Laboratoire de bioimagerie et pathologies | LBP de l'Université de Strasbourg et du cnrs

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Faculté de Pharmacie, CNRS UMR 7021

THÈSE

présentée par :

Antoine MOUSSON

soutenue le : **27 novembre 2020**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**
Spécialité : Sciences Pharmaceutiques - Pharmacologie

Analyse du rôle des protéines FAK et CD47 dans l'invasion tumorale du mélanome

THÈSE dirigée par :

M. RONDÉ Philippe	Dr, Université de Strasbourg, CNRS UMR7021

RAPPORTEURS :

M. DEDIEU Stéphane	Pr, Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS UMR7369 MEDyC
M. BOUVARD Daniel	Dr, Université de Montpellier, CRBM

AUTRE MEMBRE DU JURY :

Mme. TOMASETTO Catherine-Laure	Dr, Université de Strasbourg, IGBMC

INVITÉE :

Mme. SICK Emilie	Dr, Université de Strasbourg, CNRS UMR7021

C’est une bonne situation ça doctorant ?

- Vous savez, moi je ne crois pas qu’il y ait de bonne ou de mauvaise situation. Moi, si je devais résumer ma vie aujourd’hui avec vous, je dirais que c’est d’abord des rencontres. Des gens qui m’ont tendu la main, peut-être à un moment où je ne pouvais pas, où j’étais seul chez moi. Et c’est assez curieux de se dire que les hasards, les rencontres forgent une destinée. Parce que quand on a le goût de la chose, quand on a le goût de la chose bien faite, le beau geste, parfois on ne trouve pas l’interlocuteur en face je dirais, le miroir qui vous aide à avancer. Alors ça n’est pas mon cas, comme je disais là, puisque moi au contraire, j’ai pu : et je dis merci à la vie, je lui dis merci.

Astérix et Obélix : Mission Cléopâtre

REMERCIEMENTS

A l'issue de mon doctorat, je suis convaincu que la recherche est un travail d'équipe. Je n'aurais jamais pu réaliser ce travail sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette étape d'apprenti-chercheur.

Je tiens tout d'abord à remercier, le Dr. Daniel Bouvard, le Pr. Stéphane Dedieu et le Dr. Catherine-Laure Tomasetto pour avoir accepté de participer au jury de mon doctorat et d'évaluer mon travail.

Je voudrais par la suite remercier le Dr. Yves Mély et le Dr. Monique Dontenwill pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire et dans leur équipe.

Je remercie respectueusement le Dr. Phillipe Rondé pour m'avoir accepté dans son laboratoire et pour ses conseils. Je le remercie notamment de m'avoir laissé libre de mener à bien ma propre recherche tout en guidant mes choix.

Un merci tout particulier au Dr. Emilie Sick, ma mère scientifique, qui m'a enseigné et partagé ses connaissances dès mes première et deuxième années de Master, qui m'a aidé à m'épanouir professionnellement et personnellement durant mon doctorat afin que je puisse développer mon sens de l'organisation et du management. En étant toujours disponible et à l'écoute, elle a rendu ma vie au sein du laboratoire des plus agréable. Sur le plan professionnel, elle aura été, par sa sagacité, la personne qui a révélé en moi la passion pour la cancérologie et la pharmacologie.

Un grand merci à Tania Steffan et à Marlène Legrand qui ont participé à la réalisation de mon projet et m'ont prodigué des conseils plus qu'utiles. Leur présence et leur bonne humeur ont créé un environnement si accueillant au laboratoire et propice à surmonter les moments difficiles de ma thèse. J'ai été extrêmement sensible à leurs qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de mon travail.

Je remercie également Romain Vauchelles, le Dr. Emmanuel Boutant et le Dr. Eleonore Real qui m'ont formé aux bases et aux techniques d'imagerie et qui m'ont aidé dans la préparation du concours de l'école doctorale et du concours « Ma Thèse en 180 secondes ». Bien qu'ils ne soient pas spécialistes en cancérologie, ils ont toujours pris le temps de discuter des tenants et

aboutissement de ma thèse afin de m'aider dans le déroulement de mon projet de recherche et dans la préparation de mon projet professionnel. Dans les moments les plus difficiles, ils ont fait preuve de compréhension et d'attention, à l'écoute de mes doutes et questionnements sans les juger tout en faisant preuve de compassion mais surtout de confiance en moi.

Remerciements chaleureux à tous les autres membres de l'équipe et notamment au Dr. Phillipe Carl qui n'a pas compté ses heures pour m'aider à optimiser l'analyse de mes données ainsi qu'au Pr. Maxime Lehmann qui m'a permis de concilier la recherche théorique et appliquée durant mon doctorat. Merci également au Dr. Kenneth Takeda et au Dr. Yann De-Mey, deux anciens membres du laboratoire, qui m'ont prodigué des conseils essentiels à l'obtention et au bon déroulement de mon contrat doctoral.

Un grand merci à Elisabete Silva, Mary Tannoo, Marina Pierrevelcin, et à tous les étudiants en master avec lesquels j'ai eu le plaisir de travailler. Les moments passés dans et en dehors du laboratoire avec vous sont mémorables.

J'adresse également mes remerciements aux secrétaires dévouées Marlyse Wernert et Ingrid Barthel pour leur patience et leur gentillesse.

Je voudrais également remercier ces personnes extérieures au laboratoire qui ont été et sont essentielles à mon épanouissement personnel et à ma joie de vivre.

Le plus grand merci revient à Malaury, la personne la plus importante à mes yeux. Merci pour ton amour de tous les jours, ta confiance en moi, ton écoute, ton soutien, ta présence mais aussi ta faculté à réconforter, motiver, comprendre, rire, ressentir, encourager, guider et surtout aimer.

Merci à ma famille : Maman, Papa et Arnaud. Merci pour avoir toujours cru en moi, pour avoir toujours fait tout votre possible pour que je puisse mener à bien mes projets personnels et développer mes aptitudes. Sans vous, rien n'aurait été possible. Merci à mon frère pour sa présence et son soutien qui sont aussi les moteurs de ma vie.

Merci enfin à mes amis : Les Bretons, David, Antoine, Simon, Quentin, Camille, Paul, Clément et Charlotte. Mais également aux Alsaciens, Timothée, Jeff, Lisa, Chloé et à la Jurassienne, Alizée. Nous avons vécu durant ces quelques années des soirées, des vacances et des randonnées qui sont des souvenirs inoubliables.

RESUME

Français

L'invasion tumorale requière la coordination des processus de migration et de dégradation de la matrice extracellulaire (MEC), régulés respectivement par les adhérences focales et par les invadopodes, protrusions membranaires enrichies en métalloprotéases matricielles. Sur un modèle de mélanome, nous avons étudié les mécanismes moléculaires de l'invasion cellulaire sous-jacents.

La protéine FAK (*Focal Adhesion Kinase*) régule la balance entre migration et dégradation matricielle dans les cellules cancéreuses. Nous montrons que l'inhibition du domaine kinase de FAK diminue la migration cellulaire mais augmente la dégradation matricielle. En revanche, en inhibant l'interaction FAK-paxilline, nous montrons que la migration et l'invasion tumorale sont diminuées, soulignant la pertinence d'une nouvelle stratégie thérapeutique ciblant FAK.

Aussi, nous avons trouvé que l'activation du récepteur CD47 par la TSP-1 inhibe la migration mais favorise la dégradation de la MEC par la voie de signalisation MEK/ERK. Nous montrons ainsi pour la première fois l'implication directe de l'axe CD47-TSP-1 dans la formation et l'activité des invadopodes.

Mot clés: Mélanome, FAK, CD47, invasion, invadopode, inhibiteurs d'interaction protéine-protéine

English

Tumour invasion requires the coordination of migration and degradation of the extracellular matrix (ECM). These processes are regulated respectively by focal adhesions and by invadopodia, which are membrane protrusions enriched in matrix metalloproteases. In a melanoma model, we have studied the molecular mechanisms underlying invasion.

FAK (Focal Adhesion Kinase) regulates the balance between migration and matrix degradation in cancer cells. We show that inhibition of the kinase domain of FAK decreases cell migration but increases matrix degradation. On the other hand, by inhibiting the interaction of FAK with paxillin, we found that migration and tumour invasion are inhibited. This suggests that targeting FAK might represent a new therapeutic strategy.

We also demonstrated that activation of CD47 by TSP-1 inhibits migration but promotes degradation of ECM by the MEK/ERK pathway. We thus show for the first time the involvement of the CD47-TSP-1 axis in the formation and activity of invadopodia.

Keywords: Melanoma, FAK, CD47, invasion, invadopodia, protein-protein interaction inhibitors

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION **1**

A. La peau 1

I. Biologie de la peau 1

II. Les couches de la peau 1

1. L'épiderme 1
2. La jonction dermo-épidermique 3
3. Le derme 3
4. L'hypoderme 3

III. La matrice extracellulaire 4

IV. Les mélanocytes 4

V. Les naevus 5

B. Le mélanome 6

I. Généralités 6

II. Evolution 6

III. Les principales altérations génétiques du mélanome 7

IV. L'influence du microenvironnement tumoral 9

V. Les thérapies du mélanome 11

1. La chirurgie 11
2. La Radiothérapie 11
3. La chimiothérapie 11
4. Les thérapies ciblées 12
5. L'immunothérapie 12

C. L'invasion tumorale 13

I. L'invasion dans le développement et la dissémination des cancers 13

1. Migration mésenchymateuse 13
2. Migration amiboïde 17
3. Migration collective 18

II. Les mécanismes moléculaires de la migration mésenchymateuse 20

1. La polarisation cellulaire et la génération des protrusions membranaires 20
2. Les adhérences focales 21
   - 2.1. Formation des adhérences focales 21
   - 2.2. La génération des forces contractiles 23
   - 2.3. Le désassemblage des adhérences focales 24
3. Les invadopodes 25
   - 3.1. Découverte et observations des invadopodes 25
   - 3.2. Caractérisation moléculaire des invadopodes 28
   - 3.3. Les principaux composants moléculaires des invadopodes 29
     - i. Les récepteurs transmembranaires 29
     - ii. Les lipides 31
     - iii. L'actine et ses régulateurs 32
     - iv. Les régulateurs de l'activité protéolytique 35

3.4. Initiation, Formation et Maturation des invadopodes 43
3.5. Sensibilité au microenvironnement 45

D. Focal Adhesion Kinase 47

I. Structure de FAK 47
1. Domaine N-terminal 47
2. Domaine Kinase 48
3. Domaine C-terminal 49

II. L'activité catalytique de la protéine FAK 50
1. Activation de la protéine FAK dans les FAs 50
2. Activation dans les endosomes 52
3. L'influence du microenvironnement 53
4. Les mécanismes endogènes de régulation 54
4.1. La régulation génomique de FAK 54
4.2. FRNK 54
4.3. Les protéases 55
4.4. La sumoylation 55
4.5. PTEN 56

III. FAK dans le développement 56

IV. FAK dans les cancers 57
1. La surexpression et la suractivation de FAK 57
2. L'immunité 58
3. La prolifération et la survie cellulaire 59
4. La migration 61
4.1. L'assemblage des adhérences focales 61
4.2. Le désassemblage des adhérences focales 64
5. L'invasion 66
5.1. La transition épithélio-mésenchymateuse 66
5.2. L'angiogenèse 66
5.3. La dégradation matricielle par les invadopodes 67

V. Les thérapies ciblant FAK 69
1. Les inhibiteurs du domaine kinase 69
2. Les inhibiteurs allostériques 72
3. Les inhibiteurs d'interaction protéine-protéine 73
3.1. Les inhibiteurs du domaine FERM 73
3.2. Les inhibiteurs du domaine FAT 74

E. La protéine associée aux intégrines IAP/CD47 77

I. Structure de CD47 77

II. Les principaux partenaires de CD47 78
1. Les partenaires extracellulaires 78
1.1. La TSP-1 et ses dérivés peptidiques 78
1.2. SIRPα et SIRPγ 80
2. Les partenaires membranaires 80
2.1. Les intégrines 80
2.2. CD36 82
2.3. Le VEGFR 82
3. Les partenaires intracellulaires 82

3.1. L'adénylate et la guanylate cyclase 82
3.2. PLIC1 84
III. CD47 dans les cancers 84
1. La surexpression de CD47 84
2. La mort cellulaire 85
3. La survie et la prolifération cellulaire 87
4. L'immunité 87
5. L'angiogenèse 90
6. Migration et invasion 91
IV. Les thérapies ciblant CD47 92
MATERIEL ET METHODES 97
CIBLER LA PROTEINE FAK AVEC DES INHIBITEURS D'INTERACTION PROTEINE-PROTEINE 107
A. Contexte de la revue 107
B. Principales conclusions 107
CIBLER L'INTERACTION FAK-PAXILLINE INHIBE L'INVASION ET LA MIGRATION DES CELLULES DE MELANOME METASTATIQUE 139
A. Contexte de la recherche 139
B. Objectif du travail 140
C. Principaux résultats 140
L'ACTIVATION DE CD47 FAVORISE L'INVASION DES CELLULES DE MELANOME PAR LE BIAIS DE LA VOIE DE SIGNALISATION MEK-ERK 181
A. Contexte de la recherche 181
B. Objectif du travail 181
C. Principaux résultats 181
DISCUSSION ET PERSPECTIVES 209
A. Le mélanome est-il un modèle d'étude de la formation et de la maturation des invadopodes ? 209
B. FAK régule-t-elle l'invasion des cellules cancéreuses ? 211
I. La protéine FAK inhibe-t-elle la formation et l'activité des invadopodes ? 211
II. Le complexe FAK-src régule-t-il la balance migration-dégradation ? 213
III. La localisation subcellulaire de FAK affecte-elle son rôle anti-invasif ? 214
C. Inhiber l'interaction FAK-paxilline : une nouvelle stratégie thérapeutique 215
I. Quels sont les effets d'une inhibition de l'interaction FAK-paxilline sur le développement et la dissémination des cellules cancéreuses ? 215
II. Quels peuvent être les effets *off target* d'un inhibiteur du domaine FAT ? 218
D. Comment FAK est-elle activée dans le cytoplasme ? 219

E. CD47 régule-t-il l'invasion du mélanome ? 221
BIBLIOGRAPHIE 225
ANNEXE 257

LISTE DES ABBREVIATIONS

A

AC : Adénylate cyclase
ADAM : A Disintegrin and Metalloprotease
ADCC : Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity
AFAP110 : Actin Filament Associated Protein
Akt : Protein Kinase B
APC : Cellules présentatrices d'antigènes
aPKC : Atypique Protéine Kinase C
Arf : ADP ribosylation factor
Arp2/3 : Actin Related Protein-2/3
ASAP1 : ArfGAP containing SH3 Domain Ankyrin Repeat and PH Domain 1

B

Bad : Bcl-2 Associated Death Promotor
bFGF : Basic Fibroblast Growth Factor

C

CAF : Cancer Associated Fibroblasts
Cav-1 : Cavéoline 1
CBD : Collagen Binding Domain
Cdc42 : Cell Division Control Protein 42
CDKN2A : Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
CK2α : Casein kinase 2α
COX2 : Cyclooxygenase-2
CREB : cAMP Response Element-Binding protein
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4

D

DDR1 : Discoidin domain receptor family, member 1
Drp1 : Dynamin-related protein 1

E

EGF : Epidermal Growth Factor
ERK : Extracellular signal-regulated kinase
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

F

FAK : Focal Adhesion Kinase
FAH : FAT homology domain
FAs : Adhérences focales
FAT : Focal adhesion targeting
FERM : Band 4.1-Ezrin-Radixin-Moesin
FGF : Fibroblast Growth Factor
FRAP : Fluorescence recovery after photobleaching
FRET : Fluorescence resonance energy transfert
FRNK : FAK-Related Non-Kinase

G

GAG : Glycosaminoglycanes
GAP : GTPase activating protein
GC : Guanylate cyclase
GDI : Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors
GEF : Guanine Exchange Factors
GPI : Glycosylphosphatidylinositol
Grb2 : Growth factor receptor bound protein 2
GSK3 : Glycogen synthase kinase 3

H

HBD : Domaine de liaison à l'héparine
HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
HGF : Hepatocyte growth factor
HIF: Hypoxia-Inducible Factor
HP : Hydrophobic Patch

HSPG : Protéoglycanes de sulfate d'héparane
HSQC-NMR : Heteronuclear Single Quantum Coherence Nuclear Magnetic Resonance

I

IAP : Integrin Associated Protein
IGF-I : Insulin-like growth factor I
IgV : Immunoglobulines
IIPP : Inhibiteur D'interaction Protéine-Protéine
IL-2 : Interleukine-2
IPP : Interaction Protéine-Protéine
ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motifs

J

JNK : c-Jun N-terminal kinases

L

LC-MS : Liquid chromatography - mass spectrometry
LD : Leucine Aspartate
LIM : Zinc-binding motifs

M

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MC1R : Melanocortine-1
Mdm2 : Murine double minute 2
MEC : Matrice extracellulaire
MITF : Microphthalmia-Associated Transcription Factor
MLC : Chaines légères de myosines
MLCK : Myosin Light Chain Kinase
MLCP : Myosin Light Chain Phosphatase
MMP : Métalloprotéases solubles
MS : Mass spectrometry
MSH : Melanocyte Stimulating Hormone
MT-MMP : MMP membranaires
MTOC : Microtubule Organizing centre

N

NCK : Non-Catalytic region of tyrosine Kinase adaptor protein 1
NES : Nuclear Export Signal
NHE : Echangeurs de sodium-hydrogène
NLS : Nuclear Localization Signal
NO : Monoxyde d'azote
NOS : Nitric oxyde synthase
NOX : NADPH oxydase
N-WASP : Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein

P

p21 : Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p53 : Tumor protein 53
PCR : Polymerase Chain Reaction
PD-1 : Programmed cell death protein 1
PDE : Phosphodiesterase
PDGF : Platelet-derived Growth Factor
PH : Domaine d'homologie à la plekstrin
PH-PTB : Plextrin Homology-Phosphotyrosine Binding Domain Fold
PI3K : Phosphatidylinositol-3-kinase
PIPKIγ : Type I phosphatidylinositol phosphate kinase- γ
PKA : Protéine Kinase A
PKC : Protéine Kinase C
POMC : Pro-opiomélanocortine
PRD : Prolin-Rich Domain
PTEN : Phosphatase And Tensin Homolog
PTPα : Protein tyrosine phosphatase α
PTP1B : Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1
PTP-PEST : Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12
PX : Phosphoinositide binding domain
Pyk2 : Related adhesion focal tyrosine kinase

R

Rhoa : Ras homolog family member A
ROCK : Rho-associated protein kinase
Rous : Rétrovirus exprimant l'oncogène v-Src
RTK : Récepteur à activité tyrosinE kinase

S

SAXS : Small Angle X-rays Scattering
SH : Src Homology Domains
SHC1 : SHC-transforming protein 1
SHP1 : Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1
SIRP : Signal Regulatory Protein
Snail : Zinc finger protein SNAI1
SNARE : Soluble N-Ethylmqleimide Sensitive Factor Receptor
SOCE : Store Operated Calcium Entry
Sos : Son of sevenless
SPR : Surface Plasmon Resonance
Src : Rous sarcoma virus
STIM1 : Stromal interaction molecule 1
SUMO : Small Ubiquitin-like Modifier Protein

T

TAM : Tumor-Associated Macrophages
TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF : Transforming Growth Factor
TKS-x : Tyrosine kinase substrate with x SH3 domains
TM : Transmembranaire
TME : Transition mésenchymo-épithéliale
TSP-1 : Thrombospondine-1

U

UV : Ultraviolets

V

VAMP : Vesicle-Associated Membrane Protein
VEC : Vascular endothelial cadherin
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
v-Src : Viral Src
vWF : Domaine de type C du facteur von Willebrand

Introduction

INTRODUCTION

A. La peau

I. Biologie de la peau

La peau est un organisme composé de plusieurs couches de tissus et constitue la première barrière de l'organisme face à l'environnement extérieur et ses menaces physiques, chimiques et biologiques. Cet organe assure également d'importantes fonctions thermiques, biochimiques, neurosensorielles et immunitaires. Histologiquement, la peau est constituée de 4 couches : l'épiderme, la jonction dermo-épidermique, le derme et l'hypoderme **(Figure 1).**

II. Les couches de la peau

1. L'épiderme

L'épiderme constitue la partie supérieure de la peau et peut être défini comme un épithélium de revêtement pavimenteux stratifié (composé de plusieurs couches cellulaires) squameux (les cellules superficielles sont plates) kératinisé (les cellules produisent de la kératine) (Tobin, 2006). Il assure la rétention de l'eau dans l'organisme et prévient l'entrée de pathogène. N'étant pas vascularisé, la nutrition de ces cellules repose sur la diffusion depuis les capillaires sanguins situés à la surface des couches supérieures du derme.

L'épiderme est constitué à 80% de cellules épithéliales, les kératinocytes, et présente une organisation en cinq couches (Kanitis, 1997 ; Tobin, 2006). Les kératinocytes prolifèrent activement au sein de la couche la plus profonde de l'épiderme, la **couche basale**, qui repose sur la jonction dermo-épidermique également appelée lame basale. Les kératinocytes basaux possèdent des structures transmembranaires, les hémidesmosomes, assurant leur ancrage à cette matrice et leur polarisation en vue de migrer dans les couches supérieures de l'épiderme. Au fur et à mesure de leur progression dans l'épiderme, les kératinocytes arrêtent leur prolifération au profit d'une différenciation. C'est en traversant la **couche de Malpighi** que les kératinocytes débutent leur différenciation en devenant plus volumineux et en synthétisant activement des fibres de kératine qui rempliront progressivement l'intégralité de la cellule. Le processus de différentiation s'achève dans la **couche granuleuse**. Les kératinocytes y deviennent très aplatis et leur noyau commence à dégénérer en formant de nombreuses structures granulaires. La synthèse de grains de kératohyaline favorise la déshydratation cellulaire et la création d'un réseau de kératine à l'intérieur de la cellule entraînant leur aplatissement et à terme la mort cellulaire. Dans cette couche granuleuse se trouve également un nombre important de

kératinosomes ; des petites structures responsables de la sécrétion dans l'espace pericellulaire d'une substance lipidique formant un ciment intercellulaire (Kanitis, 1997 ; Tobin, 2006). La **couche claire** est une couche de l'épiderme qui n'existe qu'au niveau de la paume de la main et la plante du pied. Les kératinocytes la constituant sont des cellules mortes dont le noyau disparaît, remplacé par une vacuole. Enfin la **couche cornée**, constitue la partie superficielle de l'épiderme. Elle est composée de kératinocytes complètement différenciés, anucléés, aplatis, sans organites et intégralement remplis d'une matrice de filaments de kératine ; ce sont des cornéocytes. Ces cellules mortes sont fortement liées par des cornéodesmosomes, structures d'adhésion transmembranaire dérivées des desmosomes qui lient les kératinocytes de l'épiderme vivant. Le ciment lipidique sécrété par les kératinosomes comble l'espace intercellulaire, formant une couche imperméable permettant de conserver l'intégrité du corps. La couche cornée constitue également une barrière contre l'invasion bactérienne extérieure grâce à l'acidification de la surface de la peau.

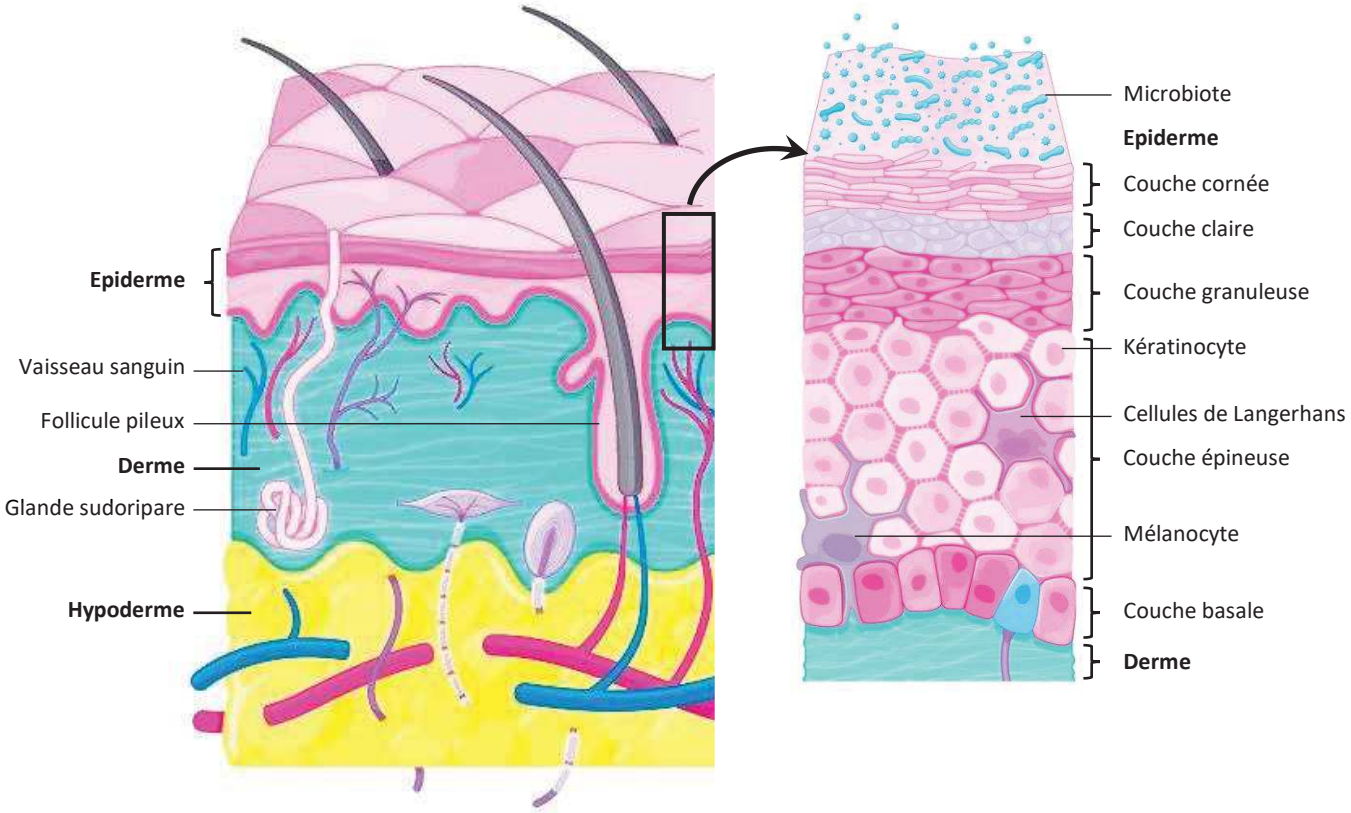


Figure 1 : La constitution de la peau. La peau est constituée de 4 couches : l'épiderme, la jonction dermo-épidermique, le derme et l'hypoderme. Les mélanocytes sont situés dans la couche basale de l'épiderme et la jonction dermo-épidermique également appelée lame basale, prévient le passage des cellules de l'épiderme vers le derme. Adapté de Gould, 2018.

Outre les kératinocytes, l'épiderme comprend entre 3 et 8% de cellules de Langerhans. Ces cellules dendritiques sont produites au niveau des organes hématopoïétiques et migrent vers l'épiderme afin de détecter les antigènes exogènes ayant pénétré. Elles rejoignent ensuite les ganglions lymphatiques afin de présenter les exo-antigènes aux lymphocytes pour activer une réponse immunitaire (Flacher et *al.,* 2010). On retrouve également 3 à 5% de cellules de Merkel dans la couche basale de l'épiderme. Ce sont des prolongements du système neuroendocrinien jouant un rôle de mécanorécepteur (Maricich et *al.,* 2009). Enfin les mélanocytes constituent 1 à 3% des cellules de l'épiderme et assurent la photo-protection de l'épiderme grâce à la synthèse de mélanine ; ce type cellulaire sera développé plus en détail ultérieurement.

2. La jonction dermo-épidermique

L'épiderme et le derme sont séparés par une fine couche de fibre appelée jonction dermo-épidermique ou lame basale. Cette membrane régule le transport des cellules et des molécules entre l'épiderme et le derme et agit comme une barrière empêchant le passage des cellules cancéreuses plus profondément dans le tissu. La membrane basale est principalement composée de laminine et de collagène de type IV synthétisée conjointement par les kératinocytes de l'épiderme et les fibroblastes du derme.

3. Le derme

Le derme est la couche située sous l'épiderme. Outre son rôle nutritif de l'épiderme, le derme joue un rôle primordial dans la thermorégulation, dans la cicatrisation ainsi que dans l'élimination de produits toxiques. C'est un tissu conjonctif composé principalement de fibroblaste qui assure la production de fibre de collagène, d'élastine et de fibronectine à l'origine de l'élasticité de la peau, mais également la sécrétion de la matrice extracellulaire (MEC) (Tobin, 2006). Le derme contient également des cellules du système immunitaire (leucocytes, mastocytes, macrophages), des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques et des terminaisons nerveuses. Il est le siège des follicules pileux, des glandes sudoripares et des glandes sébacées qui assurent l'hydratation et la nutrition par diffusion de la peau.

4. L'hypoderme

L'hypoderme est la couche la plus profonde. C'est un tissu conjonctif lâche richement vascularisé qui contient selon les endroits plus ou moins de tissu adipeux. Il est principalement composé d'adipocytes qui assurent le stockage des graisses et de fibroblastes. Cette couche

assure le stockage énergétique et permet l'isolation thermique et la protection mécanique des tissus sous-jacents (Tobin, 2006).

III. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est un réseau tridimensionnel de macromolécules sécrété par les cellules afin de maintenir l'homéostasie tissulaire (Biteau et *al.,* 2011). Outre son rôle de soutien et de protection, l'interaction des cellules avec les récepteurs de la MEC, tels que les intégrines, est essentielle à l'adhérence cellulaire, la communication cellule-cellule et la différenciation (Hynes*,* 2009). Elle constitue également une barrière contre le développement des cellules cancéreuses et l'invasion tumorale. Elle peut être retrouvée sous forme de matrice interstitielle capable d'absorber la pression générée dans les espaces intercellulaires, ou bien sous forme de membrane basale séparant le stroma des cellules épithéliales dans l'endothélium, ainsi que dans d'autres tissus (Benton et *al.,* 2011). La composition de la matrice extracellulaire est dépendante des tissus, mais on y retrouve principalement de l'eau, des collagènes, de la fibronectine, de la laminine et des protéoglycanes. Les proportions relatives des composantes fibreuses et non-fibreuses, leur diamètre et leur agencement définissent les propriétés physiques générales de la MEC (Tanzer, 2006). C'est une structure très dynamique qui est remodelée et dont les composants moléculaires subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles. Dans le cas d'un cancer, la sécrétion excessive de matrice par les fibroblastes et son remodelage favorisent le développement des cellules cancéreuses (Frantz et *al.,* 2010).

IV. Les mélanocytes

Les mélanocytes sont des cellules dendritiques responsables de la pigmentation de la peau et des follicules pileux grâce à la synthèse de mélanine (Costin & Hearing, 2007). Dans la peau, ils sont situés dans la couche basale de l'épiderme et au niveau de l'infundibulum et au sommet des papilles dermiques dans les follicules pileux. En dehors de la peau, ils sont fortement concentrés dans le tractus uvéal des yeux et à plus faible concentration dans d'autres tissus tels que les méninges (Shain & Bastian, 2016). Les mélanocytes représentent une minorité des cellules de l'épiderme et se divisent peu fréquemment ; moins de deux fois par an. Quelle que soit leur localisation dans la peau, les mélanocytes sont issus de la différenciation des mélanoblastes de la crête neurale (Lin & Fisher, 2007).

Les mélanocytes épidermiques produisent des mélanosomes dans lesquels sont synthétisés deux types de mélanine : l'eumélanine, un pigment de couleur brun-noir, et la phéomélanine un pigment de couleur jaune-rouge (Lin & Fisher, 2007). Le rôle majeur des mélanines est de protéger la peau contre les effets néfastes des rayonnements ultraviolets (UV) afin d'empêcher le développement de cancers cutanés. En effet, suite à un endommagement de leur ADN par les UV, les kératinocytes vont sécréter de l'αMSH (*α-Melanocyte Stimulating Hormone*) par scission de la pro-opiomélanocortine (POMC), grâce à l'action de la protéine p53 (Cui et *al.,* 2007). Cette hormone lie alors le récepteur couplé aux protéines G de la melanocortine-1 (MC1R) exprimée à la surface des mélanocytes afin de stimuler la translocation de la PKA dans le noyau et la phosphorylation des facteurs de transcription CREB (c*AMP Response Element-Binding protein*) (Levy et *al.,* 2006 ; Lin & Fisher*,* 2007). Une fois activité, CREB se lie à l'ADN et favorise la transcription de MITF (*Microphthalmia-Associated Transcription Factor*) qui régule l'expression de nombreux pigments dont la mélanine (Bertolotto et *al.,* 1998). Une fois produite, la mélanine est transportée dans les mélanosomes grâce aux fibres d'actine et de tubuline jusqu'aux kératinocytes qui l'utilisent pour disperser et absorber les radiations des UV afin de protéger leur information génétique.

V. Les naevus

Les grains de beauté ou naevus sont des lésions mélanocytaires bénignes provoquées par une densité anormalement élevée de mélanocytes issus d'une prolifération bénigne de ces cellules. Les cellules sont regroupées en amas à proximité de la couche basale de l'épiderme, et dans certains cas dans le derme. Chez l'humain, les naevus se développent généralement dans les vingt premières années de la vie et peuvent évoluer au cours du temps (taille, couleur, forme) (Zalaudek et *al.,* 2011). Bien que les naevus représentent des tumeurs bénignes, ils ont peu de chance de se développer en mélanome. En effet, la majeure partie des naevus présentent des altérations génétiques dont la mutation BRAF V600E (Shain et *al.,* 2015). Après l'acquisition de cette mutation, les mélanocytes vont débuter une prolifération limitée débouchant à la formation du naevus avant d'entrer dans un stade de sénescence (Michaloglou et *al.,* 2005). Cliniquement, les naevus n'évoluent pas durant plusieurs années ; cependant certains mélanocytes dans le naevus conservent la capacité de proliférer, et ce, malgré la sénescence des autres cellules. Ce faible taux de prolifération est contrebalancé par l'apoptose de ces cellules à la suite des stress oncogéniques (Gorgoulis et *al.,* 2005) et par l'infiltration lymphocytaire (Kuilman et *al.,* 2008).

B. Le mélanome

I. Généralités

Le mélanome est une tumeur cutanée particulièrement agressive, qui représente un problème de santé publique majeur en raison de son incidence avec une augmentation annuelle de 10 % en Europe. En France, trois à quinze nouveaux cas par an pour 100.000 habitants sont détectés chaque année. Contrairement aux autres cancers cutanés tels que les carcinomes basocellulaire et épidermoïdes naturellement peu invasifs, le mélanome, représentant 10 % des cancers de la peau, est particulièrement létal. Du fait de sa forte capacité à se disséminer dans l'organisme et à former des métastases, le taux de survie à 5 ans du patient est réduit à 10 - 20 % s'il est traité tardivement. En effet, le mélanome ne représente que 2 à 3 % de l'ensemble des cancers, mais plus de 1 500 décès annuels lui sont imputables en France, soit 1 % des décès par cancer.

II. Evolution

Le mélanome est un cancer de la peau qui se développe à partir des mélanocytes épidermiques. Ils sont associés à différents types de lésions précurseurs allant d'un nævus bénin à un nævus dysplasique et à un mélanome *in situ* et invasif **(Figure 2).** La transformation du naevus bénin en naevus dysplasique est une étape non-essentielle au développement d'un mélanome. Les naevus dysplasiques se différencient des autres naevus par une taille plus importante (5mm ou plus), des bords irréguliers ainsi qu'un changement de couleur et d'aspect (Gandini et *al.,* 2005). Ils se développent suite à l'accumulation de mutations favorisant la prolifération cellulaire et sont corrélés avec une augmentation du risque de développer un mélanome (Rigel et *al.,* 1989).

Le mélanome *in situ* définit une prolifération incontrôlée des mélanocytes en amas irréguliers dans l'épiderme. Les évènements moléculaires conduisant au développement d'un mélanome *in situ* ne sont pas clairement établis bien que l'accumulation d'altérations génétiques ou épigénétiques affectant la régulation du cycle cellulaire, la prolifération et l'apoptose favorise ce processus (Gray-Schopfer et *al.,* 2007). Les radiations dues aux UV suite à une exposition chronique au soleil représentent la principale cause de développement de ces lésions (Lo & Fisher, 2014). Un mélanome *in situ* peut persister des années avant de devenir invasif. En effet, un comportement invasif requiert d'avantages d'altérations génétiques et l'expression d'enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire tels que les métalloprotéases (MMP). De même, l'échappement des cellules cancéreuses à la surveillance du système immunitaire peut également être un facteur de progression du mélanome (Abbas et *al.,* 2014). Une fois que

les cellules ont quitté l'épiderme et pénétré dans les tissus subjacents tels que le derme, le mélanome est devenu invasif. Cette progression est associée à un mauvais pronostique, car le taux de survie est corrélé à la profondeur d'invasion. En effet, une fois dans le derme, les cellules cancéreuses peuvent rejoindre le système lymphatique et vasculaire afin de se disséminer dans l'organisme et induire une forme plus agressive de cancer, le mélanome métastatique (Gaggioli & Sahai, 2007). La dissémination des cellules tumorales se fait principalement par voie lymphatique et les métastases sont le plus souvent localisées au niveau des ganglions lymphatiques puis dans les poumons, le foie, les os et le cerveau (Sleeman, 2012).

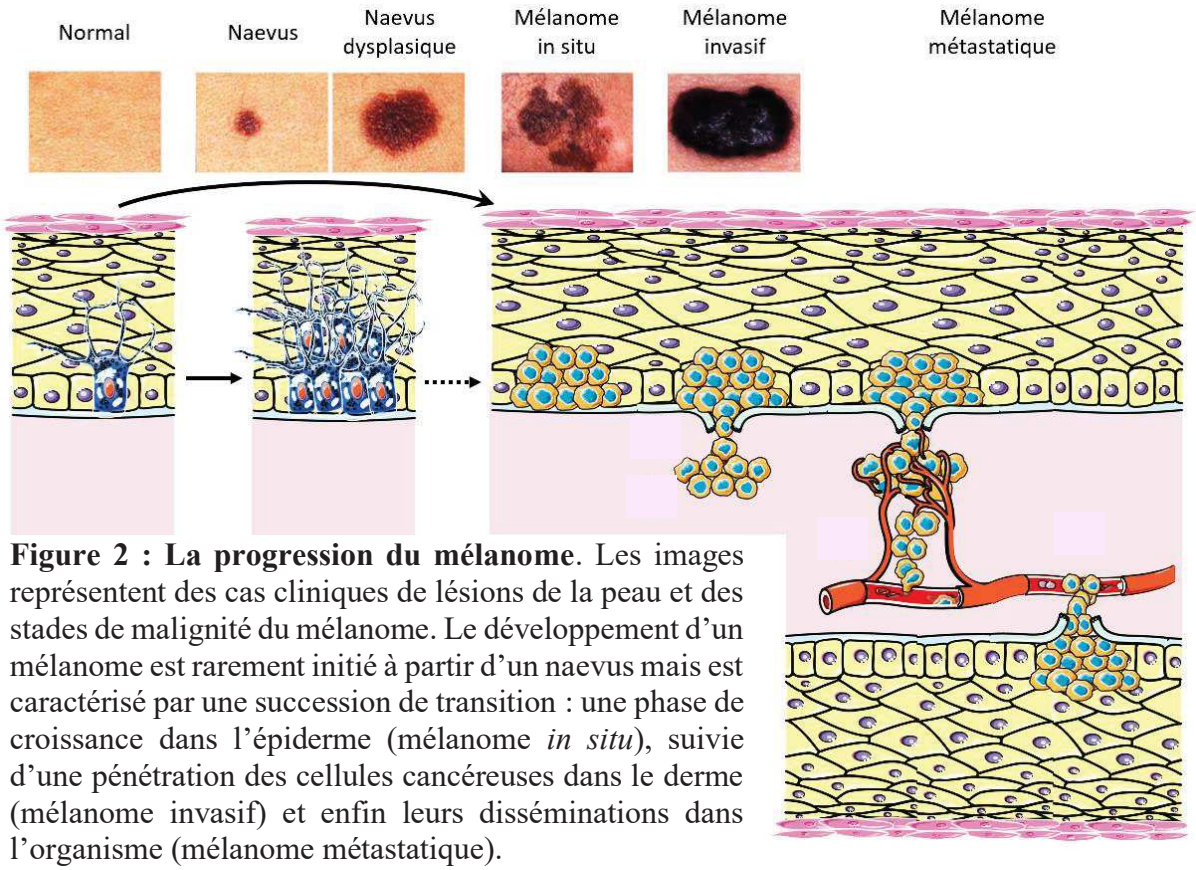


Figure 2 : La progression du mélanome. Les images représentent des cas cliniques de lésions de la peau et des stades de malignité du mélanome. Le développement d'un mélanome est rarement initié à partir d'un naevus mais est caractérisé par une succession de transition : une phase de croissance dans l'épiderme (mélanome *in situ*), suivie d'une pénétration des cellules cancéreuses dans le derme (mélanome invasif) et enfin leurs disséminations dans l'organisme (mélanome métastatique).

III. Les principales altérations génétiques du mélanome

Les mutations de gènes régulant la prolifération et la survie cellulaire favorisent l'initiation et le développement du mélanome (Gray-Schopfer et *al.,* 2007). Les gènes mutés sont principalement des oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs comme NRAS, CDKN2A, BRAF (Shain et *al.,* 2015). La mutation la plus fréquente dans le mélanome cible la protéine tyrosine kinase BRAF. Parmi ces mutations, le remplacement de la valine en position 600 par un acide glutamique (V600E) est observé dans 50% des mélanomes. Cette mutation de BRAF entraîne une activation anormale de la signalisation des MAPK (M*itogen-Activated Protein*

Kinase) conduisant à une suractivation de la prolifération et une augmentation de la capacité de survie des cellules tumorales **(Figure 3)**. D'autres mutations de la valine 600 sont retrouvées ; celle-ci peut être remplacée dans certains cas par une lysine (V600K) ou une arginine (V600R) (Arkenau et *al.,* 2011; Scolyer et *al.,* 2011). La présence de BRAF muté est également détectée dans les nævi bénins et dysplasiques montrant qu'il s'agit d'un évènement précoce dans la progression du mélanome.

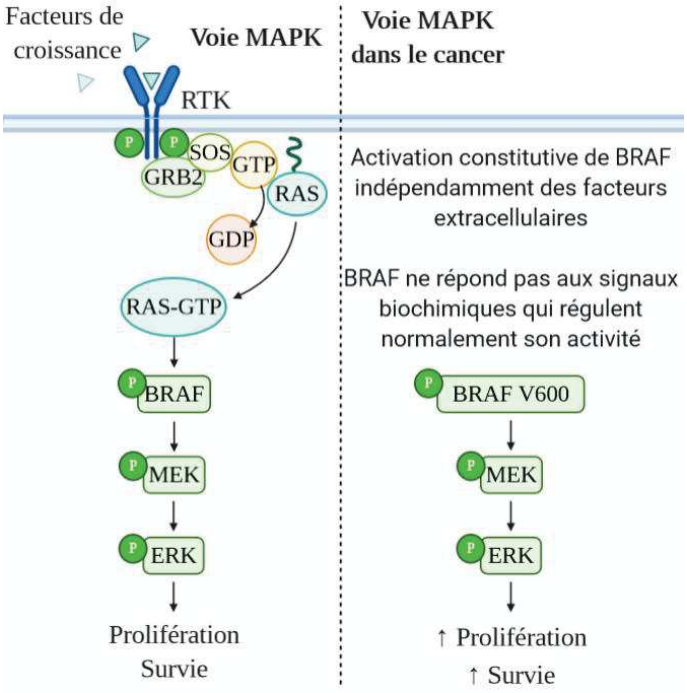


Figure 3 : L'activation constitutive de BRAF dans le mélanome. En condition physiologique, l'association des protéines adaptatrices Grb2 et SOS aux résidus tyrosyls phosphorylés des récepteurs aux facteurs de croissance (RTK) conduit à l'activation de la protéine G Ras. Celle-ci peut alors phosphoryler et activer la protéine BRAF qui à son tour active la protéine MEK à l'origine de l'activation de ERK. Une fois phosphorylé, ERK peut aller dans le noyau pour favoriser la prolifération et la survie des cellules. Dans la plupart des mélanomes, une mutation de BRAF active constitutivement la protéine et la voie de signalisation sous-jacente des MAPK augmentant ainsi la croissance tumorale.

Cependant, les mutations responsables de l'évolution du mélanome *in situ* en mélanome invasif restent à ce jour obscur. En effet, le nombre de mutations ne semble pas accru une fois le derme atteint ; en revanche, le nombre de copies des mutations augmentent durant cette progression. Golan et son équipe ont récemment proposé que la voie Notch soit un acteur majeur de la progression tumorale du mélanome. Il a été démontré *in vitro* et *in vivo*, que l'interaction des mélanocytes avec les kératinocytes différenciés de l'épiderme induit l'activation de la voie Notch à l'origine de la dissociation du complexe entre le facteur de transcription anti-invasif MITF (Carreira et *al.,* 2006 ; Levy et *al.,* 2010) et le miR-222/221 pour permettre l'invasion des mélanomes (Golan et *al.,* 2015). Par ailleurs, certaines mutations, comme p53 et PTEN, sont retrouvées plus fréquemment dans les mélanomes invasifs ou métastasés que dans les mélanomes in situ (Birck et *al.,* 2000 ; Castresana et *al.,* 1993). Les mutations de p53 sont observées dans 20 % des mélanomes métastatiques et favorisent leurs développements en inactivant les capacités anti-prolifératives et apoptotiques des cellules (Hodis et *al.,* 2012). De même, l'inactivation de la protéine PTEN favorise la croissance tumorale et réduit la mort

cellulaire. Il a été démontré que des souris développant conjointement la mutation BRAF V600E et une protéine PTEN déficiente, présente une progression tumorale beaucoup plus rapide que des souris présentant seulement la mutation BRAF (Dankort et *al.,* 2009).

IV. L'influence du microenvironnement tumoral

Le microenvironnement est également un acteur majeur dans le développement du mélanome. Dans la peau, les kératinocytes régulent la prolifération des mélanocytes en sécrétant des facteurs de croissance et en communicant au travers des adhérences cellule-cellule (Haass & Herlyn, 2005). Au cours de la progression tumorale, les mélanocytes subissent une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et échappent au contrôle des kératinocytes en désorganisant les jonctions cellule-cellule selon un mécanisme qui sera abordé plus en détail ultérieurement.

Il est maintenant bien établi que des tumeurs solides ne sont pas simplement des agrégats de cellules cancéreuses, mais contiennent également de nombreux autres types cellulaires mentionnés comme le stroma. Le stroma d'une tumeur comprend la MEC, les facteurs de croissance, les cytokines, les vaisseaux sanguins, les fibroblastes ainsi que les cellules inflammatoires (Ruiter et *al.,* 2002). Pendant la progression tumorale, les cellules cancéreuses acquièrent la capacité de recruter, d'incorporer et de reprogrammer la biologie et la fonction de ces cellules saines pour favoriser la survie et le développement de la tumeur (Bitoux & Stamenkovic, 2008 ; Kalluri, 2016) **(Figure 4)**. Les cellules cancéreuses répondent à des messagers chimiques tels que les facteurs de croissance sécrétés par les cellules du stroma (communication paracrine) mais elles sont également capables de sécréter des facteurs de croissance qui agissent sur leur propre comportement (communication autocrine) ainsi que sur les cellules saines. Il a notamment été démontré que les mélanomes sécrètent de manière autocrine du bFGF (*Basic Fibroblast Growth Factor*) afin de favoriser la survie et la prolifération alors que les mélanocytes requièrent un apport paracrine du bFGF pour survivre (Lazar-Molnar et *al.,* 2000). La croissance tumorale rapide conduit à un appauvrissement en oxygène dans la tumeur et dans son microenvironnement, également appelée hypoxie. Ce phénomène régule la transcription des facteurs HIF (*Hypoxia-Inducible Factor*) afin de développer un réseau vasculaire et de garantir un apport en oxygène et en nutriment dans la tumeur primaire et aux sites secondaires (Zhang *al.,* 2012). L'angiogenèse, processus par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins sont formés à partir des vaisseaux préexistants, est déclenchée par les facteurs de croissance autocrine et paracrine tels que VEGF, bFGF, PDGF, TGF-α et TGF-β (Fukumura & Jain, 2007 ; Lu & Kang, 2010). Outre le fait de stimuler l'angiogenèse,

un environnement hypoxique altère le métabolisme cellulaire et crée un environnement acide dans la tumeur. La diminution du pH, suite à la surexpression des échangeurs de sodium-hydrogène (NHE), induit une surexpression du VEGF afin de favoriser la vascularisation de la tumeur (Amith & Fliegel, 2013). Par ailleurs, NHE-1 favorise l'expression, la sécrétion et l'activation de protéases à l'origine d'un remodelage de la MEC et d'une augmentation de la dureté du stroma ; ce phénomène a été rapporté pour faciliter le développement et la dissémination des cellules cancéreuses (Kato et *al.,* 2005). De nombreuses autres cellules du stroma dont les *Cancer Associated Fibroblasts* (CAF) participent activement au développement tumoral en sécrétant des facteurs de croissance et des protéases, en produisant de la MEC et en favorisant l'angiogenèse démontrant encore une fois l'importance du microenvironnement tumoral (Bierie & Moses*,* 2006 ; Ruiter et *al.,* 2002). Enfin, le développement tumoral déclenche une réponse inflammatoire de l'organisme (Brigati et *al.,*2002). Le recrutement des cellules immunitaires dans la tumeur conduit à l'activation des macrophages et à la production de cytokines augmentant ainsi la réponse inflammatoire dans le stroma. De manière surprenante, ce processus favorise le développement tumoral en stimulant le développement des vaisseaux sanguins ainsi que la survie cellulaire (Bitoux & Stamenkovic, 2008). En effet, l'afflux de leucocytes dans la tumeur induit une sécrétion importante de cytokines, d'ERO (Espèces Réactives de l'Oxygène) ainsi que d'enzymes protéolytiques favorisant le remodelage de la MEC et la libération de facteurs de croissance (Horimoto et *al.,* 2012).

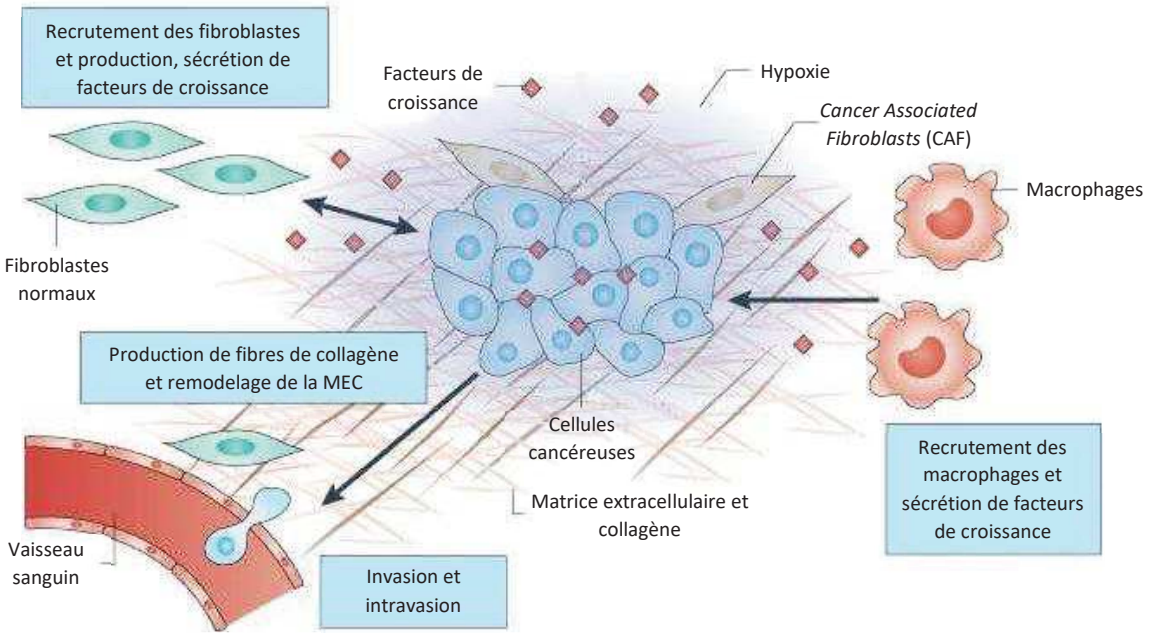


Figure 4 : Le microenvironnement tumoral. C'est un réseau complexe composé de la MEC, des cellules stromales (fibroblastes, cellules endothéliales) et des cellules immunitaires (cellules T, cellules cytotoxiques, macrophages). Ces cellules communiquent et coopèrent pour favoriser le développement et la dissémination des cellules cancéreuses. Adapté de Gikes et *al.,* 2014

V. Les thérapies du mélanome

Environ 90% des mélanomes diagnostiqués sont des mélanomes in situ sans signe de métastases et sont systématiquement traités par exérèse chirurgicale. Le pronostique vital de ces patients est bon avec une survie à 5 ans de 75 à 85 % (Garbe et *al.,* 2010). En revanche, la survie des patients n'excède pas 10 - 20 % si le cancer présente des signes de dissémination métastatique (Maio, 2012). Un certain nombre de patients répond correctement aux thérapies ciblées (inhibiteurs de tyrosine kinases, anticorps monoclonaux) mais de nombreux cas de résistance sont déjà recensés. Plus récemment, des traitements par immunothérapies pour les stades avancés ont été développés et ont révolutionné la prise en charge thérapeutique du mélanome (Redman et *al.,* 2016).

1. La chirurgie

La chirurgie est le principal traitement des mélanomes cutanés in situ. La chirurgie s'effectue en deux fois avec une première intervention permettant de retirer la lésion et de confirmer le diagnostic du mélanome. Une seconde excision est ensuite réalisée en retirant une bande de peau saine par sécurité. L'exérèse des ganglions lymphatiques situés dans la zone de drainage du mélanome (également appelées ganglions sentinelles), afin de vérifier la présence de micro-métastases, n'est pas pratiquée de manière systématique mais est relativement fréquente dans le cas de tumeurs profondes (Garbe et *al.,* 2010 ; Testori et *al.,* 2009). L'exérèse des métastases est également réalisée lorsqu'elles sont accessibles. Cependant en cas de métastases trop nombreuses ou trop étendues, la chirurgie n'est plus adaptée.

2. La Radiothérapie

La radiothérapie est une méthode peu utilisée car le mélanome est considéré comme un cancer radio-résistant. Cette stratégie est employée dans le cas de tumeurs in situ, de ganglions lymphatiques envahis ou de métastases quand les lésions sont peu ou pas accessibles et donc inopérables par chirurgie (Garbe et *al.,* 2010 ; Testori et *al.,* 2009).

3. La chimiothérapie

Les mélanomes de stades très avancés répondent mal à la chimiothérapie malgré la réalisation de plusieurs études avec des antinéoplasiques en monothérapie ou en combinaison (Agarwala, 2009 ; Eggermont & Kirkwood, 2004 ; Trinh, 2008). La dacarbazine et son pro-médicament, le témozolomide, sont les molécules les plus employées avec des taux de réponse de 8 à 20 %, et

une survie globale des patients augmentée de 6 à 9 mois (Bedikian, 2006 ; Middleton et *al.,* 2000). Des études avec le témozolomide, un pro-médicament capable de traverser la barrière hématoencéphalique et potentiellement d'agir contre les métastases cérébrales ont également été menées sans amélioration significative de la survie sans progression et de la survie globale en comparaison de la dacarbazine (Stevens et *al.,* 1987). Ces résultats ont suffi à positionner durant des dizaines d'années la dacarbazine comme le traitement standard.

4. Les thérapies ciblées

Cette stratégie consiste à cibler spécifiquement des protéines mutées et/ou dérégulées dans un cancer donné et ainsi limiter la toxicité pour les cellules saines. Comme évoqué précédemment, la voie MAPK est particulièrement dérégulée suite à la mutation de la protéine BRAF dans le mélanome et de nombreux inhibiteurs spécifiques ciblant cette protéine ont été testés (Davies & Samuels, 2010 ; Seetharamu et *al.,* 2009). Le Vémurafenib a notamment montré son efficacité dans le traitement des formes métastatiques des mélanomes porteurs d'une mutation BRAF V600 (Chapman et *al.,* 2011) avec un taux de réponse de 50% et une amélioration de la survie globale des patients. Cependant, après une courte période de réponse (6-8 mois), une grande majorité des patients deviennent à terme résistants (Flaherty et *al.,* 2010; Sosman et *al.,* 2012). Le Dabrafénib, un second inhibiteur de BRAF, a présenté des résultats comparables. Pour pallier ce problème, le Tramétinib, un inhibiteur de MEK, protéine en aval de BRAF dans la voie MAPK, a également été testé en monothérapie ou en combinaison avec les inhibiteurs de BRAF et a présenté un certain succès (Flaherty et *al.,* 2010).

5. L'immunothérapie

Les mélanomes sont des cancers immunogènes comme l'attestent les régressions spontanées et les infiltrats lymphocytaires (McCardle et *al.,* 2009) et sont donc particulièrement sensibles à l'immunothérapie. L'immunothérapie vise à stimuler les défenses du système immunitaire contre les cellules cancéreuses. L'interleukine-2 (IL-2) a été pendant longtemps la seule immunothérapie approuvée pour les mélanomes métastatiques avec une réponse durable chez 5-10 % de la population (Phan et *al.,* 2001 ; Tarhini et *al.,* 2007). Par la suite, la découverte des points de contrôle immunitaires ou *immune checkpoints* des cellules T a conduit au développement de nouvelles stratégies visant à surmonter la tolérance et à améliorer les réponses immunitaires. L'ipilimumab, un anticorps ciblant CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4*), a démontré son efficacité avec une augmentation de la survie des patients

atteints de mélanome métastatique mais surtout avec une réponse durable dans le temps puisque 15-30 % des patients sont toujours vivants après 5 ans (Hodi et *al.,* 2010). Le nivolumab et le pembrolizumab ciblant PD-1 (*Programmed cell death protein 1*) se sont révélés supérieurs à l'ipilimumab seul. La combinaison d'ipilimumab et de nivolumab a donné des taux de réponse plus élevés, une régression tumorale plus importante et une survie sans progression plus longue que la monothérapie seule (Redman et *al.,* 2016). Ces inhibiteurs de points de contrôle immunitaires sont indiqués en première ligne de traitement du mélanome avancé non résécable et du mélanome métastatique. Par ailleurs, le nivolumab et le pembrolizumab sont indiqués en première ligne de traitement des mélanomes non mutés BRAF V600, et en deuxième ligne, après l'échec d'une bithérapie ciblée (un inhibiteur de BRAF associé à un inhibiteur de MEK), pour les mélanomes mutés BRAF V600.

C. L'invasion tumorale

I. L'invasion dans le développement et la dissémination des cancers

Durant la dissémination métastatique, les cellules cancéreuses se détachent de la masse tumorale, entrent dans la circulation sanguine ou lymphatique et envahissent un organe distant du site primaire (Friedl & Gilmour, 2009). L'étude *in vitro* et *in vivo* des processus d'invasion cellulaire démontre que les cellules cancéreuses peuvent quitter la masse tumorale soit seules, en utilisant un mode de migration amiboïde ou mésenchymal, soit en paquets en utilisant une migration de type collective (Friedl & Wolf, 2003).

1. Migration mésenchymateuse

Afin de traverser la membrane basale et rejoindre la circulation générale, les cellules tumorales d'origine épithéliale peuvent subir une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) ou *fibroblast-like* (Krakhmal et *al*., 2015). Ce phénomène a été décrit pour la première fois sur des cellules MDCK qui, après incubation dans un milieu provenant de fibroblastes en culture, ont été transformées en fibroblastes motiles (Stoker & Perryman, 1985). Le facteur de croissance hépatocytaire (HGF) fut rapidement identifié comme la cause de cette transition (Matsumoto, et *al*., 1995). A ce jour, de nombreux autres facteurs de croissance sécrétés par les cellules immunitaires, les cellules endothéliales et les fibroblastes ont été identifiées pour induire la TEM (Thiery, 2002 ; Yilmaz & Christofori, 2009). En effet, les voies de signalisation du TGFβ, de Wnt et de Notch en sont les principaux inducteurs (Gonzalez & Medici, 2014). La liaison du TGFβ sur son récepteur induit la formation du complexe SMAD2-SMAD3-SMAD4 et favorise

la translocation nucléaire du complexe afin de favoriser la transcription de protéines favorisant cette transition telle que Snail, Zeb et Twist (Kaimori et *al.,* 2007). De même, l'activation de la voie WNT inhibe la destruction de GSK3 et facilite la translocation nucléaire de la caténine ainsi que la transcription de Snail afin de sous-exprimer les marqueurs épithéliaux de la cellule (Yook et *al.,* 2005).

Durant la TEM, les cellules cancéreuses perdent leurs caractéristiques épithéliales telles que la polarité baso-apicale et les adhérences cellule-cellule au profit de caractéristiques mésenchymateuses **(Figure 5)**. La sous-expression de la E-cadhérine est un élément clé de cette transition. Cette glycoprotéine transmembranaire assure la formation des jonctions d'adhérence en interagissant avec les cadhérines des cellules adjacentes. Ces jonctions cellule-cellule sont notamment stabilisées grâce à l'interaction de la E-cadhérine avec le cytosquelette d'actine par le biais de la β-caténine et de l'α-caténine (Halbleib & Nelson, 2006). Au cours de la TEM, de nombreuses autres protéines impliquées dans la formation des jonctions épithéliales cellule-cellule (occludine, claudine) sont réprimées tandis que des protéines impliquées dans le cytosquelette et dans la polarité (fibronectine, vitronectine, vimentine, N-cadhérine) sont exprimées (Huang et *al.,* 2012 ; Yilmaz & Christofori, 2009). En effet, la sous-expression de la E-cadhérine est associée à une surexpression de la N-cadhérine à l'origine d'une augmentation de la prolifération et de la mobilité cellulaire (Aleskandarany et *al.,* 2014 ; Araki et *al.,* 2011). Il a notamment été démontré que la N-cadhérine est capable de stabiliser le FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptor*) et le PDGFR (*Platelet-derived Growth Factor Receptor*) afin d'activer respectivement les voies MAPK et PI3K et de faciliter la dissémination des cellules cancéreuses (Hulit et *al.,* 2007). Par ailleurs, la perte d'expression de la E-cadhérine permet la translocation nucléaire de la β-caténine à l'origine de la transcription des gènes MITF et cycline D1 impliqués dans le développement tumoral (Onder et *al.,* 2008). De manière intéressante, la progression des cellules cancéreuses n'est pas linéaire et la TEM est un processus réversible. En effet, les tumeurs primaires et les tumeurs métastatiques d'adénocarcinome colorectal ont une structure similaire caractérisée par la présence de cellules mésenchymateuses au front d'invasion et par des cellules épithéliales au centre de la tumeur (Brabletz et *al*., 2001). Ces résultats ont mis en évidence que l'environnement tumoral régule la transition des deux phénotypes transitoires afin de permettre la dissémination des cellules cancéreuses.

Bien que l'épiderme, présente des protéines d'adhérence cellulaire tel que les E-cadhérines, les mélanocytes ne sont pas considérés comme des cellules épithéliales et ne peuvent donc pas

subir une TEM (Li et *al.,* 2015). En revanche, un processus semblable à la TEM a été rapporté dans les mélanocytes pour induire la perte des jonctions d'adhérences et promouvoir le développement d'un mélanome métastatique (Li et *al.,* 2015). Ce phénomène peut être partiel dans la tumeur et des jonctions cellule-cellule peuvent rester intactes ou affaiblies.

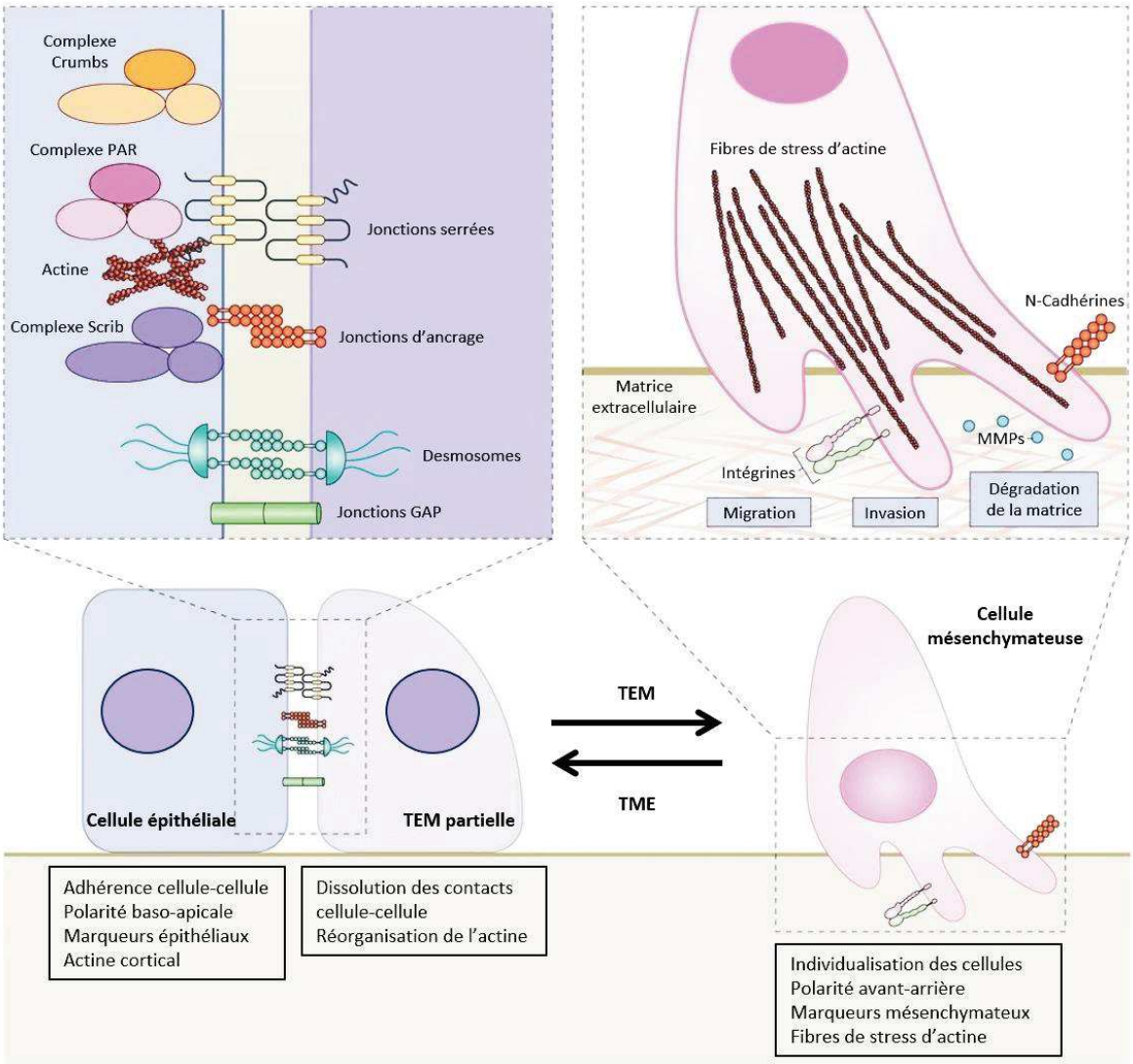


Figure 5 : La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). La TEM est initiée par le désassemblage des contacts entre les cellules épithéliales, comprenant les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions Gap, ainsi que la perte de polarité cellulaire suite à la rupture des complexes de polarité Crumbs, PAR (*Partitioning Defective*) et SCRIB (*Scribble*). Parallèlement à la répression des gènes épithéliaux, des gènes mésenchymateux sont exprimés dans la cellule à l'origine d'une réorganisation de l'architecture de l'actine. Les cellules acquièrent alors une motilité et des capacités invasives en formant des lamellipodes, des filopodes et des invadopodes, et en exprimant des métalloprotéases matricielles (MMP) qui peuvent dégrader les protéines la MEC. Néanmoins, ce processus est réversible et la transition mésenchymateux-épithélial (TME) permet aux cellules de revenir à un phénotype épithélial. Adapté de Lamouille et *al.,* 2014.

Suite à ce processus, les cellules de mélanome réalisent une migration de type mésenchymateuse pour s'échapper de l'épiderme. Les cellules entreprennent la formation de protrusions qui se stabilisent en interagissant avec la MEC au niveau de sites d'adhérences riches en intégrines, les **adhérences focales** (FAs) **(Figure 6)**. Ces points d'adhérences exercent les forces de traction nécessaires au déplacement de la cellule (Lauffenburger & Horwitz, 1996). Néanmoins, les cellules cancéreuses ne peuvent pas traverser aussi aisément la lame basale que de nombreuses cellules saines dont les cellules du système immunitaire (Rowe & Weiss, 2008). La transmigration des leucocytes est indépendante de toute activité protéolytique car ces cellules disposent de noyaux souples pouvant se déformer lors du passage au travers des pores de la membrane basale (Friedl & Wolf, 2003; Rowe & Weiss, 2008). En revanche, les cellules cancéreuses possèdent des noyaux plus rigides, moins déformable et leur passage à travers la membrane basale requière un remodelage de l'environnement par des protéases (Friedl & Wolf, 2003 ; Infante et *al.,* 2018 ; Wolf et *al.,* 2013). La migration mésenchymateuse est donc accompagnée d'un processus de dégradation de la matrice extracellulaire induit par la sécrétion de peptidases au niveau de structures riches en actine appelées **invadopodes** (Wolf & Friedl, 2006) **(Figure 6)**. Une fois échappées de la tumeur primaire, les cellules cancéreuses vont migrer à travers la matrice extracellulaire du derme pour rejoindre les vaisseaux sanguins. Dans cet environnement riche en fibre de collagène, le noyau des cellules supporte des contraintes physiques et mécaniques importantes, le contraignant à des changements de taille et de forme (Harada et *al.,* 2014 ; Swift et *al.,* 2013). Le noyau constitue l'organelle le plus large, le plus rigide de la cellule et sa déformation peut engendrer des altérations de l'enveloppe nucléaire (Bell & Lammerding, 2016). Ce processus est corrélé avec une diminution de l'expression de la lamine A favorisant la survie et la migration des cellules en espace confiné (Bell & Lammerding, 2016). Par ailleurs, la sous-expression de la lamine A induit également une augmentation de l'expression des métalloprotéases et une augmentation du potentiel invasif des cellules (Bell & Lammerding, 2016 ; Infante et *al.,* 2018). La dégradation de la MEC par les protéases est donc une réponse adaptative des cellules cancéreuses face à un environnement dense et confiné. Par la suite, les cellules cancéreuses traversent la paroi vasculaire pour se retrouver dans la circulation sanguine, mais aussi lymphatique, c'est ce que l'on appelle l'intravasation (Sahai, 2007). Le développement des techniques d'imagerie intravitale de haute résolution a permis de visualiser *in vivo* l'importance du remodelage de la MEC par les invadopodes dans ce processus (Condeelis & Segall, 2003 ; Sahai et *al.,* 2005 ; Wolf et *al.,* 2003). Une fois dans la circulation sanguine, les cellules sont alors confrontées à des forces de cisaillement et aux cellules du système immunitaire pouvant conduire à la mort cellulaire.

Enfin, les cellules ayant survécu se propagent dans le corps et s'implantent dans un nouvel organe, d'où par extravasation, elles quitteront le vaisseau sanguin pour envahir le tissu (Chambers et *al.,* 2002). La modélisation expérimentale de cette dernière étape de la formation des métastases par l'injection de cellules cancéreuses directement, ou de manière orthotopique, dans la circulation sanguine a notamment permis de mettre en évidence l'importance des MMP dans la croissance des cellules cancéreuses au niveau d'un site secondaire.

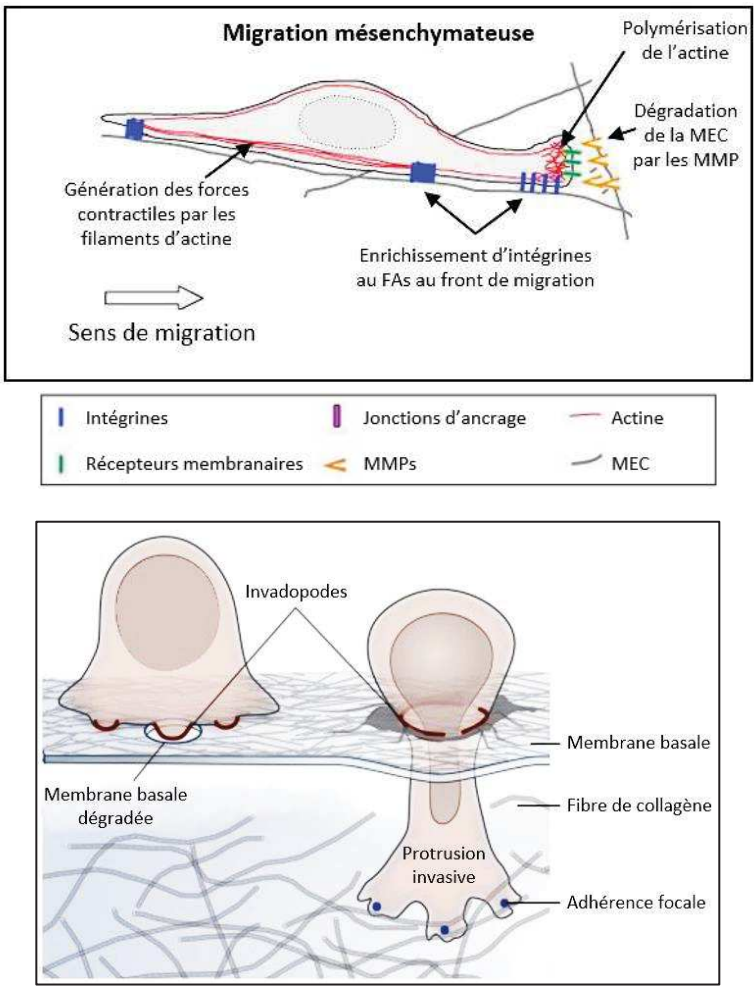


Figure 6 : La migration mésenchymateuse. La migration mésenchymateuse requière des interactions entre la cellule et la MEC au niveau de sites enrichis en intégrines, les adhérences focales (FAs). Les cellules s'alignent ainsi le long des fibres de collagène de la MEC et remodèle le microenvironnement en sécrétant des protéases au niveau de structures riches en actine, les invadopodes. Le centre organisateur des microtubules (MTOC) est situé à l'avant du noyau, afin de cibler les vésicules contenant les protéases vers l'avant de la cellule pour remodeler la matrice extracellulaire et faciliter l'invasion. Adapté de Sahai, 2005 et de Ferrari et *al.,* 2019.

2. Migration amiboïde

Les cellules cancéreuses ne réalisent pas toutes une TEM afin de franchir les barrières de la peau. En effet, les tumeurs de mélanomes sont fréquemment enrichies en cellules rondes caractéristiques d'une invasion individuelle de type amiboïde (Cantelli et *al.,* 2015; Sanz-

Moreno et *al.,* 2011). Cette migration diffère du type mésenchymal car elle est guidée par des contacts avec la MEC dont la force et la demi-vie sont très courts et, où les points focaux, les protéases et les fibres de stress sont absents et remplacés par des réseaux corticaux d'actine (Friedl & Wolf, 2003 : Liu et *al.,* 2015b) **(Figure 7)**. De plus dans ces cellules, les intégrines β1 et β3 sont faiblement exprimées et sont réparties de manière diffuse à la membrane (Sahai, 2005). Cette morphologie confère aux cellules une grande déformabilité et peu d'interactions avec le stroma, leur permettant de se faufiler à travers les pores formés par les fibres de collagène et ce indépendamment de toute activité protéolytique (Sabeh et *al.,* 2009 ; Sahai, 2005). Les cycles d'extension et de contraction du cytosquelette d'acto-myosine, régulé par la GTPase Rhoa et son effecteur ROCK, permettent aux cellules de type amiboïde de migrer plus rapidement que les cellules de type mésenchymateuses (Mishima et *al.,* 2010 ; Sahai, 2005).

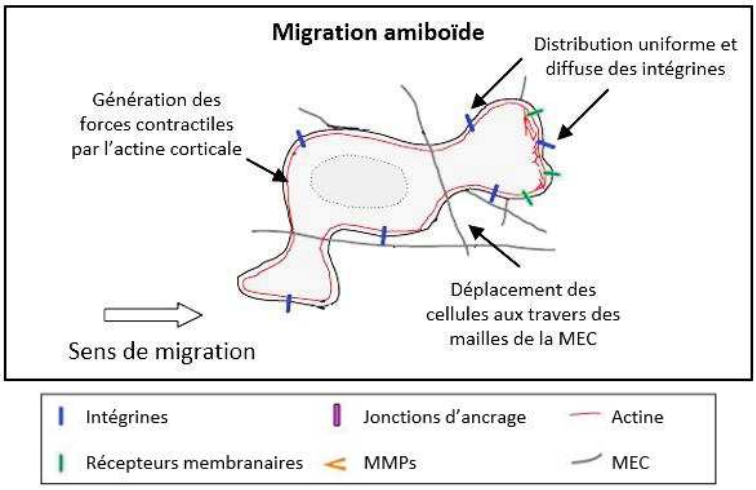


Figure 7 : La migration amiboïde. Contrairement à la migration mésenchymateuse, la migration amiboïde ne requière pas une adhérence importante des cellules à la MEC. Les cellules utilisent donc divers récepteurs autres que des intégrines pour générer les forces contractiles afin de se déplacer dans les pores de la MEC et ce sans avoir recours à une activité protéolytique. Adapté de Sahai, 2005

3. Migration collective

Le processus d'invasion collective est observé dans la progression des cancers du sein, de la prostate, du colon, des carcinomes et des mélanomes suite à une TEM partielle (Friedl & Gilmour, 2009; Weijer, 2009). Cette migration est caractérisée par la migration d'amas cellulaires dans lesquels des cellules très mobiles se placent en meneur à l'avant et entraînent les cellules avoisinantes grâces aux jonctions intercellulaires et aux cadhérines ayant persistées **(Figure 8)**. Les cellules situées au front de migration et celles situées à l'arrière présentent des morphologies, des fonctions et des niveaux d'expressions de gènes différents (Mayor & Etienne-Manneville, 2016). En effet, les meneurs présentent des caractéristiques

mésenchymateuses reflétant une perte partielle de la polarité baso-apicale mais également un attachement aux cellules avoisinantes révélant la persistance des caractéristiques épithéliales. Ces cellules sont fortement en contact avec les composants de la MEC par le biais des intégrines et notamment de β1 (Lamalice et *al.,* 2007 ; Yamaguchi et *al.,* 2015). L'interaction des intégrines avec la MEC conduit à l'activation des GTPases Cdc42 et Rac (Osmani et *al.,* 2010) mais également des tyrosines kinases FAK et Src (Lawson & Burridge, 2014 ; Scales & Parsons, 2011) à l'origine de l'extension des protrusions au front de migration. Les voies sous-jacentes favorisent également la polymérisation des microtubules, le trafic vésiculaire et la création des forces contractiles nécessaires au déplacement de la cellule (Etienne-Manneville, 2013). Il a également été démontré, *in vitro*, dans des tests de *wound healing* et *in vivo*, dans des modèles de poissons zèbres et de drosophiles, que l'invasion collective est fréquemment induite par les facteurs de croissance (Mayor & Carmona-Fontaine, 2010). Le VEGF favorise notamment l'activation de la voie PI3K conduisant à l'activation des GTPases Cdc42 et Rac afin de favoriser la polymérisation de l'actine et la polarisation des meneurs. De plus, dans la migration collective, les meneurs sont liés aux suiveurs par des jonctions d'adhérences telles que les cadhérines. Il a été démontré dans plusieurs modèles que l'altération des cadhérines induit le détachement des meneurs de l'amas (Camand et *al.,* 2012). La perte des E-cadhérines au bord de l'amas inhibe également la formation des protrusions et la migration des cellules (Niewiadomska et *al.,* 1999). Par ailleurs, la distribution anisotrope des jonctions d'adhérences

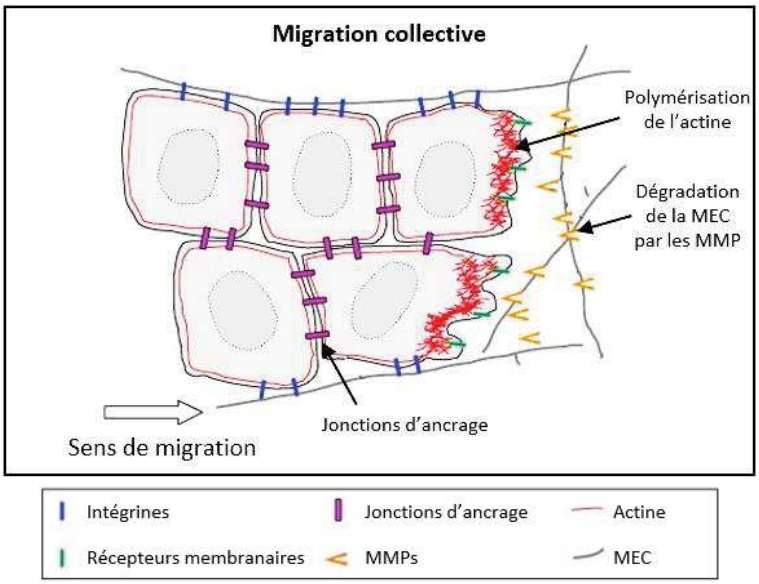


Figure 8 : La migration collective. Le front de migration d'un amas cellulaire comprend une ou plusieurs cellules « meneuses » aux caractéristiques mésenchymateuses. Ces cellules secrètent des MMP à l'avant de la cellule afin de remodeler la MEC et génèrent des forces de traction au niveau de protubérances riches en actine. Elles peuvent ainsi entrainer le long de la voie de migration préétablie les cellules avoisinantes grâce à des jonctions d'ancrages cellule-cellule ayant persistées. Adapté de Sahai, 2005

dans les meneurs suffit à induire la polarisation des cellules en activant les voies de signalisation des intégrines à l'origine d'une réorientation du cytosquelette, du centrosome et du golgi vers le front de migration (Borghi et *al.,* 2010 ; Dupin et *al.,* 2009). Enfin, les meneurs n'explorent pas seulement le microenvironnement, ils remodèlent la matrice extracellulaire en sécrétant des protéases afin de créer un passage pour les cellules du groupe, plus solidaires entre elles et interagissant moins avec leur environnement (Hegerfeldt et *al.,* 2002 ; Nabeshima et *al.,* 2000 ; Wolf et *al.,* 2003 ; Wolf et *al.,* 2007).

II. Les mécanismes moléculaires de la migration mésenchymateuse

Les cellules migrent grâce à des cycles répétitifs de protrusions, d'adhérences et de contractions. La migration d'une cellule est initiée par la polarisation cellulaire et par la formation de protrusions en lamellipodes ou en filipodes au front de migration. La cellule entreprend ensuite des interactions avec la MEC afin de former des points d'adhérences focales riches en intégrines et des invadopodes riches en protéases capables respectivement d'exercer les forces de traction nécessaires au déplacement et de remodeler la MEC. Enfin, la cellule désassemble les sites d'adhérences à l'arrière de la cellule afin de rétracter son corps cellulaire (Lauffenburger & Horwitz, 1996).

1. La polarisation cellulaire et la génération des protrusions membranaires

Pour migrer, la cellule adopte une asymétrie spatiale caractérisée par la formation d'un « avant » et d'un « arrière » de la cellule. Des changements architecturaux tels que la réorganisation du centre organisateur des microtubules (MTOC), des microtubules et de l'appareil de Golgi sont nécessaires durant ce processus (Watanabe et *al.,* 2005). Ces changements sont principalement initiés par la GTPase Cdc42. En effet, Cdc42 est rapidement recruté et activé à l'avant de la cellule et l'inhibition de son activité altère la morphologie des cellules polarisées ainsi que la réorientation de l'appareil de Golgi et du centrosome (Etienne-Manneville & Hall, 2002). Dans sa conformation active, Cdc42 interagit avec le complexe protéique PAR6-PAR3-aPKC (atypique Protéine Kinase C) afin de l'activer et de réguler la localisation du centrosome (Etienne-Manneville & Hall, 2001). Plus récemment, la protéine FAK a également été décrite pour interagir de manière transitoire avec la dynéine aux FAs situées à l'avant de la cellule, et ce, afin d'exercer les forces de traction sur les microtubules nécessaire au déplacement du centrosome (Fructuoso et *al.,* 2019).

Par la suite, la cellule entreprend de former des protrusions sous le contrôle de la polymérisation de l'actine. Les filaments d'actine assemblés sont eux-mêmes polarisés et présentent une extrémité « barbelée » à croissance rapide ainsi qu'une extrémité « pointue » à croissance lente. Les protrusions peuvent être soit des filipodes dont la fonction est d'explorer l'environnement, soit des lamellipodes qui forment une large structure sur laquelle se base la cellule pour aller de l'avant (Ridley et *al.,* 2003).

2. Les adhérences focales

2.1. Formation des adhérences focales

Afin de générer les forces de traction nécessaires au déplacement de la cellule, les lamellipodes interagissent et adhèrent à la MEC au niveau de structures d'ancrages, les adhérences focales **(Figure 9)**. Ces structures sont initiées par l'activation et par l'accumulation de récepteurs transmembranaires, les intégrines (Alexandrova et *al.,* 2008 ; Choi et *al.,* 2008). Ces protéines possèdent un domaine extracellulaire ainsi qu'une queue cytoplasmique capable de lier respectivement les constituants de la MEC et des ligands intracellulaires afin de transmettre de manière bidirectionnelle des forces mécaniques et des signaux biochimiques à travers la membrane plasmique. Les intégrines forment ainsi un lien physique entre le cytosquelette d'actine et la MEC (Geiger et al., 2001). Les intégrines αvβ3 et α5β1, liant respectivement la vitronectine et la fibronectine, ont été décrites pour initier la formation des adhérences focales en recrutant séquentiellement des protéines adaptatrices, le cytosquelette d'actine et des protéines de signalisation.

L'observation microscopique de ces structures d'adhérence couplée à l'expression de protéines fluorescentes a mis en évidence que certains composants sont recrutés directement aux adhérences focales tandis que d'autres forment au préalable des complexes protéiques puis sont recrutés (Kirchner et *al.,* 2003 ; Zaidel-Bar et *al.,* 2003). Bien que la cinétique de recrutement des partenaires ne soit pas clairement établie, il est admis que des protéines régulant le cytosquelette d'actine comme la taline et la paxilline sont rapidement recrutées dans les adhérences focales (Vicente-Manzanares et *al.,* 2009). Il a notamment été démontré que la délétion des talines 1 et 2 empêche la formation des structures d'adhérence démontrant un rôle central de ces protéines (Zhang et *al.,* 2008). En effet, outre le fait de stabiliser les adhérences focales en faisant l'intermédiaire entre les filaments d'actine et le domaine cytoplasmique des intégrines, les talines sont capables de stimuler l'activation des intégrines en interagissant avec

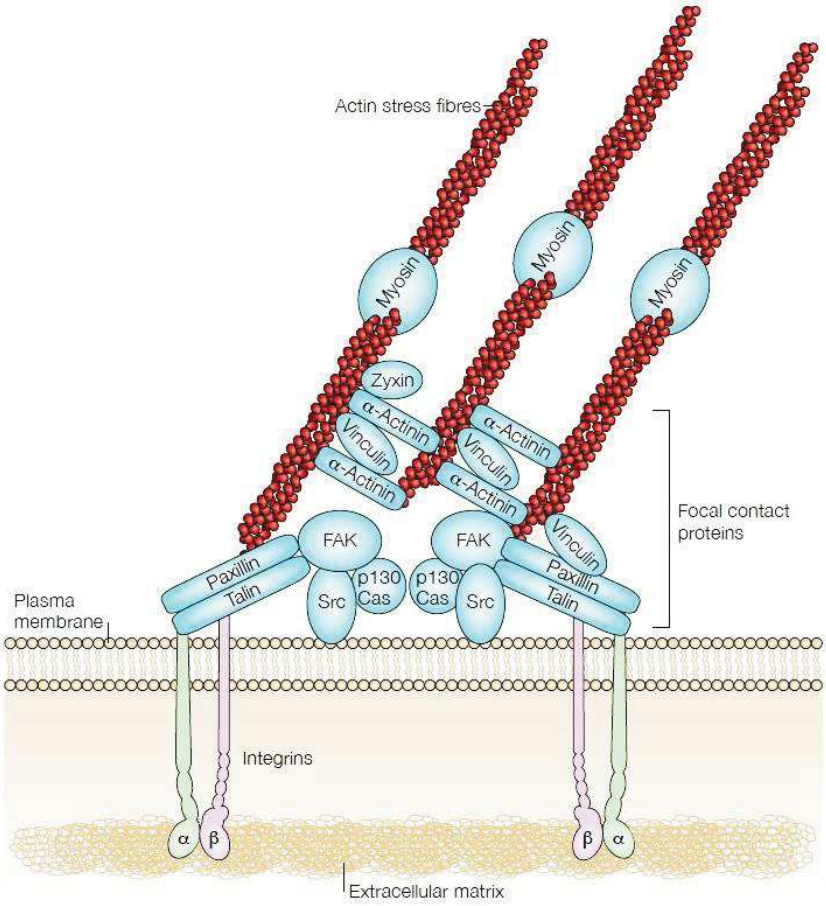


Figure 9 : L'architecture des adhérences focales. L'adhérence des cellules à la MEC par le biais des intégrines conduit à l'activation et au recrutement de nombreux partenaires intracellulaires à la membrane plasmique. A ce jour, plusieurs centaines de protéines, dont seules les principales sont représentées sur ce schéma, ont été identifiées dans les adhérences focales. Adapté de Mitra et *al.,* 2005

les kindline 2 et 3 (Ma et *al.,* 2008 ; Montanez et *al.,* 2008 ; Moser et *al.,* 2008). D'un autre côté, par mutagénèse dirigée, il a été démontré que la phosphorylation des résidus tyrosines Y31 et Y118 de la paxilline favorise la formation des FAs (Zaidel-Bar et *al.,* 2006). Bien que le mécanisme de recrutement de la paxilline soit encore obscur, il a été démontré que la phosphorylation des résidus Y31 et Y118 n'en est pas responsable (Zaidel-Bar et *al.,* 2006). En revanche les motifs de liaison protéine-protéine en doigt de zinc LIM2 et LIM3 sont indispensables à sa localisation aux FAs (Brown et *al.,* 1996 ; Lopez-Colomé et *al.,* 2017) **(Figure 10)**. Des résultats suggèrent que l'interaction des domaines LIM2 et LIM3 de la paxilline avec la phosphatase cytosolique PTP-PEST pourrait en être la cause. En effet, l'interaction de ces deux protéines favoriserait l'accumulation de la phosphatase aux FAs afin qu'elle puisse déphosphoryler son principal substrat, la protéine p130Cas, et ainsi réguler la dynamique de l'actine (Turner, 2000). De plus, la paxilline comporte cinq domaines LD (motifs

riches en leucine) lui permettant d'interagir et de recruter dans les FAs des protéines structurales telles que la vinculine ainsi que des protéines de signalisation telles que FAK et Src (Brown et *al.,* 1998 ; Turner et *al.,* 1990). Il a notamment été démontré que l'interaction de la paxilline avec le complexe FAK-Src conduit à la phosphorylation de ses sites Y31 et Y118 à l'origine de son activation. Une fois activée, la paxilline régule alors la formation des FAs en interagissant avec les RhoGTPases ainsi qu'avec la protéine adaptatrice Crk (Lopez-Colomé et *al.,* 2017 ; Ma et *al.,* 2018 ; Turner, 2000). Le recrutement de ces partenaires et l'activation de tyrosines kinases telles que FAK induit la polymérisation de l'actine et le développement des structures d'adhérence (Parsons et *al.,* 2010 ; Zhai et *al.,* 2003). En effet, la formation des FAs est étroitement liée à la polymérisation de l'actine sous le contrôle des RhoGTPases et du complexe Arp2/3 qui est recruté par la vinculine durant les phases initiales d'assemblage des structures (Alexandrova et *al.,* 2008 ; Choi et *al.,* 2008 ; DeMali et *al.,* 2002).

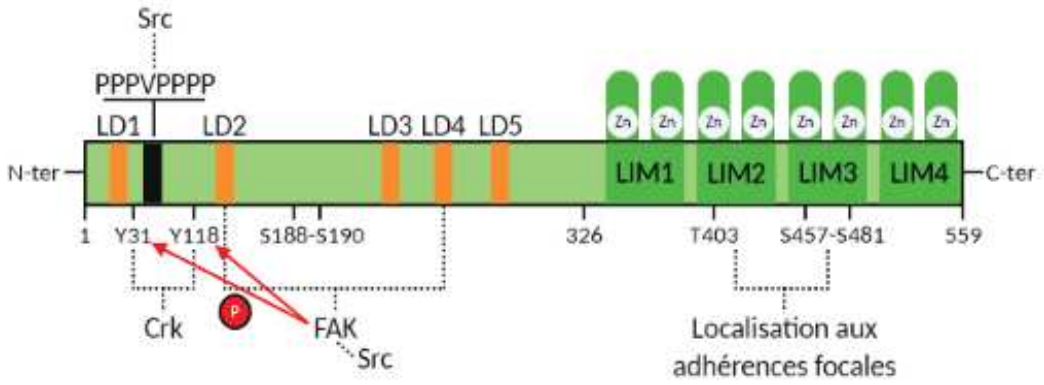


Figure 10 : La structure de la paxilline. La paxilline est constituée en N-terminal de cinq domaines riches en leucine (LD) ainsi que d'une région riche en proline permettant l'interaction avec de nombreuses protéines parmi lesquelles on retrouve FAK, Src et Crk. La liaison de FAK aux domaines LD2 et LD4 de la paxilline induit son activation. La région C-terminal comprend, quant à elle, quatre domaines en doigt de zinc (LIM) impliqués dans l'ancrage de la protéine à la membrane plasmique ainsi que dans son recrutement aux FAs où elle est essentielle au turn-over des structures pendant la migration.

2.2. La génération des forces contractiles

Des forces de traction sont ensuite générées depuis ces structures d'adhérence et à travers le cytosquelette d'actine qui agissent telles des sondes mécaniques transmettant l'information de la MEC vers l'intérieur de la cellule et modifiant les dynamiques du cytosquelette d'actine (Galbraith et *al.,* 2002 ; Lauffenburger & Horwitz, 1996). Les forces exercées aux FAs résultent de l'interaction de la myosine II avec les filaments d'actine formés dans ces structures. En effet l'inhibition de la myosine II n'altère pas la formation des FAs mais prévient la génération des

forces de tractions (Choi et *al.,* 2008 ; Vicente-Manzanares et *al.,* 2007). L'activité de la myosine II est dépendante de l'état de phosphorylation des chaines légères de myosines (MLC) qui elle-même peut être activée par la *Myosin Light Chain Kinase* (MLCK) et par la Rho-kinase (ROCK), ou encore réprimée par la MLC phosphatase. Il a également été démontré que l'interaction de la MLCK avec le complexe calcium-calmoduline active la myosine II et génère une contraction (Katoh et *al.,* 2001). Enfin, la Rho kinase augmente l'activité de la MLC en la phosphorylant directement ou en inactivant le principal régulateur négatif des MLC, la myosine phosphatase (MLCP).

2.3. Le désassemblage des adhérences focales

L'équilibre entre la formation et le désassemblage des sites d'adhérences, également appelé *turn-over*, est un processus nécessaire pour une migration efficace des cellules (Broussard et *al.,* 2008). A l'avant de la cellule, le désassemblage est associé à la formation de nouvelles structures d'adhérence qui vont tracter la cellule tandis qu'à l'arrière le désassemblage des FAs permet la rétractation du corps cellulaire. Certains travaux ont notamment démontré l'importance des phosphatases, des kinases et des microtubules dans le processus de dissociation des FAs.

Les microtubules ont été décrits pour libérer localement la tension cellulaire et ainsi favoriser le désassemblage des FA. Une fois localisés dans ces structures, les microtubules peuvent recruter la protéine kinase Arg afin d'inhiber Rho par le biais de p190RhoGAP (Peacock et *al.,* 2007). La délétion de la protéine Arg est d'ailleurs corrélée avec une inhibition du *turn-over* des FAs (Broussard et *al.,* 2008). Les microtubules favorisent également l'endocytose des intégrines dans ces complexes dépendamment de la dynamine et des clathrines (Ezratty et *al.,* 2005 ; Ezratty et *al.,* 2009). De plus, les microtubules activent la protéolyse des molécules d'adhérences tels que la taline, FAK et la paxilline par les calpaïnes libérant ainsi la tension cellulaire (Bhatt et *al.,* 2002 ; Franco & Huttenlocher, 2005). La protéine kinase FAK est également essentielle au *turn-over* de ces structures. En effet, il a été démontré que des fibroblastes n'exprimant pas cette protéine voient leurs sites d'adhérence augmenter de taille, et leur migration ralentir par rapport aux fibroblastes sauvages (Webb et al., 2002). Les mécanismes précis par lesquels FAK régule le *turn-over* des FAs seront détaillés ultérieurement dans la partie D - IV- 5.

3. Les invadopodes

3.1. Découverte et observations des invadopodes

Les invadopodes ont été observés pour la première fois en 1980 dans des fibroblastes provenant d'embryons de poulet transformés par le virus du sarcome de Rous (rétrovirus exprimant l'oncogène v-Src) (Chen, 1989 ; David-Pfeuty & Singer, 1980 ; Tarone et *al.,* 1985). La transformation de ces cellules induit une réorganisation des protéines du cytosquelette d'actine telles que la vinculine et l'α-actinine, initialement présentes au niveau des FAs, pour former des amas circulaires appelés « rosettes » (David-Pfeuty & Singer, 1980). Ces structures enrichies en filaments d'actine et en protéines à résidus tyrosine phosphorylée (Tarone et *al.,* 1985), sont des sites d'adhérence cellulaire capables de dégrader la matrice extracellulaire ou des substrats matriciels artificiels (Chen, 1989 ; Mueller & Chen, 1991). La notion d'invadopode a émergé progressivement avec l'observation de ces structures dans d'autres modèles cellulaires tels que des lignées de carcinomes mammaires (Bowden et *al.,* 1999).

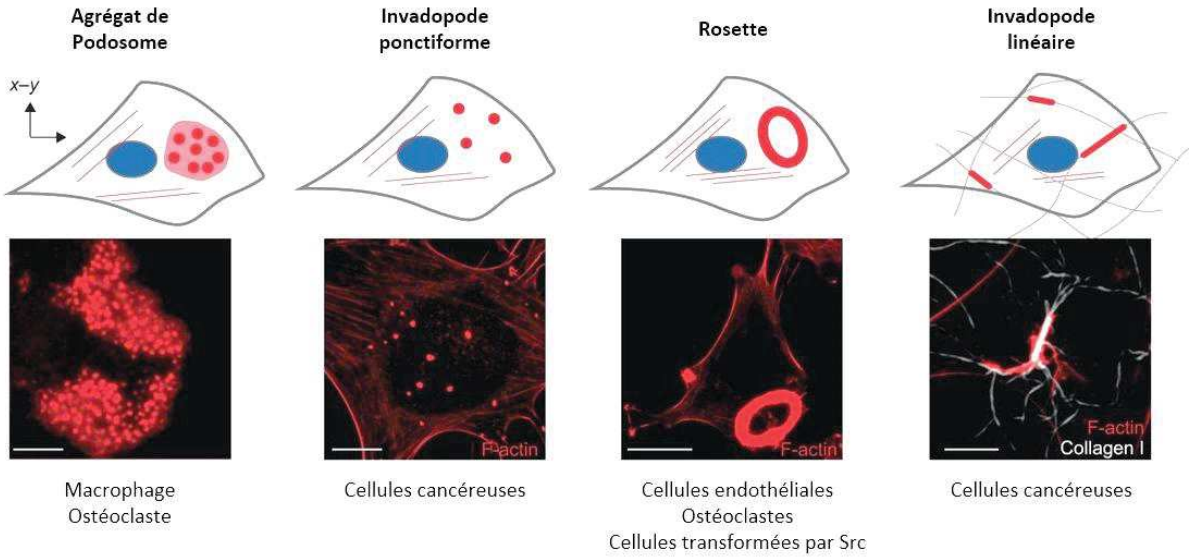


Figure 11 : Structures des podosomes et des invadopodes. Représentation schématique et image de microscopie confocale des structures d'invasion avec un marquage de l'actine (rouge) et des fibrilles de collagène (blanc). Les podosomes et les invadopodes sont des structures riches en actine qui se forment sur la membrane ventrale de la cellule. Selon le type de cellulaire, la matrice et les stimuli fournis, les podosomes et les invadopodes peuvent former des structures individuelles ponctiformes ou linéaires ou des rosettes. Adapté de Di Martino et *al.,* 2016.

Il existe d'autres protrusions membranaires capables de dégrader les constituants de la matrice extracellulaire, les podosomes (Linder, 2007 ; Linder et *al.,* 2011) **(Figure 11).** Contrairement aux invadopodes qui se forment uniquement dans les cellules cancéreuses (Murphy & Courtneidge, 2011), les cellules formant des podosomes sont typiquement des cellules saines

telles que les monocytes/macrophages, les ostéoclastes, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales (Linder *et al*., 2011). Bien que très proche d'un point de vue structurel, les podosomes et les invadopodes présentent quelques différences fonctionnelles (Linder, 2007). Alors que les podosomes présentent un diamètre et une profondeur compris entre 0,5 et 2 µm, les invadopodes sont plus profonds : un diamètre de 0,5-2 µm pour une profondeur supérieure à 2 µm (Murphy & Courtneidge, 2011). De même, les podosomes présentent une dynamique rapide (durée de vie comprise entre 2 et 12 min) tandis que les invadopodes ont une persistance plus élevée (environ 1 h). De ce fait, les podosomes dégradent la MEC sur une grande superficie mais de manière superficielle tandis que les invadopodes réalisent une dégradation en profondeur mais localisée. A ce jour, deux types distincts d'invadopodes ont été observés dans les cellules cancéreuses : les invadopodes ponctiformes et les invadopodes linéaires **(Figure 11)**. De constitution et de fonction similaires, ces invadopodes diffèrent par leur support. Tandis que les invadopodes linéaires sont observés dans des cellules cancéreuses cultivées sur du collagène de type IV, de la laminine, de la fibronectine et de la vitronectine, les invadopodes linéaires se forment uniquement sur des fibrilles de collagène de type I (Juin et *al.,* 2012) suite à l'activation de DDR1 et de Cdc42 (Juin et *al.,* 2014).

