and Safer, D.** 1992. Interaction of thymosin beta 4 with muscle and platelet actin: implications for actin sequestration in resting platelets. *Biochemistry* **31**:6179-6185.
- Weed, S.A., Du, Y. and Parsons JT.** 1998. Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1. *J. Cell Sci.* **111**:2433-43.
- Welch, M.D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D.A. and Mitchison, T.J.** 1998. Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* **281**:105-108.
- West, M.A., Antoniou, A.N., Prescott, A.R., Azuma, T., Kwiatkowski, D.J. and Watts, C.** 1999. Membrane ruffling, macropinocytosis and antigen presentation in the absence of gelsolin in murine dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **29**:3450-3455.

- West, M.A., Prescott, A.R., Eskelinen, E.L., Ridley, A.J. and Watts, C.** 2000. Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr. Biol.* **10**:839-848.
- Whiteford, C.C., Brearley, C.A. and Ulug, E.T.** 1997. Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate defines a novel PI 3-kinase pathway in resting mouse fibroblasts. *Biochem. J.* **323**:597-601.
- Wilde, A., Beattie, E.C., Lem, L., Riethof, D.A., Liu, S.H., Mobley, W.C., Soriano, P. and Brodsky, F.M.** 1999. EGF receptor signaling stimulates SRC kinase phosphorylation of clathrin, influencing clathrin redistribution and EGF uptake. *Cell* **96**:677-687.
- Williams, R.L.** 1999. Mammalian phospho-inositide-specific phospholipase C. *Biochim. Biophys. Acta* **1441**:255-267.
- Wilkins, A., Chubb, J. R. and Insall, R. H.** 2000. A novel Dictyostelium RasGEF is required for normal endocytosis, cell motility and multicellular development. *Curr. Biol.* **10**:1427-1437.
- Wyke, J.A. and Stoker, A.W.** 1987. Genetic analysis of the form and function of the viral Src oncogene product. *Biochim. Biophys. Acta* **907**: 47-69.
- Yahara, I., Harada, F., Sekita, S., Yoshihira, K. and Natori, S.** 1982. Correlation between effects of 24 different cytochalasins on cellular structures and cellular events and those on actin in vitro. *J. Cell Biol.* **92**:69-78.
- Yoo, J. and Robinson, R.A.** 1999. H-ras and K-ras mutations in soft tissue sarcoma. Comparative studies of sarcomas from Korean and American patients. *Cancer* **86**:58-63.
- Yu, J., Zhang, Y., McIlroy, J., Rordorf-Nikolic, T., Orr, G.A. and Backer, J.M.** 1998a. Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110 γ catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol. Cell. Biol.* **18**:1379-1387.
- Yu, J., Wjasow, C. and Backer, J.M.** 1998b. Regulation of the p85/p110 α phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the n-terminal and c-terminal SH2 domains. *J. Biol. Chem.* **273**:30199-30203.
- Zhou, K., Pandol, S., Bokoch, G. and Traynor-Kaplan A. E.** 1998. Disruption of Dictyostelium PI3K genes reduces [32P]phosphatidylinositol 3,4 bisphosphate and [32P]phosphatidylinositol trisphosphate levels, alters F-actin distribution and impairs pinocytosis. *J. Cell Sci.* **111**:283-294.