De nombreuses études ont porté sur la caractérisation de ces structures dans des modèles de monocouche cellulaire déposée sur un substrat de verre. Il a notamment été démontré par microscopie électronique à transmission que les invadopodes sont localisés à proximité du noyau et du golgi des cellules (Tolde et *al.,* 2010 ; Revach et *al.,* 2015). Bien que ces modèles permettent d'identifier les protéines impliquées dans les invadopodes, il est impossible d'étudier l'organisation de ces structures dans ces conditions où l'extension de l'invadopode est bloquée par le verre. Schoumacher et son équipe ont donc élaboré un test d'invasion dans des inserts de culture *Transwell* coatés avec une fine couche de substrat fluorescent pour mimer la membrane basale. Les pores de la membrane étant suffisamment grand pour permettre la formation d'un invadopode mais trop petit pour permettre le passage des cellules, ce modèle a permis de visualiser la formation et l'élongation des invadopodes *in vitro* (Schoumacher et *al.,* 2010). Ces dernières années, le développement de nouvelles techniques d'imageries a permis l'identification des invadopodes et des podosomes dans des modèles plus complexes. Par exemple, Goertzen et son équipe ont pu mesurer l'activité de dégradation des invadopodes dans un modèle d'invasion 3D en sphéroïde en incorporant un substrat fluorogénique dans la matrice extracellulaire. Ils ont également observé ces structures en générant des coupes de paraffine du sphéroïde et en combinant un marquage à l'hématoxyline et à l'éosine avec des techniques de

microscopie confocale et super résolutive (Goertzen et *al.,* 2018). Le développement des techniques d'imagerie intravitale de haute résolution a également permis de visualiser le processus d'invasion dans des modèles de poisson-zèbre, de poulet, de ver et de souris (Condeelis & Segall, 2003 ; Sahai et *al.,* 2005 ; Wolf et *al.,* 2003). Afin de confirmer l'identification d'invadopodes ou de podosomes *in vivo*, un minimum de deux marqueurs protéiques caractéristiques de ces structures est nécessaire (Di Martino et *al.,* 2014). Dans ces modèles, la formation des invadopodes ou des podosomes est observable lors du passage des cellules au travers de la membrane basale. Les podosomes ont été observées pour la première fois *in vivo* en 2010 par microscopie immuno-électronique dans des cellules musculaires lisses vasculaires délétées du micro-RNAs-143(145) (Quintavalle et *al.,* 2010). Une autre étude a observé l'invasion des cellules épithéliales dans un modèle d'intestin de poisson-zèbre développant une altération de l'architecture intestinale suite à une mutation de la chaine lourde de la myosine 11 (Seiler et *al.,* 2012). Utilisant des techniques de vidéo-microscopie, ils ont observé la formation de protrusions riches en actine et en protéines caractéristiques des podosomes dans les cellules épithéliales traversant la membrane basale. Ce mécanisme a également été mis en évidence dans les cellules épithéliales de C-elegans (Hagedorn et *al.,* 2013) **(Figure 12)**. De plus, des protrusions comportant plusieurs protéines caractéristiques des invadopodes ont été décrites pour dégrader les fibres de collagène de type I dans des xénogreffes

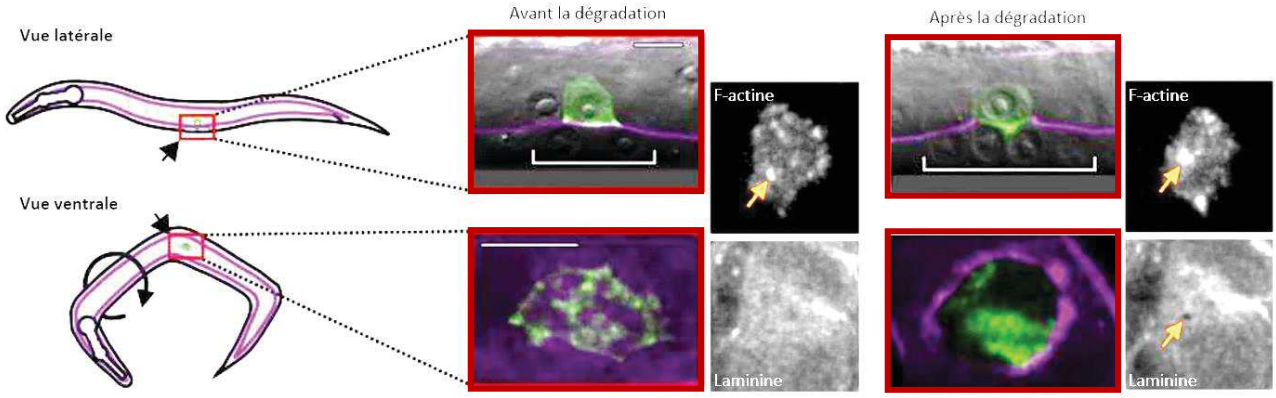


Figure 12 : Visualisation des invadopodes dans leur environnement. Suivi par imagerie confocale de l'invasion d'une cellule cancéreuse, dont l'actine est marquée (en vert), à travers la lame basale de C-elegans. La dégradation de la lamine fluorescente (en violet) est observée par une perte du signal fluorescent. Les encadrés rouges représentent la vue latérale ou la vue ventrale de l'invasion par superposition des marquages fluorescents et du contraste de phase. En parallèle, les petits encadrés représentent la vue ventrale de l'actine ou de la laminine avant et après dégradation par les invadopodes. Avant la dégradation, une accumulation d'actine (flèche) est déjà observée dans la cellule cancéreuse. Celle-ci est par la suite colocalisée avec une perte du signal fluorescent de la laminine (flèche) durant la transmigration de la cellule cancéreuse. Adapté de Hagedorn et *al.,* 2013.

de cellules cancéreuses humaines chez la souris (Gligorijevic et *al.,* 2014). Enfin, plus récemment et pour la première fois, ces structures de dégradation ont été mises en évidence dans des coupes de paraffines de tumeurs humaines de pancréas par marquage immunofluorescent (Chen et *al.,* 2019).

3.2. Caractérisation moléculaire des invadopodes

Au cours d'un test d'invasion, les invadopodes et les podosomes forment des protrusions dans la matrice qu'il est possible d'isoler en enlevant le corps cellulaire à l'aide d'un grattoir. De nombreuses études ont porté sur la caractérisation des composants moléculaires de ces structures en étudiant les fractions subcellulaires obtenues suite à cet isolement. En effet, la réalisation d'électrophorèse bi-dimensionnelle quantitative (2D-DIGE) a permis d'identifier 58 protéines enrichies dans les fractions membranaires des invadopodes des cellules cancéreuses humaines de mélanome (Attanasio et *al.,* 2011). De nombreuses protéines du cytosquelette et ses régulateurs (actine, tubuline, Arp2/3) étaient d'ores et déjà connues mais de nouvelles enzymes métaboliques aux fonctions encore inconnues dans la biogénèse des invadopodes furent également identifiées. Pour pallier la faible sensibilité de cette méthode, une autre étude a combiné le fractionnement cellulaire avec une méthode quantitative de LC-MS/MS pour étudier les podosomes des cellules de macrophage humain (Cervero et *al.,* 2012). Suite à leurs mesures, Cervero et son équipe ont comparé les fractions subcellulaires des membranes ventrales des macrophages formant des podosomes avec les fractions des cellules traitées au PP2, un inhibiteur de Src altérant la formation des structures d'invasion. Ils ont ainsi identifié 203 protéines enrichies dans les podosomes dont 170 nouvelles. Cependant les invadopodes et les podosomes sont particulièrement difficiles à isoler car la F-actine et d'autres composants moléculaires de ces structures sont en commun avec de nombreuses autres structures cellulaires. Par exemple, les FAs qui sont associées avec les fibres de stress d'actine partagent des éléments moléculaires tels que la protéine Src et la paxilline avec les invadopodes. Pour pallier cette difficulté, Ezzoukhry et son équipe ont développé une méthode combinant la microdissection par capture laser avec la spectrométrie de masse afin de caractériser les composants moléculaires des rosettes sur des fibroblastes transformés par Src fixés (Ezzoukhry et *al.,* 2018). Cette méthode innovante permet d'extraire de manière automatisée les rosettes, identifiables grâce à un marquage fluorescent de l'actine, tout en limitant les contaminations protéiques exogènes, grâce à un marquage des acides aminés avec un isotope stable. Suite à l'extraction des protéines, la méthode de LC-MS/MS a conduit à l'identification de 570 protéines dont 12 en commun avec Attanasio et *al.,* (2011) et 71 avec Cervero et *al.,* (2012).

Une autre approche envisagée pour définir les composants moléculaires des invadopodes a été l'étude des interactions protéine-protéine. La réalisation de co-immunopréciptation sur les fractions subcellulaires obtenus suite à l'isolement des invadopodes a permis de caractériser de nombreux complexes protéiques tels que le complexe cortactine-paxilline-PKC (Bowden et *al.,* 1999). Plus récemment, de nouvelles méthodes ont été développées en se basant sur la purification par affinité de complexes protéiques connus pour être localisés et impliqués dans la biogénèse des invadopodes. Suite à l'extraction, l'identification des complexes protéiques est réalisée par LC-MS/MS. Cette méthode a notamment permis d'identifier un certain nombre de protéines liant la cortactine, l'une des protéines clé dans la formation des invadopodes (Grigera et *al.,* 2012) ou encore des protéines liant TKS4, une protéine impliquée dans le transport vésiculaire et dans l'activité protéolytique des invadopodes (Havrylov & Park, 2015). Contrairement aux précédentes techniques qui étudient l'interactome après lyse cellulaire, une nouvelle méthode couplant la biotinylation et la spectrométrie de masse à caractériser l'interactome de TKS5 dans des cellules vivantes. Thuault et son équipe ont ainsi identifié 40 protéines interagissant directement avec la protéine d'intérêt même de façon transitoire (Thuault et *al.,* 2020). Toutefois, les protéines d'intérêts n'étant pas sélectives des invadopodes, il est nécessaire de vérifier que chaque partenaire protéique identifié soit localisé et impliqué dans la biogénèse de l'invadopode par immunomarquage et à l'aide de siRNA.

3.3. Les principaux composants moléculaires des invadopodes

i. Les récepteurs transmembranaires

Les intégrines : Ce sont des récepteurs transmembranaires qui facilitent l'adhérence cellulaire et assurent la transduction de signaux extracellulaires vers la cellule. Elles possèdent une structure hétérodimérique avec une chaîne α et une chaîne β sous forme inactive et qui nécessitent des signaux intracellulaires pour enclencher des changements conformationnels et permettre la liaison du ligand. Les intégrines sont capables de lier de nombreux constituants de la MEC dont le collagène, la fibronectine, la vitronectine et la laminine **(Figure 13)**. Suite à son activation, la queue cytoplasmique de l'intégrine se lie à des protéines adaptatrices et au cytosquelette d'actine afin de transmettre les signaux extracellulaires vers le cytoplasme. De nombreuses études ont localisé les sous-unités α2, α3, α5, α6, β1 et β3 dans les invadopodes et ont montré leurs implications dans la formation de ces structures. Dans le mélanome, α3β1 interagit avec la séprase, également appelée protéine d'activation des fibroblastes, au niveau de ces structures (Mueller et *al.,* 1999). De même, les interactions entre l'intégrine α5β1 et la

fibronectine (Seftor et *al.,* 1993) et entre α6β1 et la laminine (Nakahara et *al.,* 1996) favorisent l'activité des invadopodes. Enfin, il a été démontré que l'inhibition des sous-unités d'intégrine α2 et β1 à l'aide d'anticorps inhibe la formation et l'activité des invadopodes dans le cancer du sein (Artym et *al.,* 2015).

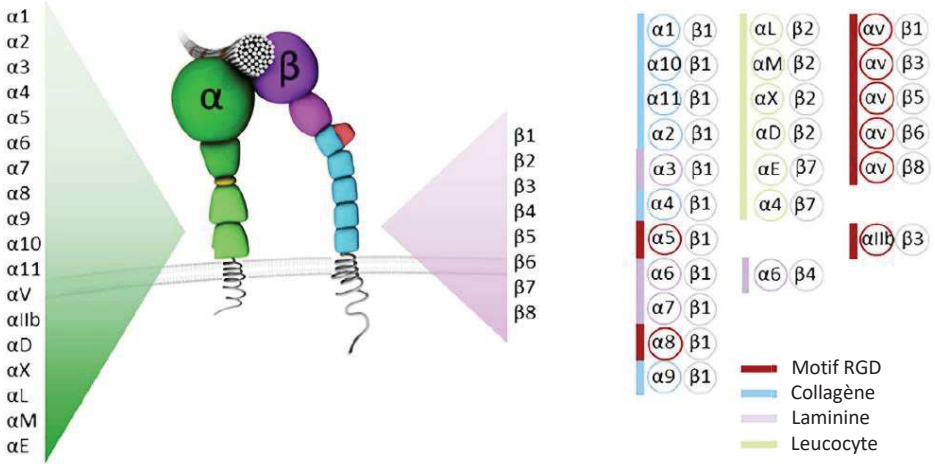


Figure 13 : La structure des intégrines. Les intégrines sont des récepteurs transmembranaire constitués d'une sous-unité α et d'une sous-unité β s'associant pour former 24 hétérodimères distincts que l'on peut regrouper en fonction de leur spécificité du ligand. Tandis que certaines intégrines ne se trouvent que sur les globules blancs (vert), d'autres intégrines se lient au collagène (bleu), à la laminine (violet) ou encore à la séquence tripeptidique Arg-Gly-Asp (RGD) (rouge) que l'on retrouve dans les protéines de la MEC comme la fibronectine. Adapté de Arias-Mejias et *al.,* 2020

<u>Les Récepteurs à activités tyrosines kinases (RTK)</u> : Les RTK sont des récepteurs transmembranaires capables de lier des facteurs de croissance, des cytokines et des hormones présents dans le milieu extracellulaire. La liaison des ligands entraine la dimérisation et l'activation du domaine kinase des récepteurs débouchant sur l'activation de diverses protéines cytoplasmiques. Le facteur de croissance épidermique (EGF) (Mader et *al.,* 2011 ; Yamaguchi et *al.,* 2005), le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) (Rajadurai et *al.,* 2012), le facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF) (Lucas et *al.,* 2010) ainsi que le facteur de croissance de transformation beta (TGFβ) (Mandal et *al.,* 2008 ; Pignatelli et *al.,* 2012) constituent des signaux extracellulaires initiateurs de la formation des invadopodes (Buccione et *al.,* 2009 ; Hoshino et *al.,* 2013 ; Murphy & Courtneidge, 2011). L'activation de ces récepteurs conduit notamment à l'activation de la protéine kinase Src, de la PI3K et des RhoGTPases, protéines indispensables à la formation des invadopodes (Beaty & Condeelis, 2014 ; Hauck et *al.,* 2002 ; Mader et *al.,* 2011 ; Murphy & Courtneidge, 2011).

CD44 : CD44 est une glycoprotéine de surface impliquée dans l'adhérence cellulaire et la formation des invadopodes par ses interactions avec l'acide hyaluronique, le collagène de type I, de type IV, la laminine et la fibronectine (McFarlane et *al.,* 2015). En effet, CD44 s'accumule dans les invadopodes pour former un complexe avec MMP9 (Lagarrigue et *al.,* 2010) ou pour interagir avec la fibronectine afin d'activer l'intégrine α5β1 et de favoriser la maturation des structures (Beaty et *al.,* 2013 ; McFarlane et *al.,* 2015). Enfin, une isoforme spécifique de CD44 est connue pour favoriser la maturation des invadopodes en augmentant l'activité de la cortactine et des MMP (Zhao et *al.,* 2016b).

ii. Les lipides

Dans les invadopodes, la membrane plasmique est enrichie en domaines lipidiques de cholestérol organisés appelés « radeaux lipidiques » (Caldieri et *al.,* 2009 ; Yamaguchi et *al.,* 2009). La suppression de ces domaines en cholestérol altère la formation des radeaux et inhibe la formation et l'activité protéolytique des invadopodes (Caldieri et *al.,* 2009). Ces domaines lipides sont également enrichis en phosphoinositides parmi lesquels on retrouve PI(3,4)P2, PI(4,5)P2, et PI(3,4,5)P3 (Saengsawang et *al.,* 2013 ; Yamaguchi & Oikawa, 2010). Ces lipides membranaires sont connus pour contrôler le trafic intracellulaire, l'arrangement du cytosquelette et l'organisation de la membrane plasmique. L'utilisation de drogues inhibitrices des PI3K tels que la Wortmannin et le LY294002, ont permis de mettre en évidence le rôle des PI3K dans la formation des invadopodes (Chellaiah et *al.,* 2001 ; Walker et *al.,* 2007) et notamment des PI3Kα et β. En effet, la mutation ou l'inhibition des sous unités p110α ou p110β inhibe la formation et l'activité des invadopodes tandis que l'inhibition des autres isoformes n'affecte pas ces structures (Erami et *al.,* 2019 ; Yamaguchi *et al.*, 2011). Il a été démontré que les intégrines β1 initient le complexe PI3Kβ-SHIP2 (Erami et *al.,* 2019 ; Sharma et *al.,* 2013) pour former le PI(3,4)P2 à la membrane des invadopodes et permettre le recrutement de protéines présentant un domaine d'homologie à la plekstrin (domaine PH) tels que N-WASP, la cofiline et la dynamine-2 afin de favoriser la polymérisation de l'actine (Caldieri et *al.,* 2009 ; Rivera et *al.,* 2009) **(Figure 14)**. Le PI(3,4)P2 a également été démontré pour favoriser le recrutement de TKS5 et de Grb2 afin de favoriser la formation de ces structures. Par ailleurs, la délétion ou la mutation de PTEN (*Phosphatase And Tensin Homolog*) dont la principale fonction est d'être un régulateur négatif de la voie de PI3K en convertissant le PI(3,4,5)P3 en PI(4,5)P2 (Worby & Dixon, 2014) induit une accumulation de PI(3,4,5)P3 et favorise la formation et l'activité des invadopodes *in vitro* et *in vivo* (Malek et *al.,* 2017).

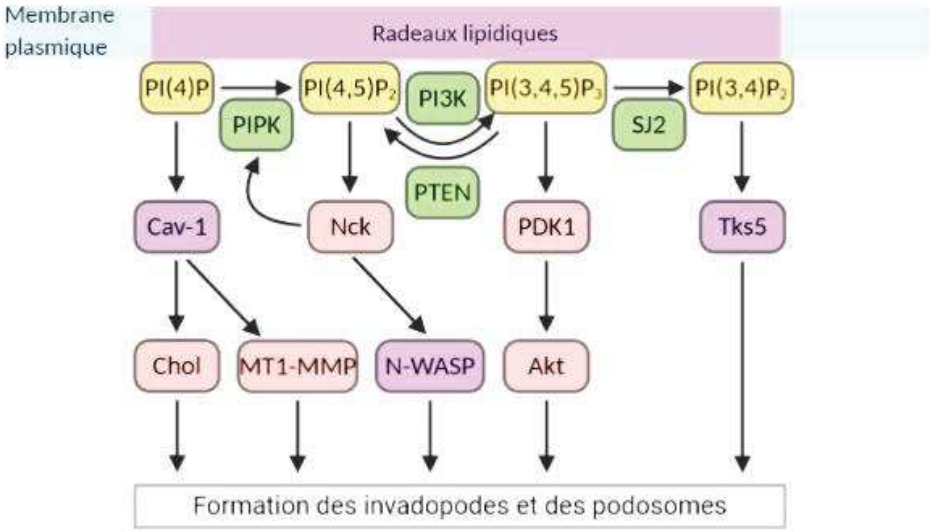


Figure 14 : Le rôle des lipides dans la formation des invadopodes. Les radeaux lipidiques permettent le recrutement de nombreux composants des invadopodes. L'enrichissement de la cavéoline 1 (Cav-1) permet le transport du cholestérol et de la MT1-MMP à la membrane plasmique de ces structures. Le PI(4,5)P2 généré par la PIPK permet d'activer localement plusieurs composants des invadopodes, dont N-WASP, et sert également de substrat pour la PI3K générant ainsi du PI(3,4,5)P3, qui à son tour régule l'activité d'Akt. La Nck est, quant à elle, nécessaire à la polymérisation de l'actine induite par N-WASP et favorise l'enrichissement local de PI(4,5)P2 en stimulant la PIPK. De plus, l'action de la phosphatase SJ2 (ou synaptojanine-2) sur la PI(3,4,5)P3 permet la production de PI(3,4)P2 afin de recruter TKS5 à la membrane. Enfin, la phosphatase PTEN est fréquemment mutée dans les cancers afin de permettre l'accumulation des lipides à la membrane. Adapté de Yamaguchi & Oikawa, 2010.

iii. L'actine et ses régulateurs

La polymérisation de l'actine est initiée par le processus de nucléation de l'actine. Les monomères d'actine globulaire (actine-G) vont s'assembler et former un filament d'actine (actine-F) asymétrique. La polymérisation de l'actine va nécessiter des monomères d'actine-G couplés à de l'ATP. L'assemblage des monomères entre eux est facilité à l'extrémité (+) ou «*barbed end*» **(Figure 15)**. En revanche, l'hydrolyse de l'ATP en ADP qui favorise le désassemblage des monomères d'actine G à lieu au niveau de l'extrémité (-) ou «*pointed end*» du filament d'actine. Les filaments d'actine se polymérisent à la base de l'invadopode, induisant par la même l'extension de la protrusion, et se dépolymérisent à leur sommet (Schoumacher et *al.,* 2011). La dynamique de polymérisation et de dépolymérisation des filaments d'actine régule le dynamisme des invadopodes.

Le complexe Arp2/3-N-WASP : Le complexe Arp2/3 est constitué de 7 sous-unités (Arp2, Arp3, ARPC1-5) et facilite la formation d'un réseau arborescent à partir d'un filament d'actine préexistante. Possédant une très faible activité de nucléation, le complexe Arp2/3 nécessite une activation par des protéines adaptatrices telles que N-WASP **(Figure 16)**. Cette protéine, de la famille WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*), a été identifiée comme le principal activeur

du complexe Arp2/3 dans les invadopodes. L'expression d'une forme tronquée de la protéine N-WASP dans des cellules ou la délétion de cette protéine altère la formation des invadopodes (Mizutani et *al.,* 2002 ; Yamaguchi et *al.,* 2005). La localisation de N-WASP à la membrane plasmique est régulée par les protéines adaptatrices telles que Grb2, Nck (Kempiak et *al.,* 2005) ainsi que par la cortactine (Oser et *al.,* 2009) qui sont observées dans les invadopodes.

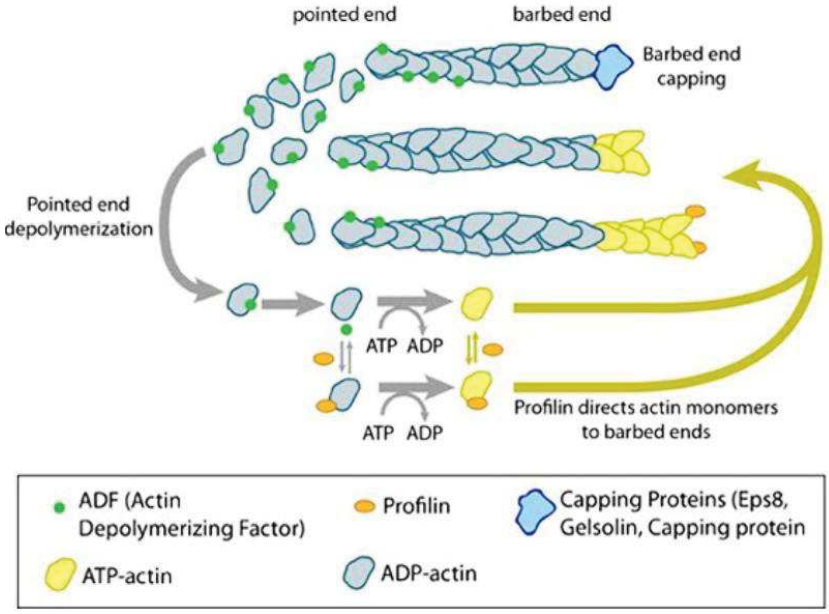


Figure 15 : La dynamique de l'actine. L'élongation du filament d'actine se fait par l'extrémité + (*barbed end*) et se termine par la liaison d'une protéine de coiffe (*capping proteins*). Les filaments d'actine vieillissent suite à l'hydrolyse de l'ATP (changement de couleur) et des protéines tel que l'ADF/cofiline favorise la dissociation du phosphate, coupe les filaments d'ADP-actine et favorise la dissociation de l'ADP-actine au niveau des extrémités – (*pointed end*). La profiline catalyse, quant à elle, l'échange ADP-ATP, afin de renouveler le réservoir d'ATP-actine pour favoriser la croissance des extrémités + libres. Adapté de mechanobio.info

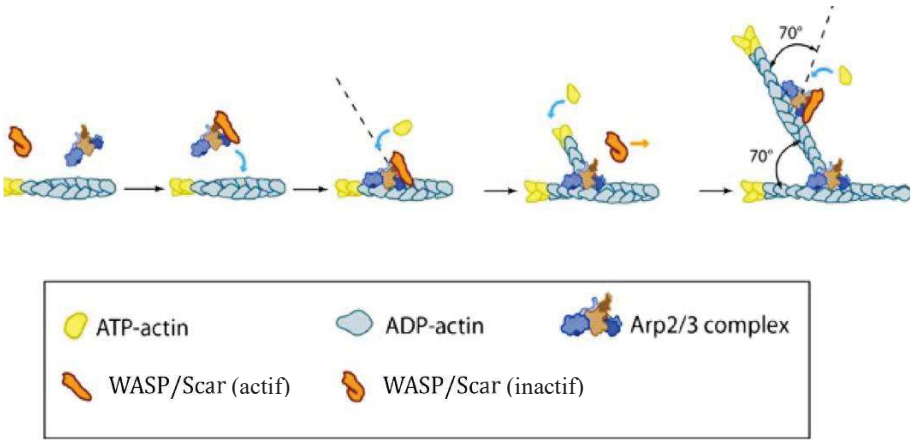


Figure 16 : Le complexe N-WASP Arp2/3. Une fois activé, N-WASP interagit avec le complexe Arp2/3 qui s'associe à un filament d'actine préexistant afin d'induire la nucléation de l'actine créant ainsi un nouveau filament avec une extrémité libre barbelée. Ce nouveau filament est orienté selon un angle de 70° par rapport au préexistant, avec le complexe Arp2/3 à la jonction de la branche. Adapté de mechanobio.info

Les Rho GTPases : Les Rho GTPases sont des petites protéines G impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine et dans de nombreux processus cellulaires tels que la motilité, la polarité cellulaire ou encore les invadopodes. Dans leurs conformations inactives, les Rho GTPases lient le GDP et sont stabilisées par les GDI (*Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors*). L'activation de ces protéines, par catalyse du GDP en GTP par les GEF (*Guanine Exchange Factors*), active des voies de signalisation sous-jacentes (Moon & Zheng, 2003 ; Rossman et *al.,* 2005). La protéine Cdc42 (*Cell Division Control Protein 42*) favorise la polymérisation de l'actine en activant la protéine N-WASP et la cortactine. De même, RhoC contrôle l'élongation des invadopodes en concentrant la polymérisation de l'actine par la cofiline au cœur de la structure (Bravo-Cordero et *al.,* 2011). Enfin, suite à son activation par les intégrines β1, p190RhoGAP est transporté aux invadopodes afin d'activer la protéine RhoA (Nakahara et *al.,* 1998). Cette petite protéine G coopère alors avec Cdc42 afin de favoriser l'exocytose des MMP aux invadopodes et d'accroître la dégradation de la matrice extracellulaire (Nakahara et *al.,* 1998 ; Sakurai-Yageta et *al.,* 2008). Contrairement aux autres RhoGTPases (RhoA, RhoC, Rac), la délétion ou l'inhibition de Cdc42 inhibe complètement la formation ou le dynamisme des invadopodes (Desmarais et *al.,* 2009 ; Yamaguchi et *al.,* 2005) suggérant un rôle crucial de cette protéine.

La Cortactine : Cette protéine est fondamentale à la formation et à l'activité des invadopodes. En effet, la surexpression de la cortactine dans des cellules tumorales augmente le potentiel migratoire et invasif des cellules (Clark et *al.,* 2007 ; Li et *al.,* 2001) tandis que sa délétion ou son inhibition par micro-injection d'anticorps bloquant empêche la formation des invadopodes ainsi que la dégradation de la matrice (Artym et *al.,* 2006 ; Bowden et *al.,* 1999 ; Desmarais et *al.,* 2009). La cortactine est une protéine d'échafaudage capable de se lier aux filaments d'actine et de les stabiliser à la suite de son activation par des tyrosines kinases ou des serines thréonines kinases telles que Src. La phosphorylation de ses sites Y421, Y466 et Y482 par Src favorise les processus de migration cellulaire et le remaniement de l'actine. La cortactine dispose à son extrémité N-terminal d'un domaine NTA capable de lier et d'activer le complexe Arp2/3 et, à son extrémité C-terminal d'un motif SH3 permettant l'interaction avec des protéines contenant des domaines PRD (*Prolin-Rich Domain*) tels que N-WASP. Par ailleurs, plusieurs modifications post-traductionnelles ont été démontrées pour favoriser le *turn-over* des filaments d'actine et l'activité des invadopodes. La protéine ERK est capable de phosphoryler les sites S405 et S418 de la cortactine afin d'accroître l'affinité de la protéine pour N-WASP et ainsi augmenter la polymérisation de l'actine (Yin et *al.,* 2017). Par ailleurs, l'activation de la

cortactine au niveau de la tyrosine Y421 permet le recrutement de la protéine NHE1 conduisant à une augmentation du pH intracellulaire, d'une dissociation du complexe cortactine-cofiline et au désassemblage des filaments (Yin et *al.,* 2017). Enfin la phosphorylation de la T24 de la cortactine par CK2α (*Casein kinase 2α*) inhibe le complexe cortactine-Arp2/3 et favorise la nucléation de l'actine (Markwell et *al.,* 2019). Bien que le complexe cortactine-Arp2/3 est essentiel à la formation et à l'activité des invadopodes, la dissociation du complexe suite à la phosphorylation de cette thréonine favorise également ces processus par un mécanisme encore méconnu.

iv. Les régulateurs de l'activité protéolytique

Src : La protéine kinase c-Src est l'une des 9 protéines kinases de la famille Src. Elle est constituée d'un domaine C-terminal, de 4 domaines SH (*Src Homology Domains* 1, 2, 3 et 4) et d'un domaine N-terminal (Guiet et *al.,* 2008). Dans sa conformation inactive, la protéine Src est localisée dans les régions périnucléaires et est phosphorylée sur son résidu Y527 (chez le poulet) ou Y530 (chez l'homme) situé dans le domaine C-terminal (Yamaguchi et *al.,* 1996). Sous l'effet de divers stimuli, la protéine Src subit un changement de conformation conduisant à son ouverture, à sa dimérisation et l'autophosphorylation de son site Y416 (chez le poulet) ou Y419 (chez l'homme). L'activation de Src conduit à sa translocation à la membrane plasmique où elle s'attache via ce domaine SH4 acylé et interagit avec divers partenaires (Sefton et *al.,* 1982) **(Figure 17)**.

Comme précisé précédemment, l'expression d'une forme constitutivement active de Src, ou v-Src, dans des cellules induit la formation d'invadopodes organisés en rosettes. En plus d'induire la formation des invadopodes, la voie de signalisation en aval de Src régule la maturation et la dissociation de ces structures. En effet, l'inhibition de Src avec des inhibiteurs pharmacologiques tels que le PP1, le PP2 et le SU6656 altère la formation et l'activité des invadopodes. De même, les cellules exprimant un mutant de Src inactif présentent moins d'invadopodes et sont moins invasives (Bowden et *al.,* 2006 ; Linder et *al.,* 2000 ; Cougoule et *al.,* 2005). A l'inverse, la réexpression ectopique d'un mutant constitutivement actif de Src dans ces cellules déplétées restaure la formation d'invadopodes (Hauck et *al.,* 2002). Il a été démontré que c-Src est impliquée dans la formation des invadopodes en stimulant la polymérisation de l'actine via la phosphorylation de la cortactine et de N-WASP (Tehrani et *al.,* 2006 ; Park et *al.,* 2005). Enfin, le recrutement et l'activation de Tks5 par Src semblent nécessaires à la maturation des invadopodes (Murphy & Courtneidge, 2011).

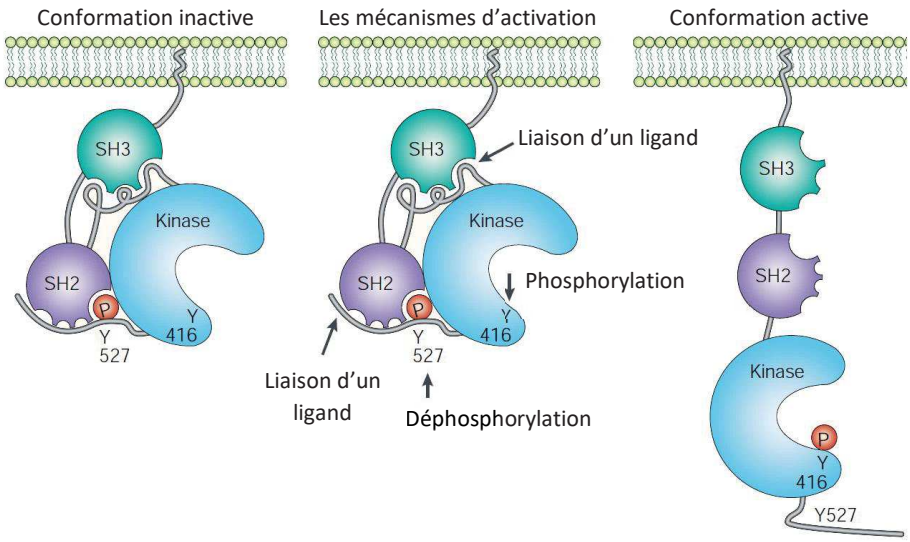


Figure 17 : Mécanisme d'activation de Src. Dans sa conformation inactive, la phosphorylation du résidu Y527 (chez le poulet) ou Y530 (chez l'homme) crée un site de liaison pour le domaine SH2 afin de maintenir la protéine dans une conformation inactive et de réduire les interactions protéiques. De même, l'interaction entre le domaine SH3 et le domaine kinase participe à la régulation négative de Src. La déphosphorylation de Y527 ou Y530 par des phosphatases telles que PTPα, SHP1 et PTP1B provoque un changement de conformation conduisant à l'ouverture de la protéine, à sa dimérisation et à l'autophosphorylation de son site Y416 (chez le poulet) ou Y419 (chez l'homme) afin d'aboutir à l'activation complète de Src. La dimérisation est médiée par une interaction entre le domaine N-terminal SH4 myristoylé d'un partenaire et le domaine kinase du second partenaire (Spassov et *al.,* 2018). De nombreuses protéines transmembranaires tels que l'EGFR et le PDGFR ainsi que l'interaction directe entre FAK ou p130Cas et les domaines SH2-SH3 de Src ont également été décrit pour favoriser l'activation de la protéine. Adapté de Martin, 2001.

<u>TKS5</u> : La protéine TKS5, également connue sous le nom de FISH et SH3PXD2A, est une protéine d'échafaudage localisée principalement dans les invadopodes. TKS5 intervient dans la stabilisation et maturation de ces structures et est considérée comme un marqueur d'activité protéolytique (Blouw et *al.,* 2015 ; Murphy & Courtneidge, 2011 ; Iizuka et *al.,* 2016). En effet, le marquage de cette protéine est couramment utilisé pour identifier les invadopodes par microscopie intravitale à haute résolution lors des processus d'intra et d'extravasation des cellules cancéreuses *in vivo* (Gligorijevic et *al.,* 2014 ; Leong et *al.,* 2014). La déplétion de Tks5 dans des cellules cancéreuses abolit la formation des invadopodes et la dégradation de la matrice extracellulaire (Seals et *al.,* 2005; Sharma et *al.,* 2013). A l'inverse, la réexpression ectopique de Tks5 dans ces cellules déplétées restaure leurs capacités dégradatives et invasives (Seals et *al.,* 2005; Sharma et *al.,* 2013). A ce jour, Src est le seul substrat connu de cette protéine cependant il est reporté que le récepteur à l'EGF participe au recrutement de Tks5 à la membrane plasmique. À la suite de son activation sur les Y552, Y558 et Y620, TK5 initie la

formation des invadopodes en rosettes en liant les phosphatidylinositols et la protéine adaptatrice Grb2 grâce à son domaine PX et ses domaines SH3 respectivement (Oikawa et *al.,* 2008). Par la suite, le suivi par vidéo-microscopie des invadopodes ponctiformes dans des cellules de carcinomes mammaires a suggéré que la cortactine, N-WASP, la cofiline et l'actine initient la formation des invadopodes et que l'interaction entre TKS5 et les phosphatidylinositols stabilisent les structures (Sharma et *al.,* 2013). En effet, la délétion de TKS5 dans ces cellules cancéreuses ne réduit pas le nombre d'invadopodes mais altère leur durée de vie. Plus récemment, la caractérisation de l'interactome de TKS5 à l'aide d'une nouvelle méthode couplant la biotinylation et la spectrométrie de masse a permis d'identifier de nouvelles protéines localisées dans les invadopodes parmi lesquelles on retrouve notamment l'arpin (inhibiteur du complexe Arp2/3) et SHC1 (*SHC transforming protein* 1) (Thuault et *al.,* 2020). Bien que leurs fonctions restent à déterminer, l'implication de ces protéines dans la régulation du cytosquelette d'actine suggère qu'elles pourraient réguler la formation des invadopodes. En exprimant un mutant de TKS5 tronqué du domaine PX, Thuault et son équipe ont également pu étudier la formation de ces complexes protéiques. Il a été démontré que certaines protéines telles que la cortactine interagisse avec TKS5 avant son recrutement aux invadopodes tandis que SHC1 comme tant d'autres interagissent avec TKS5 uniquement après son recrutement aux invadopodes. Par ailleurs, TKS5 peut interagir avec les protéases de la famille ADAM grâce à ses 5 domaines SH3 pour favoriser l'activité protéolytique des invadopodes (Abram et *al.,* 2003 ; Paterson & Courtneidge, 2018).

Il existe également un variant d'épissage à 4 domaines SH3 appelé TKS4 (Buschman et *al.,* 2009) présentant une localisation et des fonctions similaires à TKS5 mais dont le mécanisme d'activation reste inconnu (Paterson & Courtneidge, 2018). En effet, la délétion de l'une ou l'autre des isoformes dans des cellules cancéreuses de mélanome murin et humain inhibe la formation et l'activité protéolytique des invadopodes *in vitro* et *in vivo* (Iizuka et *al.,* 2016). Bien que la délétion de TKS4 et TKS5 n'affecte pas les niveaux d'expression de MT1-MMP, il a été démontré que cette délétion réduit l'expression à la membrane plasmique des MMP en contrôlant l'exocytose de MT1-MMP (Iizuka et *al.,* 2016).

Pyk2 : Pyk2 est une tyrosine kinase cytoplasmique analogue de la protéine FAK qui a récemment décrite pour favoriser la formation et l'activité des invadopodes (Genna et *al.,* 2018 ; Lu et *al.,* 2019). Pyk2 est une protéine calcium-dépendante dont l'activation est dépendante du mécanisme SOCE (*Store Operated Calcium Entry*). La libération de calcium du réticulum vers

le cytoplasme de la cellule conduit à l'oligomérisation et la translocation de STIM1 aux jonctions de la membrane plasmique et du réticulum où elle active les pores Orail1 permettant le mécanisme SOCE. Un complexe calcium-calmoduline-Pyk2 se forme alors dans les invadopodes conduisant à la phosphorylation du site Y402 de Pyk2 et à son activation (Kohno et *al.,* 2008 ; Lu et *al.,* 2019). Pyk2 est ensuite capable d'activer la protéine Src et la cortactine afin de favoriser la polymérisation de l'actine et le recrutement d'autres partenaires aux invadopodes (Genna et *al.,* 2018 ; Lu et *al.,* 2019). Bien que présent en faible concentration au niveau des adhérences focales, Pyk2 est également capable de lier la paxilline pour favoriser le processus de migration cellulaire (Naser et *al.,* 2018 ; Walkiewicz et *al.,* 2015).

Les MMP : Les métalloprotéases régulées par le zinc de la famille des MMP sont séparées en deux classes : les MMP solubles et les MMP membranaires (MT-MMP). Seule la MT1-MMP ainsi que deux exemples de MMP solubles, la MMP-2 et la MMP-9, seront abordés dans cette partie **(Tableau 1)**. La MT1-MMP (M*embrane Type 1- Matrix Metalloproteinase*) est présente à la membrane plasmique et est enrichie au niveau des invadopodes afin de permettre la dégradation de la matrice extracellulaire (Artym et *al.,* 2006 ; Poincloux et *al.,* 2009). Il a notamment été démontré que la MT1-MMP est accumulée dans l'invadopode suite à la formation des filaments d'actine et au recrutement de la cortactine (Artym et *al.,* 2006). Un immunomarquage de surface a notamment permis de corréler la localisation de la protéase avec des zones de dégradation de la MEC (Steffen et *al.,* 2008). Cette protéase est synthétisée dans le Golgi sous forme de proenzyme puis est activée par clivage de son prodomaine par la furine durant son transport jusqu'à la membrane plasmique afin de produire une enzyme catalytiquement active à la surface (Mazzone et *al.,* 2004; Yana & Weiss, 2000) **(Figure 18)**. Une fois activée, elle est capable de dégrader de nombreux composants de la matrice extracellulaire tels que les collagènes de type I, II, III et IV, les laminines, la fibronectine et la vitronectine. Au-delà de son activité de dégradation, MT1-MMP est capable d'activer au niveau des invadopodes des MMP solubles dont MMP2 et MMP9 afin de dégrader le collagène de type IV (Deryugina et *al.,* 2001 ; Artym et *al.,* 2006).

Une fois à la membrane plasmique, MT1-MMP est rapidement internalisée par endocytose **(Figure 18)**. En effet, l'expression de MT1-MMP à la membrane est généralement de courte durée puisque celle-ci est rapidement inhibée à la surface. Une surexpression de la protéase à la surface est corrélée avec une augmentation du potentiel agressif du cancer (Lodillinsky et *al.* 2016, Marchesin et *al.* 2015, Rosse et *al.* 2014) tandis que l'inhibition de l'endocytose favorise

Tableau 1 : Structures et caractéristiques des MMP. Les MMP sont constituées d'un prédomaine (bleu), d'un prodomaine régulant négativement la protéase (vert clair), d'un domaine catalytique impliqué dans la dégradation des composants de la MEC (blanc) et d'un domaine hémopexine relié au domaine catalytique afin de réguler la reconnaissance du substrat et les interactions protéiques avec notamment les autres MMP (vert foncé). Les gélatinases A et B présentent également un domaine CBD (*Collagen Binding Domain*) leur permettant d'interagir avec le collagène. En plus de ces domaines, les MT-MMP peuvent présenter en C-terminal un domaine transmembranaire (TM) ou une ancre lipidique de type GPI permettant leur insertion au niveau de la membrane plasmique. Contrairement aux MT-MMP, les MMP solubles ne possèdent pas de domaines permettant leur insertion à la membrane plasmique et sont sécrétées dans le milieu extracellulaire. Toutefois, elles peuvent se lier indirectement à la membrane plasmique par interaction avec des MT-MMP ou des récepteurs membranaires de type intégrines ou CD44. Adapté de Bauvois, 2012 et de Lu et *al.,* 2011

Structure	Membre	Catégorie	Activateurs	Cibles
TM, S, S	MT1-MMP (ou MMP14)	Membranaire	Furine	Gélatine, Collagène I, II, III et IV, fibrine fibronectine, laminine, aggrécane, pro-MMP-2, pro-MMP-13, CD44
CBD, S, S	MMP2	Gélatinase A	MMP-1, MMP-7, MMP-13, plasmine, MT1-, MT2-, MT3-, MT5- et MT6-MMP	Collagène IV, V, VII, X et XI, Gélatine, fibronectine, élastine, laminine, aggrécane
	MMP9	Gélatinase B	MMP-2, MMP-3, MMP-10, MMP-13, plasmine	Gélatine, Collagène III, IV et V, vitronectine, élastine, entactine, aggrécane

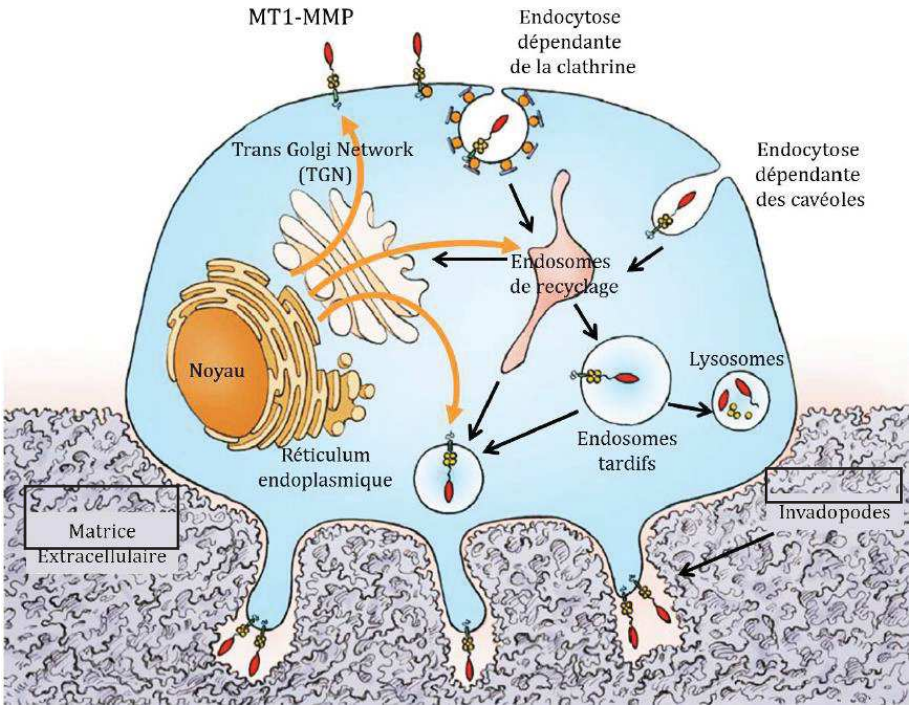


Figure 18 : Synthèse, endocytose et trafic intracellulaire de la MT1-MMP. La MT1-MMP est adressée à la membrane plasmique de la cellule soit par la voie sécrétoire après synthèse et maturation au niveau de l'appareil de Golgi, soit par la voie d'endocytose et d'exocytose, en faisant intervenir un trafic intracellulaire dépendant de la clathrine ou des cavéoles. Une fraction de la protéase est présente dans les endosomes tardifs à partir desquels la MT1-MMP est transportée dans les invadopodes. Adapté de Poincloux et *al.,* 2009.

la dégradation de la MEC (Jiang et *al.,* 2001 ; Lafleur et *al.,* 2006). L'endocytose de MT1-MMP est principalement dépendante de la clathrine grâce à l'interaction du complexe adaptateur AP-2 avec le motif LL situé sur la queue cytoplasmique de la protéase (Poincloux et *al.,* 2009). Un mécanisme d'endocytose dépendant des cavéoles a également été proposé (Remacle et *al.,* 2003 ; Yamaguchi et *al.,* 2009). En effet, la délétion de la calvéoline-1 dans les cellules cancéreuses altère la dégradation de la MEC mais il n'est pas exclu que ce phénomène soit dépendant des fonctions de la calvéoline-1 dans les voies lipidiques (Castro-Castro et *al.,* 2016). De manière intéressante, la MT1-MMP est recyclée efficacement à la membrane par endocytose mais ses fonctions de remodelage de la MEC dans les invadopodes nécessitent une interaction stable. Des études de FRAP ont permis de mettre en évidence que cette protéase a une dynamique lente aux niveaux des invadopodes contrastant avec la rapide dynamique et le fort recyclage aux autres régions membranaires (Hoshino et *al.,* 2012, Yu et *al.,* 2012). En effet, l'interaction de la queue cytoplasmique de la protéase avec les filaments d'actine dans les invadopodes stabilise le complexe et permet le remodelage de la MEC (Yu et *al.,* 2012).

Suite à son internalisation, MT1-MMP s'accumule dans des vésicules intracellulaires et les endosomes, à partir desquelles la protéase peut être transportée dans les lysosomes pour être dégradée (Takino et *al.,* 2003) ou bien recyclée à la surface de la cellule (Wang et *al.,* 2004) **(Figure 18)**. Le trafic intracellulaire des endosomes est régulé par de nombreuses protéines dont les GTPases de la famille Rabs (Barr, 2013; Huotari & Helenius, 2011). En effet, la MT1-MMP a été observée dans des endosomes positifs pour les protéines Rab-7, Rab-8, Rab-4 et Rab-11 afin d'être recyclée à la surface de la cellule (Chevalier et *al.,* 2016 ; Monteiro et *al.,* 2013 ; Rosse et *al.,* 2014 ; Williams & Coppolino, 2011). De nombreuses études ont également mis en évidence l'importance de la polymérisation des filaments d'actine à la surface des endosomes dans la régulation de la dynamique des endosomes et dans le recyclage des protéases (Derivery et *al.,* 2009). En effet, il a été démontré que les endosomes enrichis en MT1-MMP contiennent de l'actine ponctiforme dont la formation est dépendant du complexe Arp2/3, de son activateur WASH et de la cortactine (Monteiro et *al.,* 2013, Rosse et *al.,* 2014). La délétion de la protéine WASH dans ces cellules inhibe la formation de l'actine ponctiforme et altère le transport des protéases aux invadopodes à l'origine d'une inhibition de la dégradation de la MEC (Monteiro et *al.,* 2013). D'autres études ont par la suite démontré l'importance des microtubules dans le transport intracellulaire de la protéase, notamment *via* les moteurs moléculaires de type kinésine impliquant les protéines JIP3, JIP4 et Arf6 (Wiesner et *al.,* 2010). Des microtubules ont d'ailleurs été observés dans les invadopodes matures (Schoumacher et

al., 2010). JIP3 et JIP4 sont des protéines d'échafaudages impliquées dans les voies de signalisation de JNK et p38 respectivement (Kelkar et *al.,* 2005). Ces protéines sont nécessaires pour l'association de la kinésine-1 et de la dynéine-dynactine avec les endosomes enrichis en MT1-MMP et ce sous le contrôle de la protéine Arf6 (Marchesin et *al.,* 2015 ; Montagnac et *al.,* 2009). En revanche, la kinésine-2 est recrutée indépendamment des JIP . L'altération d'une seule de ces protéines perturbe la migration des endosomes enrichis en MT1-MMP le long des microtubules et l'activité des invadopodes (Marchesin et *al.,* 2015).

Enfin, une fois aux invadopodes, la fusion des vésicules avec la membrane plasmique, permet l'exocytose du contenu des endosomes dans le milieu extracellulaire **(Figure 19)**. Ce procédé est dépendant de la protéine Arf6, dont la délétion conduit à l'accumulation des endosomes dans les régions périnucléaires, mais également des protéines SNARE (Proux-Gillardeaux et *al.,* 2005). Il a en effet été montré que les protéines SNARE VAMP-7 (*Vesicle-Associated Membrane Protein 7*) (Steffen et *al.,* 2008 ; Williams et *al.,* 2014) et VAMP-3 (Kean et *al.,* 2009) sont présentes à la surface des endosomes contenant MT1-MMP et sont nécessaires à leur fusion avec la membrane plasmique et la dégradation de la MEC. Il a d'ailleurs été mis en évidence que VAMP-7 et MT1-MMP colocalisent au niveau des invadopodes en association avec la dégradation de la matrice extracellulaire (Steffen et *al.,* 2008).

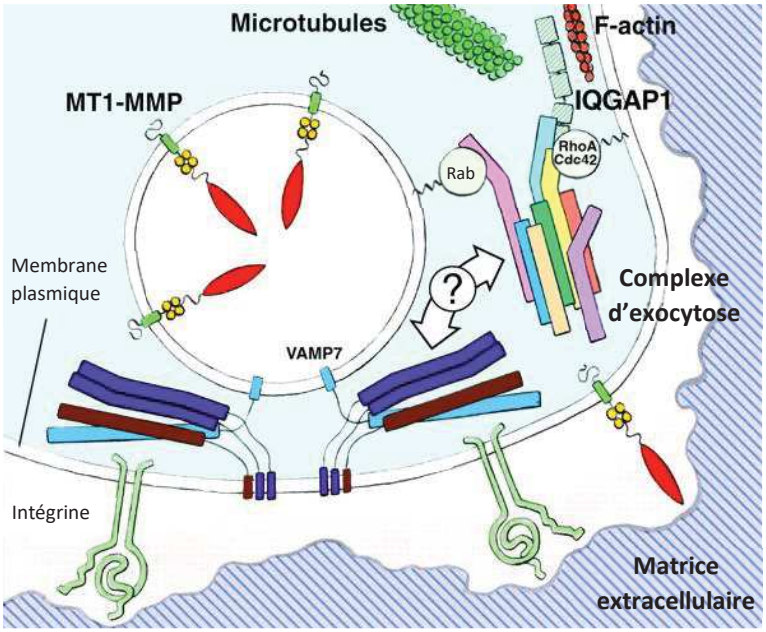


Figure 19 : L'exocytose de la MT1-MMP aux invadopodes. Les endosomes contenant MT1-MMP sont adressés à la membrane plasmique via un mécanisme impliquant le complexe d'exocyste et les protéine Arf6, VAMP-3 et VAMP7. Ce processus va permettre l'exocytose de la MT1-MMP à la membrane plasmique de l'invadopode afin de dégrader la MEC. Adapté de Poincloux et *al.,* 2009.

<u>Les Espèces Réactives de l'oxygène</u> : Les ERO sont des molécules oxygénées hautement réactives du fait de la présence dans leurs structures d'électrons libres chimiquement instables. Elles sont produites par les mitochondries et par l'action des NADPH oxydase (NOX) et plus particulièrement des enzymes NOX1, 2, 3 et 4 (Lambeth et *al.,* 2007) **(Figure 20)**. Les protéines NOX sont régulées par l'action de facteurs cytosoliques incluant les GTPases Rac1 et Rac2 et par des protéines activatrices telles que p67PHOX (Bokoch & Diebold, 2002 ; Lambeth et *al.,* 2007). Dans les cellules cancéreuses, la production d'ERO suite aux dysfonctions mitochondriales et au stress métabolique, conduit à des altérations de l'ADN, à l'apoptose mais également à une augmentation de l'invasion tumorale (Grek & Tew, 2010). En effet, il a été démontré que les NOX favorisent la production des ERO dans les invadopodes à l'origine d'une augmentation de l'expression et de l'activation des MMP (Bedard & Krause, 2007 ; Diaz et *al.,* 2009). A l'inverse, l'inhibition des NOX ou la délétion de la sous unité p22PHOX réduit la

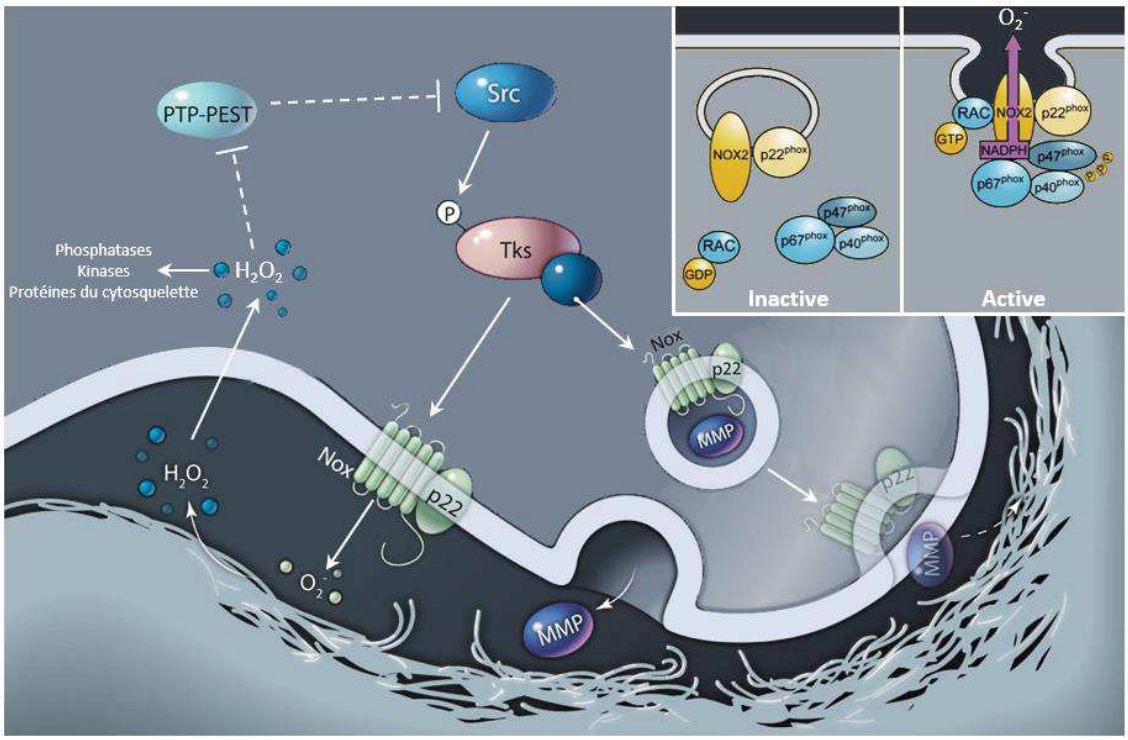


Figure 20 : Modèle d'implication des ERO dans l'activité des invadopodes. L'activation de Tks4 ou Tks5 par Src peut permettre le recrutement du complexe Nox-p22^{phox} dans des vésicules ou à la membrane plasmique des invadopodes en formation. Par la suite, la phosphorylation de la sous-unité cytosolique p47^{phox} par la GTPase Rac entraîne des changements de conformation permettant l'interaction avec p22^{phox} et le recrutement des autres sous-unités cytoplasmiques p67^{phox} et p40^{phox}, afin de former le complexe enzymatique NOX2 actif. Une fois activé, le complexe enzymatique actif transporte les électrons du NADPH cytoplasmique vers l'oxygène extracellulaire pour générer de l'O_2^-. L'oxydation des acides aminés de diverses protéines des invadopodes telles que la phosphatase PTP-PEST favorise l'activité des invadopodes. Il est possible que l'activation de Nox puisse affecter la fusion des vésicules contenant des MMP à la membrane plasmique. De même, il se peut que PTP-PEST ait un rétrocontrôle négatif sur Src. Adapté de Bedard & Krause, 2007 et de Weaver, 2009.

formation et l'activité de ces structures (Diaz et *al.,* 2009 ; Kolli-Bouhafs et *al.,* 2014). De manière intéressante, des similitudes structurales entre les protéines TKS4, TKS5 et la protéine p47PHOX composante du système NOX ont été mises en évidence (Courtneidge, 2012 ; Lock et *al.,* 1998). Il a été démontré que Tks-5 peut interagir avec la sous unité p22PHOX et p67PHOX pour promouvoir la production des ERO (Diaz et *al.,* 2009 ; Gianni et *al.,* 2009 ; Gianni et *al.,* 2011). De plus, dans les invadopodes, les ERO sont capables d'oxyder et d'inactiver la phosphatase cytosolique PTP-PEST afin de favoriser l'activité des protéines TKS4 et TKS5 (Diaz et *al.,* 2009).

3.4. Initiation, Formation et Maturation des invadopodes

La formation d'un invadopode est caractérisée par une succession d'étape incluant l'initiation, la formation et la maturation **(Figure 21)**. Cependant, à ce jour, peu de données existent concernant les premières étapes de la formation des invadopodes. En effet l'existence ou non d'un complexe initiateur de ces structures reste en suspens. Du fait des similarités protéiques entre les complexes d'adhérences focales et les invadopodes, des études ont proposé une relation réciproque entre ces structures ; la déformation des FAs libérerait des complexes protéiques initiant la formation des invadopodes (Chan et *al.,* 2009b ; Genna et *al.,* 2018 ; Kolli-Bouhafs et *al.,* 2014). Dans des fibroblastes transformés par v-Src, les invadopodes en rosette sont initiés en réponse à la formation de radeaux lipidiques (Oikawa et *al.,* 2008). Ces lipides permettent le recrutement de la protéine TKS5 et de la cortactine initiant le recrutement d'autres partenaires protéiques (Abram et *al.,* 2003 ; Artym et *al.,* 2006). Un modèle similaire a été proposé pour les invadopodes ponctiformes (Eddy et *al.,* 2017) bien qu'à ce jour la cinétique de recrutement et l'interactome des protéines favorisant l'assemblage des invadopodes ne soient pas clairement établis.

Il a été démontré que les invadopodes sont formés sous l'effet de divers stimuli et notamment sous l'influence de cytokines et de facteurs de croissance (VEGF, TGFβ, EGF). Ces stimuli permettent l'activation des intégrines, particulièrement les sous unités β3 et β5, ainsi que l'activation des RTK ; cela induit une cascade de phosphorylation intracellulaire aboutissant à l'activation des protéines composant les invadopodes et en particulier Pyk2, Src, PKC et les GTPases de la famille Rho (Cdc42) **(Figure 21a)**. Par la suite, Cdc42 stimule l'association du complexe Arp2/3 avec la protéine N-WASP (*Neural Wiskott-Aldrich syndrome Protein*) afin d'induire la nucléation et la polymérisation de l'actine formant ainsi le cœur d'actine des invadopodes (Gimona et *al.,* 2008). Au cours de cet assemblage, de nombreuses protéines

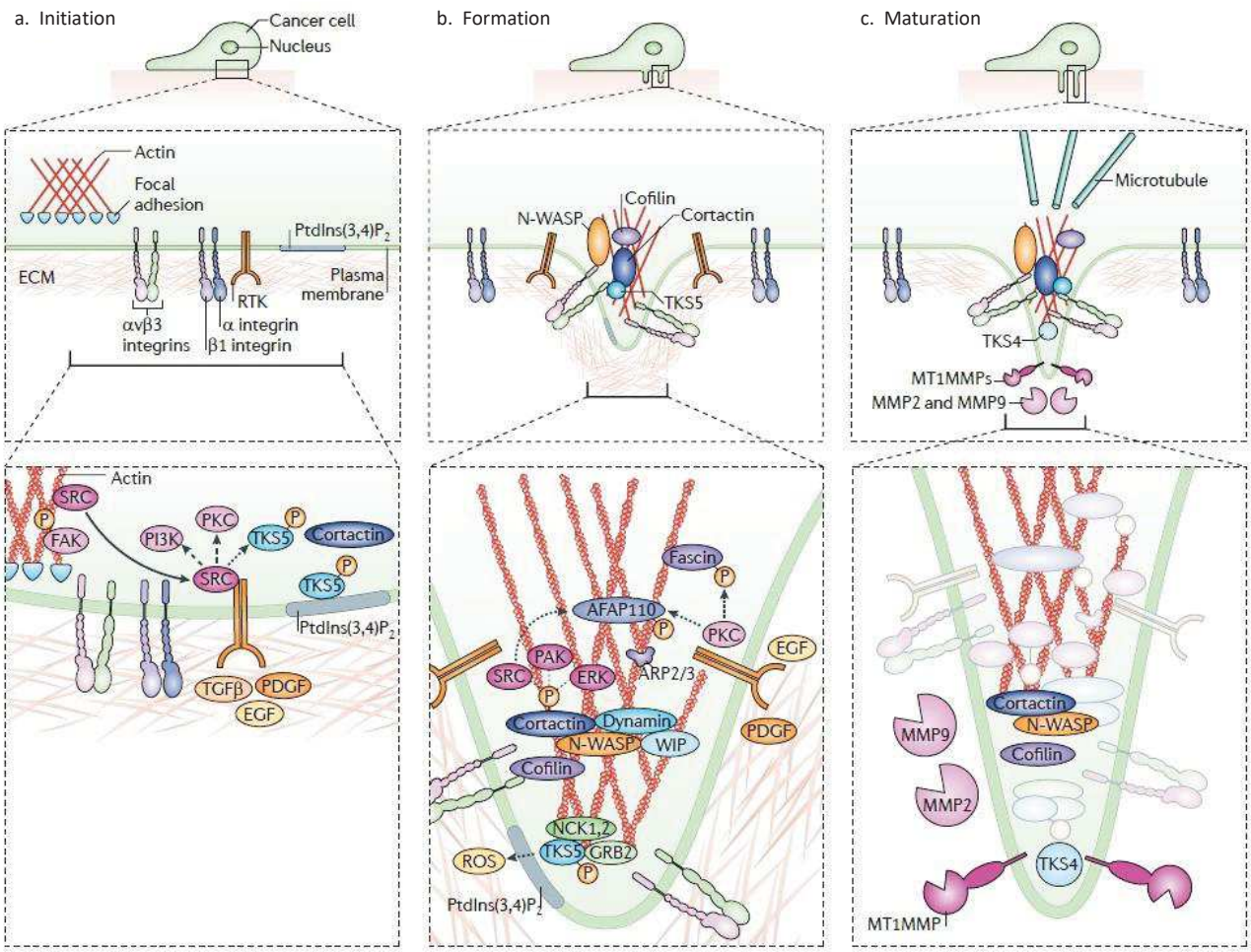


Figure 21 : Modèle de formation des invadopodes. (**A**) L'initiation d'un invadopode nécessite la formation d'adhérences focales. Ces sites d'adhérence sont formés par des intégrines, récepteurs de la MEC, et la transduction du signal est assuré en particulier par les protéines FAK et Src. La transition d'un phénotype migratoire à un phénotype invasif se produit suite à la sécrétion de facteurs (EGF, PDGF) qui stimule la libération de la protéine Src des adhérences focales vers les invadopodes (**B**) Src recrute et active ses partenaires (PKC, Tks5) débouchant sur le recrutement des composants structurels de l'invadopode, notamment l'actine et la cortactine. La formation des invadopodes est donc corrélée au désassemblage des adhérences focales (**C**) Bien que les mécanismes par lesquels les protéines s'associent et la façon dont elles sont régulées restent inconnus, une fois à maturation, les invadopodes induisent la production d'ERO ainsi que l'expression de MT1-MMP capables à leur tour d'activer des métalloprotéases solubles sécrétées par la cellule (MMP-2 et MMP-9 notamment). Ce processus est associé à une dégradation localisée de la matrice extracellulaire. (Adapté de Murphy & Courtneidge. 2011).

d'échafaudages, tels que la cortactine, Tks-5 ou encore AFAP110, viennent s'ajouter pour stabiliser les nouveaux filaments d'actine (Murphy & Courtneidge, 2011) **(Figure 21b)**. Du fait de son rôle dans la stabilisation des filaments d'actine, la cortactine est une protéine indispensable à la formation des invadopodes (Yin et *al.,* 2017 ; Markwell et *al.,* 2019). Cependant, la polymérisation des filaments d'actine n'est pas suffisante pour permettre la

maturation de l'invadopode. Les filaments d'actine générés exercent une pression au niveau de la membrane plasmique permettant de générer la protrusion tandis qu'une activité protéolytique permet de créer l'espace nécessaire à l'extension de cette protrusion (Artym et *al.,* 2006 ; Schoumacher et *al.,* 2010). Les invadopodes stimulent la dégradation de la MEC en coordonnant la sécrétion de protéases, telles que la calpaïne et les métalloprotéases solubles (MMP-2 et MMP-9) et la présentation des métalloprotéases membranaires (MT1-MMP) en bordure de la structure **(Figure 21c)**. La protéine Tks-5 stimule notamment l'expression de MT1-MMP pour faciliter l'invasion tumorale (Blouw et *al.,* 2015 ; Iizuka et *al.,* 2016). De même, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) jouent un rôle prépondérant dans l'activité des invadopodes puisqu'elles stimulent la sécrétion des métalloprotéases solubles (Kolli-Bouhafs et *al.,* 2014).

Les invadopodes sont des structures dynamiques avec une durée de vie d'environ une heure mais peu de choses sont connues sur la régulation de leur *turn-over* et sur le devenir des complexes protéiques. Il a été démontré que la phosphorylation de certaines protéines telles que la cortactine ou AFAP110 favorise leur déformation (Dorfleutner et *al.,* 2008 ; Oser et *al.,* 2009). De même, les phosphatases ont probablement un rôle clé dans le devenir de ces structures mais peu sont détaillées. Tandis que PTP1B favorise la formation des invadopodes en déphosphorylant la protéine Src, la phosphatase PTP-PEST favorise leur déformation en inhibant l'activité de TKS4 et TKS5 (Diaz et *al.,* 2009).

3.5. Sensibilité au microenvironnement

Plusieurs études ont décrit l'influence du microenvironnement tumoral sur l'invasion des cellules cancéreuses. En effet, de nombreux facteurs de croissance stimulant la formation et l'activité des invadopodes sont sécrétés en abondance par les cellules saines et les cellules cancéreuses du stroma (Hoshino et *al.,* 2012 ; Murphy & Courtneidge, 2011). Il a également été démontré *in vitro* par microscopie à haute résolution que les macrophages de la tumeur favorisent la formation des invadopodes et l'intravasation des cellules cancéreuses grâce à des contacts cellule-cellule activant la voie Notch et la GTPase RhoA (Roh-Johnson et *al.,* 2014). De plus, la transcription des facteurs HIF en réponse à l'appauvrissement en oxygène dans la tumeur stimule la formation des invadopodes en favorisant la surexpression de facteurs de croissances (PDGF, VEGF et HGF) et des MMP (Fukumura & Jain, 2007 ; Lu & Kang, 2010). Il est important de noter que l'hypoxie favorise également l'activité protéolytique des invadopodes en créant un environnement stressant, propice à la production d'ERO (Choi &

Lim, 2013 ; Diaz *al.,* 2009). Le facteur HIF a également été rapporté pour favoriser le recrutement de protéine dans les invadopodes tel que CAIX qui a récemment été décrite pour interagir avec les intégrines $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, and $\alpha_6\beta_1$ ainsi que MMP14 (Swayampakula et *al.,* 2017). Outre ces mécanismes, il a été démontré que la diminution du pH dans la tumeur induit une surexpression du VEGF favorisant les processus d'angiogenèse et d'invasion (Amith & Fliegel*,* 2013 ; Brisson et *al.,* 2012). Le transporteur NHE-1 a notamment été observé au niveau des invadopodes où il dissocie le complexe cortactine-cofiline afin d'accroître l'élongation de la structure (Busco et *al.,* 2010 ; Magalhaes et *al.,* 2011 ; Oser et *al.,* 2009). Par ailleurs, NHE-1 favorise la dégradation de la MEC en augmentant l'expression, la sécrétion et l'activation de MT1-MMP, de MMP2 et de MMP9 (Kato et *al.,* 2005).

Par ailleurs, les invadopodes sont composés de récepteurs transmembranaires sensibles à la composition, à la topologie et à la rigidité matricielle (Di Martino et *al.,* 2016). La sécrétion abondante de collagène et de fibronectine par les CAF augmente la rigidité de la matrice extracellulaire et favorise la formation et de l'activité des invadopodes (Albigès-Rizo et *al.,* 2009 ; Alexander et *al.,* 2008 ; Friedl & Gilmour, 2009 ; Parekh & Weaver, 2009). De même, le remodelage de la MEC par les MMP conduit à la libération de fragments bioactifs de protéines tels que le fragment C16 de la laminine-111 qui a été rapporté pour stimuler la formation des invadopodes de manière β1 dépendante (Siqueira et *al.,* 2016).

D. Focal Adhesion Kinase

La protéine FAK a été décrite pour la première fois en 1990 comme étant une protéine de 125KDa phosphorylée en réponse à la transformation de fibroblastes embryonnaires de poulet par l'oncogène v-Src. L'équipe de Schaller a par la suite identifié cette protéine dans les adhérences focales et l'a nommé la kinase des adhérences focales soit *Focal Adhesion Kinase* (FAK) en anglais (Schaller et *al.,* 1992). Son importance dans la physiologie et dans le développement de pathologie a rapidement été mise en évidence et une multitude d'études cellulaires et *in vivo* ont depuis placé FAK comme un acteur clé des processus cellulaires.

I. Structure de FAK

La protéine FAK comporte plusieurs domaines fonctionnels dont un domaine central portant l'activité catalytique, encadré par un domaine N-terminal et un domaine C-terminal. Initialement, les domaines et les régions fonctionnelles de la protéine ont été identifiés en se basant sur l'homologie de séquence et sur l'analyse par délétion. Depuis, la cristallographie des principaux domaines ainsi que l'observation en cryo-microscopie électronique de la protéine FAK a permis d'améliorer notre compréhension de ses mécanismes de régulation et de ses interactions avec ses principaux partenaires (Acebrón et *al.,* 2020 ; Arold et *al.,* 2002 ; Ceccarelli et *al.,* 2006 ; Hayashi et *al.,* 2002 ; Lietha et *al.,* 2007 ; Nowakowski et *al.,* 2002).

1. Domaine N-terminal

Le domaine N-terminal de FAK est doté d'une région FERM (*Band 4.1-Ezrin-Radixin-Moesin)* constituée de 3 sous-domaines globuleux organisés en « feuille de trèfle » **(Figure 22)**. Le lobe F1 adopte une conformation *ubiquitine-like* tandis que le lobe F2 présente des homologies avec la protéine de liaison à Acyl-CoA et le lobe F3 comporte un domaine PH-PTB (*Plextrin Homology-Phosphotyrosine Binding Domain Fold*) (Tapial Martinez et *al.,* 2020). Bien que les premières études *in vitro* aient suggéré une interaction directe entre les β-intégrines et le domaine FERM de FAK, cette interaction n'a toujours pas été démontrée. En revanche, le domaine FERM semble interagir avec les formes activées de l'EGF et du PDGF (Dunty et *al.,* 2004 ; Sieg et *al.,* 2000). Il a également été démontré que le domaine FERM est impliqué dans des interactions protéines-protéines et protéines-lipides qui régulent la localisation subcellulaire de FAK. En effet, FAK interagit avec la protéine Arp2/3 et le cytosquelette d'actine via le lobe F1 mais également avec des phosphoinositides grâce à la séquence KAKTLRK sur le lobe F2 (Cai et *al.,* 2008 ; Goni et *al.,* 2014). De même, une région NLS (*Nuclear Localization Signal*)

et une région NES (*Nuclear Export Signal*) situées sur le lobe F1 de FERM régulent la translocation nucléaire de la protéine (Ossovskaya et *al.,* 2008).

Le domaine FERM régule également l'activité catalytique de FAK en interagissant directement avec le domaine kinase (Cooper et *al.,* 2003). Cet état d'auto-inhibition est maintenu par l'interaction entre le lobe F2 de FERM et un site centré autour de F596 dans le domaine C-terminal (Kleinschmidt & Schlaepfer, 2017). En effet, les mutations Y180A-M183A dans le domaine F2 FERM ou F596D dans le domaine kinase induit l'activation constitutive de la protéine FAK. De plus, la formation d'un feuillet β par l'interaction entre les linkers 394-401 du domaine kinase et le lobe F1 masque le site d'autophosphorylation de la protéine en Y397 et prévient l'activation de la protéine. Enfin, la liaison du domaine FERM avec les phosphoinositides et avec la protéine Src est indispensable à l'activation de la protéine (Kleinschmidt & Schlaepfer, 2017). Les modèles actuels suggèrent également qu'une interaction intermoléculaire FERM-FERM autour du résidu W266 est indispensable à la dimérisation et à l'activation de FAK (Brami-Cherrier et *al.,* 2014).

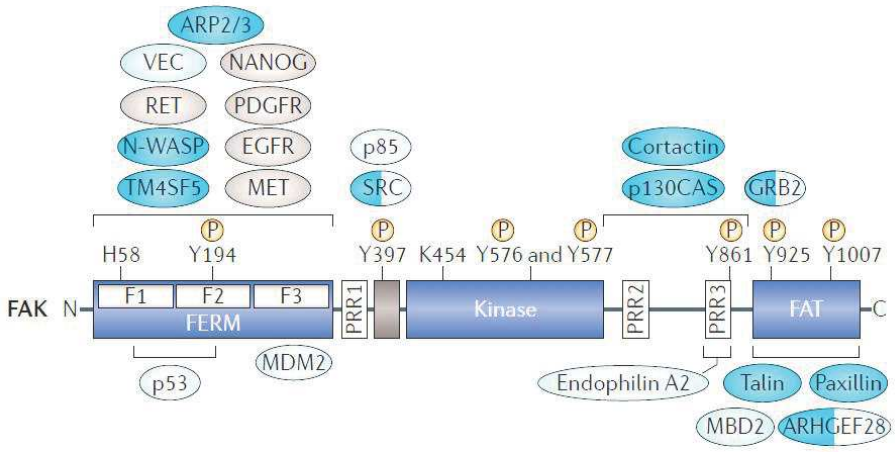


Figure 22 : La structure de FAK. La protéine FAK est constituée de trois domaines : un domaine amino-terminal FERM (*Band 4.1-Ezrin-Radixin-Moesin*) et un domaine carboxy-terminal FAT (*Focal Adhesion Targeting*) délimitant un domaine central portant l'activité catalytique. Certains sites de phosphorylation, dont le site Y397 qui est primordial à l'activité kinase de la protéine, ainsi que des protéines associées à FAK sont également représentés. Adapté de Sulzmaier et *al.,* 2014.

2. Domaine Kinase

Encadré par les domaines N-terminal et C-terminal, le domaine kinase de FAK porte l'activité catalytique de la protéine **(Figure 22)**. Il est constitué de 2 lobes encadrant le site de liaison à l'ATP ainsi que d'un motif DFG permettant la liaison de l'ATP et l'autophosphorylation de la

protéine en Y397. Cette phosphorylation libère un site de liaison de forte affinité pour des protéines contenant un domaine SH2 telles que les kinases de la famille Src. Le recrutement de Src induit la phosphorylation de deux autres résidus tyrosine, Y576 et Y577, situés dans le domaine kinase et aboutit à l'activation enzymatique complète de FAK (Kleinschmidt & Schlaepfer, 2017 ; Lietha et *al.,*2007).

De plus, l'interaction du domaine kinase avec les lipides de la membrane par le biais des résidus R508, K621 et K627 contribue à l'activation de FAK (Acebron et *al.,* 2020 ; Hall & Schaller, 2017). En effet, la mutation de ces résidus entraîne une réduction significative de la liaison au PI(4,5)P2 et une inhibition de la phosphorylation de la protéine (Hall & Schaller, 2017).

3. Domaine C-terminal

Le domaine C-terminal de FAK comprend le domaine FAT (*Focal Adhesion Targeting*) et des régions riches en proline intercalées entre FAT et le domaine kinase **(Figure 22)**. Le domaine FAT est organisé en quatre hélices antiparallèles présentant des homologies avec des séquences retrouvées dans d'autres protéines impliquées dans l'adhérence cellulaire telles que la vinculine et l'α caténine. Cette séquence régule la localisation de FAK au niveau des FAs par une interaction entre les sites HP1 (*Hydrophobic Patch 1*) et HP2 (*Hydrophobic Patch 2*) situés respectivement à la surface des hélices 2-3 et 1-4 du domaine FAT, avec les motifs LD2 et LD4 de la paxilline (Arold et *al.,* 2002 ; Bertolucci et *al.,* 2005 ; Hayashi et *al.,* 2002) **(Figure 23)**. L'inhibition de l'interaction FAK-paxilline conduit à une délocalisation de la protéine FAK dans le cytoplasme. Il est reporté que seule une mutation ou une inhibition conjointe des deux sites de liaison inhibe cette interaction. En effet, la mutation conjointe des isoleucines I936 et I998 en acide glutamique inhibe l'interaction FAK-paxilline contrairement à une mutation unique (Deramaudt et *al.,* 2014 ; Gao et *al.,* 2004). Le domaine FAT assure également le recrutement de la taline aux FAs (Sulzmaier et *al.,* 2014). De plus, des sites de liaison de fortes affinités sont présents sur ce domaine tels que S910 et Y925 qui, une fois phosphorylés, sont capables de lier respectivement ERK et la protéine adaptatrice Grb2 (Schlaepfer et *al.,* 1994 ; Schlaepfer et *al.,* 1998).

Enfin, le couplage de la méthode SAXS (*Small Angle X-rays Scattering)* avec de la mutagénèse dirigée a mis en évidence *in vitro* que l'interaction du domaine FAT avec la séquence KAKTLRK du domaine F2 FERM est nécessaire durant l'activation de la protéine afin de stabiliser le dimère (Brami-Cherrier et *al.,* 2014).

Les régions riches en proline permettent quant à elles l'interaction de la protéine FAK avec les domaines SH3 de protéines tels que p130Cas (Harte et *al.,* 1996 ; Tachibana et *al.,* 1997) et les GTPases (Li et *al.,* 2011) afin d'induire les voies de signalisation sous-jacentes.

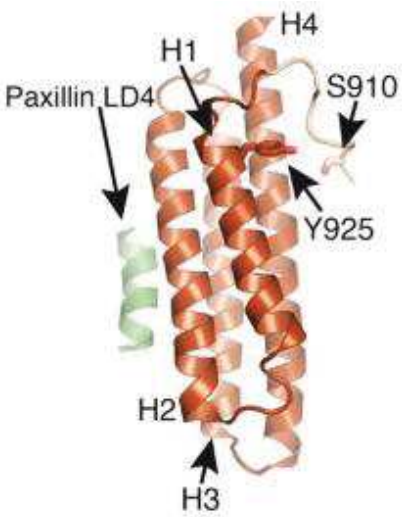


Figure 23 : La structure du domaine FAT. Cette figure représente le domaine FAT (brun) liant le domaine LD4 de la paxilline (vert) avec les hélices H1-H4 et les sites de phosphorylation S910 et Y925 représentés. Il existe deux sites de liaison à la paxilline : le premier à l'interface des hélices H1-H4 et le second à l'interface des hélices H2-H3. Adapté de Tapial Martinez et *al.,* 2020.

II. L'activité catalytique de la protéine FAK

1. Activation de la protéine FAK dans les FAs

A ce jour, le mécanisme d'activation de FAK n'est pas complètement élucidé et plusieurs modèles sont proposés. En condition inactive, la protéine FAK est présente sous forme de monomère dans le cytoplasme de la cellule et son domaine catalytique est masqué par le domaine FERM (Brami-Cherrier et *al.,* 2014 ; Walkiewicz et *al.,* 2015) **(Figure 24a)**. En effet, il a été démontré par cristallographie et par mutagénèse dirigée que les interactions des lobes F2 FERM et F1 FERM avec respectivement le domaine C-kinase et le domaine N-kinase masquent le site d'autophosphorylation de la protéine en Y397 et préviennent l'activation de la protéine (Ceccarelli et *al.,* 2006 ; Goni et *al.,* 2014 ; Lietha et *al.,*2007).

La liaison des intégrines à la MEC induit la formation de sites d'adhérences dans lesquels FAK est recruté. Cependant, la protéine FAK ne lie pas directement les intégrines mais interagit aux niveaux de ces structures avec la paxilline (Theodosiou et *al.,* 2016). Des études de photoblanchiment et de microscopie confocale ont également démontré qu'une accumulation de FAK aux FAs est indispensable à son activation (Walkiewicz et *al.,* 2015). Ainsi, l'accumulation locale de la protéine induit la formation de dimère par une interaction intermoléculaire FERM-FERM autour du résidu W266 qui est stabilisé par une interaction entre le domaine FAT et le lobe F2 FERM (Brami-Cherrier et *al.,* 2014 ; Toutant et *al.,* 2002) **(Figure 24b)**. Puisque l'interaction FAK-paxilline stabilise cette interaction FAT-FERM, il est possible que le recrutement de FAK dans les FAs induise la dimérisation de la protéine, d'une part, en augmentant la concentration locale de FAK, et d'autre part en favorisant l'interaction

FAT-FERM. Néanmoins, comme l'ont mis en évidence les études de SAXS, la dimérisation n'est pas suffisante pour induire une activation complète de la protéine car le domaine FERM maintient son activité auto-inhibitrice sur le domaine kinase (Brami-Cherrier et *al.,* 2014).

Par ailleurs, le fait que la protéine FAK ait été localisée à proximité de la membrane cellulaire par microscopie à haute résolution couplée à l'identification de motifs d'interaction avec le PI(4,5)P2 suggère l'implication des lipides dans le mécanisme d'activation de la protéine (Kanchanawong et *al.,* 2010). En effet, en utilisant des biosenseurs, il a été démontré que l'interaction du PI(4,5)P2 avec le domaine F2 FERM favorise son activation (Cai et *al.,* 2008 ; Goni et *al.,* 2014). Une étude de cryo-microscopie électronique a également révélé que la liaison des dimères de FAK au PI(4,5)P2 par le domaine FERM engendre un choc stérique entre la bicouche lipidique et le domaine kinase à l'origine d'une dissociation de l'interaction FERM-kinase (Acebron et *al.,* 2020 ; Brod & Fässler, 2020). La libération du domaine kinase conduit alors à un changement conformationnel permettant la liaison du domaine C-kinase aux lipides de la membrane, exposant ainsi le site d'autophosphorylation Y397 de FAK (Acebron et *al.,* 2020 ; Tapial Martinez et *al.,* 2020) **(Figure 24c)**. Néanmoins, selon ce modèle, l'accessibilité de la Src à la boucle d'activation ainsi que l'accès des substrats au site catalytique de la protéine restent limités puisque le site actif fait face à la membrane lipidique (Acebron et *al.,* 2020). Il a été proposé qu'une force mécanique, potentiellement transmise via le domaine FAT, soit nécessaire afin de soulever le domaine kinase de la membrane et de rendre le site actif

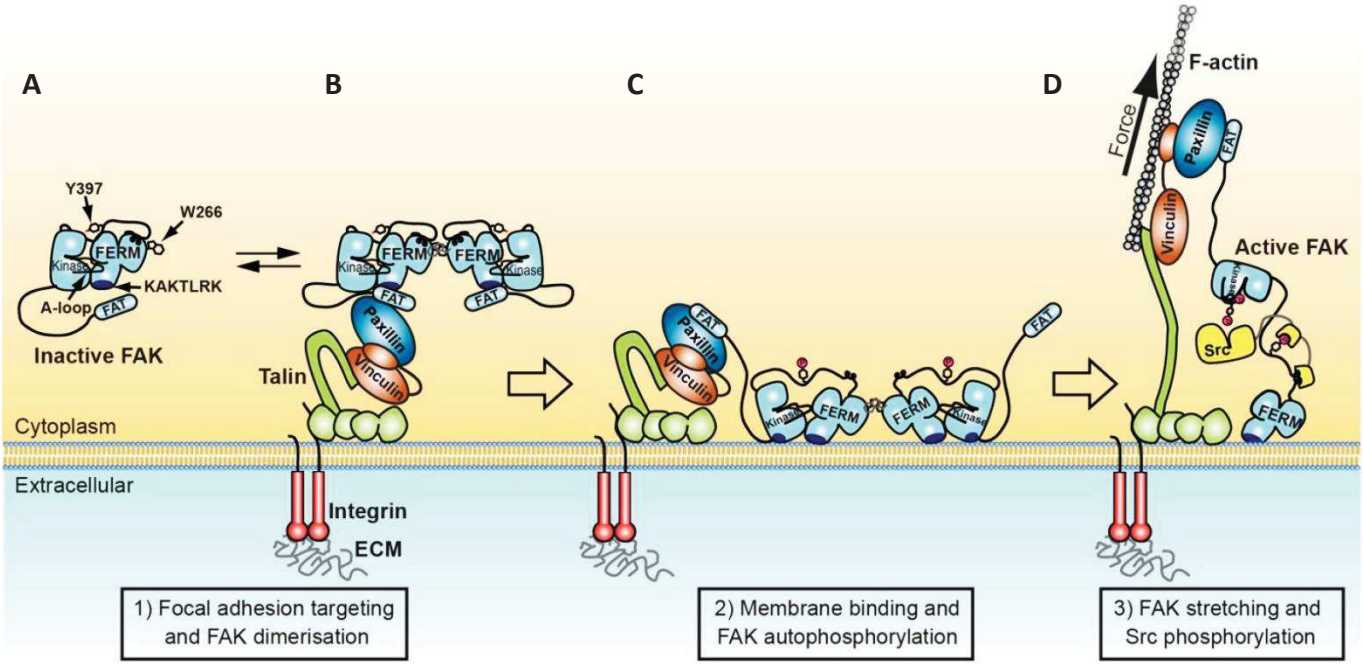


Figure 24 : Modèle d'activation de FAK. Adapté de Tapial Martinez et *al.,* 2020

facilement accessible. Ainsi, bien que l'interaction FAK- PI(4,5)P2 ne soit pas nécessaire à la localisation de FAK dans les FAs, ces études suggèrent qu'elle favorise la libération du domaine FERM et l'autophosphorylation de la protéine FAK en Y397 (Acebron et *al.,* 2020 ; Brami-Cherrier et *al.,* 2014 ; Goni et *al.,* 2014).

La phosphorylation du site Y397 créé un site de liaison de haute affinité pour les protéines de la famille Src. La protéine Src interagit alors par le biais de ses domaines SH2 et SH3 avec la Y397 phosphorylée ainsi qu'avec le motif proline adjacent **(Figure 24d)**. Ces interactions favorisent ainsi l'activation de Src et son recrutement aux FAs. Une fois activée, Src phosphoryle à son tour plusieurs tyrosines de FAK dont les sites Y576, Y577 dans la boucle d'activation afin de parachever l'activation de la protéine. De manière intéressante, la phosphorylation de ces deux résidus tyrosines, stabilise la conformation active de FAK en stabilisant la boucle d'activation et en empêchant l'inhibition par le domaine FERM.

2. <u>Activation dans les endosomes</u>

Afin de réguler les voies de signalisations des intégrines exprimées à la surface de la cellule, celles-ci sont internalisées dans les endosomes, à partir desquelles elles peuvent être transportées dans les lysosomes pour être dégradées ou bien recyclées à la surface (De Franceschi et *al.,* 2015). Les cycles de trafic endocytaire et exocytaire, coordonnés par les GTPases Rab, Arf et leurs effecteurs, contrôlent donc la disponibilité des intégrines à la surface de la cellule (De Franceschi et *al.,* 2015). L'interaction de FAK avec la dynamine a également été rapportée pour favoriser l'endocytose des intégrines et ainsi promouvoir le *turn-over* des FAs (Ezratty et *al.,* 2005 ; Wang et *al.,* 2011). A l'inverse, le recyclage polarisé des intégrines au front de migration des cellules assure le réassemblage des FAs afin d'améliorer la survie et la migration des cellules (Nader et *al.,* 2016). De manière intéressante, il a récemment été démontré que la protéine FAK dans sa conformation active (P-Y397) est localisée dans les endosomes afin de maintenir l'activité des intégrines et de prolonger les voies de signalisation sous-jacentes (Alanko et *al.,* 2015). En effet, il a été mis en évidence, *in vitro*, que la protéine FAK lie les endosomes purifiés de cellules $FAK^{-/-}$ via le domaine FERM afin d'être activé dans ces structures (Alanko et *al.,* 2015). Bien que l'activité intrinsèque de FAK ne soit pas nécessaire à son recrutement dans les endosomes (Alanko et *al.,* 2015), le maintien de l'activité endosomale des intégrines est dépendant de l'activité kinase de FAK (Nader et *al.,* 2016). En effet, il a été démontré que la protéine FAK phosphoryle et active la PIPKI dans les endosomes afin de générer du PIP2 ; celui-ci permet ensuite le recrutement de la taline, qui de part son

interaction avec la queue cytoplasmique des intégrines, maintien l'activité des récepteurs transmembranaires (Nader et *al.,* 2016). Ces résultats soulignent le fait que la protéine FAK peut être activée et peut affecter la migration cellulaire dans d'autres structures que les FAs.

3. L'influence du microenvironnement

Le remodelage de la MEC et l'augmentation de la rigidité matricielle dans la tumeur suite à une sécrétion accru de collagène par les CAF régule l'activation de nombreuses protéines (Sulzmaier et *al.,* 2014). Il a été démontré dans des échantillons de cancer du sein, dans des cellules de fibrosarcome et dans des cellules MDCK que l'activité des intégrines et que la phosphorylation en Y397 de FAK est accrue dans un environnement rigide (Levental et *al.,* 2009). En utilisant des biosenseurs basé sur la technique de FRET, Seong et son équipe ont également décrit que l'activation de FAK par la fibronectine est dépendante de la tension mécanique du substrat (Seong et *al.,* 2013). Ce mécanisme d'activation est notamment à l'origine d'une tolérance aux inhibiteurs de B-RAF dans un modèle de coculture de fibroblastes et de cellules de mélanome (Hirata et *al.,* 2015). En effet, l'inhibition de B-RAF induit une augmentation de la sécrétion de la MEC et de l'expression du PDGFR dans le stroma à l'origine d'une augmentation de la rigidité matricielle et du développement d'une insensibilité au traitement. De manière intéressante, il a été observé par microscopie que l'augmentation de la rigidité matricielle suite au traitement des cellules avec l'inhibiteur de B-RAF est corrélée à une réorganisation des intégrines β1 dans les FAs et à une augmentation de l'activité de FAK (Hirata et *al.,* 2015). *In vivo*, Hirata et son équipe ont également démontré que l'inhibition conjointe de B-RAF et de FAK abolit la réactivation de la voie des MAPK et réduit le développement tumoral.

De même, l'augmentation du pH intracellulaire dans les cellules cancéreuses favorise l'activation de FAK (Ritt et *al.,* 2013). Il a été démontré que la délétion ou l'inhibition de l'échangeur NHE-1 inhibe l'activité de FAK dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) à l'origine d'une réduction de la taille des FAs et de l'apparition d'une morphologie ronde dans les cellules (Choi et *al.,* 2013). Par mutagénèse dirigée, Choi et son équipe, ont décrit que la sensibilité de FAK au pH intracellulaire est corrélée à la protonation de H58 dans le domaine F1 FERM. La protonation de cette histidine favorise l'interaction avec E466 du domaine kinase et induit la libération du domaine FERM de FAK (Choi et *al.,* 2013 ; Ritt et *al.,* 2013). Ainsi, l'augmentation localisée du pH dans les FAs lors de la formation des protrusions intervient dans la levée de l'auto-inhibition du domaine FERM de FAK.

4. Les mécanismes endogènes de régulation

De manière endogène, l'activité kinase de FAK est régulée par plusieurs protéines pouvant empêcher son activation en abaissant les concentrations de la protéine, en renforçant les interactions auto-inhibitrices, en entrant en compétition avec les ligands activateurs, en déphosphorylant le site d'autophosphorylation ou encore en délocalisant la protéine de ses sites d'activation (Naser et *al.,* 2018).

4.1. La régulation génomique de FAK

Chez l'homme, le gène PTK2 codant pour la protéine FAK est situé sur le chromosome 8q24.3 (Fiedorek & Kay, 1995). Les facteurs NF-κB, AGo2, PEA3 et NANOG en sont les principaux promoteurs tandis que la protéine p53 est le principal répresseur (Cheng et *al.,* 2014 ; Corsi et *al.,* 2006 ; Ho et *al.,* 2012 ; Li et *al.,* 2013). Par ailleurs, quatre isoformes de FAK résultant de l'épissage alternatif ont été caractérisées (Burgaya et *al.,* 1997) **(Figure 25)**. Dans le cerveau, la principale forme de FAK est une isoforme appelée FAK+, qui contient une insertion de trois acides aminés, PWR, avant le domaine FAT. Les autres isoformes, FAK 6, 7 et 28 font référence au nombre d'acides aminés insérés de part et d'autre du site Y397. De manière surprenante, les isoformes 6 et 7 ont un niveau de phosphorylation en Y397 plus important que l'isoforme standard, FAK 0 (Burgaya et *al.,* 1997 ; Toutant et *al.,* 2002). Enfin, plusieurs études ont mis en évidence que l'expression de FAK 0 et FAK 6 est corrélé à une augmentation de l'agressivité tumorale dans le cas de cancers du côlon, des ovaires et des leucémies myéloïdes aiguës (Despeaux et *al.,* 2012 ; Devaud et *al.,* 2019 ; Nolasco-Quiroga et *al.,* 2019).

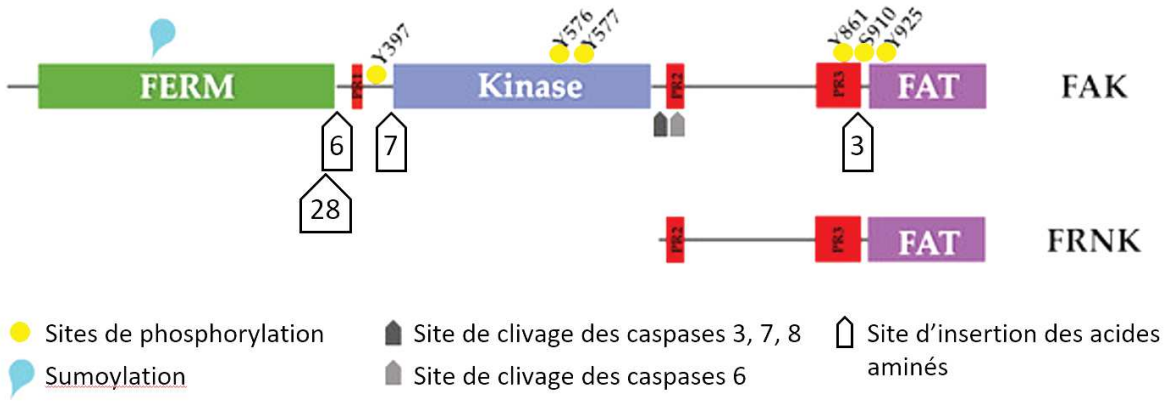


Figure 25 : Les mécanismes endogènes de régulation de FAK. Adapté de Naser et *al.,* 2018

4.2. FRNK

Grâce à un promoteur situé dans un intron de la séquence C-terminale, PTK2 peut également produire une protéine tronquée appelée FRNK (*FAK-Related Non-Kinase*) (Schaller et *al.,*

1993). Cette protéine comporte uniquement les régions riches en proline, le domaine FAT et les sites de phosphorylation situés en C-terminal **(Figure 25)**. Elle est donc capable d'interagir avec la paxilline pour se localiser aux FAs ainsi qu'avec quelques partenaires de FAK dont p130Cas et les GTPases. L'expression de FRNK dans les cellules conduit donc à une compétition avec FAK pour ces partenaires. En effet, il a été démontré en immunofluorescence que FRNK délocalise FAK hors des FAs diminuant ainsi les niveaux de phosphorylation de la protéine (Schaller et *al.,* 1993). De même, l'expression de FRNK conduit à une diminution de l'expression et de l'activation en Y397 de FAK dans les cellules cancéreuses (Koshman et *al.,* 2010 ; Zak et *al.,* 2017). Enfin, en délocalisant FAK hors des FAs, cette protéine tronquée favorise le désassemblage des structures d'adhérence à l'origine d'une diminution de la migration cellulaire (Deramaudt et *al.,* 2011 ; Hamadi et *al.,* 2005).

4.3. Les protéases

Il a également été démontré que la protéine FAK peut être clivée par des protéases telles que les caspases et les calpaïnes. Les caspases 3, 6, 7 et 8 sont des acteurs majeurs de la mort cellulaire programmée qui clivent FAK en fragments de différentes tailles dans les premiers stades de l'apoptose induite par myc (Naser et *al.,* 2018) **(Figure 25)**. Parmi les produits du clivage, un fragment ressemblant à la protéine FRNK a été rapporté pour inhiber l'activité de la protéine FAK dans des cellules cancéreuses de type HeLa (Wen et *al.,* 1997). De plus, un autre fragment issu de ce clivage correspond à la protéine FAK dépourvu de son domaine FAT (Wen et *al.,* 1997) ; il est donc probable que cette protéine FERM-kinase ne puisse pas être recrutée dans les FAs ainsi que dans les autres sites dépendants du domaine FAT conduisant ainsi à un désassemblage des structures d'adhérence.

4.4. La sumoylation

L'interaction de la protéine FAK avec la protéine SUMO-E3 ligase PIAS1 a été décrite pour favoriser une sumoylation sur la K152 du domaine FERM *in vitro* (Fonseca et *al.,* 2013) **(Figure 25)**. Ce phénomène est corrélé à une augmentation de la phosphorylation de la Y397 ainsi qu'à une accumulation de la protéine FAK dans le noyau des cellules. Bien que le mécanisme à l'origine de cette augmentation de l'activité kinase reste inconnu à ce jour, il est possible que la sumoylation de la K152, située à proximité du site d'interaction FERM-kinase, puisse interférer avec l'auto-inhibition de la protéine.

4.5. PTEN

La PI3K interagit avec les régions riches en proline de FAK afin de favoriser l'activation de la voie PI3K/Akt et de promouvoir l'adhésion et la survie cellulaire (Zhang et *al.,* 2018). Comme mentionné précédemment, la phosphatase lipidique PTEN a pour principale fonction d'être un régulateur négatif de la voie de PI3K en convertissant le PI(3,4,5)P3 en PI(4,5)P2, inhibant ainsi la migration, l'invasion et la survie des cellules cancéreuses (Lu & Rounds, 2012). Outre cette fonction, PTEN a été décrit pour interagir avec la forme active de FAK afin de déphosphoryler le site Y397 et d'inhiber l'adhérence cellulaire (Haier & Nicolson, 2002). Enfin, PTEN est rapporté pour inhiber l'expression de FAK dans les myélomes et les cancers gastriques (Wang et *al.,* 2012).

III. FAK dans le développement

L'importance de FAK dans le développement a été mise en évidence suite au développement de modèle *knockout*. En effet, la délétion de FAK dans les cellules souches embryonnaires de souris par recombinaison homologue aboutit à une mort embryonnaire à 8,5 jours. A ce stade du développement et plus particulièrement durant la gastrulation, les mouvements coordonnés des cellules du mésoderme sont importants or la protéine FAK est fortement exprimée dans cette région. Les embryons déficients en FAK présentent une absence de formation de somites, un cœur rudimentaire, un manque de circulation efficace et une notochorde peu visible. Ces défauts au niveau du mésoderme suggèrent que l'expression de FAK est importante dans la migration, la prolifération ou la survie de ces cellules. La délétion tissu-spécifique de FAK a clairement révélé l'importance de cette protéine dans le développement cardio-vasculaire. Il a notamment été rapporté que la délétion de FAK dans les cellules endothéliales aboutit à la mort des souris entre 9,5 et 11,5 jours (Braren et *al.,* 2006). Bien que les cellules endothéliales puissent se différencier, celles-ci sont incapables de former des vaisseaux sanguins fonctionnels. Des études réalisées sur le Xénope lisse ont également souligné le rôle crucial de FAK dans la migration et l'angiogenèse (Doherty et *al.,* 2010). Par ailleurs, il a été démontré que FAK joue un rôle important dans le développement neural. En effet, des *knockout* conditionnels ou inductibles chez la souris ont mis en évidence que la protéine FAK est impliquée dans les processus de myélinisation, dans le branchement neuronal et dans la formation de synapses dans le système nerveux central (Forrest et *al.,* 2009 ; Rico et *al.,* 2004). Enfin, chez la souris, la délétion de FAK dans les cellules épithéliales mammaires a démontré l'importance de la protéine dans le développement de la glande mammaire durant la gestation (Nagy et *al.,* 2007 ; Hall et *al.,* 2011).

IV. FAK dans les cancers

Depuis sa découverte, de nombreuses études ont décrit l'importance de la protéine FAK dans les cancers. En effet, cette protéine est surexprimée ou suractivée dans un certain nombre de cancer et ce phénomène peut être associé à un mauvais pronostique. De plus, il a été rapporté dans des modèles *in vitro* et *in vivo* que la protéine FAK favorise le développement et la dissémination des cellules cancéreuses en intervenant dans de nombreuses voies de signalisation. Outre ses fonctions kinases, la protéine FAK possède une fonction kinase-indépendante également appelée *scaffolding*. Comprendre l'équilibre entre les fonctions kinases et les fonctions *scaffolding* de cette protéine est essentiel dans l'élaboration d'une stratégie thérapeutique.

1. La surexpression et la suractivation de FAK

Par PCR et par immunohistochimie, l'expression de la FAK a largement été étudiée dans les tissus tumoraux et leurs équivalents normaux afin de mettre en évidence une surexpression de la protéine dans une grande variété de cancers épithéliaux. De manière intéressante, il a été mis en évidence que l'expression de FAK est associée à un mauvais pronostique dans un certain nombre de ces cancers. En effet, des bases de données telles que l'Atlas du génome du cancer montrent que les niveaux d'ARNm de FAK sont augmentés dans les tumeurs ovariennes agressives (environ 37%) ainsi que les cancers du sein invasifs (environ 26%) (Sulzmaier et *al.,* 2014) **(Figure 26)**. L'analyse transcriptomique de tumeurs humaines a également montré que l'expression de FAK est augmentée selon le stade de malignité dans les carcinomes hépatocellulaires (Cance et *al.,* 2000), les leucémies myéloïdes aiguës (Fujii et *al.,* 2004), les tumeurs ovariennes (Sood et *al.,* 2004) et les tumeurs mammaires (Cance et *al.,* 2000 ; Lark et *al.,* 2005). Bien qu'aucune surexpression n'ait été observée dans le mélanome, il a été démontré que l'activité de la protéine FAK, déterminée par la reconnaissance du site d'autophosphorylation de la protéine en western blot ou en immunohistochimie, augmente avec l'agressivité de la tumeur (Hess et *al.,* 2005 ; Kahana et *al.,* 2002). Ces résultats suggèrent donc que FAK peut être un marqueur de pronostic. Cependant, il existe des études contradictoires montrant une absence de valeurs pronostiques dans la surexpression ou la suractivation de la protéine FAK dans le cas du cancer du sein sans envahissement ganglionnaire (Schmitz et *al.,* 2005), du carcinome du côlon (Theocharis et *al.,* 2003), du carcinome colorectal (Ayaki et *al.,* 2001) ou du cancer du pancréas résécable (Furuyama et *al.,* 2006). Certaines études suggèrent même le contraire, à savoir un meilleur résultat pour les patients présentant une expression élevée de FAK, comme cela a été démontré pour le cancer du col de l'utérus (Gabriel et *al.,*

2006) et le cancer gastrique de type diffus carcinome (Giaginis et *al.,* 2009). Ces résultats contradictoires mettent donc en évidence des rôles différents de la protéine FAK selon le stade et le type de la tumeur. Malgré les résultats divergents quant aux niveaux d'expression et d'activation de la protéine FAK dans les cancers, l'ensemble des études réalisées *in vitro* et *in vivo* s'accordent sur le fait que FAK favorise le développement et la dissémination des cellules cancéreuses en régulant la prolifération, la survie, la réponse immunitaire, la migration et l'invasion.

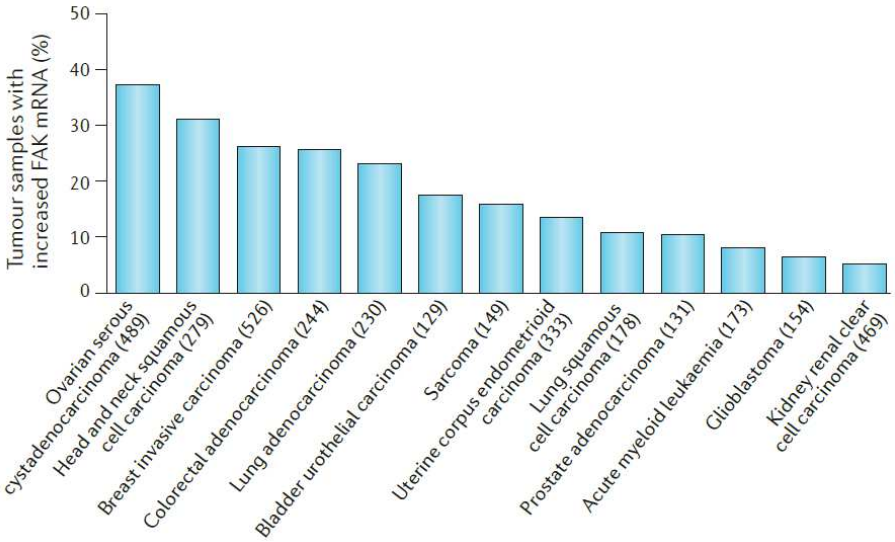


Figure 26 : La surexpression de FAK dans les cancers. Pourcentage d'échantillons de tumeurs présentant des niveaux accrus d'ARNm de FAK en se basant sur les données de L'Atlas du génome du cancer. Le nombre de tumeurs analysées est indiqué entre parenthèses sur l'axe des abscisses. Adapté de Sulzmaier et *al.,* 2014

2. <u>L'immunité</u>

Ces dernières années, FAK a été rapportée pour favoriser le recrutement les cellules du système immunitaire dans les tumeurs. En effet, le *knockout* de FAK spécifique aux lignées myéloïdes chez la souris diminue la capacité des neutrophiles à tuer les pathogènes (Kasorn et *al.,* 2009). De même, les macrophages primaires de moelle osseuse issues de souris déficientes en FAK présentent une chimiotaxie directionnelle réduite *in vitro* en comparaison des cellules contrôles (Owen et *al.,* 2007). Cela induit *in vivo* une perturbation du recrutement des monocytes aux sites inflammatoires (Owen et *al.,* 2007). D'autres études ont également mis en évidence dans des modèles murins de cancer du sein et d'adénocarcinome pancréatique que l'inhibition de FAK diminue l'infiltration des leucocytes et des macrophages dans les tumeurs à l'origine d'une réduction du développement tumoral (Stokes et *al.,* 2011 ; Walsh et *al.,* 2010).

Par ailleurs, dans un modèle de souris présentant un système immunitaire fonctionnel, la délétion de FAK réduit la croissance des cellules de carcinome épidermoïde en comparaison des cellules *wild type* (Serrels et *al.,* 2015). De manière surprenante, il a été démontré que l'activité kinase de FAK dans le noyau favorise le recrutement des Treg dans les tumeurs (Serrels et *al.,* 2015 ; Tan et *al.,* 2009). En effet, l'expression d'un mutant de FAK dépourvu d'activité kinase ou l'inhibition pharmacologique de la protéine, empêche la formation de cet environnement immunosuppresseur (Jiang et *al.,* 2016 ; Serrels et *al.,* 2015). Ces résultats attestent de l'importance de l'activité kinase de FAK dans le noyau et supportent le fait que le niveau nucléaire de FAK actif puisse être un indicateur de pronostic.

3. La prolifération et la survie cellulaire

FAK a été initialement rapporté pour favoriser le développement tumoral en stimulant la progression du cycle cellulaire dans des lignées de fibroblastes et dans des cellules endothéliales. En effet, la micro-injection du dominant négatif FRNK dans ces cellules induit la délocalisation de la protéine hors des FAs à l'origine d'une diminution de la synthèse d'ADN (Gilmore & Romer, 1996). Il a également été démontré que la surexpression de FAK dans plusieurs lignées de fibroblastes accélère la transition G1/S en augmentant l'expression de la cycline D1 tout en inhibant celle de la *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor* 1 ou p21. En parallèle, dans les cellules cancéreuses, plusieurs voies de signalisation de FAK ont été décrites pour favoriser la prolifération cellulaire. La formation du complexe FAK-Src aboutit à la phosphorylation de la Y925 de FAK afin de créer un site de liaison pour la protéine adaptatrice Grb2 et d'activer la voie des MAPK (Schlaepfer et *al.,* 1998). De plus, il a démontré que la protéine ERK favorise l'activation du facteur de transcription EtsB afin de permettre la liaison de la protéine FAK à l'origine de la régulation transcriptionnelle de la cycline D1 (Zhao et *al.,* 2001). D'autres mécanismes impliquant l'activation de JNK/c-Jun par le complexe FAK-Src-p130Cas ont également été proposés pour réguler l'expression de la cycline D1 (Oktay et *al.,* 1999). Ces résultats soutiennent donc que l'activité kinase de FAK régule les signaux intrinsèques des cellules qui favorisent la prolifération.

D'un autre côté, l'activation de FAK aux FAs permet aux cellules cancéreuses de prévenir la mort cellulaire induite par le détachement de leur matrice, également appelée anoïkose. En effet, l'expression d'un mutant de FAK constitutivement actif dans des cellules épithéliales prévient cette mort cellulaire (Chan et *al.,* 1994) tandis que l'inhibition de son activité kinase induit l'apoptose des cellules (Hungerford et *al.,* 1996). Il a été démontré dans différents modèles

cellulaires que la liaison de la PI3K sur le site phosphorylé Y397 de FAK conduit à l'activation de la voie Akt et à l'inhibition des protéines pro-apoptotiques telles que Bad et GSK3 (Hennessy et *al.,* 2005). Par exemple, dans un modèle de leucémie, l'activation de la voie PI3K-Akt par la protéine FAK augmente l'activation du facteur NF-κB afin d'exprimer des inhibiteurs de l'apoptose et de protéger les cellules contre la mort cellulaire (Sonoda et *al.,* 2000).

Enfin, la translocation de FAK dans le noyau grâce à son domaine NLS contribue à la prolifération et à la survie cellulaire indépendamment de l'activité kinase **(Figure 27)**. Une fois dans le noyau, FAK interagit avec le suppresseur de tumeur p53 et avec l'E3 ubiquitine ligase MDM2, via le lobe F1 FERM et F3 FERM respectivement, afin de favoriser l'ubiquitination et la dégradation de la protéine p53 (Lim et *al.,* 2008). La dégradation de cette protéine diminue l'expression des protéines inhibitrices du cycle cellulaire telles que p21 afin d'empêcher l'arrêt du cycle cellulaire et s'accompagne également d'une inhibition des signaux pro-apoptotiques (Kurenova et *al.,* 2004). Par ailleurs, la protéine p53 étant le principal répresseur du gène PTK2, sa dégradation conduit également à une surexpression de la protéine FAK (Cance & Golubovskaya, 2008).

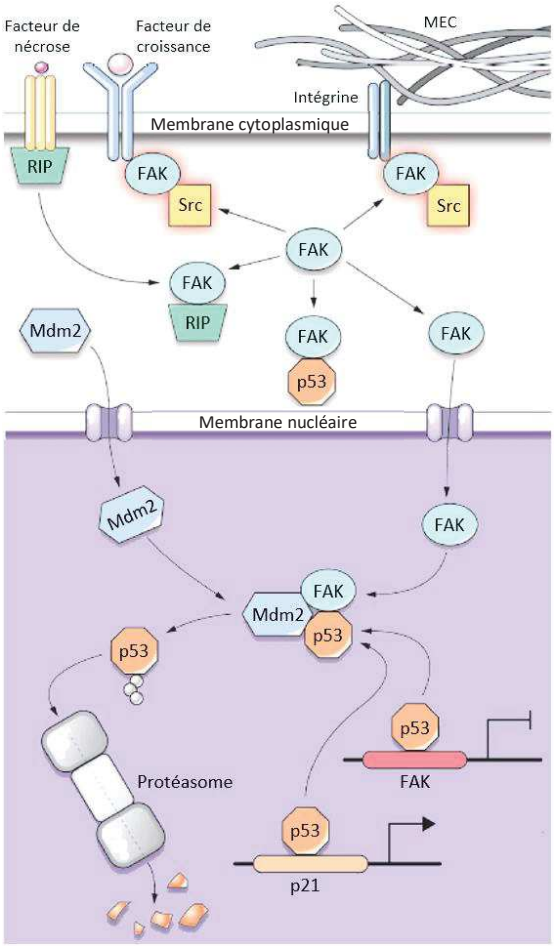


Figure 27 : La fonction *scaffolding* de FAK régule la survie et la prolifération. En l'absence de signaux membranaires, FAK s'accumule dans le cytoplasme, où, par un mécanisme indépendant de son activité kinase, elle séquestre la protéine kinase RIP afin de prévenir des signaux pro-apoptotiques. Bien que son effet soit encore inconnu, FAK est également décrite pour interagir avec p53 dans le cytoplasme. En parallèle, dans le noyau, p53 favorise la transcription du gène codant pour p21, provoquant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire, et se lie à la région promotrice du FAK afin d'inhiber sa transcription. Suite à sa translocation dans le noyau, FAK interagit avec Mdm2 afin de dégrader la protéine p53 à l'origine d'une augmentation de la survie et de la prolifération cellulaire ainsi que d'une surexpression de la protéine FAK. Adapté de Cance & Golubovskaya, 2008.

4. La migration

L'implication de FAK dans la migration cellulaire a initialement été mise en évidence par une augmentation de l'activité ou de l'expression de la protéine durant la migration des cellules endothéliales et des kératinocytes (Gates et *al.,* 1994). Par la suite, il a été démontré que des fibroblastes dérivés d'embryon de souris FAK *knockout* migrent moins efficacement que des cellules de souris *wild type (*Ilic et *al.,* 1995). De manière intéressante, tandis que la réexpression de la protéine FAK *wild type* dans les cellules délétées restaure la migration cellulaire, la surexpression d'un mutant dépourvu d'activité kinase (Y397F FAK) n'influence pas la migration des cellules (Cary et *al.,* 1996 ; Owen et *al.,* 1999 ; Sieg et *al.,* 1998). Ces résultats suggèrent donc que l'activité kinase de FAK favorise la migration cellulaire. Depuis, des études ont décrit l'importance de FAK dans la dynamique des adhérences focales dans de nombreuses lignées cellulaires saines et cancéreuses et la migration est aujourd'hui la fonction de FAK la mieux décrite.

4.1. L'assemblage des adhérences focales

Bien que la protéine FAK soit recrutée précocement dans les adhérences focales afin de phosphoryler de nombreux partenaires sur leurs sites tyrosines, elle n'est pas essentielle à la formation de ces structures (Kirchner et *al.,* 2003 ; Zaidel-Bar et *al.,* 2003). En effet, les fibroblastes déficients en protéine FAK forment toujours des structures d'adhérence mais celles-ci ne subissent pas un cycle de maturation normal (Ilic et *al.,* 1995). Néanmoins, il est important de souligner que la réexpression de FAK *wild type* dans ces cellules induit la réorganisation des FAs « immatures » afin de les connecter aux fibres de stress d'actine et ainsi permettre la contractibilité et la polarisation cellulaire (Ilic et *al.,* 1995).

L'un des mécanismes par lequel FAK participe à la formation des FAs consiste à réguler l'enrichissement lipidique. En effet, en exprimant un mutant de FAK (D395A) incapable d'interagir avec la PI3K ou en l'inhibant avec de la wortmannine ou du LY294002, des études ont mis en évidence que les voies de signalisation sous-jacentes du complexe FAK-PI3K favorisent la migration cellulaire (Reiske et *al.,* 1999). Par ailleurs, FAK favorise la production de PI(3,4)P2 par la PIPKIγ (*Type I phosphatidylinositol phosphate kinase- γ*) au niveau de ces structures créant ainsi un site de liaison pour la taline et la vinculine **(Figure 28a)**. La taline peut alors former un lien entre les intégrines et le cytosquelette d'actine en liant directement les β-intégrines par le biais de son domaine FERM ainsi que par son interaction avec le PI(3,4)P2, la vinculine et l'α-actinine (Mitra et *al.,* 2005). Néanmoins, les sites de liaison aux intégrines et

à la PIPKIγ sur le domaine FERM de la taline se chevauchement et il a été démontré que la phosphorylation en Y644 de la PIPKIγ par le complexe FAK-Src créé un site de liaison de haute affinité pour la taline à l'origine d'une inhibition de l'interaction taline-intégrine (Barsukov et *al.,* 2003). Ainsi, bien que FAK-Src favorise la production de PI(3,4)P2 et la formation de contacts focaux en activant la PIPKIγ, la phosphorylation du site Y644 de PIPKIγ par Src inhibe le complexe taline-intégrine et conduit à la déformation des FAs.

D'un autre côté, la formation du complexe FAK-Src et la subséquente phosphorylation des partenaires protéiques est l'une des voies de signalisation pro-migratoire les plus étudiées (Cary et *al.,* 1996 ; Owen et *al.,* 1999 ; Sieg et *al.,* 1998). En effet, l'autophosphorylation en Y397 de la protéine FAK et la liaison de la protéine Src sur ce site de liaison favorise la migration cellulaire tandis que l'expression d'un mutant non activable de FAK (Y397F) inhibe à la fois l'interaction FAK-Src et la migration cellulaire dans de nombreux modèles (Cary et *al.,* 1996 ; Cary et *al.,* 1998 ; Owen et *al.,* 1999). Une fois formé, le complexe FAK-Src est capable de recruter et de phosphoryler la protéine adaptatrice p130Cas **(Figure 28a)**. L'activation de la protéine p130Cas aboutit notamment au recrutement de protéines contenant des domaines SH2 telles que Crk afin d'activer la protéine Rac et de permettre la formation des lamellipodes (Brabek et *al.,* 2004). A l'inverse, la dissociation de la protéine p130Cas de ce complexe par mutagénèse dirigée ou à l'aide d'un dominant négatif a été rapporté pour inhiber la migration cellulaire (Cary et *al.,* 1998).

Enfin, en régulant les GTPases de la famille Rho, FAK participe également à l'assemblage du cytosquelette d'actine des FAs **(Figure 28a-c)**. En effet, FAK interagit par le biais de son domaine FAT avec la protéine p190RhoGEF afin d'activer la GTPase RhoA et de promouvoir la formation de fibres de stress d'actine (Schlaepfer et *al.,* 2004). Il a notamment été démontré que la formation du complexe FAK-p190RhoGEF dans les FAs favorise la migration des cellules de carcinomes de colon (Miller et *al.,* 2013). De plus, FAK régule la polymérisation de l'actine par son interaction avec un effecteur de Cdc42, la protéine N-WASP. Néanmoins la protéine FAK est décrite pour interagir uniquement avec la protéine N-WASP activée par Cdc42 et n'est pas capable d'activer elle-même cette protéine (Mitra et *al.,* 2005). Ainsi, la phosphorylation du site Y256 de N-WASP par FAK n'affecte pas son activité mais conduit à l'accumulation cytoplasmique de la protéine afin de favoriser le remodelage de l'actine à l'avant de la cellule en migration (Wu et *al.,* 2004).

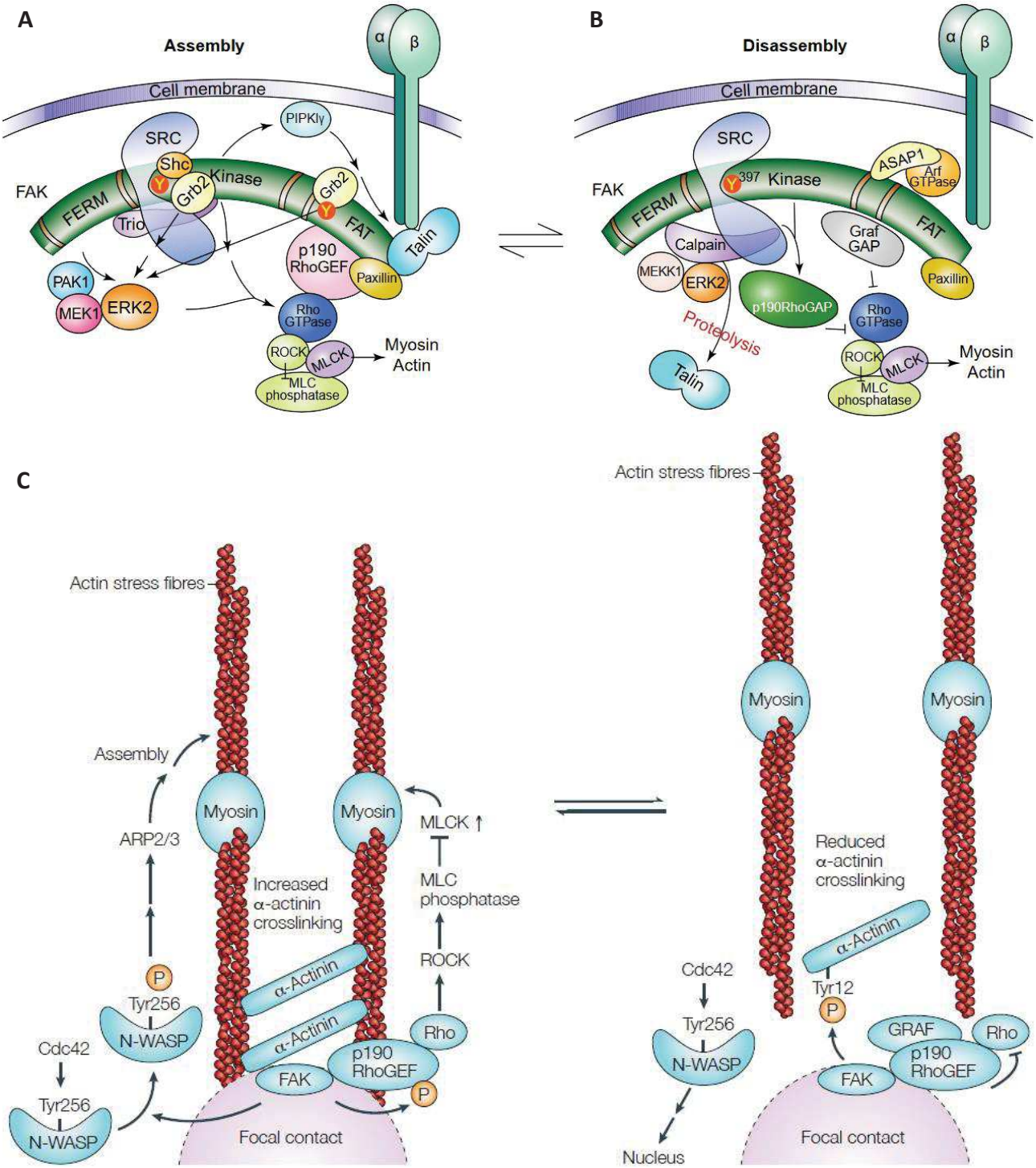


Figure 28 : FAK régule la dynamique des adhérences focales. (**A**) Les RhoGTPases (RhoA) régulent indirectement la phosphorylation de la MLC en activant la MLCK ou en inhibant la MLCP. FAK régule l'activité des RhoGTP par le biais de plusieurs mécanismes dépendants de la kinase ERK. De plus, FAK favorise l'interaction de la paxilline avec les intégrines et donc la formation des FAs en activant la PIPKIγ. (**B**) A l'inverse, l'inhibition des RhoGTPases induit un réarrangement de l'actine et le désassemblage des FAs. FAK régule l'activité des RhoGTPases et des ArfGTPases en interagissant respectivement avec les protéines GAP Graf et ASAP1. Le complexe FAK-Src inhibe également les RhoGTPases en activant la p190RhoGAP. Par ailleurs, une protéolyse sélective des protéines associées aux FAs telles que la taline favorise le *turn-over* des structures et l'inhibition de l'interaction FAK-paxilline altère les voies de signalisations de FAK décrites ci-dessus. (**C**) Enfin, tandis que la phosphorylation de N-WASP par FAK favorise la polymérisation de l'actine et la migration cellulaire, FAK peut également phosphoryler l'α-actinine afin d'inhiber sa liaison à l'actine et déstabilise les FAs. Adapté de Schlaepfer & Mitra, 2004 et de Mitra et *al.,* 2005.

4.2. Le désassemblage des adhérences focales

Plusieurs études ont également observé que l'état de phosphorylation de FAK régule sa localisation subcellulaire ainsi que sa capacité à réguler le désassemblage des structures d'adhérence. En effet, une étude de FRAP réalisée par notre laboratoire sur un modèle d'astrocytome humain a démontré l'importance de la phosphorylation des sites Y397 et Y576 de FAK dans le désassemblage des FAs (Hamadi et *al.,* 2005). De même, le suivi par vidéo-microscopie du taux d'incorporation de la paxilline dans des fibroblastes exprimant ou non la protéine FAK a souligné l'importance du complexe FAK-Src dans le *turn-over* des structures d'adhérence (Webb et *al.,* 2004 ; Zaidel-Bar et *al.,* 2003).

D'un point de vue moléculaire, plusieurs mécanismes ont été mis en évidence. Il a été démontré que la phosphorylation de la paxilline en Y31 et en Y118 par le complexe FAK-Src conduit au recrutement de la protéine adaptatrice Crk et de la phosphatase PTP-PEST afin de déphosphoryler la p130Cas et de favoriser le désassemblage des FAs (Petit et *al.,* 2000 ; Turner, 2000). D'un autre côté, outre le fait de stimuler la voie des MAPK, la liaison de Grb2 sur le site Y925 phosphorylé de FAK favorise l'exclusion de la protéine hors des FAs et inhibe le *turn-over* des structures (Katz et *al.,* 2003) **(Figure 29)**. De manière intéressante, une précédente étude du laboratoire a également rapporté que l'expression d'un mutant de FAK non phosphorylable en Y925 (Y925F) présente une interaction accrue avec la paxilline inactive et ce faisant conduit à une stabilisation des FAs et à une inhibition de la migration cellulaire (Deramaudt et *al.,* 2011). A l'inverse, l'expression d'un mutant de FAK constitutivement phosphorylé en Y925 (Y925E) s'accompagne d'une augmentation de la phosphorylation de la paxilline et de p130Cas à l'origine d'une augmentation du *turn-over* des FAs et de la migration cellulaire (Deramaudt et *al.,* 2011). Collectivement, ces résultats suggèrent donc que la phosphorylation en Y925 de FAK induit une compétition entre Grb2 et la paxilline puisque leurs sites de liaisons se chevauchent partiellement (Liu et *al.,* 2002), à l'origine d'une délocalisation temporaire de FAK hors des FAs avant d'être recruté de nouveau dans le but de favoriser le dynamisme des structures. Enfin, la liaison de ERK sur la S910 phosphorylé de FAK inhibe l'interaction FAK-paxilline et favorise l'exclusion de la protéine hors des FAs (Hunger-Glaser et *al.,* 2004) **(Figure 29)**. Ce processus fait probablement partie d'un cycle dans lequel FAK-Src active la voie de ERK afin d'exclure FAK des FAs dans un premier temps ; puis dans un second temps, ERK active la paxilline pour recruter de nouveau la protéine FAK et ce dans le but de former de nouveaux points d'adhérences (Ishibe et *al.,* 2004 ; Liu et *al.,* 2002).

Par ailleurs, en interagissant avec des protéines GAP, telles que Graf ou ASAP1, la protéine FAK inhibe l'activité des RhoGTPases et des ArfGTPases respectivement provoquant ainsi un réarrangement de l'actine et le désassemblage des FAs **(Figure 28b)**. Il a été notamment été démontré dans des fibroblastes déficients en FAK que l'activité intrinsèque de la protéine RhoA est accrue et que la réexpression de FAK *wild type* dans ces cellules réduit l'activité de la GTPase en augmentant l'activité de la p190RhoGAP (Chen et *al.,* 2002 ; Mitra et *al.,* 2005).

Enfin, le désassemblage des FAs est également dépendant de la protéolyse des molécules d'adhérences, telles que la taline et FAK, par les calpaïnes. En effet, des cellules n'exprimant pas la calpaïne 4 présentent un nombre accru de FAs (Dourdin et *al.,* 2001). Ces protéases forment un complexe avec les protéines ERK2, Src et FAK afin d'être activées et de favoriser le *turn-over* des FAs (Carragher et *al.,* 2003). De manière intéressante, dans des cellules déficientes en FAK, l'expression d'un mutant de FAK incapable d'être phosphorylé par Src sur plusieurs sites (Y407F, Y576F, Y577F, Y861F et Y925F) n'empêche pas la formation de ce complexe mais ne restaure pas pleinement l'activité des calpaïnes pour autant, contrairement à des cellules réexprimant la protéine FAK *wild type* (Westhoff et *al.,* 2004).

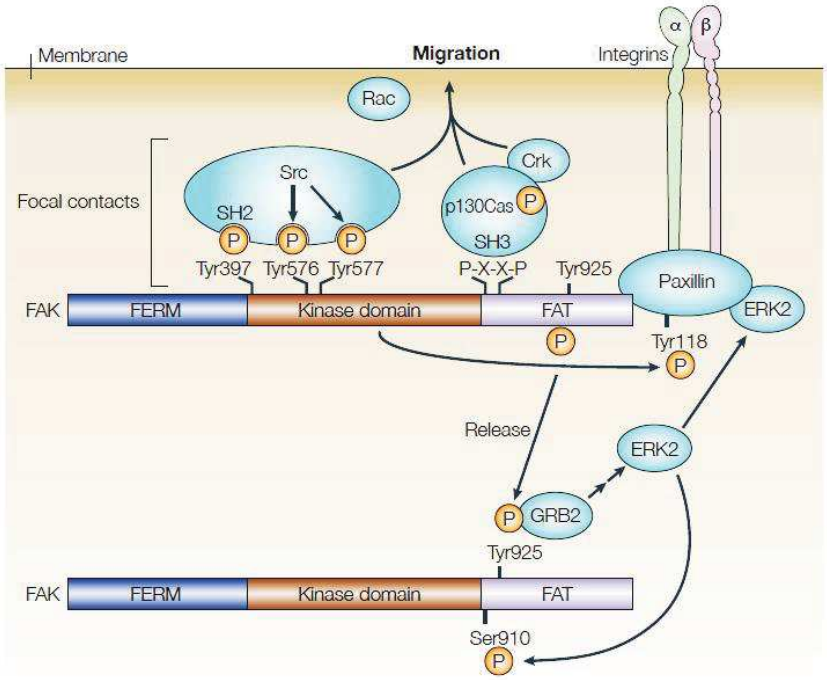


Figure 29 : Les sites de phosphorylation de FAK régule le *turn-over* des adhérences focales. Une fois activée par Src, FAK interagit avec p130Cas afin de promouvoir l'activation de Rac, la formation de lamellipodes et la migration cellulaire. La liaison de la paxilline au domaine FAT est essentielle à la localisation de FAK dans les FAs et aux subséquentes voies de signalisation pro-migratoires. Cependant, la liaison de Grb2 au site Y925 de FAK ainsi la phosphorylation de S910 par ERK ont été décrit pour inhiber l'interaction FAK-paxilline, délocaliser FAK en dehors des contacts focaux et favoriser le *turn-over* des structures. Adapté de Mitra et al., 2005.

5. L'invasion

5.1. La transition épithélio-mésenchymateuse

FAK est également décrite pour favoriser la TEM afin d'accroître les capacités migratoires et invasives des cellules cancéreuses. Dans le cancer du sein, il a notamment été démontré que le complexe FAK-Src favorise la phosphorylation de l'endophiline A2 afin d'induire l'expression de marqueurs mésenchymateux, tels que la MT1-MMP (Fan et *al.,* 2013 ; Wu et *al.,* 2005). A l'inverse, une diminution de l'expression de FAK entraîne une diminution des marqueurs mésenchymateux et une augmentation de l'expression de la E-cadhérine (Kong et *al.,* 2012). De plus, la protéine FAK régule l'internalisation de le E-cadhérine dans les cellules cancéreuses (Canel et *al.,* 2013). En effet, la surexpression d'un mutant de FAK incapable d'être phosphorylé par Src sur plusieurs sites (Y407F, Y576F, Y577F, Y861F et Y925F) inhibe l'internalisation de la E-cadhérine dans les cellules de carcinome du côlon (Avizienyte et *al.,* 2002) tandis que l'inhibition de l'activité kinase de FAK stabilise les adhérences cellule-cellule en favorisant l'expression des E-cadhérines à la surface (Canel et *al.,* 2010).

5.2. L'angiogenèse

Plusieurs modèles de souris transgéniques ont mis en évidence que l'expression et l'activité de FAK dans les cellules endothéliales est essentielle au cours à l'angiogenèse. En effet, le *knockout* global de la protéine ou spécifique aux cellules endothéliales, ainsi que l'expression d'un mutant dépourvu d'activité kinase, entraine de nombreuses anomalies vasculaires léthales dans l'embryon (Braren et *al.,* 2006 ; Lim et *al.,* 2010 ;Shen et *al.,* 2005). Il a également été démontré chez la souris que l'inhibition de la protéine FAK réduit la mobilité des cellules endothéliales à l'origine d'une inhibition de l'angiogenèse (Angelucci & Bologna, 2007). Par ailleurs, les cellules endothéliales d'une tumeur présentent des niveaux d'ARNm, d'expression et d'activité en Y397 de la protéine FAK augmentés par rapport aux cellules normales (Jean et *al.,* 2014). L'implantation d'un gliome chez des souris présentant des cellules endothéliales déficientes en protéine FAK conduit à une normalisation vasculaire de la tumeur (Lee et *al.,* 2010). De même, la délétion de FAK dans les cellules endothéliales chez des souris porteuses d'un mélanome ou d'un carcinome pulmonaire entraîne une inhibition de la croissance tumorale par altération de l'angiogenèse (Tavora et *al.,* 2010). Ainsi, l'inhibition de FAK est rapportée pour réduire l'angiogenèse tumorale dans des modèles *in vivo* de cancer du sein (Benlimame et *al.,* 2005), de côlon humain (Schultze & Fiedler, 2010), d'ovaires (Halder et *al.,* 2007), de mélanome (Jean et *al.,* 2014) et de carcinome hépatocellulaire (Bagi et *al.,* 2009) **(Figure 30)**.

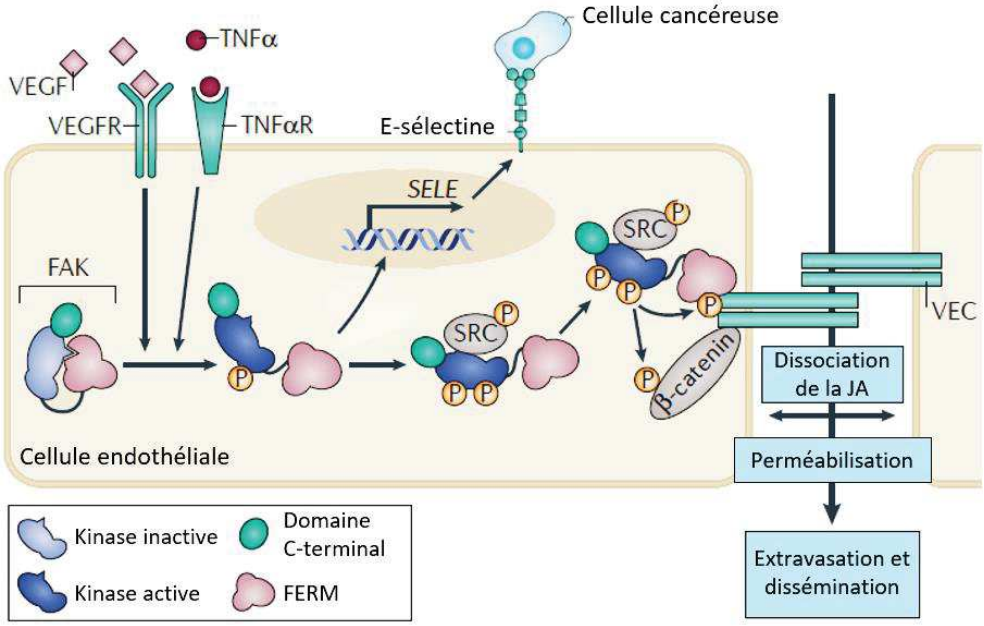


Figure 30 : FAK régule la perméabilité vasculaire des cellules endothéliales. Une fois activée par les facteurs de croissance, FAK stimule la transcription de la E-sélectine (codée par SELE) afin de favoriser l'adhérence des cellules cancéreuses à la surface des cellules endothéliales. Par ailleurs, le complexe FAK-Src est recruté aux jonctions des cellules endothéliales afin d'interagir avec la cadhérine de l'endothélium vasculaire (VEC) ainsi qu'avec la β-caténine pour les phosphoryler respectivement en Y658 et Y142. La phosphorylation des deux protéines favorise la dissociation du complexe VEC-β-caténine et la dégradation de VEC. La perte de VEC à la surface des cellules endothéliales entraîne alors une augmentation de la perméabilité vasculaire et permet aux cellules tumorales de traverser la barrière endothéliale afin de se disséminer dans l'organisme. Adapté de Sulzmaier et *al.,* 2014.

5.3. La dégradation matricielle par les invadopodes

Enfin, la localisation de la protéine FAK ainsi que son rôle dans la formation et l'activité des invadopodes restent mitigés. Des premières études sur des fibroblastes transformées par v-Src ont rapporté que Src favorise l'interaction entre l'intégrine β1 et FAK au niveau des invadopodes en rosette (Hauck et *al.,* 2002). De même, FAK a été observé dans les invadopodes ponctiformes des cellules MCF10A-CA1 du cancer du sein où elle semble favoriser l'activité de ces structures (Alexander et *al.,* 2008). En effet, tandis que la surexpression de FAK favorise l'activité des invadopodes des cellules cultivées sur une MEC rigide, cela n'affecte pas les cellules cultivées sur un substrat mou (Alexander et *al.,* 2008). Pan et son équipe ont quant à eux démontré que la protéine FAK est présente dans les invadopodes en rosette ainsi que dans une faible proportion des invadopodes ponctiformes des fibroblastes transformés par v-Src (Pan et *al.,* 2011). De manière paradoxale, tandis que FAK est indispensable à la formation des structures en rosette, il semblerait que la protéine est non-essentielle à la formation des invadopodes ponctiformes (Pan et *al.,* 2011 ; Vitale et *al.,* 2008). Il a également été démontré

dans cette étude que l'expression d'un mutant de FAK dépourvu d'activité kinase inhibe l'activité des invadopodes en rosette soulignant le rôle pro-invasif de la protéine (Pan et *al.,* 2011 ; Parekh & Weaver, 2009). A l'inverse, dans les cellules de cancer du sein humain, dans les cellules d'adénocarcinome mammaire de rat ainsi que dans les cellules de mélanome murin, FAK n'est pas localisée dans les invadopodes ponctiformes et elle régule négativement ces structures (Bowden et *al.,* 2006 ; Chan et *al.,* 2009b ; Genna et *al*., 2018 ; Kolli-Bouhafs et *al.,* 2014). En effet, dans ces cellules, la déplétion de FAK à l'aide d'un siRNA induit une réduction importante de la migration cellulaire ainsi qu'une augmentation du nombre d'invadopode et de la dégradation matricielle. Ces études ont mis en évidence que la protéine FAK régule la balance entre migration et dégradation grâce à la phosphorylation de son site Y397. Selon ce modèle, la phosphorylation de la Y397 de FAK contrôle la localisation de la protéine Src entre les FAs et les invadopodes. Il a été démontré dans les cellules que la délétion de FAK ou que l'expression d'un mutant dépourvu d'activité kinase induit une diminution du taux de protéines phosphorylées aux niveaux des FAs coïncidant avec le désassemblage de ces structures mais s'accompagne également d'un recrutement de Src au niveau des invadopodes par Pyk2, débouchant sur la phosphorylation de nombreuses tyrosines, telles que Tks5, à l'origine d'une

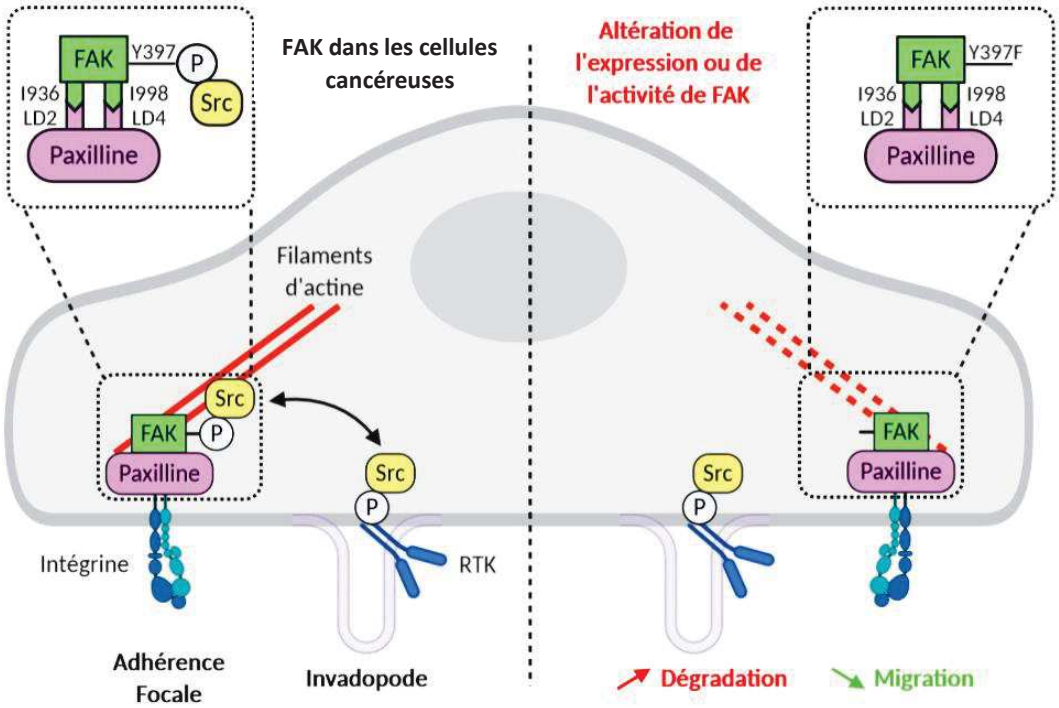


Figure 31 : FAK régule la balance migration-dégradation en contrôlant la localisation de Src. (**A gauche**) Grâce à sa phosphorylation en Y397, FAK recrute Src aux FAs afin d'activer leurs partenaires et de favoriser les voies de signalisation pro-migratoires. (**A droite**) La délétion ou l'inhibition du site de liaison de Src (FAK Y397F), libère la protéine Src des FAs, lui permettant d'être recrutée dans les invadopodes par Pyk2 afin de promouvoir la phosphorylation de Tks5 et la dégradation de la MEC tout en inhibant la migration cellulaire.

augmentation du nombre d'invadopodes et de l'activité protéolytique (Chan et *al.,* 2009b ; Genna et *al*., 2018 ; Kolli-Bouhafs et *al.,* 2014) **(Figure 31)**. De manière intéressante, malgré une formation accrue d'invadopodes, il a été rapporté que l'invasion des cellules MTLn3 et MDA-MB-231 déficientes en FAK à travers une matrice de Matrigel est altérée (Chan et *al.,* 2009b ; Genna et *al*., 2018). Bien que l'activité protéolytique soit indispensable à l'invasion des cellules cancéreuses, ces résultats mettent en avant qu'une dégradation accrue de la matrice n'est pas suffisante pour une invasion efficace des cellules tumorales déficientes en FAK. A l'inverse, une précédente étude de notre laboratoire sur des cellules de mélanome murin a démontré que l'invasion des cellules cancéreuses déficientes en FAK à travers une matrice de Matrigel est accrue et ce malgré l'inhibition de la migration cellulaire (Kolli-Bouhafs et *al.,* 2014). Ces résultats contradictoires permettent de supposer que FAK via une modulation de son taux d'expression, de son activité ou de sa localisation subcellulaire pourrait avoir des effets différents en fonction du type cellulaire, du stade de malignité ou du microenvironnement.

V. Les thérapies ciblant FAK

La participation de FAK à l'ensemble des points clé de l'invasion tumorale fait d'elle une cible d'intérêt potentiel sur le plan thérapeutique. Ces dernières années de nombreuses molécules inhibant FAK ont d'ailleurs été développés et étudiés en essais cliniques. Les inhibiteurs de FAK peuvent être séparés en trois groupes : les petites molécules inhibitrices du domaine kinase, les inhibiteurs allostériques et les inhibiteurs d'interaction protéine-protéine.

1. Les inhibiteurs du domaine kinase

Les petites molécules inhibitrices de l'activité kinase sont des analogues de l'ATP. Du fait de la forte similarité des sites de liaison à l'ATP entre les protéines, une molécule ciblant ce domaine peut potentiellement se lier à d'autres protéines que celles d'intérêts et induire des effets *off-target*. En effet, certaines molécules inhibant l'activité kinase de FAK présentent une forte sélectivité et d'autres inhibent plusieurs protéines. Cette sélectivité est notamment définie par la capacité des molécules à stabiliser l'hélice hélicoïdale contenant la boucle DFG de FAK (Lietha et *al*., 2008 ; Roberts et *al*., 2008). Une brève description des principaux composés développés sera réalisée dans cette partie **(Tableau 2)** :

L'un des premiers composés à avoir été développé est le **PF-573228**, un inhibiteur hautement sélectif de FAK. En effet, cette molécule présente une affinité 250 fois plus fortes pour FAK

Tableau 2 : Les principaux inhibiteurs du domaine kinase de FAK.

Molécule	Sélectivité - IC50 *in vitro*		Cancer ciblé	Essai Clinique
	FAK	Autres protéines		
PF-573,228	4nM	> 1000nM	Prostate et sein	Préclinique
TAE-226	5,3nM	5nM	Gliome et ovaire	Abandonné
GSK2256098	10nM	> 1000nM	Ovaire et pancréas	Phase II – bithérapie NCT02428270 NCT04331041 NCT02523014
VS-4718 (PND-1186)	1,5nM	Inconnue	Ovaire et sein	Phase I - monothérapie NCT01849744 (arrêté en 2017) Phase I – bithérapie NCT02651727 (arrêté en 2017)
VS-6062 (PF-562,271)	1,5nM	14nM	Prostate, pancréas et sein	Phase I - monothérapie NCT00666926 (complété en 2013)
VS-6063 (defactinib ou PF-04554878)	0,6nM	0,6nM	Ovaire	Phase I - bithérapie NCT03875820 Phase II - bithérapie NCT02758587 NCT03287271 NCT03727880

que pour son homologue Pyk2, ainsi que pour les autres protéines (Slack-Davis et *al.,* 2007). Il a été démontré sur plusieurs types de cancer que cet inhibiteur réduit la migration des cellules mais n'impacte ni la prolifération ni l'apoptose (Slack-Davis et *al.,* 2007).

De même, le **GSK2256098** est un inhibiteur sélectif de FAK qui a été décrit pour sa capacité à réduire la migration des cellules cancéreuses de l'ovaire (Yoon et *al.,* 2015). Dans des cellules PDAC, il induit également une inhibition des voies ERK et Akt en aval de FAK à l'origine d'une inhibition de la croissance et de la migration cellulaire (Zhang et *al.,* 2014). Bien qu'il n'ait pas montré de gain en phase I d'essai clinique en monothérapie ou en bithérapie avec le trametinib, une seconde étude en phrase II est actuellement menée en bithérapie avec le vismodegib.

Le **TAE226** inhibe quant à lui l'activité de FAK à des concentrations de l'ordre du nanomolaire mais cible également la protéine Pyk2 et l'*insulin-like growth factor I receptor* (IGF-IR) (Halder et *al.,* 2007). *In vitro* il a été démontré que cette molécule inhibe l'invasion, réduit la

prolifération cellulaire et augmente l'apoptose des cellules cancéreuses de l'ovaire et du glioblastome (Halder et *al.,* 2007; Liu et *al.,* 2007; Shi et *al.,* 2007). De plus, il a été décrit dans des modèles *in vivo* que cette molécule augmente la survie des animaux avec xénogreffes (Liu et *al.,* 2007 ; Watanabe et *al.,* 2008). En bithérapie avec le docetaxel, un stabilisateur des microtubules, le TAE226 a également été rapporté pour inhiber l'angiogenèse et l'invasion du carcinome de l'ovaire (Halder et *al.,* 2007). Malgré ces effets antitumoraux, les troubles du métabolisme du glucose causé par l'inhibition non sélective de l'IGF-IR induisent une toxicité trop importante, et le TAE226 a dû être abandonné (Liu et *al.,* 2007).

D'autre part, le **VS-4718** (ou PND-1186) est un inhibiteur de l'activité kinase de FAK, ciblant également les protéines FLT-3 et ACK1. Il a été démontré que ce composé inhibe la migration des cellules de carcinome du sein mais induit également leur apoptose (Tanjoni et *al.,* 2010). Ce composé a été étudié en phase I d'essai clinique en monothérapie pour les cancers métastatiques et en combinaison avec le paclitaxel ou la gemcitabine pour le cancer du pancréas.

En parallèle, le **VS-6062** (ou PF-562,271), est un inhibiteur sélectif de FAK et de Pyk2 à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Roberts et *al.,* 2008). *In vitro*, ce composé inhibe l'invasion tumorale en altérant la migration des CAFs et ainsi l'influence du microenvironnement tumorale (Stokes et *al.,* 2011). Dans des modèles *in vivo* de PDAC, cette molécule inhibe également la formation de métastases mais n'impacte pas la prolifération cellulaire à des doses 10 fois supérieures à celles nécessaires pour inhiber l'activité catalytique de FAK, de Pyk2 et l'invasion tumorale (Stokes et *al.,* 2011). En étude de phase 1, les patients traités avec le VS-6062 sont stables mais le profil pharmacocinétique non-linéaire de la molécule a conduit à l'arrêt des essais (Infante et *al.,* 2012).

Enfin la dernière génération d'inhibiteur sélectif de FAK comporte le **VS-6063** (ou defactinib ou PF-04554878), qui est étudié dans plusieurs études cliniques : en combinaison avec un anti-PD-1, le Pembrolizumab, en phase I/Ia pour les patients atteint de tumeurs solides ; en combinaison avec le placlitaxel en phase I/Ib pour les patients atteins de cancers des ovaires ; en monothérapie en phase II pour les patients atteins de cancer bronchique non à petites cellules muté KRAS et enfin en trithérapie avec des carboplatines et le placlitaxel en phase I/II dans le cadre de l'étude ROCKIF (Re-sensitization of Carboplatin-resistant Ovarian Cancer with Kinase Inhibition of FAK) pour le cancer des ovaires.

2. Les inhibiteurs allostériques

Afin de pallier le manque de sélectivité des petites molécules analogues de l'ATP, une nouvelle stratégie basée sur l'inhibition allostérique de FAK a été envisagée. Les inhibiteurs allostériques inhibent l'autophosphorylation en Y397 de la protéine FAK et son activité catalytique sans interférer avec l'ATP (Heinrich et *al.,* 2013 ; Tomita et *al.,* 2013). Le Y11 et le Y15 sont deux inhibiteurs sélectifs de la protéine FAK liant des sites distincts du domaine N-terminal FERM (Golubovskaya et *al.,* 2012 ; Hochwald et *al.,* 2009). *In vitro*, il a été démontré que ces composés réduisent de manière dose-dépendant la viabilité et l'adhérence cellulaire de lignées cellulaires de cancer du côlon, du sein, du pancréas et du mélanome (Golubovskaya et *al.,* 2008 ; Golubovskaya et *al.,* 2012). Dans des modèles de xénogreffes, le Y11 a également été rapporté pour inhiber la croissance des cellules cancéreuses (Golubovskaya et *al.,* 2012). Par ailleurs le Y15 en combinaison avec le 5-FU ou avec le temozolomide dans le cadre du cancer du côlon et du glioblastome, respectivement, inhibe le développement des tumeurs *in vivo* (Golubovskaya et *al.,* 2013 ; Heffler et *al.,* 2013). Enfin, en études précliniques, ces composés ont tous deux présentés peu de toxicité aux doses efficaces.

L'ensemble de ces résultats suggère qu'inhiber l'activité catalytique de FAK peut être intéressant notamment en combinaison avec d'autres thérapies. Cependant des mécanismes de résistances ont déjà été observés. Suite à l'inhibition de FAK, le récepteur HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*) peut être surexprimé afin de favoriser la transphosphorylation de la protéine FAK conduisant à sa réactivation et au déclenchement des voies Akt et MAPK (Marlowe et *al.,* 2016). Il a également été démontré qu'une inhibition de l'activité catalytique de FAK peut être compensée par une suractivation de son homologue Pyk2 pour promouvoir la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (Genna et *al.,* 2018 ; Sieg et *al.,* 1998 ; Weis et *al.,* 2008). Bien que la non-sélectivité soit un problème observé sur bon nombre des molécules déjà existantes, dans le cas de FAK cela pourrait être pertinent. En effet, l'utilisation d'un double inhibiteur FAK-Pyk2 pourrait prévenir ce mécanisme de résistance (Genna et *al.,* 2018). Par ailleurs, les petites molécules inhibitrices du domaine kinase et les inhibiteurs allostériques n'altèrent pas les fonctions *scaffolding* de la protéine, or comme précédemment décrit, la survie et la prolifération sont davantage dépendant de ces fonctions tandis que l'activité catalytique de FAK est principalement nécessaire à la migration. De plus des études ont démontré que l'inhibition de l'activité kinase de FAK induit une accumulation nucléaire de la protéine (Lim et *al.,* 2012), translocation favorable à la survie des cellules. De ce fait, inhiber les interactions entre FAK et ses partenaires peut être une alternative.

3. Les inhibiteurs d'interaction protéine-protéine

Les interactions protéines-protéines (IPP) sont les contacts physiques de haute spécificité établis entre deux protéines ou plus afin de réaliser leurs fonctions biologiques. Les IPP requièrent une surface de contact importante (1500–3000 $Å^2$), plane qui est généralement constituée de plusieurs petites poches. Bien que le site d'interaction soit large, des résidus, que l'on nomme *hots spots*, sont indispensables à une forte affinité de liaison entre les protéines. La perturbation de ces interactions médiées par les *hots spots* permet l'inhibition de l'IPP. Les inhibiteurs d'interaction protéine-protéine (IIPP) sont des molécules qui empêchent l'interaction entre deux protéines par mimétisme structural des protéines impliquées. Ces inhibiteurs sont capables de se fixer à plusieurs *hots spots* simultanément par une multitude d'interaction faible et de ce fait possèdent une forte complémentarité de structure avec la cible. Ainsi l'effet d'un IIPP est très sélectif et permet de diminuer les effets *off target*. Cependant cette complémentarité structurale rend ces molécules de haut poids moléculaire difficiles à développer

3.1. Les inhibiteurs du domaine FERM

Le domaine FERM de FAK constitue une cible intéressante pour les IIPP du fait de ces nombreuses interactions avec les RTK, les intégrines et les protéines du cytosquelette d'actine (Frame et *al.,* 2010).

Comme précédemment décrit, la protéine FAK interagit avec les protéines p53 et MDM2 via son domaine FERM afin de favoriser la dégradation de la protéine pro-apoptotique et de promouvoir la survie cellulaire. La réactivation de la protéine p53 étant essentielle pour prévenir le développement tumoral, plusieurs études ont portés sur le développement de molécules inhibant la formation du complexe FAK-Mdm2-p53. Golubovskaya et son équipe ont notamment démontré que l'expression d'un peptide contenant les 7 acides aminés de p53 nécessaire à l'interaction avec FAK dans des cellules de carcinome du sein et du colon humain réduit la viabilité cellulaire (Golubovskaya et *al.,* 2008). Par la suite, le criblage *in silico* de milliers molécules pouvant s'ancrer dans la poche d'interaction FAK-p53 a permis d'identifier plusieurs composés, dont le Roslin2, capables de lier le domaine FERM de FAK, d'inhiber l'interaction FAK-p53 et de réactiver la protéine pro-apoptotique (Golubovskaya et *al.,* 2013a). Il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que ce composé sensibilise les cellules cancéreuses du colon au doxorubicine et le fluorouracile. De même, plusieurs études ont envisagé d'inhiber l'interaction FAK-Mdm2 afin de réactiver la protéine p53. Le criblage d'une banque de

molécule virtuelle a ainsi identifié 24 composés, dont le M13, susceptibles d'inhiber le complexe FAK-Mdm2 (Golubovskaya et *al.,* 2013b). Dans des cellules de cancer du sein, du colon, du pancréas ainsi que du mélanome, le M13 a été décrit pour lier le domaine FERM de FAK, inhiber le complexe FAK-Mdm2 et favoriser la réactivation de p53 à l'origine d'une diminution de la viabilité cellulaire (Golubovskaya et *al.,* 2013b). Enfin, dans des modèles de souris de cancer du sein et du colon, ce composé a également été rapporté pour inhiber la croissance des tumeurs.

Plus récemment, des études ont mis en avant que l'interaction entre FAK et HER2, médié respectivement par le lobe F1 FERM ainsi que d'un site à proximité du site Y397 de FAK et par le domaine kinase de HER2, pouvait être une cible pertinente (Marlowe et *al.,* 2016). En effet, HER2 favorise la transphosphorylation de la protéine FAK en Y397 conduisant à sa réactivation et au développement de résistances aux inhibiteurs du domaine kinase (Benlimame et *al.,* 2005 ; Marlowe et *al.,* 2016). De plus, l'activité kinase de FAK est décrite pour favoriser le développement de résistance au trastuzumab et au lapatinib, deux inhibiteurs de HER2 (Jin et *al.,* 2017). Le criblage *in silico* de composés capables de lier les deux *hots spots* du domaine FERM de FAK a permis d'identifier une vingtaine de composés capable d'inhiber le complexe FAK-HER2 (Marlowe et *al.,* 2019). Parmi ces composés, le VS-4 et le VS-14, liant respectivement le domaine F1 FERM à proximité du site M33 et le domaine FERM à proximité du site Y397, ont été décrits pour inhiber l'interaction FAK-HER2. De manière intéressante, tandis que le VS-4 n'affecte pas l'activité kinase de la protéine FAK dans des cellules de carcinome du sein, le VS-14 inhibe à la fois l'auto et la transphosphorylation de la protéine. En effet, la liaison du VS-14 à la protéine FAK inhibe l'interaction avec la protéine HER2 mais interfère également avec la liaison de l'ATP sur son site de liaison. Cette molécule induit ainsi une délocalisation de FAK dans le cytoplasme à l'origine d'une diminution de l'adhérence cellulaire et de l'invasion tumorale dans des cellules cancéreuses du sein (Stahl et *al.,* 2020).

3.2. Les inhibiteurs du domaine FAT

La localisation de FAK dans les adhérences focales étant essentielle à sa régulation par les intégrines et à son rôle pro-migratoire, une autre stratégie envisagée pour inhiber les fonctions de FAK dans le cancer a été de cibler le domaine FAT de la protéine.

Comme précédemment décrit, la localisation de FAK dans les FAs est conditionnée par l'interaction entre les sites HP1 et HP2 du domaine FAT, avec les motifs LD2 et LD4 de la

paxilline (Arold et *al.,* 2002 ; Bertolucci et *al.,* 2005 ; Hayashi et *al.,* 2002). Par mutagénèse dirigée, il a été démontré qu'une inhibition de l'interaction FAK-paxilline conduit à une délocalisation de la protéine FAK dans le cytoplasme (Deramaudt et *al.,* 2014). Il est important de noter que l'obstruction des deux *hot spots* du domaine FAT est essentielle pour prévenir la formation du complexe FAK-paxilline (Deramaudt et *al.,* 2014 ; Gao et *al.,* 2004). Dans un modèle de fibroblaste et de mélanome murin, il a été rapporté que l'inhibition de l'interaction FAK-paxilline conduit à une diminution importante de la phosphorylation en Y397, Y576 et Y925 de FAK à l'origine d'une inhibition de l'adhérence et de la migration cellulaire (Deramaudt et *al.,* 2014 ; Kaneda et *al.,* 2008). Par ailleurs, une étude menée par notre laboratoire sur des fibroblastes transformés pas Src a mis en évidence que l'expression d'un mutant de FAK incapable de lier la paxilline altère le dynamisme des FAs ainsi que le nombre de rosettes conduisant à une inhibition de la migration et de l'invasion cellulaire (Deramaudt et *al.,* 2014). De manière surprenante, malgré la délocalisation cytoplasmique et l'inhibition de l'activité en Y397 de FAK, nous avons observé par immunoprécipitation qu'inhiber l'interaction FAK-paxilline n'affecte pas le complexe FAK-Src. De plus, les cellules exprimant ce mutant de FAK sont incapables de lier la paxilline possèdent des propriétés migratoires et invasives moins importantes que les cellules ayant subis un *knockout* (Deramaudt et *al.,* 2014). Ces résultats suggèrent donc qu'inhiber l'interaction FAK-paxilline inhibe la migration et la dégradation en séquestrant des partenaires clés de l'invasion tumorale dans le cytoplasme. Ainsi, ces dernières années, plusieurs équipes se sont concentrées sur le développement d'IIPP ciblant l'interaction FAK-paxilline. Kossiakoff et son équipe ont notamment développé deux anticorps synthétiques (sAb) capables de lier respectivement le domaine LD2 et LD4 de la paxilline à partir d'une banque de fragments d'anticorps humain (Fab) (Kossiakoff et *al.,* 2015). Il a été démontré par immunoprécipitation sur des extraits cellulaires, que ces sAb inhibent l'interaction FAK-paxilline. Malgré leur incapacité à pénétrer spontanément dans des cellules, il a également été observé après marquage immunocytochimique que ces anticorps sont concentrés dans les FAs des cellules. Néanmoins, aucune preuve de leur efficacité à inhiber l'interaction FAK-paxilline *in vitro* n'a été mise en évidence. Plus récemment, le couplage des techniques de SPR (*Surface Plasmon Resonance*) et d'HSQC-NMR (*Heteronuclear Single Quantum Coherence Nuclear Magnetic Resonance*) a permis d'identifier onze composés capables d'inhiber cette interaction (Alvarado et *al.,* 2019). De même Marlowe et son équipe ont développé un test de polarisation par fluorescence à haut débit afin d'identifier trois composés inhibant l'interaction FAK-paxilline de manière dose-dépendant (Marlowe et *al.,* 2019). A ce jour, aucuns de ces composés n'a cependant été testé *in vitro*. Enfin, en criblant *in*

silico une banque de molécule, Kandil et son équipe ont observé que plusieurs composés ciblant le domaine FAT de FAK favorisent l'accumulation de la protéine dans le cytoplasme (Kandil et *al.,* 2020). Bien que ces composés n'affectent pas la phosphorylation en Y397 de FAK, il a été démontré que ces molécules inhibent la prolifération et la migration des cellules cancéreuses du sein et du pancréas.

L'interaction du VEGFR-3 avec le domaine FAT de FAK a également fait l'objet de plusieurs études. En effet, il a été démontré dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer du sein que ces deux protéines interagissent directement afin de favoriser l'adhérence, la prolifération et la survie cellulaire (Garces et *al.,* 2006). Il a été rapporté que l'expression d'un peptide inhibant l'interaction FAK-VEGFR-3 induit une délocalisation de la protéine FAK en dehors des FAs à l'origine d'une inhibition de l'adhérence cellulaire et d'une augmentation de l'apoptose (Garces et *al.,* 2006). En caractérisant les *hots spots* de ce complexe par cristallographie, Kurenova et son équipe ont mis en évidence que la molécule C4, une petite molécule initialement décrite comme un antagoniste du récepteur H1 de l'histamine, est capable d'inhiber l'interaction FAK-VEGFR-3 dans diverses lignées de cancer du sein (Kurenova et *al.,* 2009). De manière intéressante, bien que cette molécule n'affecte pas l'interaction FAK-paxilline, il a été démontré que C4 induit une délocalisation de FAK en dehors des FAs à l'origine d'une inhibition de l'activité en Y397 conduisant à une inhibition de la prolifération cellulaire et à l'induction de l'apoptose dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (Kurenova et *al.,* 2009). Par la suite, plusieurs analogues de cette molécule ont été synthétisés et caractérisés pour leurs effets antitumoraux sur diverses lignées cellulaires de cancer du pancréas, du sein, du gliome et du mélanome (Gogate et *al.,* 2014 ; Kandil et *al.,* 2018).

E. La protéine associée aux intégrines IAP/CD47

CD47 est un récepteur membranaire ubiquitaire appartenant à la superfamille des Immunoglobulines. Identifié pour la première fois en 1990 comme une protéine de la membrane plasmique des monocytes et des macrophages associées à l'intégrine αVβ3, ce récepteur a été initialement appelé IAP (*Integrin-Associated Protein*) (Brown et *al.,* 1990).

I. Structure de CD47

CD47 est composé de cinq domaines transmembranaires, d'un domaine extracellulaire IgV *like* en N-terminal avec cinq sites de N-glycosylation et d'une queue intracellulaire C-terminale caractérisée par un épissage alternatif (Sick et *al.,* 2012) **(Figure 32)**. En effet, quatre isoformes caractérisées par des variants du nombre d'acides aminés dans la queue cytoplasmique ont été identifiées chez la souris et chez l'homme (Reinhold et *al.,* 1995). Bien que les formes 3 (23 acides aminés) et 4 (34 acides aminés) ont été décrites pour leur rôle dans la conservation de la mémoire chez le rat, et que la forme 2 (16 acides aminés) a été rapporté pour être fortement exprimée dans les astrocytes et pour être recrutée à la surface des cellules lors de la différenciation terminale érythroïde, peu de chose à l'heure actuelle sont connues sur les fonctions de ces isoformes.

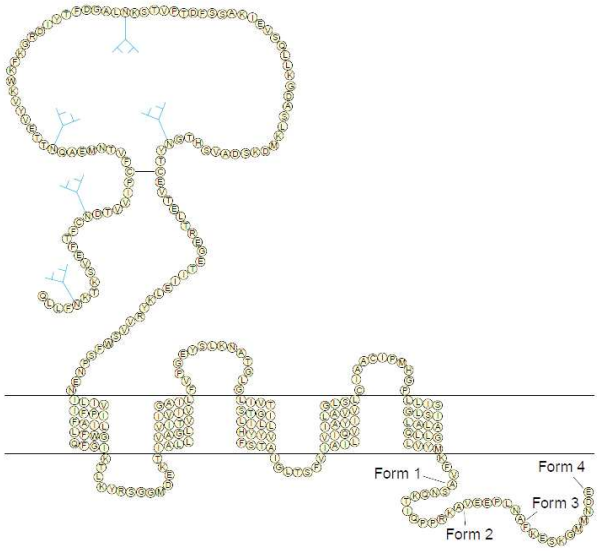


Figure 32 : Structure de la protéine associée aux intégrines (IAP/CD47). Le domaine variable des immunoglobulines extracellulaires (IgV) fortement glycosylé est suivi de cinq segments transmembranaires se terminant par une queue cytoplasmique, donnant lieu à quatre isoformes par épissage alternatif, dont la plus longue, la forme 4, est représentée dans son intégralité. Adapté de Brown & Frazier, 2001.

De manière intéressante, dans un modèle de levure, les modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation semblent être essentielles au recrutement des récepteurs CD47 à la membrane cellulaire (Parthasarathy et *al.,* 2006). Des études ont notamment montré que le récepteur CD47, sous sa forme glycosylée, est présent dans des vésicules extracellulaires telles que les exosomes relargués par les plaquettes (Kim et *al.,* 2012; Rho et *al.,* 2013; Sadallah et *al.,*2011). Cependant, l'influence de la glycosylation du domaine N-terminal de CD47 sur la liaison de ses partenaires et sur les voies de signalisation qui en découle est peu détaillée. Bien

que CD47 soit fortement exprimé à la membrane plasmique sous la forme de plusieurs isoformes glycosylées allant de 40 à 55 KDa, plusieurs isoformes de haut poids moléculaire ont également été décrites. En effet, Kaur et son équipe ont observé le récepteur sous forme de protéoglycane composé de chaînes d'héparine et de sulfate de chondroïtine (GAG) aux sites S64 et S79 (> 200 KDa) dans des cellules Jurkat exprimant naturellement peu de CD47 de bas poids moléculaire (55 KDa) ainsi que dans des cellules vasculaires (Kaur et *al.,* 2011). Des isoformes de poids moléculaire plus faible peuvent également être observés à la suite du clivage protéolytique du domaine extracellulaire (Reinhold et *al.,* 1995). En effet, le domaine N-terminal de CD47 peut être relargué des cellules suite à un clivage protéolytique de son domaine IgV par la MMP2 (Maile et *al.,* 2008a ; Maile et *al.,* 2008b). Bien que cette forme soluble de la protéine soit capable d'interagir avec plusieurs de ses partenaires (TSP-1, SIRPα ou encore CD47), aucune fonction n'a encore été attribuée à ces fragments protéiques.

II. Les principaux partenaires de CD47

1. Les partenaires extracellulaires

1.1. La TSP-1 et ses dérivés peptidiques

La Thrombospondine-1 (TSP-1) a été le premier ligand endogène identifié pour le récepteur CD47 (Gao & Frazier, 1994). Initialement décrit comme un facteur protéique de haut poids moléculaire sécrété par les plaquettes activées en réponse à la thrombine (Baenziger et *al.,* 1971), il a maintenant été démontré que la TSP-1 est exprimée dans un grand nombre de types cellulaires. Elle appartient à la famille des Thrombospondines (TSPs), des glycoprotéines multidomaines qui s'associent sous forme d'homotrimères (TSP-1 et TSP-2) ou d'homopentamères (TSP-3, TSP-4 et TSP-5).

La TSP-1 est constituée de plusieurs domaines lui permettant d'interagir avec des récepteurs membranaires et des composants de la MEC afin d'assurer la médiation des interactions cellule-cellule et cellule-MEC **(Figure 33)**. Son domaine N-terminal est constitué d'un domaine de liaison à l'héparine (HBD) permettant son interaction avec les protéoglycanes de sulfate d'héparane (HSPG) et avec les intégrines α3β1, α4β1, α5β1 et α6β1. Ce domaine HBD est suivi d'un court segment riche en cystéine qui génère les ponts disulfures nécessaires à l'oligomérisation de la protéine et d'un domaine procollagénique identique au domaine de type C du facteur von Willebrand (vWF). On retrouve ensuite trois répétitions de type 1 (T1 ou properdine) permettant l'interaction de la TSP-1 avec le CD36, le collagène de type V, la

fibronectine et les HSPG mais contenant également deux séquences indispensables à l'activation du TGF-β. La partie C-terminale comporte, quant à elle, trois domaines EGF (T2), suivis de 7 domaines de fixation du calcium (T3) enrichis en séquence RGD qui permettent l'interaction avec les intégrines β_3. Enfin, le domaine CBD en C-Terminal permet l'interaction de la protéine avec le récepteur CD47 (Resovi et *al.,* 2014 ; Sick et *al.,* 2012) **(Figure 33)**. En effet, il a été démontré par mutagénèse dirigée qu'altérer les séquences VVM du domaine CBD empêche l'interaction de la TSP1 avec CD47 (Mcdonald et *al.,* 2003). Cependant, l'analyse structurale de ce domaine par cristallographie a mis en évidence que les motifs VVM ne sont pas exposés au solvant et, par conséquent, sont peu susceptibles de servir de médiateurs directs à la liaison de CD47 (Kvansakul et *al.,* 2004). Il est donc possible qu'un changement conformationnel de la protéine soit nécessaire afin d'exposer le motif et permettre l'interaction (Floquet et al., 2008). Par ailleurs, la glycosylation du récepteur CD47 en S64 avec une chaîne de sulfate d'héparane semble essentielle à la voie de signalisation TSP-1-CD47 dans des lymphocytes T (Kaur et *al.,* 2011).

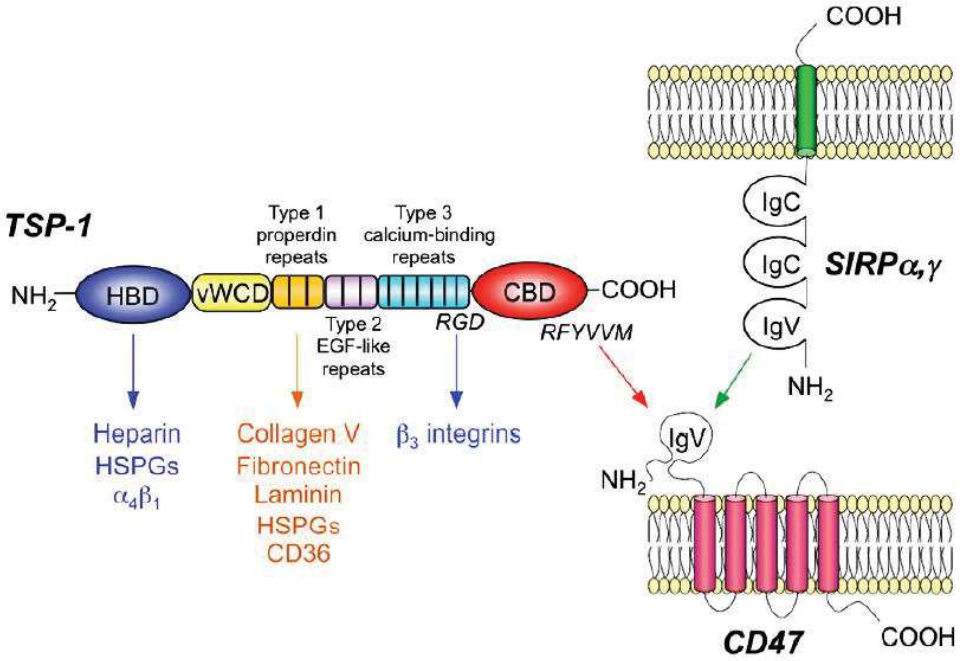


Figure 33 : Structure des partenaires extracellulaires de CD47, la TSP-1 et SIRPα, γ. La TSP-1 et SIRPα, γ interagissent avec le domaine IgV *like* de CD47 respectivement par le biais d'une séquence RFYVVM et d'un domaine IgV. Les différents composants de la MEC avec lesquels interagit la TSP-1 sont également représentés. Adapté de Sick et *al.,* 2012.

Suite à la caractérisation de la séquence d'interaction entre la TSP-1 et CD47, plusieurs dérivés peptidiques mimant ce motif ont été synthétisés parmi lesquels on retrouve le 7N3 (^{1102}FIRVVMYEGKK^{1112}), 4N1 (^{1016}RFYVVMWK^{1024}) et 4N1K (K-^{1016}RFYVVMWK^{1024}-K), (Gao et *al.,* 1996). Néanmoins ces peptides ont été décrits dans plusieurs études pour se lier à

un autre récepteur encore non identifié. En effet le 4N1 et le 4N1K favorisent l'agrégation plaquettaire et renforcent l'adhérence cellulaire dans des cellules déficientes en CD47 (Barazi et *al.,* 2002 ; Tulasne et *al.,* 2001). Il est donc important de confronter les résultats obtenus avec ces peptides avec la TSP-1 native, des cellules déficientes en CD47 ou des anticorps monoclonaux anti-CD47.

1.2. SIRPα et SIRPγ

CD47 interagit également avec deux protéines de la famille SIRP (*Signal Regulatory Protein*) par le biais de leur domaine IgV : SIRPα (également appelée BIT, SHPS1, p84 ou CD172a) et SIRPγ (également appelée SIRPβ2 ou CD172g) (Barclay et *al.,* 2014 ; Vernon-Wilson et *al*., 2000). L'affinité de ces deux protéines pour CD47 diffère d'un facteur 10, avec des valeurs de K_D de 2µM et 23µM pour SIRPα et SIRPγ respectivement (Brooke et *al.,* 2004). Malgré la conservation des structures entre les différents membres de la famille SIRP, la protéine SIRPβ (CD172b) n'interagit pas avec le récepteur CD47 et ce en partie du fait de la présence d'une M27 et non d'une V27 dans le domaine IgV (Hatherley et *al.,* 2008).

SIRPα est une protéine transmembranaire composé de trois domaines de type immunoglobuline dans la partie extracellulaire N-terminale, d'un domaine transmembranaire et d'une queue cytoplasmique en C-terminal comportant deux motifs ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motifs*) avec quatre sites tyrosine de phosphorylation (Brooke et *al.,* 1998) **(Figure 33)**. Elle est exprimée dans les monocytes, les macrophages, les granulocytes, les cellules dendritiques myéloïdes ainsi que dans les neurones du système nerveux central (Isenberg et *al.,* 2006). L'interaction de SIRPα avec CD47 par leur domaine IgV induit la phosphorylation des résidus tyrosines des domaines ITIM par des protéines de la famille Src à l'origine du recrutement et de l'activation des phosphatases SHP-1 et SHP-2 (Matlung et *al.,* 2017 ; Veillette & Chen, 2018 ; Vernon-Wilson et *al.,* 2000). Le complexe SIRPα-CD47 peut ainsi déphosphoryler les protéines des voies de signalisation sous-jacentes afin de réguler la phagocytose ou l'activation des lymphocytes T.

2. Les partenaires membranaires

2.1. Les intégrines

CD47 a initialement été décrit pour interagir avec l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ par le biais de son domaine IgV *like* afin de l'activer (Lindberg et *al.,* 1996) et de favoriser l'étalement cellulaire, la

synthèse des cytokines, la phagocytose ou encore la mort cellulaire (Brown et *al.,* 1990 ; Capo et *al.,* 1999 ; Gao et *al.,* 1996 ; Hermann et *al.,* 1999 ; Saumet et *al.,* 2005). Depuis, de nombreuses interactions avec d'autres sous-unités d'intégrines ont été mises en évidence. En effet, l'interaction entre CD47 et l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ favorise notamment la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses (Wang & Frazier, 1998). De même, l'association de CD47 avec les intégrines αIIbβ3, α2β1, αLβ2 et α4β1 ont été rapporté dans différents modèles cellulaires (Soto-Pantoja et *al.,* 2013). Dans des cellules de carcinome du sein, la stimulation du récepteur par les peptides dérivés de la TSP-1 favorise l'activation de l'intégrine αVβ3 mais n'affectent pas l'intégrine α3β1 (Chandrasekaran et *al.,* 1999). De manière paradoxale, tandis que l'inhibition du récepteur CD47 par un anticorps, le B6H12, inhibe l'intégrine αVβ3 et l'adhérence cellulaire dans le mélanome, cet anticorps a également été décrit pour stimuler l'adhérence des lymphocytes T en activant les intégrines α4β1, α2β1 et α5β1 (Barazi et *al.,* 2002). Etant donné que les dérivés peptidiques de la TSP-1 favorisent dans cette étude l'activation des intégrines dans des cellules déficientes en CD47, ces résultats suggèrent différents mécanismes de régulation des intégrines par le 4N1 et par le B6H12. De plus, plusieurs études ont décrit que les résultats obtenus avec des anticorps bloquants dirigés contre le CD47 sont difficiles à concilier avec les effets induits par la TSP-1 ou ses dérivés du fait que ces anticorps peuvent également avoir des fonctions agonistes. En effet, le B6H12 peut induire les mêmes effets que la TSP-1 dans l'activation des intégrines (Barazi et *al.,* 2002), dans la différenciation des lymphocytes T (Grimbert et *al.,* 2006), ainsi que dans l'agrégation homotypique du monocyte U937 (Yamauchi et *al.,* 2002).

Concernant la signalisation intracellulaire cellulaire associée au CD47, plusieurs études ont rapporté que l'activation du CD47 associé aux intégrines se traduit par l'activation des protéines G. En effet, la toxine pertussique inhibe l'activation de l'intégrine plaquettaire αIIbβ3 par la TSP-1 et le 4N1K (Chung et *al.,* 1997). Dans cette étude, Chung et son équipe ont montré que les ligands de CD47 favorisent l'activation d'une protéine Gi et conduisent à l'activation de la tyrosine kinase Syk à l'origine de la phosphorylation de Lyn et de FAK (Chung et *al.,* 1997). Dans des cellules de mélanome, le 7N3 a également été décrit pour activer l'intégrine αVβ3 et la protéine FAK afin de favoriser l'adhérence cellulaire (Sipes et *al.,* 1999). Par ailleurs, dans des globules rouges, le récepteur CD47, par le biais de la PKA et de la protéine Src, favorise la phosphorylation du domaine cytoplasmique de l'intégrine α4β1 conduisant ainsi à son activation (Brittain et *al.,* 2004). Cependant, dans toutes ces études, il est difficile de différencier les acteurs en amont ou en aval de l'activation des intégrines. D'après les

connaissances actuelles sur la signalisation des intégrines, il est probable que l'activation de FAK et Src soit en aval des intégrines.

2.2. CD36

Plusieurs études suggèrent également que CD47 interagit avec l'intégrine α6β1 et avec le récepteur CD36 et ce malgré l'absence d'une preuve directe de l'existence de ce complexe telle qu'une co-immunoprécipitation (Bamberger et *al.,* 2003 ; Isenberg et *al.,* 2006 ; Miller et *al.,* 2010). L'activation de CD36 par un peptide dérivé des motifs T1 de la TSP1 a notamment été décrit pour inhiber la NO synthase et ce de manière dépendante de CD47 **(Figure 34)**. En effet, l'activation de CD36 n'affecte pas cette voie de signalisation dans des cellules déficientes en CD47 (Isenberg et *al.,* 2008b ; Zhang et *al.,* 2009). Ainsi, CD47 est impliqué dans la voie de signalisation de CD36 et il est possible par le biais d'une interaction CD36-CD47-intégrines, CD36 affecte les substrats en aval de CD47 impliqué dans la synthèse du NO.

2.3. Le VEGFR

CD47 a également été rapporté pour interagir directement avec le VEGFR2 dans les cellules endothéliales et dans les lymphocytes T (Kaur et *al.,* 2010 ; Kaur et *al.,* 2014). En effet, il a été observé par microscopie confocale que ces protéines co-localisent de manière importante dans les cellules HUVEC. L'interaction entre CD47 et le VEGFR2 a ensuite été confirmé par co-immunoprécipitation et par microscopie FRET. De manière intéressante, tandis que le VEGF n'affecte pas le complexe CD47-VEGFR2, la TSP-1 est capable d'inhiber l'interaction entre ces deux protéines (Kaur et *al.,* 2010) **(Figure 34)**. En effet, la TSP-1 et le 7N3 inhibent la phosphorylation du VEGFR2 en Y1175 afin de réguler les voies de signalisation sous-jacentes telles que le transport du récepteur VEGFR2, la prolifération cellulaire, la migration et l'angiogenèse (Soto-Pantoja et *al.,* 2015). Par ailleurs, l'inhibition du VEGFR2 par la TSP1 est fortement atténuée dans des cellules déficientes en CD47 ou traitées avec un anticorps bloquant. Ces résultats suggèrent donc un mécanisme de régulation du VEGFR2 par la TSP-1 et ce par le biais du récepteur CD47 (Kaur et *al.,* 2010 ; Kaur et *al.,* 2014 ; Qin et *al.,* 2014).

3. Les partenaires intracellulaires

3.1. L'adénylate et la guanylate cyclase

Outre le fait d'activer les intégrines par le biais des protéines G, CD47 est décrit pour réguler les cyclases. En effet, il a été démontré que le 4N1K, par son interaction avec CD47 associé à

l'intégrine αVβ3, inhibe l'adénylate cyclase (AC) via Gi et réduit ainsi la quantité d'AMPc intracellulaire dans les plaquettes (Frazier et *al.,* 1999) **(Figure 34)**. Des études ont également mis en évidence que la TSP-1 inhibe la production d'AMPc dans plusieurs types cellulaires (Guo et *al.,* 1998 ; Manna & Frazier, 2003 ; Yao et *al.,* 2011). A l'inverse, les niveaux d'AMPc et de GMPc sont accrus dans des cellules musculaires ou vasculaires déficientes en TSP-1 ou en CD47 (Isenberg et *al.,* 2009 ; Yao et *al.,* 2011). Ces résultats suggèrent donc que l'interaction entre TSP-1 et CD47 régule l'AC ainsi que la guanylate cyclase (GC). En effet, la TSP-1 peut inhiber la production du principal activateur de la GC, le monoxyde d'azote (NO) (Isenberg et *al.,* 2009). Kaur et son équipé ont également démontré que l'inhibition de la phosphorylation du VEGFR2 par la TSP-1, induit une inhibition des protéines Src et Akt à l'origine d'une inhibition de la synthèse de NO par la NO synthas*e* (NOS) (Kaur et *al.,* 2010 ; Kaur et *al.,* 2014). De manière intéressante, en activant la GC, le NO peut également inhiber la PDE-3 (Phosphodiesterase-3) empêchant ainsi l'hydrolyse de l'AMPc et favorisant son accumulation cytoplasmique (Yao et *al.,* 2011) **(Figure 34)**. La TSP-1 peut donc inhiber directement l'AC par le biais d'une protéine G inhibitrice ou indirectement par le biais des phosphodiestérases.

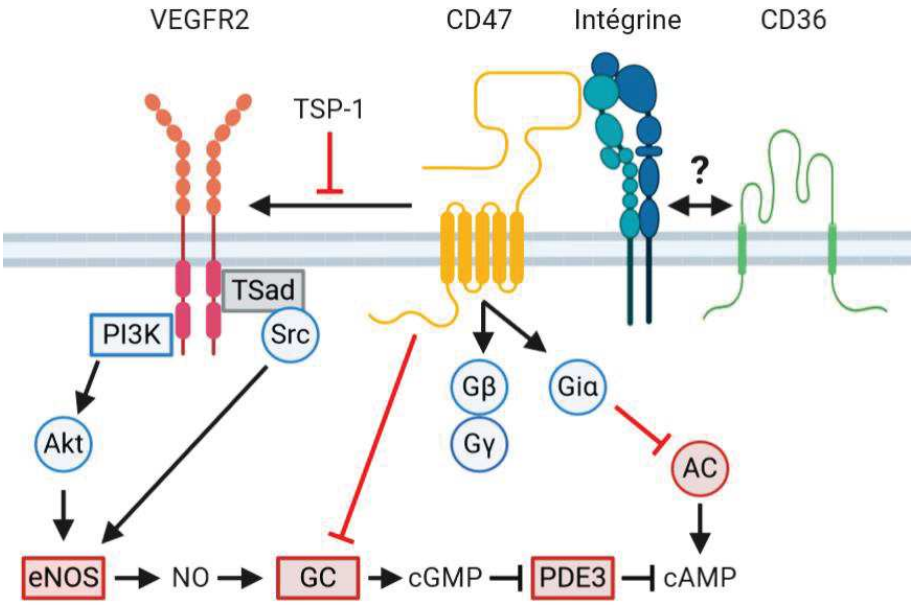


Figure 34 : CD47 régule les niveaux de GMPc et d'AMPc. La liaison de la TSP-1 à CD47 inhibe la NO synthase (eNOS) ainsi que guanylate cyclase (GC) en altérant l'activité du VEGFR2. Bien que le mécanisme soit peu détaillé, CD36 a également été décrit pour inhiber la eNOS par le biais du récepteur CD47. En parallèle, CD47 s'associe aux intégrines afin de recruter des petites protéines G et notamment des sous-unités Gαi capable d'inhiber l'adénylate cyclase (AC). Enfin, la diminution du niveau de GMPc préserve l'activité de la PDE3 qui peut alors hydrolyser l'AMPc.

3.2. PLIC1

Par ailleurs, CD47 interagit par le biais de son domaine C-terminal avec une protéine liée à l'ubiquitine, PLIC1 (*Protein Linking Integrin-Associated Protein To Cytoskeleton*-1 ou ubiquiline-1) qui est décrite pour réguler les protéines G. En effet, la PLIC1 interagit avec le complexe Gβγ afin d'associer les protéines G à CD47 (Frazier et *al.,* 1999 ; N'diaye & Brown, 2003). Ce complexe a notamment été décrit dans les cellules d'astrocytome pour favoriser l'activation de la voie PI3K-Akt (Sick et *al.,* 2011).

III. CD47 dans les cancers

Afin de comprendre les fonctions et les voies de signalisation de CD47, il est important de noter que plusieurs ligands peuvent se lier simultanément au récepteur, entrer en compétition pour le site de liaison ou réguler de manière allostérique les autres protéines. Par exemple, des études d'interactions ont mis en évidence que la TSP-1 inhibe la liaison de SIRPα au récepteur CD47 (Isenberg et *al.,* 2009).

1. La surexpression de CD47

CD47 est une protéine ubiquitaire dont la surexpression dans un grand nombre de tumeur est associée avec un mauvais pronostic (Oldenborg, 2000 ; Jaiswal et *al.,* 2009 ; Chao et *al.,* 2012 ; Sudo et *al.,* 2017). Par immunohistochimie, Wang et son équipe ont démontré que le taux de survie des patients développant un carcinome des ovaires est réduit si celui-ci surexprime la protéine CD47 (Wang et *al.,* 2015). L'Atlas du génome du cancer rapporte aussi que 79 % des tumeurs ovariennes expriment le récepteur CD47 et que les niveaux d'ARNm sont augmentés dans 49 % des tumeurs (Brightwell et *al.,* 2016). De plus, il a été rapporté que les tumeurs ovariennes surexprimant CD47 sont moins sensibles à la chimiothérapie (Li et *al.,* 2017 ; Wang et *al.,* 2015). D'autres études ont également mis en évidence que CD47 est surexprimé dans les leucémies lymphoblastiques et myéloïdes (Jaiswal et *al.,* 2009 ; Majeti et *al.,* 2009), dans le lymphome non hodgkinien, dans l'ostéosarcome (Mohanty et *al.,* 2019), dans les cancers épidermoïdes de la tête et du cou (Pai et *al.,* 2019), dans le cancer de la vessie (Chan et *al.,* 2009a) ainsi que dans le cancer du sein (Willingham et *al.,* 2012 ; Zhang et *al.,* 2015 ; Zhao et *al.,* 2011). Par ailleurs, la TSP-1, CD36 et plus particulièrement CD47 sont fortement exprimés dans les biopsies de mélanome humain et les niveaux d'expression peuvent être corrélé à l'agressivité tumorale (Jayachandran et *al.,* 2014 ; Jeanne et *al.,* 2016a).

Bien que les mécanismes moléculaires régulant l'expression de CD47 ne soient pas clairement définis, le facteur hypoxique HIF-1 favorise l'expression de CD47 dans les cancers du sein (Zhang et *al.,* 2015). De plus, le 4Mu, un inhibiteur de la synthèse de l'acide hyaluronique, est capable de réduire l'expression de CD47 sur les cellules de carcinome hépatocellulaire à l'origine d'une augmentation de la clairance des cellules tumorales (Rodríguez et *al.,* 2018). Casey et son équipe ont également démontré que la signalisation de MYC intervient dans la surexpression de CD47 et de PD-L1 dans les cellules tumorales (Casey et a*l.,* 2016). En effet, la délétion de MYC dans les cellules tumorales murines et humaines diminue les niveaux de d'ARNm de CD47 et de PD-L1. Par ailleurs, l'expression du CD47 est soumise à une régulation post-transcriptionnelle par les miRNA. Le miR-133a et le miR-192 ont été décrit pour altérer la progression tumorale dans le carcinome épidermoïde de l'œsophage, le cancer colorectal et le médulloblastome en inhibant l'expression de CD47 (Suzuki et *al.,* 2012 : Yang et *al.,* 2015). De même, le miR-708 peut se lier directement au 3'UTR de CD47 et inhiber l'expression du récepteur (Huang et *al.,* 2018).

2. La mort cellulaire

CD47 participe activement à l'apoptose des cellules et joue donc un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. En effet, la liaison de la TSP-1 ou de son dérivé peptidique, le 4N1K, sur le récepteur CD47 favorise l'apoptose des cellules Jurkat et des cellules de leucémie lymphocytaire chronique (Mateo et *al.,* 2002). De même, il a été démontré qu'un anticorps liant le domaine IgV de CD47 appelé mAb22 favorise la mort cellulaire des cellules Jurkat, tandis que la compétition entre ce ligand et les anticorps anti-CD47, B6H12 et 2D3, ciblant respectivement un épitope à proximité et un site distant du domaine IgV, n'induisent aucun effet (Pettersen et *al.,* 1999). Ces résultats suggèrent donc que la réponse pro-apoptotique induite par l'activation de CD47 est dépendante de plusieurs sites situés sur le domaine IgV.

Bien que plusieurs voies de signalisation aient été décrites dans la mort cellulaire induite par le récepteur CD47, la plupart des études s'accordent à dire que le mécanisme est indépendant de l'activation des caspases **(Figure 35)**. Ce processus étant inhibé par la cytochalasine D ou par la délétion de la protéine N-WASP, il est probable qu'un réarrangement du cytosquelette d'actine est essentiel à l'apoptose induite par CD47 (Mateo et *al.,* 2002). Il a également été montré dans plusieurs lignées de cancer du sein que la stimulation de CD47 par le 4N1K favorise l'apoptose par le biais des protéines Gi dont l'activation réduit les niveaux d'AMPc et inhibe l'activité de la PKA (Manna & Frazier, 2004).

D'un autre côté, l'activation de CD47 a été décrit pour accroitre la sensibilité des cellules cancéreuses à des agents chimiothérapeutiques et des radiations ionisantes. En effet, la résistance des cellules cancéreuses de la prostate aux taxanes est corrélé à la surexpression de la protéine Txr1, dont l'activité inhibe considérablement l'expression de la TSP-1 (Lih et *al.,* 2006). Dans cette étude, Lih et son équipe ont également démontré que la stimulation de CD47 par la TSP-1 ou par le 4N1K, augmente l'apoptose induite par l'agent chimiothérapeutique. Plus récemment, une étude réalisée sur des cellules de carcinome épidermoïde a confirmé que la délétion de CD47 accroit la toxicité des radiations ionisantes (Pai et *al.,* 2019). En parallèle, il a été observé que des tissus ainsi que cellules vasculaires primaires issues de souris déficientes en TSP-1 ou en CD47 sont résistances aux lésions causées par des radiations ionisantes (Isenberg et *al.,* 2008a). De plus, la délétion ou l'inhibition du récepteur CD47 augmenterait la sensibilité des souris porteuses d'un mélanome ou d'un carcinome pulmonaire aux radiations ionisantes tout en conférant une radiorésistance aux tissus mous normaux, à la moelle osseuse et aux leucocytes associés aux tumeurs (Maxhimer et *al.,* 2009). Cet effet radioprotecteur des tissus sains est probablement causé par l'activation de l'autophagie ainsi que le rétablissement de l'activité cytoprotectrice du NO qui n'est plus inhibée par la voie de signalisation de TSP-1-CD47 (Soto-Pantoja et *al.,* 2015). Ainsi, ces résultats suggèrent que cibler l'interaction TSP-1-

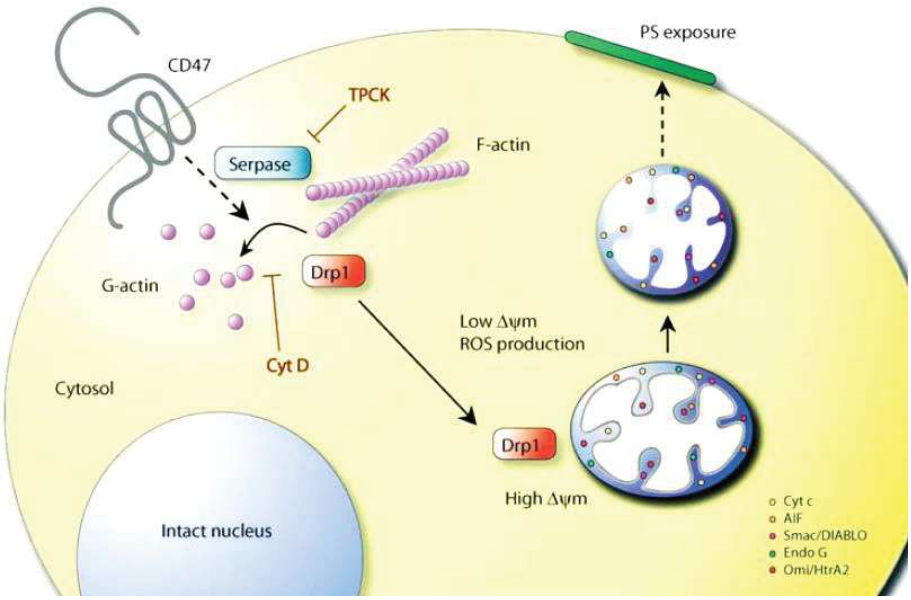


Figure 35 : CD47 induit une apoptose indépendante des caspases. L'activation de CD47 induit, par le biais des serpases, la dépolymérisation de l'actine ainsi que la translocation de la Drp-1 (*Dynamin Related Protein*-1) du cytosol aux mitochondries afin d'induire des lésions mitochondriales caractérisées par un effondrement du potentiel de la membrane mitochondriale, une production de ROS et l'absence de libération de protéines pro-apoptotiques à l'origine de l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS) et de l'élimination des cellules mortes. Adapté de Barbier et *al*., 2009

CD47 serait un moyen efficace d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie, tout en diminuant les effets nocifs sur les tissus normaux adjacents.

3. La survie et la prolifération cellulaire

Malgré ses fonctions pro-apoptotiques, CD47 a également été décrit pour favoriser la survie et la prolifération cellulaire. En effet, l'activation de CD47 par le 4N1 augmente la survie des cellules de carcinome folliculaire de la thyroïde à la camptothécine et à la doxorubicine ; ces deux agents chimiothérapeutiques étant largement décrits pour induire l'apoptose dans de nombreux modèles cellulaires (Rath et *al.,* 2006). De même, Rath et son équipe ont démontré que l'activation de CD47 inhibe l'apoptose induite par les céramides C2 en stimulant la voie AMPc-PKA dans les cellules de la thyroïde (Rath et *al.,* 2006). Ces études ont mis en évidence que l'activation de CD47 inhibe l'activité des caspases-3 afin de prévenir la mort cellulaire, tandis que l'expression de la TSP-1 est inhibée dans les cellules traitées par les différentes molécules cytotoxiques.

De plus, le 4N1 favorise l'interaction de CD47 avec le complexe Gβγ afin d'activer la voie PI3K-Akt et augmente la prolifération des cellules d'astrocytome (Sick et *al.,* 2011). De manière surprenante, la stimulation de CD47 n'affecte pas la prolifération des astrocytes normaux. Un fragment peptidique résultant du clivage protéolytique de la serpine A1 a également été décrit pour favoriser la prolifération cellulaire des cellules hépatiques cancéreuses et des cellules de cancer du sein par le biais du récepteur CD47 et de la PKC (Congote & Temmel, 2004). En parallèle, il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que la TSP-1 favorise le développement des lymphomes cutanés par le biais de ERK et Akt tandis que l'inhibition de CD47 avec un anticorps bloquant est associée avec une inhibition du développement tumoral (Kamijo et *al.,* 2019). La régulation positive de CD47 dans la prolifération a également été confirmée dans un modèle *in vivo* de mélanome et de cancer du poumon non à petites cellules (Wang et *al.,* 2013 ; Zhao et *al.,* 2016a).

4. L'immunité

L'importance de CD47 dans l'immunité a été mis en évidence suite au développement de modèle *knockout*. Oldenborg et son équipe ont montré que la transfusion de globules rouges déficients en CD47 dans des souris *wild type* conduit à une élimination rapide des globules rouges $CD47^{-/-}$ (Oldenborg et *al.,* 2000). L'analyse histologique des animaux a révélé que les

globules rouges CD47$^{-/-}$ sont engloutis par les macrophages de la rate tandis que les tests de phagocytose *in vitro* ont identifié que SIRPα est le médiateur de ce processus. En effet, par mutagénèse dirigée, il a été démontré que la liaison de SIRPα à CD47 induit un signal inhibiteur qui empêche la phagocytose et la reconnaissance du « non soi » (Ishikawa-Sekigami et *al.,* 2006) **(Figure 36)**. Ces résultats suggèrent donc que CD47 régule la protection des cellules souches et progénitrices contre l'élimination par les macrophages. Depuis, un certain nombre d'études ont décrit que CD47 agit comme un "marqueur du soi" et qu'il joue un rôle particulièrement important en permettant la transplantation solide et hématologique à travers les barrières xénogéniques (Blazar et *al.,* 2001; Takenaka et *al.,* 2007 ; Yamauchi et *al.,* 2013).

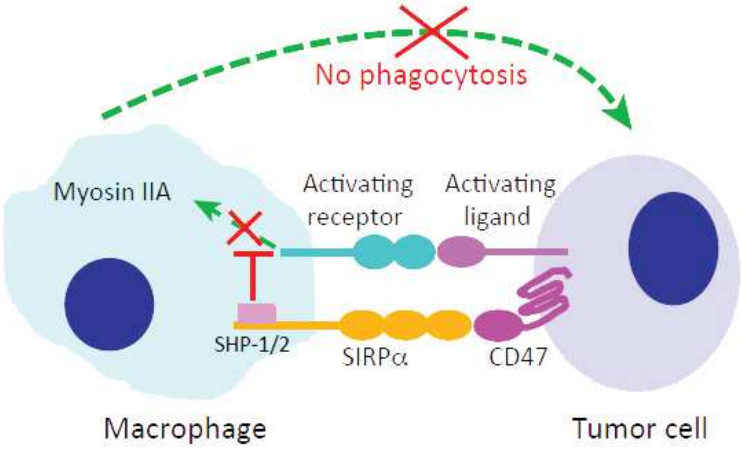


Figure 36 : CD47 régule la phagocytose par les macrophages. L'interaction de SIRPα avec CD47 par leur domaine IgV induit la phosphorylation des quatre résidus tyrosines des domaines ITIM par des protéines de la famille Src à l'origine du recrutement et de l'activation des phosphatases SHP-1 et SHP-2. Ces phosphatases inhibent alors la capacité des récepteurs pro-phagocytaires à déclencher la phagocytose des cellules cancéreuses exprimant CD47 à leur surface. Bien que le mécanisme par lequel SHP-1 et SHP-2 inhibent la phagocytose n'est pas entièrement élucidé, cela implique l'inhibition de la myosine IIA non musculaire. Adapté de Veillette & Chen, 2018.

Par ailleurs, de nombreuses études ont étudiées la contribution de l'interaction entre CD47 et SIRPα dans la clairance des cellules cancéreuses. Weissman et son équipe ont notamment montré dans un certain nombre de cancers, hématologiques ou non, que CD47 favorise l'échappement des cellules cancéreuses au système immunitaire et à la phagocytose (Chao et *al.,* 2010 ; Jaiswal et *al.,* 2009 ; Majeti et *al.,* 2009). Le blocage du récepteur CD47 par différents anticorps favorise la clairance des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* (Matlung et *al.,* 2017). En revanche, l'appauvrissement des macrophages par l'acide clodronique altère la clairance des cellules cancéreuses par l'anti-CD47 (Majeti et *al.,* 2009). En effet, une fois phagocyté par les macrophages, l'acide clodronique se libère dans le cytosol des cellules où il

est converti en un analogue de l'ATP non hydrolysable afin d'induire l'apoptose des cellules du système immunitaire, empêchant ainsi le signal pro-phagocytaire de l'anticorps. Outre le fait de favoriser la phagocytose, le blocage de CD47 augmente le recrutement des macrophages dans la tumeur. En effet, dans un modèle de souris porteuses d'un cancer du poumon à petites cellules, l'utilisation d'un anticorps anti-CD47, le Hu5F9-G4, induit la phagocytose des cellules cancéreuses à l'origine d'une sécrétion de chimiokines et de cytokines qui recrutent des cellules immunitaires dans la tumeur (Weiskopf et *al.,* 2016). De même, une étude réalisée sur le glioblastome a montré que l'inhibition de CD47 augmente le recrutement des macrophages et

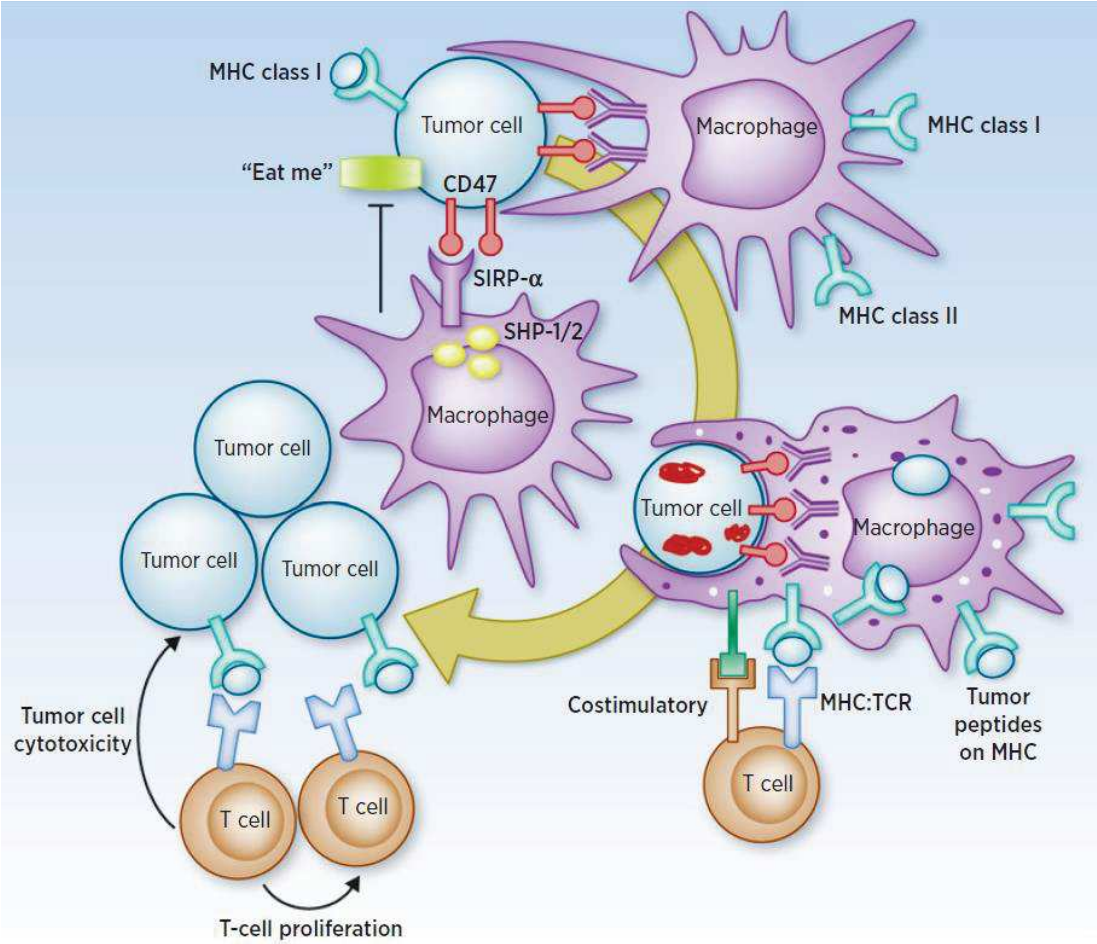


Figure 37 : Cibler l'interaction CD47-SIRPα stimule la réponse immunitaire anti-tumorale. L'engagement de CD47 avec le domaine IgV de SIRPα exprimé à la surface des macrophages inhibe la phagocytose tumorale selon le mécanisme détaillé précédemment. L'inhibition de l'interaction CD47-SIRPα par des anticorps ou d'autres stratégies favorise la phagocytose des cellules tumorales par les cellules présentatrices d'antigènes (APC). Les antigènes associés à la tumeur sont alors présentés par les APC sur leur CMH. Les lymphocytes T naïfs réactifs aux tumeurs peuvent ensuite s'engager avec le CMH des APC présentant les néoantigènes tumoraux et ce, avec après reconnaissance d'un coactivateur. Les lymphocytes T spécifiques de la tumeur sont ensuite activés et se développent afin d'induire une cytotoxicité des cellules tumorales spécifiques de l'antigène sur les cellules malignes restantes. Adapté de McCracken et *al.,* 2015

convertit les *tumor-associated macrophages* en macrophages pro-inflammatoires. Bien que les effets sur les macrophages soient plus détaillés, d'autres cellules immunitaires peuvent également répondre aux thérapies inhibant le complexe SIRPα-CD47. Une étude réalisée sur un modèle *in vivo* de mélanome murin a notamment montré que la liaison de SIRPα à CD47 inhibe l'ADCC (*Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*) et plus particulièrement la cytotoxicité induite par l'anticorps TA99 en réponse à la reconnaissance de l'antigène gp75 (Zhao et *al.,* 2011). Dans des souris immunocompétentes, les cellules dendritiques ont également été décrites pour contribuer à l'efficacité des thérapies anti-CD47 (Liu et *al.,* 2015a). En effet, le blocage de CD47 stimule l'activité des cellules T cytotoxiques en augmentant la présentation d'antigène par les cellules dendritiques (Chao et *al.,* 2010 ; Liu et *al.,* 2015a) **(Figure 37)**. De même, Soto-Pantoja et son équipe ont mis en évidence que le blocage de CD47 induit une réponse immunitaire antitumorale cytotoxiques dépendante des cellules T dans le fibrosarcome (Soto-Pantoja et *al.,* 2014). Enfin, dans un modèle de souris porteuses de mélanome, la délétion de CD47 dans les cellules T cytotoxiques augmente leur activité antitumorale, tandis que l'augmentation de l'expression de CD47 diminue l'infiltration des lymphocytes T dans la tumeur (Soto-Pantoja et *al.,* 2014).

5. L'angiogenèse

La TSP-1 et le 4N1K inhibent la migration des cellules endothéliales du cerveau et altèrent la formation d'un réseau tubulaire dans des modèles de *wound healing* et de *Transwell* (Xing et *al.,* 2009). À l'aide de fragments recombinants, il a été montré que la liaison de la TSP-1 à CD47 inhibe l'activation de la GC induite par le NO afin d'inhiber le processus d'angiogenèse (Isenberg et *al.,* 2006). Ce mécanisme de régulation a par la suite été confirmé dans les plaquettes ainsi que dans les cellules musculaires lisses (Miller et *al.,* 2010). A l'inverse, le blocage du récepteur restaure la voie de signalisation du NO et augmente le flux sanguin. Il a notamment été montré dans plusieurs modèles *in vivo* de transplants de peau ou d'organes que la délétion ou l'inhibition de CD47 avec des anticorps bloquants tels que miap301 augmente la survie des greffons (Isenberg et *al.,* 2008a ; Isenberg et *al.,* 2008b ; Isenberg et *al.,* 2009).

De plus, la liaison du domaine central de la TSP-1 à CD36 inhibe l'activité du VEGFR2 ainsi que les voies de signalisation sous-jacentes. En effet, une fois activé, CD36 forme un complexe avec les intégrines β1 ainsi qu'avec le VEGFR2 afin d'inhiber sa phosphorylation en Y1175 et le processus d'angiogenèse (Zhang et *al.,* 2009). Comme précédemment décrit, Isenberg et son équipe ont démontré que la stimulation de CD36 n'affecte pas l'angiogenèse dans des cellules

déficientes en CD47 démontrant ainsi que l'effet anti-angiogénique de CD36 est dépendant de CD47 (Isenberg et *al.,* 2008b). Par ailleurs, dans un modèle *in vivo* de cancer de la prostate, la délétion de CD47 s'accompagne d'une augmentation du processus d'angiogenèse et d'une surexpression du VEGFR2 ainsi que de son ligand, le VEGF-A (Gao et *al.,* 2017). Enfin, comme décrit préalablement dans la section E - II - 2.3, Kaur et son équipe ont également rapporté que la liaison de la TSP-1 à CD47 inhibe l'activation du VEGFR2 et la voie de signalisation sous-jacente (Kaur et *al.,* 2010).

6. Migration et invasion

Des études ont également mis en évidence des fonctions de CD47 dans la migration cellulaire. Il a initialement été décrit qu'une inhibition du récepteur avec un anticorps altère la transmigration des cellules du système immunitaire à travers l'endothélium (Cooper et *al.,* 1995 ; De Vries et *al.,* 2002). Par ailleurs, en interagissant avec les intégrines α2β1 et *via* Gi, CD47 réduit les niveaux d'AMPc intracellulaire et inhibe l'activité de ERK afin de favoriser la migration des cellules musculaires lisses dans une matrice de collagène (Wang & Frazier, 1998 ; Wang et *al.,* 1999). Une autre étude a, quant à elle, démontré que le complexe CD47-α2β1-Gi stimule la migration des cellules épithéliales intestinales sur une matrice de collagène de type I en augmentant l'expression de COX2 (*Cyclooxygenase-2*) (Broom et *al.,* 2009). De plus, Shinohara et son équipe ont observé que CD47 est colocalisé avec la E-cadhérine au niveau des adhérences cellules-cellules des cellules épithéliales et que la surexpression du récepteur perturbe partiellement les adhérences entre les cellules et favorise la migration cellulaire (Shinohara et *al.,* 2006). Ces résultats suggèrent donc que CD47 participe à l'adhérence et à la migration cellulaire en réorganisant le cytosquelette d'actine dans les cellules épithéliales.

Cependant, le rôle de CD47 dans la migration des cellules cancéreuses est moins bien décrit. Une étude menée sur des cellules de carcinome épidermoïde a récemment démontré que CD47 favorise l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine et la vimentine, et inhibe l'expression des marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine (Pai et *al.,* 2019). Bien que l'implication de CD47 n'ait pas été mis en évidence, Jayachandran et son équipe ont également montré que la TSP-1 est fortement exprimée dans les cellules de mélanome ayant subis une TEM (Jayachandran et *al.,* 2014). Il est donc possible que l'activation de CD47 par la TSP-1 puisse participer au processus de TEM dans les cellules cancéreuses. Par ailleurs, l'interaction de CD47 avec les intégrines αvβ3 et αvβ5 favorise la propagation des cellules de mélanome sur la vitronectine en activant la protéine FAK et la PI3K (Gao et *al.,* 1996). L'effet

pro-migratoire de CD47 serait lié à la localisation du complexe CD47-αvβ3-Gi au sein des radeaux lipidiques enrichis en cholestérol (Green et *al.,* 1999). Néanmoins, CD47 est capable de favoriser l'adhérence cellulaire par le biais des intégrines αvβ3 et α4β1, et ce par des voies de signalisations indépendantes du cholestérol et des protéines G (Brittain et *al.,* 2004 ; McDonald et *al.,* 2004). Plusieurs études ont également associé la délétion du récepteur CD47 et la stimulation par la TSP-1 avec respectivement une inhibition et une augmentation de la migration, en *wound healing* ou en *Transwell*, de plusieurs lignées cancéreuses des ovaires, de la prostate, d'ostéosarcome et de lymphomes suggérant un rôle pro-migratoire de CD47 (Firlej et *al.,* 2011 ; Hu et *al.,* 2017 ; Kamijo et *al.,* 2019 ; Pai et *al.,* 2019). A l'inverse, il a été démontré *in vitro* que l'interaction de SIRPα avec CD47 inhibe la migration des cellules de mélanome Melan-a (Ogura et *al.,* 2004). En effet, la liaison de SIRPα sur le récepteur CD47 situé à la membrane des cellules de mélanome, inhibe l'expression du ligand dans les cellules adjacentes en stimulant sa dégradation par le protéasome. La dégradation accrue de SIRPα conduit alors à une inhibition de la phosphatase SHP-2 à l'origine d'une inhibition de la déphosphorylation de FAK et donc du désassemblage des adhérences focales (Ogura et *al.,* 2004). De manière surprenante, d'après cette même étude, SIRPα n'affecte pas la migration des cellules de mélanome B16F10. En effet, la structure de SIRPα dans les deux lignées de mélanomes diffère et une N-glycosylation aberrante du ligand altère son interaction avec le récepteur CD47 dans les B16F10 (Ogura et *al.,* 2004). Enfin, CD47 a été rapporté pour favoriser la dissémination des cellules cancéreuses en régulant l'invasion tumorale. En effet, CD47 favorise l'invasion des cellules cancéreuses du poumon dans un modèle de puce microfluidique coaté avec du matrigel, et ce, par un mécanisme dépendant de la protéine Cdc42 (Zhao et *al.,* 2016a). Zhao et son équipe ont également observé dans un modèle *in vivo* que la délétion de CD47 s'accompagne d'une diminution du nombre de métastases (Zhao et *al.,* 2016a). Des résultats similaires ont été obtenus dans des souris porteuses de mélanome, de cancer de la vessie et de carcinome épidermoïde de la tête et du cou (Wang et *al.,* 2013 ; Willingham et *al.,* 2012). Enfin, il a été rapporté que CD47 favorise l'invasion des cellules de glioblastomes en *Transwell* en activant la voie de signalisation PI3K-Akt (Liu et *al.,* 2019). De nombreuses autres études ont mis en avant le rôle pro-migratoire et pro-invasif de la TSP-1, et ce notamment dans le mélanome, mais l'implication de CD47 dans ces fonctions reste à démontrer.

IV. Les thérapies ciblant CD47

Diverses thérapies ciblant le complexe CD47-SIRPα sont en cours d'études précliniques et cliniques **(Tableau 3)**. En effet, à ce jour, huit molécules ciblant CD47 sont en étude clinique

de phase I/II dans le cadre des traitements des cancers hématologiques et des tumeurs solides (Feng et *al.,* 2020).

Tableau 3 : Les principaux inhibiteurs de l'axe CD47-SIRPα. Adapté de Feng et *al.,* 2020

Sponsor (Lead Drug)	ID	Types of cancer	Additional information	Phase	Completion Date
Forty Seven Hu5F-G4	NCT02953509	Relapsed / Refractory B-cell NHL	+ Rituximab	I/II	January 2023
	NCT02953782	Solid Tumors and ACC	+ Cetuximab	I/II	March 2023
	NCT03248479	HM	Monotherapy or + Azacitidine	I	August 2022
	NCT03558139	Ovarian Cancer	+ Avelumab	I	May 2023
Celgene CC-90002	NCT02641002	AML, MDS	Monotherapy	I	July 2018
	NCT02367196	Hematologic Neoplasms	Monotherapy or + Rituximab		May,2021
Surface Oncology SRF231	NCT03512340	Advanced Solid and Hematologic Cancers	Monotherapy	I	October 30, 2020
ALX Oncology ALX148	NCT03013218	Advanced Solid Tumors and Lymphoma	Monotherapy or + Rituximab /Pembrolizumab /Trastuzumab	I	December 2019
Trillium TTI-621	NCT02663518	HM and Selected Solid Tumors	Monotherapy or +Rituximab /Nivolumab	Ia / Ib	June 2020
	NCT02890368	Relapsed and Refractory Solid Tumors and Mycosis Fungoides	Monotherapy or + PD1/PD-L1 Inhibitor /pegylated interferon-α2a /T-Vec/radiation	I	December 2019
Trillium TTI-622	NCT03530683	Relapsed or refractory lymphoma or myeloma	+Rituximab	I	April 2021
Arch Oncology AO-176	NCT03834948	Multiple solid tumor malignancies	Monotherapy	I	July 2021
Innovent Biologics IBI188	NCT03763149	Advanced malignant tumors and lymphomas	Monotherapy	I	Aug 2022
	NCT03717103	Advanced Malignancies	Monotherapy or + Rituximab		Jan 2022

Abbreviation: NHL, Non-Hodgkin Lymphoma; ACC, Advanced Colorectal Cancer; HM, Hematological Malignancies; AML, Acute myeloid leukemia; MDS,myelodysplastic syndromes;

En l'absence d'engagement des récepteurs pro-phagocytaires, le blocage de l'interaction SIRPα-CD47, par des fragments Fab anti-CD47 ou des *nanobodies*, n'est généralement pas suffisant pour déclencher la phagocytose. En revanche, lorsque les récepteurs pro-phagocytaires sont activés, le blocage du complexe SIRPα-CD47 induit une phagocytose efficace. Ce processus peut être déclenché en utilisant des anticorps anti-CD47 bloquants contenant une portion Fc, qui induit l'activation des FcR sur les macrophages ou bien en ajoutant des anticorps antitumoraux contenant une portion de Fc, tels que le rituximab, le trastuzumab ou le cetuximab (Veillette & Chen, 2018 ; Weiskopf et *al.,* 2017). En outre, la phagocytose peut être stimulée lorsque les cellules tumorales expriment des ligands pour d'autres récepteurs pro-phagocytaires tels que SLAMF7 et Mac-1 (Veillette & Chen, 2018). De ce fait, les thérapies anti-CD47 sont maintenant étudiées en combinaison avec d'autres anticorps antitumoraux opsonisant.

Les anticorps anti-CD47 sont les thérapies les mieux caractérisées avec une efficacité démontrée *in vitro* et *in vivo*, dans des modèles de xénogreffes de souris ainsi que dans des souris immunocompétentes, et ce contre une grande variété de tumeurs. Parmi ces anticorps anti-CD47 humanisé, le Hu5F9-G4 et le CC-90002 semblent prometteurs (Matlung et *al.,* 2017 ; Weiskopf et *al.,* 2017). D'un autre côté, des polypeptides recombinants dérivés de SIRPα ont également été développés. Ces composés interagissent et lient CD47 afin d'entrer en

compétition avec les cellules du système immunitaire exprimant SIRPα. Par la suite, plusieurs variants, tels que le TTI-621, ont été créé en fusionnant le domaine N-terminal de SIRPα *wild type* à un domaine Fc humain (Feng et *al.,* 2020 ; Weiskopf et *al.,* 2017). Une étude a notamment rapporté que le TTI-621 favorise la phagocytose des cellules cancéreuses médiée par les macrophages dans des souris porteuses de leucémie myéloïde aiguë et de lymphome B (Petrova et *al.,* 2017). Cependant, la toxicité globale du TTI-621 est plus élevée pour les autres cellules en raison d'une ADCC plus forte des IgG1 (Huang et *al.,* 2017). Enfin, la dernière génération de protéines de fusion SIRPα-Fc a été conçue pour améliorer la liaison à CD47. Il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que ces composés sont capables d'induire la phagocytose des cellules cancéreuses sans aucune stimulation supplémentaire (Krampitz et *al.,* 2016 ; Weiskopf et *al.,* 2013 ; Weiskopf et *al.,* 2016).

En outre, il est possible que ces thérapies régulent la synthèse du NO et l'angiogenèse subséquente en modulant l'interaction TSP-1-CD47 puisqu'il a déjà été montré que le B6H12 perturbe simultanément les interactions TSP-1-CD47 et SIRPα-CD47 (Isenberg et *al.,* 2008b). De même, les anticorps anti-CD47 peuvent potentiellement interférer avec les voies de signalisation anti-angiogéniques de CD36 étant donné que CD47 est essentiel à l'activation de CD36 par la TSP-1 (Isenberg et *al.,* 2006).

Un peptide cyclique dérivé de CD47, appelé TAX2, a également été développé afin de se lier à la TSP-1 et d'empêcher sélectivement l'interaction TSP-1-CD47 (Jeanne et *al.,* 2015). Dans un modèle animal de mélanome murin, le TAX2 inhibe le développement tumoral et le processus d'angiogenèse. Des études *in vitro* suggèrent que les propriétés anti-angiogéniques du composé sont médiées par l'activation de CD36. En effet, en inhibant le complexe TSP-1-CD47, le TAX2 augmente la quantité de TSP-1 soluble biodisponible libre de son engagement avec CD47 mais capable d'interagir avec CD36 par le biais de ses trois répétitions de type 1 (Jeanne et *al.,* 2015). A ce jour, cette molécule a également été décrite dans des modèles de mélanome humain, de carcinome du pancréas, de neuroblastome et de glioblastome pour inhiber le développement tumoral, l'angiogenèse et la dissémination des cellules cancéreuses (Daubon et *al.,* 2019 ; Jeanne et *al.,* 2015 ; Jeanne et *al.,* 2016a ; Jeanne et *al.,* 2016b).

Enfin, afin de stimuler le processus anti-angiogénique médié par CD36, plusieurs dérivés peptidiques de la TSP-1 mimant le motif GVITRIR des trois répétitions de type 1 ont été développés. Bien que l'ABT-526 et son énantiomère, l'ABT-510, ont favorisé la régression de

la pathologie dans les études précliniques, l'absence d'efficacité en phase II d'essai clinique et le développement d'effets secondaires ont conduit à son arrêt (Jeanne et *al.,* 2015). Une autre approche consistant à favoriser l'expression de la TSP-1 dans le microenvironnement tumoral afin d'inhiber l'angiogenèse a été approuvée dans le cadre du traitement de deuxième ligne du cancer des ovaires en récidive avec la trabectédine (Dossi et *al.,* 2015). Selon le même mécanisme, une molécule développée par Vigeo Therapeutics, le VT1021, est actuellement en cours d'étude de phase I dans le cadre du traitement des cancers du pancréas, des ovaires et du sein.

Matériel et Méthodes

MATERIEL ET METHODES

A. Culture cellulaire des lignées de mélanomes et des mélanocytes

Les mélanocytes proviennent de la société Lonza (Bâle, Suisse) et sont maintenus dans du milieu Dermal Cell Basal Medium (ATCC) supplémenté de 1 % de M8 supplément, de L-Glutamine (6 mM), d'insuline (5 µg/mL), d'acide ascorbique (50 µg/mL), d'épinéphrine (1 µM), de chlorure de calcium (0,2 mM), de pénicilline (10 UI/mL) et de streptomycine (10 µg/mL). Les composés ajoutés au milieu proviennent de la société ATCC.

Les différentes lignées primaires humaines de mélanomes comprenant deux lignées *in situ*, deux lignées invasives et quatre lignées métastatiques **(Tableau 4)**, à l'origine établies par l'Institut Wistar (Philadelphie) sont commercialisées par la société Rockland Immunochemicals (Limerick, PA, USA). Les cellules de mélanomes sont maintenues dans un milieu MDCB153/L-15 supplémenté de 2 % de SVF décomplémenté (30 min, 56°C), de $CaCl_2$ (1,68 mM), de pénicilline (100 UI/mL) et de streptomycine (50 µg/mL). La lignée stable de mélanome métastatique humain A375 (ATCC, CRL-1619) et la lignée de mélanome murin B16F10 (ATCC, CRL-6475) sont maintenues dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (Lonza) supplémenté de 10 % de SVF décomplémenté (30 min, 56°C), de pénicilline (100 UI/mL) et de streptomycine (50 µg/mL).

Tableau 1 : Caractéristiques des lignées cellulaires utilisées.

Espèce	Lignées cellulaires	Grade de malignité	Mutations	Ratio de démultiplication
Humain	Mélanocyte	Normal	/	10^6 cellules.
	WM1552C	In situ	BRAF V600E PTEN	1 : 5
	WM1862		BRAF V600E	1 : 4
	WM983A	Invasif	BRAF V600E	1 : 5
	WM115		BRAF V600D PTEN	1 : 3
	WM3622	Métastatique	PTEN F3375S	1 : 3
	WM3456		NRAS Q61K	1 : 4
	WM 266-4		BRAF V600D PTEN	1 : 3
	WM983B		BRAF V600E	1 : 10
	A375		BRAF V600E CDKN2A	1 : 5
Murin	B16F10	Métastatique	/	1 : 10

Les passages des cellules sont effectués lorsque les cellules atteignent 90 % de confluence. A ce stade, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS (Dutscher) puis détachées avec de la trypsine 1X (Lonza) durant 3 min à 37°C. L'action enzymatique de la trypsine est neutralisée par l'ajout de DMEM 10 % de SVF. Selon les recommandations du fournisseur, la suspension cellulaire est alors ensemencée selon un ratio de démultiplication (**Tableau 4**) et cultivée dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère à 5 % de CO_2 et saturée en vapeur d'eau.

B. siRNA et traitement des cellules

Transfection de siRNA

Les siRNA (Small interfering RNA) sont des petits ARN pouvant se lier spécifiquement à des séquences d'ARN messager, les cliver et ainsi empêcher l'expression du gène pour une durée de 48-72 h. Les cellules sont ensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 250 000 cellules/puit dans 2 mL de milieu de culture. Après 24 h d'incubation à 37°C, les cellules sont transfectées avec 50 pmol de siRNA dirigé contre CD47 (ThermoFischer, CD47 siRNAs, n380676) ou contre FAK (5'-UGACAGAUACCUAGC AUCUAGCAAA-3', Dharmacon) pour 5 µL de lipofectamine 2000 (11668019, Invitrogen) et ce dans 500 µL d'Opti-MEM (31985062, Gibco). En parallèle, un contrôle négatif est réalisé avec un siRNA ne ciblant aucune séquence (Dharmacon). Les cellules transfectées sont incubées 48 h à 37°C. Le siFAK est dirigé contre une séquence non codante en 5'-UTR du gène codant pour la protéine. Des co-transfections de siFAK et de plasmide codant pour la protéine FAK WT GFP, FAK Y397F GFP et FAK 936E 998E GFP ont donc pu être réalisées.

PF-573228, un inhibiteur de FAK

Le PF-573228 est un inhibiteur compétitif réversible du domaine tyrosine kinase de FAK. Contrairement aux autres molécules ciblant FAK, le PF-573228 est une molécule hautement sélective du site Y397 de FAK. Il provient de la société Selleckchem (Houston, TX, USA). Afin d'évaluer le rôle de FAK dans l'invasion du mélanome, les cellules sont traitées au PF-573228 à 1 µM pendant 12 h à 37°C

TSP-1 et 4N1, des agonistes de CD47

La TSP-1 et son dérivé peptidique, le 4N1, proviennent respectivement de Millipore (605225-25UG) et de Bachem (4031305.0005). Afin d'évaluer l'effet d'une stimulation de CD47 sur l'invasion du mélanome, la TSP1 et le 4N1 ont été utilisées à des concentrations de 1 µg/mL et 100 µM respectivement.

Miap-301, un anticorps bloquant CD47

Un anticorps bloquant CD47, le miap 301, provenant de BD Pharmingen (562220) a également été utilisé afin d'évaluer l'effet d'une inhibition de CD47 sur l'invasion du mélanome. Les cellules sont traitées avec 10 µg/mL d'anticorps pendant 12h à 37°C. Dans le cas d'un co-traitement des cellules avec l'anticorps bloquant et un agoniste de CD47, l'anticorps est ajouté dans le milieu 30 min avant le ligand.

PD98059, un inhibiteur de MEK

Le PD98059 est un inhibiteur sélectif de MEK1 et MEK2. Il lie la forme inactive des protéines et prévient leurs activations par des activateurs en amont dans la voie des MAPK tel que c-Raf. Il provient de la société Invitrogen (PHZ1164). Afin de démontrer que l'effet de CD47 sur l'invasion du mélanome est dû à une activation de la voie MAPK, les cellules sont traitées 30 minutes avec 5 µM de PD98059.

C. Transfection de plasmides

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 250 000 cellules/puit dans 2 mL de milieu de culture. Après 24 h d'incubation à 37°C, les cellules sont transfectées avec 1 µg de FAK WT GFP, 4 µg de FAK Y397F, 4 µg de FAK 936E 998E GFP, 2 µg de FAT GFP ou 4 µg de LD2-LD4 GFP pour 7 µL de lipofectamine 2000 (11668019, Invitrogen) et ce dans 500 µL d'Opti-MEM (31985062, Gibco). Les cellules sont incubées 48 h à 37°C.

Les conditions FAK WT GFP, FAK Y397F GFP et FAK 936E 998E GFP sont cotransfectés simultanément avec un siRNA ciblant FAK. Les cellules transfectées sont incubées 48 h à 37°C.

D. Modèles d'invasion

Invasion en *Transwell*

Ce modèle a été utilisé afin d'évaluer les capacités migratoires et invasives des cellules mélanome murin soumis à un gradient de SVF dans une matrice tridimensionnelle de Matrigel.

Les manipulations ont été effectuées dans des inserts de culture Transwell individuels avec des pores de 8µm de diamètre et une membrane en PET (24 puits, Millipore, PIEP12R48). Le diamètre des pores est suffisamment grand pour permettre à une cellule de traverser la membrane par un processus de migration et/ou d'invasion. Tandis que l'étude de la migration cellulaire nécessite des inserts non coatés, le processus d'invasion requière que les insert de

culture soient préalablement coatés avec une solution de matrigel (Corning, 356234). Le matrigel est une préparation de membrane basale reconstituée qui est extraite du sarcome de souris Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), une tumeur riche en protéines de la matrice extracellulaire (laminine, collagène de type IV, facteurs de croissance). Le coating des inserts est réalisé dans la glace avec du matériel préalablement réfrigéré à - 20°C. Après avoir été disposé en plaque 24 puits, les inserts sont coatés avec 100 µL d'une solution de matrigel diluée au 1/25 dans du milieu de culture dépourvu de sérum puis incubés 90 min à 37°C pour polymériser. Une fois les inserts préparés, 300 µL de milieu dépourvu de SVF est ajouté dans la partie supérieure de l'insert tandis que 700 µL de milieu enrichi avec 10 % de SVF sont disposés dans le puit de la plaque afin de créer un gradient de chémoattraction. Les cellules, à une concentration de 100 000 cellules/insert, ainsi que les différents traitements sont également ajoutés dans la partie supérieure de l'insert. Après 24 h d'incubation à 37°C, les inserts sont rincés avec 500 µL de PBS puis la face interne des inserts est nettoyée par écouvillonnage pour éliminer les cellules non invasives. Une fois l'intérieur de l'insert nettoyé, les cellules de la face extérieure de la membrane sont fixées dans du paraformaldéhyde 4 % et colorées au DAPI dilué au 1/5000. Les cellules ayant traversé la membrane dans les conditions de migration et d'invasion sont ensuite comptées à l'aide d'un microscope à épifluorescence. Le pourcentage d'invasion est déterminé comme le rapport entre le nombre moyen de cellules qui envahissent dans des inserts coatés avec du Matrigel et le nombre moyen de cellules qui migrent dans les inserts non coatés.

Invasion dans une matrice tridimensionnelle de collagène

Cette technique permet d'évaluer les capacités invasives des mélanocytes et des cellules de mélanome soumis à un gradient de SVF dans une matrice tridimensionnelle de collagène. Ce modèle d'invasion est adapté du papier de Sadok et al. (2015).

Afin de quantifier la progression des cellules dans la matrice de collagène, celles-ci sont marquées à l'Hoechst 33342 à 0,1µg/mL quelques heures avant le début de l'expérience. Après marquage, les cellules sont suspendues dans une solution de collagène de type 1 neutralisée à une concentration de 300 000 cellules/mL. Pour 1 mL, la solution de collagène est composée de 260 µL de DMEM 5X (D1152, Sigma), de 701 µL de Collagène de Type 1 à 3 mg/mL (5005-B, Advanced biomatrix) et ajustée à un pH de 7 avec de la soude 0,1 M. Après suspension des cellules, 600 µL sont déposés dans les puits d'une plaque noire à fond de verre (058062, Dutscher) préalablement coatés avec de la BSA 0,2 %. La plaque est ensuite centrifugée à 1500

rpm pendant 5 minutes à 4°C. Après avoir vérifié la précipitation des cellules au fond des puits avec un microscope à fluorescence, la plaque est incubée 3 h à 37°C pour permettre la polymérisation du collagène. Enfin, du milieu de culture supplémenté de 10 % de SVF et de 100 ng/mL de EGF sont ajoutés dans chaque puit. Après 24 h d'incubation à 37°C, les cellules sont observées au microscope confocal Leica TSC SPE équipé d'un objectif x63 à huile HCX Pl Apo 1.32 NA (Wetzlar, Allemagne). Un stack d'image est acquis entre 0 et 60 µm dans quatre champs pris aléatoirement pour chacune des conditions. La localisation des noyaux dans la matrice 3D de collagène est réalisé avec le logiciel Imaris. Un index d'invasion est calculé pour chaque condition en faisant le ratio de la somme des cellules comprises entre 10 µm et 60 µm par le nombre total de cellule.

Visualisation des invadopodes dans un modèle 2,5D

Cette technique permet de visualiser la formation et l'élongation des invadopodes lors de l'invasion des cellules de mélanome. Ce modèle est adapté de Schoumacher et al. (2010).

Des inserts de culture Transwell avec des pores de 1 µm de diamètre sont utilisés. Le diamètre des pores correspond au diamètre moyen d'un invadopode, il est donc plus petit que le noyau d'une cellule. L'avantage de ce test est donc d'empêcher le passage de cellules au travers de la membrane tout en permettant la formation des invadopodes. Après avoir été disposés en plaque 12 puits, les inserts sont coactés avec 250 µL d'une solution de gélatine fluorescente. Cette solution est composée à 80 % de collagène de type 1 neutralisé à 3 mg/mL (5005-B, Advanced biomatrix) et à 20 % de gélatine fluorescente à 0,5 mg/mL (ECM670, Merck). Après 1 h d'incubation à 4°C, 150 µL de la solution sont retirés des inserts puis la plaque est incubée 30 minutes à 37°C. Après polymérisation de la matrice fluorescente, 1 mL de milieu dépourvu de SVF est ajouté dans la partie supérieure de l'insert tandis que 1 mL de milieu enrichi avec 10 % de SVF et 40 ng/mL d'EGF est utilisé pour créer un gradient de chémoattraction. Les cellules de mélanome sont déposées dans la partie supérieure de l'insert à une concentration de 50 000 cellules/insert. Après 24 h d'incubation à 37°C, les inserts sont lavés avec du PBS et fixés selon le protocole d'immunocytochimie décrit à la section G . Les membranes des inserts sont ensuite découpées et montées sur une lame avec du milieu de montage anti-photoblanchiment Prolong Gold® (Invitrogen). Les échantillons sont conservés à l'obscurité à 4°C jusqu'à observation au microscope confocal Leica TSC SPE équipé d'un objectif x63 à huile HCX Pl Apo 1.32 NA (Wetzlar, Allemagne).

E. Western Blot

Extraction des protéines

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 6 puits et traitées selon les protocoles décrit précédemment. A 80 % de confluence les cellules sont rincées deux fois avec du PBS froid sur glace. Elles sont ensuite grattées dans un volume de 150 µL de tampon de lyse RIPA (25 mM de Tris-HCl pH 7,6, 150 mM de chlorure de sodium, 1 % de Tergitol NP-40, 1 % de désoxycholate de sodium et 0,1 % de SDS) supplémenté de 1 % d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases 100X (aprotinine, bestatine, E-64, leupeptine, fluorure de sodium, orthovanadate de sodium, pyrophosphate de sodium et glycérol-2-phosphate). Après une incubation de 15 min sur glace, le lysat cellulaire est centrifugé à 14 000 x *g* pendant 15 minutes à 4°C. Les surnageants sont récupérés et la concentration en protéines est déterminée avec le Kit DC Protein Assay (BioRad, Hercules, CA, USA). Ce dernier est basé sur la méthode de dosage de Lowry selon laquelle la réduction des acides aminés aromatiques (tryptophane et tyrosine) conduit à la formation d'un complexe coloré en bleu. La solution de travail A' est constituée de 20 µL de réactif A (solution de tartrate de cuivre) pour 1 mL de réactif S (Solution tensioactive). Ainsi 5 µL d'échantillon ou de standard de BSA (500-0207, Biorad) sont déposés en plaque 96 puits avec 25 µL de la solution de travail A' et 200 µL de solution diluée de réactif de Folin (réactif B). La plaque est incubée 15 minutes à l'obscurité puis l'absorbance du produit coloré est mesurée à 750 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines contenues dans les échantillons.

Electrophorèse en SDS-Page

La séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire est réalisée par électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence d'un détergent anionique, le dodécysulfate de sodium (SDS). Ce détergent dénature les protéines et masque les charges des acides aminés la composant. Ainsi lors de la migration sous un courant électrique continu, la séparation se fait uniquement en fonction de leur poids moléculaire. Les échantillons protéiques ajustés à la même concentration sont dilués dans du tampon de charge (Laemmli sample Buffer, Biorad, Hercules, CA, USA) supplémenté en DTT 50 mM puis dénaturés en chauffant 5 minutes à 95°C. Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel à 8 % ou 10 % de polyacrylamide avec un marqueur de poids moléculaire (26619, ThermoFisher). La migration est réalisée dans une solution de tampon de migration contenant 25 mM de Tris, 192 mM de glycine et 0,1% de SDS sous une tension de 50 V pendant 15 minutes puis de 100 V pendant 45 minutes.

Electro-transfert des protéines

Après migration, les protéines du gel sont transférées sur une membrane PVDF (10600023, GE Healthcare) préalablement activée dans de l'éthanol à 99 % ; le transfert est réalisé pendant 1 h à 100 V dans une solution de transfert contenant 25 mM de Tris, 192 mM de glycine et 10 % d'éthanol.

Immuno-détection

Les protéines sont ensuite visualisées par immunodétection. Dans un premier temps, les sites de liaison non spécifique sont saturés par incubation de la membrane dans une solution de BSA à 5 % dans le TBS-T (137 mM de chlorure de sodium, 20 mM Tris et 0,1 % Tween-20) pendant 1 h sous agitation. Dans un second temps, la membrane est incubée, sous agitation, pendant 1 h à température ambiante ou pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire ; celui-ci est dilué au 1/1000 dans la solution de BSA à 5 % / TBS-T pour l'ensemble des marquages réalisés à l'exception de l'anticorps primaire anti-actine dilué au 1/2000. Après 3 lavages de 5 minutes au TBS-T sous agitation, la membrane est incubée avec un anticorps secondaire couplé à la HRP dilué au 1/10 000 dans de BSA 5 % / TBS-T pendant 1 h. Enfin, la membrane est lavée une première fois avec du TBS-T puis 2 fois avec du TBS. Le kit ECL Clarity (BioRad) est utilisé pour la révélation et les images sont acquises sur l'appareil ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). La densité des bandes obtenues est quantifiée à l'aide du logiciel ImageQuantTL (GE Healthcare) puis normalisée par rapport au contrôle.

F. Co-immunoprécipitation

Cette technique permet d'étudier des interactions protéine-protéine à partir d'un lysat cellulaire brut en combinant l'immunoprécipitation du complexe protéique par des antigènes et le système SDS/Page.

Les cellules sont ensemencées dans des boites de Pétri 90 mm et traitées selon les protocoles décrit précédemment. A 80 % de confluence les cellules sont rincées deux fois avec du PBS froid sur glace. Elles sont ensuite grattées dans 500 µL de tampon d'immunoprécipitation (137 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8.0, 10% glycérol, 1% IGEPAL CA-630, 3mM Na3Vo4) supplémenté de 1 % d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases 100X (aprotinine, bestatine, E-64, leupeptine, fluorure de sodium, orthovanadate de sodium, pyrophosphate de sodium et glycérol-2-phosphate). Après une incubation de 15 minutes sur glace, le lysat cellulaire est centrifugé à 14 000 x *g* pendant 15 minutes à 4°C. Les surnageants

sont récupérés et la concentration en protéines est déterminée avec le Kit DC Protein Assay (BioRad, Hercules, CA, USA) comme décrit précédemment. Les échantillons destinés au Western Blot sont préparés avec 20 µg d'extraits protéiques et du tampon de charge Laemmli supplémenté en DTT 50 mM. Ils sont ensuite dénaturés en chauffant 5 minutes à 95°C. Les extraits protéiques sont ajustés à la concentration de 500 µg dans un volume de 500 µL. Ces extraits sont incubés avec un anticorps anti-FAK totale (610088, BD Transduction Laboratories, dilué au 1/100) durant 3 h à 4°C sur agitateur rotatif. Les complexes immuns sont ensuite précipités avec des billes de type protéine G-sépharose (17-0618-01, Merck) durant une nuit sous rotation à 4°C. Après 3 lavages par centrifugation 5 minutes 4°C 1000g avec du tampon Ripa froid (25 mM de Tris-HCl pH 7,6, 150 mM de chlorure de sodium, 1 % de Tergitol NP-40, 1 % de désoxycholate de sodium et 0,1 % de SDS), les billes sont re-suspendus dans du tampon Laemmli. (Dharmacon) Le surnageant contenant les complexes protéiques est récupéré et déposé dans un gel à 8 % de polyacrylamide afin de réaliser une électrophorèse, un électro-transfert et l'immuno-détection comme décrit précédemment.

G. Marquage immunocytochimique

Les cellules sont sevrées dans un milieu de culture enrichi à 1 % de SVF 24 h avant le début de la manipulation. Après sevrage, les cellules sont ensemencées dans des plaque 6 puits contenant des lamelles en verre 18 mm préalablement nettoyées à l'éthanol et incubées dans un milieu enrichi à 10 % de SVF selon les protocoles de traitement décrit précédemment. Après 24 h incubation à 37°C, le milieu de culture est aspiré et les cellules sont rincées 3 fois dans le PBS puis fixées pendant 10 minutes dans une solution de paraformaldehyde à 4 % dilué dans le PBS. Après 3 lavages de 5 minutes dans du PBS, les cellules sont perméabilisées avec une solution de Triton X-100 à 0,1 % pendant 5 minutes. Après 3 lavages supplémentaires dans le PBS, les sites de liaison non spécifique sont saturés avec une solution de BSA à 2 % dans le PBS pendant 1 h, sous agitation, à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées pendant 1 h sous agitation avec les anticorps primaires dilués au 1/100 (phospho-Y397 FAK) ou au 1/250 (cortactine, paxilline, phospho-Y118 paxilline, FAK, phospho-Y397 FAK) dans une solution de BSA à 1 %. Les anticorps secondaires couplés aux fluorochromes (dilué au 1/1000 dans la BSA à 1 %) sont ajoutés à la suite de 3 lavages de 5 minutes avec le PBS, L'actine est quant à elle directement marquée par la phalloïdine Alexa Fluor® 568 ou 647 (dilué au 1/250 dans la BSA à 1 %) et le noyau est révélé par un marquage de l'ADN grâce au DAPI (dilué au 1/5000 dans la BSA 1 %). Les anticorps secondaires, la phalloïdine et le DAPI sont incubés pendant 1

h à température ambiante, sous agitation. Après 3 lavages au PBS, les échantillons sont montés sur une lame dans du milieu de montage anti-photoblanchiment Prolong Gold® (Invitrogen). Les échantillons sont conservés à l'obscurité à 4°C jusqu'à observation au microscope confocal Leica TSC SPE équipé d'un objectif x63 à huile HCX Pl Apo 1.32 NA (Wetzlar, Allemagne). Les quantifications sont réalisées l'aide de macros développées sous ImageJ par la Plateforme d'Imagerie Quantitative (PIQ) au sein de l'UMR 7021.

H. Zymographie in situ

Cette technique permet de quantifier l'activité des protéases d'une cellule en combinant un gel fluorescent avec un marquage immuno-cytochimique. La dégradation du gel fluorescent par les protéases cellulaires supprime la fluorescence permettant une visualisation et une quantification des zones d'activité protéolytique.

***Coating* des lamelles et ensemencement**

Afin de quantifier la dégradation de la matrice extracellulaire par les différentes lignées cellulaires, les cellules préalablement sevrées dans du milieu 1 % SVF sont déposées sur un coating de gélatine-FITC ou Cy3. Ce coating est réalisé grâce au kit *QCM™Gelatin invadopodia assay* (ECM670 ou ECM671, Merck Millipore) dans des plaque 6 puits contenant des lamelles en verre 18 mm préalablement nettoyées à l'acide chlorhydrique et à l'éthanol. Dans un premier temps, les lamelles de verre sont traitées à la poly-L-Lysine 1X durant 20 minutes afin de charger positivement la surface du verre. Après 3 lavages de 5 minutes dans du PBS, les lamelles sont traitées au glutaraldéhyde 1X durant 10 minutes afin d'assurer la liaison des protéines de la gélatine fluorescente à la poly-L-Lysine par des liaisons covalentes. Après 3 lavages supplémentaires dans du PBS, une solution de gélatine fluorescente, constituée de 20% de gélatine fluorescente et 80% de gélatine non-fluorescente et préalablement chauffée à 60°C durant 5 minutes est déposée sur les lamelles. La gélatine est incubée durant 10 minutes à l'obscurité. Enfin, à la suite de 3 lavages dans du PBS, les lamelles sont incubées dans du milieu DMEM enrichi à 10 % SVF durant 30 minutes afin de neutraliser les aldéhydes libres. Le milieu de culture est ensuite retiré et les cellules sont cultivées sur ce substrat pendant 24 h à 37°C dans du milieu de culture enrichi à 10 % de SVF selon les protocoles de traitement décrit précédemment.

Marquage immuno-cytochimique

Après 24 h d'incubation, les cellules sont fixées pendant 10 minutes dans une solution de PFA à 4 % dans le PBS puis perméabilisées au Triton X-100 0,1 % pendant 5 min et enfin marquées selon le protocole d'immunocytochimie décrit précédemment. Les échantillons sont, par la suite montés sur lame dans du milieu de montage anti-photoblanchiment Prolong Gold® (Invitrogen). Les échantillons sont conservés à l'obscurité à 4°C jusqu'à observation au microscope confocal Leica TSC SPE équipé d'un objectif x63 à huile HCX Pl Apo 1.32 NA (Wetzlar, Allemagne). Les zones de dégradation sont quantifiées à l'aide d'une macro développée sous ImageJ par la Plateforme d'Imagerie Quantitative (PIQ) au sein de l'UMR 7021.

I. Wound healing

Les cellules sont ensemencées en plaque 24 puits dans du milieu enrichi à 10% SVF de manière à former un tapis cellulaire confluent à 24 h ou 48 h selon les conditions de traitements détaillées préalablement. Une fois le temps d'incubation écoulé, les cellules sont traitées avec de la mitomycine C à une concentration de 10 µg/mL durant 2 h à 37°C afin de s'affranchir de la prolifération des cellules et de s'assurer que la blessure se referme par un processus de migration. Après lavage, le tapis cellulaire est blessé en croix à l'aide d'un cône de pipette de P200, le milieu est retiré et remplacé par 2 mL de milieu de culture enrichi à 10 % de SVF. La cicatrisation de la blessure est observée sur un microscope Leica DMIRB2 disposant d'une enceinte thermostatée et chambre d'incubation contrôlée en CO2 (Life Imaging System) avec un objectif x10 N Plan (0,25) et une prise d'image toutes les heures. La prise d'images a été réalisée en utilisant une caméra Photometrics Prime (sCMOS) pilotée à l'aide du logiciel Metamorph.

Résultats

CIBLER LA PROTEINE FAK AVEC DES INHIBITEURS D'INTERACTION PROTEINE-PROTEINE

A. Contexte de la revue

FAK est une tyrosine kinase cytoplasmique qui joue un rôle clé dans la régulation de la prolifération, de la survie, de l'immunité, de la migration et de l'adhérence cellulaire. Dans les cancers, cette protéine est un acteur majeur de l'invasion et de la dissémination des cellules cancéreuses et sa surexpression est souvent associée à un mauvais pronostique (Cance et *al.,* 2000 ; Golubovskaya, 2014). Conjointement, la surexpression de FAK dans les tissus cancéreux et ses fonctions pro-oncogènes en ont fait une cible médicamenteuse prometteuse. Ces dernières années l'approche classique pour cibler FAK a donc consisté à inhiber le domaine kinase, et en particulier le site de liaison de l'ATP, pour inhiber l'activité enzymatique de la protéine. Bien que de nombreuses molécules ont été décrits pour inhiber le développement et la dissémination des cellules cancéreuses dans les études précliniques, l'inhibition du domaine kinase de FAK n'a pas encore fait ses preuves dans les phases III d'essais cliniques comme décrit préalablement dans la section D-V-1 (Golubovskaya, 2014 ; Sulzmaier et *al.,* 2014) et plusieurs mécanismes de résistances ont d'ores et déjà été observés. Par exemple, suite à l'inhibition de FAK, le récepteur HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*) peut être surexprimé afin de favoriser la transphosphorylation de la protéine FAK conduisant à sa réactivation et au déclenchement des voies Akt et MAPK (Marlowe et *al.,* 2016 ; Marlowe et *al.,* 2019). Il a également été démontré qu'une inhibition de l'activité catalytique de FAK n'affecte pas les fonctions *scaffolding* responsable de la survie et de la prolifération. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est donc un enjeu majeur. Dans cette revue, nous avons décrit les principales interactions pro-oncogènes de FAK et discuté la pertinence et la faisabilité de développer une approche thérapeutique ciblant la protéine FAK basée sur les inhibiteurs d'interaction protéine-protéine.

B. Principales conclusions

Les inhibiteurs d'interaction protéine-protéine (IIPP) sont des molécules qui empêchent sélectivement l'interaction entre deux protéines. Cette stratégie thérapeutique est en essor ces dernières années avec plusieurs IIPP actuellement en essais cliniques en cancérologie. La protéine FAK interagit par le biais de ses domaines et de ses régions fonctionnelles avec de nombreux partenaires afin de réguler son activation, sa localisation et ses fonctions et ce faisant

représente une cible pertinente pour les IIPP (Hall et *al.,* 2011 ; Sulzmaier et *al.,* 2014). Il a d'ailleurs été mis en évidence par mutagénèse dirigée que l'obstruction de ces domaines d'interactions altère les fonctions pro-oncogènes de FAK et plusieurs laboratoires travaillent actuellement à la conception de molécules inhibitrices des domaines fonctionnels de FAK. Les premiers essais *in vitro* ont d'ores et déjà démontré que ces IIPP inhibent le développement et l'invasion tumorale de divers cancers (Golubovskaya et *al.,* 2013a ; Golubovskaya et *al.,* 2013b ; Kandil et *al.,* 2020 ; Kurenova et *al.,* 2009 ; Marlowe et *al.,* 2019).

cancers

MDPI

Review

Targeting Focal Adhesion Kinase Using Inhibitors of Protein-Protein Interactions

Antoine Mousson [1,2], Emilie Sick [1,2], Philippe Carl [1,2], Denis Dujardin [1,2], Jan De Mey [1,2] and Philippe Rondé [1,2,*]

1 Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 67401 Illkirch, France; antoine.mousson@etu.unistra.fr (A.M.); esick@unistra.fr (E.S.); philippe.carl@unistra.fr (P.C.); denis.dujardin@unistra.fr (D.D.); jan.de-mey@unistra.fr (J.D.M.)
2 CNRS UMR 7021, Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, 67401 Illkirch, France
* Correspondence: philippe.ronde@unistra.fr; Tel.: +33-368-85-41-84; Fax: +33-368-85-43-13

Received: 18 July 2018; Accepted: 14 August 2018; Published: 21 August 2018

Abstract: Focal adhesion kinase (FAK) is a cytoplasmic non-receptor protein tyrosine kinase that is overexpressed and activated in many human cancers. FAK transmits signals to a wide range of targets through both kinase-dependant and independent mechanism thereby playing essential roles in cell survival, proliferation, migration and invasion. In the past years, small molecules that inhibit FAK kinase function have been developed and show reduced cancer progression and metastasis in several preclinical models. Clinical trials have been conducted and these molecules display limited adverse effect in patients. FAK contain multiple functional domains and thus exhibit both important scaffolding functions. In this review, we describe the major FAK interactions relevant in cancer signalling and discuss how such knowledge provide rational for the development of Protein-Protein Interactions (PPI) inhibitors.

Keywords: FAK; cancer signalling; PPI inhibitor; FAK inhibitor

1. Search for Inhibitors of Protein-Protein Interaction

1.1. Introduction

During the last two decades, considerable efforts have been made in the understanding of the molecular mechanisms of diseases. However, at present, only a small portion of proteins (around 400) involved in diseases have been explored as therapeutic targets [1]. Indeed, functional genomic studies have predicted that 3000–10,000 proteins are implicated in diseases [2]. Currently, therapeutic targets are primarily G protein-coupled receptors, enzymes, ion channels, transporters and nuclear receptors. These proteins are considered as easy to target because they have natural ligand-binding sites for endogenous agonists or substrate. It is therefore not surprising that pharmaceutical companies have extensively exploited these druggable proteins. However, the number of new drug approvals is stagnating at around 15–25 per year since five decades and the majority of launched drugs are derivatives of lead compounds with the same chemical signature [3]. Thus, the challenge in drug design and discovery is to identify new potential therapeutic targets in order to propose innovative therapies.

Among these potential new targets, protein-protein interactions (PPIs) are of considerable and growing interest. Indeed, PPIs are critical for many aspects of cell biology and are involved in physiological as well as pathological processes. However, targeting PPIs with small "drug-like" molecules is challenging for at least two main reasons. First, the contact surfaces involved in PPI are large (1500–3000 Å^2) compared with those involved in small-molecule-protein interactions (300–1000 Å^2) [4,5]. In PPI, affinity is mostly obtained by a multitude of often weak interactions. It is

therefore difficult to design a small molecule that could bind tightly because of insufficient interactions. Second, the contact surfaces are usually flat and often lack the pockets that are characteristic of natural ligand-protein contact surfaces. Traditional ligand-binding sites are characterized by one or two large pockets with a typical volume close to 260 $Å^3$ in contrast to PPI, which involve an average of six small pockets with a pocket volume around 54 $Å^3$ [6]. It is therefore difficult to predict which pocket (s) at the protein-protein surface contact will be able to bind a small inhibitor, if any.

Despite these challenges, several evidences provide hope for discovering small drug-like molecules that would target PPI interfaces. Even though the protein-protein interfaces are large, mutational studies have shown that a small subset of residues involved is essential for high-affinity binding; they are called hot spots [7]. The disruption of the interactions mediated by these hot spots is efficient in inhibiting PPIs [8]. Hotspots often comprise side chains of tyrosine, tryptophan and arginine that all allow adaptive conformational changes to accommodate small molecules as well as strong hydrogen-bonding potential through nitrogen and oxygen atoms [9]. Traditional high-throughput screening (HTS), which is particularly suitable for the drug discovery in well-defined "druggable" pockets, was at present not very successful. This could be explained by the content of compounds used for screening that are derived mainly from chemistry efforts in pharmaceutical companies. These chemotypes are dominated by past drug-discovery research on GPCR, enzymes and traditional druggable targets. However, PPI interfaces strongly differ from druggable well defined binding pockets and therefore, the discovery of successful inhibitors requires that new chemotypes need to be included in HTS libraries in order to match to these novel class of target. Indeed, it is believed that except for close homologues, each protein-protein interface is different, so the chemotypes of their inhibitors are likely to be more isolated in chemical space. Computational modelling methods in combination with high-resolution X-ray crystal structures of protein complexes seriously improved the prediction of relevant small-molecule binding pockets on a protein-protein interface [10]. Additionally, advances in fragment-based lead discovery allow the rapid probing of the protein surface for small chemical fragments binding sites and therefore addresses the druggability issue [11]. It is possible that evaluating the structure activity relationship of compounds by nuclear magnetic resonance (NMR) as in fragment-based screening will be more successful than HTS when applied to PPI. Full ligand screening has already been used to find an inhibitor of Keap1/Nrf2 interaction able to initiate an anti-oxidant and anti-inflammatory response [12]. Furthermore, fragment-based methods have allowed discovering an inhibitor of STAT3 dimerization, which inhibits nuclear translocation of the protein and the transcription of pro-carcinogenic genes [13].

1.2. Successful Examples

Successful examples of PPI inhibitors have been reported in distinct biological pathways. One of those and probably the best-characterized are the inhibitors of the interaction between p53 and human protein double minute 2 (HDM2). MDM2 (the mouse homologue of HDM2), which is an ubiquitin E3 ligase was initially found to binds to the tumour suppression protein p53 leading to its proteasomal degradation [14]. p53 is inactivated by mutation or deletion of its gene in nearly 50% of human cancers. In the other 50% displaying wild-type p53, its tumour suppression function can be altered by several distinct mechanisms. One major inhibitory mechanism is mediated by the interaction between MDM2 and p53. This interaction has been mapped to the first 120 amino acid residues in the N-terminal domain of HDM2 and the 30 first amino acid residues in the N-terminal domain of p53. High-resolution crystal structure of MDM2 complexed with residues 15–29 of p53 was solved in 1996 [15] and reveals that p53/MDM2 interaction is mediated by a well-defined hydrophobic surface in MDM2 and three key hydrophobic residues in p53 (Phe19, Trp23 and Leu26) [15]. In search of inhibitors, the first class of potent and specific small MDM2 inhibitors were identified by HTS at Hoffmann-La Roche. These tetra-substituted imidazole inhibitors were named Nutlins. Nutlin-3, one of the most potent of these small molecules was reported to bind to MDM2 with IC50 = 90 nM and showed antitumour activity against xenografts in vivo [16]. Using NMR spectroscopy, Nutlin-3 was

shown to insert its aromatic moieties into the same hotspot pockets in MDM2 where p53 binds [17]. Structure-activity relationship studies lead to the discovery of a refined Nutlin-3-derived compound, RG7112, which is the first MDM2 inhibitor advanced into clinical trials for the treatment of several human cancers [18]. RG7112 effectively binds to MDM2 with IC50 = 18 nM and inhibits the growth of cancer cell lines with wild-type p53 in vitro with IC50 = 0.18–2.2 μM. Moreover, it demonstrated good selectivity over cancer cell lines with p53 mutation (IC50 = 5.7–20.3 μM). Clinical evaluation of RG7112 after oral administration in phase I clinical trials have shown that the molecule is able to activate p53 signalling in human tumours leading to apoptosis [18]. These studies have provided a proof of concept that PPI inhibitors are efficient at the clinical level. However, several patients treated by RG7112 had severe adverse effects including neutropenia and thrombopenia. This haematological toxicity has prompted the development of a more selective compound, RG-7388 (Idasanutlin) actually in phase III of the clinical trial [19]. Several other MDM2 inhibitors are now making their way through clinical trials including AMG232 developed by Amgen (phase I/II) or MK-8242 developed by Merck (phase I) [20]. Their antitumoral activities are tested as single agents or in combination with traditional chemotherapeutic agents.

Another example of PPI inhibitors is small inhibitors of the Bcl-2 family in clinical trials especially for the treatment of patients with lymphoid malignancies. The Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) family contains important regulators of apoptosis. These proteins govern mitochondrial outer-membrane permeabilization and form homodimers or heterodimers with other family members to mediate either a pro-apoptotic or a pro-survival signal. The effect of pro-apoptotic proteins Bak and Bax are blocked by the interaction with anti-apoptotic partners such as Bcl-2 and Bcl-X. This interaction is mediated by a hydrophobic BH3 domain in pro-apoptotic protein containing four key hydrophobic residues (Leu 59, Leu 63, Ile 66 and Leu 70) [21]. Disrupting this interaction by binding the anti-apoptotic Bcl-2 family proteins with small molecules BH3 mimetics induce apoptosis of cancer cells [22]. Abbott laboratories by using N heteronuclear single quantum coherence (HSQC) protein NMR, has developed Bcl-2 family inhibitors such as ABT-263 (Navitoclax). This compound binds Bcl-2 protein in vitro with subnanomolar affinities and inhibits tumour growth of chronic lymphocytic leukaemia (CLL) when combined with rituximab in phase II of clinical trial. However, navitoclax was found to induce thrombopenia by binding the anti-apoptotic Bcl-X protein with a similar affinity to Bcl-2 protein. Since the disclosure of navitoclax, several monoselective inhibitors of Bcl-2 has been developed such as venetoclax [23,24]. Venetoclax was shown to selectively bind Bcl-2 with high affinity and to induce apoptosis by Bax-Bak signalling. Its efficiency was demonstrated in a human xenograft model of B cell lymphoma and more recently in phase I/II of human clinical trial [24] as single agents or in combination with traditional chemotherapeutic agents. This new class of Bcl-2 inhibitor reduces thrombocytopenia risk associated with the inhibition of Blc-X while conferring a rapid reduction of tumour in CLL patients.

Thus, PPI inhibitors may represent an interesting alternative to target protein kinases. Indeed, the majority of reported protein kinase inhibitors are ATP-binding competitors which bind to the active kinase conformation (type I inhibitors) resulting in often limited kinase selectivity due to the high degree of conservation within the ATP-site. Searching for competitive inhibitors rather than ATP-competitive inhibitors may be a more rational approach. At present, more than 1500 ATP-dependent enzymes have been identified with 420 Ser/Thr kinases and 90 Tyr Kinases. Moreover, the high intracellular ATP concentrations necessitate high intracellular concentrations (μM) of the inhibitor to effectively inhibit the target, even when the affinity of the inhibitor is in the nanomolar range [25]. On the other hand, PPI inhibitors frequently have subnanomolar affinity to the target and their efficiency has already been proven at this concentration in many cases. Thus, selectivity of these inhibitors may be better than kinase inhibitors that compete with ATP in the substrate-binding site. Moreover, inhibition of kinase activity does not alter protein scaffold properties and subsequent signalling pathways. PPI can be targeted with small molecules that would have a pharmacokinetic profile that is different from the current known PPI inhibitors. Currently, the majority of small molecules in

clinical trials are orally available drugs despite of their high molecule weight and hydrophobic clusters. However, PPI inhibitors design is challenging and requires a perfect understanding of the structure activity relationship.

2. FAK Structure and Interaction

More than twenty years ago, FAK was first described as a substrate of the oncogene product of the sarcoma virus (v-Src) and as a protein highly phosphorylated upon clustering of Integrins at focal adhesions [26–28]. Soon after, the group of William Cance at the University of North Carolina found an increase in FAK mRNA in invasive and metastatic human tissues [29]. Subsequently, analysis of FAK protein expression in a variety of human tumours revealed increased levels of FAK that correlated with the invasive potential of these tumours [30]. This lead to intensive research for the mechanisms of FAK activation and the signalling pathways regulated by the kinase. FAK is a ubiquitously expressed non-receptor cytoplasmic tyrosine kinase composed of an N-terminal FERM (band 4.1, ezrin, radixin, moesin homology) domain, a central kinase domain, several proline-rich domains and a C-terminal focal adhesion targeting (FAT) domain (Figure 1). FAK is primary implicated in the regulation of signals initiated at sites of Integrin mediated cell adhesion to the extra-cellular matrix as well as signals triggered upon growth factor receptors activation [31]. The first experimental evidence implicating FAK in tumour formation and progression was obtained by using conditional knock-out mice with selective *fak* deletion in the epidermis [32]. This proof of concept experiment led to the development of strategies aimed at inhibiting FAK with the hope to reduce tumour progression. Thus, the development of FAK antagonists, as anti-cancer therapy, led to several small inhibitors of FAK kinase function that are currently undergoing clinical trials.

Nevertheless, besides its kinase function, FAK possess also scaffolding functions that are highly relevant in cancer signalling [33]. Indeed, according to the Biological General Repository for Interaction Datasets (BioGRID) [34,35], FAK is involved in none less than 235 interactions. Nevertheless, some of these interactions are redundant because they were characterized via different methods and by different laboratories. For example, Paxillin both interacts with the FAT domain of FAK and is a substrate for its kinase activity. Thus, the total number of unique FAK interactions identified until now is rather 125 (Figure 1). The BioGRID data base considers as an interaction any direct physical binding of two proteins, co-existence in a stable complex and genetic interaction. Therefore, the term interaction does not necessary involve a physical interaction between two proteins as these interactions are recorded using various techniques including affinity capture-MS, affinity capture-Western, biochemical activity, co-fractionation, co-purification, FRET or two-hybrid. For example, the affinity capture method identifies an interaction when a protein is affinity captured from cell extracts by an antibody and the associated partner identified either by mass spectroscopy or by Western blot. Thus, for FAK, some interactions were identified by the two-hybrid system while many others were characterized by the affinity capture-Western method and therefore may also be indirect as part of a signalling complex. Interactions identified by high-throughput two-hybrid systems need to be further characterized in order to establish their biological effect on a defined system and thus will not be fully addressed in this study. In this review, we will rather focus on direct FAK interactions with a particular interest for those involved in cancer initiation and progression. These interactions and their consequences on FAK activation and signalling will be described in details and we will examine how the knowledge of the structural motifs involved in these interactions could be the basis for development of PPI inhibitors.

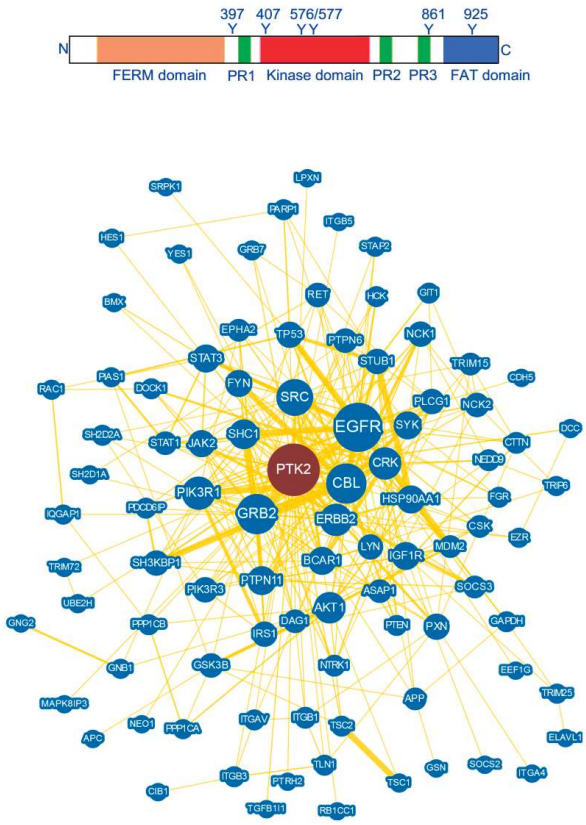


Figure 1. The main structure domains of FAK. Important sites of tyrosine phosphorylation are also indicated. Graphical network of FAK protein interactions identified by BioGRID based on a compilation of publications referring to protein and genetic interactions. Circles with layers closest to the centre are more highly connected.

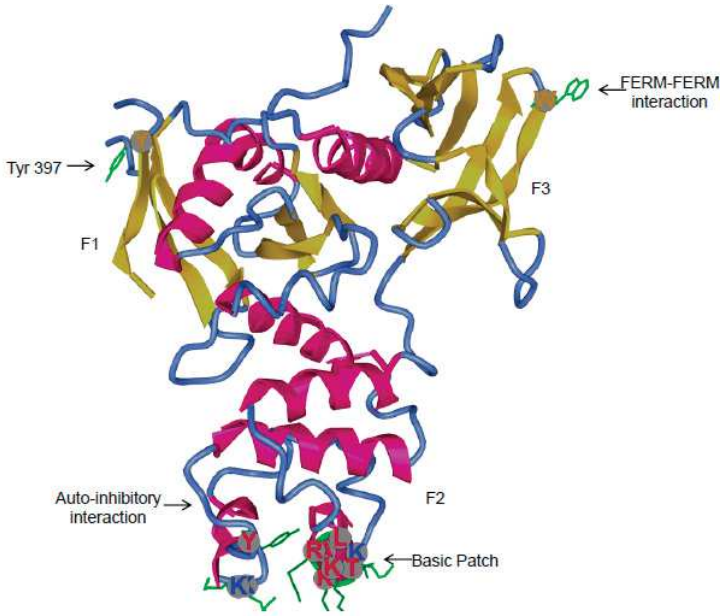
3. FAK Structural Determinant for the Search of Potent FAK Inhibitors

3.1. Major Interactions at the FERM Domain

3.1.1. FAK Interaction with Growth Factor Receptors and Mechanism of FAK Activation

The best characterized mechanism that promotes FAK activation involves Integrin receptor clustering upon cell binding to the extracellular matrix which has been shown to involve binding of the β Integrin cytoplasmic domain to FAK [27,36,37]. Further analysis of Integrin-FAK interactions revealed that the cytoplasmic tail of the β1 Integrin directly stimulates FAK activity in vitro, this activity being increased after deletion of the FERM domain of FAK suggesting a mechanism of FAK autoinhibition [38]. Recently, the β4 Integrin-FAK interaction was mapped to 11-amino-acid region ahead of the FAK Tyr397 site [39]. FERM domains usually promote the coupling of cytoskeletal structures to the plasma membrane. In the case of FAK, recent studies have shown that the regulation of FAK activity entails an intramolecular association of the FERM domain with the kinase domain, which then blocks the accessibility of the Tyr397, the autophosphorylation site. Indeed, the crystal structure of a FAK fragment containing the FERM domain and the kinase domain in its auto-inhibited form reveals that this interaction requires the F2 lobe of the FERM domain notably the residues Y180 and M183 and the c-lobe of the kinase domain centred on F596 [40]. This mechanism of action implies that lipid-protein and/or protein-protein interactions in the FERM domain are necessary to release the FERM-kinase interaction (Figure 2). Thus, many components able to induce FERM-kinase domain opening have been proposed which include Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns (4,5) P_2 [41] the tetraspanin TM4SF5 [42] and growth factor receptors. Among the latter both PDGFR, EGFR, IGF-1R, c-Met and

RET were shown to form a complex with the FERM domain of FAK [31,43–45], thus suggesting that the resulting increases in FAK activation, may be due to the relief of the FERM-kinase auto-inhibition. In the case of RET kinase, a transactivation mechanism has been highlighted which involves reciprocal phosphorylation of FAK Tyr575/576 by RET and RET Tyr905/1062 by FAK. Recently, HER2 was shown to directly interact with the FAK-FERM-F1 lobe thereby promoting phosphorylation of FAK Tyr 397 [46]. On the other hand, c-Met promotes FAK phosphorylation at Tyr194 leading to FAK activation. Constitutive activation of FAK by replacement of Tyr194 with the phosphomimetic E194 can be overcome by mutations of the basic patch KAKTLRK of the F2 lobe of the FERM domain, indicating that the interactions between the phosphorylated Tyr194 and these basic residues may allow FAK activation through relief of its autoinhibition [47]. Consequently, the addition of HGF stimulates invasion of MDCK cells through Matrigel. VEGF also stimulates FAK activation leading to the association of the cytoplasmic tail of VE cadherin with the FAK FERM domain thus enabling β-catenin phosphorylation to promote junctional disassembly and vascular permeability. As the VEGF dependency of FAK activation is lost upon Y180A/M183A mutation it is believed that in endothelial cells, VEGF activates FAK in a conformation-dependent manner [48]. Early experiments have also demonstrated a role of the FAK-Ezrin interaction in the control of FAK activity as in kidney-derived epithelial cells, ezrin promoted FAK phosphorylation at Tyr-397. Mapping experiments showed that FAK amino acids 1–376 were required for optimal Ezrin binding [49].



Interactions	References
Integrin, PIP2, Tetraspanin	[27,37,39,41,42,50,51]
PDGFR, EGFR, IGFR, RET, c-MET	[31,44–47]
Cadherin, Ezrin, Dynamin	[48,49,52]
Arp2/3, N-WASP, RACK1, ETK	[53–57]
PIAS1, RIP, p53, Mdm2, Nanog	[58–62]

Figure 2. Structure of the FERM domain of FAK from the protein databank (accession code 2AL6). The FERM domain displays three lobes, F1, F2 and F3. The structure includes the Tyr397 auto-phosphorylation site which is located between the FERM and kinase domain. In the F2 lobe, residues belonging to basic patches important for FAK activation are highlighted and their side chains coloured in green. The auto-inhibitory interaction implicates residues from the F2 lobe of the FERM domain and C lobe from the kinase domain. The Trp266 implicated in FERM-FERM interaction necessary for FAK dimerization is also highlighted. Proteins associating with the FERM domain are shown in the table.

Using a FRET-based biosensor for monitoring FAK activation it was also confirmed that PIP2 triggers a change in FAK conformation state which likely represents unbinding of the FERM-kinase domain [50]. However, PIP2 has been shown to be necessary for FAK clustering at the membrane and partial opening of FAK conformation without complete release of auto-inhibitory interactions [51]. Thus, it remains possible that increased PIP2 levels simply induce clustering of FAK molecules necessary for the FAK trans-phosphorylation. In this case, other mechanisms such as FAK dimerization mediated by traction force or FERM-FERM interactions would be necessary to release the closed FERM-kinase conformation state. Force-mediated FAK activation has been shown to involve a basic patch in the FERM domain able to prevent FAK inhibition induced by an interaction between FERM domain acidic sites and Myosin II [63]. Moreover, FAK activation by dimerization which has been first described in 2002 [64] require an intermolecular FERM-FERM interaction around residue W266 stabilized by the FAT (Focal Adhesion Targeting) binding to a basic patch K_{216}AKTLRK located in the FERM F2 lobe [65]. The FERM domain is also involved in direct FAK binding to Integrin-containing endosomes thereby regulating adhesion induced FAK activation and cancer related processes such as anchorage-independent growth [66]. This report established an unprecedented FAK activation pathway distinct from the signalling role of Integrin/FAK complexes at FAs. Nevertheless, the relationship between FAK and the endocytic and membrane trafficking processes was first described by Gundersen's group, who found an interaction between FAK and dynamin at FAs during forced FA disassembly [52]. Latter it was shown that dynamin is specifically recruited at FAs by a direct interaction with the FERM domain of FAK thus allowing dynamin phosphorylation at Tyr 231 by Src [67].

Other mechanisms of FAK autoinhibition have also been unveiled. First, based on early structural data on the FERM domain together with different linker segments, the Tyr397 site was shown to be inaccessible because of an interaction with the F1 lobe of the FERM domain and inhibition of Src binding due to sequestration of the SH3 binding site via an intramolecular interaction with the F3 lobe [68]. Second, it was recently reported that relief of FERM autoinhibition can be provided by changes in pHi which mediated deprotonation of the H58 residue of the FERM domain and subsequent conformational changes that modulating the accessibility of Tyr397 [69]. In the autoinhibited conformation, it is possible that the FAK FERM domain may also bind to the actin nucleating protein Arp3 and promotes the recruitment of the Arp2/3 complex to nascent adhesions in a kinase-independent manner [70]. As FAK is needed for nascent adhesion assembly, this complex could be implicated in the transition of nascent adhesion into FA. This interaction implies FAK K38 a residue previously implicated in FAK activation [53] suggesting that FAK binding to Arp2–3 may be one element for the release of FAK auto-inhibition. This FAK/Arp3 interaction has been recently shown to be involved in haptotaxis [54].

3.1.2. FAK Control of Cell Polarity and Migration

Several mechanisms seem to be implicated in the control of wound-induced cell polarity. Indeed, it was first described that FAK directly interact and phosphorylate the actin regulatory protein N-WASP thereby promoting cell migration [55]. Integrin-mediated FAK phosphorylation at Tyr397 creates a binding site for p120RasGAP which allows FAK to subsequently phosphorylate p190A thus creating a molecular complex that regulate Golgi orientation and cell polarization [71]. Latter, other experiments indicated that another complex composed of FAK, RACK1 and PDE4D5 located at nascent adhesion is also involved in Golgi orientation and direction sensing. The interaction of FAK with RACK implicates residues 139–140 located in the FERM domain and mutation of these residues lead to impaired nascent adhesion formation, Golgi reorientation, polarization and chemotactic invasion in squamous cell carcinoma [56]. Moreover, a peptide disrupting RACK1-PDE4D5 binding mimics the effect on Golgi re-orientation. This FAK/RACK1/PDE4D5 complex likely signals to the guanine nucleotide exchange factor EPAC, which in turn activates its small GTPase target Rap1. Interestingly, this signalling complex has been shown to mediate cell invasion in BRAF-mutated melanoma suggesting a link between polarity efficiency and cell invasiveness [72]. The transcription factor Nanog also mediate cell invasion via direct binding to the N-terminal domain of FAK with subsequent increased formation

of filopodia/lamellipodia [58]. Finally, FAK is also able to activate ETK, a member of the Bruton's tyrosine kinase (Btk), via interaction of the F1 sub-domain of FERM and the PH domain of ETK. This interaction is involved in the regulation of Integrin-mediated endothelial and metastatic carcinoma cell migration [57].

3.1.3. FAK Functions in the Nucleus

The FERM domain of FAK contain different elements such as nuclear localization signals (NLS) and nuclear export signals (NES) that regulate the shuttling of FAK between the nucleus and FA. In the F2 lobe, beside the ^{216}KAKTLRK^{222} basic patch which mediates interaction with other proteins, another partially overlapping surface exposed basic patch involving K190/191, K216/218, R221 and K222 has been shown to mediate FAK localisation to the nucleus. This raised the intriguing possibility that in the absence of FAK activation signal involving binding of c-Met, PIP2 or other molecules to these basic residues, FAK will be mainly located to the nucleus due to unmasking of the NLS signal. Besides, another basic patch namely R177/178 located in the F2 lobe is also consistent with NLS signal activity [59]. Interestingly, FAK can be post-translationally modified by addition of a small ubiquitin-related modifier (SUMO) at the Lys152 residue via PIAS1 (Protein Inhibitor of Activated STAT1) binding to the FERM domain [60]. Sumoylation is often associated with nuclear import and sumoylated FAK present in the nuclear fraction is associated with increased FAK activity.

Normal cells require adhesion to the ECM in order to survive and grow a process that is dependent on FAK activation. Indeed, many reports have shown that inhibition of FAK leads to the onset of apoptosis [73,74]. Besides, FAK is over-expressed in many cancer cells [75] and a hallmark of the tumourigenesis process is the resistance to anoikis a form of apoptosis induced by the loss of contact to the ECM. Survival signals can be transduced either by the activation of the PI-3K/AKT pathway, cell cycle progression through cyclin D1 or inhibition of apoptotic pathways such as caspase and FADD-dependent pathways or p53 signalization. Receptor-Interaction Protein (RIP) is a serine/threonine kinase that contains a death domain and associates with the death receptor complex to provide apoptotic signals. This signal could be inhibited via direct interaction of the N-terminal domain of FAK with the death domain of RIP [61]. Moreover, early studies demonstrated that FAK transduces survival signals from the ECM via inhibition of p53 as a consequence of direct interaction between the N-terminal domain of FAK and the N-terminal domain of p53 [62]. Later, it was shown that FAK-meditated survival requires the F2 lobe of the FERM domain for nuclear localization of FAK, the F1 lobe for binding to p53 and the F3 lobe for interactions with Mdm2 [59]. This mechanism implies ubiquitination of p53 and Mdm2-mediated proteasomal degradation thus keeping p53 at low levels to facilitate cell survival. At this time, this was one of the first kinase-independent roles of FAK described which requires only the scaffolding function of FAK.

3.1.4. Inhibitor of FERM Interactions

The search for inhibitors of PPIs can be made by selectively targeting mechanisms that modulate the kinase activity or specific interactions with known regulators of cancer-related pathways. For the first purpose, one should target protein-protein interactions that play a role in the regulation of kinase activity in order to achieve targeting specificity. In this aim, a protein pharmacophore model for the FAK-related kinase Pyk2 F3 FERM domain was recently generated and served as a template for the screening of the LeadQuest database. This led to the identification of a small compound that directly bind to the Pyk2 FERM domain and inhibited the Pyk2-stimulated glioma cell migration [76]. Nevertheless, because the survival pathway is critical for cancer progression inhibiting FAK/p53 interactions using PPIs could therefore represent an efficient alternative of classical kinase inhibitors. The search of PPI inhibitors to reduce FAK activity has been pioneered by the group of William Cance at the Roswell Park Cancer Institute in Buffalo. They first described a sequence of 7-amino-acid residues in the N-terminal proline-rich domain of human p53 necessary for FAK binding and show that a peptide containing these residues together with a TAT sequence for cell penetration was able to

reduce viability of breast and human colon carcinoma cell lines [77]. Having validated this interaction as a potential therapeutic target, they performed computer modelling of the p53 peptide containing the 7 amino acid sequence, docked it into the three-dimensional structure of the FERM domain of FAK involved in the interaction with p53 and screened small molecules from different libraries for docking into the FAK-p53 pocket [78]. Several small compounds were selected and notably the compound 1-benzyl-15,3,5,7-tetraazatricyclo [3.3.1.1~3,7~] decane, named Roslin2 were able to reactivate p53 in colon cancer cells both in vitro and in-vivo and to sensitize cancer cells to doxorubicin and 5-fluorouracil.

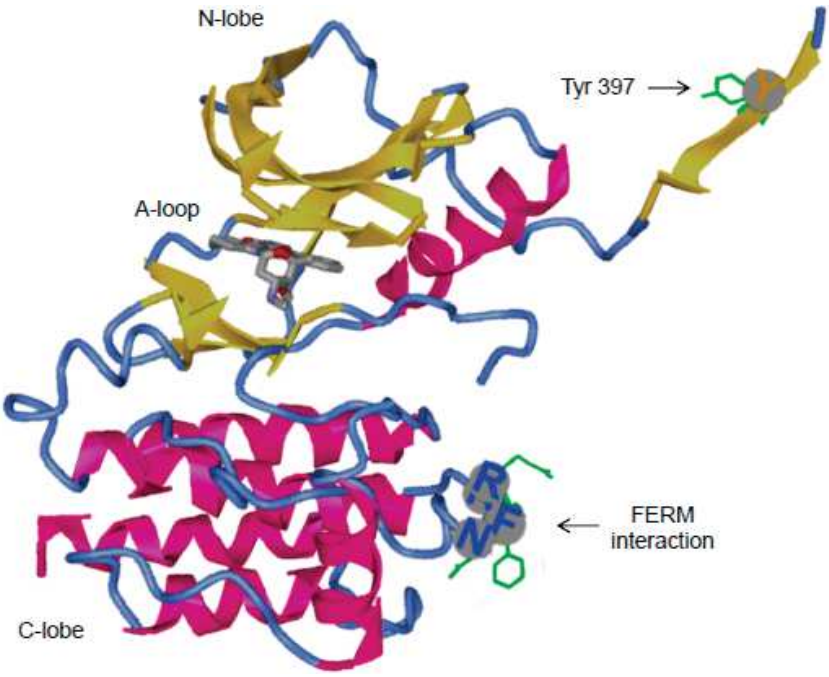
Another successful example came from the same group targeting the FAK-Mdm-2 interaction. Mdm-2 is a p53 target involved in p53 proteasomal degradation which was found to bind FAK via the F3 lobe of the FERM domain [59]. Using the structures of the FAK FERM domain and Mdm-2, macromolecular techniques were used to model the FAK-FERM interaction which serves as a template for the virtual screening of 200,000 small molecule compounds from NCI database. This strategy helped them to identify a 5′-O-Tritylthymidine compound called M13 that significantly decrease viability in different cancer cells [79]. Several other protein-binding sites have been identified in the FERM domain. For example, pharmacological inhibition of FAK-mediated FAK localisation in the nucleus promotes anti-inflammatory properties via an interaction between the FERM domain of FAK and GATA4 thus preventing cytokine-stimulated VCAM-1 transcription [80]. Moreover, in addition to the known effect of Nanog, a homeobox transcription factor, on FAK transcription, Nanog also directly bind the N-terminal domain of FAK leading to Nanog phosphorylation which in term lead to altered cancer cell filopodia and lamellipodia formation [58].

The interaction between FAK and IGF-1R was also partially characterized. It appears that this interaction encompasses FAK amino-acid 127–243 and the N-terminal part of IGF-1R [81]. Using the strategy described above, modelling and targeting the FAK-IGF-1R interaction led to the identification the lead compound INT2-31 [81]. This compound was shown to effectively disrupt FAK/IGF-1R interaction in melanoma leading to reduce cell viability and proliferation and to the induction of cell arrest and apoptosis. Importantly, in-vivo in tumour xenografts, the compound effectively decreased AKT signalling, resulting in significant melanoma tumour regression [82].

3.2. Major Interactions at the Kinase Domain

3.2.1. Role of Tyr397 in FAK Catalytic Activity and Interactions with Binding Partners

Tyr397, which is located between the FERM and the kinase domain, is the major FAK activation site (Figure 3). FAK phosphorylation at the Tyr397 residue occurs via both intra and intermolecular processes [64,83]. Early studies have shown that mutation of Tyr397 to Phe altered cell adhesion and leads to reduced focal adhesion turn-over and cell motility in many cell types [84,85]. Phosphorylation of FAK tyr397 creates a motif that is recognize by Src family kinases thereby inducing several downstream signalling pathways [86]. Depending on the cell type, Src family kinases phosphorylate other tyrosine residues namely Tyr407, Tyr576, Tyr577 in the kinase domain, Tyr 861 in the junction between the kinase and FAT domain and Tyr925 in the FAT domain [87–89]. Tyr407 negatively regulates FAK activity whereas Tyr567 and 577 are necessary for full catalytic activity of the kinase function [87,90]. In addition to autophosphorylation, FAK is implicated in the phosphorylation of several other FA associated proteins including Paxillin [91] and p130CAS [92] although it is not entirely clear whether it is the kinase function of FAK or Src kinase in complex with FAK which phosphorylates the downstream substrates. Paxillin and p130CAS has both been implicated in the regulation of migration and invasion pathways. Indeed, cell motility is dependent on the ability of FAK/Paxillin to control the fine spatiotemporal regulation of FA turn-over [93]. Thus, overexpressing Paxillin that is mutated at FAK phosphorylation sites inhibits the turnover of focal contacts and cell motility. On the other hand, the p130CAS/Rac1 pathway has been rather implicated in lamellipodia and invadopodia formation and thus in mechanisms underlying cell invasion [94].



Interactions	References
Src, PI3K, PLCγ, PTEN	[86,95–100]
Grb7, SOCS3, p120RasGAP	[71,101–103]
Catenin, p190RhoGAP	[48,71]
PDZ-RhoGEF, FIP200	[104,105]

Figure 3. Structure of the kinase domain of FAK from the protein databank (accession code 2JOJ). The kinase domain displays the C lobe, N lobe and the activation loop. In the C lobe, residues important for FAK auto-inhibition that interact with the F2 lobe of the FERM domain are highlighted and their side chains coloured in green. Proteins associating with P-Tyr397 and the kinase domain are shown in the table.

FAK phosphorylation at Tyr397 and FAK activation is also important in tumour-associated endothelial cells where it regulates endothelial cell motility, angiogenesis, endothelial and cell sprouting [48,106–108]. Thus, besides promoting phosphorylation of FA proteins, FAK can be also localized at adherent junctions in endothelial cells where, upon VEGF activation, FAK phosphorylate directly β catenin at Y142 [48] and indirectly, via Src activation, VE cadherin at Y658 [109]. This has important implications for the metastatic process as this lead to disruption of β-catenin-VEcadherin interactions thereby altering endothelial barrier function and increasing vascular permeability. Localised increases in vascular permeability constitute preferential discrete sites for cancer cell homing due in part to endothelial FAK-mediated expression of E-selectin [110].

The majority of FAK binding partners at the kinase domain involved the binding of SH2-containing proteins to FAK phosphorylated at Tyr397 which includes Src [95] but also PI3K [96], phospholipase Cγ (PLCγ) [97], growth-factor-receptor-bound protein-7 (GRB7) [98], p120 RasGAP [71] and the suppressor of cytokine signalling, (SOCS) [101]. Upon binding to phosphorylated FAK at Tyr397, increased PLCγ1 enzymatic activity was observed [97] which may be needed for calcium-dependent FA disassembly [111,112], while Grb7 binding induced also cell motility, a process that require FAK-mediated Grb7 phosphorylation [102]. FAK promote also cancer progression by activating the oncogenic Ras pathway. Negative regulators of Ras, include p120RasGAP, a GTPase activating protein, which associates directly with Ras and promotes hydrolysis of the bound GTP, thereby inhibiting Ras activity. In malignant astrocytoma, it was reported that overexpression of FAK

promote FAK association with p120RasGAP thereby promoting Ras activity through a competitive inhibition [103]. This association involves Tyr397 as shown by mutation analysis. FAK association with p120RasGAP also facilitates FAK-mediated phosphorylation of p190RhoGAP that regulates polarity in migrating cells [71]. Autophosphorylation of FAK at Tyr 397 may also provide binding sites for proteins that negatively regulate FAK activity. Indeed, SOCS proteins presumably bind FAK to Tyr397 and both the Src homology 2 (SH2) domain and the kinase inhibitory region domains of the SOCS proteins contribute to SOCS binding to FAK [101]. This led to the inhibition of FAK kinase activity and to the polyubiquitination and degradation of FAK. Another example of negative regulation of FAK is represented by the binding of FIP200 (FAK family interacting protein of 200 kDa) to the kinase domain of FAK which regulate cell cycle progression [105]. Finally, the Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) tumour suppressor interact with FAK in a FAK Tyr397 dependent manner and reduces the phosphorylation at this site thereby reducing cell migration and invasion processes [99,100].

3.2.2. FAK Inhibitors: Targeting the ATP Binding Site

FAK phosphorylation and activation drives many cancer-related processes. Therefore, based on this knowledge, two strategies can be developed to inhibit FAK function in cancer cells. The first is to inhibit the kinase function of FAK and the second to alter Src binding to FAK because this event is at the basis of the full FAK kinase activity. Pharmacological companies like Novartis or Pfizer have developed several kinase inhibitors of FAK which are almost all small ATP-competitive molecules. One of the first compounds developed was TAE-226 which exhibit nanomolar inhibitory activity toward FAK but inhibit also insulin-like growth factor-I receptor kinase [113,114]. In vitro, this compound prevented cell invasion through Matrigel, reduced cell proliferation, increased apoptosis and interestingly, it also enhanced docetaxel-mediated growth inhibition [115]. In vivo, the therapeutic efficacy of TAE-226 was related to induction of apoptosis of tumour-associated endothelial cells and reduction of tumour cell proliferation and microvessel density. The crystal structure of the kinase domain of FAK in complex with this molecule revealed that the DFG motif adopts a helical conformation which is stabilized by interactions with TAE-226 [116]. Nevertheless, despite substantial selectivity due to this conformation, the development of this molecule was later abandoned due to off-target effects. PND-1186 is another FAK inhibitor that targets the ATP-binding site but displays also inhibition against FLT-3 and ACK1 [117]. This compound, now named VS-4718, is on phase I clinical trials alone for patient with metastatic cancer or in combination with paclitaxel and Gemcitabine for patient with pancreatic cancer. At the same time, Pfizer developed PF-271 a compound that displays nanomolar inhibitory activity toward FAK and Pyk-2 but show high selectivity against a broad range of other kinases [118]. In multiple human xenograft models this compound display dose dependent antitumor efficacy. It should be noted that in pancreatic ductal adenocarcinoma, PF-271 inhibit cell migration in tumour cells but had no effect on cell proliferation at doses 10 times higher than those required to inhibit FAK catalytic activity and migration/invasion processes [119]. Remarkably, in a phase I clinical trial study, PF-271 was reported to be safe and well tolerated up to 125 mg twice-per-day and show significant stabilisation of tumour progression in some patients [120]. On the other hand, PF-228 another highly selective FAK inhibitor developed by Pfizer, inhibited both chemotactic and haptotactic cell migration in many cell lines but did not inhibit cell proliferation or induce apoptosis at similar concentrations [121]. GlaxoSmithKline developed also a FAK inhibitor named GSK2256098 that, in early studies, displayed minor clinical responses in mesothelioma subjects. However, based on recent work indicating that anti-cancer therapy using selective BRAF inhibitors may activate FAK pathway [122,123], GSK2256098 was also tested in combination with the MEK inhibitor trametinib in a Phase Ib study in subjects with advanced solid tumours and in combination with the frizzled class receptor (SMO) inhibitor vismodegib in a phase II study in patients with progressive meningiomas harbouring mutations in SMO or NF2. Although the second study is still on-going the first one was ended because it did not demonstrate improved efficacy in subjects treated with the combination of GSK2256098 plus trametinib compared to that observed with GSK2256098 monotherapy Finally,

the late generation kinase inhibitor PF-04554878, now named VS-6063, was reported to stabilize some patients with colorectal or ovarian tumours in phase I clinical trial and is actually tested in the phase I/Ia study in combination with the anti-PD-1 Pembrolizumab for patients with advanced solid malignancies, in a phase I/Ib study in combination with placlitaxel for patients with advanced ovarian cancer and in two phase II studies, one for patients with KRAS mutant non-small cell lung cancer and one for subjects with malignant pleural mesothelioma based on their Merlin status. Moreover, with the idea of fighting cancer therapeutic resistance, a triple combination of VS-6063, carboplatin and paclitaxel is currently tested in a phase I/II clinical trial named ROCKIF (Re-sensitization of Carboplatin-resistant Ovarian Cancer with Kinase Inhibition of FAK) for the treatment of patients with ovarian cancer. Taken together, these results suggest that targeting the FAK kinase activity with new generation FAK inhibitors may be promising drug especially when added in combinatorial therapies. Although the selectivity is a well-known problem of many competitive inhibitors of the ATP binding site, in the case of FAK inhibiting the closely related kinase Pyk2 may be useful as lessons from $FAK^{-/-}$ cells have shown increased Pyk2 activity due to compensatory effect. However, several reports suggest that although FAK kinase activity is necessary for cell motility, it may be not essential for cell proliferation and survival. Indeed, as already mentioned, these later effects are most certainly mediated by the FERM domain of FAK through regulation of p53 and the Receptor-Interaction Protein.

3.2.3. Inhibiting FAK P-Tyr Binding to SH2-Containing Protein

To avoid selectivity problems typically found with competitive inhibitors of the ATP binding site, inhibiting the scaffolding function of FAK with the use of PPI inhibitors can be an attractive alternative approach. Specific interactions between SH2 domain-containing proteins and their phosphotyrosine counterparts play a significant role in tyrosine kinase signalling pathways. Thus, blocking the interaction between SH2 domain and its binding protein may inhibit overactive signalling pathways in cancer cells. For example, using structure-based virtual screening of the National Cancer Institute chemical libraries, small inhibitors of Stat3, targeting the Stat3 SH2 domain bound to a Stat3 phosphotyrosine peptide, were discovered [124]. In the case of FAK, with a similar strategy to the one used to characterize Roslin2 and M13, Vita Golubovskaya and her colleagues at Buffalo used computer modelling together with in-silico screening to target the FAK Y397 site and identify two compounds, Y11 and Y15 which display high inhibition of FAK autophosphorylation. As described previously Y397, upon phosphorylation, is involve in FAK interactions with Src, PI3K and some other SH2-containing proteins. Therefore, it is expected that such compounds would alter apoptosis and migration/invasion pathways. Indeed *in-vitro*, Y11 dose-dependently decreased viability, adhesion and clonogenicity in colon and breast cancer cell lines while significantly reducing tumour growth in a colon cancer cell mouse xenograft model [125]. Moreover, in in-vivo models of both colon cancer and glioblastoma, Y15 display synergy with 5-FU and temozolomide chemotherapy respectively [126,127]. Finally, in early preclinical studies investigating the pharmacokinetic profile, Y15 did not display toxic effect at doses effective to promote anti- tumoural results. Therefore, altogether, although the selectivity of these compounds has to be clearly evaluated, the use PPI inhibitors to target FAK-dependent pathways seem quite promising.

3.3. Major Interactions at the Prolin-Rich Domains

3.3.1. Role of the FAK PR Domain in the Invasion Pathway

FAK contains three prolin-rich (PR) domains mediating many protein interactions (Table 1): PR1 located within the N-terminal domain between the FERM and the kinase domain surrounding Pro371/374; PR2 and 3 located both into the C-terminal domain between the kinase and the FAT domain and surrounding Pro712/715/718 and Pro875/878/881, respectively. PR1 domain is involved in the interaction with Trio a GEF protein called Trio that regulates FAK activity, focal adhesion dynamics and the cytoskeleton organization [128]. The PR2 domain is involved essentially in the

Src/p130Cas-mediated migration and invasion processes. Thus, both Tyr397 and the PR2 domain of FAK are necessary for Src targeting and activation at FAs [129]. It should be also noted that the same pattern of interaction has been observed for PI3K where, although many data indicate interactions between its SH2 domain with FAK phosphorylated at Tyr397, the SH3 domain of the p85 units is also interacting with the PR domain of FAK [130]. Proteins of the CAS (Crk-associated substrate) family act essentially as scaffolds to regulate the formation of protein complexes controlling different processes such as migration, differentiation, cell cycle and apoptosis. p130Cas has been shown to be a component of the Integrin signalling machinery involved in cell motility. The role of FAK in the targeting and phosphorylation of p130Cas has been a matter of controversy. Indeed, the SH3 domain of p130Cas has been shown to be either essential [131] or not [132] to the targeting of p130Cas to FAs. Because p130Cas exists at FAs in a macromolecular complex with FAK and Src, both of which sharing PR domain and tyrosine kinase activity, the relative role of FAK and Src in addressing and phosphorylating p130Cas are difficult to assess. One model postulates that FAK autophosphorylation at Tyr397 allows the recruitment of Src via its SH2 domain, while interaction of the SH3 domain of p130Cas with the PR2 domain of FAK is needed for FAK-mediated p130Cas localisation at FA and subsequent phosphorylation by Src. Nevertheless, the "Cas-family C-terminal homology" (CCH) domain may adopt a tertiary structure similar to the FAT domain of FAK and recently it was demonstrated that this CCH domain have the ability to function as a FA targeting domain [133]. Another candidate for p130Cas targeting to FAs is the LIM protein Ajuba, which associates with the CCH domain of p130Cas and may localize p130Cas to nascent adhesive sites in migrating cells [134]. Therefore, from these data, it appears that p130Cas localize to FA via both FAK dependant and independent mechanisms, although the main one at least in FAK-expressing cells, seems to be linked to the interaction of the SH3 domain of p130CAS with the PR2 of FAK. The activation of p130Cas is linked to both Rac-mediated lamellipodia formation and subsequent increase migration and to transduction of ECM stiffness into intracellular stiffness leading to an increase in cyclin D1 expression thereby modulating cell cycling [135]. In v-Src-transformed cells, this pathway has also linked MMP expression and cell invasion [94]. In these cells, FAK was also shown to form a complex with Calpain and p42ERK thus promoting FAK proteolysis and FA turn-over. This interaction is mediated by the PR2 domain of FAK and is necessary for efficient targeting of Calpain to FAs [136].

Table 1. Proteins associating with the PR domains are shown.

Interactions at PR Domain	References
Trio, Src, PI3K, p130CAS, Calpain	[125–127,132,133]
Cortactin, MT1-MMP, Ambra, PSGAP	[134,137–140]
Graf, ASAP1, IQGAP1, CDK5, Dynein	[141–146]

Cortactin is another important protein that directly interacts with both FAK PR2 and PR3 domains thereby being phosphorylated at its tyrosine sites Tyr 421 and Tyr 466 which leads to FA dynamic regulation [147]. Cortactin is a major signalling component of the specialized matrix-degrading organelles termed invadopodia. Despite its role in the signalling pathway regulating invasion, FAK is generally not located at invadopodia [137,148,149] although it has been described in inavdopodia from MCF10A-CA1 breast cancer cells [138]. Nevertheless, FAK may promote invasion via focalised matrix degradation at FAs, a process that involves a complex comprising FAK, p130CAS and MT1-MMP. This complex is formed by a direct interaction between FAK and MT1-MMP implicating both PR1 and PR2 domains [139]. In addition, FAK interact via its PR3 domain with Endophilin A1, a protein implicated in endocytosis. This interaction promotes Src-dependent phosphorylation of Endophilin A1 leading to inhibition of Endophilin/Dynamin interactions thereby reducing endocytosis of MT1-MMP which contributes to ECM degradation [140].

The shuttling of FAK in and away from FAs is crucial for FAK regulation of the migration/invasion pathway driven in part by the spatial-temporal control of Src activity. In cancer cells, inhibition of FAK

leads to altered Src trafficking via at least two major pathways. The first implies a relocation of Src from FAs to invadopodia through its interaction with the FAK homologue Pyk2 leading to enhanced matrix degradation [148]. The second pathway is engaged to maintain cell viability when the FAK/Src pathway is severely compromised and involves c-Cbl-mediated autophagic targeting of Src [141]. The targeting of Src to autophagosomes is controlled by the autophagy regulator Ambra1 (Activating Molecule in Beclin1-Regulated Autophagy) and requires Ambra-binding proteins such as Dynactin 1 and IFITM3 (Interferon-Induced Transmembrane protein 3) [142]. Nevertheless, in the presence of FAK, Ambra bind to the FAK PR3 domain thereby controlling the spatial regulation of FAK/Src at FAs. Indeed, a FAK P875A/P881A mutant with disturbed Ambra binding properties increases the time-residency of FAK/Src at FAs leading to enhanced adhesion.

3.3.2. FAK as a Regulator of the Rho-GTPase Family

Other SH3-containing domains that interact with FAK involve critical regulators of the Rho-GTPase family, which are important molecular switches that regulate cell motility. GTPase activating proteins (GAP) and guanine-nucleotide exchange factors (GEF) bind to these domains to regulate Rho, Rac or Cdc42. For example, the Rho regulator, implicated in cytoskeleton reorganisation, termed PSGAP (Pleckstrin homology and the SH3 domain containing rhoGAP) has been shown to also interact with FAK. This protein binds to a sequence located near Pro 859 in Pyk2 close to the FAT domain and presumably to the equivalent PR3 sequence in the FAK structure, although this has not been formally demonstrated [150]. The Graf protein (GTPase Regulator Associated with FAK) also binds via its SH3 domain to the PR3 site to regulated actin organisation, a mechanism required for FAK function in promoting haptotaxis motility [104]. The Arf GAP proteins are another family of regulators that stimulate GTP hydrolysis bound to ADP-ribosylation factors (Arfs) thereby controlling membrane trafficking and cytoskeletal organization. ASAP1, an Arf GAP protein containing SH3, ANK repeat and PH domains localized at peripheral adhesions has been shown to contain an SH3 domain that binds to FAK and translocates from FAs to dorsal ruffles to regulate the Actin cytoskeleton [143]. Finally, the intracellular scaffold protein containing both IQ and GTPase-activating protein 1 motifs (IQGAP1) was recently found to interact with FAK in MDCK cells under conditions promoting RhoA activation thereby controlling FAs assembly [144]. Is not known whether this interaction is direct or not but one possibility could be a direct interaction between the WW motifs of IQGAP1 and the PR motifs of FAK.

On the other hand, FAK associates with the guanine nucleotide exchange factor PDZ-RhoGEF to modulate Rho/Rho kinase II signalling necessary for focal adhesion dynamic at the tail and trailing edge retraction but the structural determinants of FAK required for this interaction were not described [145]. Both PDZ-RhoGEF and LARG, a GEF containing a PH domain, can be phosphorylated by FAK in response to thrombin, thereby enhancing the activation of Rho [151]. The cycle of activation/inactivation of Rho family GTPases depend on the coordination of GEFs and GAPs. As discussed here FAK is associated with the recruitment at FA and their phosphorylation of several GEFs necessary for full RhoA activation but also with GAP proteins like Graf or PSGAP necessary for RhoA inactivation. It is unknown why FAK via different motifs such as Tyr397, PR domain or FAT domains interact with different GEF or GAP. However, it is very unlikely that FAK bind to these molecules at the same time. It seems rather that FAK controls the spatial-temporal activation of GEFs and GAPs to modulate cell contractility during the migration process.

3.3.3. Role of FAK Ser732

The effects induced by the phosphorylation of FAK at Ser 732, that is close to PR2 have been addressed in several cell types. The first reports describe that FAK phosphorylation at this site is important for microtubule organization and microtubule-dependant mechanisms such as nuclear translocation, mitosis and neural cell migration [146,152]. Latter, CDK5-dependant FAK phosphorylation at Ser732 specifically localized at the spindle microtubule was shown to be implicated in cancer cell proliferation and migration. Of note this process appears independent of Integrin engagement [153].

Besides, CDK5, the Rho-dependent kinase ROCK also directly phosphorylates FAK downstream of VEGF signalling [154]. Finally, an interaction between Dynein, Paxillin and FAK reported in both mouse endothelial and NRK cells was shown to involve FAK phosphorylation at Ser 732 [155].

3.3.4. Inhibiting the FAK PR Domain Binding to SH3-Containing Protein

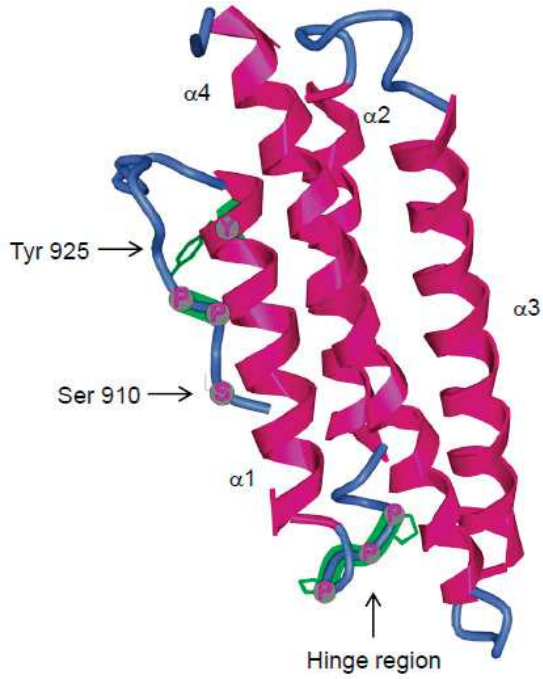
At the moment, no PPI inhibitors targeting FAK interactions via its PR domains has been developed. However, this strategy may be valuable as protein domains that bind proline-rich motifs are frequently involved in signalling events. Indeed, for FAK, P878A/P881A mutation were associated to decrease expression levels of markers for epithelial-mesenchymal transition in vivo in a mouse model of human breast cancer which correlate with an inhibition of the FAK/Endophilin A2 interaction [156]. Thus, targeting such interactions with small molecules or peptide-based sequences may be of potential interest for clinical applications. PR sequences typically contain a Pro-Xaa-Xaa-Pro motif, which folds into a polyproline helix that bind to SH3, WW, GYF or EVH1 domain. The typical Kd of these domains for their respective targets range over 1 to 500 μM which cannot be considered as high affinity. All these domains recognize several residues within the core motif of PR domains. Often aromatic side chains of the PR-binding domain recognize defined proline residues. Selectivity is therefore achieved via specific interaction with core-flanking epitopes and exposed side chains on the surface of the PR domain called epsilon determinants [157]. The determination of the precise characteristic of these critical interactions using structure-based molecular modelling together with the screening of peptide libraries may help the search of PPI targeting PR domains.

3.4. Major Interactions at the FAT Domain

3.4.1. FAK Binding to Paxillin and the Targeting to Focal Adhesions

The C-terminal domain of FAK interacts with several FA-associated proteins including Paxillin and Talin [158–160], p130^{CAS} [132,161], Grb2 [159,162], the p85α subunit of PI3K [130] and VEGFR-3 [163]. Furthermore, the C-terminal domain is both necessary and sufficient for FAK localization at FAs and thus has been called the FAT domain (Focal Adhesion Targeting). Structurally this domain is a four-helix bundle carrying two hydrophobic patches HP1 and HP2 that mediate interaction with the LD2 and LD4 motifs on Paxillin [164–166] (Figure 4). Hence, targeting of FAK to FA has been shown to be mediated primary by binding of FAK to Paxillin although alternative ways, such as binding to Talin, have been described [160]. Classical models postulate that upon Integrin engagement to the ECM, Talin and/or Paxillin are recruited to nascent adhesions via binding to the cytoplasmic tail of Integrin. Indeed, early studies have shown that FAK interact with Talin within the FAT domain and, because *in-vitro* association of Talin with the Integrin β1 cytoplasmic domain has been detected, it was suggested that Talin may target FAK to FAs [160]. However, recently it was clearly demonstrated that FAK acts upstream of Talin and recruits it via FAT binding functions to nascent adhesions, although this mechanism does not take place for Talin recruitment at mature adhesions [167]. Studies using cells from Paxillin knock-out mice or deletion of FAK-Paxillin binding sites revealed an essential role for Paxillin in targeting FAK to FAs although it should be noted that some residual FAK localization at FAs is frequently observed [168,169]. Moreover, overexpression of Hic-5 a Paxillin homologue that also localized to FAs, sequestered FAK from Paxillin and thus reduced phosphorylation of Paxillin and FAK. Therefore, Hic-5-mediated inhibition of cell spreading can be attributed to a competition with paxillin for FAK and subsequent prevention of downstream FAK signalling [170]. Alternative routes for FAK localization at FAs may involve the FERM domain of FAK which enables either FAK interaction with the Arp2/3 complex or FAK targeting to membranes and further binding to PtdIns (4,5) P_2 at sites of Integrin activation thereby connecting FAK to nascent adhesions [59,70]. Other proteins containing LD motifs have also been shown to bind to the FAT domain of FAK. This includes the tumour suppressor DLT1 (deleted in liver cancer 1) which encodes a Rho-GAP catalytic domain that negatively regulates Rho-GTPases [171] and the delayed rectifier Kv2.1 potassium channel which

upon FAK interaction promotes polarized cell morphology and enhanced motility [172]. Interaction between the FAT domain and the FERM domain of FAK has also recently been shown to be involved in FAK dimerization and activation. Surprisingly, the FAT-FERM interactions seem further stabilized by paxillin binding to FAT [65]. Moreover, beside the targeting of FAK to FAs and its subsequent implication for adhesion and migration processes, the FAK-Paxillin interaction is also involved in the regulation of mitotic spindle orientation, thus controlling tissue morphogenesis [173].



Interactions	References
Paxillin, Talin, p130Cas	[129,155,157,158,160,162]
Grb2, PI3K, VEGFR3, DLT1, Kv2.1	[127,156,159,160,168,169]
PTPα, ERK, PIN1, p190RhoGEF	[93,173–176]
GIT1, Eps8	[177–179]

Figure 4. Structure of the FAT domain of FAK from the protein databank (accession code 3S9O). The FAT domain is a four-helix bundle composed of helix α1, α2, α3 and α4. The hydrophobic patches HP1 and HP2 important for paxillin binding are located at the interface of helix α1–α4 and α2–α3. Tyr925 and Ser910 are highlighted. The residues of the hinge domain located between helix α1 and α2 important for FAK dimerization and phosphorylation of Tyr925 are coloured in green. Proteins associating with the FAT domain are shown in the table.

3.4.2. FAK Phosphorylation at Tyr925

One important motif of the FAT domain is the Tyr925 phosphorylation site, which has been identified as a Src-dependent process because its phosphorylation is significantly reduced in cells expressing a kinase-defective mutant of Src [180]. Upon phosphorylation it creates a binding site for the SH2 domain of the adaptor protein Grb2 with further activation of the MAP kinase pathway [159]. This pathway has been implicated in the control of VEGF expression in breast carcinoma cells and, when inhibited by selective mutation of FAK at Tyr925, leads to reduced tumour growth in mouse associated with impaired neo-vascularisation [181]. Via the FAK-Grb2 association, Grb2 was also proposed to link FAK to PTPα promoting PTPα phosphorylation to control downstream Integrin signalling [182]. In addition, phosphorylation of this site has been associated with activation of the p130CAS/Dock180/Rac1 signalling pathway-mediated cell protrusion [93] which, at least in

Src-transformed fibroblasts, leads to increased matrix metalloproteinase expression and activity and thus to mechanisms underlying cell invasion [94]. Nevertheless, direct association of p130CAS to FAK has been shown to be preferentially mediated by the p130CAS SH3 domain binding to the PR1 FAK domain as previously discussed. Thus, although Dock180 co-immunoprecipitates with FAK, it is unlikely that Dock180 directly interacts with FAK but instead, Dock180 and p130CAS are rather part of a signalling complex which includes FAK and Src. Therefore, the precise molecular interactions leading to activation of this pathway upon phosphorylation of FAK Tyr925 remains to be elucidated as is the search for other SH2-countaining proteins that could interact with this phosphorylated site.

Cell motility also requires the coordinated turnover of nascent adhesions at the leading edge and the disassembly of FA at the rear, a process dependent upon FAK phosphorylation at Tyr925. Because phosphorylation of Tyr925 and subsequent binding of SH2-containing protein require rearrangement of the FAT structure, it has been suggested that this process would lead to alteration of FAK-Paxillin interactions thus ultimately leading to FAK removal from FA [174]. However, although phosphorylation of FAK at Tyr925 increases FA dynamic, it also contributes to increasing the time residency of FAK at FAs and therefore may not be the molecular determinant necessary for FAK removal from FA [93]. On the other hand, rearrangement of the FAT domain involving opening of helix1 from the four-helix bundle may be a conformational change triggering the removal of FAK from FAs. Indeed, this structural rearrangement would alter the conformation of the hydrophobic patch HP2 thus reducing FAK-Paxillin interaction and also allow easy access to Tyr925 for kinase-mediated phosphorylation and subsequent binding of SH2-containing proteins. Indeed, selective deletion of Q943/A945 in the FAT domain of FAK, aimed at inducing increased strain generated by the prolines in the H1-H2 hinge region leads to an increased probability of helix 1 opening as observed by decrease FAK-Paxillin interaction and increase phosphorylation at Tyr925 [175]. Nevertheless, the nature of the signal leading to opening of the FAT domain and subsequent phosphorylation at Tyr925 remains to be determined.

3.4.3. FAK Phosphorylation at Ser910

Early studies have shown that agonists of G protein-coupled receptors, including Bombesin and lysophosphatidic acid stimulate FAK phosphorylation at Ser910, through an ERK-dependent pathway. Moreover, growth factors that stimulate the ERK pathway in 3T3 fibroblast, like FGF, phosphorylate FAK at Ser910 whereas others like Insulin which is unable to simulate the ERK pathway does not promote FAK phosphorylation at Ser910 further indicating the requirement of ERK for phosphorylation at this site [176,183]. Interestingly, phosphorylation of Ser910 in response to Bombesin was increased in a tense FAK mutant with deletion at Q943/A945 that induces destabilization of the FAT domain suggesting that FAT rearrangement also increases Ser910 accessibility to Ser/Thr kinases [175]. Ser910 is located just before a proline rich domain containing P911/P912/P913. Typically, proline-rich domains that binds to SH3 or WW containing proteins are composed of a Pro-X-X-Pro motif but a subset of WW domain bind specifically to pSer/Thr-Pro motifs. The enzymes responsible for the phosphorylation of Ser/Thr-Pro motifs are Pro-directed protein kinases, a large family of kinases which include for example MAPKs, GSK-3 and JNKs. Proline residues exist in both cis and trans isomers catalysed by peptidyl–prolyl cis/trans isomerases. A specific peptidyl–prolyl cis/trans isomerases of the Parvulin family called PIN1 (protein interacting with NIMA1) catalyses the isomerization of Ser/Thr-Pro motifs once phosphorylated. Recently it was shown that the phosphorylation of FAK at Ser910 enables the binding of PIN1thus leading to the recruitment of a protein tyrosine phosphatase PTP-PEST. This in turn leads to the dephosphorylation of FAK at Tyr397 [177]. Therefore, surprisingly in this study the inhibition of FAK via dephosphorylation at Tyr397 is linked in Ras-transformed fibroblast to the ability of Ras to induce cell migration, invasion and metastasis. Considering the overall data indicating a positive role of FAK in tumour progression, the authors suggest that FAK is required for tumour development induced by oncogenic proteins which activate a positive FAK/Src feedback loop whereas in tumour with aberrant Ras which do not rely on Src for their oncogenic development, a MAPK pathway leading to reduce FAK activity is activated that promote invasion and metastasis.

3.4.4. FAK as a Regulator of the Rho-GTPase Family

We described previously interactions between Rho-GTPase family regulators with proline-rich domains of FAK but FAK also interacts via its FAT domain with some of these regulators. First, as discussed before, FAK interacts directly or via formation of a complex that include p130Cas, with Dock180, a GEF for Rac thereby promoting lamellipodia formation. FAK also regulate Rho via interaction with p190RhoGEF that stimulate Rho activity. Although the interaction domains were not precisely mapped, mutation of FAK^{L1034S}, which destabilizes the four-helix bundle of the FAT domain, disrupts FAK interaction with p190RhoGEF thus clearly indicating the requirement for an intact FAT domain [178]. Another protein called GIT1, for G-protein-coupled receptor kinase (GRK)-interacting targets which contains at the N terminal a motif functioning as Arf GAP was found to directly associate with FAK via a region closely related to the yeast Spa2 homology domain 1 (SHD-1) [184]. GIT1 is a multifunctional protein involved in focal complex disassembly able to bind Paxillin and the PAK/β-PIX complex (p21-activated kinase/PAK-interacting exchange factor PIX). PAK is an effector for Rac1 and Cdc42 whereas β-PIX is a GEF for Rac. GIT1, like FAK, encompass Paxillin binding motifs that allow direct interaction with the LD4 motif of Paxillin, supporting the notion that GIT1 may regulate FAK/Paxillin interactions and thus focal complex dynamics. Moreover, in NIH3T3 cells, lysophosphatidic acid-induced GIT1-dependent β-PIX binding to FAK thereby involving FAK to both the control of lamelipodia formation via Rac activation and focal complex dynamic via regulation of FAK/Paxillin binding [179]. Nevertheless, the precise role of FAK in this regulation pathway leading to cell polarity and directional migration is even more complex. Indeed, phosphorylation of GIT1 by the FAK/Src complex is required for GIT1 association with FAK at FAs [185]. On the other hand, phosphorylation of GIT2, also called PKL for paxillin kinase linker, by the same FAK/Src complex in response to platelet derived growth factor (PDGF) stimulation, is required for GIT2 association with Paxillin and control of wound-induced cell polarization as well as directional migration [186]. Another regulator of cell polarization and directional migration is Eps8 (Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8), initially described as a substrate for EGFR involved in the Ras signalling pathway and endocytosis. In squamous cell carcinoma, Eps8 interacts with FAK at FAs and is required for FAK-dependent polarization and invasion [187]. This interaction require binding of Eps8 to the FAT domain of FAK spanning the region of the amino acids 981–1053, whereas in the absence of FAK, Eps8 interacts with Src to control its trafficking to autophagic structures. These findings demonstrate complex mechanisms by which FAK can function in the regulation of Rac, Rho and Cdc42 to control cellular polarization, lamellipodia extension and directed migration.

3.4.5. Inhibitors of FAT Interactions

FAK localisation at FA is essential for its regulation by Integrin signalling as demonstrated using replacement of the FAT sequence of FAK [188]. Historically, the first inhibitor of FAK described was the endogenous and autonomously expressed inhibitor FRNK (Focal adhesion kinase-Related Non Kinase) [189]. Indeed, early experiments using FRNK, indicated that many aspects of FAK function, especially adhesion and migration, involve FAK targeting to FAs [190,191]. Therefore, one way to inhibit FAK function in cancer cells would be to interfere with this targeting at the level of FAT. However, it was recently shown that FRNK inhibits growth and survival by direct binding to FAK in an inhibitory complex. This inhibition could be relieved by phosphorylation of FRNK at S217 which is the analogue of Ser910 for FAK [192]. Nevertheless, recently it was observed that altering FAK/Paxillin interactions via specific mutations in the FAT domain reduce adhesion and migration processes in non-cancer cells while inhibiting invasion in Src-transformed mouse fibroblasts [193]. Interestingly, the reduced capability of adhesion, migration and invasion observed in cells lacking FAK targeting to FA was greater to complete FAK knock-out demonstrating a gain of function which might be due to an unexpected ability of the mutated form of FAK to sequester key binding partners outside FAs. Thus, development of molecules targeting FAK interaction with protein involved in the localisation of FAK at FAs, may be a valuable strategy for the search of novel FAK inhibitors. A successful illustration

of such a strategy came from William Cance's group who reported that the FAT domain of FAK is also able to bind to VEGFR-3 in different cancer cell types. They further mapped this interaction to a region containing amino acid 853-1052 of FAT. Inhibiting this interaction with a peptide derived from the VEGFR-3 sequence coupled to a TAT cellular penetration motif decrease cell proliferation and induces apoptosis in breast cancer cells [163]. Going a step forward by using the crystal structure of FAT for molecular docking of small compounds targeting the site of interaction with VEGFR-3, they found that chloropyramine hydrochloride, a small molecule previously reported as a H1 histamine receptor antagonist, were able to alter FAK/VEGFR-3 interaction. This led to inhibition of cell proliferation in-vitro and reduction of tumour growth in-vivo in mice bearing breast cancer cell xenografts [194]. Once the lead compound had been validated, they further designed and synthesised analogues of this compound to be tested for binding to FAT and anti-cancer activities. From this second screening, analogue 29 was found to show enhanced specificity and selectivity for FAK-VEGFR-3 interaction and display in-vitro anti-tumour effect in a variety of cancer cell lines including pancreatic and breast cancer cell, glioma and melanoma [195].

4. Conclusions

Successful examples have now proven the efficiency of PPI inhibitors as some of these already reached clinical trials. FAK is at the crossroads of integrin and growth factors signalling and, as FAK is overexpressed in many human cancers, FAK is frequently associated with the promotion of oncogenic signals and the inhibition of tumour suppressive pathways. This makes FAK a clearly interesting cancer target. The development of PPI inhibitors targeting FAK is thus quite promising as FAK, via several specific subdomains and numerous sites of phosphorylation, is at the heart of an important interactome. Several small molecules targeting FAK kinase function are currently being developed with some success in clinical trials. Especially, targeting FAK in combination with therapies against other signalling pathways may be a promising approach for the treatment of drug-resistant cancers. Therefore, with the mapping of many FAK interactions at the molecular level, the search for inhibitors of FAK scaffolding function may lead to new promising therapeutics.

Funding: This work was supported in part by grants from the Ligue Contre le Cancer and Alsace contre le Cancer to P. Rondé. Antoine Mousson was supported by a doctoral fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Jin, L.; Wang, W.; Fang, G. Targeting protein-protein interaction by small molecules. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *54*, 435–456. [CrossRef] [PubMed]
2. Hopkins, A.L.; Groom, C.R. The druggable genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 727–730. [CrossRef] [PubMed]
3. Proudfoot, J.R. Drugs, leads and drug-likeness: An analysis of some recently launched drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1647–1650. [CrossRef]
4. Conte, M.P.; Longhi, C.; Petrone, G.; Buonfiglio, V.; Di Santo, S.; Seganti, L.; Velenti, P. The anti-invasive effect of bovine lactoferrin requires an interaction with surface proteins of Listeria Monocytogenes. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **1999**, *12*, 149–155. [PubMed]
5. Smith, J.; Diez, G.; Klemm, A.H.; Schewkunow, V.; Goldmann, W.H. CapZ-lipid membrane interactions: A computer analysis. *Theor. Biol. Med. Model.* **2006**, *3*, 30. [CrossRef] [PubMed]
6. Fuller, J.C.; Burgoyne, N.J.; Jackson, R.M. Predicting druggable binding sites at the protein-protein interface. *Drug Discov. Today* **2009**, *14*, 155–161. [CrossRef] [PubMed]
7. Clackson, T.; Wells, J.A. A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science* **1995**, *267*, 383–386. [CrossRef] [PubMed]
8. Hajduk, P.J.; Huth, J.R.; Tse, C. Predicting protein druggability. *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 1675–1682. [CrossRef]

9. Bogan, A.A.; Thorn, K.S. Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 1–9. [CrossRef] [PubMed]
10. Cheng, A.C.; Coleman, R.G.; Smyth, K.T.; Cao, Q.; Soulard, P.; Caffrey, D.R.; Salzberg, A.C.; Huang, E.S. Structure-based maximal affinity model predicts small-molecule druggability. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 71–75. [CrossRef] [PubMed]
11. Kozakov, D.; Hall, D.R.; Chuang, G.Y.; Cencic, R.; Brenke, R.; Grove, L.E.; Beglov, D.; Pelletier, J.; Whitty, A.; Vajda, S. Structural conservation of druggable hot spots in protein-protein interfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 13528–13533. [CrossRef] [PubMed]
12. Zhuang, C.; Narayanapillai, S.; Zhang, W.; Sham, Y.Y.; Xing, C. Rapid identification of Keap1-Nrf2 small-molecule inhibitors through structure-based virtual screening and hit-based substructure search. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1121–1126. [CrossRef] [PubMed]
13. Shin, W.H.; Christoffer, C.W.; Kihara, D. In silico structure-based approaches to discover protein-protein interaction-targeting drugs. *Methods* **2017**, *131*, 22–32. [CrossRef] [PubMed]
14. Momand, J.; Zambetti, G.P.; Olson, D.C.; George, D.; Levine, A.J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **1992**, *69*, 1237–1245. [CrossRef]
15. Kussie, P.H.; Gorina, S.; Marechal, V.; Elenbaas, B.; Moreau, J.; Levine, A.J.; Pavletich, N.P. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumour suppressor transactivation domain. *Science* **1996**, *274*, 948–953. [CrossRef] [PubMed]
16. Vassilev, L.T.; Vu, B.T.; Graves, B.; Carvajal, D.; Podlaski, F.; Filipovic, Z.; Kong, N.; Kammlott, U.; Lukacs, C.; Klein, C.; et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* **2004**, *303*, 844–848. [CrossRef] [PubMed]
17. Fry, D.C.; Emerson, S.D.; Palme, S.; Vu, B.T.; Liu, C.M.; Podlaski, F. NMR structure of a complex between MDM2 and a small molecule inhibitor. *J. Biomol. NMR* **2004**, *30*, 163–173. [CrossRef] [PubMed]
18. Vu, B.; Wovkulich, P.; Pizzolato, G.; Lovey, A.; Ding, Q.; Jiang, N.; Liu, J.J.; Zhao, C.; Glenn, K.; Wen, Y.; et al. Discovery of RG7112: A Small-Molecule MDM2 Inhibitor in Clinical Development. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 466–469. [CrossRef] [PubMed]
19. Ding, Q.; Zhang, Z.; Liu, J.J.; Jiang, N.; Zhang, J.; Ross, T.M.; Chu, X.J.; Bartkovitz, D.; Podlaski, F.; Janson, C.; et al. Discovery of RG7388, a potent and selective p53-MDM2 inhibitor in clinical development. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5979–5983. [CrossRef] [PubMed]
20. Tisato, V.; Voltan, R.; Gonelli, A.; Secchiero, P.; Zauli, G. MDM2/X inhibitors under clinical evaluation: Perspectives for the management of hematological malignancies and pediatric cancer. *J. Hematol. Oncol.* **2017**, *10*, 133. [CrossRef] [PubMed]
21. Scott, D.E.; Bayly, A.R.; Abell, C.; Skidmore, J. Small molecules, big targets: Drug discovery faces the protein-protein interaction challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15*, 533–550. [CrossRef] [PubMed]
22. Anderson, M.A.; Huang, D.; Roberts, A. Targeting BCL2 for the treatment of lymphoid malignancies. *Semin. Hematol.* **2014**, *51*, 219–227. [CrossRef] [PubMed]
23. Souers, A.J.; Leverson, J.D.; Boghaert, E.R.; Ackler, S.L.; Catron, N.D.; Chen, J.; Dayton, B.D.; Ding, H.; Enschede, S.H.; Fairbrother, W.J.; et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 202–208. [CrossRef] [PubMed]
24. Ashkenazi, A.; Fairbrother, W.J.; Leverson, J.D.; Souers, A.J. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 273–284. [CrossRef] [PubMed]
25. Levitzki, A. Tyrosine kinase inhibitors: Views of selectivity, sensitivity and clinical performance. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2013**, *53*, 161–185. [CrossRef] [PubMed]
26. Kanner, S.B.; Reynolds, A.B.; Vines, R.R.; Parsons, J.T. Monoclonal antibodies to individual tyrosine-phosphorylated protein substrates of oncogene-encoded tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 3328–3332. [CrossRef] [PubMed]
27. Lipfert, L.; Haimovich, B.; Schaller, M.D.; Cobb, B.S.; Parsons, J.T.; Brugge, J.S. Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets. *J. Cell Biol.* **1992**, *119*, 905–912. [CrossRef] [PubMed]
28. Schaller, M.D.; Borgman, C.A.; Cobb, B.S.; Vines, R.R.; Reynolds, A.B.; Parsons, J.T. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5192–5196. [CrossRef] [PubMed]

29. Weiner, T.M.; Liu, E.T.; Craven, R.J.; Cance, W.G. Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet* **1993**, *342*, 1024–1025. [CrossRef]
30. Owens, L.V.; Xu, L.; Craven, R.J.; Dent, G.A.; Weiner, T.M.; Kornberg, L.; Liu, E.T.; Cance, W.G. Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2752–2755. [PubMed]
31. Sieg, D.J.; Hauck, C.R.; Ilic, D.; Klingbeil, C.K.; Schaefer, E.; Damsky, C.H.; Schlaepfer, D.D. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 249–256. [CrossRef] [PubMed]
32. McLean, G.W.; Komiyama, N.H.; Serrels, B.; Asano, H.; Reynolds, L.; Conti, F.; Hodivala-Dilke, K.; Metzger, D.; Chambon, P.; Grant, S.G.; et al. Specific deletion of focal adhesion kinase suppresses tumor formation and blocks malignant progression. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 2998–3003. [CrossRef] [PubMed]
33. Cance, W.G.; Kurenova, E.; Marlowe, T.; Golubovskaya, V. Disrupting the scaffold to improve focal adhesion kinase-targeted cancer therapeutics. *Sci. Signal.* **2013**, *6*, pe10. [CrossRef] [PubMed]
34. Stark, C.; Breitkreutz, B.J.; Reguly, T.; Boucher, L.; Breitkreutz, A.; Tyers, M. BioGRID. A general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, D535–D539. [CrossRef] [PubMed]
35. Chatr-Aryamontri, A.; Breitkreutz, B.J.; Oughtred, R.; Boucher, L.; Heinicke, S.; Chen, D.; Stark, C.; Breitkreutz, A.; Kolas, N.; O'Donnell, L.; et al. The BioGRID interaction database: 2015 update. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *43*, D470–D478. [CrossRef] [PubMed]
36. Schaller, M.D.; Parsons, J.T. Focal adhesion kinase: An integrin-linked protein tyrosine kinase. *Trends Cell Biol.* **1993**, *3*, 258–262. [CrossRef]
37. Schaller, M.D.; Otey, C.A.; Hildebrand, J.D.; Parsons, J.T. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J. Cell Biol.* **1995**, *130*, 1181–1187. [CrossRef] [PubMed]
38. Cooper, L.A.; Shen, T.L.; Guan, J.L. Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 8030–8041. [CrossRef] [PubMed]
39. Tai, Y.L.; Chu, P.Y.; Lai, I.R.; Wang, M.Y.; Tseng, H.Y.; Guan, J.L.; Liou, J.Y.; Shen, T.L. An EGFR/Src-dependent beta4 integrin/FAK complex contributes to malignancy of breast cancer. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 16408. [CrossRef] [PubMed]
40. Lietha, D.; Cai, X.; Ceccarelli, D.F.; Li, Y.; Schaller, M.D.; Eck, M.J. Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell* **2007**, *129*, 1177–1187. [CrossRef] [PubMed]
41. Frame, M.C.; Patel, H.; Serrels, B.; Lietha, D.; Eck, M.J. The FERM domain: Organizing the structure and function of FAK. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 802–814. [CrossRef] [PubMed]
42. Jung, O.; Choi, S.; Jang, S.B.; Lee, S.A.; Lim, S.T.; Choi, Y.J.; Kim, H.J.; Kim, D.H.; Kwak, T.K.; Kim, H.; et al. Tetraspan TM4SF5-dependent direct activation of FAK and metastatic potential of hepatocarcinoma cells. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 5960–5973. [CrossRef] [PubMed]
43. Chen, S.Y.; Chen, H.C. Direct interaction of focal adhesion kinase (FAK) with Met is required for FAK to promote hepatocyte growth factor-induced cell invasion. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 5155–5167. [CrossRef] [PubMed]
44. Plaza-Menacho, I.; Morandi, A.; Mologni, L.; Boender, P.; Gambacorti-Passerini, C.; Magee, A.I.; Hofstra, R.M.; Knowles, P.; McDonald, N.Q.; Isacke, C.M. Focal adhesion kinase (FAK) binds RET kinase via its FERM domain, priming a direct and reciprocal RET-FAK transactivation mechanism. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 17292–17302. [CrossRef] [PubMed]
45. Liu, W.; Bloom, D.A.; Cance, W.G.; Kurenova, E.V.; Golubovskaya, V.M.; Hochwald, S.N. FAK and IGF-IR interact to provide survival signals in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 1096–1107. [CrossRef] [PubMed]
46. Marlowe, T.A.; Lenzo, F.L.; Figel, S.A.; Grapes, A.T.; Cance, W.G. Oncogenic Receptor Tyrosine Kinases Directly Phosphorylate Focal Adhesion Kinase (FAK) as a Resistance Mechanism to FAK-Kinase Inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* **2016**, *15*, 3028–3039. [CrossRef] [PubMed]
47. Chen, T.H.; Chan, P.C.; Chen, C.L.; Chen, H.C. Phosphorylation of focal adhesion kinase on tyrosine 194 by Met leads to its activation through relief of autoinhibition. *Oncogene* **2011**, *30*, 153–166. [CrossRef] [PubMed]
48. Chen, X.L.; Nam, J.O.; Jean, C.; Lawson, C.; Walsh, C.T.; Goka, E.; Lim, S.T.; Tomar, A.; Tancioni, I.; Uryu, S.; et al. VEGF-induced vascular permeability is mediated by FAK. *Dev. Cell* **2012**, *22*, 146–157. [CrossRef] [PubMed]

49. Poullet, P.; Gautreau, A.; Kadare, G.; Girault, J.A.; Louvard, D.; Arpin, M. Ezrin interacts with focal adhesion kinase and induces its activation independently of cell-matrix adhesion. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 37686–37691. [CrossRef] [PubMed]
50. Cai, X.; Lietha, D.; Ceccarelli, D.F.; Karginov, A.V.; Rajfur, Z.; Jacobson, K.; Hahn, K.M.; Eck, M.J.; Schaller, M.D. Spatial and temporal regulation of focal adhesion kinase activity in living cells. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 201–214. [CrossRef] [PubMed]
51. Goni, G.M.; Epifano, C.; Boskovic, J.; Camacho-Artacho, M.; Zhou, J.; Bronowska, A.; Martin, M.T.; Eck, M.J.; Kremer, L.; Grater, F.; et al. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate triggers activation of focal adhesion kinase by inducing clustering and conformational changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, E3177–E3186. [CrossRef] [PubMed]
52. Ezratty, E.J.; Partridge, M.A.; Gundersen, G.G. Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 581–590. [CrossRef] [PubMed]
53. Cohen, L.A.; Guan, J.L. Mechanisms of focal adhesion kinase regulation. *Curr. Cancer Drug Targets* **2005**, *5*, 629–643. [CrossRef] [PubMed]
54. Swaminathan, V.; Fischer, R.S.; Waterman, C.M. The FAK-Arp2/3 interaction promotes leading edge advance and haptosensing by coupling nascent adhesions to lamellipodia actin. *Mol. Biol. Cell* **2016**, *27*, 1085–1100. [CrossRef] [PubMed]
55. Wu, X.; Suetsugu, S.; Cooper, L.A.; Takenawa, T.; Guan, J.L. Focal adhesion kinase regulation of N-WASP subcellular localization and function. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 9565–9576. [CrossRef] [PubMed]
56. Serrels, B.; Sandilands, E.; Serrels, A.; Baillie, G.; Houslay, M.D.; Brunton, V.G.; Canel, M.; Machesky, L.M.; Anderson, K.I.; Frame, M.C. A complex between FAK, RACK1 and PDE4D5 controls spreading initiation and cancer cell polarity. *Curr. Biol. CB* **2010**, *20*, 1086–1092. [CrossRef] [PubMed]
57. Chen, R.; Kim, O.; Li, M.; Xiong, X.; Guan, J.L.; Kung, H.J.; Chen, H.; Shimizu, Y.; Qiu, Y. Regulation of the PH-domain-containing tyrosine kinase Etk by focal adhesion kinase through the FERM domain. *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 439–444. [CrossRef] [PubMed]
58. Ho, B.; Olson, G.; Figel, S.; Gelman, I.; Cance, W.G.; Golubovskaya, V.M. Nanog increases focal adhesion kinase (FAK) promoter activity and expression and directly binds to FAK protein to be phosphorylated. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 18656–18673. [CrossRef] [PubMed]
59. Lim, S.T.; Chen, X.L.; Lim, Y.; Hanson, D.A.; Vo, T.T.; Howerton, K.; Larocque, N.; Fisher, S.J.; Schlaepfer, D.D.; Ilic, D. Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Mol. Cell* **2008**, *29*, 9–22. [CrossRef] [PubMed]
60. Kadare, G.; Toutant, M.; Formstecher, E.; Corvol, J.C.; Carnaud, M.; Boutterin, M.C.; Girault, J.A. PIAS1-mediated sumoylation of focal adhesion kinase activates its autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 47434–47440. [CrossRef] [PubMed]
61. Kurenova, E.; Xu, L.H.; Yang, X.; Baldwin, A.S., Jr.; Craven, R.J.; Hanks, S.K.; Liu, Z.G.; Cance, W.G. Focal adhesion kinase suppresses apoptosis by binding to the death domain of receptor-interacting protein. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 4361–4371. [CrossRef] [PubMed]
62. Golubovskaya, V.M.; Finch, R.; Cance, W.G. Direct interaction of the N-terminal domain of focal adhesion kinase with the N-terminal transactivation domain of p53. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 25008–25021. [CrossRef] [PubMed]
63. Seong, J.; Tajik, A.; Sun, J.; Guan, J.L.; Humphries, M.J.; Craig, S.E.; Shekaran, A.; Garcia, A.J.; Lu, S.; Lin, M.Z.; et al. Distinct biophysical mechanisms of focal adhesion kinase mechanoactivation by different extracellular matrix proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 19372–19377. [CrossRef] [PubMed]
64. Toutant, M.; Costa, A.; Studler, J.M.; Kadare, G.; Carnaud, M.; Girault, J.A. Alternative splicing controls the mechanisms of FAK autophosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 7731–7743. [CrossRef] [PubMed]
65. Brami-Cherrier, K.; Gervasi, N.; Arsenieva, D.; Walkiewicz, K.; Boutterin, M.C.; Ortega, A.; Leonard, P.G.; Seantier, B.; Gasmi, L.; Bouceba, T.; et al. FAK dimerization controls its kinase-dependent functions at focal adhesions. *EMBO J.* **2014**, *33*, 356–370. [CrossRef] [PubMed]
66. Alanko, J.; Mai, A.; Jacquemet, G.; Schauer, K.; Kaukonen, R.; Saari, M.; Goud, B.; Ivaska, J. Integrin endosomal signalling suppresses anoikis. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 1412–1421. [CrossRef] [PubMed]
67. Wang, Y.; Cao, H.; Chen, J.; McNiven, M.A. A direct interaction between the large GTPase dynamin-2 and FAK regulates focal adhesion dynamics in response to active Src. *Mol. Biol. Cell* **2011**, *22*, 1529–1538. [CrossRef] [PubMed]

68. Ceccarelli, D.F.; Song, H.K.; Poy, F.; Schaller, M.D.; Eck, M.J. Crystal structure of the FERM domain of focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 252–259. [CrossRef] [PubMed]
69. Choi, C.H.; Webb, B.A.; Chimenti, M.S.; Jacobson, M.P.; Barber, D.L. PH sensing by FAK-His58 regulates focal adhesion remodeling. *J. Cell Biol.* **2013**, *202*, 849–859. [CrossRef] [PubMed]
70. Serrels, B.; Serrels, A.; Brunton, V.G.; Holt, M.; McLean, G.W.; Gray, C.H.; Jones, G.E.; Frame, M.C. Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 1046–1056. [CrossRef] [PubMed]
71. Tomar, A.; Lim, S.T.; Lim, Y.; Schlaepfer, D.D. A FAK-p120RasGAP-p190RhoGAP complex regulates polarity in migrating cells. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 1852–1862. [CrossRef] [PubMed]
72. Delyon, J.; Servy, A.; Laugier, F.; Andre, J.; Ortonne, N.; Battistella, M.; Mourah, S.; Bensussan, A.; Lebbe, C.; Dumaz, N. PDE4D promotes FAK-mediated cell invasion in BRAF-mutated melanoma. *Oncogene* **2017**, *36*, 3252–3262. [CrossRef] [PubMed]
73. Hungerford, J.E.; Compton, M.T.; Matter, M.L.; Hoffstrom, B.G.; Otey, C.A. Inhibition of pp125FAK in cultured fibroblasts results in apoptosis. *J. Cell Biol.* **1996**, *135*, 1383–1390. [CrossRef] [PubMed]
74. Xu, L.H.; Owens, L.V.; Sturge, G.C.; Yang, X.; Liu, E.T.; Craven, R.J.; Cance, W.G. Attenuation of the expression of the focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells. *Cell Growth Differ.* **1996**, *7*, 413–418. [PubMed]
75. McLean, G.W.; Carragher, N.O.; Avizienyte, E.; Evans, J.; Brunton, V.G.; Frame, M.C. The role of focal-adhesion kinase in cancer—A new therapeutic opportunity. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 505–515. [CrossRef] [PubMed]
76. Meurice, N.; Wang, L.; Lipinski, C.A.; Yang, Z.; Hulme, C.; Loftus, J.C. Structural conservation in band 4.1, ezrin, radixin, moesin (FERM) domains as a guide to identify inhibitors of the proline-rich tyrosine kinase 2. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 669–677. [CrossRef] [PubMed]
77. Golubovskaya, V.M.; Finch, R.; Zheng, M.; Kurenova, E.V.; Cance, W.G. The 7-amino-acid site in the proline-rich region of the N-terminal domain of p53 is involved in the interaction with FAK and is critical for p53 functioning. *Biochem. J.* **2008**, *411*, 151–160. [CrossRef] [PubMed]
78. Golubovskaya, V.M.; Ho, B.; Zheng, M.; Magis, A.; Ostrov, D.; Morrison, C.; Cance, W.G. Disruption of focal adhesion kinase and p53 interaction with small molecule compound R2 reactivated p53 and blocked tumor growth. *BMC Cancer* **2013**, *13*, 342. [CrossRef] [PubMed]
79. Golubovskaya, V.M.; Palma, N.L.; Zheng, M.; Ho, B.; Magis, A.; Ostrov, D.; Cance, W.G. A small-molecule inhibitor, 5′-*O*-tritylthymidine, targets FAK and Mdm-2 interaction and blocks breast and colon tumorigenesis in vivo. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2013**, *13*, 532–545. [CrossRef]
80. Lim, S.T.; Miller, N.L.; Chen, X.L.; Tancioni, I.; Walsh, C.T.; Lawson, C.; Uryu, S.; Weis, S.M.; Cheresh, D.A.; Schlaepfer, D.D. Nuclear-localized focal adhesion kinase regulates inflammatory VCAM-1 expression. *J. Cell Biol.* **2012**, *197*, 907–919. [CrossRef] [PubMed]
81. Zheng, D.; Kurenova, E.; Ucar, D.; Golubovskaya, V.; Magis, A.; Ostrov, D.; Cance, W.G.; Hochwald, S.N. Targeting of the protein interaction site between FAK and IGF-1R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *388*, 301–305. [CrossRef] [PubMed]
82. Ucar, D.A.; Kurenova, E.; Garrett, T.J.; Cance, W.G.; Nyberg, C.; Cox, A.; Massoll, N.; Ostrov, D.A.; Lawrence, N.; Sebti, S.M.; et al. Disruption of the protein interaction between FAK and IGF-1R inhibits melanoma tumor growth. *Cell Cycle* **2012**, *11*, 3250–3259. [CrossRef] [PubMed]
83. Schaller, M.D.; Hildebrand, J.D.; Shannon, J.D.; Fox, J.W.; Vines, R.R.; Parsons, J.T. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14*, 1680–1688. [CrossRef] [PubMed]
84. Hamadi, A.; Bouali, M.; Dontenwill, M.; Stoeckel, H.; Takeda, K.; Ronde, P. Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 4415–4425. [CrossRef] [PubMed]
85. Webb, D.J.; Donais, K.; Whitmore, L.A.; Thomas, S.M.; Turner, C.E.; Parsons, J.T.; Horwitz, A.F. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat. Cell Biol.* **2004**, *6*, 154–161. [CrossRef] [PubMed]
86. Parsons, J.T. Focal adhesion kinase: The first ten years. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 1409–1416. [CrossRef] [PubMed]
87. Calalb, M.B.; Polte, T.R.; Hanks, S.K. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: A role for Src family kinases. *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 954–963. [CrossRef] [PubMed]

88. Calalb, M.B.; Zhang, X.; Polte, T.R.; Hanks, S.K. Focal adhesion kinase tyrosine-861 is a major site of phosphorylation by Src. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *228*, 662–668. [CrossRef] [PubMed]
89. Schlaepfer, D.D.; Hunter, T. Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 5623–5633. [CrossRef] [PubMed]
90. Lim, Y.; Park, H.; Jeon, J.; Han, I.; Kim, J.; Jho, E.H.; Oh, E.S. Focal adhesion kinase is negatively regulated by phosphorylation at tyrosine 407. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 10398–10404. [CrossRef] [PubMed]
91. Bellis, S.L.; Miller, J.T.; Turner, C.E. Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 17437–17441. [CrossRef] [PubMed]
92. Cary, L.A.; Han, D.C.; Polte, T.R.; Hanks, S.K.; Guan, J.L. Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J. Cell Biol.* **1998**, *140*, 211–221. [CrossRef] [PubMed]
93. Deramaudt, T.B.; Dujardin, D.; Hamadi, A.; Noulet, F.; Kolli, K.; De Mey, J.; Takeda, K.; Ronde, P. FAK phosphorylation at Tyr-925 regulates cross-talk between focal adhesion turnover and cell protrusion. *Mol. Biol. Cell* **2011**, *22*, 964–975. [CrossRef] [PubMed]
94. Hsia, D.A.; Mitra, S.K.; Hauck, C.R.; Streblow, D.N.; Nelson, J.A.; Ilic, D.; Huang, S.; Li, E.; Nemerow, G.R.; Leng, J.; et al. Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J. Cell Biol.* **2003**, *160*, 753–767. [CrossRef] [PubMed]
95. Xing, Z.; Chen, H.C.; Nowlen, J.K.; Taylor, S.J.; Shalloway, D.; Guan, J.L. Direct interaction of v-Src with the focal adhesion kinase mediated by the Src SH2 domain. *Mol. Biol. Cell* **1994**, *5*, 413–421. [CrossRef] [PubMed]
96. Chen, H.C.; Guan, J.L. Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10148–10152. [CrossRef] [PubMed]
97. Zhang, X.; Chattopadhyay, A.; Ji, Q.S.; Owen, J.D.; Ruest, P.J.; Carpenter, G.; Hanks, S.K. Focal adhesion kinase promotes phospholipase C-gamma1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9021–9026. [CrossRef] [PubMed]
98. Shen, T.L.; Guan, J.L. Differential regulation of cell migration and cell cycle progression by FAK complexes with Src, PI3K, Grb7 and Grb2 in focal contacts. *FEBS Lett.* **2001**, *499*, 176–181. [CrossRef]
99. Tamura, M.; Gu, J.; Matsumoto, K.; Aota, S.; Parsons, R.; Yamada, K.M. Inhibition of cell migration, spreading and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* **1998**, *280*, 1614–1617. [CrossRef] [PubMed]
100. Tamura, M.; Gu, J.; Danen, E.H.; Takino, T.; Miyamoto, S.; Yamada, K.M. PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20693–20703. [CrossRef] [PubMed]
101. Liu, E.; Cote, J.F.; Vuori, K. Negative regulation of FAK signaling by SOCS proteins. *EMBO J.* **2003**, *22*, 5036–5046. [CrossRef] [PubMed]
102. Han, D.C.; Guan, J.L. Association of focal adhesion kinase with Grb7 and its role in cell migration. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 24425–24430. [CrossRef] [PubMed]
103. Hecker, T.P.; Ding, Q.; Rege, T.A.; Hanks, S.K.; Gladson, C.L. Overexpression of FAK promotes Ras activity through the formation of a FAK/p120RasGAP complex in malignant astrocytoma cells. *Oncogene* **2004**, *23*, 3962–3971. [CrossRef] [PubMed]
104. Hildebrand, J.D.; Taylor, J.M.; Parsons, J.T. An SH3 domain-containing GTPase-activating protein for Rho and Cdc42 associates with focal adhesion kinase. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 3169–3178. [CrossRef] [PubMed]
105. Abbi, S.; Ueda, H.; Zheng, C.; Cooper, L.A.; Zhao, J.; Christopher, R.; Guan, J.L. Regulation of focal adhesion kinase by a novel protein inhibitor FIP200. *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 3178–3191. [CrossRef] [PubMed]
106. Tavora, B.; Batista, S.; Reynolds, L.E.; Jadeja, S.; Robinson, S.; Kostourou, V.; Hart, I.; Fruttiger, M.; Parsons, M.; Hodivala-Dilke, K.M. Endothelial FAK is required for tumour angiogenesis. *EMBO Mol. Med.* **2010**, *2*, 516–528. [CrossRef] [PubMed]
107. Alexopoulou, A.N.; Lees, D.M.; Bodrug, N.; Lechertier, T.; Fernandez, I.; D'Amico, G.; Dukinfield, M.; Batista, S.; Tavora, B.; Serrels, B.; et al. Focal Adhesion Kinase (FAK) tyrosine 397E mutation restores the vascular leakage defect in endothelium-specific FAK-kinase dead mice. *J. Pathol.* **2017**, *242*, 358–370. [CrossRef] [PubMed]
108. Weis, S.M.; Lim, S.T.; Lutu-Fuga, K.M.; Barnes, L.A.; Chen, X.L.; Gothert, J.R.; Shen, T.L.; Guan, J.L.; Schlaepfer, D.D.; Cheresh, D.A. Compensatory role for Pyk2 during angiogenesis in adult mice lacking endothelial cell FAK. *J. Cell Biol.* **2008**, *181*, 43–50. [CrossRef] [PubMed]

109. Jean, C.; Chen, X.L.; Nam, J.O.; Tancioni, I.; Uryu, S.; Lawson, C.; Ward, K.K.; Walsh, C.T.; Miller, N.L.; Ghassemian, M.; et al. Inhibition of endothelial FAK activity prevents tumor metastasis by enhancing barrier function. *J. Cell Biol.* **2014**, *204*, 247–263. [CrossRef] [PubMed]
110. Hiratsuka, S.; Goel, S.; Kamoun, W.S.; Maru, Y.; Fukumura, D.; Duda, D.G.; Jain, R.K. Endothelial focal adhesion kinase mediates cancer cell homing to discrete regions of the lungs via E-selectin up-regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 3725–3730. [CrossRef] [PubMed]
111. Giannone, G.; Ronde, P.; Gaire, M.; Haiech, J.; Takeda, K. Calcium oscillations trigger focal adhesion disassembly in human U87 astrocytoma cells. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 26364–26371. [CrossRef] [PubMed]
112. Giannone, G.; Ronde, P.; Gaire, M.; Beaudouin, J.; Haiech, J.; Ellenberg, J.; Takeda, K. Calcium rises locally trigger focal adhesion disassembly and enhance residency of focal adhesion kinase at focal adhesions. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 28715–28723. [CrossRef] [PubMed]
113. Shi, Q.; Hjelmeland, A.B.; Keir, S.T.; Song, L.; Wickman, S.; Jackson, D.; Ohmori, O.; Bigner, D.D.; Friedman, H.S.; Rich, J.N. A novel low-molecular weight inhibitor of focal adhesion kinase, TAE226, inhibits glioma growth. *Mol. Carcinog.* **2007**, *46*, 488–496. [CrossRef] [PubMed]
114. Liu, T.J.; LaFortune, T.; Honda, T.; Ohmori, O.; Hatakeyama, S.; Meyer, T.; Jackson, D.; de Groot, J.; Yung, W.K. Inhibition of both focal adhesion kinase and insulin-like growth factor-I receptor kinase suppresses glioma proliferation in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 1357–1367. [CrossRef] [PubMed]
115. Halder, J.; Lin, Y.G.; Merritt, W.M.; Spannuth, W.A.; Nick, A.M.; Honda, T.; Kamat, A.A.; Han, L.Y.; Kim, T.J.; Lu, C.; et al. Therapeutic efficacy of a novel focal adhesion kinase inhibitor TAE226 in ovarian carcinoma. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 10976–10983. [CrossRef] [PubMed]
116. Lietha, D.; Eck, M.J. Crystal structures of the FAK kinase in complex with TAE226 and related bis-anilino pyrimidine inhibitors reveal a helical DFG conformation. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3800. [CrossRef] [PubMed]
117. Tanjoni, I.; Walsh, C.; Uryu, S.; Tomar, A.; Nam, J.O.; Mielgo, A.; Lim, S.T.; Liang, C.; Koenig, M.; Sun, C.; et al. PND-1186 FAK inhibitor selectively promotes tumor cell apoptosis in three-dimensional environments. *Cancer Biol. Therapy* **2010**, *9*, 764–777. [CrossRef]
118. Roberts, W.G.; Ung, E.; Whalen, P.; Cooper, B.; Hulford, C.; Autry, C.; Richter, D.; Emerson, E.; Lin, J.; Kath, J.; et al. Antitumor activity and pharmacology of a selective focal adhesion kinase inhibitor, PF-562,271. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 1935–1944. [CrossRef] [PubMed]
119. Stokes, J.B.; Adair, S.J.; Slack-Davis, J.K.; Walters, D.M.; Tilghman, R.W.; Hershey, E.D.; Lowrey, B.; Thomas, K.S.; Bouton, A.H.; Hwang, R.F.; et al. Inhibition of focal adhesion kinase by PF-562,271 inhibits the growth and metastasis of pancreatic cancer concomitant with altering the tumor microenvironment. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 2135–2145. [CrossRef] [PubMed]
120. Infante, J.R.; Camidge, D.R.; Mileshkin, L.R.; Chen, E.X.; Hicks, R.J.; Rischin, D.; Fingert, H.; Pierce, K.J.; Xu, H.; Roberts, W.G.; et al. Safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic phase I dose-escalation trial of PF-00562271, an inhibitor of focal adhesion kinase, in advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 1527–1533. [CrossRef] [PubMed]
121. Slack-Davis, J.K.; Martin, K.H.; Tilghman, R.W.; Iwanicki, M.; Ung, E.J.; Autry, C.; Luzzio, M.J.; Cooper, B.; Kath, J.C.; Roberts, W.G.; et al. Cellular characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 14845–14852. [CrossRef] [PubMed]
122. Chen, G.; Gao, C.; Gao, X.; Zhang, D.H.; Kuan, S.F.; Burns, T.F.; Hu, J. Wnt/beta-Catenin Pathway Activation Mediates Adaptive Resistance to BRAF Inhibition in Colorectal Cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2018**, *17*, 806–813. [CrossRef] [PubMed]
123. Hirata, E.; Girotti, M.R.; Viros, A.; Hooper, S.; Spencer-Dene, B.; Matsuda, M.; Larkin, J.; Marais, R.; Sahai, E. Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin beta1/FAK signaling. *Cancer Cell* **2015**, *27*, 574–588. [CrossRef] [PubMed]
124. Siddiquee, K.; Zhang, S.; Guida, W.C.; Blaskovich, M.A.; Greedy, B.; Lawrence, H.R.; Yip, M.L.; Jove, R.; McLaughlin, M.M.; Lawrence, N.J.; et al. Selective chemical probe inhibitor of Stat3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7391–7396. [CrossRef] [PubMed]

125. Golubovskaya, V.M.; Figel, S.; Ho, B.T.; Johnson, C.P.; Yemma, M.; Huang, G.; Zheng, M.; Nyberg, C.; Magis, A.; Ostrov, D.A.; et al. A small molecule focal adhesion kinase (FAK) inhibitor, targeting Y397 site: 1-(2-hydroxyethyl)-3,5,7-triaza-1-azoniatricyclo [3.3.1.1(3,7)] decane; bromide effectively inhibits FAK autophosphorylation activity and decreases cancer cell viability, clonogenicity and tumor growth in vivo. *Carcinogenesis* **2012**, *33*, 1004–1013. [PubMed]
126. Heffler, M.; Golubovskaya, V.M.; Dunn, K.M.; Cance, W. Focal adhesion kinase autophosphorylation inhibition decreases colon cancer cell growth and enhances the efficacy of chemotherapy. *Cancer Biol. Ther.* **2013**, *14*, 761–772. [CrossRef] [PubMed]
127. Golubovskaya, V.M.; Huang, G.; Ho, B.; Yemma, M.; Morrison, C.D.; Lee, J.; Eliceiri, B.P.; Cance, W.G. Pharmacologic blockade of FAK autophosphorylation decreases human glioblastoma tumor growth and synergizes with temozolomide. *Mol. Cancer Ther.* **2013**, *12*, 162–172. [CrossRef] [PubMed]
128. Medley, Q.G.; Buchbinder, E.G.; Tachibana, K.; Ngo, H.; Serra-Pages, C.; Streuli, M. Signaling between focal adhesion kinase and trio. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13265–13270. [CrossRef] [PubMed]
129. Yeo, M.G.; Partridge, M.A.; Ezratty, E.J.; Shen, Q.; Gundersen, G.G.; Marcantonio, E.E. Src SH2 arginine 175 is required for cell motility: Specific focal adhesion kinase targeting and focal adhesion assembly function. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 4399–4409. [CrossRef] [PubMed]
130. Guinebault, C.; Payrastre, B.; Racaud-Sultan, C.; Mazarguil, H.; Breton, M.; Mauco, G.; Plantavid, M.; Chap, H. Integrin-dependent translocation of phosphoinositide 3-kinase to the cytoskeleton of thrombin-activated platelets involves specific interactions of p85 alpha with actin filaments and focal adhesion kinase. *J. Cell Biol.* **1995**, *129*, 831–842. [CrossRef] [PubMed]
131. Nakamoto, T.; Sakai, R.; Honda, H.; Ogawa, S.; Ueno, H.; Suzuki, T.; Aizawa, S.; Yazaki, Y.; Hirai, H. Requirements for localization of p130cas to focal adhesions. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 3884–3897. [CrossRef] [PubMed]
132. Harte, M.T.; Hildebrand, J.D.; Burnham, M.R.; Bouton, A.H.; Parsons, J.T. P130Cas, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 13649–13655. [CrossRef] [PubMed]
133. Donato, D.M.; Ryzhova, L.M.; Meenderink, L.M.; Kaverina, I.; Hanks, S.K. Dynamics and mechanism of p130Cas localization to focal adhesions. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 20769–20779. [CrossRef] [PubMed]
134. Pratt, S.J.; Epple, H.; Ward, M.; Feng, Y.; Braga, V.M.; Longmore, G.D. The LIM protein Ajuba influences p130Cas localization and Rac1 activity during cell migration. *J. Cell Biol.* **2005**, *168*, 813–824. [CrossRef] [PubMed]
135. Bae, Y.H.; Mui, K.L.; Hsu, B.Y.; Liu, S.L.; Cretu, A.; Razinia, Z.; Xu, T.; Pure, E.; Assoian, R.K. A FAK-Cas-Rac-lamellipodin signaling module transduces extracellular matrix stiffness into mechanosensitive cell cycling. *Sci. Signal.* **2014**, *7*, ra57. [CrossRef] [PubMed]
136. Carragher, N.O.; Westhoff, M.A.; Fincham, V.J.; Schaller, M.D.; Frame, M.C. A novel role for FAK as a protease-targeting adaptor protein: Regulation by p42 ERK and Src. *Curr. Biol. CB* **2003**, *13*, 1442–1450. [CrossRef]
137. Kolli-Bouhafs, K.; Sick, E.; Noulet, F.; Gies, J.P.; De Mey, J.; Ronde, P. FAK competes for Src to promote migration against invasion in melanoma cells. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1379. [CrossRef] [PubMed]
138. Alexander, N.R.; Branch, K.M.; Parekh, A.; Clark, E.S.; Iwueke, I.C.; Guelcher, S.A.; Weaver, A.M. Extracellular matrix rigidity promotes invadopodia activity. *Curr. Biol.* **2008**, *18*, 1295–1299. [CrossRef] [PubMed]
139. Wang, Y.; McNiven, M.A. Invasive matrix degradation at focal adhesions occurs via protease recruitment by a FAK-p130Cas complex. *J. Cell Biol.* **2012**, *196*, 375–385. [CrossRef] [PubMed]
140. Wu, X.; Gan, B.; Yoo, Y.; Guan, J.L. FAK-mediated Src phosphorylation of endophilin A2 inhibits endocytosis of MT1-MMP and promotes ECM degradation. *Dev. Cell* **2005**, *9*, 185–196. [CrossRef] [PubMed]
141. Sandilands, E.; Serrels, B.; McEwan, D.G.; Morton, J.P.; Macagno, J.P.; McLeod, K.; Stevens, C.; Brunton, V.G.; Langdon, W.Y.; Vidal, M.; et al. Autophagic targeting of Src promotes cancer cell survival following reduced FAK signalling. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *14*, 51–60. [CrossRef] [PubMed]
142. Schoenherr, C.; Byron, A.; Sandilands, E.; Paliashvili, K.; Baillie, G.S.; Garcia-Munoz, A.; Valacca, C.; Cecconi, F.; Serrels, B.; Frame, M.C. Ambra1 spatially regulates Src activity and Src/FAK-mediated cancer cell invasion via trafficking networks. *eLife* **2017**, *6*, e23172. [CrossRef] [PubMed]

143. Randazzo, P.A.; Andrade, J.; Miura, K.; Brown, M.T.; Long, Y.Q.; Stauffer, S.; Roller, P.; Cooper, J.A. The Arf GTPase-activating protein ASAP1 regulates the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 4011–4016. [CrossRef] [PubMed]
144. Carmon, K.S.; Gong, X.; Yi, J.; Thomas, A.; Liu, Q. RSPO-LGR4 functions via IQGAP1 to potentiate Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, E1221–E1229. [CrossRef] [PubMed]
145. Iwanicki, M.P.; Vomastek, T.; Tilghman, R.W.; Martin, K.H.; Banerjee, J.; Wedegaertner, P.B.; Parsons, J.T. FAK, PDZ-RhoGEF and ROCKII cooperate to regulate adhesion movement and trailing-edge retraction in fibroblasts. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 895–905. [CrossRef] [PubMed]
146. Xie, Z.; Tsai, L.H. Cdk5 phosphorylation of FAK regulates centrosome-associated miocrotubules and neuronal migration. *Cell Cycle* **2004**, *3*, 108–110. [CrossRef] [PubMed]
147. Tomar, A.; Lawson, C.; Ghassemian, M.; Schlaepfer, D.D. Cortactin as a target for FAK in the regulation of focal adhesion dynamics. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44041. [CrossRef] [PubMed]
148. Genna, A.; Lapetina, S.; Lukic, N.; Twafra, S.; Meirson, T.; Sharma, V.P.; Condeelis, J.S.; Gil-Henn, H. Pyk2 and FAK differentially regulate invadopodia formation and function in breast cancer cells. *J. Cell Biol.* **2018**, *217*, 375–395. [CrossRef] [PubMed]
149. Chan, K.T.; Cortesio, C.L.; Huttenlocher, A. FAK alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion. *J. Cell Biol.* **2009**, *185*, 357–370. [CrossRef] [PubMed]
150. Ren, X.R.; Du, Q.S.; Huang, Y.Z.; Ao, S.Z.; Mei, L.; Xiong, W.C. Regulation of CDC42 GTPase by proline-rich tyrosine kinase 2 interacting with PSGAP, a novel pleckstrin homology and Src homology 3 domain containing rhoGAP protein. *J. Cell Biol.* **2001**, *152*, 971–984. [CrossRef] [PubMed]
151. Chikumi, H.; Fukuhara, S.; Gutkind, J.S. Regulation of G protein-linked guanine nucleotide exchange factors for Rho, PDZ-RhoGEF and LARG by tyrosine phosphorylation: Evidence of a role for focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 12463–12473. [CrossRef] [PubMed]
152. Xie, Z.; Sanada, K.; Samuels, B.A.; Shih, H.; Tsai, L.H. Serine 732 phosphorylation of FAK by Cdk5 is important for microtubule organization, nuclear movement and neuronal migration. *Cell* **2003**, *114*, 469–482. [CrossRef]
153. Rea, K.; Sensi, M.; Anichini, A.; Canevari, S.; Tomassetti, A. EGFR/MEK/ERK/CDK5-dependent integrin-independent FAK phosphorylated on serine 732 contributes to microtubule depolymerization and mitosis in tumor cells. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e815. [CrossRef] [PubMed]
154. Le Boeuf, F.; Houle, F.; Sussman, M.; Huot, J. Phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) on Ser732 is induced by rho-dependent kinase and is essential for proline-rich tyrosine kinase-2-mediated phosphorylation of FAK on Tyr407 in response to vascular endothelial growth factor. *Mol. Biol. Cell* **2006**, *17*, 3508–3520. [CrossRef] [PubMed]
155. Park, A.Y.; Shen, T.L.; Chien, S.; Guan, J.L. Role of focal adhesion kinase Ser-732 phosphorylation in centrosome function during mitosis. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 9418–9425. [CrossRef] [PubMed]
156. Fan, H.; Zhao, X.; Sun, S.; Luo, M.; Guan, J.L. Function of focal adhesion kinase scaffolding to mediate endophilin A2 phosphorylation promotes epithelial-mesenchymal transition and mammary cancer stem cell activities in vivo. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 3322–3333. [CrossRef] [PubMed]
157. Ball, L.J.; Kuhne, R.; Schneider-Mergener, J.; Oschkinat, H. Recognition of proline-rich motifs by protein-protein-interaction domains. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 2852–2869. [CrossRef] [PubMed]
158. Schaller, M.D.; Parsons, J.T. Pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk. *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 2635–2645. [CrossRef] [PubMed]
159. Schlaepfer, D.D.; Hanks, S.K.; Hunter, T.; van der Geer, P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* **1994**, *372*, 786–791. [CrossRef] [PubMed]
160. Chen, H.C.; Appeddu, P.A.; Parsons, J.T.; Hildebrand, J.D.; Schaller, M.D.; Guan, J.L. Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 16995–16999. [CrossRef] [PubMed]
161. Tachibana, K.; Urano, T.; Fujita, H.; Ohashi, Y.; Kamiguchi, K.; Iwata, S.; Hirai, H.; Morimoto, C. Tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates by focal adhesion kinase. A putative mechanism for the integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 29083–29090. [CrossRef] [PubMed]
162. Schlaepfer, D.D.; Jones, K.C.; Hunter, T. Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: Summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 2571–2585. [CrossRef] [PubMed]

163. Garces, C.A.; Kurenova, E.V.; Golubovskaya, V.M.; Cance, W.G. Vascular endothelial growth factor receptor-3 and focal adhesion kinase bind and suppress apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 1446–1454. [CrossRef] [PubMed]
164. Arold, S.T.; Hoellerer, M.K.; Noble, M.E. The structural basis of localization and signaling by the focal adhesion targeting domain. *Structure* **2002**, *10*, 319–327. [CrossRef]
165. Gao, G.; Prutzman, K.C.; King, M.L.; Scheswohl, D.M.; DeRose, E.F.; London, R.E.; Schaller, M.D.; Campbell, S.L. NMR solution structure of the focal adhesion targeting domain of focal adhesion kinase in complex with a paxillin LD peptide: Evidence for a two-site binding model. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 8441–8451. [CrossRef] [PubMed]
166. Hayashi, I.; Vuori, K.; Liddington, R.C. The focal adhesion targeting (FAT) region of focal adhesion kinase is a four-helix bundle that binds paxillin. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 101–106. [CrossRef] [PubMed]
167. Lawson, C.; Lim, S.T.; Uryu, S.; Chen, X.L.; Calderwood, D.A.; Schlaepfer, D.D. FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility. *J. Cell Biol.* **2012**, *196*, 223–232. [CrossRef] [PubMed]
168. Hagel, M.; George, E.L.; Kim, A.; Tamimi, R.; Opitz, S.L.; Turner, C.E.; Imamoto, A.; Thomas, S.M. The adaptor protein paxillin is essential for normal development in the mouse and is a critical transducer of fibronectin signaling. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 901–915. [CrossRef] [PubMed]
169. Scheswohl, D.M.; Harrell, J.R.; Rajfur, Z.; Gao, G.; Campbell, S.L.; Schaller, M.D. Multiple paxillin binding sites regulate FAK function. *J. Mol. Signal.* **2008**, *3*, 1. [CrossRef] [PubMed]
170. Nishiya, N.; Tachibana, K.; Shibanuma, M.; Mashimo, J.I.; Nose, K. Hic-5-reduced cell spreading on fibronectin: Competitive effects between paxillin and Hic-5 through interaction with focal adhesion kinase. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 5332–5345. [CrossRef] [PubMed]
171. Li, G.; Du, X.; Vass, W.C.; Papageorge, A.G.; Lowy, D.R.; Qian, X. Full activity of the deleted in liver cancer 1 (DLC1) tumor suppressor depends on an LD-like motif that binds talin and focal adhesion kinase (FAK). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 17129–17134. [CrossRef] [PubMed]
172. Wei, J.F.; Wei, L.; Zhou, X.; Lu, Z.Y.; Francis, K.; Hu, X.Y.; Liu, Y.; Xiong, W.C.; Zhang, X.; Banik, N.L.; et al. Formation of Kv2.1-FAK complex as a mechanism of FAK activation, cell polarization and enhanced motility. *J. Cell. Physiol.* **2008**, *217*, 544–557. [CrossRef] [PubMed]
173. Petridou, N.I.; Skourides, P.A. FAK transduces extracellular forces that orient the mitotic spindle and control tissue morphogenesis. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5240. [CrossRef] [PubMed]
174. Katz, B.Z.; Romer, L.; Miyamoto, S.; Volberg, T.; Matsumoto, K.; Cukierman, E.; Geiger, B.; Yamada, K.M. Targeting membrane-localized focal adhesion kinase to focal adhesions: Roles of tyrosine phosphorylation and SRC family kinases. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 29115–29120. [CrossRef] [PubMed]
175. Kadare, G.; Gervasi, N.; Brami-Cherrier, K.; Blockus, H.; El Messari, S.; Arold, S.T.; Girault, J.A. Conformational dynamics of the focal adhesion targeting domain control specific functions of focal adhesion kinase in cells. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 478–491. [CrossRef] [PubMed]
176. Jiang, X.; Sinnett-Smith, J.; Rozengurt, E. Differential FAK phosphorylation at Ser-910, Ser-843 and Tyr-397 induced by angiotensin, I.I.; LPA and EGF in intestinal epithelial cells. *Cell. Signal.* **2007**, *19*, 1000–1010. [CrossRef] [PubMed]
177. Zheng, Y.; Xia, Y.; Hawke, D.; Halle, M.; Tremblay, M.L.; Gao, X.; Zhou, X.Z.; Aldape, K.; Cobb, M.H.; Xie, K.; et al. FAK phosphorylation by ERK primes ras-induced tyrosine dephosphorylation of FAK mediated by PIN1 and PTP-PEST. *Mol. Cell* **2009**, *35*, 11–25. [CrossRef] [PubMed]
178. Zhai, J.; Lin, H.; Nie, Z.; Wu, J.; Canete-Soler, R.; Schlaepfer, W.W.; Schlaepfer, D.D. Direct interaction of focal adhesion kinase with p190RhoGEF. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 24865–24873. [CrossRef] [PubMed]
179. Lee, J.; Jung, I.D.; Chang, W.K.; Park, C.G.; Cho, D.Y.; Shin, E.Y.; Seo, D.W.; Kim, Y.K.; Lee, H.W.; Han, J.W.; et al. P85 beta-PIX is required for cell motility through phosphorylations of focal adhesion kinase and p38 MAP kinase. *Exp. Cell Res.* **2005**, *307*, 315–328. [CrossRef] [PubMed]
180. Brunton, V.G.; Avizienyte, E.; Fincham, V.J.; Serrels, B.; Metcalf, C.A., 3rd; Sawyer, T.K.; Frame, M.C. Identification of Src-specific phosphorylation site on focal adhesion kinase: Dissection of the role of Src SH2 and catalytic functions and their consequences for tumor cell behavior. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 1335–1342. [CrossRef] [PubMed]
181. Mitra, S.K.; Mikolon, D.; Molina, J.E.; Hsia, D.A.; Hanson, D.A.; Chi, A.; Lim, S.T.; Bernard-Trifilo, J.A.; Ilic, D.; Stupack, D.G.; et al. Intrinsic FAK activity and Y925 phosphorylation facilitate an angiogenic switch in tumors. *Oncogene* **2006**, *25*, 5969–5984. [CrossRef] [PubMed]

182. Cheng, S.Y.; Sun, G.; Schlaepfer, D.D.; Pallen, C.J. Grb2 promotes integrin-induced focal adhesion kinase (FAK) autophosphorylation and directs the phosphorylation of protein tyrosine phosphatase alpha by the Src-FAK kinase complex. *Mol. Cell. Biol.* **2014**, *34*, 348–361. [CrossRef] [PubMed]
183. Hunger-Glaser, I.; Salazar, E.P.; Sinnett-Smith, J.; Rozengurt, E. Bombesin, lysophosphatidic acid and epidermal growth factor rapidly stimulate focal adhesion kinase phosphorylation at Ser-910: Requirement for ERK activation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 22631–22643. [CrossRef] [PubMed]
184. Zhao, Z.S.; Manser, E.; Loo, T.H.; Lim, L. Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 6354–6363. [CrossRef] [PubMed]
185. Ren, Y.; Yu, L.; Fan, J.; Rui, Z.; Hua, Z.; Zhang, Z.; Zhang, N.; Yin, G. Phosphorylation of GIT1 tyrosine 321 is required for association with FAK at focal adhesions and for PDGF-activated migration of osteoblasts. *Mol. Cell. Biochem.* **2012**, *365*, 109–118. [CrossRef] [PubMed]
186. Yu, J.A.; Deakin, N.O.; Turner, C.E. Paxillin-kinase-linker tyrosine phosphorylation regulates directional cell migration. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 4706–4719. [CrossRef] [PubMed]
187. Schoenherr, C.; Serrels, B.; Proby, C.; Cunningham, D.L.; Findlay, J.E.; Baillie, G.S.; Heath, J.K.; Frame, M.C. Eps8 controls Src- and FAK-dependent phenotypes in squamous carcinoma cells. *J. Cell Sci.* **2014**, *127*, 5303–5316. [CrossRef] [PubMed]
188. Shen, Y.; Schaller, M.D. Focal adhesion targeting: The critical determinant of FAK regulation and substrate phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* **1999**, *10*, 2507–2518. [CrossRef] [PubMed]
189. Schaller, M.D.; Borgman, C.A.; Parsons, J.T. Autonomous expression of a noncatalytic domain of the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125FAK. *Mol. Cell. Biol.* **1993**, *13*, 785–791. [CrossRef] [PubMed]
190. Gu, J.; Tamura, M.; Pankov, R.; Danen, E.H.; Takino, T.; Matsumoto, K.; Yamada, K.M. Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. *J. Cell. Biol.* **1999**, *146*, 389–403. [CrossRef] [PubMed]
191. Sieg, D.J.; Hauck, C.R.; Schlaepfer, D.D. Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J. Cell Sci.* **1999**, *112*, 2677–2691. [PubMed]
192. Zak, T.J.; Koshman, Y.E.; Samarel, A.M.; Robia, S.L. Regulation of Focal Adhesion Kinase through a Direct Interaction with an Endogenous Inhibitor. *Biochemistry* **2017**, *56*, 4722–4731. [CrossRef] [PubMed]
193. Deramaudt, T.B.; Dujardin, D.; Noulet, F.; Martin, S.; Vauchelles, R.; Takeda, K.; Ronde, P. Altering FAK-paxillin interactions reduces adhesion, migration and invasion processes. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e92059. [CrossRef] [PubMed]
194. Kurenova, E.V.; Hunt, D.L.; He, D.; Magis, A.T.; Ostrov, D.A.; Cance, W.G. Small molecule chloropyramine hydrochloride (C4) targets the binding site of focal adhesion kinase and vascular endothelial growth factor receptor 3 and suppresses breast cancer growth in vivo. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4716–4724. [CrossRef] [PubMed]
195. Gogate, P.N.; Ethirajan, M.; Kurenova, E.V.; Magis, A.T.; Pandey, R.K.; Cance, W.G. Design, synthesis and biological evaluation of novel FAK scaffold inhibitors targeting the FAK-VEGFR3 protein-protein interaction. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *80*, 154–166. [CrossRef] [PubMed]

© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

CIBLER L'INTERACTION FAK-PAXILLINE INHIBE L'INVASION ET LA MIGRATION DES CELLULES DE MELANOME METASTATIQUE

A. Contexte de la recherche

A mon arrivée au laboratoire en 2017, un lien avait été établi entre l'activité kinase de FAK et la migration cellulaire. Il avait notamment été démontré que les sites tyrosines phosphorylables de FAK régulent le *turn-over* des FAs. En exprimant une forme non phosphorylable de FAK (Y397F) dans des astrocytomes humains, il avait été rapporté que le temps de résidence de la protéine dans les FAs est réduit à l'origine d'une diminution du désassemblage des structures d'adhérences et de la migration cellulaire (Hamadi et *al.,* 2005). En effet, la phosphorylation en Y397 crée un site de haute affinité pour la protéine Src, qui, en se liant à FAK, induit la formation d'un complexe FAK-Src capable de recruter et de phosphoryler de nombreuses protéines pour promouvoir la migration cellulaire.

Les travaux qui ont suivi ont mis en évidence dans une lignée cellulaire de mélanome murin (B16F10) que la protéine FAK régule la balance entre migration et dégradation en contrôlant la localisation de la protéine Src entre les FAs et les invadopodes (Kolli-Bouhafs et *al.,* 2014). La délétion de la protéine à l'aide d'un siRNA ou l'expression d'une forme non phosphorylable de FAK (Y397F) inhibe l'interaction FAK-Src à l'origine d'une inhibition de la dynamique des FAs et de la migration cellulaire mais s'accompagne également d'une surprenante augmentation de l'invasion tumorale. En effet, dans les cellules déficientes en FAK, la protéine Src est recrutée et activée dans les invadopodes afin de favoriser la phosphorylation de TKS5 à l'origine d'une augmentation de l'activité protéolytique des cellules cancéreuses. Bien que la migration cellulaire soit indispensable à l'invasion des cellules cancéreuses, ces résultats ont démontré que la dégradation accrue des cellules cancéreuses déficientes en FAK est suffisante pour une invasion efficace à travers une matrice de matrigel. Ces observations sont néanmoins surprenantes étant donné que les petites molécules analogues de l'ATP ciblant FAK ont démontré certains avantages en préclinique en inhibant la trans-autophosphorylation de la protéine et donc le niveau de phosphorylation en Y397 (Roberts et *al.,* 2008 ; Tanjoni et *al.,* 2010 ; Zhang et *al.,* 2014). Bien qu'aucune étude n'ait encore démontré si ces inhibiteurs présentent des effets inattendus comparables à ce que l'on a observé, les molécules n'ont pas encore fait leurs preuves en phases III d'essais cliniques comme décrit préalablement dans la

section D-V-1 (Golubovskaya, 2014 ; Sulzmaier et *al.,* 2014) et plusieurs mécanismes de résistances ont d'ores et déjà été observés (Marlowe et *al.,* 2016).

D'un autre côté, d'autres travaux du laboratoire avaient rapporté que l'expression d'un double mutant de FAK incapable de lier la paxilline (FAK 936E 998E) inhibait la migration et la dégradation des fibroblastes transformés par Src. En effet, l'inhibition de l'interaction FAK-paxilline conduisait à la délocalisation de FAK dans le cytoplasme à l'origine d'une inhibition du recrutement et de l'activation des protéines aux FAs mais s'accompagnait également d'une préservation du complexe FAK-Src, prévenant ainsi son recrutement par d'autres protéines. L'utilisation d'inhibiteur d'interaction protéine-protéine pouvait donc être une stratégie alternative aux inhibiteurs du domaine kinase.

A. Objectif du travail

Mes travaux visaient donc à confirmer le rôle de FAK dans l'invasion tumorale sur un modèle *in vitro* de mélanome humain représentant le stade primaire et le stade métastatique du cancer et ce dans le but d'identifier la pertinence thérapeutique d'une inhibition de FAK. Pour ce faire, nous avons essayé de répondre aux questions suivantes :

- FAK régule-t-elle la balance entre migration et dégradation de la MEC dans les cellules de mélanome humain ?
- Quel est l'effet d'une inhibition de l'activité tyrosine kinase de FAK à l'aide d'une petite molécule sur la migration et la dégradation de la MEC du mélanome ?
- Quel est l'effet d'une inhibition de l'interaction FAK-paxilline par mutagénèse dirigée ou à l'aide d'un peptide sur la migration et la dégradation de la MEC du mélanome ?

B. Principaux résultats

Pour la première fois, nous avons rapporté que l'inhibition du domaine kinase de FAK avec un inhibiteur développé en pré-clinique, le PF-573228, inhibe la migration cellulaire mais s'accompagne également d'une augmentation de la dégradation des cellules de mélanome métastatique. Ces résultats ont également été observés en diminuant l'expression de la protéine FAK à l'aide d'un siRNA confirmant ainsi les précédentes études menées par le laboratoire sur le mélanome métastatique murin (Kolli-Bouhafs et *al.,* 2014) et par d'autres équipes sur des modèles de cancer du sein humain et d'adénocarcinome mammaire de rat (Bowden et *al.,* 2006 ; Chan et *al.,* 2009b ; Genna et *al*., 2018). De manière intéressante, nous avons observé que cette fonction anti-invasive de FAK est dépendante du stade de malignité puisque l'inhibition de

FAK dans les mélanome *in situ* n'affecte ni le nombre, ni l'activité des invadopodes. De plus, à l'aide d'un mutant de FAK muté sur son résidu Y397 (FAK Y397F), nous avons mis en évidence que l'absence de phosphorylation sur ce motif tyrosine est responsable de l'augmentation de la dégradation de la MEC. Ainsi, afin d'identifier des stratégies alternatives aux inhibiteurs du domaine kinase de FAK capables de prévenir les fonctions pro-migratoires de la protéine et d'inhiber la dégradation de la MEC par les invadopodes en préservant l'activité en Y397 de FAK, nous avons envisagé d'utiliser un IIPP. En traitant les cellules avec un mutant de FAK (FAK 936E 998E) incapable de lier paxilline ou avec un peptide mimant les motifs LD2-LD4 de la paxilline nécessaire à son interaction avec FAK, nous avons démontré que cibler l'interaction FAK-paxilline conduit à la délocalisation cytoplasmique de la protéine FAK tout en préservant sa phosphorylation en Y397. Dans les cellules de mélanome métastatique, nous avons ainsi observé que l'inhibition de l'interaction FAK-paxilline inhibe à la fois la migration et l'activité protéolytique des cellules démontrant la preuve de concept de cette stratégie thérapeutique.

Targeting FAK-paxillin interaction inhibit invasion and migration of metastatic melanoma cells

Antoine Mousson[†], Marlène Legrand[†], Tania Steffan[†], Romain Vauchelles[†], Philippe Carl[†], Dominique Desplancq*, Jean-Pierre Gies[†], Guy Zuber*, Jan De Mey[†], Denis Dujardin[†], Emilie Sick[†] and Philippe Rondé[†]

[†] Université de Strasbourg, CNRS UMR7021, Migration, invasion and microenvironnement, Faculté de Pharmacie, Illkirch, France.

[*] Université de Strasbourg, CNRS UMR7242, Intervention Chémobiologique, ESBS, Illkirch, France.

Abstract

The nonreceptor tyrosine kinase FAK was reported to promote cancer metastasis by regulating many cellular processes, including migration and invasion of tumor cells driven by the formation of focal adhesions (FAs) and invadopodia. In this study, we investigated the benefice of FAK inhibition on these processes. We demonstrated that inhibiting FAK with either siRNA or a small inhibitor targeting the kinase domain led to increase invadopodia formation and degradation but also impaired migration of human metastatic melanoma cells. Using a mutation of FAK at Y397, we confirmed that this unexpected increased of invadopodia activity is caused by the lack of phosphorylation at this residue. To preserve phosphorylation at Y397 but also to inhibit pro-migratory functions of FAK, we found that altering FAK-paxillin interaction, with either FAT FAK mutation or a competitive inhibitor peptide drastically reduces cell migration and matrix degradation by preserving FAK activity in the cytoplasm. In conclusion, our data show that targeting FAK/Paxillin interactions could be of potential therapeutic strategy to prevent metastasis formation and replace inhibitors of FAK kinase activity which display unexpected effects

Introduction

Melanoma is a very aggressive form of skin cancer which account for more than 80% of skin cancer-related deaths. The prognosis in melanoma is directly proportionate to the depth of the neoplasm, and patients with spreading melanoma have a very poor prognosis with a 5-year survival rate less than 5%. The spreading of melanoma is a multistep process which involves several genetic alterations (Shain & Bastian, 2016). In melanoma as in many invasive epithelial cancers, such as head and neck, breast or prostate, cancer cells acquire the ability to breach basement membrane using supramolecular complexes called invadopodia. Invadopodia are sub-cortical protrusions that localize matrix-degrading activity to cell-substrate contact points and represent major hubs where many signalling pathways converge (Hoshino et al., 2013). Invadopodia are composed of an actin-rich core which include actin activators, nucleators and regulators that is surrounded by adhesion, scaffolding and signaling proteins (Murphy & Courtneidge, 2011). These structures are enriched in proteolytic enzymes such as matrix metalloproteinases (MMPs), which mediate extracellular matrix (ECM) degradation. Indeed, MMP are upregulated in invasive melanoma and there is extensive evidence that they have a role in promoting the dissemination of melanoma (Hofmann et al., 2000). Although significant efforts have been made to characterize the mechanism of invadopodia formation, the sequence of events that allows the correct assembly and regulation of inavadopodia components, especially in the context of melanoma progression, remain poorly understood. Indeed, one of the key questions that remain to be solved concern the maturation step which regulate the switch between immature invadopodia devoid of invasive properties to fully mature invadopodia able to degrade the ECM. Several proteins or signalling pathways have been already implicated in this process such as Tks5 (Sharma et al., 2013), profilin 1 (Valenzuela-Iglesias et al., 2015), talin2 (Baster et al., 2020), Mena^{IV} (Weidmann et al., 2016), protrudin (Pedersen et al., 2020) or the CCL7/CCR3 axis (Qi et al., 2020). In melanoma the transition from *in-situ* melanoma to invasive melanoma seems to be correlated with direct contact of melanoma cells with the epidermal layer thereby triggering Noth signaling pathway (Golan et al., 2015). Of note, inhibition of Notch signalling or suppression of cell-cell contact reduced Mena^{IV} expression in tumour cells (Pignatelli et al., 2016) raising the possibility that *in-situ* melanoma display already invadopodia structure that mature during their transition into invasive melanoma.

Tumoral cell invasion is a highly complex process that requires not only cell degrading capabilities to breach the basement membrane and enter the circulation but also cell adhesion

and migration to the environing substratum. In mesenchymal-like cells, cells formed focal adhesion (FA) by clustering, at sites of integrin engagement to the ECM, structural, scaffolding and signaling proteins. Among them, the Focal Adhesion Kinase (FAK) is a crucial signaling protein that integrates signals from integrins to the actin filaments thereby controlling FA turn-over which tune the migration speed (Giannone et al., 2002; Webb et al., 2004). This control is made in part by phosphorylation and dephosphorylation processes (Deramaud et al., 2011; Hamadi et al., 2005). Structurally, FAK is a 125kDa protein that contains an N-terminal FERM domain, a central kinase domain and a C-terminal domain which contains the Focal Adhesion Targeting (FAT) site (Tapial Martinez et al., 2020). The phosphorylation of FAK at Y397 creates a binding site for Src, which can phosphorylate other tyrosines on the FAK sequence thus creating new binding sites for SH2 domain-containing proteins. The activated FAK/Src complex phosphorylates also numerous downstream targets with roles in cell survival, proliferation, migration, and invasion. The precise role of FAK in invasion has been subject to controversy. The current consensus is that FAK does not localize to invadopodia but seems to regulate their formation and activity from a distance by controlling the localization of the Src kinase. Indeed, depletion of FAK in melanoma and breast cancer cells releases Src from FA thereby activating invadopodia targets and promoting invadopodia activity (Chan et al., 2009; Genna et al., 2018; Kolli-Bouhafs et al., 2014). Whether FAK inhibitors, currently under development, display similar unexpected effects remain to be determined. Nevertheless, in melanoma, it was reported that FAK promotes an aggressive phenotype which maybe correlate with its role in promoting cell migration (Hess et al., 2005).

With the panel of FAK downstream signalling effectors it is not surprising that this protein is overexpressed in many tumors and is associated with tumor growth, invasion, and resistance to treatment. Thus, the development of FAK antagonists, as anti-cancer therapy, led to several small inhibitors of FAK kinase function. For example, PF-573,228 inhibited FAK phosphorylation on Tyr397 and reduced both chemotactic and haptotactic migration concomitant with the inhibition of FA turnover (Slack-Davis et al., 2007) FAK kinase inhibitors that are currently undergoing clinical trials are almost all small ATP-competitive molecules which therefore inhibit the *trans*-autophosphorylation of FAK at tyr397 leading to altered Src recruitment. Nonetheless, besides its kinase function, FAK possess also scaffolding functions that are highly relevant in cancer signalling. Indeed, as a multi-domain protein, FAK can act as an assembly platform for protein complexes making bridges between proteins. These complexes and bridges may serve as target for the development of new FAK

inhibitors based on protein-protein interactions. Protein-protein interaction inhibitors (PPIIs) are today attractive novel tool for cancer therapy and several PPIIs were already described for FAK targeting either the p53 binding site on FERM domain (Golubovskaya et al., 2013) or the VEGFR-3 binding site on the FAT domain (Kurenova et al., 2009). Some of the compound developed on these targets showed interesting anti-tumour activity in xenograft mouse models.

In this study, we demonstrate that inhibiting FAK with either siRNA or a small inhibitor targeting the kinase domain while decreasing melanoma cell migration, led to increased invadopodia activity in metastatic melanoma but not in in-situ melanoma. Using mutation of FAK at Tyr397, a binding site for Src, we confirmed that this mutation while reducing cell migration releases a pool of active Src that mediate enhanced invadopodia activity. Searching for alternative FAK inhibition strategies that preserve FAK/Src binding capabilities we found that altering FAK/paxillin interaction, with either FAK mutation at its paxillin binding site or a peptide that disturb FAK-paxillin interaction, drastically reduces cell migration and matrix degradation. Taken together, our data provide new horizon for the development and use of FAK PPIIs.

Material and methods

Antibodies

For immunofluorescence, anti-FAK (610088) was obtained from BD; anti-cortactin (05-180) was obtained from Millipore; anti-phospho-Y118 paxillin (44-722G), anti-paxillin (AHO0492) and anti-phospho-Y397 FAK (44-625G) were obtained from Invitrogen. phalloidin 568 (A12380), phalloidin 647 (A22287) and Alexa Fluor–conjugated secondary antibodies were obtained from Molecular Probes.

For Western blotting and co-immunoprecipitation, anti-phospho-Y397 FAK (44-625G), anti-paxillin (AHO0492) was obtained from Invitrogen; anti-eGFP (66002-1-IG) was obtained from Proteintech; anti-FAK (610088) was obtained from BD; anti-b-actin (MA1115) was obtained from Boster; HRP conjugated secondary antibodies was obtained from Biorad.

Cells culture

Normal human primary epidermal melanocytes, from Lonza, were cultivated in MGM-4 medium (PS-200-041, ATCC). Primary human melanoma cell lines, originally established by the Wistar Institute (Philadelphia), were purchased from Rockland. Cells were cultured in MCDB153/L-15 medium (M7403, Sigma; 11415064, Invitrogen) supplemented with 2% foetal bovine serum, 1,68 mM $CaCl_2$ and 1% penicillin/streptomycin. A375 melanoma cell line, from ATCC, was maintained in DMEM (11960044, Lonza) supplemented with 10% foetal bovine serum, 1mM L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin antibiotics.

siRNA transfections and cells treatments

Melanoma cells were plated at $2.5.10^5$ cells in six well plates and incubated 24h at 37°C and 5% CO_2 in an incubator. Cells were then transfected with 50pmol of siRNA for 5µL of lipofectamine 2000 (11668019, Invitrogen) in 500µL Opti-MEM (31985062, Gibco). Stealth siRNA oligonucleotides (Dharmacon) used were control siRNA 5'-GAAUCUCAUCUAUUU CGUAACGGAC-3' and FAK siRNA 5'-UGACAGAUACCUAGCAUCUAGCAAA-3'. These sequences have already been described to target the 5'-UTR regions of FAK in murine melanoma cells B16F10 (Kolli-Bouhafs et al., 2014). Transfected cells were incubated for 24h at 37°C before use.

For 3D collagen matrix assay, cells were treated with GM6001 (S7157, Selleckchem) for 24h at 10µM to inhibit metalloprotease activity. For Western blot and matrix degradation assay, cells were treated with PF-573228 (S2013, Selleckchem) for 12h at 1µM to inhibit

FAK activity. For wound healing assay, melanoma cells were treated with mitomycin C (S8146, Selleckchem) for 2h at 10µg/mL before the scratch to inhibit cells replication and with PF-573228 at 1µM.

Cells transfections

FAK-WT-GFP, FAK-Y397F-GFP (kinase inactive mutant) and FAK-936 998E-GFP (paxillin non-binding mutant) were described in Deramaudt et al., (2014). LD2-LD4-GFP sequence of paxillin (aa 136–296) (FAK binding domain) was inserted into the pEGFP–C1 plasmid (Clontech), creating a fusion of enhanced GFP (EGFP) to the N terminus of paxillin as described in Robertson & Ostergaard (2011).

Melanoma cells were co-transfected with siRNA and 4 µg FAK WT or FAK mutant DNA or with LD2-LD4-GFP DNA 4 µg using lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the manufacturer instructions. Transfected cells were incubated for 24h at 37°C before use.

3D collagen matrix assay

The invasion assay was adapted from Sadok et al., (2015). Cells lines labelled with Hoechst 33342 at 0,1 µg/mL were suspended in 3mg/mL of serum free solution of collagen Bovine Type I neutralized (5005-B, Advanced biomatrix) at 3.10^5cells/mL. 600µL were dispensed into black 24 well plates (058062, Dutscher) coated with bovine serum albumin. Plated were centrifuged at 1500 rpm at 4°C for 5min and incubated in a 37°C 5% CO_2 incubator for 3 hours. Once collagen had polymerized, medium supplemented with 10% foetal bovine serum, 100ng/mL EGF and with either drugs was added on top of the collagen. After 24h of incubation at 37°C in 5% CO_2 incubator, cells were observed using Leica confocal microscope TSC SPE (x20 HCX Pl Apo 0.7 NA objective, Wetzlar, Germany) and z-stacks were acquired with a step of 1 µm in four fields by sample. Nuclear localization was quantified by Imaris at each plane. The invasion index was calculated by reporting the number of cells above 10µM on the total number of cells by field.

2,5D invadopodia assay

The 2.5D invadopodia assay was adapted from Schoumacher et al., (2010). 12-well Transwell inserts with 1µm diameter pores (MCRP12H48, Millipore) were coated with 250µL of mix 80:20 of 3mg/mL collagen Bovine Type I neutralized (5005-B, Advanced biomatrix) and 0,5mg/mL fluorescent-labelled-FITC gelatine. After 1h of incubation at 4°C, 150µL was then removed and inserts were put at 37°C in 5% CO_2 incubator for 30min. Once

matrix had polymerized, medium free serum was added in the upper side of the insert and medium supplemented with 10% foetal bovine serum, 40ng/mL EGF was used as chemoattractant. Melanoma cells were added in the upper side of the insert at 5.10^4cells and incubated 24h at 37°C in 5% CO_2 incubator. After incubation, inserts were washed with PBS and fixed as described in "Matrix degradation assay and immunofluorescence" section. Cells were imaged using Leica confocal microscope TSC SPE (x63 HCX Pl Apo 1.40 NA objective, Wetzlar, Germany). 3D images were reconstructed using ImageJ or Imaris.

Matrix degradation assay and immunofluorescence

Ibidi dish 35mm with glass bottom (81158, Ibidi) were coated with fluorescent-labelled-FITC gelatine or Cy3 gelatine as described in Artym et al. (2009). To assess the ability to form invadopodia and degrade extracellular matrix, $3.5.10^4$ melanoma cells previously starved, were plated on fluorescent gelatine and incubated at 37°C for 24h in medium supplemented with 10% foetal bovine serum. Cells were then fixed using 4% paraformaldehyde solution for 10min and permeabilized using triton-X-100 at 0,1% for 5min. Unspecific sites were blocked by incubating cells in 2% of bovine serum albumin at room temperature. Cells were then labelled for 1h with anti-cortactin (1/250), anti-phospho-Y397 FAK (1/100), anti-FAK (1/250), anti-phospho-Y118 paxillin (1/250) or anti-paxillin (1/250). After three washes with PBS, cells were incubated with Alexa-488-conjugated goat anti-rabbit (1/1000), Alexa-647-conjugated goat anti-rabbit (1/1000), Alexa-405-conjugated goat anti-mouse (1/1000), Alexa-647-conjugated goat anti-mouse (1/1000), Alexa-568-conjugated phalloidin (1/250) or Alexa-647-conjugated phalloidin (1/250) for 1h. Then cells were washed 3 times and mounted in Prolong Gold mounting media (Invitrogen). Cells were imaged using Leica confocal microscope TSC SPE (x63 HCX Pl Apo 1.40 NA or x20 HCX Pl Apo 0.7 NA objective, Wetzlar, Germany). Invadopodia were identified as actin and cortactin rich punctate structure. Areas of degradation were identified as "black holes" within the fluorescent gelatine. Invadopodia and areas of degradations were quantified using ImageJ software. Degradation areas measurements were based on cells displaying degration activity, and frequency of degradation was based on randomly selected cells.

Wound healing

Melanoma cells were seeded in 12 well plates containing medium supplemented with 10% fœtal bovin serum and transfected with siCtrl or siFAK as described before. After 24h, confluent cell layers were treated with mitomycin C and with PF-573228 as described before

and then wounded with a pipet tip. Images of cell migration were acquired using a Leica DMIRE2 microscope (x10 N PLAN 0.25 NA objective) equipped with a 37°C 5% CO2 control system (Life Imaging Services) with a Leica DC350FX CCD camera piloted by the FW4000 software (1 image every 30 min during 24h).

Co-immunoprecipitation and Western Blot

For co-immunoprecipitation, A375 melanoma cells were seeded in 90mm petri dishes and co-transfected as previously described with siFAK, siFAK and FAK-GFP or siFAK and FAKI936/I998-GFP. After 48h, cells were washed twice with ice cold PBS and lysed with modified RIPA buffer (137mM NaCl, 20mM Tris, pH 8.0, 10% glycerol, 1% IGEPAL CA-630, 3mM Na3Vo4) complemented with protease and phosphatase inhibitor cocktail (78441, Invitrogen). Lysates were centrifuged at 15,000xg for 15min at 4°C. Then, 500µg of cell lysates were then incubated with specific anti-FAK antibody (1/100) for 3h at 4°C with continuous shaking. Protein G sepharose beads (GE Healthcare) were then added for overnight incubation. Beads were then washed 3 times with ice-cold Ripa buffer and resuspended in Laemmli buffer.

For Western Blot, Total cell proteins were obtained by lysing cells for 15min at 4°C in RIPA buffer (8990, Invitrogen) supplemented with a protease and phosphatase inhibitor cocktail (78441, Invitrogen). Lysates were centrifuged at 15,000xg for 15min at 4°C. Protein concentration was determined using a Kit DC Protein Assay (BioRad, Hercules, CA, USA). Then, 20mg of proteins were suspended in Leammli buffer and loaded on 8% polyacrylamide gel, then transferred to a PVDF membrane. Non-specific sites were blocked for 1 hour at room temperature using 5% BSA in TBS-T (pH 7.4, 10mM Tris, 150mM NaCl and 0.1% Tween 20). After that, membranes were incubated with primary antibody diluted in TBS-T containing 5% BSA or 5% non-fat milk overnight at 4°C. After washing membranes three times in TBS-T for 5min, specific horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies were incubated with membranes for 1h at room temperature. Signals were detected using en ECLplus kit (170-5061, Biorad). Bands were quantified using ImageQuantTL (GE Healthcare).

Statistical analysis

Statistical significance was calculated using an unpaired, two-tailed Student's *t* test. Values were considered statistically significant if the p-value was <0.05. For all figures: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Error bars represent SEM.

Results

Aggressivity of melanoma cells is associated with invadopodia–mediated proteolytic potential

Gaining invasiveness is one of the first and most critical steps of metastasis dissemination. Prognosis for patients with melanoma significantly worsens with deeper levels of invasion (Gaggioli & Sahai, 2007). To get insight into the mechanism driving invasion we tested a panel of melanoma cell lines for their ability to invade in a 3D collagen matrix. *In-situ* melanoma cells lines showed a progression similar to normal human melanocyte (HEM) whereas malignant melanoma cells lines progressed more efficiently into the collagen matrix **(Figure 1A)**. Indeed, the index of invasion of metastatic melanoma cells was increased compare to the primary melanoma suggesting an improvement of the invasive properties during the melanoma progression **(Figure 1B)**. Efficient invasion potential was due to an increase in metalloprotease activity as demonstrated upon treatment of melanoma cells with the metalloprotease inhibitor GM6001 that completely abolished the ability of metastatic melanoma cells to migrate in the 3D collagen matrix **(Figure 1C).** Taken together, these data suggest that proteolytic activity regulate potential aggressivity of melanoma cells lines.

Invadopodia are specialized cellular structures present in cells with pathological invasive behaviours (Wolf & Friedl, 2006). To elucidate the mechanism implicated in the melanoma cells invasive potential we first quantified the number of invadopodia in our cell lines. Surprising, invadopodia, identified as actin and cortactin rich punctate structures (Artym et al., 2006), were present in all melanoma cell lines including the primary melanoma **(Figure 2A)**. Quantifying the number of invadopodia per cell revealed no correlation with their respective invasive potential in the collagen matrix **(Figure 2B).** To test whether these actin/cortactin rich structures are effectively localized into ventral protrusions, *in-situ* and malignant melanoma cell line were plated on 1µm transwell filters overlaid with fluorescent collagen, allowing protrusion to form inside the wells of the device. 3D reconstruction of confocal images indicated the presence of ventral protrusions containing actin and cortactin in both *in-situ* and malignant cell lines **(Figure 2C)** thus indicating that *in-situ* melanoma cells are able to assemble invadopodia precursor. Next, we analyzed whether invadopodia precursor mature into fully active invadopodia by acquiring matrix degrading capabilities. For this purpose, cells were plated on fluorescent gelatin as substrate and the area of degradation were quantified **(Figure 2D)**. Our results showed that all metastasis cell lines were able to degrade the fluorescent gelatin in opposition to the *in-situ* melanoma cells studied **(Figure**

2E). Furthermore, degradation frequency based on the observation of random fields showed that degradation is absent in *in-situ* cell lines in clear opposition to the metastasis cells which displayed a degradation frequency from 20% to 40.1% **(Figure 2F).** Taken together, these results support the idea that invadopodia activity regulate aggressivity of melanoma cells.

FAK expression is increased but not correlated with melanoma state

FAK has been described to control many aspects of the metastatic process including cell migration and invasion (Sulzmaier et al., 2014). Moreover, FAK overexpression have been reported in a variety of human cancers (Cance et al., 2000; Sood et al., 2004), therefore, to investigate the role of FAK in melanoma progression we first, compared FAK expression level in normal human epidermal melanocytes (HEM) and a panel of *in-situ* and malignant human melanoma cells lines **(Figure 3A)**. We observed that FAK was overexpressed in the majority of melanoma cells compared to normal human epidermal melanocyte while no correlation between the level of FAK and the grade of the tumour was observed **(Figure 3B)**, in accordance with clinical studies from Ricker et al. from the Oncomine cancer data set. As FAK localization greatly affect its functions (Deramaud et al., 2014; Kaneda et al., 2008) we further compared its subcellular localization by immunofluorescence in our different cell models **(Figure 3C)**. We noticed an important accumulation of FAK at focal adhesions identified by phospo-Y118-paxillin and a weaker FAK staining in the cytoplasm. Quantification revealed that FAK enrichment a FAs, identified by P-paxillin staining, was increased by 66% in metastatic melanoma cells **(Figure 3D)**. However, there was no correlation between total FAK expression level or FAK accumulation at FAs and the migration or the degradation properties of melanoma cells previously described.

FAK inhibition reduces migration but increases proteolytic activity of invasive melanoma cells

To investigate the role of FAK during invasion, we compared the ability of metastasis and *in-situ* melanoma cell lines to degrade extracellular matrix.with our without treatment with either an siRNA targeting the 5'-UTR region of FAK (Kolli-Bouhafs et al., 2014) or the selective FAK tyrosine kinase inhibitor PF-573228 (Slack-Davis et al., 2007). Western blot analysis **(Figure 4A)** revealed that FAK knockdown efficiency reached 52 to 66% **(Figure 4B).** On the other hand, PF-573228, inhibited between 50 and 75% of FAK activity after 12hours of treatment at 1µM **(Figure 4C).** Surprising, FAK expression level was increased in WM1552C melanoma cell lines after treatment with PF-573228 **(Figure 4B)**. We next

investigated whether FAK depletion or inhibition affect melanoma cells migration using the wound healing assay. We observed that FAK depletion or inhibition reduced the migration speed of 30-50% compared to control conditions as already demonstrated in various cancers cell lines (Webb et al., 2004; Zaidel-Bar et al., 2003) **(Figure 4D-E).** These results confirmed that FAK expression is necessary for optimal melanoma cell migration independently of melanoma aggressivity. Interestingly, treatment with PF-573228 inhibited migration speed in all cell lines studied except WM1552C cells which is probably related to the upregulation of FAK in this cell line. As invadopodia activity is required for melanoma progression in 3D matrix, we further analysed the effect of FAK depletion or inhibition on invadopodia properties **(Figure 4F)**. Surprisingly, we show that knockdown of FAK in metastasis melanoma cells significantly increased the number of invadopodia per cells as well as the occurrence of matrix degradation compared to control condition **(Figure 4G-H)** confirming previous studies in breast cancer cells (Chan et al., 2009; Genna et al., 2018). Similar results were obtained in metastasis melanoma cells treated with the FAK kinase inhibitor PF-573228. However, FAK depletion or FAK inhibition with PF-573228 did not affect the number of invadopodia or their activity in *in-situ* melanoma cells **(Figure 4G-H)**. Altogether, these data suggest that kinase activity of FAK inhibit invadopodia formation and activity in higher aggressive stages of melanoma development.

Inhibiting FAK/Src interaction increases incadopodia activity

We and other have previously reported that FAK control the tyrosine phosphorylation balance between FAs and invadopodia by regulating Src localisation (Chan et al., 2009; Genna et al., 2018; Kolli-Bouhafs et al., 2014; Vitale et al., 2008). Thus, inhibiting FAK-Src interaction would tip the balance toward invadopodia and therefore have similar effect as FAK inhibition. FAK phosphorylation at Tyr397 creates a binding site for Src via its SH2 domain, therefore, to test this hypothesis we transfected A375 melanoma cells with FAK-Y397F-GFP, a non phosphorylable form of FAK in cells depleted for FAK. As expected, in siFAK-treated cells, FAK phosphorylation at Tyr397 is completely abolished (**Figure 5A-5B).** whereas this effect is rescued upon re-expression of FAK-WT-GFP but not FAK-Y397F-GFP. We next tested the functional effect of FAK-Y397F expression on invadopodia activity. As shown in **Figure 5C-E** FAK depletion increases invadopodia formation and activity whereas rescue with FAK-WT but not FAK-Y397F abolished this effect. This suggests that preserving the FAK-Src interaction via sustained FAK phosphorylation at Y397 would keep Src from activating downstream substrate at invadopodia.

Targeting FAK/Paxillin interaction, an alternative strategy to kinase inhibitors

We then reasoned that, to reduce melanoma aggressivity, a molecule targeting FAK should inhibit FAK function at FAs to reduce cell migration while preserving substantial phosphorylation at Tyr397 in order to prevent the release of active Src from FAs and thus FAK inhibition-mediated increased proteolytic activity. We have previously described that inhibiting FAK/paxillin interaction using the mutated form of FAK, FAK-I936/I998 reduces cell migration *in vitro* by a mechanism involving altered FAK localisation at FAs (Deramaudt et al., 2014). Of importance, expression of this mutant in FAK null cells, while leading to reduced phosphorylation of FAK targets, retained substantial phosphorylation at its Tyr397 residue. Therefore, we examined the effect of this mutant on invasion by cotransfecting A375 melanoma cells with FAK siRNA and either wild type FAK or FAK-I936/I998 GFP.

First, co-immunoprecipitation experiments were done to verify whether FAK mutation at I936/I998 disrupt FAK/paxillin interaction. As shown in **Figure 6A,** mutant FAK-I936/I998 was almost completely unable to precipitate paxillin compared to wild-type FAK in FAK depleted cells. In order to investigate the effects of I936/I998 mutations on FAK activation, western blot was performed to measure the state of FAK phosphorylation at its Y397 residue. No significant difference in FAK phosphorylation on this site was observed between FAK-I936/I998-GFP and FAK-WT-GFP transfected cells **(Figure 6B)**. To visualize if these mutations alter FAK localization at FAs immunofluorescence labelling of A375 melanoma cells expressing FAK-WT-GFP or FAK-I936/I998-GFP in FAK depleted cells was performed. While FAs were clearly identified by paxillin staining, the FAK mutant contrarily to FAK-WT is mainly localized into the cytoplasm and not at FAs as shown by the distribution of GFP signal **(Figure 6C).** Moreover, analysing P-Y397 FAK staining, we observed an important accumulation of active FAK at FAs in control cells whereas weak staining was observed in the cytoplasm **(Figure 6C)**.In siFAK treated cells, quantification of active FAK at FA revealed a 46% reduction of P-Y397 staining as compared to control cells. **(Figure 6D).** Re-expression of FAK-I936/I998 in FAK depleted cells resulted in an accumulation of active FAK in the cytoplasm and a weak signal at FA thus leading to a decrease FA/cytoplasm ratio in close opposition to the high FA/cytoplasm ratio observed in the FAK WT rescue experiment. Altogether, these results confirm that inhibiting FAK/paxillin interaction delocalizes FAK from FAs. However, despite its cytoplasmic localization, FAK-I936/I998 keep part of its activity as observed by the increased accumulation of cytoplasmic P-Y397 FAK which may thus interact with partners displaying SH2 binding sites like Src.

Next, to investigate whether inhibition of FAK/paxillin interaction affect melanoma invasion, siFAK treated A375 melanoma cells expressing wild type FAK-GFP or FAK-I936/I998-GFP, were plated on Cy3-gelatin and labelled for actin and cortactin **(Figure 7A).** Melanoma cells expressing FAK-I936/I998, displayed less invadopodia as compare to FAK siRNA treated cells **(Figure 7B).** More important, area of degradation is these conditions were also reduced **(Figure 7C).** On the other hand, siFAK treated A375 melanoma cells reexpressing wild type FAK displayed a number of invadopodia and a proteolytic activity comparable to non-transfected cells. These results indicate that inhibiting FAK/paxillin interaction reduces the proteolytic activity of melanoma cells.

Disturbing FAK/Paxillin interaction reduces invasion and migration

The C-terminal FAT domain of FAK interact with the LD2-LD4 motif of paxillin to localize FAK to FA (Arold et al., 2002; Bertolucci et al., 2005; Hayashi et al., 2002). Therefore, we hypothesised that a peptide containing LD2-LD4 motif would compete with paxillin for binding to the FAT domain of FAK and thus potentially inhibit FAK targeting to FAs. To validate our hypothesis, we expressed LD2-LD4 GFP peptides in A375 melanoma cells. Immunofluorescence experiments show a distribution of these peptides comparable to paxillin with a clear localisation to FAs. together with an accumulation of P-Y397 FAK signal in cytoplasm and a weaker signal at FAs as compared to non-transfected cells. This increase in cytoplasmic P-Y397 FAK result in a 43% decrease of FA/cyto signal ratio **(Figure 8A-B)**. On the other hand, western blot, analysis revealed that LD2-LD4 overexpression did not alter neither FAK expression nor FAK activity at Tyr397 **(Figure 8C-E)**. Altogether, these results show that inhibiting FAK/Paxillin interaction delocalize FAK from FA while preserving at least part of its activity in the cytoplasm. On the other hand, we observed by immunocytochemistry that melanoma cells expressing LD2-LD4-GFP displayed a similar number of invadopodia as compared to normal cells **(Figure 8F-G).** However, using zymography *in situ*, a clear reduction of the degradative activity of invadopodia was shown in cells expressing the peptides indicating that LD2-LD4-GFP peptides are able to inhibit FAK-mediated proteolytic activity **(Figure 8F-H)**. We thus analysed the effect of these peptides in the wound healing model of migration. In cells expressing LD2-LD4-GFP the migration speed was reduced by more than 50% compared to control cells (**Figure 8I-J**) in agreement with many results showing that FAK localisation at FAs is necessary to control FA turn-over and thus cell migration (Webb et al., 2004; Hamadi et al., 2005; Hamadi et al., 2009). Taken together, our results show that inhibiting FAK/Paxillin interaction may be an efficient strategy

to prevent metastasis dissemination by inhibiting both invadopodia-mediated matrix degradation and FA-mediated cell migration.

Discussion

FAK is involved in many aspects of cancer development and studies have revealed a clear link between FAK expression and cancer aggressiveness. Therefore, development of strategies to inhibit FAK is of potential therapeutic interest. Inhibitors of the kinase domain of FAK are effective in animal models and have shown some promising cytostatic effects in clinical trials. However, an alternative way to kinase inhibitors would be to inhibit the scaffolding function of FAK by targeting the interaction of FAK with its binding partners. As many functions of FAK are related to the localization of FAK at FAs, we used site directed mutagenesis or competitive ligand to disrupt FAK-paxillin interaction. We observed that this strategy prevents FAK-paxillins interaction and inhibit both migration and proteolytic activity of invadopodia in human melanoma cells.

In this study, we observed invadopodia formation and elongation in *in-situ* and metastatic human melanoma cell lines using 2D and 2,5D invasion assays. As MMP inhibition with a non-selective inhibitor completely abrogated metastatic melanoma progression in a collagen matrix, we hypothesized that invadopodia are necessary for melanoma invasion. Indeed, MT1-MMP is one of the key proteases required for degradation of the ECM surrounding cancer tissue, and it is known that MT1-MMP localizes to invadopodia (Sounni et al., 2010). Previous studies have already shown that invadopodia participate to cancer cells intravasation and extravasation across the basal membrane in C-elegans, zebra-fish, chicken and mouse models (Condeelis & Segall, 2003; Gligorijevic et al., 2014; Sahai et al., 2005; Wolf et al., 2003). More recently, these structures have also been identified in human pancreas biopsy by immunofluorescence (Chen et al., 2019). Despite invadopodia formation, we found that *in-situ* melanoma cells were not able to degrade extracellular matrix in clear opposition to metastatic cell lines. As invadopodia initially form precursors enriched in F-actin and cortactin which then mature to acquire proteolytic activity (Artym et al., 2006 ; Genna et al., 2018), we suggested that *in-situ* melanoma cells assemble invadopodia precursor and that the maturation step occurs during melanoma progression. In agreement, previous studies described the possible involvement of signaling pathways in invadopodia maturation. Notch signalling has been described to initiate melanoma progression by inhibiting MITF function (Golan et al., 2015). Moreover, Notch signalling initiate $Mena^{IV}$ expression which stimulate invadopodia formation and function by enhancing the phosphorylation of Y421 cortactin (Eddy al., 2016). On the other hand, Tks5 has been described to stimulate invadopodia formation and activity by interacting with ADAM proteases (Abram et al., 2003; Iizuka et al.,

2016) and by inducing ROS production in Src-dependant manner (Diaz et al., 2009; Kolli-Bouhafs et al., 2014). Recently a method combining laser microdissection and mass spectrometry was used to decipher the molecular composition of invadosomes from NIH-3T3-Src cells (Ezzoukhry et al., 2018) and a proximity-labeling proteomic approach with Tks5 as a bait helped to identify the invadopodia molecular landscape of breast cancer cell (Thuault et al., 2020). Such approaches may be necessary to decipher the molecular component implicated in invadopodia maturation.

High expression of FAK has previously been reported in several cancer types, such as carcinomas and sarcomas of the breast, stomach, colon, liver, prostate or urinary bladder (McLean et al., 2003) and can correlate with poorer outcome (Gu & Zhou, 2018; Lee et al., 2015; Zhang et al., 2018). Here, in agreement with previous studies (Hess et al., 2005), we report high expression of FAK in a panel of human melanoma cell lines as compared to normal human melanocytes. These findings prompted us to evaluate the roles of FAK in melanoma progression. First, we did not find any increase in FAK expression level in metastatic melanoma cells as compared to *in-situ* melanoma. These results although in line with clinical studies (Riker et al., 2008) question the role of FAK in the metastatic cascade. Cancer dissemination is a complex process that requires coordination between adhesion, migration and matrix degradation. We found that inhibiting FAK activity via either siRNA-mediated FAK depletion or treatment of cells with the FAK kinase inhibitor PF-573228 (Slack-Davis et al., 2007) effectively inhibited melanoma cell migration but increased the proteolytic activity of metastatic melanoma. It is not surprising to note that the inhibition of FAK reduces cell migratory potential in view of the abundant literature establishing the role of FAK in the dynamics of FAs (Slack-Davis et al., 2007 ; Webb et al., 2004). On the other hand, although we and other have already reported that FAK depletion increases invadopodia activity, it is the first time that such effect was observed using a small molecule inhibitor of FAK activity. These observations raised questions about the use of such ATP competitive inhibitors as anticancer treatments. Indeed, this class of small molecules which include VS-4718 (Tanjoni et al., 2010), GSK2256098 (Zhang et al., 2014), PF-562271 (Roberts et al., 2008), and defactinib (VS-6063) (Shimizu et al., 2016), that are currently in clinical development and have demonstrated some benefits (Mohanty et al., 2020), bind to the kinase pocket of FAK, inhibit FAK *trans*-autophosphorylation and thus the level of phosphorylation at FAK-Y397. However, using a mutated form of FAK at Y397 we demonstrated here that it is precisely the lack of phosphorylation at this residue that mediate increased invadopodia activity in metastatic melanoma. This increase is due to the release of Src from FAs owing to

the mutation of its FA binding partner which then enhanced the phosphorylation state of substrates at invadopodia such as cortactin and Pyk2 (Genna et al., 2018).

These important observations highlight several interrogations. First, can an alternative strategy to kinase inhibitors be considered to suppress the pro-migratory functions of FAK? We previously found that expression of a mutated form of FAK at its paxillin binding sites in $FAK^{-/-}$ fibroblasts reduce adhesion and migration (Deramaudt et al., 2014). Here, we show that this mutant, when expressed in FAK-depleted melanoma cells decrease their ability to degrade the extracellular matrix. This effect is accompanied by a reduce localisation of the mutant to FAs and an increase in P-Y397 FAK level in the cytoplasm. Today, growing evidences provide hope for discovering small drug-like molecules that would target PPI interfaces (Mousson et al., 2018). For the FAK interactome the search for PPI inhibitors has been pioneered by the group of William Cance. They discovered several small molecules inhibiting either FAK/p53 (Golubovskaya et al., 2013) or FAK/VEGFR3 (Kurenova al., 2009) interactions that displayed anti-cancer effects in pre-clinical *in-vitro* and *in-vivo* studies (Gogate al., 2014; Golubovskaya et al., 2013). Thus, as a proof of concept that targeting FAK/Paxillin interactions would be of potential therapeutic interest, we tested the effect of a small peptide containing the LD2 and LD4 domain of paxillin. LD2 and LD4 motifs binds to the hydrophobic patch 1 and hydrophobic patch 2 located at the interface of helix 1-4 and helix 2-3 of the FAT domain of FAK (Hayashi al., 2002). We found that this peptide successfully reduced FAK activity at FAs while retaining substantial activity in cells as reported by Western blot experiments. We further show that this peptide is able to reduce both melanoma migration and degradation of the extracellular matrix which clearly shows the interest of such a strategy to reduce cell invasion.

How FAK stays active when not located at FAs remained obscure. Recent studies have shown that FAK exists in an autoinhibited conformation in the cytoplasm and the recruitment at FAs induces the formation of FAK dimmers through FERM-FERM interactions (Acebrón et al., 2020). Binding of FAK dimmers through a basic patch in the FAK FERM domain to PI(4,5)P2 relieves the autoinhibition thereby triggering autophosphorylation of Y397 which may be facilitated by mechanical forces (Goni et al., 2014 ; Bauer et al., 2019). This sequence of activation is difficult to reconcile with FAK activation outside FAs. However, there are many reports of FAK remaining active in suspended cells or in anchorage-independent cancer cells (Serrels et al., 2012). Recently, active FAK was shown to localize with active integrins on endosomes and the mechanism of FAK activation at these sites require direct binding of FAK to endosomal components. Of importance, Paxillin was absent from endosomes,

implying that FAK recruitment and signalling is organised differently on endosomes and FAs (Alanko et al., 2015). Therefore, inhibiting FAK-paxillin interaction may be without effect on endosomal activation of FAK. Early studies have also shown, using a dimerization assay, that autophosphorylation of FAK was independent of cell adhesion and did not involve the formation of stable multimeric complexes (Toutant et al., 2002). Moreover, FAK dimmers through FERM-FERM interactions are able to form in solution (Brami-Cherrier et al., 2014) and FAK-FAK interactions may exist in the cytosol as demonstrated by FCS studies (Hoffmann et al., 2014). Other activator of FAK includes Ezrin which was shown to induce its activation in suspended kidney-derived epithelial LLC-PK1 cells (Poullet et al., 2001). Changes in pHi which result in H58 deprotonation within the FERM domain leading to FAK conformational changes also enable FAK Y397 autophosphorylation (Choi et al., 2013). Clearly, further studies will be needed to identify FAK activation mechanism when located outside FAs.

In summary, based on our current findings, FAK represents an attractive therapeutic target in invadopodia-associated cancer progression and supports further consideration of PPI inhibitors as anti-FAK therapies for clinical development.

References

Abram, C.L., Seals, D.F., Pass, I., Salinsky, D., Maurer, L., Roth, T.M., and Courtneidge, S.A. (2003). The Adaptor Protein Fish Associates with Members of the ADAMs Family and Localizes to Podosomes of Src-transformed Cells. Journal of Biological Chemistry *278*, 16844–16851.

Acebrón, I., Righetto, R.D., Schoenherr, C., Buhr, S., Redondo, P., Culley, J., Rodríguez, C.F., Daday, C., Biyani, N., Llorca, O., et al. (2020). Structural basis of Focal Adhesion Kinase activation on lipid membranes. The EMBO Journal *39*.

Alanko, J., Mai, A., Jacquemet, G., Schauer, K., Kaukonen, R., Saari, M., Goud, B., and Ivaska, J. (2015). Integrin endosomal signalling suppresses anoikis. Nature Cell Biology *17*, 1412–1421.

Arold, S.T., Hoellerer, M.K., and Noble, M.E.M. (2002). The Structural Basis of Localization and Signaling by the Focal Adhesion Targeting Domain. Structure *10*, 319–327.

Artym, V.V., Zhang, Y., Seillier-Moiseiwitsch, F., Yamada, K.M., and Mueller, S.C. (2006). Dynamic Interactions of Cortactin and Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase at Invadopodia: Defining the Stages of Invadopodia Formation and Function. Cancer Research *66*, 3034–3043.

Artym, V.V., Yamada, K.M., and Mueller, S.C. (2009). ECM Degradation Assays for Analyzing Local Cell Invasion. In Extracellular Matrix Protocols, S. Even-Ram, and V. Artym, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 211–219.

Baster, Z., Li, L., Rajfur, Z., and Huang, C. (2020). Talin2 mediates secretion and trafficking of matrix metallopeptidase 9 during invadopodium formation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research *1867*, 118693.

Bauer, M.S., Baumann, F., Daday, C., Redondo, P., Durner, E., Jobst, M.A., Milles, L.F., Mercadante, D., Pippig, D.A., Gaub, H.E., et al. (2019). Structural and mechanistic insights into mechanoactivation of focal adhesion kinase. Proceedings of the National Academy of Sciences *116*, 6766–6774.

Bertolucci, C.M., Guibao, C.D., and Zheng, J. (2005). Structural features of the focal adhesion kinase-paxillin complex give insight into the dynamics of focal adhesion assembly. Protein Science *14*, 644–652.

Brami-Cherrier, K., Gervasi, N., Arsenieva, D., Walkiewicz, K., Boutterin, M.-C., Ortega, A., Leonard, P.G., Seantier, B., Gasmi, L., Bouceba, T., et al. (2014). FAK dimerization controls its kinase-dependent functions at focal adhesions. The EMBO Journal *33*, 356–370.

Cance, W.G., Harris, J.E., Iacocca, M.V., Roche, E., Yang, X., Chang, J., Simkins, S., and Xu, L. (2000). Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. Clin. Cancer Res. *6*, 2417–2423.

Chan, K.T., Cortesio, C.L., and Huttenlocher, A. (2009). FAK alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion. The Journal of Cell Biology *185*, 357–370.

Chen, Y.-C., Baik, M., Byers, J.T., Chen, K.T., French, S.W., and Díaz, B. (2019). TKS5-positive invadopodia-like structures in human tumor surgical specimens. Experimental and Molecular Pathology *106*, 17–26.

Choi, C.-H., Webb, B.A., Chimenti, M.S., Jacobson, M.P., and Barber, D.L. (2013). pH sensing by FAK-His58 regulates focal adhesion remodeling. The Journal of Cell Biology *202*, 849–859.

Condeelis, J., and Segall, J.E. (2003). Intravital imaging of cell movement in tumours. Nature Reviews Cancer 3, 921–930.

Deramaudt, T.B., Dujardin, D., Hamadi, A., Noulet, F., Kolli, K., De Mey, J., Takeda, K., and Rondé, P. (2011). FAK phosphorylation at Tyr-925 regulates cross-talk between focal adhesion turnover and cell protrusion. Molecular Biology of the Cell *22*, 964–975.

Deramaudt, T.B., Dujardin, D., Noulet, F., Martin, S., Vauchelles, R., Takeda, K., and Rondé, P. (2014). Altering FAK-Paxillin Interactions Reduces Adhesion, Migration and Invasion Processes. PLoS ONE *9*, e92059.

Diaz, B., Shani, G., Pass, I., Anderson, D., Quintavalle, M., and Courtneidge, S.A. (2009). Tks5-Dependent, Nox-Mediated Generation of Reactive Oxygen Species Is Necessary for Invadopodia Formation. Science Signaling *2*, ra53–ra53.

Eddy, R.J., Weidmann, M.D., Sharma, V.P., and Condeelis, J.S. (2017). Tumor Cell Invadopodia: Invasive Protrusions that Orchestrate Metastasis. Trends in Cell Biology *27*, 595–607.

Ezzoukhry, Z., Henriet, E., Cordelières, F.P., Dupuy, J.-W., Maître, M., Gay, N., Di-Tommaso, S., Mercier, L.,

Goetz, J.G., Peter, M., et al. (2018). Combining laser capture microdissection and proteomics reveals an active translation machinery controlling invadosome formation. Nature Communications *9*.

Gaggioli, C., and Sahai, E. (2007). Melanoma invasion ? current knowledge and future directions. Pigment Cell Research *20*, 161–172.

Genna, A., Lapetina, S., Lukic, N., Twafra, S., Meirson, T., Sharma, V.P., Condeelis, J.S., and Gil-Henn, H. (2018). Pyk2 and FAK differentially regulate invadopodia formation and function in breast cancer cells. The Journal of Cell Biology *217*, 375–395.

Giannone, G., Rondé, P., Gaire, M., Haiech, J., and Takeda, K. (2002). Calcium Oscillations Trigger Focal Adhesion Disassembly in Human U87 Astrocytoma Cells. Journal of Biological Chemistry *277*, 26364–26371.

Gligorijevic, B., Bergman, A., and Condeelis, J. (2014). Multiparametric Classification Links Tumor Microenvironments with Tumor Cell Phenotype. PLoS Biology *12*, e1001995.

Gogate, P.N., Ethirajan, M., Kurenova, E.V., Magis, A.T., Pandey, R.K., and Cance, W.G. (2014). Design, synthesis, and biological evaluation of novel FAK scaffold inhibitors targeting the FAK–VEGFR3 protein–protein interaction. European Journal of Medicinal Chemistry *80*, 154–166.

Golan, T., Messer, A.R., Amitai-Lange, A., Melamed, Z., Ohana, R., Bell, R.E., Kapitansky, O., Lerman, G., Greenberger, S., Khaled, M., et al. (2015). Interactions of Melanoma Cells with Distal Keratinocytes Trigger Metastasis via Notch Signaling Inhibition of MITF. Molecular Cell *59*, 664–676.

Golubovskaya, V.M., Palma, N.L., Zheng, M., Ho, B., Magis, A., Ostrov, D., and Cance, W.G. (2013). A Small-molecule Inhibitor, 5'-O-Tritylthymidine, Targets FAK and Mdm-2 Interaction, and Blocks Breast and Colon Tumorigenesis in vivo. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry *13*, 532–545.

Goni, G.M., Epifano, C., Boskovic, J., Camacho-Artacho, M., Zhou, J., Bronowska, A., Martin, M.T., Eck, M.J., Kremer, L., Grater, F., et al. (2014). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate triggers activation of focal adhesion kinase by inducing clustering and conformational changes. Proceedings of the National Academy of Sciences *111*, E3177–E3186.

Gu, H., and Zhou, B. (2018). Focal adhesion kinase promotes progression and predicts poor clinical outcomes in patients with osteosarcoma. Oncology Letters.

Hamadi, A., Bouali, M., Dontenwill, M., Stoeckel, H., Takeda, K., and Rondé, P. (2005). Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397. Journal of Cell Science *118*, 4415–4425.

Hamadi, A., Deramaudt, T.B., Takeda, K., and Rondé, P. (2009). Src activation and translocation from focal adhesions to membrane ruffles contribute to formation of new adhesion sites. Cellular and Molecular Life Sciences *66*, 324–338.

Hayashi, I., Vuori, K., and Liddington, R.C. (2002). The focal adhesion targeting (FAT) region of focal adhesion kinase is a four-helix bundle that binds paxillin. Nature Structural Biology *9*, 101–106.

Hess, A.R., Postovit, L.-M., Margaryan, N.V., Seftor, E.A., Schneider, G.B., Seftor, R.E.B., Nickoloff, B.J., and Hendrix, M.J.C. (2005). Focal Adhesion Kinase Promotes the Aggressive Melanoma Phenotype. Cancer Research *65*, 9851–9860.

Hoffmann, J.-E., Fermin, Y., Stricker, R.L., Ickstadt, K., and Zamir, E. (2014). Symmetric exchange of multi-protein building blocks between stationary focal adhesions and the cytosol. ELife *3*.

Hofmann, U.B., Westphal, J.R., Zendman, A.J.W., Becker, J.C., and Ruiter, D.J. (2000). Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression. J Pathol 12.

Hoshino, D., Branch, K.M., and Weaver, A.M. (2013). Signaling inputs to invadopodia and podosomes. Journal of Cell Science *126*, 2979–2989.

Iizuka, S., Abdullah, C., Buschman, M.D., Diaz, B., and Courtneidge, S.A. (2016). The role of Tks adaptor proteins in invadopodia formation, growth and metastasis of melanoma. Oncotarget *7*, 78473-78486.

Kaneda, T., Sonoda, Y., Ando, K., Suzuki, T., Sasaki, Y., Oshio, T., Tago, M., and Kasahara, T. (2008). Mutation of Y925F in focal adhesion kinase (FAK) suppresses melanoma cell proliferation and metastasis. Cancer Letters *270*, 354–361.

Kolli-Bouhafs, K., Sick, E., Noulet, F., Gies, J.-P., De Mey, J., and Rondé, P. (2014). FAK competes for Src to promote migration against invasion in melanoma cells. Cell Death and Disease *5*, e1379.

Kurenova, E.V., Hunt, D.L., He, D., Magis, A.T., Ostrov, D.A., and Cance, W.G. (2009). Small Molecule Chloropyramine Hydrochloride (C4) Targets the Binding Site of Focal Adhesion Kinase and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 and Suppresses Breast Cancer Growth in Vivo. Journal of Medicinal Chemistry *52*, 4716–4724.

Lee, B.Y., Timpson, P., Horvath, L.G., and Daly, R.J. (2015). FAK signaling in human cancer as a target for therapeutics. Pharmacology & Therapeutics *146*, 132–149.

McLean, G.W., Avizienyte, E., and Frame, M.C. (2003). Focal adhesion kinase as a potential target in oncology. Expert Opin. Pharmacother. 8.

Mohanty, A., Pharaon, R.R., Nam, A., Salgia, S., Kulkarni, P., and Massarelli, E. (2020). FAK-targeted and combination therapies for the treatment of cancer: an overview of phase I and II clinical trials. Expert Opinion on Investigational Drugs *29*, 399–409.

Mousson, A., Sick, E., Carl, P., Dujardin, D., De Mey, J., and Rondé, P. (2018). Targeting Focal Adhesion Kinase Using Inhibitors of Protein-Protein Interactions. Cancers *10*, 278.

Murphy, D.A., and Courtneidge, S.A. (2011). The "ins" and "outs" of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. Nature Reviews Molecular Cell Biology *12*, 413–426.

Pedersen, N.M., Wenzel, E.M., Wang, L., Antoine, S., Chavrier, P., Stenmark, H., and Raiborg, C. (2020). Protrudin-mediated ER–endosome contact sites promote MT1-MMP exocytosis and cell invasion. Journal of Cell Biology *219*.

Pignatelli, J., Bravo-Cordero, J.J., Roh-Johnson, M., Gandhi, S.J., Wang, Y., Chen, X., Eddy, R.J., Xue, A., Singer, R.H., Hodgson, L., et al. (2016). Macrophage-dependent tumor cell transendothelial migration is mediated by Notch1/MenaINV-initiated invadopodium formation. Scientific Reports *6*.

Poullet, P., Gautreau, A., Kadaré, G., Girault, J.-A., Louvard, D., and Arpin, M. (2001). Ezrin Interacts with Focal Adhesion Kinase and Induces Its Activation Independently of Cell-matrix Adhesion. Journal of Biological Chemistry *276*, 37686–37691.

Qi, S., Perrino, S., Miao, X., Lamarche-Vane, N., and Brodt, P. (2020). The chemokine CCL7 regulates invadopodia maturation and MMP-9 mediated collagen degradation in liver-metastatic carcinoma cells. Cancer Letters *483*, 98–113.

Riker, A.I., Enkemann, S.A., Fodstad, O., Liu, S., Ren, S., Morris, C., Xi, Y., Howell, P., Metge, B., Samant, R.S., et al. (2008). The gene expression profiles of primary and metastatic melanoma yields a transition point of tumor progression and metastasis. BMC Medical Genomics *1*.

Roberts, W.G., Ung, E., Whalen, P., Cooper, B., Hulford, C., Autry, C., Richter, D., Emerson, E., Lin, J., Kath, J., et al. (2008). Antitumor Activity and Pharmacology of a Selective Focal Adhesion Kinase Inhibitor, PF-562,271. Cancer Research *68*, 1935–1944.

Robertson, L.K., and Ostergaard, H.L. (2011). Paxillin Associates with the Microtubule Cytoskeleton and the Immunological Synapse of CTL through Its Leucine-Aspartic Acid Domains and Contributes to Microtubule Organizing Center Reorientation. The Journal of Immunology *187*, 5824–5833.

Sadok, A., McCarthy, A., Caldwell, J., Collins, I., Garrett, M.D., Yeo, M., Hooper, S., Sahai, E., Kuemper, S., Mardakheh, F.K., et al. (2015). Rho kinase inhibitors block melanoma cell migration and inhibit metastasis. Cancer Res. *75*, 2272–2284.

Sahai, E. (2005). Mechanisms of cancer cell invasion. Current Opinion in Genetics & Development *15*, 87–96.

Schoumacher, M., Goldman, R.D., Louvard, D., and Vignjevic, D.M. (2010). Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. The Journal of Cell Biology *189*, 541–556.

Serrels, A., McLeod, K., Canel, M., Kinnaird, A., Graham, K., Frame, M.C., and Brunton, V.G. (2012). The role of focal adhesion kinase catalytic activity on the proliferation and migration of squamous cell carcinoma cells. International Journal of Cancer *131*, 287–297.

Shain, A.H., and Bastian, B.C. (2016). From melanocytes to melanomas. Nature Reviews Cancer *16*, 345–358.

Sharma, V.P., Eddy, R., Entenberg, D., Kai, M., Gertler, F.B., and Condeelis, J. (2013). Tks5 and SHIP2 Regulate Invadopodium Maturation, but Not Initiation, in Breast Carcinoma Cells. Current Biology *23*, 2079–2089.

Shimizu, T., Fukuoka, K., Takeda, M., Iwasa, T., Yoshida, T., Horobin, J., Keegan, M., Vaickus, L., Chavan, A., Padval, M., et al. (2016). A first-in-Asian phase 1 study to evaluate safety, pharmacokinetics and clinical activity of VS-6063, a focal adhesion kinase (FAK) inhibitor in Japanese patients with advanced solid

tumors. Cancer Chemotherapy and Pharmacology *77*, 997–1003.

Slack-Davis, J.K., Martin, K.H., Tilghman, R.W., Iwanicki, M., Ung, E.J., Autry, C., Luzzio, M.J., Cooper, B., Kath, J.C., Roberts, W.G., et al. (2007). Cellular Characterization of a Novel Focal Adhesion Kinase Inhibitor. Journal of Biological Chemistry *282*, 14845–14852.

Sood, A.K., Coffin, J.E., Schneider, G.B., Fletcher, M.S., DeYoung, B.R., Gruman, L.M., Gershenson, D.M., Schaller, M.D., and Hendrix, M.J.C. (2004). Biological significance of focal adhesion kinase in ovarian cancer: role in migration and invasion. Am. J. Pathol. *165*, 1087–1095.

Sounni, N.E., Dehne, K., van Kempen, L., Egeblad, M., Affara, N.I., Cuevas, I., Wiesen, J., Junankar, S., Korets, L., Lee, J., et al. (2010). Stromal regulation of vessel stability by MMP14 and TGF. Disease Models & Mechanisms *3*, 317–332.

Sulzmaier, F.J., Jean, C., and Schlaepfer, D.D. (2014). FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. Nature Reviews Cancer *14*, 598–610.

Tanjoni, I., Walsh, C., Uryu, S., Tomar, A., Nam, J.-O., Mielgo, A., Lim, S.-T., Liang, C., Koenig, M., Patel, N., et al. (2010). PND-1186 FAK inhibitor selectively promotes tumor cell apoptosis in three-dimensional environments. Cancer Biology & Therapy *9*, 764–777.

Tapial Martínez, P., López Navajas, P., and Lietha, D. (2020). FAK Structure and Regulation by Membrane Interactions and Force in Focal Adhesions. Biomolecules *10*, 179.

Thuault, S., Mamelonet, C., Salameh, J., Ostacolo, K., Chanez, B., Salaün, D., Baudelet, E., Audebert, S., Camoin, L., and Badache, A. (2020). A proximity-labeling proteomic approach to investigate invadopodia molecular landscape in breast cancer cells. Scientific Reports *10*.

Toutant, M., Costa, A., Studler, J.-M., Kadaré, G., Carnaud, M., and Girault, J.-A. (2002). Alternative Splicing Controls the Mechanisms of FAK Autophosphorylation. Molecular and Cellular Biology *22*, 7731–7743.

Valenzuela-Iglesias, A., Sharma, V.P., Beaty, B.T., Ding, Z., Gutierrez-Millan, L.E., Roy, P., Condeelis, J.S., and Bravo-Cordero, J.J. (2015). Profilin1 regulates invadopodium maturation in human breast cancer cells. European Journal of Cell Biology *94*, 78–89.

Vitale, S., Avizienyte, E., Brunton, V., and Frame, M. (2008). Focal adhesion kinase is not required for Src-induced formation of invadopodia in KM12C colon cancer cells and can interfere with their assembly. European Journal of Cell Biology *87*, 569–579.

Webb, D.J., Donais, K., Whitmore, L.A., Thomas, S.M., Turner, C.E., Parsons, J.T., and Horwitz, A.F. (2004). FAK–Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. Nature Cell Biology *6*, 154–161.

Weidmann, M.D., Surve, C.R., Eddy, R.J., Chen, X., Gertler, F.B., Sharma, V.P., and Condeelis, J.S. (2016). MenaINV dysregulates cortactin phosphorylation to promote invadopodium maturation. Scientific Reports *6*.

Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U.H., Deryugina, E.I., Strongin, A.Y., Bröcker, E.-B., and Friedl, P. (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration. Journal of Cell Biology *160*, 267–277.

Wolf, K., and Friedl, P. (2006). Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity: Mechanisms of tumour cell invasion, plasticity, metastasis. British Journal of Dermatology *154*, 11–15.

Zaidel-Bar, R., Ballestrem, C., Kam, Z., and Geiger, B. (2003). Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. Journal of Cell Science *116*, 4605–4613.

Zhang, J., He, D.-H., Zajac-Kaye, M., and Hochwald, S.N. (2014). A small molecule FAK kinase inhibitor, GSK2256098, inhibits growth and survival of pancreatic ductal adenocarcinoma cells. Cell Cycle *13*, 3143–3149.

Zhang, Q., Wang, H., Wei, H., and Zhang, D. (2018). Focal adhesion kinase (FAK) is associated with poor prognosis in urinary bladder carcinoma. International Journal of Clinical and Experimental Pathology *11*, 831–838.

Figure Legends

Figure 1. Invasive potentiel of melanoma cells is MMP dependant. (A) Melanoma cells lines labelled with Hoechst 33342 were assessed for invasion in collagen-I during 24h. Representative images of HEM, WM1862 and WM983B melanoma cells in control condition between 0 and 60µm. Scale bar : 100µm. The invasion index was calculated by reporting the number of cells above 10µM on the total number of cells by field **(B)** in control condition or **(C)** in presence of non-selective MMP inhibitor, GM6001. Histograms represent the mean ± SEM from 3 independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; unpaired t test compared to HEM or non-treated cells.

Figure 2. Invadopodia activity regulate aggressivity of melanoma cells. (A) Melanoma cell lines were plated glass slides, fixed, and labelled for actin (Red) and cortactin (Green). Boxed regions and insets depict colocalization of actin and cortactin (Yellow) as markers for invadopodia. Scale Bar : 10µm. **(B)** Histograms represent the mean ± SEM of invadopodia by cell (n=56-109). **(C)** Representative 3D reconstruction image from Imaris and X–Z confocal images showing colocalization of actin (Red) and cortactin (Green) to an invadopodia (Yellow) projecting into the collagen/FITC-Gelatin matrix that was plated in the top chamber of a 1-µm transwell filter. **(D)** Melanoma cell lines were plated on FITC-Gelatin (Gray), fixed, and labelled for actin (Red) and cortactin (Green). Boxed regions and insets depict invadopodia (Yellow) and degradation were identified as black holes on fluorescent gelatine. Histograms represent the mean ± SEM of **(E)** area of degradation (n=40-142) and **(F)** degradation frequency from 3 independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; unpaired t test compared to * WM1552C or + WM862.

Figure 3. FAK expression is increased cell but not correlated with melanoma state. (A) Representative western blot of normal human epidermal melanocytes (HEM) and melanoma cells. Cellular extracts were analysed by western blotting and probed for FAK total and actin as a loading control. **(B)** Histograms represent the mean ± SEM from 3 independent experiments **(C)** Melanoma cell lines were immunostained for P-Y118-paxillin (cyan), actin (red) and FAK total (green). Scale bar : 10µm. FAK localization in melanoma cells (n=46-70) were measured by report signal of FAK in FA on signal of FAK in cytoplasm. **(D)** Histograms represent the mean ± SEM from 3 independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; unpaired t test compared to HEM

Figure 4. FAK inhibition reduces migration but increase proteolytic activity of invasive melanoma cells. (A) Melanoma cells were transfected during 48h with control siRNA / FAK siRNA or treated by PF-573228 at 1µM during 12h. Cellular extracts were analysed by western blotting and probed for Y-397 FAK, FAK total and actin as a loading control. **(B)** Quantification of FAK expression and **(C)** FAK activity after siRNA transfection or PF-573328 from 3 independent experiments. **(D)** Confluent cell layers of melanoma cell lines transiently transfected with control siRNA / FAK siRNA or treated by PF-573228 were wounded and cells were allowed to migrate during 12h. Images represent WM983B melanoma cells at 0h and 12h. **(E)** Histogram represent the mean speed migration normalized to control ± SEM from 3 independent experiments. **(F)** Melanoma transiently transfected or treated by PF-573228 were plated on FITC-Gelatin (Gray), fixed, and labelled for actin (Red) and cortactin (Green). Histograms represents the mean normalized to control ± SEM of **(G)** invadopodia by cell (n=33-59) and **(H)** area of degradation (n=48-60) from 3 independent experiments *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; unpaired t test compared to control condition

Figure 5. Inhibit FAK/Src interaction increases proteolytic activity. (A) A375 melanoma cells transiently cotransfected with the siFAK targeting the 5'-UTR region and wild type FAK-GFP or FAK-Y397F-GFP were fixed and labelled for Paxillin (Purple), actin (Red) and P-Y397 FAK (cyan). **(B)** Histogram represent the mean normalized to control ± SEM of FAK localization in melanoma cells. Signals were measured by report signal of FAK in FA on signal of FAK in cytoplasm from 3 independent experiments **(C)** A375 melanoma cells cotransfected as described above were plated on Cy3-Gelatin (Gray), fixed, and labelled for actin (Red) and cortactin (Purple). Histograms represent the mean normalized to control ± SEM of **(D)** invadopodia by cell (n=40-62) and **(E)** area of degradation (n=51-118) from 3 independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; unpaired t test compared to control condition

Figure 6. Interaction FAK/paxillin condition FAK localization to FA. (A) Cell extracts from A375 melanoma cells transiently cotransfected with the siFAK targeting the 5'-UTR region and wild type FAK-GFP or FAK-I936/I998-GFP were analyzed by immunoprecipitation (IP) using anti-FAK Ab and blotted for paxillin and FAK. The expression level of proteins in the corresponding cell lysate is shown. **(B)** Representative

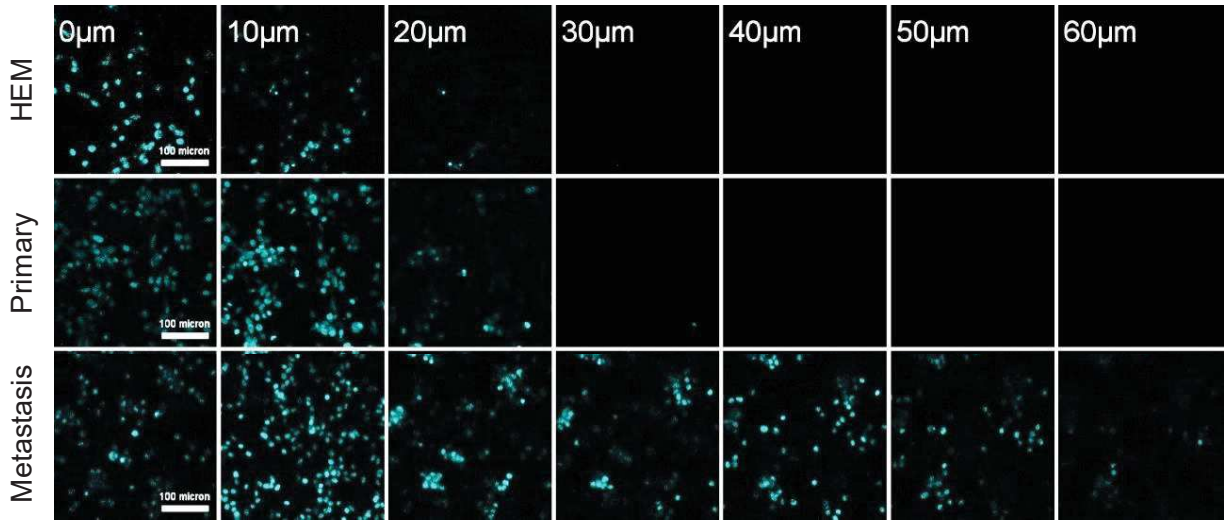
western blot showing A375 melanoma cells transfected as described above and blotted for P-Y397 FAK, FAK total, eGFP and Actin. **(C)** Cells transiently cotransfected with the siFAK targeting the 5'-UTR region and wild type FAK-GFP or FAK-I936/I998-GFP were fixed and labelled for Paxillin (Purple), actin (Red) and P-Y397 FAK (cyan). **(D)** Histogram represent the mean normalized to control ± SEM of FAK localization in melanoma cells. Signals were measured by report signal of FAK in FA on signal of FAK in cytoplasm from 3 independent experiments *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; unpaired t test compared to control condition

Figure 7. Inhibit FAK/paxillin interaction reduce proteolytic activity. (A) A375 melanoma cells transiently cotransfected with the siFAK targeting the 5'-UTR region and wild type FAK-GFP or FAK-I936/I998-GFP were plated on Cy3-Gelatin (Gray), fixed, and labelled for actin (Red) and cortactin (Purple). Histograms represent the mean normalized to control ± SEM of **(B)** invadopodia by cell (n=50-62) and **(C)** area of degradation (n=66-118) from 3 independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; unpaired t test compared to control condition

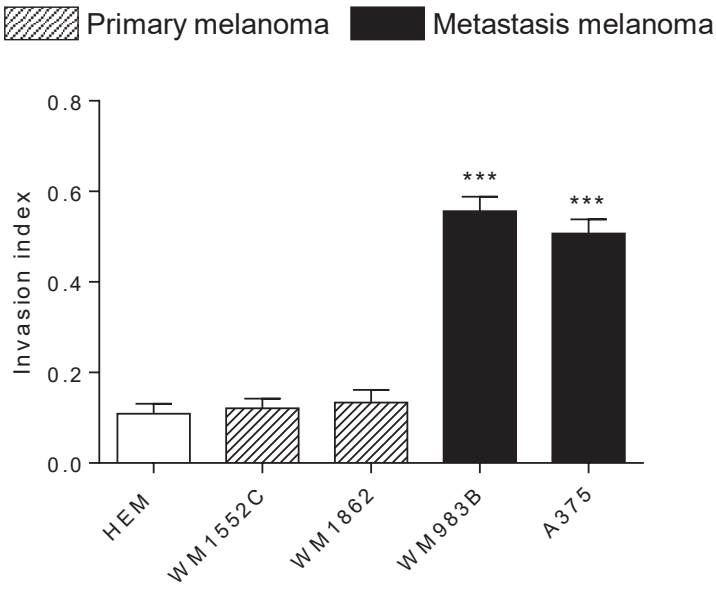
Figure 8. Competitive inhibitor of FAK/paxillin interaction reduce both migration and degradation. (A) A375 melanoma cells transiently transfected with LD2-LD4 tagged with GFP were fixed and labelled for Paxillin (Purple), actin (Red) and P-Y397 FAK (cyan). **(B)** Histogram represent the mean normalized to control ± SEM of FAK localization in melanoma cells. Signals were measured by report signal of FAK in FA on signal of FAK in cytoplasm from 3 independent experiments. **(C)** Representative western blot showing A375 melanoma cells transfected as described above and blotted for P-Y397 FAK, FAK total, eGFP and Actin. **(D)** Quantification of FAK activity and **(E)** FAK expression after LD2-LD4-GFP transfection from 3 independent experiments **(F)** A375 melanoma cells transiently transfected with LD2-LD4 tagged with GFP were plated on Cy3-Gelatin (Gray), fixed, and labelled for actin (Red) and cortactin (Purple). Histograms represent the mean normalized to control ± SEM of **(G)** invadopodia by cell (n=66-88) and **(H)** area of degradation (n=76-94) from 3 independent experiments. **(I)** Confluent cell layers of A375 melanoma cells transiently transfected were wounded and cells were allowed to migrate during 12h. **(J)** Histogram represent the mean speed migration normalized to control ± SEM from 3 independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; unpaired t test compared to control condition

Figure 1

A


0μm
10μm
20μm
30μm
40μm
50μm
60μm
HEM
Primary
Metastasis
100 micron
100 micron
100 micron

B


Primary melanoma
Metastasis melanoma
Invasion index
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
***
***
HEM
WM1552C
WM1862
WM983B
A375

C

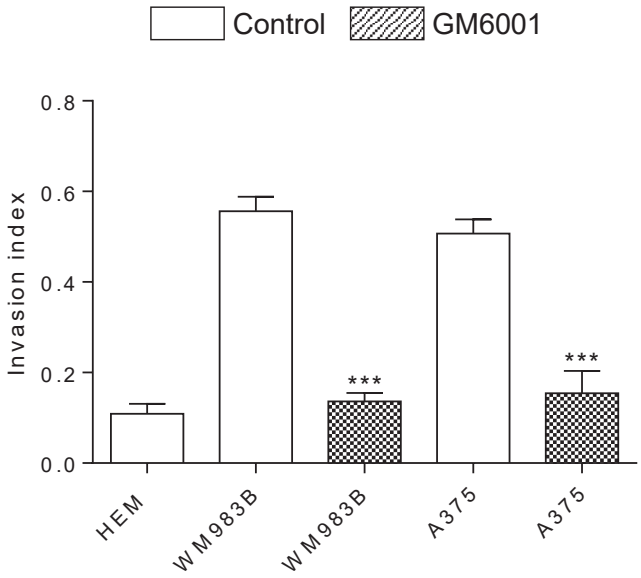

Control
GM6001
Invasion index
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
***
***
HEM
WM983B
WM983B
A375
A375

Figure 2

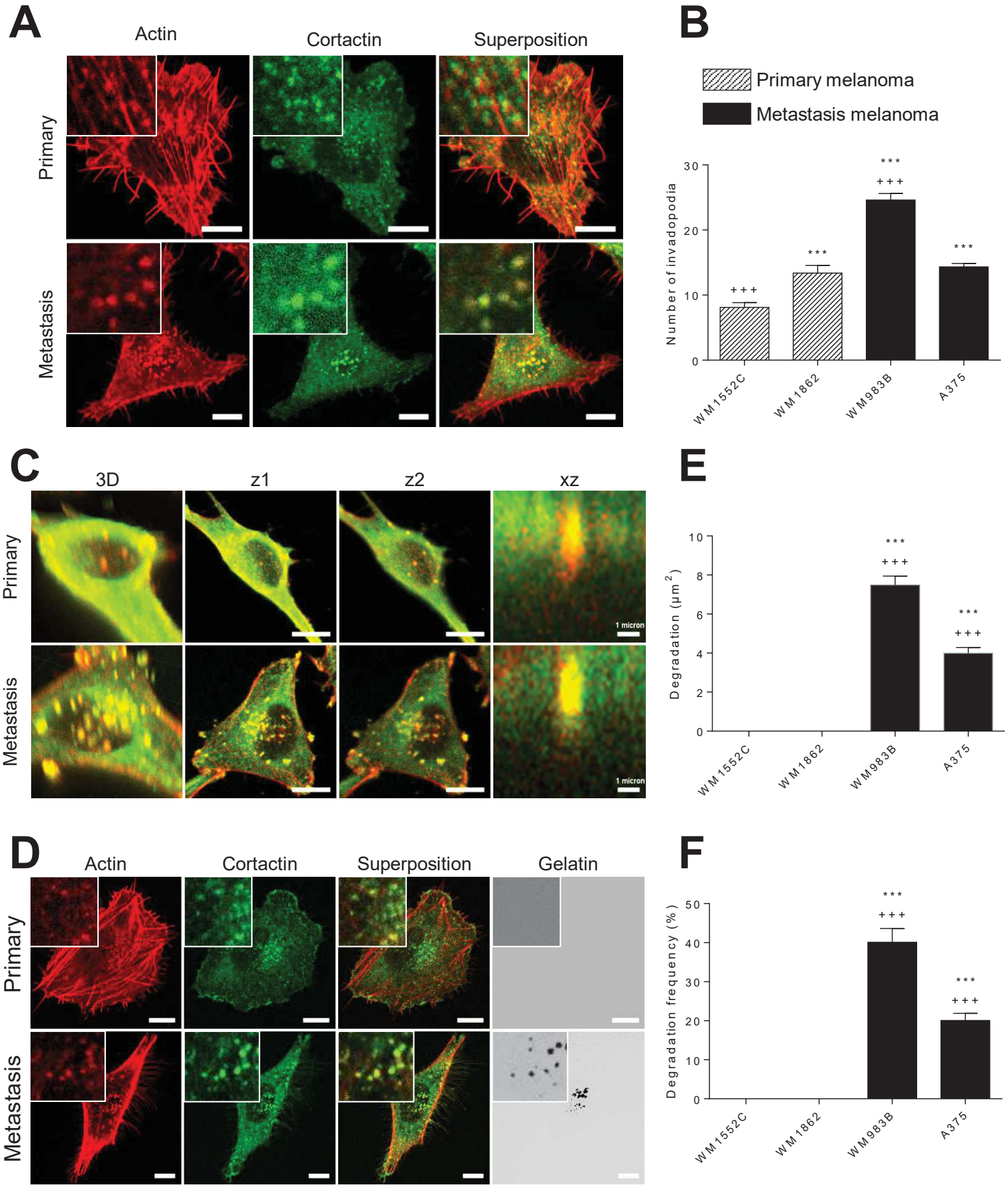
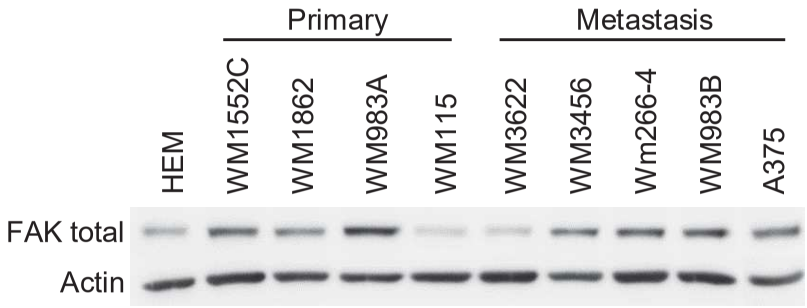
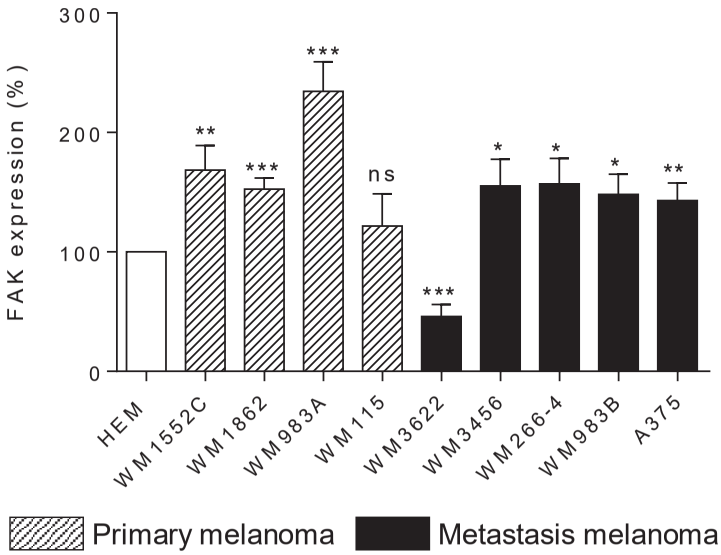

A
Actin
Cortactin
Superposition
Primary
Metastasis
B
Primary melanoma
Metastasis melanoma
Number of invadopodia
0
10
20
30
+ + +
* * *
WM1552C
WM1862
WM983B
A375
C
3D
z1
z2
xz
Primary
Metastasis
1 micron
E
Degradation (µm²)
0
2
4
6
8
10
WM1552C
WM1862
WM983B
A375
D
Actin
Cortactin
Superposition
Gelatin
Primary
Metastasis
F
Degradation frequency (%)
0
10
20
30
40
50
WM1552C
WM1862
WM983B
A375

Figure 3

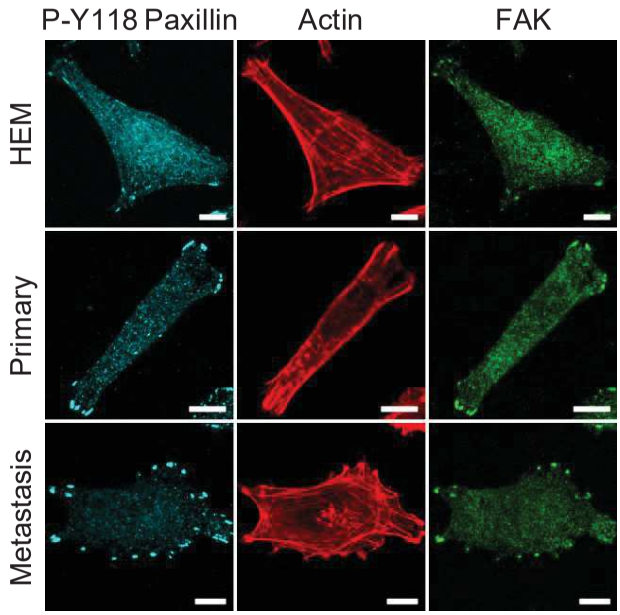
A



B



C



D

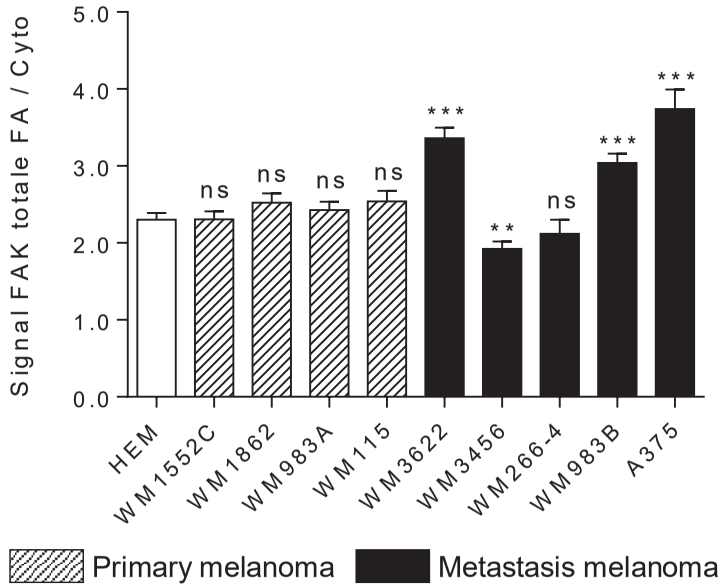


Figure 4

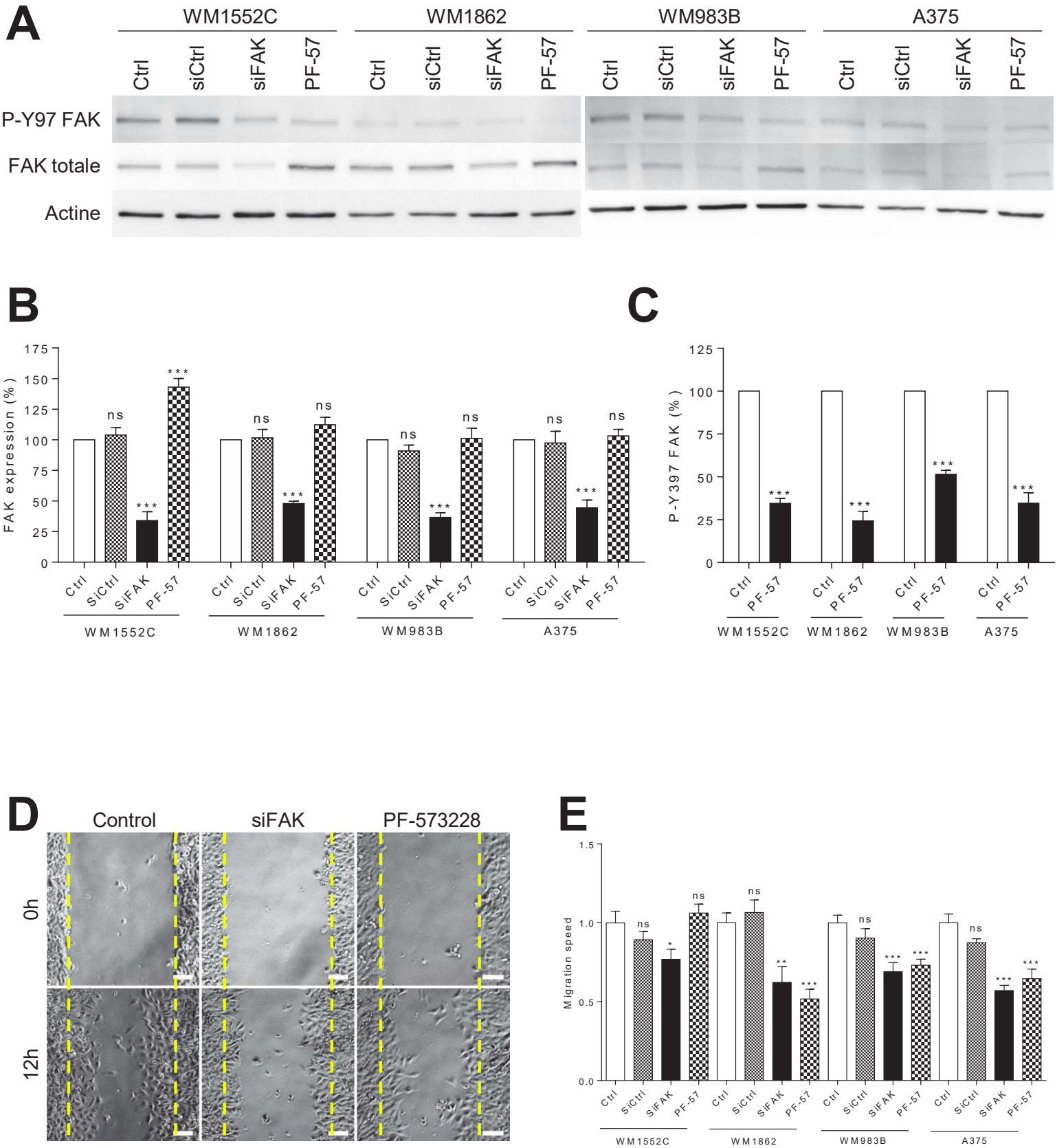
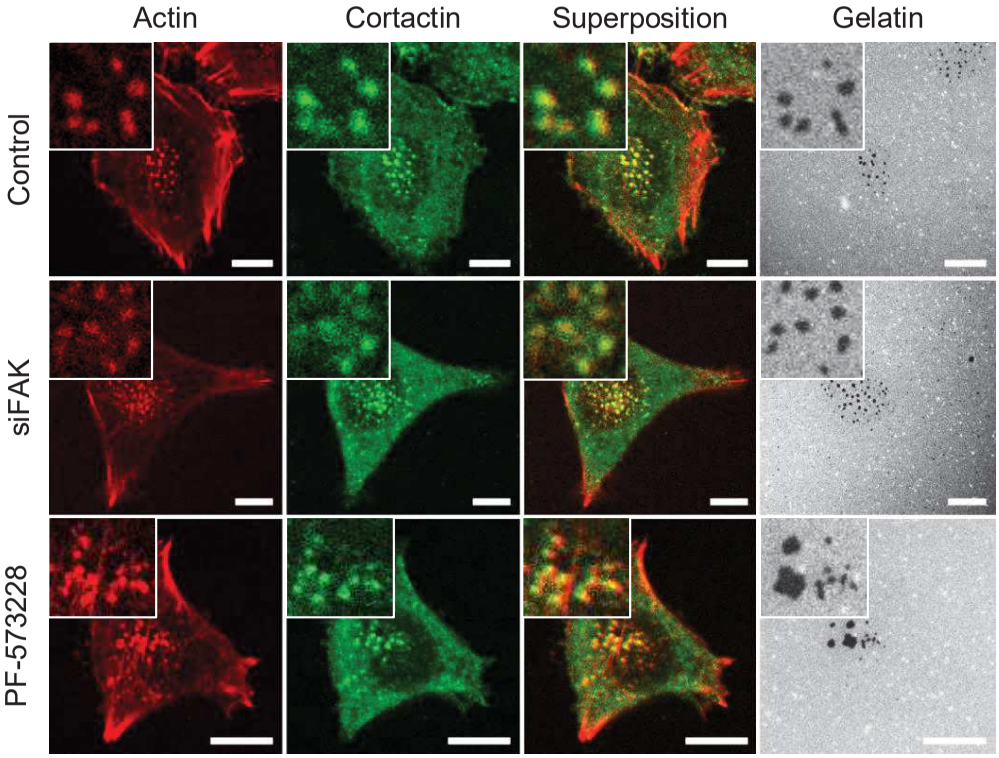
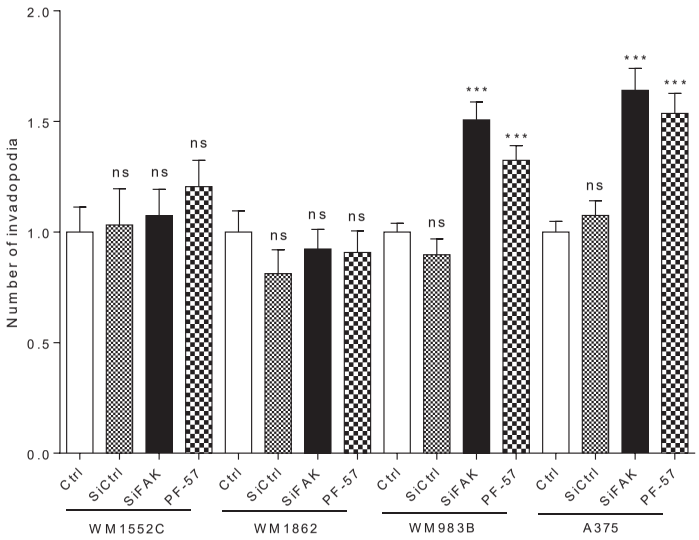

A
WM1552C
WM1862
WM983B
A375
Ctrl
siCtrl
siFAK
PF-57
P-Y97 FAK
FAK totale
Actine
B
FAK expression (%)
175
150
125
100
75
50
25
0
ns
***
Ctrl
SiCtrl
SiFAK
PF-57
WM1552C
WM1862
WM983B
A375
C
P-Y397 FAK (%)
125
100
75
50
25
0
D
Control
siFAK
PF-573228
0h
12h
E
Migration speed
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
*
**
***

Figure 4

F


Actin
Cortactin
Superposition
Gelatin
Control
siFAK
PF-573228

G


Number of invadopodia
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
***
Ctrl
SiCtrl
SiFAK
PF-57
WM1552C
WM1862
WM983B
A375

H

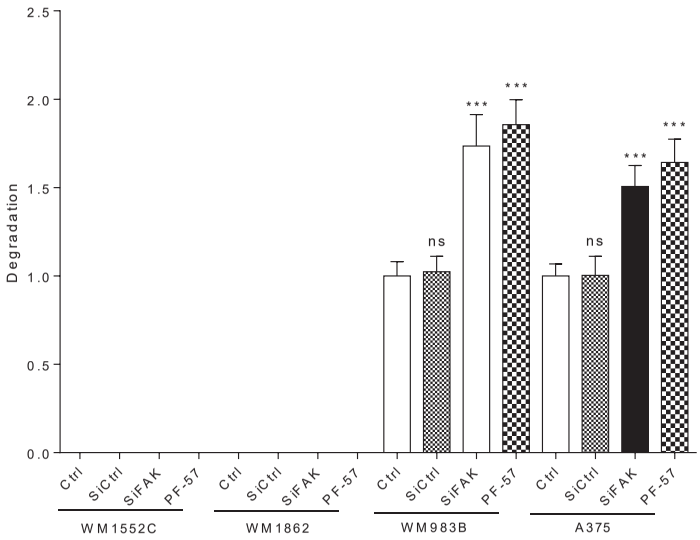
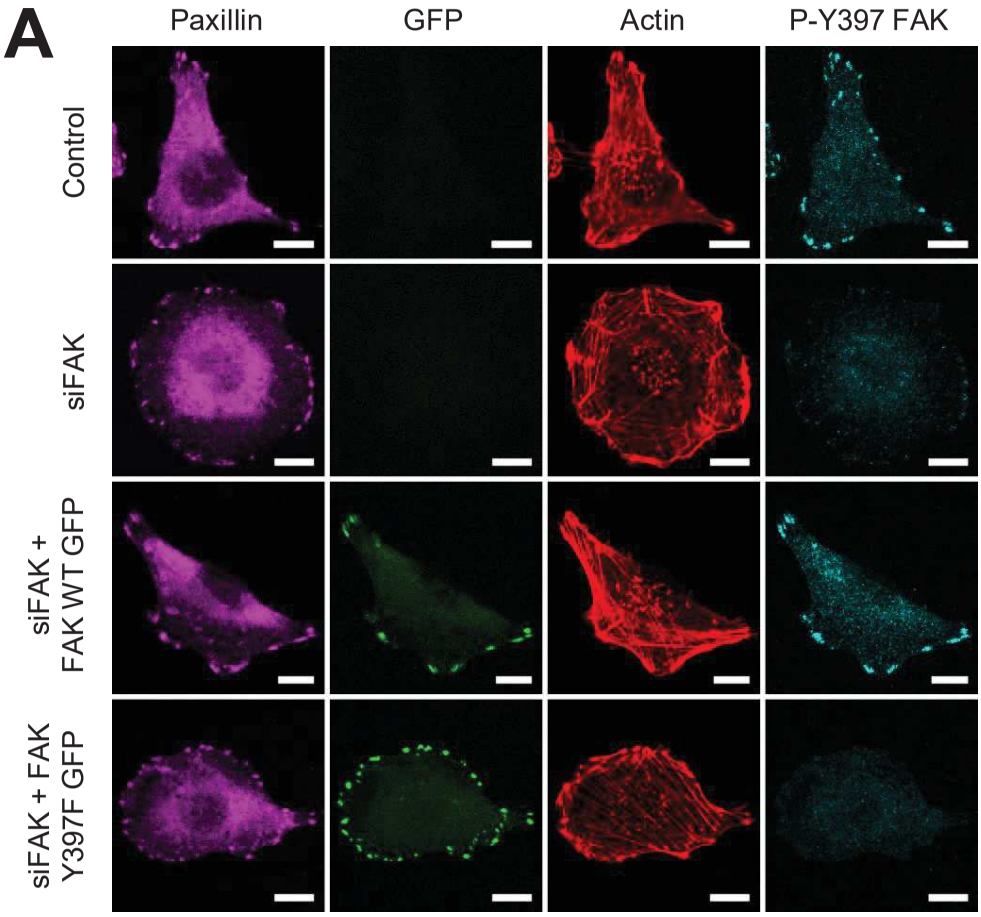
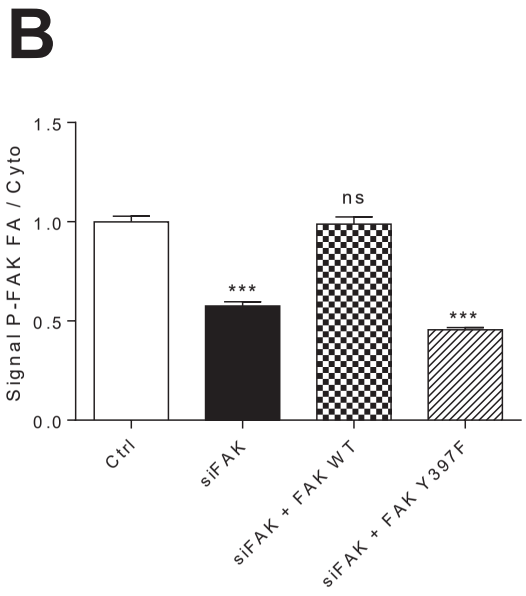
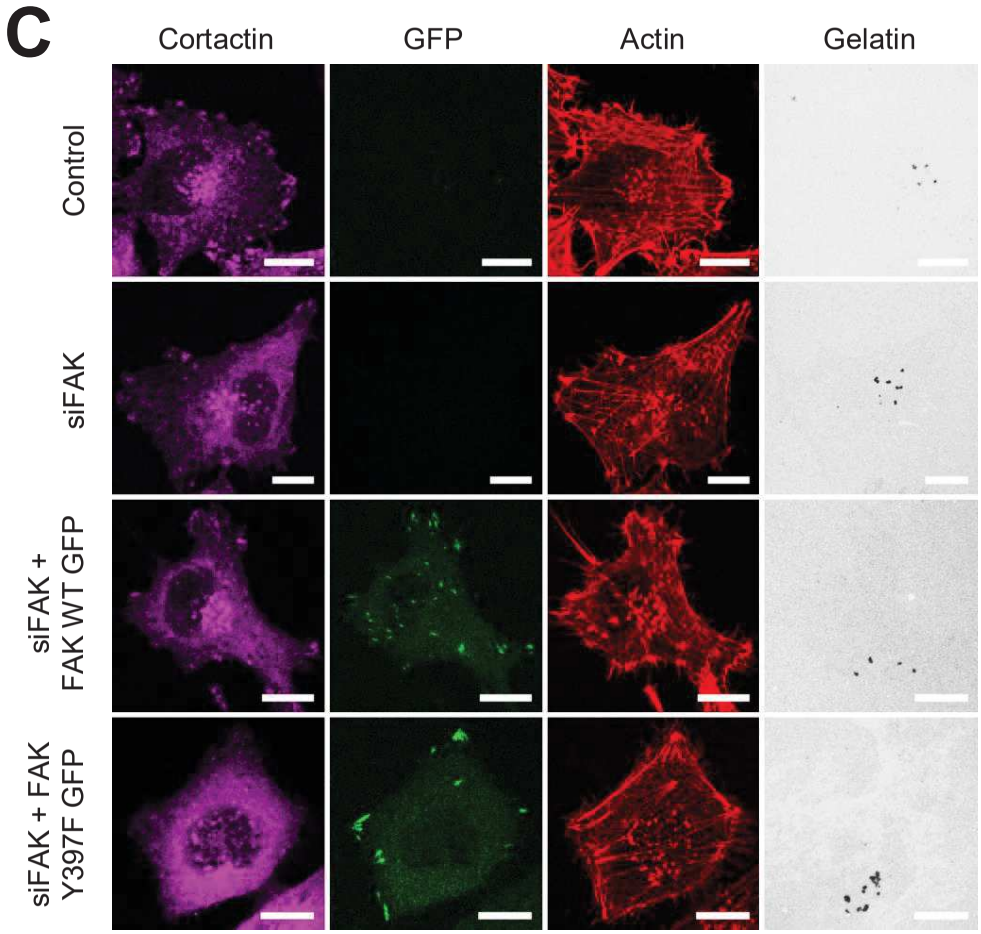
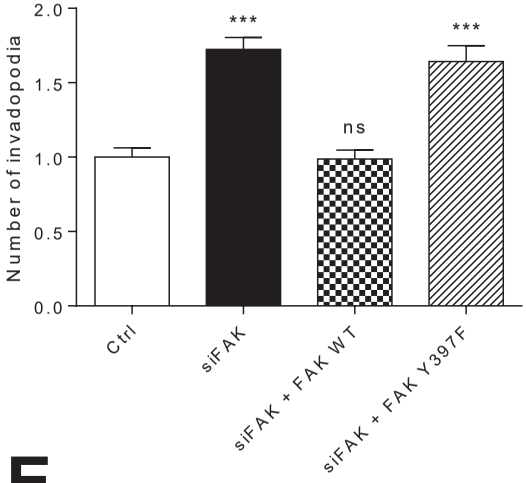

Degradation
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
***
Ctrl
SiCtrl
SiFAK
PF-57
WM1552C
WM1862
WM983B
A375

Figure 5


A
Paxillin
GFP
Actin
P-Y397 FAK
Control
siFAK
siFAK + FAK WT GFP
siFAK + FAK Y397F GFP


B
Signal P-FAK FA / Cyto
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
***
***
Ctrl
siFAK
siFAK + FAK WT
siFAK + FAK Y397F


C
Cortactin
GFP
Actin
Gelatin
Control
siFAK
siFAK + FAK WT GFP
siFAK + FAK Y397F GFP


D
Number of invadopodia
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
ns
***
Ctrl
siFAK
siFAK + FAK WT
siFAK + FAK Y397F

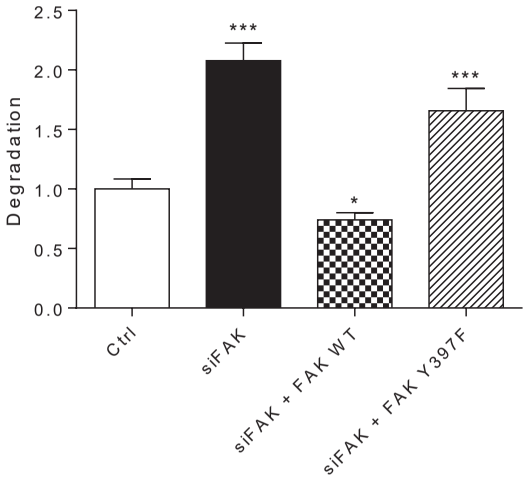

E
Degradation
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
*
***
Ctrl
siFAK
siFAK + FAK WT
siFAK + FAK Y397F

Figure 6

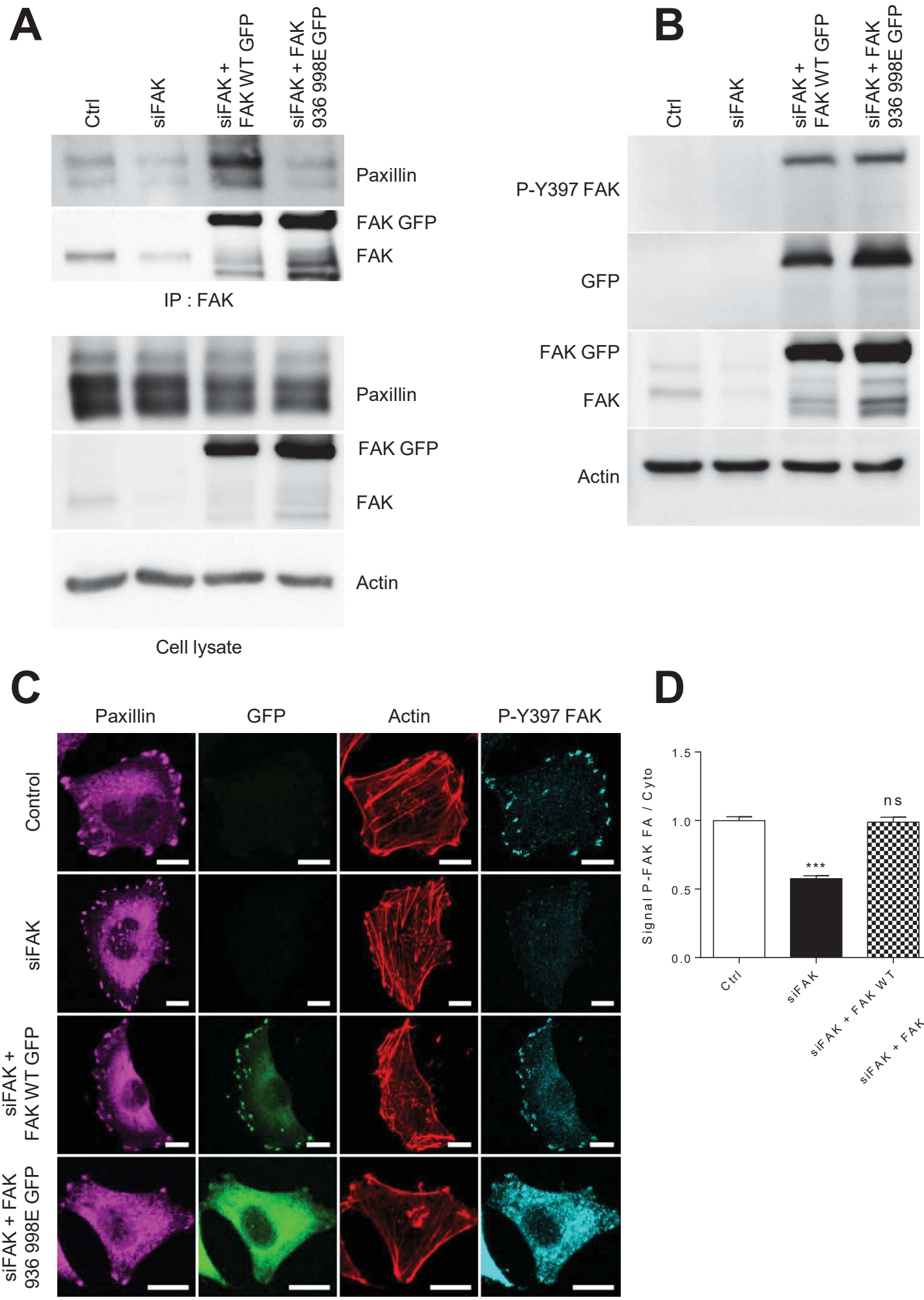
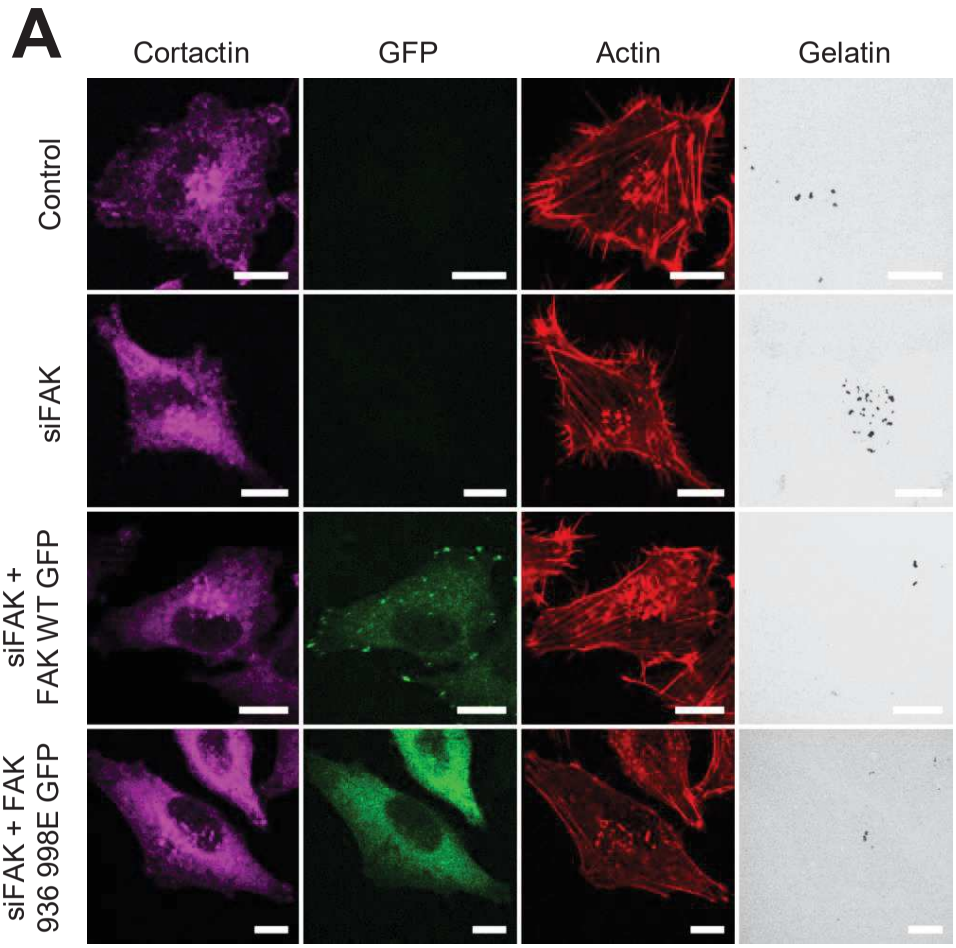
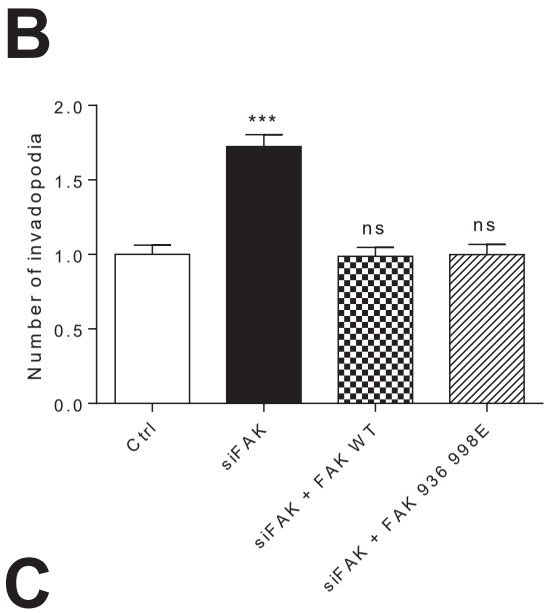

A
Ctrl
siFAK
siFAK + FAK WT GFP
siFAK + FAK 936 998E GFP
Paxillin
FAK GFP
FAK
IP : FAK
Paxillin
FAK GFP
FAK
Actin
Cell lysate
B
Ctrl
siFAK
siFAK + FAK WT GFP
siFAK + FAK 936 998E GFP
P-Y397 FAK
GFP
FAK GFP
FAK
Actin
C
Paxillin
GFP
Actin
P-Y397 FAK
Control
siFAK
siFAK + FAK WT GFP
siFAK + FAK 936 998E GFP
D
Signal P-FAK FA / Cyto
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
***
***
Ctrl
siFAK
siFAK + FAK WT
siFAK + FAK 936 998E

Figure 7


A
Cortactin
GFP
Actin
Gelatin
Control
siFAK
siFAK +
FAK WT GFP
siFAK + FAK
936 998E GFP


B
Number of invadopodia
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
ns
ns
Ctrl
siFAK
siFAK + FAK WT
siFAK + FAK 936 998E

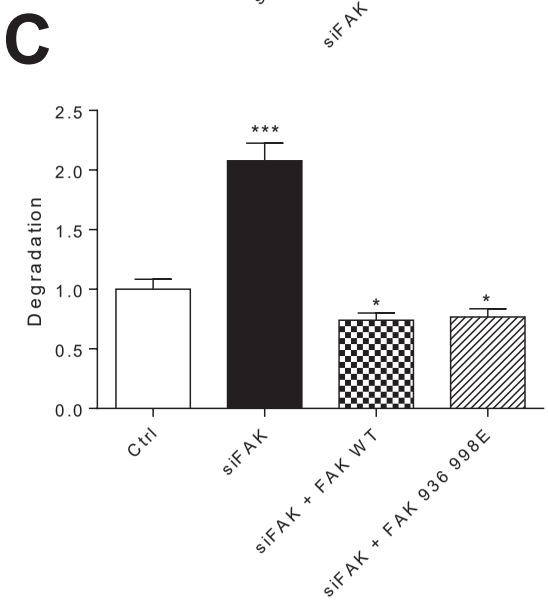

C
Degradation
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
*
*
Ctrl
siFAK
siFAK + FAK WT
siFAK + FAK 936 998E

Figure 8

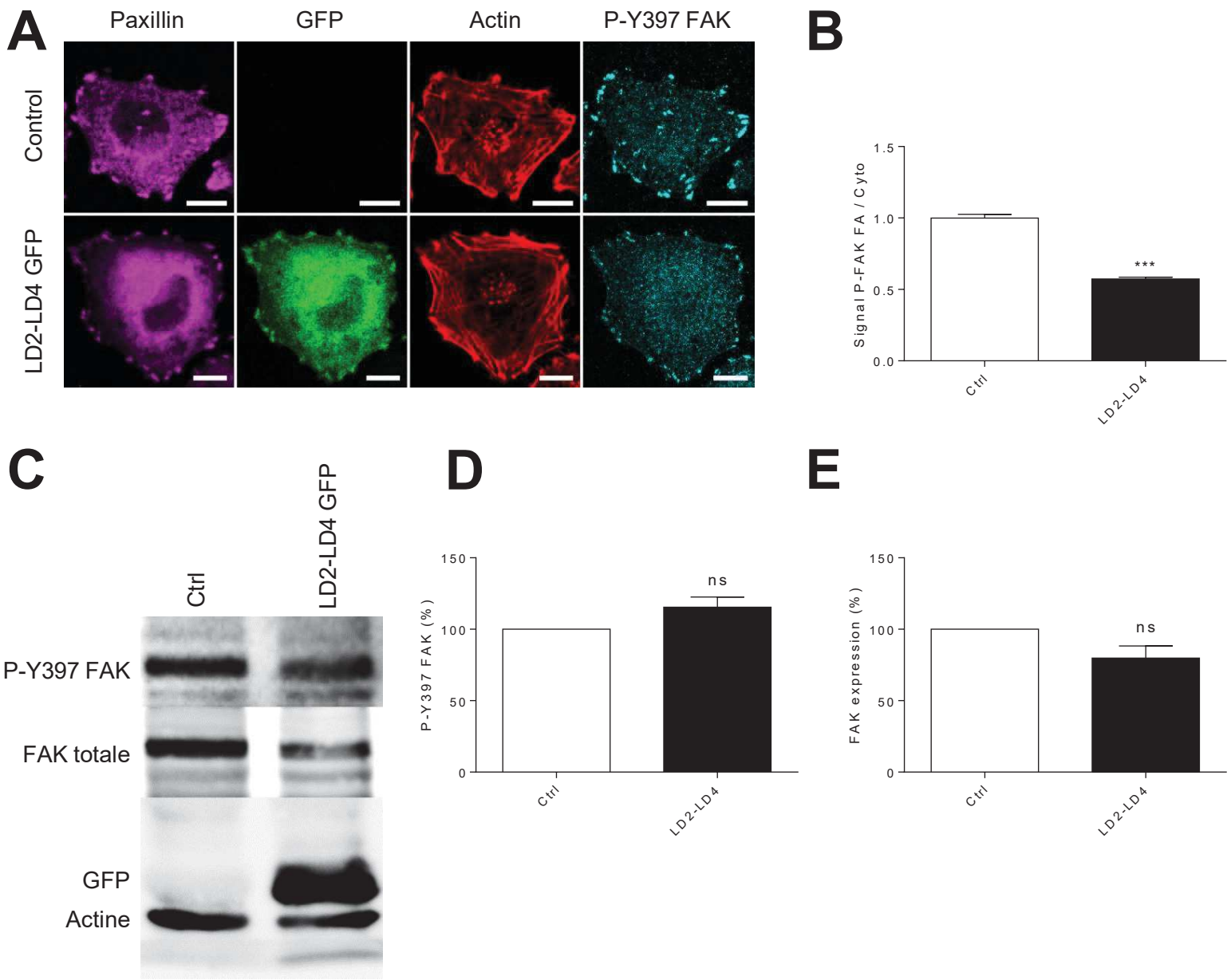
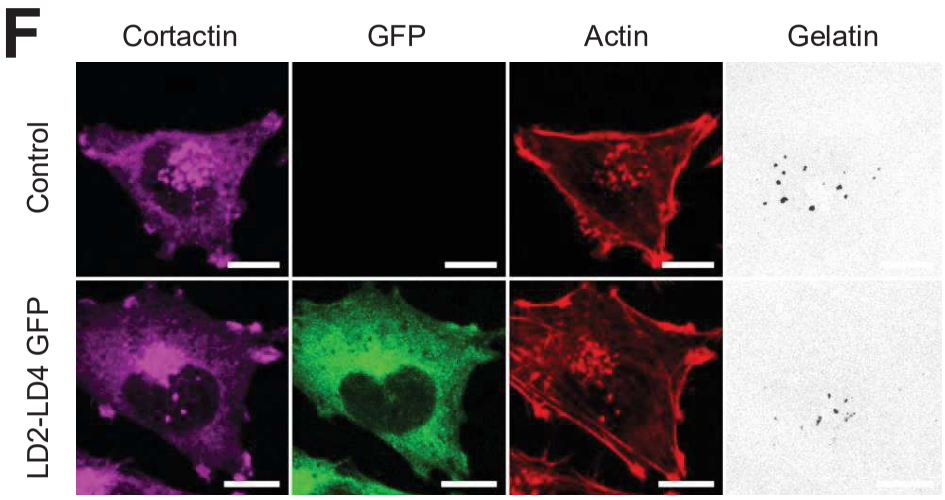
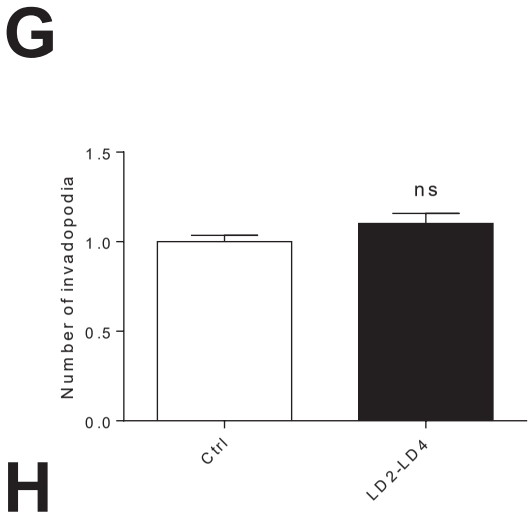
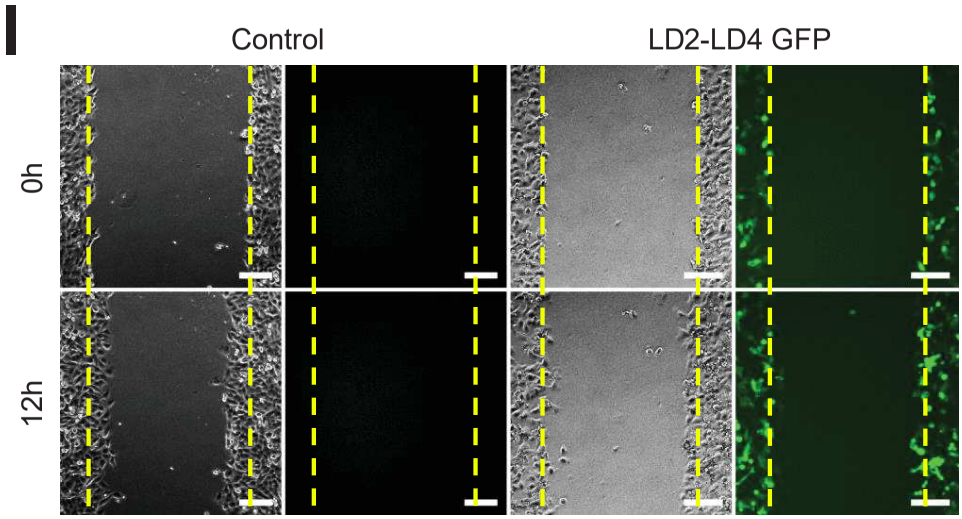
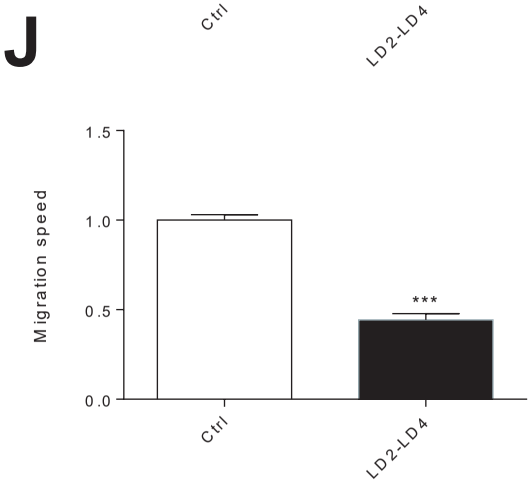

A
Paxillin
GFP
Actin
P-Y397 FAK
Control
LD2-LD4 GFP
B
Signal P-FAK FA / Cyto
1.5
1.0
0.5
0.0
***
Ctrl
LD2-LD4
C
Ctrl
LD2-LD4 GFP
P-Y397 FAK
FAK totale
GFP
Actine
D
P-Y397 FAK (%)
150
100
50
0
ns
Ctrl
LD2-LD4
E
FAK expression (%)
150
100
50
0
ns
Ctrl
LD2-LD4

Figure 8


F
Cortactin
GFP
Actin
Gelatin
Control
LD2-LD4 GFP


G
Number of invadopodia
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
Ctrl
LD2-LD4
H
Degradation
1.5
1.0
0.5
0.0
***
Ctrl
LD2-LD4


I
Control
LD2-LD4 GFP
0h
12h


J
Migration speed
1.5
1.0
0.5
0.0
***
Ctrl
LD2-LD4

L'ACTIVATION DE CD47 FAVORISE L'INVASION DES CELLULES DE MELANOME PAR LE BIAIS DE LA VOIE DE SIGNALISATION MEK-ERK

A. Contexte de la recherche

CD47 est un récepteur membranaire capable d'interagir avec la protéine transmembranaire SIRPα et avec la Thrombospondine-1 (TSP-1) afin de favoriser le développement et la dissémination des cellules cancéreuses. La surexpression du récepteur est d'ailleurs associée à un mauvais pronostique dans un certain nombre de cancers (Jaiswal et *al.,* 2009 ; Kamijo et *al.,* 2020 ; Li et *al.,* 2017 ; Wang et *al.,* 2013). Il a été démontré que l'activation de CD47 favorise l'invasion tumorale dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de mélanome, de cancer de la vessie, de carcinome épidermoïde de la tête et du cou et de cancer du poumon (Wang et *al.,* 2013 ; Willingham et *al.,* 2012 ; Zhao et *al.,* 2016a). En parallèle, de nombreuses autres études ont mis en avant le rôle pro-migratoire et pro-invasif de la TSP-1, et ce notamment dans le mélanome. Bien que les fonctions de CD47 et de la TSP-1 dans l'invasion tumorale soient bien définis, la plupart des études se sont concentrées sur l'étude du rôle de l'un ou l'autre des partenaires sans montrer clairement l'implication de l'axe TSP-1-CD47.

A. Objectif du travail

Nos travaux visaient donc à mettre en évidence les fonctions de l'axe TSP-1-CD47 dans l'invasion tumorale ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués. Pour ce faire, nous avons travaillé sur un modèle *in vitro* de mélanome murin et nous avons essayé de répondre aux questions suivantes :

- Quel est l'effet d'une activation ou d'une inhibition de CD47 sur la migration et sur la dégradation de la MEC ?
- L'interaction de la TSP-1 avec CD47 régule-t-elle la formation et l'activité des invadopodes ?
- Quelles sont les protéines impliquées dans la régulation de l'invasion tumorale par l'axe TSP-1-CD47 ?

B. Principaux résultats

Sur un modèle de type *Transwell*, nous avons observé que le peptide 4N1 et la TSP-1 inhibe la migration des cellules de mélanome et stimule parallèlement l'invasion cellulaire suggérant

ainsi un rôle anti-migratoire et pro-invasif de l'axe TSP-1-CD47. En couplant la technique de zymographie *in situ* à un marquage immunocytochimique des invadopodes, nous avons démontré que la stimulation du récepteur CD47 par le 4N1 ou la TSP-1 induit une augmentation du nombre d'invadopodes et de la dégradation des cellules. Ces effets sont inhibés par un siRNA dirigé contre CD47 et par un anticorps bloquant, le miap301. Ces résultats confirment donc l'effet pro-invasif de CD47 et suggèrent l'implication des invadopodes dans le processus. Afin d'identifier la voie de signalisation intracellulaire responsable de ces effets, l'activité des kinases Akt, Src, FAK et ERK a été quantifiée par Western Blot. Ces protéines sont à la fois des acteurs de la signalisation liée aux invadopodes et régulée (directement ou indirectement) par le CD47 dans divers modèles cellulaires (Sick et *al.,* 2012). Bien que la stimulation du récepteur CD47 ne semble pas influencer l'activité globale des protéines FAK, Src et Akt, nous avons observé qu'une stimulation par le 4N1 augmente fortement l'activité de ERK. De plus, nous avons observé qu'une inhibition du récepteur CD47 réduit partiellement la stimulation de la protéine ERK par la 4N1. Ces résultats suggèrent donc que l'activité de la protéine ERK est en partie régulée par le récepteur CD47. Sur un plan fonctionnel, l'inhibition de la protéine MEK par le PD-98 se traduit également par une diminution du nombre d'invadopode et de la dégradation matricielle induite par le 4N1 ou la TSP-1. Nous montrons ainsi la contribution du CD47 aux mécanismes pro-invasifs décrits pour la TSP-1 dans les mélanomes, ainsi que la signalisation associée via la voie des MAPK MEK-ERK.

Activation of CD47 causes invasion of melanoma cells via MEK/ERK signalling pathway

Antoine MOUSSON[1,2], Martin LETT[1,2], Philippe ANDRÉ[1,2], Denis DUJARDIN[1,2], Kenneth TAKEDA[1,2], Philippe RONDÉ[1,2], Jean-Pierre GIES[1,2], Emilie SICK[1,2*]

[1]*Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 rte du Rhin, 67401 Illkirch, France*
[2]*CNRS, UMR 7021, Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, 74 rte du Rhin, 67401 Illkirch, France*

*Correspondence to: E. Sick. Université de Strasbourg, CNRS UMR 7021, Faculté de Pharmacie, 74 rte du Rhin, BP 60024, 67401 Illkirch, France.
E-mail: esick@unistra.fr
Tel. +33 3688 54150

Abbreviations: ECM, extracellular matrix; MMP, matrix metalloprotease ; TSP-1, thrombospondin-1 ;

Running title: CD47-mediated invasion of melanoma

Key words: CD47, invadopodia, invasion, migration, melanoma, thrombospondin-1,

ABSTRACT

CD47 is a membrane-spanning receptor that plays a key role in the tumour microenvironment. The overexpression of CD47 in many cancers is associated with a poor prognosis. We show that activation of CD47 increases murine B16F10 melanoma cell invasion and decreases migration. Conversely, when cells were transfected with a siRNA directed against CD47, invasion was decreased and migration was increased, suggesting that CD47 is a constitutively activated pro-invasive receptor in melanoma cells. Augmented cell invasion induced by CD47 stimulation is associated with an increase in the number of invadopodia per cell and an increase in the proteolytic activity of invadopodia. These effects are inhibited by an anti-CD47 blocking antibody and a siRNA against CD47. Downstream signalling following CD47 activation responsible for increased invasion involves the MEK/ERK pathway. This signalling pathway is one of the known pathways that orchestrates the formation and activation of invadopodia, resulting in an increase in their matrix proteolysis activity. Our data indicate that CD47 receptors have a stimulatory role in cell invasion and demonstrate for the first time that CD47 signals via the MEK/ERK pathway to increase invadopodia activity.

INTRODUCTION

CD47 is a 50 kDa five segment membrane-spanning receptor which is ubiquitously expressed. This receptor was also termed IAP (integrin-associated protein) because it co-purifies and interacts with integrins (Brown and Frazier, 2001). CD47 is implicated in many normal and pathological processes including inflammation, phagocytosis, cardiovascular effects, cell adhesion, apoptosis and proliferation (Sick et al., 2012). Given this diversity of actions, attention was paid to deciphering the roles of CD47 in cancers and in the tumor microenvironment. This is because an increase in CD47 expression has been described in many cancers, including colorectal cancers (Hu et al., 2020), ovarian cancer (Li et al., 2017), leukemia (Jaiswal et al., 2009), breast cancer (Betancur et al., 2017), melanoma (Wang et al., 2013) and cutaneous T-cell lymphoma (Kamijo et al., 2020) and is associated with a poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia, cutaneous T-cell lymphoma and breast cancer.

CD47 interacts with signal regulatory protein α (SIRPα) and thrombospondin-1 (TSP-1) regulating various cellular responses. SIRPα are transmembrane proteins that contain three immunoglobulin-like domains in their extracellular region and a cytoplasmic region with two immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs (ITIMs) (Murata et al., 2020). Through SIRPα, CD47 inhibits the phagocytosis of SIRPα-expressing macrophages, thus mediating a "don't eat me" signal (Oldenborg et al., 2000). The CD47-SIRPα axis is also implicated in tumor immunosurveillance. Thus, targeting CD47-SIRPα axis is becoming a focus of attention in cancer immunotherapy. Currently, several CD47-blocking antibodies and SIRPα-Fc fusion proteins are being studied in clinical trials involving a wide range of cancer types (Huang et al., 2020).

TSP-1 is a 450 kDa multimodular matricellular protein not constitutively present in the extracellular matrix. It is transiently expressed under specific conditions, leading to altered cell behavior and ECM remodeling via its interactions with growth factors in the ECM and by engaging specific transmembrane receptors, including proteoglycans, integrins, CD36 and CD47 (Adams and Lawler, 2011; Kaur and Roberts, 2016). TSP-1 is a key player in the tumor microenvironment and is widely known as an endogenous inhibitor of angiogenesis (Isenberg et al., 2009). However, the effects of TSP-1 on tumor progression are multifaceted, cancer-type dependent and sometimes inconsistent with its anti-angiogenic effects (Huang et al., 2017a). For example, TSP-1 has adhesive properties that support cancer cell growth (Chandrasekaran et al., 1999; Albo et al., 2000), promotes metastatic properties of breast cancer cells (Yee et al., 2009), facilitates the invasion of squamous cell carcinoma (Pal et al., 2016), breast cancer

(Horiguchi et al., 2013), melanoma (Borsotti et al., 2015) and gastric cancer (Huang et al., 2017b). However, TSP-1 inhibited migration of renal carcinoma cells (Bienes-Martinez et al., 2012) and endothelial cells *in vitro* and *in vivo* (Tzeng et al., 2017). These results reinforce the pleotropic nature of TSP-1 actions which depend on the tumor microenvironment and its different receptors, thus accounting for its different effects on migratory and invasive cell behaviour.

While the CD47-TSP-1 axis is clearly identified as playing a crucial role in tumour invasion and progression, the underlying molecular and cellular mechanisms remain poorly understood. Our objective was to investigate the effect of CD47 activation on highly invasive murine B16F10 melanoma cells. We show for the first time that activation of CD47 with TSP-1 and peptide 4N1, a widely used CD47 agonist derived from the C-terminal domain of TSP-1, increases invasion while inhibiting the migration of melanoma cells. This increased cell invasion was associated with an increase in the formation of invadopodia, which are membrane protrusions enriched with matrix metalloproteases. Stimulation of CD47 by TSP-1 or 4N1 resulted in an increase in the surface area of degraded ECM. This effect was inhibited by a siRNA against CD47 and an anti-CD47 function-blocking antibody (Ab), consistent with CD47-mediated invasion being dependent on MEK/ERK activation.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and reagents

Peptide 4N1 (RFYVVMWK) was from Bachem (Bubendorf, Switzerland). Thrombospondin-1 (TSP-1), PD98059 and anti-cortactin mAb were from Merck Millipore (Darmstadt, Germany). Horseradish peroxidase-conjugated Abs, Alexa Fluor™-conjugated Abs, anti-phospho-Y397 FAK, Alexa Fluor™568-phalloidin, and Lipofectamine 2000 were from ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). Phospho-p44/p42 MAPK (ERK1/2), p44/p42 MAPK (ERK1/2), phospho-Akt and Akt Abs, anti-Src and anti-Y418-phospho-Src were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). The anti-CD47 Miap301 mAb and the anti-FAK mAb was from BD Biosciences (San Diego, CA, USA).

Cell culture conditions and transfection

Murine B16F10 melanoma cells (ATCC, Rockville, IN, USA; ECACC, Salisbury, UK) were maintained in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 100 UI/mL penicillin and 50 μg/mL streptomycin. Culture medium and supplies were from Lonza (Basel, Switzerland). Cells were grown at 37°C in a humidified incubator with 5% CO_2 in air.

For siRNA transfections, B16F10 cells were plated at $1.5x10^5$ cells in 6-well plates. 18 h later, cells were transfected with 50 pmol of siRNA using 5 μl Lipofectamine 2000 in 500 μl Opti-MEM (Lonza). Control siRNA and siRNA against CD7 were from Thermo Fisher Scientific. Transfected cells were incubated for 48 h at 37°C before use.

Cell invasion and migration assay

Invasion was assessed using 24-well plates with Matrigel™-coated inserts (BD Biosciences) and migration was assessed using uncoated inserts. B16F10 cells ($1x10^5$) were seeded on the inner part of the insert (8 μm pore size) in 500 μL serum-free DMEM and placed in wells containing 500 μL DMEM supplemented with 10% FBS as chemo-attractant. After 24 h at 37°C, the inserts' inner surfaces were swabbed to remove non-invasive cells. Cells from the outer side of the membrane were fixed in 4% paraformaldehyde and stained with DAPI. Invading and migrating cells were counted using an epifluorescence microscope. The percent invasion was determined as the ratio of the mean number of cells invading through Matrigel™ insert membranes over the mean number of migrating cells through non-coated insert

membranes. The invasion index is expressed as the ratio of the percent invasion of test cells over the percent invasion of control cells (Kolli-Bouhafs et al., 2014).

In vitro fluorescent matrix digestion assay and Immunofluorescence

Cells ($3x10^4$) were seeded in IBIDI LabTek dishes (35 mm with glass bottom, Nunc Wiesbaden, Germany) previously coated or not with fluorescent-labelled gelatin (QCM™ Gelatin Invadopodia Assay, Merck Millipore) in DMEM supplemented with 10% FBS. After 24 h at 37°C, cells were fixed using 4% paraformaldehyde for 15 min and then permeabilized using Triton X-100 at 0.05%. Non-specific binding sites were blocked by incubating cells in 1% bovine serum albumin (BSA) at room temperature for 1 h. Cells were then labeled during 1 h with anti-cortactin Ab (1/250). After 3 washes with PBS, cells were incubated with Alexa 488-conjugated goat anti-mouse Ab (1/1000) and Alexa 568-conjugated phalloidin for 1 h, washed 3x with PBS and then observed using a Leica TSC SPE confocal microscope (63x HCX Pl Apo 1.32 NA objective, Wetzlar, Germany). Areas of degradation were identified as black holes on fluorescent-labelled gelatin and quantified using ImageJ software. Colocalization of actin- and cortactin-rich dots was used to identify invadopodia.

Western Blotting

Cells were grown in 6-well plates to 80% confluency, treated and the medium was then aspirated, and cells were rinsed twice with ice-cold PBS. Cells were then lysed with and scraped loose into ice-cold RIPA lysis buffer for Western Blotting (1 M Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 2 mM sodium orthovanadate, 10 mM NaF, 5 mM Na pyrophosphate) supplemented with Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Fischer Scientific). After centrifugation at 14 000x *g* for 10 min at 4°C, supernatants were boiled for 5 min in Laemmli sample buffer supplemented with 50 mM DTT. Equal amounts of lysed and boiled protein (20 µg/well) were loaded and subjected to electrophoresis on 10% polyacrylamide gels (BioRad, Hercules, CA, USA). Separated proteins were transferred to PVDF membranes (GE Healthcare), which were then blocked for 1 h at room temperature using 5% BSA in TBS-T (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween20 at a pH of 7.4). Membranes were then incubated overnight at 4°C with the primary Ab. Concentrations were chosen according to the manufacturer's instructions. Secondary horseradish peroxydase-conjugated Ab was incubated for 1 h at room temperature and proteins were detected using an enhanced chemiluminescence kit (Biorad). Image J software was used for densitometric analysis.

Statistical Analysis

Results are presented as mean ± s.e.m. of at least 3 independent experiments. Statistical analysis was done using Student's t-test. Significant differences are represented throughout as *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$.

RESULTS

CD47 inhibits cell migration while increasing invasion of melanoma cells

The effects of 4N1 and TSP-1, two well-characterized CD47 agonists (Sick et al., 2012), were assessed on the migration and invasion and of murine B16F10 melanoma cells, a model of invasive melanoma. Migration was evaluated using the Boyden chamber assay with 10% FBS as a chemoattractant. As illustrated in Fig. 1A, cell migration was inhibited by 70% by 4N1 and by 15% by TSP-1. In order to evaluate the role of CD47 in cell migration, B16F10 cells were treated with siCD47 (siRNA against CD47) for 48 h. Western blot analysis of CD47 expression revealed that knock-down efficiency reached 50% after 48 h of siRNA transfection (not shown). Migration of siCD47-treated cells was increased by 140%. Thus, CD47 stimulation by either 4N1 or TSP-1 decreased migration of B16F10 melanoma cells and consistently, CD47 knock-down resulted in increased migration.

Invasion was assessed in the Boyden chamber assay using Matrigel-coated inserts and 10% FBS as chemoattractant where cells degrade and migrate through Matrigel. In order to remove intrinsic migration properties, the invasion index was calculated by dividing the percentage of cells invading through Matrigel-coated inserts by the percentage of cells migrating through non-coated inserts (Kolli-Bouhafs et al., 2014). We found that stimulation of CD47 using 4N1 and TSP-1 increased cell invasion by 100% and 90% respectively (Fig. 1B). In contrast, invasion of CD47-deficient cells was decreased by 53%. Taken together, these data are consistent with CD47 being a constitutive contributor to melanoma cell invasion while opposing cell migration.

Activation of CD47 increases the number of invadopodia and their proteolytic activity

In melanoma cells, as in many types of highly invasive cancer cells, specialized matrix-degrading organelles called invadopodia have been identified. These actin-based protrusions are enriched with proteolytic enzymes such as MMPs, which are responsible for ECM degradation (Murphy and Courtneidge, 2011). To elucidate the mechanism involved in CD47-mediated cell invasion, the number of invadopodia, identified as actin- and cortactin-rich punctiform structures, was quantified after immunostaining.

As illustrated in Fig. 2A, the number of invadopodia in B16F10 melanoma was increased by 52% and 67% respectively by 4N1 and TSP-1 treatment. Transfection with siCD47 did not increase the number of invadopodia, which were similar to the siCtrl condition and for untreated cells. However, transfection with siCD47 resulted in a nearly total inhibition

of the formation of invadopodia induced by 4N1 and TSP-1. In order to confirm these data, in another set of experiments, cells were pre-incubated for 1 h with anti-CD47 Ab (1 μg/mL) before challenge with 4N1 or TSP-1. As shown in Fig. 2B, similarly to what was observed in CD47-deficient cells, the function-blocking anti-CD47 Ab abolished the increase in invadopodia formation induced by 4N1 and TSP-1. The function blocking anti-CD47 Ab did not influence the basal level of invadopodia in control cells. These results indicate that stimulation of CD47 by 4N1 and TSP-1 increases the number of invadopodia per cell.

In order to verify whether the increase in the number of invadopodia translates into an increase in their functionality, the degradation of the ECM was evaluated. Cells were plated on fluorescent gelatin as substrate and the area of degradation were measured. As illustrated in Fig. 3A, quantification of fluorescent gelatin degradation revealed that matrix degradation was increased by 67% and 59% respectively by 4N1 and TSP-1. Cell transfection with siCD47 did not result in a significant increase in the area of degradation, being similar to siCtrl-treated cells and untreated cells. However, the increase in matrix proteolysis induced by 4N1 or TSP-1 stimulation of CD47 is inhibited in CD47-deficient cells. To confirm these data, cells were pre-incubated for 1 h with anti-CD47 Ab (1 μg/mL) or left untreated before challenge with 4N1 or TSP-1 (Fig. 3B). Similarly to what was observed in CD47-deficient cells, the function-blocking anti-CD47 Ab abolished the proteolytic activity of invadopodia induced by 4N1 and TSP-1. The function blocking anti-CD47 Ab did not influence the basal level of invadopodia in control cells. Thus, CD47 stimulation by 4N1 and TSP-1 increases the number of invadopodia per cell and also their proteolytic activity. These effects were abolished by CD47 knockdown or by pretreatment with anti-CD47 Ab.

CD47 activation stimulates a MEK/ERK-dependent pathway in melanoma cells

In order to identify the intracellular signalling pathways responsible for the pro-invasive effect of CD47 in melanoma, the phosphorylation levels of several kinases known to be implicated in invasion were studied by Western Blot. Upon treatment with 4N1, a time-dependent increase in phosphorylation of ERK1/2 was observed in B16F10 cells (Fig. 4A), with a maximal effect being obtained after 1-5 min. Akt, FAK, and Src phosphorylation levels were unaffected when cells were treated with 4N1 (not shown). As illustrated in Fig. 4B, TSP-1 induced a weak increase in phosphorylation of ERK1/2 after 1 min but this effect was not significant ($p = 0.053$). Again, Akt, FAK, and Src phosphorylation levels were not significantly affected when cells were treated with TSP-1 (not shown). 4N1-induced ERK1/2 phosphorylation level was significantly decreased by 40% by anti-CD47 Ab and by almost 75%

in CD47-deficient cells (Fig. 4C). Finally, the involvement of MEK in the upstream pathway of ERK1/2 was assessed after 4N1 treatment using PD98059, a selective MEK inhibitor. As ERK1/2 phosphorylation levels were basally detected in B16F10 cells, a concentration-response curve of the effect of PD98059 was first performed in order to determine the minimum effective concentration that does not affect the basal phosphorylation rate of ERK1/2 (not shown). As illustrated in Fig. 4D, PD98059 (5 μM) has no effect on the basal phosphorylation rate of ERK1/2, but on the other hand, this MEK inhibitor strongly and almost totally reduced the phosphorylation of ERK1/2 induced by 4N1. Taken together, these data are consistent with stimulation of CD47 by 4N1 in melanoma cells resulting in the activation of MEK-ERK downstream signaling pathways.

The MEK-ERK pathway is responsible for CD47-mediated invasion in melanoma cells

We showed that CD47 activation by 4N1 in melanoma cells results in the activation of the MEK-ERK pathway. However, in order to assess if this signalling pathway is responsible for the pro-invasive effect attributed to CD47, cells were pre-treated with PD98059 (5 μM) and the number of invadopodia per cell was quantified in the presence of 4N1 and TSP-1. As shown in Fig. 5, PD98059 did not affect the basal number of invadopodia per cell. However, pre-treatment of cells with PD98059 resulted in almost total inhibition of invadopodia formation induced by stimulation of CD47 by 4N1 and TSP-1. These results show that 4N1 and TSP-1 increase the number of invadopodia and that this effect is blocked by inhibition of a MEK-dependent signalling pathway.

Furthermore, the degradation of the ECM induced by CD47 stimulation with 4N1 and TSP-1 was also inhibited by PD98059, as illustrated in Fig. 6. PD98059 did not change the basal degradation surface area per cell, consistent with the lack of effect of the MEK inhibitor on the number of invadopodia.

DISCUSSION

This study examined the roles of CD47 activation in highly invasive murine B16F10 melanoma cells. We show that activation of CD47 by TSP-1 and peptide 4N1 increases invasion while inhibiting the migration of melanoma cells. This increased cell invasion was associated with an increase in the formation of invadopodia. Stimulation of CD47 by TSP-1 or 4N1 resulted in an increase in the surface area of degraded ECM. Downstream signalling following CD47 activation responsible for increased invasion involves the MEK/ERK pathway.

While the role of the TSP-1-CD47 axis in angiogenesis is well documented (Tsuchida et al., 2014), its role in tumor metastasis is only now emerging. Overexpression of CD47 in ovarian cancer cells has been found to promote invasion and to induce an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) (Li et al., 2017). Indeed, it has been shown that overexpression of CD47 increases the level of expression of N-cadherin, a well-known marker of EMT, and decreases the expression of E-cadherin. Similar results were described by Jayachandran et al. (2014) with TSP-1 increasing the invasion of human melanoma cells and promoting an aggressive phenotype through the EMT. However, it is not known whether this effect was mediated by CD47. In non-small cell lung cancer cells, CD47 knockdown suppressed invasion and it was suggested that CD47 may control invasion/migration through Cdc42 expression in these cells (Zhao et al., 2016). Overexpression of CD47 in epithelial ovarian cancer cells resulted in increased invasion and migration (Wang et al., 2019). Thus, most reports have focused on examining the role of various partners of CD47 in tumor cell invasion without clearly showing the involvement of the TSP-1-CD47 axis.

However, studies using TAX2 are consistent with the involvement of the TSP-1-CD47 axis in tumor invasion. TAX2 is a peptide derived from CD47 whose cyclized sequence mimics the interaction region of CD47 with the CBD domain of TSP-1 (Floquet et al., 2008). This peptide selectively blocked the interaction of TSP-1 with CD47 and was initially described as an inhibitor of tumor angiogenesis (Jeanne et al., 2015). In addition, TAX2 was recently shown to inhibit hypoxia-induced cell invasion in glioblastoma cell spheroids embedded in collagen (Daubon et al., 2019).

Here, we found that activation of CD47 by TSP-1 stimulates the invasion of melanoma cells in a Boyden chamber model. This model allows us to clearly identify the respective contributions of cell migration on one hand, and the degradation of the ECM on the other hand, with cell invasion ultimately resulting from the coordinated regulation of these two processes. The pro-invasive effects induced by CD47 stimulation were linked to an increase in the

formation of invadopodia and an increased capacity of cells to degrade the ECM. Taken together, we have thus described an anti-migratory role of CD47 while highlighting its pro-invasive character in B16F10 melanoma cells. In addition, CD47 receptors appeared to be basally activated in our cells since transfection with siCD47 induced increased migration and decreased invasion. Our data are consistent with studies showing a correlation between CD47 expression in biopsies of various cancers with poor prognosis or with tumoral grade (Jaiswal et al., 2009; Betancur et al., 2017; Daubon et al., 2019; Kamijo et al., 2020), which might be explained at least in part by basal activation of CD47.

We demonstrated that the formation of invadopodia and the increased degradation of the ECM following CD47 stimulation results from the activation of the MEK/ERK pathway. ERK appears to be one of the proteins involved in intracellular CD47 signalling in cancers. For example, a recent report showed that CD47 overexpression increases the level of phosphorylation of ERK, but not JNK and p38, thus promoting proliferation and migration of colorectal cancer cells (Hu et al., 2020). According to this study, CD47 enhanced aerobic glycolysis and activation of ERK by upregulating ENO1, a glycolytic enzyme regulating proliferation and metastasis in colorectal cancer. ENO-1 is co-immunoprecipitated and co-localized with CD47 in these cells and represents a target for CD47-mediated ERK phosphorylation (Hu et al., 2020). The involvement of ERK1/2 was described in the intracellular signalling pathway responsible for the activity of invadopodia (Siqueira et al., 2016). Indeed, it was shown that laminin peptide (C16) increases the activity of invadopodia in squamous basal carcinoma cells (CAL27) and fibrosarcoma cells (HT1080) and that this effect was related to β1 integrin activation (Siqueira et al., 2016). These studies are consistent with our observation that the MEK/ERK pathway stimulates invadopodia activity in murine B16F10 melanoma cells. However, in CAL27 and HT1080 cells, C16 increased Src phosphorylation (Siqueira et al., 2016). Indeed, Src signalling is essential for the assembly of invadopodia and cortactin, whose phosphorylation status controls the formation of invadopodia, is also necessary (Eddy et al., 2017; Paterson and Courtneidge, 2018). In addition to tyrosine phosphorylation and activation, cortactin is phosphorylated by serine/threonine kinases, including ERK/MAP kinases, protein kinase D, and p21-activated kinase (Yin et al., 2017). Unexpectedly, we were unable to detect significant changes in phosphorylation of Src and cortactin in cells stimulated by TSP-1 or 4N1 compared to control cells (data not shown). However, it cannot be excluded that local Src activation occurs and that phosphorylated Src subsequently translocates into invadopodia in order to orchestrate their activity, as we previously described in B16F10 cells (Kolli-Bouhafs et al., 2014). This would therefore require further investigation. Similarly, the

low level of ERK phosphorylation observed in cells treated with TSP-1 compared to cells treated with 4N1, where a clear increase in ERK phosphorylation was found, merits further study. These results are puzzling since the formation of invadopodia and the degradation of gelatin-FITC were inhibited by PD98, a MEK inhibitor. However, some studies have shown that TSP-1 inhibits the phosphorylation of ERK by stimulating the recruitment of phosphatases. For example, the TSP-1-CD47 axis increased choroidal endothelial cell viability, migration and tubule formation via tyrosine phosphatase Src homology 2 (SH2)-containing protein tyrosine phosphatase 2 (SHP-2), with an upregulation of the STAT-iNOS pathway during oxidative stress (Li et al., 2020). Similarly, H_2S stimulated T cell activation by potentiating MEK-dependent ERK phosphorylation and TSP-1 inhibited this effect in a CD47-dependent manner (Miller et al., 2013). As above, we cannot exclude that local ERK activation occurs and that phosphorylated cortactin subsequently translocates into the invadopodia in order to orchestrate their activity.

In conclusion, our data indicate that the activation of CD47 receptors increases the invasion of B16F10 murine melanoma cells, upregulating the formation of invadopodia and the degradation of the ECM. We demonstrated that the CD47-associated signalling pathway underlying this effect involves MEK/ERK. Pertinently, targeting BRAF and/or MEK using specific inhibitors has become the standard of care for patients with late-stage mutant BRAF melanomas, although the benefits are often of limited duration due to rapid development of resistance (Algazi et al., 2020). BRAF/MEK inhibitors promoted CD47 expression by upregulating transcription factor NRF-1, an effect reversed by ERK inhibition (Liu et al., 2017). Thus, according to our results, therapies targeting BRAF/MEK may well decrease the invasiveness of melanoma cells and inhibition of ERK might therefore be a relevant additional strategy.

Acknowledgements. This work was in part supported by the CNRS, the Université de Strasbourg and the Ligue Contre le Cancer (grant to PR, from the Comité du Haut-Rhin et du Bas-Rhin). AM was recipient of a Fellowship from the Ministère de la Recherche.

REFERENCES

Adams, J.C., and Lawler, J. (2011). The thrombospondins. Cold Spring Harbor Perspect Biol *3*: a009712 .

Albo, D., Rothman, V.L., Roberts, D.D., and Tuszynski, G.P. (2000). Tumour cell thrombospondin-1 regulates tumour cell adhesion and invasion through the urokinase plasminogen activator receptor. Br J Cancer *83*: 298–306.

Algazi, A.P., Othus, M., Daud, A.I., Lo, R.S., Mehnert, J.M., Truong, T.-G., et al. (2020). Continuous versus intermittent BRAF and MEK inhibition in patients with BRAF-mutated melanoma: a randomized phase 2 trial. Nat Med *26*: 1564–1568.

Betancur, P.A., Abraham, B.J., Yiu, Y.Y., Willingham, S.B., Khameneh, F., Zarnegar, M., et al. (2017). A CD47-associated super-enhancer links pro-inflammatory signalling to CD47 upregulation in breast cancer. Nat Commun *8*:14802.

Bienes-Martínez, R., Ordóñez, A., Feijoo-Cuaresma, M., Corral-Escariz, M., Mateo, G., Stenina, O., et al. (2012). Autocrine stimulation of clear-cell renal carcinoma cell migration in hypoxia via HIF-independent suppression of thrombospondin-1. Sci Rep *2*:788.

Borsotti, P., Ghilardi, C., Ostano, P., Silini, A., Dossi, R., Pinessi, D., et al. (2015). Thrombospondin-1 is part of a Slug-independent motility and metastatic program in cutaneous melanoma, in association with VEGFR-1 and FGF-2. Pigment Cell Melanoma Res. *28*: 73–81.

Brown, E. and Frazier, W.A. (2001). Integrin-associated protein (IAP) and its ligands. Trends Cell Biol *11*: 130–135.

Chandrasekaran, S., Guo, N., Rodrigues, R.G., Kaiser, J., and Roberts, D.D. (1999). Pro-adhesive and chemotactic activities of thrombospondin-1 for breast carcinoma cells are mediated by α3β1 integrin and tegulated by insulin-like growth factor-1 and CD98. J Biol Chem *274*: 11408-11416.

Daubon, T., Léon, C., Clarke, K., Andrique, L., Salabert, L., Darbo, E., et al. (2019). Deciphering the complex role of thrombospondin-1 in glioblastoma development. Nat Commun *10*: 1146.

Eddy, R.J., Weidmann, M.D., Sharma, V.P., and Condeelis, J.S. (2017). Tumor cell invadopodia: invasive protrusions that orchestrate metastasis. Trends Cell Biol *27*: 595–607.

Floquet, N., Dedieu, S., Martiny, L., Dauchez, M., and Perahia, D. (2008). Human thrombospondin's (TSP-1) C-terminal domain opens to interact with the CD-47 receptor: a molecular modeling study. Arch Biochem Biophys *478*: 103-109.

Horiguchi, H., Yamagata, S., Rong Qian, Z., Kagawa, S., and Sakashita, N. (2013). Thrombospondin-1 is highly expressed in desmoplastic components of invasive ductal carcinoma of the breast and associated with lymph node metastasis. J Med Invest *60*: 91–96.

Hu, T., Liu, H., Liang, Z., Wang, F., Zhou, C., Zheng, X., et al. (2020). Tumor-intrinsic CD47 signal regulates glycolysis and promotes colorectal cancer cell growth and metastasis. Theranostics *10*: 4056–4072.

Huang, C.-Y., Ye, Z.-H., Huang, M.-Y., and Lu, J.-J. (2020). Regulation of CD47 expression in cancer cells. Transl Oncol *13*: 100862.

Huang, T., Sun, L., Yuan, X., and Qiu, H. (2017a). Thrombospondin-1 is a multifaceted player in tumor progression. Oncotarget *8*: 84546–84558.

Huang, T., Wang, L., Liu, D., Li, P., Xiong, H., Zhuang, L., et al. (2017b). FGF7/FGFR2 signal promotes invasion and migration in human gastric cancer through upregulation of thrombospondin-1. Int J Oncol *50*: 1501–1512.

Isenberg, J.S., Shiva, S., and Gladwin, M. (2009). Thrombospondin-1–CD47 blockade and exogenous nitrite enhance ischemic tissue survival, blood flow and angiogenesis via coupled NO–cGMP pathway activation. Nitric Oxide *21*: 52–62.

Jaiswal, S., Jamieson, C.H.M., Pang, W.W., Park, C.Y., Chao, M.P., Majeti, R., et al. (2009). CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. Cell *138*: 271–285.

Jayachandran, A., Anaka, M., Prithviraj, P., Hudson, C., McKeown, S.J., Lo, P.-H., et al. (2014). Thrombospondin 1 promotes an aggressive phenotype through epithelial-to-mesenchymal transition in human melanoma. Oncotarget *5*: 5782–5797.

Jeanne, A., Sick, E., Devy, J., Floquet, N., Belloy, N., Theret, L., et al. (2015). Identification of TAX2 peptide as a new unpredicted anti-cancer agent. Oncotarget *6*: 17981–18000.

Kamijo, H., Miyagaki, T., Takahashi-Shishido, N., Nakajima, R., Oka, T., Suga, H., et al. (2020). Thrombospondin-1 promotes tumor progression in cutaneous T-cell lymphoma via CD47. Leukemia *34*: 845–856.

Kaur, S., and Roberts, D.D. (2016). Divergent modulation of normal and neoplastic stem cells by thrombospondin-1 and CD47 signaling. Int J Biochem Cell Biol *81*: 184–194.

Kolli-Bouhafs, K., Sick, E., Noulet, F., Gies, J.-P., De Mey, J., and Rondé, P. (2014). FAK competes for Src to promote migration against invasion in melanoma cells. Cell Death Dis *5*: e1379.

Li, Y., Lu, S., Xu, Y., Qiu, C., Jin, C., Wang, Y., et al. (2017). Overexpression of CD47 predicts poor prognosis and promotes cancer cell invasion in high-grade serous ovarian carcinoma. Am J Transl Res *9*: 2901–2910.

Li, J., He, J., Zhang, X., Li, J., Zhao, P., and Fei, P. (2020). TSP1 ameliorates age-related macular degeneration by regulating the STAT3-iNOS signaling pathway. Exp Cell Res *388*: 111811.

Liu, F., Jiang, C.C., Yan, X.G., Tseng, H.-Y., Wang, C.Y., Zhang, Y.Y., et al. (2017). BRAF/MEK inhibitors promote CD47 expression that is reversible by ERK inhibition in melanoma. Oncotarget *8*: 69477–69492.

Miller, T.W., Kaur, S., Ivins-O'Keefe, K., and Roberts, D.D. (2013). Thrombospondin-1 is a CD47-dependent endogenous inhibitor of hydrogen sulfide signaling in T cell activation. Matrix Biol *32*: 316–324.

Murata, Y., Saito, Y., Kotani, T., and Matozaki, T. (2020). Blockade of CD47 or SIRPα: a new cancer immunotherapy. Exp Opinion Therap Targets *2:* 1–7.

Murphy, D.A., and Courtneidge, S.A. (2011). The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. Nat Rev Mol Cell Biol *12*: 413–426.

Oldenborg, P.-A. (2000). Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. Science *288*: 2051–2054.

Pal, S.K., Nguyen, C.T.K., Morita, K., Miki, Y., Kayamori, K., Yamaguchi, A., et al. (2016). THBS1 is induced by TGFB1 in the cancer stroma and promotes invasion of oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med *45*: 730–739.

Paterson, E.K., and Courtneidge, S.A. (2018). Invadosomes are coming: new insights into function and disease relevance. FEBS J *285*: 8–27.

Sick, E., Jeanne, A., Schneider, C., Dedieu, S., Takeda, K., and Martiny, L. (2012). CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest. Br J Pharmacol *167*: 1415–1430.

Siqueira, A.S., Pinto, M.P., Cruz, M.C., Smuczek, B., Cruz, K.S.P., Barbuto, J.A.M., et al. (2016). Laminin-111 peptide C16 regulates invadopodia activity of malignant cells through β1 integrin, Src and ERK 1/2. Oncotarget *7*: 47904–47917.

Tsuchida, R., Osawa, T., Wang, F., Nishii, R., Das, B., Tsuchida, S., et al. (2014). BMP4/Thrombospondin-1 loop paracrinically inhibits tumor angiogenesis and suppresses the growth of solid tumors. Oncogene *33*: 3803–3811.

Tzeng, H.-T., Tsai, C.-H., Yen, Y.-T., Cheng, H.-C., Chen, Y.-C., Pu, S.-W., et al. (2017). Dysregulation of Rab37-mediated cross-talk between cancer cells and endothelial cells via thrombospondin-1 promotes tumor neovasculature and metastasis. Clin Cancer Res *23*: 2335–2345.

Wang, C.-L., Lin, M.-J., Hsu, C.-Y., Lin, H.-Y., Tsai, H.-P., Long, C.-Y., et al. (2019). CD47 promotes cell growth and motility in epithelial ovarian cancer. Biomed Pharmacotherap *119*: 109105.

Wang, Y., Xu, Z., Guo, S., Zhang, L., Sharma, A., Robertson, G.P., et al. (2013). Intravenous delivery of siRNA targeting CD47 effectively inhibits melanoma tumor growth and lung metastasis. Mol Therap *21*: 1919–1929.

Yee, K.O., Connolly, C.M., Duquette, M., Kazerounian, S., Washington, R., and Lawler, J. (2009). The effect of thrombospondin-1 on breast cancer metastasis. Breast Cancer Res Treat *114*: 85–96.

Yin, M., Ma, W., and An, L. (2017). Cortactin in cancer cell migration and invasion. Oncotarget *8*: 88232–88243.

Zhao, H., Wang, J., Kong, X., Li, E., Liu, Y., Du, X., et al. (2016). CD47 promotes tumor invasion and metastasis in non-small cell lung cancer. Sci Rep *6*: 29719.

Figure legends

Figure 1. Effects of CD47 activation or inhibition on cell migration and invasion. (A), B16F10 melanoma cells transiently transfected with control siRNA or siCD47 were seeded on Transwell inserts. Medium with 10% FBS was used as a chemoattractant (B). For invasion assays, cells were seeded on Matrigel® coated-Transwell inserts. Cells were incubated for 24 h with 4N1 (100 μM) or TSP-1 (1 μg/mL) or left untreated. Migrating/invading cell nuclei were stained with DAPI. Data are mean ± s.e.m. from at least 5 independent experiments (**$p<0.01$, ***$p<0.001$).

Figure 2. Effects of CD47 activation or inhibition on invadopodia formation. B16F10 cells transiently transfected with control siRNA or siCD47 (A), or pre-treated with anti-CD47 blocking Ab (1 μg/mL) (B), were incubated for 24 h with 4N1 (100 μM) or TSP-1 (1 μg/mL) or left untreated. Co-localization of actin and cortactin at dot-like invadopodia was quantified using Image J. (C) Confocal images from fixed cells treated with 4N1 (100 μM; middle panel), with TSP-1 (1 μg/mL; lower panel) or left untreated (upper panel). Cells were immunostained for actin (red) and cortactin (green). Scale bar: 10 μm. Data are mean ± s.e.m. from at least 3 independent experiments (***$p<0.001$).

Figure 3. Effects of CD47 activation or inhibition on proteolytic activity of invadopodia. B16F10 cells transiently transfected with control siRNA or siCD47 (A), or pre-treated with anti-CD47 blocking Ab (1 μg/mL) (B), were seeded on gelatin-FITC-coated coverslips and incubated for 24 h with 4N1 (100 μM) or TSP-1 (1 μg/mL) or left untreated. Degraded areas were quantified using Image J. (C) Confocal images from fixed cells treated with 4N1 (100 μM; middle panel), with TSP-1 (1 μg/mL; lower panel) or left untreated (upper panel). Cells seeded on gelatin-FITC (grey) were immunostained for actin (red) and cortactin (green). Scale bar: 10 μm. Data are mean ± s.e.m. from at least 3 independent experiments (*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$).

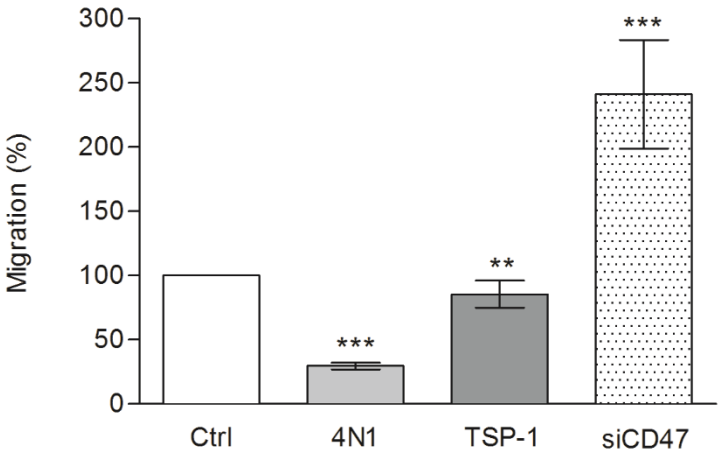
Figure 4. CD47-induced ERK1/2 activation. (A) Time-dependent effects of 4N1 and TSP-1 stimulation on ERK1/2 phosphorylation. Cells were incubated with 4N1 (100 μM) or TSP-1 (1 μg/mL) for the indicated times and whole cell lysates were analysed by Western blotting using Abs against ERK1/2 and phosphorylated ERK1/2 (P-ERK1/2); blots are representative of 3 independent experiments. Bands were quantified by densitometry (mean ± s.e.m., **p<0.01, ***p<0.001). (B) Cells transfected with siCD47 or pre-incubated with anti-CD47 blocking Ab (1 μg/mL) were stimulated with 4N1 (100 μM) for 5 min and whole cell lysates were analysed by Western blotting for P-ERK1/2. Data were quantified by densitometry (mean ± s.e.m., ***p<0.001 compared to control, #p<0.05 and ##p<0.01 compared to 4N1-treated cells). (C) Cells were treated with a MEK inhibitor (PD98059, 5 μM) for 30 min before stimulation with 4N1 (100 μM) for 5 min. Whole cell lysates were analysed by Western blotting for P-ERK1/2. Blots are representative of 3 independent experiments. Data were quantified by densitometry (mean ± s.e.m., **p<0.001 compared to control, #p<0.05 compared to 4N1-treated cells).

Figure 5. Effects of MEK inhibition on invadopodia formation induced by CD47 activation. B16F10 cells pre-treated with PD98059 for 30 min before stimulation with 4N1 (100 μM) or TSP-1 (1 μg/mL) or left untreated. 24 h later, co-localization of actin and cortactin at dot-like invadopodia was quantified using Image J. (B) Confocal images from fixed cells treated with 4N1 (100 μM; middle panel), with TSP-1 (1 μg/mL; lower panel) or left untreated (upper panel). Cells were immunostained for actin (red) and cortactin (green). Insets show magnified view of invadopodia. Scale bar: 10 μm. Data are mean ± s.e.m. from at least 3 independent experiments (***p<0.001).

Figure 6. Effects of MEK inhibition on invadopodia proteolytic activity. B16F10 cells were seeded on gelatin-FITC-coated coverslips and pre-treated with PD98059 for 30 min before stimulation with 4N1 (100 μM) or TSP-1 (1 μg/mL) for 24 h. Degraded areas were quantified using Image J. (B) Confocal images from fixed cells treated with 4N1 (100 μM; middle panel), with TSP-1 (1 μg/mL; lower panel) or left untreated (upper panel). Cells seeded on gelatin-FITC (grey) were immunostained for actin (red) and cortactin (green). Scale bar: 10 μm. Data are mean ± s.e.m. from at least 3 independent experiments (***p<0.001).

Figure 1

A


Migration (%)
300
250
200
150
100
50
0
***
**
***
Ctrl
4N1
TSP-1
siCD47

B

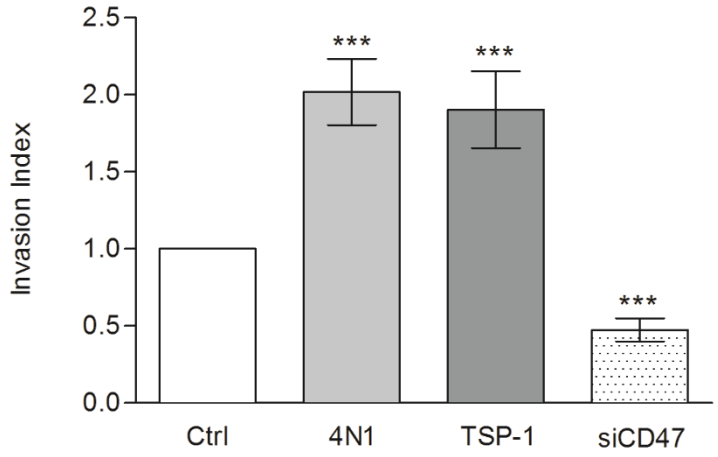

Invasion Index
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
***
Ctrl
4N1
TSP-1
siCD47

Figure 2

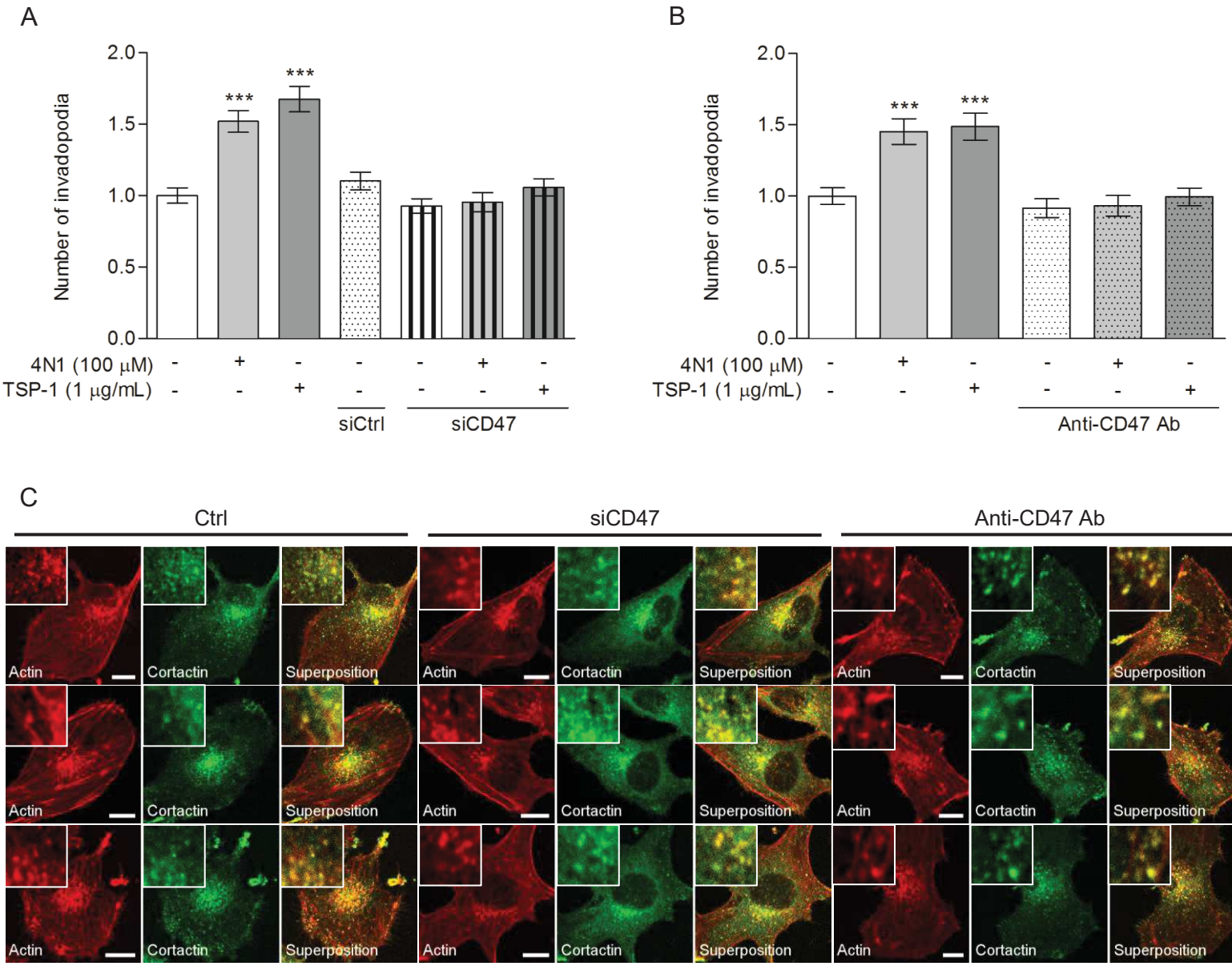
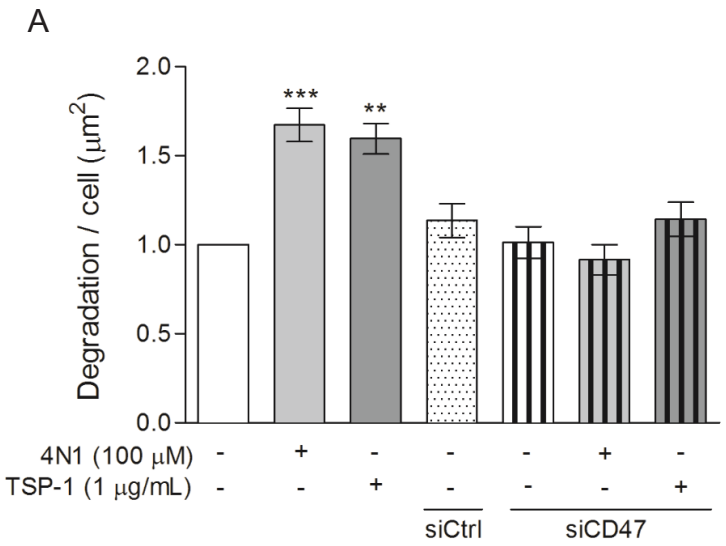
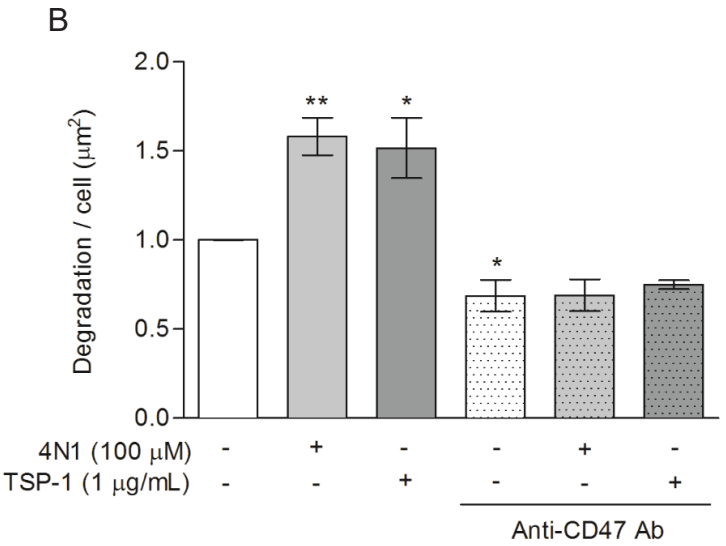

A
Number of invadopodia
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
4N1 (100 μM) - + - - - + -
TSP-1 (1 μg/mL) - - + - - - +
siCtrl
siCD47
B
Number of invadopodia
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
4N1 (100 μM) - + - - + -
TSP-1 (1 μg/mL) - - + - - +
Anti-CD47 Ab
C
Ctrl
siCD47
Anti-CD47 Ab
Ctrl
4N1
TSP-1
Actin
Cortactin
Superposition

Figure 3


A
Degradation / cell (μm²)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
**
4N1 (100 μM) - + - - - + -
TSP-1 (1 μg/mL) - - + - - - +
siCtrl
siCD47


B
Degradation / cell (μm²)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
*
*
4N1 (100 μM) - + - - + -
TSP-1 (1 μg/mL) - - + - - +
Anti-CD47 Ab

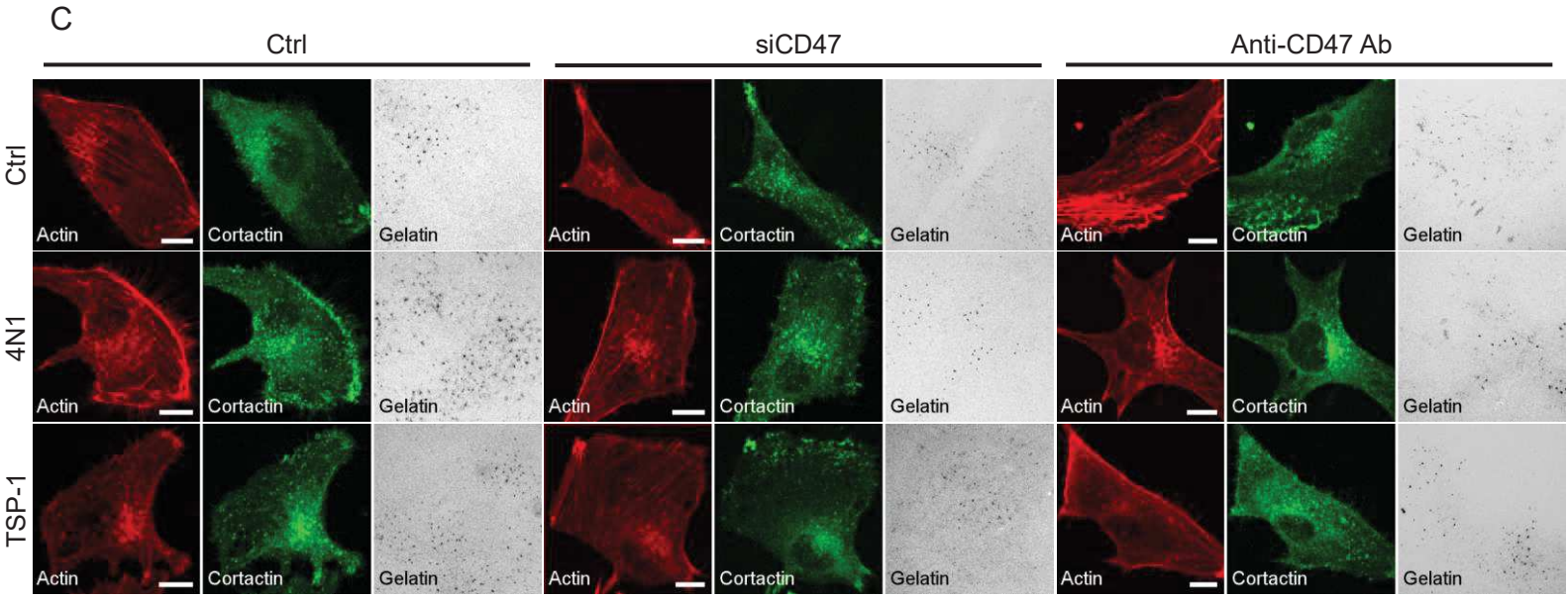
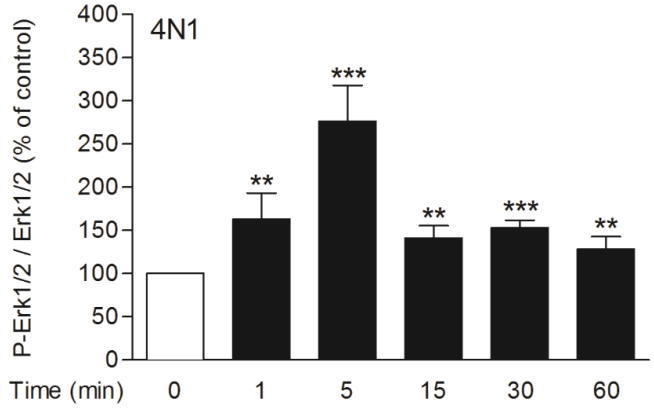
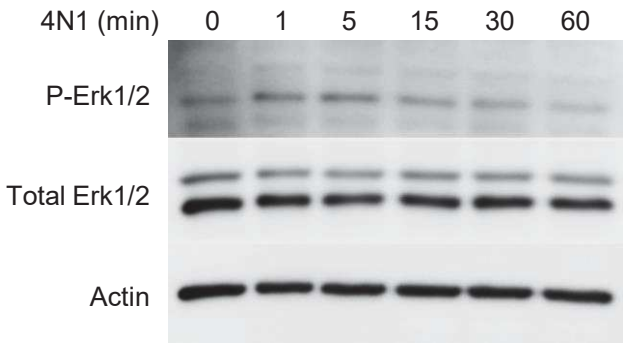
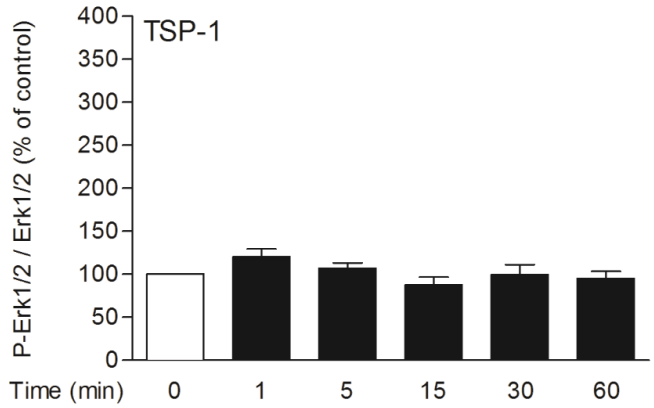

C
Ctrl
siCD47
Anti-CD47 Ab
Ctrl
4N1
TSP-1
Actin
Cortactin
Gelatin

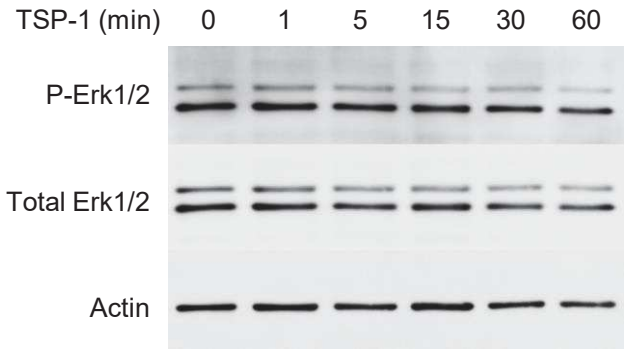
Figure 4

A

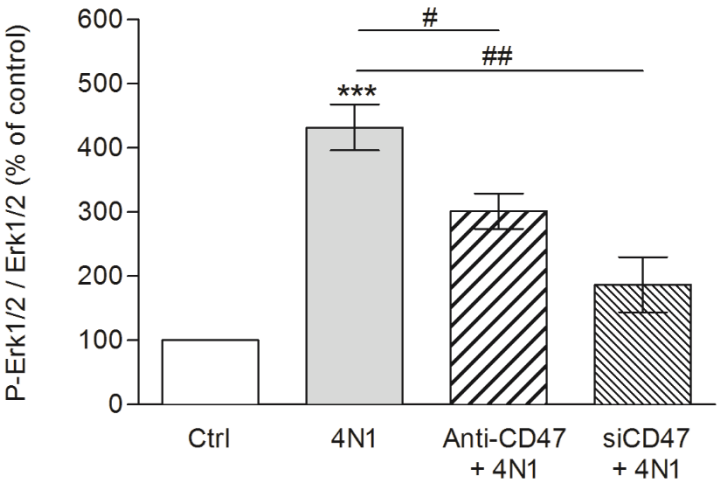

4N1
P-Erk1/2 / Erk1/2 (% of control)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
**
***
**
***
**
Time (min)
0
1
5
15
30
60

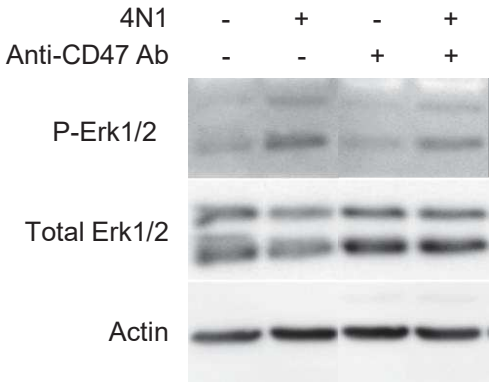

4N1 (min)
0
1
5
15
30
60
P-Erk1/2
Total Erk1/2
Actin


TSP-1
P-Erk1/2 / Erk1/2 (% of control)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Time (min)
0
1
5
15
30
60

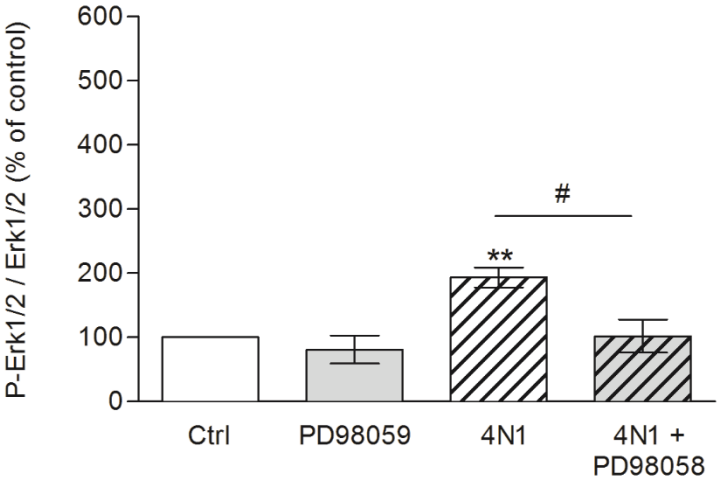

TSP-1 (min)
0
1
5
15
30
60
P-Erk1/2
Total Erk1/2
Actin

B


P-Erk1/2 / Erk1/2 (% of control)
600
500
400
300
200
100
0
#
##
***
Ctrl
4N1
Anti-CD47 + 4N1
siCD47 + 4N1


4N1
- + - +
Anti-CD47 Ab
- - + +
P-Erk1/2
Total Erk1/2
Actin

C


P-Erk1/2 / Erk1/2 (% of control)
600
500
400
300
200
100
0
#
**
Ctrl
PD98059
4N1
4N1 + PD98058

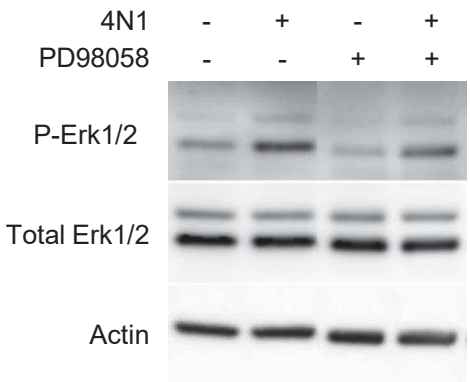
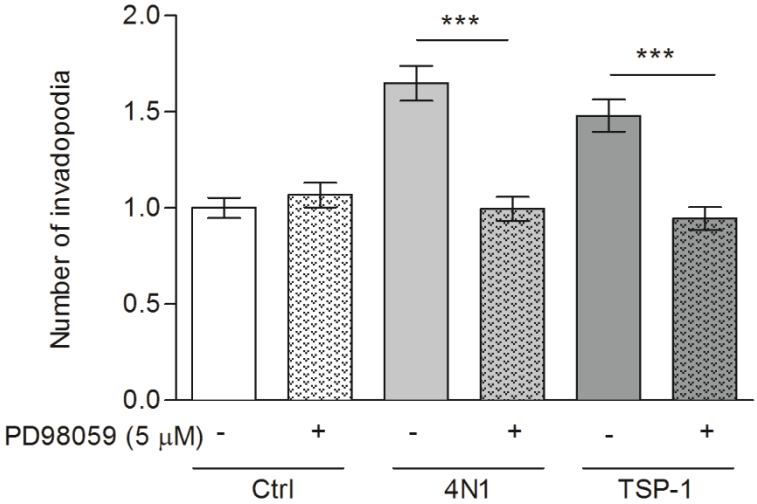

4N1
- + - +
PD98058
- - + +
P-Erk1/2
Total Erk1/2
Actin

Figure 5

A


Number of invadopodia
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
PD98059 (5 μM)
-
+
-
+
-
+
Ctrl
4N1
TSP-1

B

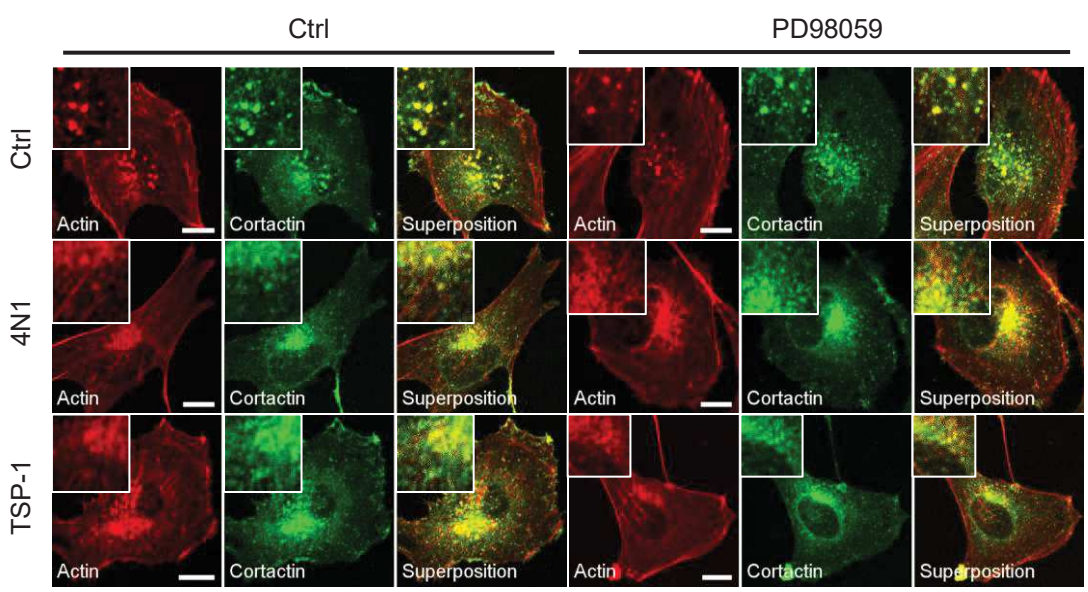
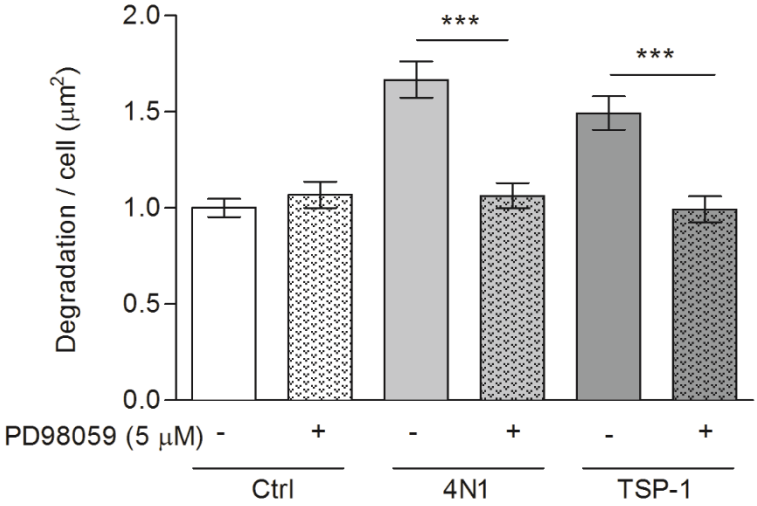
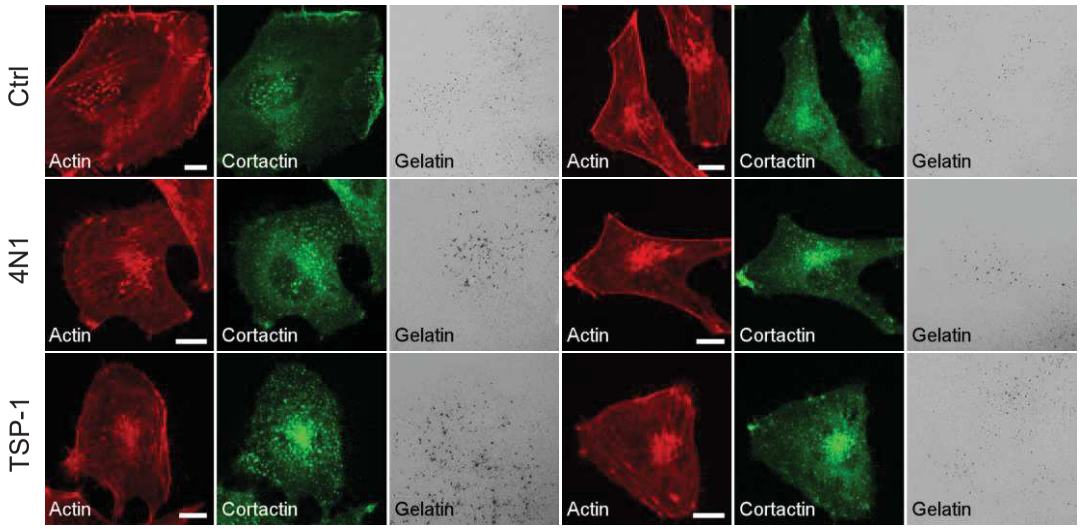

Ctrl
PD98059
Ctrl
4N1
TSP-1
Actin
Cortactin
Superposition

Figure 6

A


Degradation / cell (μm²)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
PD98059 (5 μM)
-
+
-
+
-
+
Ctrl
4N1
TSP-1

B


Ctrl
4N1
TSP-1
Actin
Cortactin
Gelatin

Discussion et Perspectives

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Mon travail a visé à étudier le rôle des protéines FAK et CD47 dans l'invasion tumorale du mélanome ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués. Pour ce faire, j'ai inhibé les protéines d'intérêt selon différentes stratégies et j'ai observé les effets induits sur les processus de migration et de dégradation et plus particulièrement sur les structures possédant une activité protéolytique, les invadopodes.

A. Le mélanome est-il un modèle d'étude de la formation et de la maturation des invadopodes ?

Dans le manuscrit 2, nous avons observé que les lignées de mélanome métastatique progressent plus efficacement que les lignées *in situ* dans une matrice de collagène. Ce résultat traduit une optimisation de l'invasion tumorale dépendante soit de la migration soit de la dégradation. Etant donné que l'inhibition des MMP avec un inhibiteur à large spectre inhibe complètement la progression des lignées métastatiques, nous avons démontré l'importance des protéases dans l'invasion des mélanomes et par conséquent l'importance potentielle des invadopodes. En effet, par immunomarquage, nous avons observé la formation et l'élongation de structures riches en actine ponctiforme et en cortactine caractéristique des invadopodes dans des lignées cellulaires de mélanome humain *in situ* et métastatiques, et ce en utilisant des modèles d'invasion 2D et 2,5D. Ces résultats concordent avec les précédentes études montrant que les invadopodes participent à l'intravasation et à l'extravasation des cellules cancéreuses à travers la membrane basale (Condeelis & Segall, 2003 ; Gligorijevic et *al.,* 2014 ; Sahai et *al.,* 2005 ; Wolf et *al.,* 2003). Néanmoins il est surprenant d'observer ces structures d'invasion dans l'ensemble des lignées de mélanome étudiées. En effet, les lignées de mélanome *in situ* sont définis par un fort taux de prolifération dans l'épiderme et par l'incapacité à traverser la lame basale (Elder, 2016 ; Gaggioli & Sahai, 2007 ; Golan et *al.,* 2015). A l'aide d'un test de dégradation *in situ*, nous avons constaté que, malgré la formation d'invadopodes, les cellules de mélanome *in situ* ne sont pas capables de dégrader la MEC contrairement aux lignées cellulaires métastatiques. Comme les invadopodes forment initialement des précurseurs enrichis en F-actine et en cortactine qui mûrissent pour acquérir une activité protéolytique (Artym et *al.,* 2006 ; Genna et *al.,* 2018 ; Murphy & Courtneidge, 2011), nous avons suggéré que les cellules de mélanome *in situ* assemblent des « précurseurs » d'invadopodes et que la maturation des invadopodes se produit pendant la progression du mélanome.

A ce jour, les processus et les acteurs impliqués dans l'initiation et la maturation des invadopodes restent peu connus et dès lors, il serait possible à l'aide de nos modèles d'étudier le mécanisme de maturation de ces structures. Dans cette optique, il serait nécessaire de vérifier la nature des protrusions membranaires observées dans les lignées de mélanome *in situ* en réalisant des immunomarquages des protéines recrutées précocement aux invadopodes. Bien que la colocalisation de l'actine ponctiforme et de la cortactine représente le marquage le plus fréquemment utilisé pour identifier les invadopodes (Chan et *al.,* 2009b ; Kolli-Bouhafs et *al.,* 2014 ; Pourfarhangi et *al.,* 2018 ; Yamaguchi et *al.,* 2005), plusieurs études suggèrent qu'il n'est pas assez sélectif. En effet, ces dernières années, plusieurs équipes ont identifié les précurseurs des invadopodes en zymographie *in situ* grâce à la colocalisation de deux protéines, la cortactine et TKS5, avec une absence de dégradation du gel fluorescent. En revanche, la colocalisation de ces deux protéines avec une dégradation de la MEC indique un invadopode mature (Chen et *al.,* 2019 ; Eddy et *al.,* 2017 ; Genna et *al.,* 2018 ; Sharma et *al.,* 2013). De même, les sous-unités α2, α3, α5, α6, β1 et β3 des intégrines ont d'ores et déjà été observé en microscopie pour initier la formation des invadopodes et ils pourraient être utilisé en colocalisation avec l'actine, la cortactine ou TKS5 pour identifier les « précurseurs » (Artym et *al.,* 2015 ; Beaty et *al.,* 2013 ; Peláez et *al.,* 2019).

Par ailleurs, l'activité des invadopodes peut être modulé par des caractéristiques fonctionnelles tels que le diamètre et le temps de formation ou de déformation des protrusions. Il n'est pas à exclure que l'absence d'activité protéolytique des protrusions membranaires observées dans les lignées de mélanome *in situ* soit induite par l'altération de l'une ou l'autre de ces caractéristiques. En effet, le suivi par vidéo-microscopie de cellules marquées à la GFP-actine et des expériences de redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) ont mis en évidence que les podosomes, tout comme les invadopodes, subissent des cycles de polymérisation et de dépolymérisation de l'actine qui se maintient tout au long de la durée de vie des structures (Badowski et *al.,* 2008 ; Destaing et *al.,* 2003). La stabilisation de ces filaments d'actine par les microtubules ainsi que par les protéines d'échafaudage mentionnées dans l'introduction favorise l'activité protéolytique des invadopodes. Ainsi un suivi par vidéo-microscopie des lignées de mélanome *in situ* et de invasives transfectées avec un peptide fluorescent marquant l'actine, tel que le LifeAct (Berginski et *al.,* 2014 ; Riedl et *al.,* 2008) ou bien de la cortactine fluorescente permettrait d'identifier l'étape de formation ou de maturation défaillante.

Enfin, plusieurs protéines ont été proposées dans la littérature pour être impliquées dans la maturation des invadopodes. Par exemple, Golan et son équipe ont proposé que la voie Notch soit un acteur majeur de la progression tumorale du mélanome. En effet, il a été démontré *in vitro* et *in vivo*, que l'interaction des mélanocytes avec les kératinocytes différenciés de l'épiderme induit l'activation de la voie Notch à l'origine de la dissociation du complexe entre le facteur de transcription anti-invasif MITF et le miR-222/221 permettant l'invasion des mélanomes à travers la lame basale (Golan et *al.,* 2015). De plus la voie de signalisation Notch a été rapportée pour initier l'expression de Mena IV, une protéine décrite pour stimuler la formation et la fonction des invadopodes en augmentant la phosphorylation de la cortactine en Y421 (Eddy et *al.,* 2017). Mais il est également possible que les « précurseurs » d'invadopode présente des défauts d'activation ou du transport des protéases nécessaire à la dégradation de la MEC. Il serait donc intéressant de mesurer dans ces lignées de mélanome *in situ* les niveaux d'expression et de sécrétions des principales protéases. D'autre part, la protéine TKS5 a été décrite comme stimulant la formation et l'activité des invadopodes en interagissant avec les protéases ADAM (Abram et *al.,* 2003 ; Paterson & Courtneidge, 2018) et en induisant la production de ROS de manière Src-dépendante (Diaz et al., 2009 ; Kolli-Bouhafs et *al.,* 2014). Un défaut d'activation ou du recrutement de cette protéine dans les invadopodes pourrait expliquer l'absence d'activité protéolytique des lignées de mélanome *in situ*. Enfin, pour conclure sur la différence moléculaire entre les invadopodes observés dans les cellules de mélanome *in situ* et métastatique, une étude de protéomique couplant la microdissection par capture laser à la spectrométrie de masse comme celle mise au point par Ezzoukhry et *al.,* sur des rosettes pourrait s'avérer intéressante (Ezzoukhry et *al.,* 2018). Néanmoins, des difficultés pourraient survenir durant l'identification et l'extraction des invadopodes ponctiformes de nos lignées de mélanome qui se trouvent être plus petit que les rosettes. Ainsi la caractérisation de l'interactome d'une protéine clé selon la méthode développée par Thuault et *al.,* serait surement la plus adaptée à notre modèle (Thuault et *al.,* 2020). En comparant le profil des « précurseurs » et des invadopodes matures de cellules de mélanome *in situ* et métastatique issu du même patient, nous pourrions peut-être identifier les acteurs favorisant la maturation des structures.

B. FAK régule-t-elle l'invasion des cellules cancéreuses ?

I. La protéine FAK inhibe-t-elle la formation et l'activité des invadopodes ?

Nous avons également démontré que la diminution d'expression de la protéine FAK favorise la formation et l'activité des invadopodes ponctiformes dans les lignées de mélanome

métastatique humain, suggérant un rôle anti-invasif de la protéine. Ces résultats sont en accord avec les précédentes études menées par le laboratoire sur le mélanome métastatique murin (Kolli-Bouhafs et *al.,* 2014) ainsi que ceux obtenus par d'autres équipes sur les modèles de cancer du sein humain et d'adénocarcinome mammaire de rat (Bowden et *al.,* 2006 ; Chan et *al.,* 2009b ; Genna et *al*., 2018). En effet, bien que la protéine FAK ne soit pas localisée dans les invadopodes ponctiformes, elle régule négativement ces structures **(Figure 38).** Outre le fait d'augmenter le nombre d'invadopodes, il a été démontré que l'inhibition de FAK accroit de moitié la durée de vie de ces structures afin d'augmenter la dégradation de la MEC (Berginski et *al.,* 2014). A l'inverse, plusieurs études menées sur des fibroblastes transformées par v-Src ont mis en évidence que la protéine FAK favorise la formation des invadopodes en rosette soulignant un rôle pro-invasif de la protéine **(Figure 38)** (Hauck et *al.,* 2002 ; Pan et *al.,* 2011 ; Vitale et *al.,* 2008). Les rosettes sont des structures d'invasion qui présentent de fortes similarités protéiques avec les adhérences focales (FAK, vinculine, paxilline …) et plusieurs études ont d'ailleurs proposé que les rosettes soient initiées à partir des FAs (Linder et *al.,* 2011). De manière paradoxale, tandis que FAK est indispensable à la formation des structures en rosette, il semblerait que la protéine soit non-essentielle à la formation des invadopodes ponctiformes (Pan et *al.,* 2011 ; Vitale et *al.,* 2008). Ainsi, du fait des différences structurales entre les invadopodes ponctiformes et les rosettes, il est possible que FAK régule différemment ces structures invasives. D'un autre côté, les cellules cancéreuses formant des invadopodes ponctiformes peuvent former des invadopodes linéaires lorsqu'elles sont cultivées sur des fibrilles de collagène de type I (Ferrari et *al.,* 2019 ; Juin et *al.,* 2012 ; Juin et *al.,* 2014). Puisque ces structures présentes de fortes similarités protéiques avec les invadopodes ponctiformes, comme l'enrichissement en cortactine, en TKS5 et en MMP ou encore l'absence de paxilline et de vinculine (Juin et *al.,* 2012), il pourrait être intéressant d'étudier l'effet d'une délétion de FAK ou d'une inhibition de son domaine kinase dans la formation et l'activité des invadopodes linéaires.

Par ailleurs, nous avons observé que la délétion de la protéine FAK dans les lignées de mélanome *in situ* n'affecte ni le nombre de « précurseurs » d'invadopode, ni leur activité protéolytique. Ainsi, en supposant que les structures observées soit bel et bien des invadopodes, ces résultats suggèrent que la régulation négative de FAK n'est pas responsable de l'incapacité des cellules *in situ* à dégrader la MEC. Il n'est également pas à exclure que FAK puisse réguler différemment la formation et l'activité des invadopodes selon l'agressivité de la tumeur.

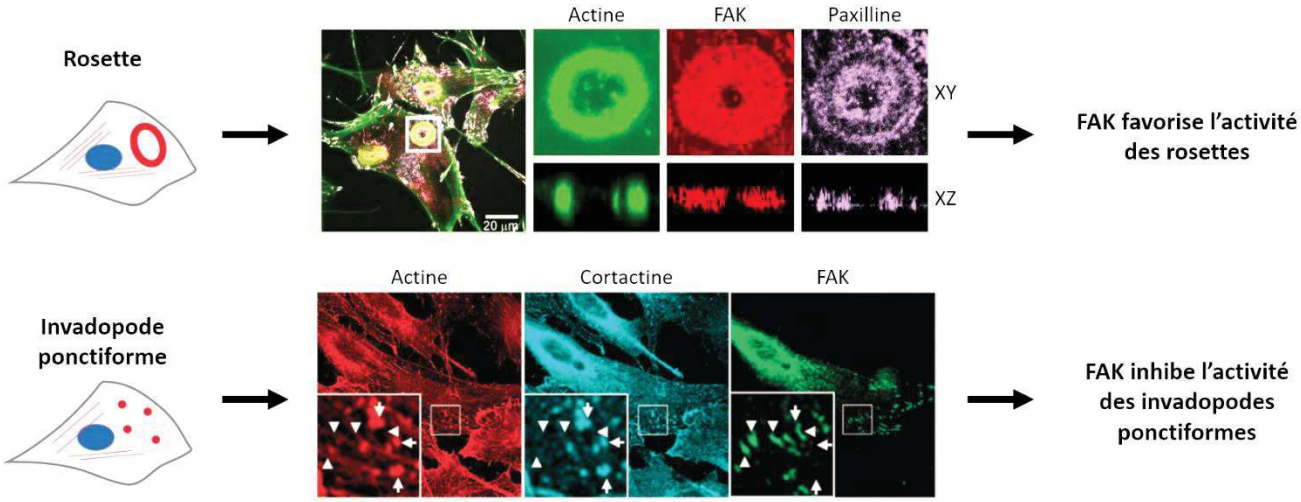


Figure 1 : FAK régule les rosettes et les invadopodes ponctiformes. FAK est localisée dans les structures en rosette afin de promouvoir l'activité protéolytique des cellules transformées par Src. A l'inverse, FAK est observée dans les adhérences focales (têtes de flèche) mais pas dans les invadopodes ponctiformes (identifiés par une colocalisation de l'actine et de la cortactine, flèches) des cellules cancéreuses ; elle favorise ainsi la migration cellulaire mais inhibe l'invasion tumorale. Adapté de Pan et *al.,* 2011 et de Kolli-Bouhafs et *al.,* 2014.

II. Le complexe FAK-src régule-t-il la balance migration-dégradation ?

Pour la première fois, nous avons démontré que l'inhibition du domaine kinase de FAK avec un inhibiteur développé en pré-clinique, le PF-573228, inhibe la migration cellulaire mais s'accompagne également d'une augmentation de la dégradation des cellules de mélanome métastatique. Compte tenu du grand nombre de publications décrivant la fonction pro-migratoire de la protéine, il n'est pas surprenant que l'inhibition de FAK réduise le potentiel migratoire des cellules cancéreuses (Slack-Davis et *al.,* 2007 ; Webb et *al.,* 2004), mais ces résultats attestent également de l'importance de l'activité kinase de FAK dans sa fonction anti-invasive. La phosphorylation du motif Y397 de FAK est un marqueur de l'activité de la protéine et constitue un site de liaison de haute affinité pour Src, protéine dont l'activité favorise la maturation des invadopodes en phosphorylant de nombreux partenaires et en favorisant la sécrétion de MMP (Lock et *al.,* 1998 ; Wu et *al.,* 2005). Afin d'étudier l'importance de la phosphorylation et de la liaison des protéines sur ce motif tyrosine dans l'activité des invadopodes, nous avons exprimé dans une lignée métastatique déficiente en FAK, un mutant de FAK (FAK Y397F) abolit de sa phosphorylation en Y397. Dans ces cellules, nous avons observé que l'expression de la protéine FAK *wild type* inhibe la formation et l'activité des invadopodes, contrairement au mutant Y397F de FAK. Ces résultats confortent les précédentes études menées sur des cellules de cancer du sein ou de mélanome murin ayant démontré que la

phosphorylation du résidu Y397 est essentielle à la fonction anti-invasive de FAK (Chan et *al.,* 2009b ; Kolli-Bouhafs et *al.,* 2014). En effet, l'inhibition de la phosphorylation en Y397 de FAK libère la protéine Src des FAs, favorisant ainsi son recrutement au niveau des invadopodes par Pyk2 afin de phosphoryler de nombreuses tyrosines, telles que Tks5, et de promouvoir la transition d'un phénotype migratoire à un phénotype invasif (Chan et *al.,* 2009b ; Genna et *al*., 2018 ; Kolli-Bouhafs et *al.,* 2014). Ces observations sont néanmoins surprenantes étant donné que les petites molécules analogues de l'ATP ciblant FAK telles que le VS-4718, le GSK2256098, le PF-562271 et le defactinib ont démontré certains avantages en préclinique en inhibant la trans-autophosphorylation de la protéine et donc le niveau de phosphorylation en Y397 (Roberts et *al.,* 2008 ; Tanjoni et *al.,* 2010 ; Zhang et *al.,* 2014).

III. La localisation subcellulaire de FAK affecte-elle son rôle anti-invasif ?

L'interaction entre les sites HP1 et HP2 de FAK, situés respectivement à la surface des hélices 2-3 et 1-4 du domaine FAT, avec les motifs LD2 et LD4 de la paxilline régule la localisation de la protéine dans les adhérences focales afin de favoriser son activation et de promouvoir la migration cellulaire (Arold et *al.,* 2002 ; Bertolucci et *al.,* 2005 ; Brami-Cherrier *al.,* 2014). Bien que l'interaction de FAK avec ses partenaires soit peu étudiée en dehors des FAs, plusieurs études attestent qu'elle peut être localisée et phosphorylée en Y397 dans d'autres structures telles que les endosomes et le noyau (Alanko et *al.,* 2015 ; Serrels et *al.,* 2015). Ainsi, afin d'identifier des stratégies alternatives aux inhibiteurs du domaine kinase de FAK capables de prévenir les fonctions pro-migratoires de la protéine et d'inhiber la dégradation par les invadopodes en préservant le complexe FAK-Src, nous avons envisagé de cibler l'interaction de FAK-paxilline.

En mutant les motifs I936 et I998 situés respectivement dans la région HP2 et HP1 du domaine FAT en acide glutamique (FAK 936E 998E), nous avons observé que FAK est incapable d'interagir avec la paxilline conduisant ainsi à une accumulation cytoplasmique de la protéine mais également à une préservation de la phosphorylation en Y397. Ces résultats suggèrent que la concentration accrue de FAK active cytoplasmique pourrait interagir avec des partenaires présentant des sites de liaison SH2 comme Src ; bien que cela devra être vérifié par immunoprécipitation ou par immunofluorescence. Néanmoins une précédente étude menée par notre laboratoire sur un modèle de fibroblaste a également montré qu'une inhibition de l'interaction FAK-paxilline par mutagénèse dirigée favorise la délocalisation de FAK mais s'accompagne également d'une inhibition importante du taux de phosphorylation en Y397

(Deramaudt et *al.,* 2014). De manière intéressante, malgré la délocalisation cytoplasmique et l'inhibition de l'activité en Y397 de FAK, cette étude a mis en évidence par immunoprécipitation qu'inhiber l'interaction FAK-paxilline n'affecte pas le complexe FAK-Src. Bien que la différence d'activité du mutant 936E 998E de FAK entre ces deux études menées par notre laboratoire soit surprenante, des mécanismes de suractivation ou de réactivation de FAK pourraient en être la cause. En effet, dans les cellules cancéreuses, des RTK, tels que HER2, sont capables d'interagir avec le domaine FERM de FAK afin de favoriser l'activation de la protéine, et ce indépendamment de son activité kinase (Marlowe et *al.,* 2019 ; Stahl et *al.,* 2020). Par ailleurs, nous avons démontré qu'inhiber l'interaction FAK-paxilline par mutagénèse dirigée diminue le nombre et l'activité protéolytique des invadopodes dans les cellules de mélanome métastatique contrairement aux inhibiteurs du domaine kinase de FAK. Ainsi, dans les cellules cancéreuses, malgré sa délocalisation dans le cytoplasme, FAK conserve sa phosphorylation en Y397 et semble préserver son interaction avec Src afin d'empêcher son recrutement dans les invadopodes et d'inhiber l'invasion tumorale.

C. Inhiber l'interaction FAK-paxilline : une nouvelle stratégie thérapeutique

I. Quels sont les effets d'une inhibition de l'interaction FAK-paxilline sur le développement et la dissémination des cellules cancéreuses ?

La pertinence des IIPP dans le cadre des traitements ciblant FAK a déjà été mise en évidence avec l'observation d'effets anticancéreux de plusieurs inhibiteurs de l'interaction FAK-p53 ou FAK-VEGFR3 *in vitro* et *in vivo* (Golubovskaya et *al.,* 2013 ; Kurenova et *al.,* 2009). De notre côté, nous avons traité les cellules cancéreuses avec un peptide contenant le domaine LD2-LD4 de la paxilline afin de démontrer la relevance des inhibiteurs d'interaction FAK-paxilline, par immunofluorescence, nous avons rapporté que ce peptide est capable d'entrer en compétition avec la paxilline pour lier le domaine FAT induisant ainsi une accumulation de la protéine FAK dans le cytoplasme. En accord avec les résultats du mutant FAK 936E 998E, nous avons observé que les niveaux d'expression et d'activité en Y397 de FAK sont conservés malgré la délocalisation de la protéine hors des FAs. De même, il a récemment été démontré que des composés ciblant un *hot spot* à proximité du motif Y925 situé dans le domaine FAT de FAK favorisent l'accumulation de la protéine dans le cytoplasme des cellules de cancer du sein et du pancréas sans pour autant affecter les niveaux de phosphorylation en Y397 et Y925 (Kandil *al.,* 2020). Ces résultats supportent donc le modèle selon lequel une inhibition de l'interaction FAK-paxilline préserve l'activité de FAK et le complexe FAK-Src en dehors des FAs.

En parallèle, nous avons observé que l'expression du peptide LD2-LD4 inhibe l'activité protéolytique des invadopodes confirmant là encore nos résultats obtenus avec le mutant 936E 998E de FAK. Outre le fait d'inhiber l'activité protéolytique en séquestrant la protéine Src hors des invadopodes, il est possible qu'altérer l'interaction FAK-paxilline inhibe la migration cellulaire. En effet, la formation et l'activation du complexe FAK-Src dans les adhérences focales sont décrits pour être des éléments majeurs dans la régulation de la motilité cellulaire en régulant la formation et la déformation des adhérences focales (Deramaudt et *al.,* 2011 ; Hamadi et *al.,* 2009 ; Kaneda et *al.,* 2008). Dans notre étude, nous avons observé en *wound healing* que la délocalisation de FAK en dehors des FAs suite à l'expression du peptide LD2-LD4 inhibe la migration cellulaire. De même, les composés favorisant l'accumulation cytoplasmique de FAK développés par Kandil et son équipe sont capables d'altérer le dynamique des adhérences focales à l'origine d'une inhibition de la migration des cellules de cancer du sein et du pancréas *in vitro* (Kandil et *al.,* 2020). Enfin, tandis que Kadaré et son équipe ont associé l'inhibition de l'interaction FAK-paxilline avec une accumulation cytoplasmique et une augmentation de la phosphorylation des motifs S910 et Y925 de FAK (Kadaré et *al.,* 2015), il a récemment été observé sur des coupes histologiques de mélanome

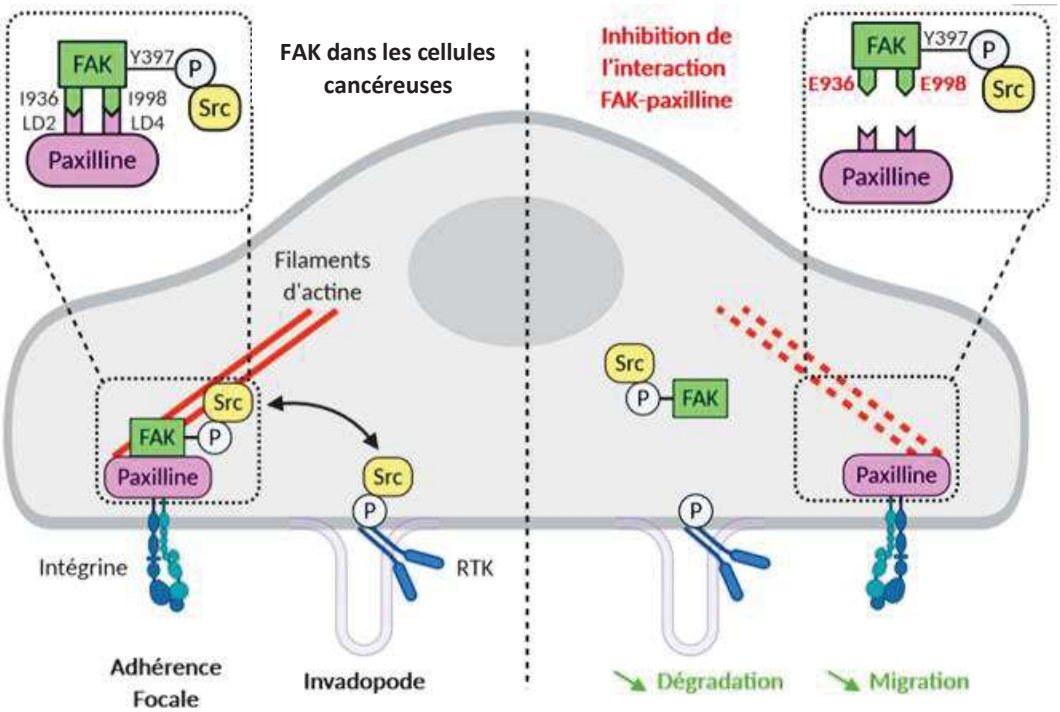


Figure 2 : Les inhibiteurs d'interaction FAK-paxilline inhibent l'invasion tumorale. (**A gauche**) FAK régule la balance entre migration et dégradation en contrôlant la localisation de Src entre les adhérences focales et les invadopodes. (**A droite**) L'inhibition de l'interaction FAK-paxilline par mutagénèse dirigée (FAK 936E 998E) ou à l'aide d'une petite molécule libère la protéine FAK dans sa conformation active hors des FAs, lui permettant ainsi d'interagir avec Src et de la séquestrer en dehors des structures de migration et de dégradation.

que la phosphorylation en S910 de FAK s'accompagne d'une accumulation cytoplasmique de la protéine et est associée à un taux de survie plus élevé (Najjar *al.,* 2019). Collectivement ces résultats mettent donc en avant qu'inhiber l'interaction FAK-paxilline peut être une stratégie pertinente pour éviter la dissémination des cellules cancéreuses bien que des études *in vitro* dans des modèles plus représentatifs des conditions physiologiques tels qu'un modèle de peau reconstituée et des études *in vivo* soient nécessaires pour le confirmer.

Outre le fait d'inhiber la migration et l'invasion tumorale, l'inhibition de l'interaction FAK-paxilline peut affecter de nombreuses autres processus cellulaires. En effet, bien que les composés développés par Kandal et son équipe n'affectent pas la phosphorylation en Y397 de FAK, ils ont été rapportés pour inhiber la prolifération cellulaire (Kandil et *al.,* 2020). Ces résultats suggèrent que, malgré son activité tyrosine kinase, la protéine FAK cytoplasmique n'est pas capable de promouvoir l'activation des voies des MAPK et PI3K-Akt décrites pour favoriser la prolifération et la survie des cellules cancéreuses (Hennessy et *al.,* 2005 ; Schlaepfer et *al.,* 1998). Il est également possible que l'accumulation cytoplasmique de FAK dans cette conformation altère son aptitude à se transloquer dans le noyau afin de promouvoir la survie et la résistance au système immunitaire (Kurenova et *al.,* 2004 ; Lim et *al.,* 2008). L'altération conjointe des voies de signalisation favorisant la dissémination des cellules cancéreuses et le développement tumoral pourrait améliorer le potentiel thérapeutique de cette stratégie thérapeutique. En effet, plusieurs inhibiteurs du domaine kinase de FAK réduisent la migration des cellules mais n'impacte ni la prolifération ni l'apoptose (Slack-Davis et *al.,* 2007 ; Stokes et *al.,* 2011) nécessitant ainsi une combinaison de traitements pour inhiber le développement tumoral. Nos travaux ont donc démontré la preuve de concept des inhibiteurs d'interaction FAK-paxilline pour prévenir la dissémination des cellules cancéreuses mais il sera nécessaire de vérifier leurs aptitudes à inhiber le développement tumoral. Il existe trois principaux types de tests biochimiques de prolifération cellulaire, basés sur la synthèse de l'ADN (par exemple, l'incorporation de thymidine 3H, BrdU), l'activité métabolique (tels que le bleu d'Alamar ou le LDH) et la concentration en ATP (bioluminescence de la luciférase). Bien que chacune de ces méthodes présente des avantages, elles sont réalisées pour la plupart avec des points terminaux uniques. Pour compenser ces inconvénients, nous pourrions réaliser en parallèle à l'aide d'un Incucyte® un dénombrement des cellules au cours du temps en mesurant le taux de confluence ou encore en utilisant un marquage fluorescent du noyau. Enfin, il sera nécessaire de réaliser des tests de viabilité cellulaire après plusieurs jours de traitements, avec des colorants supravitaux (tels que les sels de tétrazolium) mais également des tests nécrose (par exemple le

LDH, le dosage colorimétrique du malondialdéhyde) et des tests d'apoptose (mesure d'activité des caspases).

II. Quels peuvent être les effets *off target* d'un inhibiteur du domaine FAT ?

Afin d'inhiber l'interaction FAK-paxilline plusieurs études ont récemment développées des molécules se liant au domaine FAT de FAK (Alvarado et *al.,* 2019 ; Kandil et *al.,* 2020 ; Marlowe et *al.,* 2019). Néanmoins plusieurs protéines, autre que FAK, présentent des domaines d'homologie de FAT et ces inhibiteurs d'interaction protéine-protéine pourraient inhiber leur liaison à la paxilline (Alam et *al.,* 2014 ; Brown et *al.,* 1996 ; Li et *al.,* 2011 ; Turner et *al.,* 1990). Le domaine FAT de Pyk2 présente notamment 57 % d'homologie de séquence avec le domaine FAT de FAK, lui permettant ainsi d'interagir avec la paxilline au niveau des adhérences focales (Naser et *al.,* 2018). De même, la vinculine a été rapportée pour interagir avec les domaines LD1, LD2 et LD4 de la paxilline par le biais d'un domaine d'homologie de FAT (FAH) (Alam et *al.,* 2014). Il sera donc nécessaire de vérifier l'affinité des inhibiteurs d'interaction FAK-paxilline pour ces autres complexes protéiques par des techniques d'immunoprécipitation, de SPR ou bien de FRET. Bien que l'inhibition de l'interaction entre ces protéines et la paxilline puisse être considérée comme un effet *off target*, cela pourrait également présenter un intérêt sur le plan thérapeutique.

Pyk2 interagit avec la paxilline au niveau des adhérences focales pour favoriser la migration cellulaire mais cette interaction a été décrite comme dynamique et instable (Naser et *al.,* 2018 ; Vanarotti et *al.,* 2016). En revanche, la leupaxine, un autre membre de la famille des paxillines, a été suggéré comme étant le partenaire de liaison natif de Pyk2. En effet, il a été démontré que les domaines LD1 et LD3 de la leupaxilline interagissent de manière stable avec le domaine FAT de Pyk2 (Vanarotti et *al.,* 2016). De manière intéressante, une étude a récemment mis en évidence que la leupaxilline est localisée dans les podosomes afin de favoriser la dégradation de la MEC (Klapproth et *al.,* 2019). Bien qu'aucune étude n'ait à ce jour étudié la localisation de cette protéine dans les invadopodes, il est possible qu'elle soit responsable du recrutement de Pyk2 dans les structures d'invasion. En effet, l'activation de Pyk2 dans les invadopodes par le complexe calcium-calmoduline a récemment été rapporté pour favoriser l'invasion tumorale des mélanomes et des cancers du sein *in vitro* (Kohno et *al.,* 2008 ; Lu et *al.,* 2019). Malgré la caractérisation du rôle pro-invasif de Pyk2, le mécanisme par lequel cette protéine est recrutée aux invadopodes n'est toujours pas éclairci. Par ailleurs, une inhibition de l'activité catalytique de FAK peut être compensée par une suractivation de son homologue Pyk2 pour promouvoir

la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (Genna et *al.,* 2018 ; Sieg et *al.,* 1998 ; Weis et *al.,* 2008). Il n'est donc pas à exclure que la délocalisation de FAK hors des adhérences focales conduise à un recrutement de la protéine Pyk2 dans ces structures pour mettre en place un mécanisme de compensation. Il pourrait donc être intéressant d'étudier l'effet d'une inhibition du domaine FAT de Pyk2 sur son recrutement dans les invadopodes ainsi que sur les processus de migration et d'invasion tumorale, seule ou conjointement avec un inhibiteur du domaine FAT de FAK.

D'un autre côté, le domaine D5 situé dans la queue C-terminal de la vinculine interagit avec de nombreuses protéines du cytosquelette d'actine ou impliquées dans des voies de signalisations telles que la paxilline ou les lipides (Carisey & Ballestrem, 2011). Ce domaine D5 forme un faisceau à cinq hélices qui ressemble aux domaines FAH si l'on considère l'hélice N-terminale de D5 comme un élément structurel similaire aux extensions N-terminales de FAT ou de FAH (Alam et *al.,* 2014). Bien que le mécanisme ne soit pas complètement élucidé, l'interaction de la vinculine avec la paxilline favorise son recrutement aux adhérences focales et son activation (Pasapera et *al.,* 2010). Outre le fait de favoriser la migration cellulaire et le dynamisme des adhérences focales en transductant les forces dans la cellule (Jannie et *al.,* 2015 ; Rothenberg et *al.,* 2018), la vinculine a été décrite pour inhiber la prolifération cellulaire. En effet, la vinculine entre en compétition avec FAK pour lier les domaines de la paxilline et agit donc comme un rétrocontrôle négatif de l'interaction FAK-paxilline et des voies de signalisations sous-jacentes telles que la MAPK (Carisey & Ballestrem, 2011). Une inhibition du domaine FAH de la vinculine pourrait donc potentialiser l'inhibition de la migration cellulaire induite par les inhibiteurs du domaine FAT de FAK. En revanche, la vinculine étant une protéine ubiquitaire dont les niveaux d'expression peuvent être diminués ou augmentés selon les cancers (Yu et *al.,* 2020 ; Zhang et *al.,* 2019), les IIPP ciblant de manière non sélective le domaine FAT de FAK ou le domaine FAH de la vinculine pourraient induire une toxicité trop importante.

D. Comment FAK est-elle activée dans le cytoplasme ?

Malgré son accumulation cytoplasmique, nous avons observé que le motif Y397 de FAK est phosphorylé par un mécanisme moléculaire encore obscure. Actuellement, il est admis que l'autophosphorylation en Y397 de FAK crée un site de liaison pour Src afin d'être activée et de phosphoryler les sites Y576, Y577, Y861 et Y925 de FAK. La phosphorylation de ces deux premiers motifs situés dans la boucle d'activation parachève l'activation de la protéine FAK.

Néanmoins, selon ce modèle, l'accessibilité de la Src à la boucle d'activation ainsi que l'accès des substrats au site catalytique de la protéine restent limités étant donné que le site actif fait face à la membrane lipidique (Acebron et *al.,* 2020 ; Brami-Cherrier et *al.,* 2014 ; Lietha et *al.,* 2007). Structurellement, il a été proposé que l'étirement de la molécule FAK par la force puisse exposer le site actif et les résidus de la boucle d'activation (Acebron et *al.,* 2020). Dans les adhérences focales, les forces d'étirement sont générées par la contraction des fibres de stress de l'actomyosine attachées à la couche d'actine. Un tel mécanisme permet notamment à la taline d'exposer des sites de liaison de haute affinité pour la vinculine (Ciobanasu et *al.,* 2014 ; Del Rio et *al.,* 2009 ; Tapial Martinez et *al.,* 2020) et pourrait expliquer que l'activation de FAK soit régulée par la rigidité du microenvironnement tumoral (Hirata et *al.,* 2015 ; Seong et *al.,* 2013). Selon cette hypothèse, les points d'ancrage pouvant transmettre les forces d'étirement nécessaire à l'ouverture de la protéine seraient d'une part, les sites d'interactions lipidiques situés dans le domaine FERM et à l'extrémité C-terminale du domaine kinase, et d'autre part, les sites d'interaction avec la paxilline situés dans le domaine FAT. En accord avec ce modèle, il a été démontré par AFM que les forces appliquées aux molécules FAK via les site de liaison lipidique entraînent la rupture des interactions auto-inhibitrices entre le domaine FERM et le domaine kinase (Bauer et *al.,* 2019). Cependant, cette séquence d'activation est difficile à concilier avec l'activation de FAK en dehors des FAs. Outre nos résultats, il a pourtant été démontré que FAK peut être activée dans des cellules en suspension ou dans les cellules cancéreuses indépendantes de l'ancrage (Poullet et *al.,* 2001 ; Serrels et *al.,* 2012). De même, il a été montré à l'aide d'un test de dimérisation, que l'autophosphorylation des FAK était indépendante de l'adhésion cellulaire et n'impliquait pas la formation de complexes multimériques stables (Toutant et *al.,* 2002). En outre, la dimérisation de FAK par le biais d'interactions FERM-FERM peut se former en solution (Brami-Cherrier et *al.,* 2014) et des interactions FAK-FAK peuvent exister dans le cytosol comme le démontrent les études FCS (Hoffmann et *al.,* 2014). Enfin, plus récemment, Alanko et son équipe ont également observé que FAK s'accumule dans les endosomes par le biais de son domaine FERM afin d'être phosphorylée et d'activer à son tour des intégrines (Alanko et *al.,* 2015 ; Nader et *al.,* 2016). Il est donc clair que des études supplémentaires seront nécessaires pour identifier le mécanisme d'activation de FAK en dehors des FAs. Par microscopie confocale et par microscopie à haute résolution, nous pourrions identifier précisément la localisation de la FAK cytoplasmique une fois l'interaction FAK-paxilline inhibée ; est-elle accumulée dans les endosomes ? est-elle ancrée à la membrane ? ou est-elle en solution dans le cytoplasme ? Par ailleurs, en mutant les principaux domaines d'interaction de FAK tels que les motifs de liaison des lipides, nous

pourrions identifier les partenaires pouvant interagir avec la FAK cytoplasmique et ainsi les éléments permettant l'activation de la protéine en dehors des FAs.

E. CD47 régule-t-il l'invasion du mélanome ?

Bien que les fonctions de l'axe TSP-1-CD47 soient clairement définies dans l'angiogenèse, son rôle dans la dissémination des cellules cancéreuses ne fait qu'émerger. La surexpression de CD47 a notamment été rapportée pour favoriser l'adhérence et la migration cellulaire en induisant la TEM des cellules épithéliales de l'intestin et des cellules cancéreuses des ovaires (Li et *al.,* 2017 ; Pai et *al.,* 2019 ; Shinohara et *al.,* 2006). Bien que l'implication de CD47 n'ait pas été mise en évidence, Jayachandran et son équipe ont également montré que la TSP-1 est fortement exprimée dans les cellules de mélanome ayant subi une TEM (Jayachandran et *al.,* 2014). En parallèle, il a été démontré que la délétion de CD47 s'accompagne d'une diminution du potentiel invasif des cellules cancéreuses du poumon dans des modèles *in vitro* de *Transwell* et de puce microfluidique coaté avec du matrigel ainsi que dans des modèles *in vivo* (Cabrales, 2019 ; Zhao et *al.,* 2016a). Paradoxalement, la délétion de CD47 est également rapportée pour inhiber la migration des cellules de glioblastome et de carcinome épidermoïde en *Transwell* et en *wound healing* suggérant un rôle pro-migratoire de CD47 (Liu et *al.,* 2019 ; Pai et *al.,* 2019). Comme l'illustrent ces exemples, la plupart des études se sont concentrées sur l'étude du rôle de l'un ou l'autre des partenaires dans l'invasion des cellules tumorales sans montrer clairement l'implication de l'axe TSP-1-CD47. Les quelques études ayant étudié l'implication de l'axe TSP-1-CD47 dans l'invasion des tumeurs ont utilisé le TAX2, un peptide cyclique dérivé de CD47 capable de se lier à la TSP-1 et d'inhiber sélectivement son interaction avec CD47 (Jeanne et *al.,* 2015). Cette molécule a d'ailleurs été décrite pour inhiber l'invasion tumorale induite par l'hypoxie dans un modèle d'invasion en sphéroïde de cellules de glioblastome (Daubon et *al.,* 2019). Nous avons donc voulu comprendre les mécanismes moléculaires permettant à l'axe TSP-1-CD47 de favoriser l'invasion tumorale. Sur un modèle *Transwell*, nous avons démontré que l'activation du récepteur CD47 par la TSP-1 ou le 4N1 inhibe la migration cellulaire mais s'accompagne également d'une augmentation de l'invasion des cellules de mélanome. A l'inverse, la diminution d'expression de CD47 augmente la migration cellulaire et inhibe l'invasion tumorale. Ces résultats suggèrent donc un rôle anti-migratoire et pro-invasif de l'axe TSP-1-CD47 confortant ainsi les études ayant démontré une corrélation entre le taux d'expression de CD47 et l'agressivité tumorale dans les biopsies de divers cancers (Jaiswal et *al.,* 2009 ; Sudo et *al.,* 2017; Daubon et *al.,* 2019 ; Kamijo et *al.,* 2020).

En couplant la technique de zymographie *in situ* à un marquage immunocytochimique des invadopodes, nous avons montré que la stimulation du récepteur CD47 par le 4N1 ou la TSP-1 induit une augmentation du nombre d'invadopode et de la dégradation de la MEC. A l'inverse, la diminution d'expression de CD47 ou son inhibition avec un anticorps bloquant empêche l'effet pro-invasif de la TSP-1 et du 4N1 confirmant ainsi que l'activation de CD47 par ses ligands favorise la formation et l'activité des invadopodes pour promouvoir l'invasion du mélanome. Afin d'identifier la voie de signalisation intracellulaire responsable de ces effets, nous avons étudié l'activité de protéines qui sont, d'une part, impliquées dans la signalisation liée aux invadopodes et d'autre part, régulées directement ou indirectement par CD47. Nous avons ainsi observé que la stimulation du récepteur CD47 ne semble pas influencer l'activité des protéines FAK et Akt contrairement aux précédentes études menées sur le mélanome et le glioblastome (Liu et *al.,* 2019 ; Ogura et *al.,* 2004). En revanche, l'activation de CD47 par le 4N1 augmente fortement l'activité de ERK ; tandis que l'inhibition de CD47 réduit partiellement la stimulation de la protéine ERK par ce peptide. Ces résultats suggèrent donc que l'activité de la protéine ERK est en partie régulée par CD47. En accord avec nos résultats, Hu et son équipe ont montré que la surexpression de CD47 augmente le niveau de phosphorylation de ERK, mais pas de JNK et de p38, afin de favoriser la prolifération et la migration des cellules cancéreuses colorectales (Hu et *al.,* 2020). De même, bien que l'implication de CD47 n'ait pas été mise en évidence, il a récemment été démontré que la TSP-1 est capable de phosphoryler la protéine ERK dans les cellules de lymphome (Kamijo et *al.,* 2020). Sur un plan fonctionnel, l'inhibition de la protéine MEK par le PD-98059 se traduit par une diminution du nombre d'invadopode et de la dégradation matricielle induite par le 4N1 ou la TSP-1. Bien qu'il pourrait être intéressant de confirmer nos résultats en mutant spécifiquement les motifs tyrosines de MEK et de ERK, nous avons ainsi démontré l'implication de CD47 dans les mécanismes pro-invasifs de la TSP-1 dans le mélanome, ainsi que la signalisation associée via la voie des MAPK MEK-ERK.

La voie de signalisation pro-invasive de CD47 en aval de ERK reste cependant obscure. Quelques études ont récemment démontré l'implication de ERK dans la voie de signalisation intracellulaire responsable de l'activité des invadopodes. En effet, Siquiera et son équipe ont montré que le peptide de laminine C16 favorise l'activité des invadopodes dans des cellules de carcinome basal squameux et de fibrosarcome en augmentant l'activité des intégines β1 et les niveaux de phosphorylation de Src et de ERK (Siqueira et *al.,* 2016). De plus, une étude a mis en évidence que la protéine ERK est capable de phosphoryler les sites S405 et S418 de la

cortactine afin d'accroître son affinité pour la protéine N-WASP et ainsi augmenter la polymérisation de l'actine (Campbell et *al.,* 1999 ; Yin et *al.,* 2017). Ces résultats confortent donc notre observation selon laquelle la voie MEK-ERK pourrait stimuler l'activité des invadopodes dans le mélanome. Néanmoins, dans notre étude, aucun changement significatif dans la phosphorylation de Src et de la cortactine n'a été détecté entre les cellules témoins et les cellules activées par la TSP-1 ou le 4N1. Il serait donc intéressant de réaliser des études complémentaires pour vérifier s'il existe ou non, une activation locale de Src précédent son recrutement dans les invadopodes, où il orchestre l'activité des structures, comme cela a précédemment été décrit dans les cellules de mélanome murin B16F10 (Kolli-Bouhafs et *al.,* 2014).

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

Abbas, O., Miller, D.D., and Bhawan, J. (2014). Cutaneous Malignant Melanoma: Update on Diagnostic and Prognostic Biomarkers. The American Journal of Dermatopathology *36*, 363–379.

Abram, C.L., Seals, D.F., Pass, I., Salinsky, D., Maurer, L., Roth, T.M., and Courtneidge, S.A. (2003). The Adaptor Protein Fish Associates with Members of the ADAMs Family and Localizes to Podosomes of Src-transformed Cells. Journal of Biological Chemistry *278*, 16844–16851.

Acebrón, I., Righetto, R.D., Schoenherr, C., Buhr, S., Redondo, P., Culley, J., Rodríguez, C.F., Daday, C., Biyani, N., Llorca, O., et al. (2020). Structural basis of Focal Adhesion Kinase activation on lipid membranes. The EMBO Journal *39*.

Agarwala, S.S. (2009). Current systemic therapy for metastatic melanoma. Expert Review of Anticancer Therapy *9*, 587–595.

Alam, T., Alazmi, M., Gao, X., and Arold, S.T. (2014). How to find a leucine in a haystack? Structure, ligand recognition and regulation of leucine–aspartic acid (LD) motifs. Biochemical Journal *460*, 317–329.

Alanko, J., Mai, A., Jacquemet, G., Schauer, K., Kaukonen, R., Saari, M., Goud, B., and Ivaska, J. (2015). Integrin endosomal signalling suppresses anoikis. Nature Cell Biology *17*, 1412–1421.

Albiges-Rizo, C., Destaing, O., Fourcade, B., Planus, E., and Block, M.R. (2009). Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. Journal of Cell Science *122*, 3037–3049.

Aleskandarany, M.A., Negm, O.H., Green, A.R., Ahmed, M.A.H., Nolan, C.C., Tighe, P.J., Ellis, I.O., and Rakha, E.A. (2014). Epithelial mesenchymal transition in early invasive breast cancer: an immunohistochemical and reverse phase protein array study. Breast Cancer Research and Treatment *145*, 339–348.

Alexander, N.R., Branch, K.M., Parekh, A., Clark, E.S., Iwueke, I.C., Guelcher, S.A., and Weaver, A.M. (2008). Extracellular Matrix Rigidity Promotes Invadopodia Activity. Current Biology *18*, 1295–1299.

Alexandrova, A.Y., Arnold, K., Schaub, S., Vasiliev, J.M., Meister, J.-J., Bershadsky, A.D., and Verkhovsky, A.B. (2008). Comparative Dynamics of Retrograde Actin Flow and Focal Adhesions: Formation of Nascent Adhesions Triggers Transition from Fast to Slow Flow. PLoS ONE *3*, e3234.

Alvarado, C., Stahl, E., Koessel, K., Rivera, A., Cherry, B.R., Pulavarti, S.V.S.R.K., Szyperski, T., Cance, W., and Marlowe, T. (2019). Development of a Fragment-Based Screening Assay for the Focal Adhesion Targeting Domain Using SPR and NMR. Molecules *24*, 3352.

Amith, S.R., and Fliegel, L. (2013). Regulation of the Na+/H+ Exchanger (NHE1) in Breast Cancer Metastasis. Cancer Research *73*, 1259–1264.

Angelucci, A., and Bologna, M. (2007). Targeting Vascular Cell Migration as a Strategy for Blocking Angiogenesis: The Central Role of Focal Adhesion Protein Tyrosine Kinase Family. Current Pharmaceutical Design *13*, 2129–2145.

Araki, K., Shimura, T., Suzuki, H., Tsutsumi, S., Wada, W., Yajima, T., Kobayahi, T., Kubo, N., and Kuwano, H. (2011). E/N-cadherin switch mediates cancer progression via TGF-β-induced epithelial-to-mesenchymal transition in extrahepatic cholangiocarcinoma. British Journal of Cancer *105*, 1885–1893.

Arias-Mejias, S.M., Warda, K.Y., Quattrocchi, E., Alonso-Quinones, H., Sominidi-Damodaran, S., and Meves, A. (2020). The role of integrins in melanoma: a review. International Journal of Dermatology *59*, 525–534.

Arkenau, H.-T., Kefford, R., and Long, G.V. (2011). Targeting BRAF for patients with melanoma. British Journal of Cancer *104*, 392–398.

Arold, S.T., Hoellerer, M.K., and Noble, M.E.M. (2002). The Structural Basis of Localization and Signaling by the Focal Adhesion Targeting Domain. Structure *10*, 319–327.

Artym, V.V., Zhang, Y., Seillier-Moiseiwitsch, F., Yamada, K.M., and Mueller, S.C. (2006). Dynamic Interactions of Cortactin and Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase at Invadopodia: Defining the Stages of Invadopodia Formation and Function. Cancer Research *66*, 3034–3043.

Artym, V.V., Yamada, K.M., and Mueller, S.C. (2009). ECM Degradation Assays for Analyzing Local Cell Invasion. In Extracellular Matrix Protocols, S. Even-Ram, and V. Artym, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 211–219.

Artym, V.V., Swatkoski, S., Matsumoto, K., Campbell, C.B., Petrie, R.J., Dimitriadis, E.K., Li, X., Mueller, S.C., Bugge, T.H., Gucek, M., et al. (2015). Dense fibrillar collagen is a potent inducer of invadopodia via a specific signaling network. Journal of Cell Biology *208*, 331–350.

Attanasio, F., Caldieri, G., Giacchetti, G., van Horssen, R., Wieringa, B., and Buccione, R. (2011). Novel invadopodia components revealed by differential proteomic analysis. European Journal of Cell Biology *90*, 115–127.

Avizienyte, E., Wyke, A.W., Jones, R.J., McLean, G.W., Westhoff, M.A., Brunton, V.G., and Frame, M.C. (2002). Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling. Nature Cell Biology *4*, 632–638.

Ayaki, M., Komatsu, K., Mukai, M., Murata, K., Kameyama, M., Ishiguro, S., Miyoshi, J., Tatsuta, M., and Nakamura, H. (2001). Reduced expression of focal adhesion kinase in liver metastases compared with matched primary human colorectal adenocarcinomas. Clin. Cancer Res. *7*, 3106–3112.

Badowski, C., Pawlak, G., Grichine, A., Chabadel, A., Oddou, C., Jurdic, P., Pfaff, M., Albigès-Rizo, C., and Block, M.R. (2008). Paxillin Phosphorylation Controls Invadopodia/Podosomes Spatiotemporal Organization. Molecular Biology of the Cell *19*, 633–645.

Baenziger, N.L., Brodie, G.N., and Majerus, P.W. (1971). A Thrombin-Sensitive Protein of Human Platelet Membranes. Proceedings of the National Academy of Sciences *68*, 240–243.

Bagi, C.M., Christensen, J., Cohen, D.P., Roberts, W.G., Wilkie, D., Swanson, T., Tuthill, T., and Andresen, C.J. (2009). Sunitinib and PF-562,271 (FAK/Pyk2 inhibitor) effectively block growth and recovery of human hepatocellular carcinoma in a rat xenograft model. Cancer Biology & Therapy *8*, 856–865.

Bamberger, M.E., Harris, M.E., McDonald, D.R., Husemann, J., and Landreth, G.E. (2003). A Cell Surface Receptor Complex for Fibrillar β-Amyloid Mediates Microglial Activation. The Journal of Neuroscience 23, 2665–2674.

Barazi, H.O., Li, Z., Cashel, J.A., Krutzsch, H.C., Annis, D.S., Mosher, D.F., and Roberts, D.D. (2002). Regulation of Integrin Function by CD47 Ligands: differential effects on αvβ3 and α4β1 integrin-mediated adhesion. Journal of Biological Chemistry *277*, 42859–42866.

Barbier, S., Chatre, L., Bras, M., Sancho, P., Roue, G., Virely, C., Yuste, V.J., Baudet, S., Rubio, M., Esquerda, J.E., et al. (2009). Caspase-independent type III programmed cell death in chronic lymphocytic leukemia: the key role of the F-actin cytoskeleton. Haematologica *94*, 507–517.

Barclay, A.N., and van den Berg, T.K. (2014). The Interaction Between Signal Regulatory Protein Alpha and CD47: Structure, Function, and Therapeutic Target. Annual Review of Immunology *32*, 25–50.

Barr, F.A. (2013). Rab GTPases and membrane identity: Causal or inconsequential? The Journal of Cell Biology *202*, 191–199.

Barsukov, I.L., Prescot, A., Bate, N., Patel, B., Floyd, D.N., Bhanji, N., Bagshaw, C.R., Letinic, K., Di Paolo, G., De Camilli, P., et al. (2003). Phosphatidylinositol Phosphate Kinase Type 1γ and β_1 -Integrin Cytoplasmic Domain Bind to the Same Region in the Talin FERM Domain. Journal of Biological Chemistry *278*, 31202–31209.

Bauvois, B. (2012). New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer *1825*, 29–36.

Beaty, B.T., and Condeelis, J. (2014). Digging a little deeper: The stages of invadopodium formation and maturation. European Journal of Cell Biology *93*, 438–444.

Beaty, B.T., Sharma, V.P., Bravo-Cordero, J.J., Simpson, M.A., Eddy, R.J., Koleske, A.J., and Condeelis, J. (2013). β1 integrin regulates Arg to promote invadopodial maturation and matrix degradation. Molecular Biology of the Cell *24*, 1661–1675.

Bedard, K., and Krause, K.-H. (2007). The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. Physiological Reviews *87*, 245–313.

Bedikian, A.Y. (2006). Metastatic Uveal Melanoma Therapy: Current Options. International Ophthalmology Clinics *46*, 151–166.

Bell, E.S., and Lammerding, J. (2016). Causes and consequences of nuclear envelope alterations in tumour progression. European Journal of Cell Biology *95*, 449–464.

Benlimame, N., He, Q., Jie, S., Xiao, D., Xu, Y.J., Loignon, M., Schlaepfer, D.D., and Alaoui-Jamali, M.A. (2005). FAK signaling is critical for ErbB-2/ErbB-3 receptor cooperation for oncogenic transformation and invasion. Journal of Cell Biology *171*, 505–516.

Benton, G., Kleinman, H.K., George, J., and Arnaoutova, I. (2011). Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells. International Journal of Cancer *128*, 1751–1757.

Berginski, M.E., Creed, S.J., Cochran, S., Roadcap, D.W., Bear, J.E., and Gomez, S.M. (2014). Automated analysis of invadopodia dynamics in live cells. PeerJ *2*, e462.

Bertolotto, C., Abbe, P., Hemesath, T.J., Bille, K., Fisher, D.E., Ortonne, J.-P., and Ballotti, R. (1998). Microphthalmia Gene Product as a Signal Transducer in cAMP-Induced Differentiation of Melanocytes. Journal of Cell Biology *142*, 827–835.

Bertolucci, C.M., Guibao, C.D., and Zheng, J. (2005). Structural features of the focal adhesion kinase-paxillin complex give insight into the dynamics of focal adhesion assembly. Protein Science *14*, 644–652.

Bhatt, A., Kaverina, I., Otey, C., and Huttenlocher, A. (2002). Calpain regulates focal complex composition and disassembly. Journal of cell science *115*, 3415-3425.

Bierie, B., and Moses, H.L. (2006). TGFβ: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. Nature Reviews Cancer *6*, 506–520.

Birck, A., Ahrenkiel, V., Zeuthen, J., Hou-Jensen, K., and Guldberg, P. (2000). Mutation and Allelic Loss of the PTEN/MMAC1 gene in Primary and Metastatic Melanoma Biopsies. Journal of Investigative Dermatology *114*, 277–280.

Biteau, B., Hochmuth, C.E., and Jasper, H. (2011). Maintaining Tissue Homeostasis: Dynamic Control of Somatic Stem Cell Activity. Cell Stem Cell *9*, 402–411.

Bitoux, M.-A., and Stamenkovic, I. (2008). Tumor-host interactions: the role of inflammation. Histochemistry and Cell Biology *130*, 1079–1090.

Blazar, B.R., Lindberg, F.P., Ingulli, E., Panoskaltsis-Mortari, A., Oldenborg, P.-A., Iizuka, K., Yokoyama, W.M., and Taylor, P.A. (2001). Cd47 (Integrin-Associated Protein) Engagement of Dendritic Cell and Macrophage Counterreceptors Is Required to Prevent the Clearance of Donor Lymphohematopoietic Cells. Journal of Experimental Medicine *194*, 541–550.

Blouw, B., Patel, M., Iizuka, S., Abdullah, C., You, W.K., Huang, X., Li, J.-L., Diaz, B., Stallcup, W.B., and Courtneidge, S.A. (2015). The Invadopodia Scaffold Protein Tks5 Is Required for the Growth of Human Breast Cancer Cells In Vitro and In Vivo. PLOS ONE *10*, e0121003.

Bokoch, G.M., and Diebold, B.A. (2002). Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. Blood *100*, 2692–2695.

Borghi, N., Lowndes, M., Maruthamuthu, V., Gardel, M.L., and Nelson, W.J. (2010). Regulation of cell motile behavior by crosstalk between cadherin- and integrin-mediated adhesions. Proceedings of the National Academy of Sciences *107*, 13324–13329.

Bowden, E., Onikoyi, E., Slack, R., Myoui, A., Yoneda, T., Yamada, K., and Mueller, S. (2006). Co-localization of cortactin and phosphotyrosine identifies active invadopodia in human breast cancer cells. Experimental Cell Research *312*, 1240–1253.

Bowden, E.T., Barth, M., Thomas, D., Glazer, R.I., and Mueller, S.C. (1999). An invasion-related complex of cortactin, paxillin and PKCm associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation. Oncogene 18, 4440-4449.

Brábek, J., Constancio, S.S., Shin, N.-Y., Pozzi, A., Weaver, A.M., and Hanks, S.K. (2004). CAS promotes invasiveness of Src-transformed cells. Oncogene *23*, 7406–7415.

Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L.A., Knuechel, R., and Kirchner, T. (2001). Variable -catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. Proceedings of the National Academy of Sciences *98*, 10356–10361.

Brami-Cherrier, K., Gervasi, N., Arsenieva, D., Walkiewicz, K., Boutterin, M.-C., Ortega, A., Leonard, P.G., Seantier, B., Gasmi, L., Bouceba, T., et al. (2014). FAK dimerization controls its kinase-dependent functions at focal adhesions. The EMBO Journal *33*, 356–370.

Braren, R., Hu, H., Kim, Y.H., Beggs, H.E., Reichardt, L.F., and Wang, R. (2006). Endothelial FAK is essential for vascular network stability, cell survival, and lamellipodial formation. Journal of Cell Biology *172*, 151–162.

Bravo-Cordero, J.J., Oser, M., Chen, X., Eddy, R., Hodgson, L., and Condeelis, J. (2011). A Novel Spatiotemporal RhoC Activation Pathway Locally Regulates Cofilin Activity at Invadopodia. Current Biology *21*, 635–644.

Brigati, C., Noonan, D.M., Albini, A., and Benelli, R. (2002). Tumors and inflammatory infiltrates: Friends or foes? Clinical & experimental metastasis 19, 247-258.

Brightwell, R.M., Grzankowski, K.S., Lele, S., Eng, K., Arshad, M., Chen, H., and Odunsi, K. (2016). The CD47 "don't eat me signal" is highly expressed in human ovarian cancer. Gynecologic Oncology *143*, 393–397.

Brisson, L., Reshkin, S.J., Goré, J., and Roger, S. (2012). pH regulators in invadosomal functioning: Proton delivery for matrix tasting. European Journal of Cell Biology *91*, 847–860.

Brittain, J.E., Han, J., Ataga, K.I., Orringer, E.P., and Parise, L.V. (2004). Mechanism of CD47-induced α4β1 Integrin Activation and Adhesion in Sickle Reticulocytes. Journal of Biological Chemistry *279*, 42393–42402.

Brod, F., and Fässler, R. (2020). A FAK conundrum is solved: activation and organization of focal adhesion kinase at the plasma membrane. The EMBO Journal *39*.

Brooke, G., Holbrook, J.D., Brown, M.H., and Barclay, A.N. (2004). Human Lymphocytes Interact Directly with CD47 through a Novel Member of the Signal Regulatory Protein (SIRP) Family. The Journal of Immunology *173*, 2562–2570.

Brooke, G.P., Parsons, K.R., and Howard, C.J. (1998). Cloning of two members of the SIRPα family of protein tyrosine phosphatase binding proteins in cattle that are expressed on monocytes and a subpopulation of dendritic cells and which mediate binding to CD4 T cells. European Journal of Immunology *28*, 1–11.

Broom, O.J., Zhang, Y., Oldenborg, P.-A., Massoumi, R., and Sjölander, A. (2009). CD47 Regulates Collagen I-Induced Cyclooxygenase-2 Expression and Intestinal Epithelial Cell Migration. PLoS ONE *4*, e6371.

Broussard, J.A., Webb, D.J., and Kaverina, I. (2008). Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells. Current opinion in cell biology *20,* 85-90

Brown, E. and Frazier, W.A. (2001). Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. Trends in Cell Biology *11*, 130–135.

Brown, E., Hooper, L., Ho, T., and Greshamll, H. (1990). Integrin-associated Protein: A 50-kD Plasma Membrane Antigen Physically and Functionally Associated with Integrins. The journal of cell biology 111, 2785-2794.

Brown, M.C., Perrotta, J.A., and Turner, C.E. (1996). Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. The Journal of Cell Biology *135*, 1109–1123.

Brown, M.C., Perrotta, J.A., and Turner, C.E. (1998). Serine and Threonine Phosphorylation of the Paxillin LIM Domains Regulates Paxillin Focal Adhesion Localization and Cell Adhesion to Fibronectin. Molecular Biology of the Cell *9*, 1803–1816.

Buccione, R., Caldieri, G., and Ayala, I. (2009). Invadopodia: specialized tumor cell structures for the focal degradation of the extracellular matrix. Cancer and Metastasis Reviews *28*, 137–149.

Burgaya, F., Toutant, M., Studler, J.M., Costa, A., Le Bert, M., Gelman, M., and Girault, J.A. (1997). Alternatively spliced focal adhesion kinase in rat brain with increased autophosphorylation activity. J. Biol. Chem. *272*, 28720–28725.

Buschman, M.D., Bromann, P.A., Cejudo-Martin, P., Wen, F., Pass, I., and Courtneidge, S.A. (2009). The Novel Adaptor Protein Tks4 (SH3PXD2B) Is Required for Functional Podosome Formation. Molecular Biology of the Cell *20*, 1302–1311.

Busco, G., Cardone, R.A., Greco, M.R., Bellizzi, A., Colella, M., Antelmi, E., Mancini, M.T., Dell'Aquila, M.E., Casavola, V., Paradiso, A., et al. (2010). NHE1 promotes invadopodial ECM proteolysis through acidification of the peri-invadopodial space. The FASEB Journal *24*, 3903–3915.

Cabrales, P. (2019). RRx-001 Acts as a Dual Small Molecule Checkpoint Inhibitor by Downregulating CD47 on Cancer Cells and SIRP-α on Monocytes/Macrophages. Translational Oncology *12*, 626–632.

Cai, X., Lietha, D., Ceccarelli, D.F., Karginov, A.V., Rajfur, Z., Jacobson, K., Hahn, K.M., Eck, M.J., and Schaller, M.D. (2008). Spatial and Temporal Regulation of Focal Adhesion Kinase Activity in Living Cells. Molecular and Cellular Biology *28*, 201–214.

Caldieri, G., Giacchetti, G., Beznoussenko, G., Attanasio, F., Ayala, I., and Buccione, R. (2009). Invadopodia biogenesis is regulated by caveolin-mediated modulation of membrane cholesterol levels. Journal of Cellular and Molecular Medicine *13*, 1728–1740.

Camand, E., Peglion, F., Osmani, N., Sanson, M., and Etienne-Manneville, S. (2012). N-cadherin expression level modulates integrin-mediated polarity and strongly impacts on the speed and directionality of glial cell migration. Journal of Cell Science *125*, 844–857.

Campbell, D.H., Sutherland, R.L., and Daly, R.J. (1999). Signaling Pathways and Structural Domains Required for Phosphorylation of EMS1/Cortactin. Cancer Research *59*, 5376 –5385

Cance, W.G., and Golubovskaya, V.M. (2008). Focal adhesion kinase versus p53: apoptosis or survival? Science signaling 1, pe22.

Cance, W.G., Harris, J.E., Iacocca, M.V., Roche, E., Yang, X., Chang, J., Simkins, S., and Xu, L. (2000). Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and

colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. Clin. Cancer Res. *6*, 2417–2423.

Canel, M., Serrels, A., Miller, D., Timpson, P., Serrels, B., Frame, M.C., and Brunton, V.G. (2010). Quantitative In vivo Imaging of the Effects of Inhibiting Integrin Signaling via Src and FAK on Cancer Cell Movement: Effects on E-cadherin Dynamics. Cancer Research *70*, 9413–9422.

Canel, M., Serrels, A., Frame, M.C., and Brunton, V.G. (2013). E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. Journal of Cell Science *126*, 393–401.

Cantelli, G., Orgaz, J.L., Rodriguez-Hernandez, I., Karagiannis, P., Maiques, O., Matias-Guiu, X., Nestle, F.O., Marti, R.M., Karagiannis, S.N., and Sanz-Moreno, V. (2015). TGF-β-Induced Transcription Sustains Amoeboid Melanoma Migration and Dissemination. Current Biology *25*, 2899–2914.

Capo, C., Lindberg, F.P., Meconi, S., Zaffran, Y., Tardei, G., Brown, E.J., Raoult, D., and Mege, J.L. (1999). Subversion of monocyte functions by coxiella burnetii: impairment of the cross talk between alphavbeta3 integrin and CR3. Journal of immunology *163*, 6078-6085.

Carisey, A., and Ballestrem, C. (2011). Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling. European Journal of Cell Biology *90*, 157–163.

Carragher, N.O., Westhoff, M.A., Fincham, V.J., Schaller, M.D., and Frame, M.C. (2003). A Novel Role for FAK as a Protease-Targeting Adaptor Protein: Regulation by p42 ERK and Src. Current Biology 9, 1442-1450.

Carreira, S., Goodall, J., Denat, L., Rodriguez, M., Nuciforo, P., Hoek, K.S., Testori, A., Larue, L., and Goding, C.R. (2006). Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. Genes & Development *20*, 3426–3439.

Cary, L.A., Han, D.C., Polte, T.R., Hanks, S.K., and Guan, J.-L. (1998). Identification of p130Cas as a Mediator of Focal Adhesion Kinase–promoted Cell Migration. Journal of Cell Biology *140*, 211–221.

Cary, L.A., Chang, J.F., and Guan, J.-L. (1996). Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. Journal of Cell Biology *1*09, 1787-1794.

Casey, S.C., Tong, L., Li, Y., Do, R., Walz, S., Fitzgerald, K.N., Gouw, A.M., Baylot, V., Gutgemann, I., Eilers, M., et al. (2016). MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1. Science *352*, 227–231.

Castresana, J.S., Rubio, M.-P., Seizinger, B.R., Vàzquez, J.J., Idoate, M., Sober, A.J., and Barnhill, R.L. (1993). Lack of allelic deletion and point mutation as mechanisms of p53 activation in human malignant melanoma. International Journal of Cancer *55*, 562–565.

Castro-Castro, A., Marchesin, V., Monteiro, P., Lodillinsky, C., Rossé, C., and Chavrier, P. (2016). Cellular and Molecular Mechanisms of MT1-MMP-Dependent Cancer Cell Invasion. Annual Review of Cell and Developmental Biology *32*, 555–576.

Ceccarelli, D.F.J., Song, H.K., Poy, F., Schaller, M.D., and Eck, M.J. (2006). Crystal Structure of the FERM Domain of Focal Adhesion Kinase. Journal of Biological Chemistry *281*, 252–259.

Cervero, P., Himmel, M., Krüger, M., and Linder, S. (2012). Proteomic analysis of podosome fractions from macrophages reveals similarities to spreading initiation centres. European Journal of Cell Biology *91*, 908–922.

Chambers, A.F., Groom, A.C., and MacDonald, I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. Nature Reviews Cancer *2*, 563–572.

Chan, K.S., Espinosa, I., Chao, M., Wong, D., Ailles, L., Diehn, M., Gill, H., Presti, J., Chang, H.Y., van de Rijn, M., et al. (2009a). Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. Proceedings of the National Academy of Sciences *106*, 14016–14021.

Chan, K.T., Cortesio, C.L., and Huttenlocher, A. (2009b). FAK alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion. The Journal of Cell Biology *185*, 357–370.

Chandrasekaran, S., Guo, N., Rodrigues, R.G., Kaiser, J., and Roberts, D.D. (1999). Pro-adhesive and Chemotactic Activities of Thrombospondin-1 for Breast Carcinoma Cells Are Mediated by α3β1 Integrin and Regulated by Insulin-like Growth Factor-1 and CD98. The journal of biological chemistry *274*, 11408- 11416.

ChanS, P.-Y., and Whitney, G. (1994). A Transmembrane-anchored Chimeric Focal Adhesion KinaIs e Constitutively Activatedand Phosphorylated at Tyrosine Residues Identical to pp125FM. The journal of biological chemistry *269*, 20567-20574.

Chao, M.P., Jaiswal, S., Weissman-Tsukamoto, R., Alizadeh, A.A., Gentles, A.J., Volkmer, J., Weiskopf, K., Willingham, S.B., Raveh, T., Park, C.Y., et al. (2010). Calreticulin Is the Dominant Pro-Phagocytic Signal on Multiple Human Cancers and Is Counterbalanced by CD47. Science Translational Medicine *2*, 63ra94-63ra94.

Chao, M.P., Weissman, I.L., and Majeti, R. (2012). The CD47–SIRPα pathway in cancer immune evasion and potential

therapeutic implications. Current Opinion in Immunology *24*, 225–232.

Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., et al. (2011). Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. New England Journal of Medicine *364*, 2507–2516.

Chellaiah, M.A., Biswas, R.S., Yuen, D., Alvarez, U.M., and Hruska, K.A. (2001). Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Directs Association of Src Homology 2-containing Signaling Proteins with Gelsolin. Journal of Biological Chemistry *276*, 47434–47444.

Chen, W.-T. (1989). Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. Journal of Experimental Zoology *251*, 167–185.

Chen, B.-H., Tzen, J.T.C., Bresnick, A.R., and Chen, H.-C. (2002). Roles of Rho-associated Kinase and Myosin Light Chain Kinase in Morphological and Migratory Defects of Focal Adhesion Kinase-null Cells. Journal of Biological Chemistry *277*, 33857–33863.

Chen, H.C., Appeddu, P.A., Parsons, J.T., Hildebrand, J.D., Schaller, M.D., and Guan, J.L. (1995). Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. The journal of biological chemistry 270, 16995-16999.

Chen, Y.-C., Baik, M., Byers, J.T., Chen, K.T., French, S.W., and Díaz, B. (2019). TKS5-positive invadopodia-like structures in human tumor surgical specimens. Experimental and Molecular Pathology *106*, 17–26.

Cheng, S.Y.S., Sun, G., Schlaepfer, D.D., and Pallen, C.J. (2014). Grb2 Promotes Integrin-Induced Focal Adhesion Kinase (FAK) Autophosphorylation and Directs the Phosphorylation of Protein Tyrosine Phosphatase by the Src-FAK Kinase Complex. Molecular and Cellular Biology *34*, 348–361.

Chevalier, C., Collin, G., Descamps, S., Touaitahuata, H., Simon, V., Reymond, N., Fernandez, L., Milhiet, P.-E., Georget, V., Urbach, S., et al. (2016). TOM1L1 drives membrane delivery of MT1-MMP to promote ERBB2-induced breast cancer cell invasion. Nature Communications *7*, 10765.

Choi, J.-A., and Lim, I.K. (2013). TIS21/BTG2 inhibits invadopodia formation by downregulating reactive oxygen species level in MDA-MB-231 cells. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology *139*, 1657–1665.

Choi, C.-H., Webb, B.A., Chimenti, M.S., Jacobson, M.P., and Barber, D.L. (2013). pH sensing by FAK-His58 regulates focal adhesion remodeling. The Journal of Cell Biology *202*, 849–859.

Choi, C.K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L.A., Mogilner, A., and Horwitz, A.R. (2008). Actin and α-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. Nature Cell Biology *10*, 1039–1050.

Chung, J., Gao, A.-G., and Frazier, W.A. (1997). Thrombspondin Acts via Integrin-associated Protein to Activate the Platelet Integrin αIIbβ3. The journal of biological chemistry *272*, 14740-14746.

Ciobanasu, C., Faivre, B., and Le Clainche, C. (2014). Actomyosin-dependent formation of the mechanosensitive talin–vinculin complex reinforces actin anchoring. Nature Communications *5*.

Clark, E.S., Whigham, A.S., Yarbrough, W.G., and Weaver, A.M. (2007). Cortactin Is an Essential Regulator of Matrix Metalloproteinase Secretion and Extracellular Matrix Degradation in Invadopodia. Cancer Research *67*, 4227–4235.

Condeelis, J., and Segall, J.E. (2003). Intravital imaging of cell movement in tumours. Nature Reviews Cancer *3*, 921–930.

Congote, L.F., and Temmel, N. (2004). The C-terminal 26-residue peptide of serpin A1 stimulates proliferation of breast and liver cancer cells: role of protein kinase C and CD47. FEBS Letters *576*, 343–347.

Cooper, D., Lindberg, F.P., Gamble, J.R., Brown, E.J., and Vadas, M.A. (1995). Transendothelial migration of neutrophils involves integrin-associated protein (CD47). Proceedings of the National Academy of Sciences *92*, 3978–3982.

Cooper, L.A., Shen, T.-L., and Guan, J.-L. (2003). Regulation of Focal Adhesion Kinase by Its Amino-Terminal Domain through an Autoinhibitory Interaction. Molecular and Cellular Biology *23*, 8030–8041.

Corsi, J.-M., Rouer, E., Girault, J.-A., and Enslen, H. (2006). Organization and post-transcriptional processing of focal adhesion kinase gene. BMC Genomics *7*.

Costin, G.-E., and Hearing, V.J. (2007). Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. The FASEB Journal *21*, 976–994.

Cougoule, C., Carreno, S., Castandet, J., Labrousse, A., Astarie-Dequeker, C., Poincloux, R., Le Cabec, V., and Maridonneau-Parini, I. (2005). Activation of the Lysosome-Associated p61Hck Isoform Triggers the Biogenesis

of Podosomes. Traffic *6*, 682–694.

Courtneidge, S.A. (2012). Cell migration and invasion in human disease: the Tks adaptor proteins. Biochemical Society Transactions *40*, 129–132.

Cui, R., Widlund, H.R., Feige, E., Lin, J.Y., Wilensky, D.L., Igras, V.E., D'Orazio, J., Fung, C.Y., Schanbacher, C.F., Granter, S.R., et al. (2007). Central Role of p53 in the Suntan Response and Pathologic Hyperpigmentation. Cell *128*, 853–864.

Dankort, D., Curley, D.P., Cartlidge, R.A., Nelson, B., Karnezis, A.N., Damsky Jr, W.E., You, M.J., DePinho, R.A., McMahon, M., and Bosenberg, M. (2009). BrafV600E cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. Nature Genetics *41*, 544–552.

Daubon, T., Léon, C., Clarke, K., Andrique, L., Salabert, L., Darbo, E., Pineau, R., Guérit, S., Maitre, M., Dedieu, S., et al. (2019). Deciphering the complex role of thrombospondin-1 in glioblastoma development. Nature Communications *10*.

David-Pfeuty, Th., and Singer, S.J. (1980). Altered distributions of the cytoskeletal proteins vinculin and a-actinin in cultured fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 5.

Davies, M.A., and Samuels, Y. (2010). Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. Oncogene *29*, 5545–5555.

De Franceschi, N., Hamidi, H., Alanko, J., Sahgal, P., and Ivaska, J. (2015). Integrin traffic - the update. Journal of Cell Science *128*, 839–852.

Del Rio, A., Perez-Jimenez, R., Liu, R., Roca-Cusachs, P., Fernandez, J.M., and Sheetz, M.P. (2009). Stretching Single Talin Rod Molecules Activates Vinculin Binding. Science *323*, 638–641

DeMali, K.A., Barlow, C.A., and Burridge, K. (2002). Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin. Journal of Cell Biology *159*, 881–891.

Deramaudt, T.B., Dujardin, D., Hamadi, A., Noulet, F., Kolli, K., De Mey, J., Takeda, K., and Rondé, P. (2011). FAK phosphorylation at Tyr-925 regulates cross-talk between focal adhesion turnover and cell protrusion. Molecular Biology of the Cell *22*, 964–975.

Deramaudt, T.B., Dujardin, D., Noulet, F., Martin, S., Vauchelles, R., Takeda, K., and Rondé, P. (2014). Altering FAK-Paxillin Interactions Reduces Adhesion, Migration and Invasion Processes. PLoS ONE *9*, e92059.

Derivery, E., Sousa, C., Gautier, J.J., Lombard, B., Loew, D., and Gautreau, A. (2009). The Arp2/3 Activator WASH Controls the Fission of Endosomes through a Large Multiprotein Complex. Developmental Cell *17*, 712–723.

Deryugina, E.I., Ratnikov, B., Monosov, E., Postnova, T.I., DiScipio, R., Smith, J.W., and Strongin, A.Y. (2001). MT1-MMP Initiates Activation of pro-MMP-2 and Integrin αvβ3 Promotes Maturation of MMP-2 in Breast Carcinoma Cells. Experimental Cell Research *263*, 209–223.

DesMarais, V., Yamaguchi, H., Oser, M., Soon, L., Mouneimne, G., Sarmiento, C., Eddy, R., and Condeelis, J. (2009). N-WASP and cortactin are involved in invadopodium-dependent chemotaxis to EGF in breast tumor cells. Cell Motility and the Cytoskeleton *66*, 303–316.

Despeaux, M., Chicanne, G., Rouer, E., De Toni-Costes, F., Bertrand, J., Mansat-De Mas, V., Vergnolle, N., Eaves, C., Payrastre, B., Girault, J.-A., et al. (2012). Focal Adhesion Kinase Splice Variants Maintain Primitive Acute Myeloid Leukemia Cells Through Altered Wnt Signaling. STEM CELLS *30*, 1597–1610.

Destaing, O., Ferguson, S.M., Grichine, A., Oddou, C., De Camilli, P., Albiges-Rizo, C., and Baron, R. (2013). Essential Function of Dynamin in the Invasive Properties and Actin Architecture of v-Src Induced Podosomes/Invadosomes. PLoS ONE *8*, e77956.

Devaud, C., Tilkin-Mariamé, A.-F., Vignolle-Vidoni, A., Souleres, P., Denadai-Souza, A., Rolland, C., Duthoit, C., Blanpied, C., Chabot, S., Bouillé, P., et al. (2019). FAK alternative splice mRNA variants expression pattern in colorectal cancer: FAK alternative splice mRNA variants expression pattern in colorectal cancer. International Journal of Cancer *145*, 494–502.

De Vries, H.E., Hendriks, J.J.A., Honing, H., de Lavalette, C.R., van der Pol, S.M.A., Hooijberg, E., Dijkstra, C.D., and van den Berg, T.K. (2002). Signal-Regulatory Protein α-CD47 Interactions Are Required for the Transmigration of Monocytes Across Cerebral Endothelium. The Journal of Immunology *168*, 5832–5839.

Di Martino, J., Paysan, L., Gest, C., Lagrée, V., Juin, A., Saltel, F., and Moreau, V. (2014). Cdc42 and Tks5: A minimal and universal molecular signature for functional invadosomes. Cell Adhesion & Migration *8*, 280–292.

Di Martino, J., Henriet, E., Ezzoukhry, Z., Goetz, J.G., Moreau, V., and Saltel, F. (2016). The microenvironment controls invadosome plasticity. Journal of Cell Science *129*, 1759–1768.

Diaz, B., Shani, G., Pass, I., Anderson, D., Quintavalle, M., and Courtneidge, S.A. (2009). Tks5-Dependent, Nox-Mediated Generation of Reactive Oxygen Species Is Necessary for Invadopodia Formation. Science Signaling *2*, ra53–ra53.

Doherty, J.T., Conlon, F.L., Mack, C.P., and Taylor, J.M. (2010). Focal adhesion kinase is essential for cardiac looping and multichamber heart formation. Genesis *48*, 492–504.

Dorfleutner, A., Cho, Y., Vincent, D., Cunnick, J., Lin, H., Weed, S.A., Stehlik, C., and Flynn, D.C. (2008). Phosphorylation of AFAP-110 affects podosome lifespan in A7r5 cells. Journal of Cell Science *121*, 2394–2405.

Dossi, R., Frapolli, R., Di Giandomenico, S., Paracchini, L., Bozzi, F., Brich, S., Castiglioni, V., Borsotti, P., Belotti, D., Uboldi, S., et al. (2014). Antiangiogenic activity of trabectedin in myxoid liposarcoma: Involvement of host TIMP-1 and TIMP-2 and tumor thrombospondin-1: Antiangiogenic activity of trabectedin. International Journal of Cancer n/a-n/a.

Dourdin, N., Bhatt, A.K., Dutt, P., Greer, P.A., Arthur, J.S.C., Elce, J.S., and Huttenlocher, A. (2001). Reduced Cell Migration and Disruption of the Actin Cytoskeleton in Calpain-deficient Embryonic Fibroblasts. Journal of Biological Chemistry *276*, 48382–48388.

Dunty, J.M., Gabarra-Niecko, V., King, M.L., Ceccarelli, D.F.J., Eck, M.J., and Schaller, M.D. (2004). FERM Domain Interaction Promotes FAK Signaling. Molecular and Cellular Biology *24*, 5353–5368.

Dupin, I., Camand, E., and Etienne-Manneville, S. (2009). Classical cadherins control nucleus and centrosome position and cell polarity. The Journal of Cell Biology *185*, 779–786.

Eddy, R.J., Weidmann, M.D., Sharma, V.P., and Condeelis, J.S. (2017). Tumor Cell Invadopodia: Invasive Protrusions that Orchestrate Metastasis. Trends in Cell Biology *27*, 595–607.

Eggermont, A.M.M., and Kirkwood, J.M. (2004). Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years? European Journal of Cancer *40*, 1825–1836.

Elder, D.E. (2016). Melanoma progression. Pathology *48*, 147–154.

Erami, Z., Heitz, S., Bresnick, A.R., and Backer, J.M. (2019). PI3Kβ links integrin activation and PI(3,4)P_2 production during invadopodial maturation. Molecular Biology of the Cell *30*, 2367–2376.

Etienne-Manneville, S. (2013). Microtubules in Cell Migration. Annual Review of Cell and Developmental Biology *29*, 471–499.

Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. Nature *420*, 629–635.

Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2001). Integrin-Mediated Activation of Cdc42 Controls Cell Polarity in Migrating Astrocytes through PKCζ. Cell *106*, 489-498.

Ezratty, E.J., Partridge, M.A., and Gundersen, G.G. (2005). Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. Nature Cell Biology *7*, 581–590.

Ezratty, E.J., Bertaux, C., Marcantonio, E.E., and Gundersen, G.G. (2009). Clathrin mediates integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells. The Journal of Cell Biology *187*, 733–747.

Ezzoukhry, Z., Henriet, E., Cordelières, F.P., Dupuy, J.-W., Maître, M., Gay, N., Di-Tommaso, S., Mercier, L., Goetz, J.G., Peter, M., et al. (2018). Combining laser capture microdissection and proteomics reveals an active translation machinery controlling invadosome formation. Nature Communications *9*.

Fan, H., Zhao, X., Sun, S., Luo, M., and Guan, J.-L. (2013). Function of Focal Adhesion Kinase Scaffolding to Mediate Endophilin A2 Phosphorylation Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Mammary Cancer Stem Cell Activities *in Vivo*. Journal of Biological Chemistry *288*, 3322–3333.

Feng, R., Zhao, H., Xu, J., and Shen, C. (2020). CD47: the next checkpoint target for cancer immunotherapy. Critical Reviews in Oncology/Hematology *152*, 103014.

Ferrari, R., Martin, G., Tagit, O., Guichard, A., Cambi, A., Voituriez, R., Vassilopoulos, S., and Chavrier, P. (2019). MT1-MMP directs force-producing proteolytic contacts that drive tumor cell invasion. Nature Communications *10*.

Fiedorek, F.T., and Kay, E.S. (1995). Mapping of the focal adhesion kinase (Fadk) gene to mouse Chromosome 15 and human Chromosome 8. Mammalian Genome *6*, 123–126.

Firlej, V., Mathieu, J.R.R., Gilbert, C., Lemonnier, L., Nakhle, J., Gallou-Kabani, C., Guarmit, B., Morin, A., Prevarskaya, N., Delongchamps, N.B., et al. (2011). Thrombospondin-1 Triggers Cell Migration and Development of Advanced Prostate Tumors. Cancer Research *71*, 7649–7658.

Flacher, V., Tripp, C.H., Stoitzner, P., Haid, B., Ebner, S., Del Frari, B., Koch, F., Park, C.G., Steinman, R.M., Idoyaga,

J., et al. (2010). Epidermal Langerhans Cells Rapidly Capture and Present Antigens from C-Type Lectin-Targeting Antibodies Deposited in the Dermis. Journal of Investigative Dermatology *130*, 755–762.

Flaherty, K.T., Puzanov, I., Kim, K.B., Ribas, A., McArthur, G.A., Sosman, J.A., O'Dwyer, P.J., Lee, R.J., Grippo, J.F., Nolop, K., et al. (2010). Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. New England Journal of Medicine *363*, 809–819.

Floquet, N., Dedieu, S., Martiny, L., Dauchez, M., and Perahia, D. (2008). Human thrombospondin's (TSP-1) C-terminal domain opens to interact with the CD-47 receptor: A molecular modeling study. Archives of Biochemistry and Biophysics *478*, 103–109.

Fonseca, C., Voabil, P., Carvalho, A.S., and Matthiesen, R. (2013). Tools for Protein Posttranslational Modifications Analysis: FAK, a Case Study. Method in molecular biology *1007*, 335-358

Forrest, A.D., Beggs, H.E., Reichardt, L.F., Dupree, J.L., Colello, R.J., and Fuss, B. (2009). Focal adhesion kinase (FAK): A regulator of CNS myelination. Journal of Neuroscience Research *87*, 3456–3464.

Frame, M.C., Patel, H., Serrels, B., Lietha, D., and Eck, M.J. (2010). The FERM domain: organizing the structure and function of FAK. Nature Reviews Molecular Cell Biology *11*, 802–814.

Franco, S.J. and Huttenlocher, A. (2005). Regulating cell migration: calpains make the cut. Journal of Cell Science *118*, 3829–3838.

Frantz, C., Stewart, K.M., and Weaver, V.M. (2010). The extracellular matrix at a glance. J Cell Sci *123*, 4195–4200.

Frazier, W.A., Gao, A.-G., Dimitry, J., Chung, J., Brown, E.J., Lindberg, F.P., and Linder, M.E. (1999). The Thrombospondin Receptor Integrin-associated Protein (CD47) Functionally Couples to Heterotrimeric G_i. Journal of Biological Chemistry *274*, 8554–8560.

Friedl, P., and Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. Nature Reviews Molecular Cell Biology *10*, 445–457.

Friedl, P., and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. Nature Reviews Cancer *3*, 362–374.

Fructuoso, M., Legrand, M., Mousson, A., Steffan, T., Vauchelles, R., De Mey, J., Sick, E., Rondé, P., and Dujardin, D. (2019). FAK Regulates Dynein Localization and Cell Polarity in Migrating Mouse Fibroblasts. Biology of the Cell *112*, 53-72.

Fujii, T., Koshikawa, K., Nomoto, S., Okochi, O., Kaneko, T., Inoue, S., Yatabe, Y., Takeda, S., and Nakao, A. (2004). Focal adhesion kinase is overexpressed in hepatocellular carcinoma and can be served as an independent prognostic factor. Journal of Hepatology *41*, 104–111.

Fukumura, D., and Jain, R.K. (2007). Tumor microvasculature and microenvironment: Targets for anti-angiogenesis and normalization. Microvascular Research *74*, 72–84.

Furuyama, K., Doi, R., Mori, T., Toyoda, E., Ito, D., Kami, K., Koizumi, M., Kida, A., Kawaguchi, Y., and Fujimoto, K. (2006). Clinical Significance of Focal Adhesion Kinase in Resectable Pancreatic Cancer. World Journal of Surgery *30*, 219–226.

Gabriel, B. (2006). Weak Expression of Focal Adhesion Kinase (pp125FAK) in Patients with Cervical Cancer Is Associated with Poor Disease Outcome. Clinical Cancer Research *12*, 2476–2483.

Gaggioli, C., and Sahai, E. (2007). Melanoma invasion ? current knowledge and future directions. Pigment Cell Research *20*, 161–172.

Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J.F., Harrington, K., and Sahai, E. (2007). Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. Nature Cell Biology *9*, 1392–1400.

Galbraith, C.G., Yamada, K.M., and Sheetz, M.P. (2002). The relationship between force and focal complex development. Journal of Cell Biology *159*, 695–705.

Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M.S., Pasquini, P., Abeni, D., Boyle, P., and Melchi, C.F. (2005). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. European Journal of Cancer *41*, 28–44.

Gao, A.G., and Frazier, W.A. (1994). Identification of a receptor candidate for the carboxyl-terminal cell binding domain of thrombospondins. The journal of biological chemistry *269*, 29650-29657.

Gao, A.-G., Lindberg, F.P., Dimitry, J.M., Brown, E.J., and Frazier, W.A. Thrombospondin Modulates OLv~3 Function through Integrin-associated Protein. 12.

Gao, G., Prutzman, K.C., King, M.L., Scheswohl, D.M., DeRose, E.F., London, R.E., Schaller, M.D., and Campbell,

S.L. (2004). NMR Solution Structure of the Focal Adhesion Targeting Domain of Focal Adhesion Kinase in Complex with a Paxillin LD Peptide: evidence for a two-site binding model. Journal of Biological Chemistry *279*, 8441–8451.

Gao, L., Chen, K., Gao, Q., Wang, X., Sun, J., and Yang, Y.-G. (2017). CD47 deficiency in tumor stroma promotes tumor progression by enhancing angiogenesis. Oncotarget *8*, 22406–22413.

Garbe, C., Peris, K., Hauschild, A., Saiag, P., Middleton, M., Spatz, A., Grob, J.-J., Malvehy, J., Newton-Bishop, J., Stratigos, A., et al. (2010). Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. European Journal of Cancer *46*, 270–283.

Garces, C.A., Kurenova, E.V., Golubovskaya, V.M., and Cance, W.G. (2006). Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 and Focal Adhesion Kinase Bind and Suppress Apoptosis in Breast Cancer Cells. Cancer Research *66*, 1446–1454.

Gates, E., King, L.E., Hanks, K., and Nanney, B. (1994). Potential Role for Focal Adhesion Kinase in Migrating and Proliferating Keratinocytes near Epidermal Wounds and in Culture. Cell Growth *5*, 891-899.

Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., and Yamada, K.M. (2001). Transmembrane extracellular matrix– cytoskeleton crosstalk. Nature reviews: Molecular cell biology *2*, 793-805.

Genna, A., Lapetina, S., Lukic, N., Twafra, S., Meirson, T., Sharma, V.P., Condeelis, J.S., and Gil-Henn, H. (2018). Pyk2 and FAK differentially regulate invadopodia formation and function in breast cancer cells. The Journal of Cell Biology *217*, 375–395.

Giaginis, C.T., Vgenopoulou, S., Tsourouflis, G.S., Politi, E.N., Kouraklis, G.P., and Theocharis, S.E. (2009). Expression and Clinical Significance of Focal Adhesion Kinase in the Two Distinct Histological Types, Intestinal and Diffuse, of Human Gastric Adenocarcinoma. Pathology & Oncology Research *15*, 173–181.

Gianni, D., Diaz, B., Taulet, N., Fowler, B., Courtneidge, S.A., and Bokoch, G.M. (2009). Novel p47phox-Related Organizers Regulate Localized NADPH Oxidase 1 (Nox1) Activity. Science Signaling *2*, ra54–ra54.

Gianni, D., DerMardirossian, C., and Bokoch, G.M. (2011). Direct interaction between Tks proteins and the N-terminal proline-rich region (PRR) of NoxA1 mediates Nox1-dependent ROS generation. European Journal of Cell Biology *90*, 164–171.

Gilkes, D.M., Semenza, G.L., and Wirtz, D. (2014). Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. Nature Reviews Cancer *14*, 430–439.

Gilmore, A.P., and Romer, L.H. (1996). Inhibition of focal adhesion kinase (FAK) signaling in focal adhesions decreases cell motility and proliferation. Molecular Biology of the Cell *7*, 1209–1224.

Gimona, M., Buccione, R., Courtneidge, S.A., and Linder, S. (2008). Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. Current Opinion in Cell Biology *20*, 235–241.

Gligorijevic, B., Bergman, A., and Condeelis, J. (2014). Multiparametric Classification Links Tumor Microenvironments with Tumor Cell Phenotype. PLoS Biology *12*, e1001995.

Goertzen, C., Eymael, D., and Magalhaes, M. (2018). Three-Dimensional Quantification of Spheroid Degradation Dependent Invasion and Invadopodia Formation. Biological Procedures Online *20*.

Gogate, P.N., Ethirajan, M., Kurenova, E.V., Magis, A.T., Pandey, R.K., and Cance, W.G. (2014). Design, synthesis, and biological evaluation of novel FAK scaffold inhibitors targeting the FAK–VEGFR3 protein–protein interaction. European Journal of Medicinal Chemistry *80*, 154–166.

Golan, T., Messer, A.R., Amitai-Lange, A., Melamed, Z., Ohana, R., Bell, R.E., Kapitansky, O., Lerman, G., Greenberger, S., Khaled, M., et al. (2015). Interactions of Melanoma Cells with Distal Keratinocytes Trigger Metastasis via Notch Signaling Inhibition of MITF. Molecular Cell *59*, 664–676.

Golubovskaya, V. (2014). Targeting FAK in human cancer: from finding to first clinical trials. Frontiers in Bioscience *19*, 687.

Golubovskaya, V.M., Nyberg, C., Zheng, M., Kweh, F., Magis, A., Ostrov, D., and Cance, W.G. (2008). A Small Molecule Inhibitor, 1,2,4,5-Benzenetetraamine Tetrahydrochloride, Targeting the Y397 Site of Focal Adhesion Kinase Decreases Tumor Growth. Journal of Medicinal Chemistry *51*, 7405–7416.

Golubovskaya, V.M., Figel, S., Ho, B.T., Johnson, C.P., Yemma, M., Huang, G., Zheng, M., Nyberg, C., Magis, A., Ostrov, D.A., et al. (2012). A small molecule focal adhesion kinase (FAK) inhibitor, targeting Y397 site: 1-(2-hydroxyethyl) -3, 5, 7-triaza-1-azoniatricyclo [3.3.1.13,7]decane; bromide effectively inhibits FAK autophosphorylation activity and decreases cancer cell viability, clonogenicity and tumor growth in vivo. Carcinogenesis *33*, 1004–1013.

Golubovskaya, V.M., Ho, B., Zheng, M., Magis, A., Ostrov, D., Morrison, C., and Cance, W.G. (2013). Disruption of focal adhesion kinase and p53 interaction with small molecule compound R2 reactivated p53 and blocked tumor growth. BMC Cancer *13*.

Golubovskaya, V.M., Palma, N.L., Zheng, M., Ho, B., Magis, A., Ostrov, D., and Cance, W.G. (2013). A Small-molecule Inhibitor, 5'-O-Tritylthymidine, Targets FAK and Mdm-2 Interaction, and Blocks Breast and Colon Tumorigenesis in vivo. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry *13*, 532–545.

Goni, G.M., Epifano, C., Boskovic, J., Camacho-Artacho, M., Zhou, J., Bronowska, A., Martin, M.T., Eck, M.J., Kremer, L., Grater, F., et al. (2014). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate triggers activation of focal adhesion kinase by inducing clustering and conformational changes. Proceedings of the National Academy of Sciences *111*, E3177–E3186.

Gonzalez, D.M., and Medici, D. (2014). Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. Science Signaling *7*, re8–re8.

Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.-V.F., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Jr, R.A.D., Kastrinakis, N.G., Levy, B., et al. (2005). checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *434*, 7.

Gould, J. (2018). Superpowered skin. Nature *563*, S84–S85.

Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., and Marais, R. (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. Nature *445*, 851–857.

Green, J.M., Zheleznyak, A., Chung, J., Lindberg, F.P., Sarfati, M., Frazier, W.A., and Brown, E.J. (1999). Role of Cholesterol in Formation and Function of a Signaling Complex Involving αvβ3, Integrin-Associated Protein (Cd47), and Heterotrimeric G Proteins. Journal of Cell Biology *146*, 673–682.

Grek, C.L., and Tew, K.D. (2010). Redox metabolism and malignancy. Current Opinion in Pharmacology *10*, 362–368.

Grigera, P.R., Ma, L., Borgman, C.A., Pinto, A.F., Sherman, N.E., Parsons, J.T., and Fox, J.W. (2012). Mass spectrometric analysis identifies a cortactin–RCC2/TD60 interaction in mitotic cells. Journal of Proteomics *75*, 2153–2159.

Grimbert, P., Bouguermouh, S., Baba, N., Nakajima, T., Allakhverdi, Z., Braun, D., Saito, H., Rubio, M., Delespesse, G., and Sarfati, M. (2006). Thrombospondin/CD47 Interaction: A Pathway to Generate Regulatory T Cells from Human $CD4^+ CD25^-$ T Cells in Response to Inflammation. The Journal of Immunology *177*, 3534–3541.

Guiet, R., Poincloux, R., Castandet, J., Marois, L., Labrousse, A., Lecabec, V., and Maridonneauparini, I. (2008). Hematopoietic cell kinase (Hck) isoforms and phagocyte duties – From signaling and actin reorganization to migration and phagocytosis. European Journal of Cell Biology *87*, 527–542.

Guo, N., Zabrenetzky, V.S., Chandrasekaran, L., Sipes, J.M., Lawler, J., Krutzsch, H.C., and Roberts, D.D. (1998). Differential Roles of Protein Kinase C and Pertussis Toxin-sensitive G-binding Proteins in Modulation of Melanoma Cell Proliferation and Motility by Thrombospondin. Cancer research *58*, 3154-3162.

Haass, N.K., and Herlyn, M. (2005). Normal Human Melanocyte Homeostasis as a Paradigm for Understanding Melanoma. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings *10*, 153–163.

Hagedorn, E.J., Ziel, J.W., Morrissey, M.A., Linden, L.M., Wang, Z., Chi, Q., Johnson, S.A., and Sherwood, D.R. (2013). The netrin receptor DCC focuses invadopodia-driven basement membrane transmigration in vivo. The Journal of Cell Biology *201*, 903–913.

Haier, J., and Nicolson, G.L. (2002). PTEN regulates tumor cell adhesion of colon carcinoma cells under dynamic conditions of fluid flow. Oncogene *21*, 1450-1460

Halbleib, J.M., and Nelson, W.J. (2006). Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. Genes & Development *20*, 3199–3214.

Halder, J., Lin, Y.G., Merritt, W.M., Spannuth, W.A., Nick, A.M., Honda, T., Kamat, A.A., Han, L.Y., Kim, T.J., Lu, C., et al. (2007). Therapeutic efficacy of a novel focal adhesion kinase inhibitor TAE226 in ovarian carcinoma. Cancer Res. *67*, 10976–10983.

Hall, J.E., and Schaller, M.D. (2017). Phospholipid binding to the FAK catalytic domain impacts function. PLOS ONE *12*, e0172136.

Hall, J.E., Fu, W., and Schaller, M.D. (2011). Focal Adhesion Kinase. In International Review of Cell and Molecular Biology, (Elsevier), pp. 185–225.

Hamadi, A., Bouali, M., Dontenwill, M., Stoeckel, H., Takeda, K., and Rondé, P. (2005). Regulation of focal

adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397. Journal of Cell Science *118*, 4415–4425.

Hamadi, A., Deramaudt, T.B., Takeda, K., and Rondé, P. (2009). Src activation and translocation from focal adhesions to membrane ruffles contribute to formation of new adhesion sites. Cellular and Molecular Life Sciences *66*, 324–338.

Harada, T., Swift, J., Irianto, J., Shin, J.-W., Spinler, K.R., Athirasala, A., Diegmiller, R., Dingal, P.C.D.P., Ivanovska, I.L., and Discher, D.E. (2014). Nuclear lamin stiffness is a barrier to 3D migration, but softness can limit survival. The Journal of Cell Biology *204*, 669–682.

Harte, M.T., Hildebrand, J.D., Burnham, M.R., Bouton, A.H., and Parsons, J.T. (1996). p130 ^{Cas} , a Substrate Associated with v-Src and v-Crk, Localizes to Focal Adhesions and Binds to Focal Adhesion Kinase. Journal of Biological Chemistry *271*, 13649–13655.

Hatherley, D., Graham, S.C., Turner, J., Harlos, K., Stuart, D.I., and Barclay, A.N. (2008). Paired Receptor Specificity Explained by Structures of Signal Regulatory Proteins Alone and Complexed with CD47. Molecular Cell *31*, 266–277.

Hauck, C.R., Hsia, D.A., Ilic, D., and Schlaepfer, D.D. (2002). v-Src SH3-enhanced Interaction with Focal Adhesion Kinase at β_1 Integrin-containing Invadopodia Promotes Cell Invasion. Journal of Biological Chemistry *277*, 12487–12490.

Havrylov, S., and Park, M. (2015). MS/MS-based strategies for proteomic profiling of invasive cell structures. PROTEOMICS *15*, 272–286.

Hayashi, I., Vuori, K., and Liddington, R.C. (2002). The focal adhesion targeting (FAT) region of focal adhesion kinase is a four-helix bundle that binds paxillin. Nature Structural Biology *9*, 101–106.

Heffler, M., Golubovskaya, V.M., Dunn, K.M.B., and Cance, W. (2013). Focal adhesion kinase autophosphorylation inhibition decreases colon cancer cell growth and enhances the efficacy of chemotherapy. Cancer Biology & Therapy *14*, 761–772.

Hegerfeldt, Y., Tusch, M., Brocker, E.-B., and Friedl, P. (2002). Collective Cell Movement in Primary Melanoma Explants: Plasticity of Cell-Cell Interaction β1-Integrin Function and Migration Strategies. Cancer research *62*, 2125-2130.

Heinrich, T., Seenisamy, J., Emmanuvel, L., Kulkarni, S.S., Bomke, J., Rohdich, F., Greiner, H., Esdar, C., Krier, M., Grädler, U., et al. (2013). Fragment-Based Discovery of New Highly Substituted 1 *H* -Pyrrolo[2,3- *b*]- and 3 *H* -Imidazolo[4,5- *b*]-Pyridines as Focal Adhesion Kinase Inhibitors. Journal of Medicinal Chemistry *56*, 1160–1170.

Hennessy, B.T., Smith, D.L., Ram, P.T., Lu, Y., and Mills, G.B. (2005). Exploiting the PI3K/AKT Pathway for Cancer Drug Discovery. Nature Reviews Drug Discovery *4*, 988–1004.

Hermann, P., Armant, M., Brown, E., Rubio, M., Ishihara, H., Ulrich, D., Caspary, R.G., Lindberg, F.P., Armitage, R., Maliszewski, C., et al. (1999). The Vitronectin Receptor and its Associated CD47 Molecule Mediates Proinflammatory Cytokine Synthesis in Human Monocytes by Interaction with Soluble CD23. Journal of Cell Biology *144*, 767–775.

Hess, A.R., Postovit, L.-M., Margaryan, N.V., Seftor, E.A., Schneider, G.B., Seftor, R.E.B., Nickoloff, B.J., and Hendrix, M.J.C. (2005). Focal Adhesion Kinase Promotes the Aggressive Melanoma Phenotype. Cancer Research *65*, 9851–9860.

Hirata, E., Girotti, M.R., Viros, A., Hooper, S., Spencer-Dene, B., Matsuda, M., Larkin, J., Marais, R., and Sahai, E. (2015). Intravital Imaging Reveals How BRAF Inhibition Generates Drug-Tolerant Microenvironments with High Integrin β1/FAK Signaling. Cancer Cell *27*, 574–588.

Ho, B., Olson, G., Figel, S., Gelman, I., Cance, W.G., and Golubovskaya, V.M. (2012). Nanog Increases Focal Adhesion Kinase (FAK) Promoter Activity and Expression and Directly Binds to FAK Protein to Be Phosphorylated. Journal of Biological Chemistry *287*, 18656–18673.

Hochwald, S.N., Nyberg, C., Zheng, M., Zheng, D., Wood, C., Massoll, N.A., Magis, A., Ostrov, D., Cance, W.G., and Golubovskaya, V., M. (2009). A novel small molecule inhibitor of FAK decreases growth of human pancreatic cancer. Cell cycle *8*, 2435-2443.

Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. New England Journal of Medicine *363*, 711–723.

Hodis, E., Watson, I.R., Kryukov, G.V., Arold, S.T., Imielinski, M., Theurillat, J.-P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., et al. (2012). A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. Cell *150*, 251–263.

Hoffmann, J.-E., Fermin, Y., Stricker, R.L., Ickstadt, K., and Zamir, E. (2014). Symmetric exchange of multi-protein building blocks between stationary focal adhesions and the cytosol. ELife *3*.

Horimoto, Y., Polanska, U.M., Takahashi, Y., and Orimo, A. (2012). Emerging roles of the tumor-associated stroma in promoting tumor metastasis. Cell Adhesion & Migration *6*, 193–203.

Hoshino, D., Jourquin, J., Emmons, S.W., Miller, T., Goldgof, M., Costello, K., Tyson, D.R., Brown, B., Lu, Y., Prasad, N.K., et al. (2012). Network analysis of the focal adhesion to invadopodia transition identifies a PI3K-PKCα invasive signaling axis. Sci Signal *5*, ra66.

Hoshino, D., Branch, K.M., and Weaver, A.M. (2013). Signaling inputs to invadopodia and podosomes. Journal of Cell Science *126*, 2979–2989.

Hu, C., Wen, J., Gong, L., Chen, X., Wang, J., Hu, F., Zhou, Q., Liang, J., Wei, L., Shen, Y., et al. (2017). Thrombospondin-1 promotes cell migration, invasion and lung metastasis of osteosarcoma through FAK dependent pathway. Oncotarget *8*, 75881–75892.

Hu, T., Liu, H., Liang, Z., Wang, F., Zhou, C., Zheng, X., Zhang, Y., Song, Y., Hu, J., He, X., et al. (2020). Tumor-intrinsic CD47 signal regulates glycolysis and promotes colorectal cancer cell growth and metastasis. Theranostics *10*, 4056–4072.

Huang, R.Y.-J., Guilford, P., and Thiery, J.P. (2012). Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. Journal of Cell Science *125*, 4417–4422.

Huang, T., Sun, L., Yuan, X., and Qiu, H. (2017). Thrombospondin-1 is a multifaceted player in tumor progression. Oncotarget *8*, 84546–84558.

Huang, W., Wang, W.-T., Fang, K., Chen, Z.-H., Sun, Y.-M., Han, C., Sun, L.-Y., Luo, X.-Q., and Chen, Y.-Q. (2018). MIR-708 promotes phagocytosis to eradicate T-ALL cells by targeting CD47. Molecular Cancer *17*.

Hulit, J., Suyama, K., Chung, S., Keren, R., Agiostratidou, G., Shan, W., Dong, X., Williams, T.M., Lisanti, M.P., Knudsen, K., et al. (2007). N-Cadherin Signaling Potentiates Mammary Tumor Metastasis via Enhanced Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation. Cancer Research *67*, 3106–3116.

Hungerford, J.E., Compton, M.T., Matter, M.L., Hoffstrom, B.G., and Otey, C.A. (1996). Inhibition of pp125FAgin Cultured Fibroblasts Results in Apoptosis. The journal of cell biology *135*, 1383-1390.

Hunger-Glaser, I., Fan, R.S., Perez-Salazar, E., and Rozengurt, E. (2004). PDGF and FGF induce focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation at Ser-910: Dissociation from Tyr-397 phosphorylation and requirement for ERK activation. Journal of Cellular Physiology *200*, 213–222.

Huotari, J., and Helenius, A. (2011). Endosome maturation: Endosome maturation. The EMBO Journal *30*, 3481–3500.

Hynes, R.O. (2009). The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. Science *326*, 1216–1219.

Iizuka, S., Abdullah, C., Buschman, M.D., Diaz, B., and Courtneidge, S.A. (2016). The role of Tks adaptor proteins in invadopodia formation, growth and metastasis of melanoma. Oncotarget *7*, 78473-78486.

Ilić, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., and Yamamoto, T. (1995). Reduced cell motility andenhanced focal adhesioncontact formation in cellsfrom FAK-deficient mice. Nature *377,* 539-544.

Infante, E., Castagnino, A., Ferrari, R., Monteiro, P., Agüera-González, S., Paul-Gilloteaux, P., Domingues, M.J., Maiuri, P., Raab, M., Shanahan, C.M., et al. (2018). LINC complex-Lis1 interplay controls MT1-MMP matrix digest-on-demand response for confined tumor cell migration. Nature Communications *9*.

Infante, J.R., Camidge, D.R., Mileshkin, L.R., Chen, E.X., Hicks, R.J., Rischin, D., Fingert, H., Pierce, K.J., Xu, H., Roberts, W.G., et al. (2012). Safety, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Phase I Dose-Escalation Trial of PF-00562271, an Inhibitor of Focal Adhesion Kinase, in Advanced Solid Tumors. Journal of Clinical Oncology *30*, 1527–1533.

Isenberg, J.S., Ridnour, L.A., Dimitry, J., Frazier, W.A., Wink, D.A., and Roberts, D.D. (2006). CD47 Is Necessary for Inhibition of Nitric Oxide-stimulated Vascular Cell Responses by Thrombospondin-1. Journal of Biological Chemistry *281*, 26069–26080.

Isenberg, J.S., Maxhimer, J.B., Hyodo, F., Pendrak, M.L., Ridnour, L.A., DeGraff, W.G., Tsokos, M., Wink, D.A., and Roberts, D.D. (2008a). Thrombospondin-1 and CD47 Limit Cell and Tissue Survival of Radiation Injury. The American Journal of Pathology *173*, 1100–1112.

Isenberg, J.S., Pappan, L.K., Romeo, M.J., Abu-Asab, M., Tsokos, M., Wink, D.A., Frazier, W.A., and Roberts, D.D. (2008b). Blockade of Thrombospondin-1-CD47 Interactions Prevents Necrosis of Full Thickness Skin Grafts:

Annals of Surgery *247*, 180–190.

Isenberg, J.S., Shiva, S., and Gladwin, M. (2009). Thrombospondin-1–CD47 blockade and exogenous nitrite enhance ischemic tissue survival, blood flow and angiogenesis via coupled NO–cGMP pathway activation. Nitric Oxide *21*, 52–62.

Ishibe, S., Joly, D., Liu, Z.-X., and Cantley, L.G. (2004). Paxillin Serves as an ERK-Regulated Scaffold for Coordinating FAK and Rac Activation in Epithelial Morphogenesis. Molecular Cell *16*, 257–267.

Ishikawa-Sekigami, T., Kaneko, Y., Saito, Y., Murata, Y., Okazawa, H., Ohnishi, H., Oldenborg, P.-A., Nojima, Y., and Matozaki, T. (2006). Enhanced phagocytosis of CD47-deficient red blood cells by splenic macrophages requires SHPS-1. Biochemical and Biophysical Research Communications *343*, 1197–1200.

Jaiswal, S., Jamieson, C.H.M., Pang, W.W., Park, C.Y., Chao, M.P., Majeti, R., Traver, D., van Rooijen, N., and Weissman, I.L. (2009). CD47 Is Upregulated on Circulating Hematopoietic Stem Cells and Leukemia Cells to Avoid Phagocytosis. Cell *138*, 271–285.

Jannie, K.M., Ellerbroek, S.M., Zhou, D.W., Chen, S., Crompton, D.J., García, A.J., and DeMali, K.A. (2015). Vinculin-dependent actin bundling regulates cell migration and traction forces. Biochemical Journal *465*, 383–393.

Jayachandran, A., Anaka, M., Prithviraj, P., Hudson, C., McKeown, S.J., Lo, P.-H., Vella, L.J., Goding, C.R., Cebon, J., and Behren, A. (2014). Thrombospondin 1 promotes an aggressive phenotype through epithelial-to-mesenchymal transition in human melanoma. Oncotarget *5*, 5782–5797.

Jean, C., Chen, X.L., Nam, J.-O., Tancioni, I., Uryu, S., Lawson, C., Ward, K.K., Walsh, C.T., Miller, N.L.G., Ghassemian, M., et al. (2014). Inhibition of endothelial FAK activity prevents tumor metastasis by enhancing barrier function. The Journal of Cell Biology *204*, 247–263.

Jeanne, A., Sick, E., Devy, J., Floquet, N., Belloy, N., Theret, L., Boulagnon-Rombi, C., Diebold, M.-D., Dauchez, M., Martiny, L., et al. (2015). Identification of TAX2 peptide as a new unpredicted anti-cancer agent. Oncotarget *6*, 17981–18000.

Jeanne, A., Boulagnon-Rombi, C., Devy, J., Théret, L., Fichel, C., Bouland, N., Diebold, M.-D., Martiny, L., Schneider, C., and Dedieu, S. (2016). Matricellular TSP-1 as a target of interest for impeding melanoma spreading: towards a therapeutic use for TAX2 peptide. Clinical & Experimental Metastasis *33*, 637–649.

Jeanne, A., Martiny, L., and Dedieu, S. (2017). Thrombospondin-targeting TAX2 peptide impairs tumor growth in preclinical mouse models of childhood neuroblastoma. Pediatric Research *81*, 480–488.

Jiang, A., Lehti, K., Wang, X., Weiss, S.J., Keski-Oja, J., and Pei, D. (2001). Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis. Proceedings of the National Academy of Sciences *98*, 13693–13698.

Jiang, H., Hegde, S., Knolhoff, B.L., Zhu, Y., Herndon, J.M., Meyer, M.A., Nywening, T.M., Hawkins, W.G., Shapiro, I.M., Weaver, D.T., et al. (2016). Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy. Nature Medicine *22*, 851–860.

Jin, M.H., Nam, A.-R., Park, J.E., Bang, J.-H., Bang, Y.-J., and Oh, D.-Y. (2017). Resistance Mechanism against Trastuzumab in HER2-Positive Cancer Cells and Its Negation by Src Inhibition. Molecular Cancer Therapeutics *16*, 1145–1154.

Juin, A., Billottet, C., Moreau, V., Destaing, O., Albiges-Rizo, C., Rosenbaum, J., Génot, E., and Saltel, F. (2012). Physiological type I collagen organization induces the formation of a novel class of linear invadosomes. Molecular Biology of the Cell *23*, 297–309.

Juin, A., Di Martino, J., Leitinger, B., Henriet, E., Gary, A.-S., Paysan, L., Bomo, J., Baffet, G., Gauthier-Rouvière, C., Rosenbaum, J., et al. (2014). Discoidin domain receptor 1 controls linear invadosome formation via a Cdc42–Tuba pathway. The Journal of Cell Biology *207*, 517–533.

Kadaré, G., Gervasi, N., Brami-Cherrier, K., Blockus, H., El Messari, S., Arold, S.T., and Girault, J.-A. (2015). Conformational Dynamics of the Focal Adhesion Targeting Domain Control Specific Functions of Focal Adhesion Kinase in Cells. Journal of Biological Chemistry *290*, 478–491.

Kahana, O., Micksche, M., Witz, I.P., and Yron, I. (2002). The focal adhesion kinase (P125FAK) is constitutively active in human malignant melanoma. Oncogene *21*, 3969–3977.

Kaimori, A., Potter, J., Kaimori, J., Wang, C., Mezey, E., and Koteish, A. (2007). Transforming Growth Factor-β1 Induces an Epithelial-to-Mesenchymal Transition State in Mouse Hepatocytes *in Vitro*. Journal of Biological Chemistry *282*, 22089–22101.

Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. Nat. Rev. Cancer *16*, 582–598.

Kamijo, H., Miyagaki, T., Takahashi-Shishido, N., Nakajima, R., Oka, T., Suga, H., Sugaya, M., and Sato, S. (2020). Thrombospondin-1 promotes tumor progression in cutaneous T-cell lymphoma via CD47. Leukemia *34*, 845–856.

Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A.M., Ramko, E.B., Davidson, M.W., Hess, H.F., and Waterman, C.M. (2010). Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. Nature *468*, 580–584.

Kandil, S., Prencipe, F., Jones, S., Hiscox, S., and Westwell, A.D. (2018). The discovery of new and more potent chloropyramine (C4) analogues for the potential treatment of invasive breast cancer. Chemical Biology & Drug Design *91*, 314–321.

Kandil, S.B., Jones, S.R., Smith, S., Hiscox, S.E., and Westwell, A.D. (2020). Structure-Based Virtual Screening, Synthesis and Biological Evaluation of Potential FAK-FAT Domain Inhibitors for Treatment of Metastatic Cancer. Molecules *25*, 3488.

Kaneda, T., Sonoda, Y., Ando, K., Suzuki, T., Sasaki, Y., Oshio, T., Tago, M., and Kasahara, T. (2008). Mutation of Y925F in focal adhesion kinase (FAK) suppresses melanoma cell proliferation and metastasis. Cancer Letters *270*, 354–361.

Kanitis, J. (1997). Biologie de la peau humaine chapter Structure histologique de la peau humaine. Les éditions INSERM. 5, 6, 7, 8, 11, 44, pages 1–20.

Kasorn, A., Alcaide, P., Jia, Y., Subramanian, K.K., Sarraj, B., Li, Y., Loison, F., Hattori, H., Silberstein, L.E., Luscinskas, W.F., et al. (2009). Focal Adhesion Kinase Regulates Pathogen-Killing Capability and Life Span of Neutrophils via Mediating Both Adhesion-Dependent and -Independent Cellular Signals. The Journal of Immunology *183*, 1032–1043.

Kato, Y., Lambert, C.A., Colige, A.C., Mineur, P., Noel, A., Frankenne, F., Foidart, J.-M., Baba, M., Hata, R.-I., Miyazaki, K., et al. (2005). Acidic Extracellular pH Induces Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Mouse Metastatic Melanoma Cells through the Phospholipase D-Mitogen-activated Protein Kinase Signaling. Journal of Biological Chemistry *280*, 10938–10944.

Katoh, K., Kano, Y., Amano, M., Onishi, H., Kaibuchi, K., and Fujiwara, K. (2001). Rho-Kinase–Mediated Contraction of Isolated Stress Fibers. The Journal of Cell Biology *153*, 569–584.

Katz, B.-Z., Romer, L., Miyamoto, S., Volberg, T., Matsumoto, K., Cukierman, E., Geiger, B., and Yamada, K.M. (2003). Targeting Membrane-localized Focal Adhesion Kinase to Focal Adhesions: ROLES OF TYROSINE PHOSPHORYLATION AND SRC FAMILY KINASES. Journal of Biological Chemistry *278*, 29115–29120.

Kaur, S., Martin-Manso, G., Pendrak, M.L., Garfield, S.H., Isenberg, J.S., and Roberts, D.D. (2010). Thrombospondin-1 Inhibits VEGF Receptor-2 Signaling by Disrupting Its Association with CD47. Journal of Biological Chemistry *285*, 38923–38932.

Kaur, S., Kuznetsova, S.A., Pendrak, M.L., Sipes, J.M., Romeo, M.J., Li, Z., Zhang, L., and Roberts, D.D. (2011). Heparan Sulfate Modification of the Transmembrane Receptor CD47 Is Necessary for Inhibition of T Cell Receptor Signaling by Thrombospondin-1. Journal of Biological Chemistry *286*, 14991–15002.

Kaur, S., Chang, T., Singh, S.P., Lim, L., Mannan, P., Garfield, S.H., Pendrak, M.L., Soto-Pantoja, D.R., Rosenberg, A.Z., Jin, S., et al. (2014). CD47 Signaling Regulates the Immunosuppressive Activity of VEGF in T Cells. The Journal of Immunology *193*, 3914–3924.

Kean, M.J., Williams, K.C., Skalski, M., Myers, D., Burtnik, A., Foster, D., and Coppolino, M.G. (2009). VAMP3, syntaxin-13 and SNAP23 are involved in secretion of matrix metalloproteinases, degradation of the extracellular matrix and cell invasion. Journal of Cell Science *122*, 4089–4098.

Kelkar, N., Standen, C.L., and Davis, R.J. (2005). Role of the JIP4 Scaffold Protein in the Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways. Molecular and Cellular Biology *25*, 2733–2743.

Kempiak, S.J., Yamaguchi, H., Sarmiento, C., Sidani, M., Ghosh, M., Eddy, R.J., DesMarais, V., Way, M., Condeelis, J., and Segall, J.E. (2005). A Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein-mediated Pathway for Localized Activation of Actin Polymerization That Is Regulated by Cortactin. Journal of Biological Chemistry *280*, 5836–5842.

Kim, H.-S., Choi, D.-Y., Yun, S.J., Choi, S.-M., Kang, J.W., Jung, J.W., Hwang, D., Kim, K.P., and Kim, D.-W. (2012). Proteomic Analysis of Microvesicles Derived from Human Mesenchymal Stem Cells. Journal of Proteome Research *11*, 839–849.

Kirchner, J., Kam, Z., Tzur, G., Bershadsky, A.D., and Geiger, B. (2003). Live-cell monitoring of tyrosine phosphorylation in focal adhesions following microtubule disruption. Journal of Cell Science *116*, 975–986.

Klapproth, S., Bromberger, T., Türk, C., Krüger, M., and Moser, M. (2019). A kindlin-3–leupaxin–paxillin signaling pathway regulates podosome stability. Journal of Cell Biology *218*, 3436–3454.

Kleinschmidt, E.G., and Schlaepfer, D.D. (2017). Focal adhesion kinase signaling in unexpected places. Current Opinion in Cell Biology *45*, 24–30.

Kohno, T., Matsuda, E., Sasaki, H., and Sasaki, T. (2008). Protein-tyrosine kinase CAKβ/PYK2 is activated by binding Ca^{2+}/calmodulin to FERM F2 α2 helix and thus forming its dimer. Biochemical Journal *410*, 513–523.

Kolli-Bouhafs, K., Sick, E., Noulet, F., Gies, J.-P., De Mey, J., and Rondé, P. (2014). FAK competes for Src to promote migration against invasion in melanoma cells. Cell Death and Disease *5*, e1379.

Kong, X., Li, G., Yuan, Y., He, Y., Wu, X., Zhang, W., Wu, Z., Chen, T., Wu, W., Lobie, P.E., et al. (2012). MicroRNA-7 Inhibits Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis of Breast Cancer Cells via Targeting FAK Expression. PLoS ONE *7*, e41523.

Koshman, Y.E., Kim, T., Chu, M., Engman, S.J., Iyengar, R., Robia, S.L., and Samarel, A.M. (2010). FRNK Inhibition of Focal Adhesion Kinase–Dependent Signaling and Migration in Vascular Smooth Muscle Cells. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *30*, 2226–2233.

Krakhmal, N.V., Zavyalova, M.V., Denisov, E.V., Vtorushin, S.V., and Perelmuter, V.M. (2015). Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms. Acta Naturae *7*, 17–28.

Krampitz, G.W., George, B.M., Willingham, S.B., Volkmer, J.-P., Weiskopf, K., Jahchan, N., Newman, A.M., Sahoo, D., Zemek, A.J., Yanovsky, R.L., et al. (2016). Identification of tumorigenic cells and therapeutic targets in pancreatic neuroendocrine tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences *113*, 4464–4469.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C.J., Aarden, L.A., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2008). Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. Cell *133*, 1019–1031.

Kurenova, E., Xu, L.-H., Yang, X., Baldwin, A.S., Craven, R.J., Hanks, S.K., Liu, Z., and Cance, W.G. (2004). Focal Adhesion Kinase Suppresses Apoptosis by Binding to the Death Domain of Receptor-Interacting Protein. Molecular and Cellular Biology *24*, 4361–4371.

Kurenova, E.V., Hunt, D.L., He, D., Magis, A.T., Ostrov, D.A., and Cance, W.G. (2009). Small Molecule Chloropyramine Hydrochloride (C4) Targets the Binding Site of Focal Adhesion Kinase and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 and Suppresses Breast Cancer Growth in Vivo. Journal of Medicinal Chemistry *52*, 4716–4724.

Kvansakul, M., Adams, J.C., and Hohenester, E. (2004). Structure of a thrombospondin C-terminalfragment reveals a novel calcium core in the type 3repeats. EMBO Journal *23*, 1223-1233.

Lafleur, M.A., Mercuri, F.A., Ruangpanit, N., Seiki, M., Sato, H., and Thompson, E.W. (2006). Type I Collagen Abrogates the Clathrin-mediated Internalization of Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) via the MT1-MMP Hemopexin Domain. Journal of Biological Chemistry *281*, 6826–6840.

Lagarrigue, F., Dupuis-Coronas, S., Ramel, D., Delsol, G., Tronchere, H., Payrastre, B., and Gaits-Iacovoni, F. (2010). Matrix Metalloproteinase-9 Is Upregulated in Nucleophosmin-Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Anaplastic Lymphomas and Activated at the Cell Surface by the Chaperone Heat Shock Protein 90 to Promote Cell Invasion. Cancer Research *70*, 6978–6987.

Lamalice, L., Le Boeuf, F., and Huot, J. (2007). Endothelial Cell Migration During Angiogenesis. Circulation Research *100*, 782–794.

Lambeth, J.D., Kawahara, T., and Diebold, B. (2007). Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. Free Radical Biology and Medicine *43*, 319–331.

Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. Nature Reviews Molecular Cell Biology *15*, 178–196.

Lark, A.L., Livasy, C.A., Dressler, L., Moore, D.T., Millikan, R.C., Geradts, J., Iacocca, M., Cowan, D., Little, D., Craven, R.J., et al. (2005). High focal adhesion kinase expression in invasive breast carcinomas is associated with an aggressive phenotype. Modern Pathology *18*, 1289–1294.

Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1996). Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. Cell *84*, 359–369.

Lawson, C.D., and Burridge, K. (2014). The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration. Small GTPases *5*, e27958.

Lázár-Molnár, E., Hegyesi, H., Tóth, S., and Falus, A. (2000). Autocrine and paracrine regulation by cytokines and

growth factors in melanoma. Cytokine *12*, 547–554.

Lee, J., Borboa, A.K., Chun, H.B., Baird, A., and Eliceiri, B.P. (2010). Conditional Deletion of the Focal Adhesion Kinase FAK Alters Remodeling of the Blood-Brain Barrier in Glioma. Cancer Research *70*, 10131–10140.

Leong, H.S., Robertson, A.E., Stoletov, K., Leith, S.J., Chin, C.A., Chien, A.E., Hague, M.N., Ablack, A., Carmine-Simmen, K., McPherson, V.A., et al. (2014). Invadopodia Are Required for Cancer Cell Extravasation and Are a Therapeutic Target for Metastasis. Cell Reports *8*, 1558–1570.

Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N., Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F.T., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., et al. (2009). Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. Cell *139*, 891–906.

Levy, C., Khaled, M., and Fisher, D.E. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. Trends in Molecular Medicine *12*, 406–414.

Levy, C., Khaled, M., Robinson, K.C., Veguilla, R.A., Chen, P.-H., Yokoyama, S., Makino, E., Lu, J., Larue, L., Beermann, F., et al. (2010). Lineage-Specific Transcriptional Regulation of DICER by MITF in Melanocytes. Cell *141*, 994–1005.

Li, F.Z., Dhillon, A.S., Anderson, R.L., McArthur, G., and Ferrao, P.T. (2015). Phenotype Switching in Melanoma: Implications for Progression and Therapy. Frontiers in Oncology *5*.

Li, G., Du, X., Vass, W.C., Papageorge, A.G., Lowy, D.R., and Qian, X. (2011). Full activity of the deleted in liver cancer 1 (DLC1) tumor suppressor depends on an LD-like motif that binds talin and focal adhesion kinase (FAK). Proceedings of the National Academy of Sciences *108*, 17129–17134.

Li, S., Huang, X., Zhang, D., Huang, Q., Pei, G., Wang, L., Jiang, W., Hu, Q., Tan, R., and Hua, Z.-C. (2013). Requirement of PEA3 for Transcriptional Activation of FAK Gene in Tumor Metastasis. PLoS ONE *8*, e79336.

Li, Y., Tondravi, M., Liu, J., Smith, E., Haudenschild, C.C., Kaczmarek, M., and Zhan, X. (2001). Cortactin Potentiates Bone Metastasis of Breast Cancer Cells. Cancer research *61*, 6906-6911.

Li, Y., Lu, S., Xu, Y., Qiu, C., Jin, C., Wang, Y., and Liu, Z. (2017). Overexpression of CD47 predicts poor prognosis and promotes cancer cell invasion in high-grade serous ovarian carcinoma. American journal of translational research *9*, 2901-2910.

Lietha, D., and Eck, M.J. (2008). Crystal Structures of the FAK Kinase in Complex with TAE226 and Related Bis-Anilino Pyrimidine Inhibitors Reveal a Helical DFG Conformation. PLoS ONE *3*, e3800.

Lietha, D., Cai, X., Ceccarelli, D.F.J., Li, Y., Schaller, M.D., and Eck, M.J. (2007). Structural Basis for the Autoinhibition of Focal Adhesion Kinase. Cell *129*, 1177–1187.

Lih, C.-J., Wei, W., and Cohen, C.N. (2006). Txr1: a transcriptional regulator of thrombospondin-1 that modulates cellular sensitivity to taxanes. Genes & Development *20*, 2082–2095.

Lim, S.-T., Chen, X.L., Lim, Y., Hanson, D.A., Vo, T.-T., Howerton, K., Larocque, N., Fisher, S.J., Schlaepfer, D.D., and Ilic, D. (2008). Nuclear FAK Promotes Cell Proliferation and Survival through FERM-Enhanced p53 Degradation. Molecular Cell *29*, 9–22.

Lim, S.-T., Chen, X.L., Tomar, A., Miller, N.L.G., Yoo, J., and Schlaepfer, D.D. (2010). Knock-in Mutation Reveals an Essential Role for Focal Adhesion Kinase Activity in Blood Vessel Morphogenesis and Cell Motility-Polarity but Not Cell Proliferation. Journal of Biological Chemistry *285*, 21526–21536.

Lim, S.-T., Miller, N.L.G., Chen, X.L., Tancioni, I., Walsh, C.T., Lawson, C., Uryu, S., Weis, S.M., Cheresh, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2012). Nuclear-localized focal adhesion kinase regulates inflammatory VCAM-1 expression. The Journal of Cell Biology *197*, 907–919.

Lin, J.Y., and Fisher, D.E. (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. Nature *445*, 843–850.

Lindberg, F.P., Gresham, H.D., Reinhold, M.I., and Brown, E.J. (1996). Integrin-associated protein immunoglobulin domain is necessary for efficient vitronectin bead binding. The Journal of Cell Biology *134*, 1313–1322.

Linder, S. (2007). The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. Trends in Cell Biology *17*, 107–117.

Linder, S., Hüfner, K., Wintergerst, U., and Aepfelbacher, M. (2000). Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. Journal of cell science *113*, 4165-4176.

Linder, S., Wiesner, C., and Himmel, M. (2011). Degrading Devices: Invadosomes in Proteolytic Cell Invasion. Annual Review of Cell and Developmental Biology *27*, 185–211.

Liu, T.-J., LaFortune, T., Honda, T., Ohmori, O., Hatakeyama, S., Meyer, T., Jackson, D., de Groot, J., and Yung,

W.K.A. (2007). Inhibition of both focal adhesion kinase and insulin-like growth factor-I receptor kinase suppresses glioma proliferation in vitro and in vivo. Molecular Cancer Therapeutics *6*, 1357–1367.

Liu, X., Pu, Y., Cron, K., Deng, L., Kline, J., Frazier, W.A., Xu, H., Peng, H., Fu, Y.-X., and Xu, M.M. (2015a). CD47 blockade triggers T cell–mediated destruction of immunogenic tumors. Nature Medicine *21*, 1209–1215.

Liu, X., Wu, X., Wang, Y., Li, Y., Chen, X., Yang, W., and Jiang, L. (2019). CD47 Promotes Human Glioblastoma Invasion Through Activation of the PI3K/Akt Pathway. Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics *27*, 415–422.

Liu, Y.-J., Le Berre, M., Lautenschlaeger, F., Maiuri, P., Callan-Jones, A., Heuzé, M., Takaki, T., Voituriez, R., and Piel, M. (2015b). Confinement and Low Adhesion Induce Fast Amoeboid Migration of Slow Mesenchymal Cells. Cell *160*, 659–672.

Liu, Z.-X., Yu, C.F., Nickel, C., Thomas, S., and Cantley, L.G. (2002). Hepatocyte Growth Factor Induces ERK-dependent Paxillin Phosphorylation and Regulates Paxillin-Focal Adhesion Kinase Association. Journal of Biological Chemistry *277*, 10452–10458.

Lo, J.A., and Fisher, D.E. (2014). The melanoma revolution: From UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. Science *346*, 945–949.

Lock, P., Abram, C.L., Gibson, T., and Courtneidge, S.A. (1998). A new method for isolating tyrosine kinase substrates used to identify Fish, an SH3 and PX domain-containing protein, and Src substrate. The EMBO Journal *17*, 4346–4357.

Lodillinsky, C., Infante, E., Guichard, A., Chaligné, R., Fuhrmann, L., Cyrta, J., Irondelle, M., Lagoutte, E., Vacher, S., Bonsang-Kitzis, H., et al. (2016). p63/MT1-MMP axis is required for in situ to invasive transition in basal-like breast cancer. Oncogene *35*, 344–357.

López-Colomé, A.M., Lee-Rivera, I., Benavides-Hidalgo, R., and López, E. (2017). Paxillin: a crossroad in pathological cell migration. Journal of Hematology & Oncology *10*.

Lu, Q., and Rounds, S. (2012). Focal adhesion kinase and endothelial cell apoptosis. Microvascular Research *83*, 56–63.

Lu, X., and Kang, Y. (2010). Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Metastasis. Clinical Cancer Research *16*, 5928–5935.

Lu, F., Sun, J., Zheng, Q., Li, J., Hu, Y., Yu, P., He, H., Zhao, Y., Wang, X., Yang, S., et al. (2019). Imaging elemental events of store-operated Ca^{2+} entry in invading cancer cells with plasmalemmal targeted sensors. Journal of Cell Science *132*, jcs224923.

Lu, P., Takai, K., Weaver, V.M., and Werb, Z. (2011). Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology *3*, a005058–a005058.

Lucas, J.T., Salimath, B.P., Slomiany, M.G., and Rosenzweig, S.A. (2010). Regulation of invasive behavior by vascular endothelial growth factor is HEF1-dependent. Oncogene *29*, 4449–4459.

Ma, Y.-Q., Qin, J., Wu, C., and Plow, E.F. (2008). Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of β3 integrins. Journal of Cell Biology *181*, 439–446.

Mader, C.C., Oser, M., Magalhaes, M.A.O., Bravo-Cordero, J.J., Condeelis, J., Koleske, A.J., and Gil-Henn, H. (2011). An EGFR–Src–Arg–Cortactin Pathway Mediates Functional Maturation of Invadopodia and Breast Cancer Cell Invasion. Cancer Research *71*, 1730–1741.

Magalhaes, M.A.O., Larson, D.R., Mader, C.C., Bravo-Cordero, J.J., Gil-Henn, H., Oser, M., Chen, X., Koleske, A.J., and Condeelis, J. (2011). Cortactin phosphorylation regulates cell invasion through a pH-dependent pathway. The Journal of Cell Biology *195*, 903–920.

Maile, L.A., Capps, B.E., Miller, E.C., Aday, A.W., and Clemmons, D.R. (2008a). Integrin-Associated Protein Association With Src Homology 2 Domain Containing Tyrosine Phosphatase Substrate 1 Regulates IGF-I Signaling In Vivo. Diabetes *57*, 2637–2643.

Maile, L.A., Capps, B.E., Miller, E.C., Allen, L.B., Veluvolu, U., Aday, A.W., and Clemmons, D.R. (2008b). Glucose Regulation of Integrin-Associated Protein Cleavage Controls the Response of Vascular Smooth Muscle Cells to Insulin-Like Growth Factor-I. Molecular Endocrinology *22*, 1226–1237.

Maio, M. (2012). Melanoma as a model tumour for immuno-oncology. Ann. Oncol. *23 Suppl 8*, viii10-14.

Majeti, R., Chao, M.P., Alizadeh, A.A., Pang, W.W., Jaiswal, S., Gibbs, K.D., van Rooijen, N., and Weissman, I.L. (2009). CD47 Is an Adverse Prognostic Factor and Therapeutic Antibody Target on Human Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. Cell *138*, 286–299.

Malek, M., Kielkowska, A., Chessa, T., Anderson, K.E., Barneda, D., Pir, P., Nakanishi, H., Eguchi, S., Koizumi, A., Sasaki, J., et al. (2017). PTEN Regulates PI(3,4)P2 Signaling Downstream of Class I PI3K. Molecular Cell *68*, 566-580.e10.

Mandal, S., Johnson, K.R., and Wheelock, M.J. (2008). TGF-β induces formation of F-actin cores and matrix degradation in human breast cancer cells via distinct signaling pathways. Experimental Cell Research *314*, 3478–3493.

Manna, P.P., and Frazier, W.A. (2003). The Mechanism of CD47-Dependent Killing of T Cells: Heterotrimeric G_i-Dependent Inhibition of Protein Kinase A. The Journal of Immunology *170*, 3544–3553.

Manna, P.P., and Frazier, W.A. (2004). CD47 Mediates Killing of Breast Tumor Cells via Gi-Dependent Inhibition of Protein Kinase A. Cancer Research *64*, 1026–1036.

Marchesin, V., Montagnac, G., and Chavrier, P. (2015). ARF6 Promotes the Formation of Rac1 and WAVE-Dependent Ventral F-Actin Rosettes in Breast Cancer Cells in Response to Epidermal Growth Factor. PLOS ONE *10*, e0121747.

Maricich, S.M., Wellnitz, S.A., Nelson, A.M., Lesniak, D.R., Gerling, G.J., Lumpkin, E.A., and Zoghbi, H.Y. (2009). Merkel Cells Are Essential for Light-Touch Responses. Science *324*, 1580–1582.

Markwell, S.M., Ammer, A.G., Interval, E.T., Allen, J.L., Papenberg, B.W., Hames, R.A., Castaño, J.E., Schafer, D.A., and Weed, S.A. (2019). Cortactin Phosphorylation by Casein Kinase 2 Regulates Actin-Related Protein 2/3 Complex Activity, Invadopodia Function, and Tumor Cell Invasion. Molecular Cancer Research *17*, 987–1001.

Marlowe, T., Alvarado, C., Rivera, A., Lenzo, F., Nott, R., Bondugji, D., Montoya, J., Hurley, A., Kaplan, M., Capaldi, A., et al. (2019). Development of a High-Throughput Fluorescence Polarization Assay to Detect Inhibitors of the FAK–Paxillin Interaction. SLAS DISCOVERY *25*, 21-32.

Marlowe, T.A., Lenzo, F.L., Figel, S.A., Grapes, A.T., and Cance, W.G. (2016). Oncogenic Receptor Tyrosine Kinases Directly Phosphorylate Focal Adhesion Kinase (FAK) as a Resistance Mechanism to FAK-Kinase Inhibitors. Molecular Cancer Therapeutics *15*, 3028–3039.

Martin, G.S. (2001). The hunting of the Src. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *2*, 467–475.

Mateo, V., Brown, E.J., Biron, G., Rubio, M., Fischer, A., Deist, F.L., and Sarfati, M. (2002). Mechanisms of CD47-induced caspase-independent cell death in normal and leukemic cells: link between phosphatidylserine exposure and cytoskeleton organization. Blood *100*, 2882–2890.

Matlung, H.L., Szilagyi, K., Barclay, N.A., and van den Berg, T.K. (2017). The CD47-SIRPα signaling axis as an innate immune checkpoint in cancer. Immunological Reviews *276*, 145–164.

Matsumoto, K., Ziober, B.L., Yao, C.-C., and Kramer, R.H. (1995). Growth factor regulation of integrin-mediated cell motility. Cancer and Metastasis Reviews *14*, 205–217.

Maxhimer, J.B., Soto-Pantoja, D.R., Ridnour, L.A., Shih, H.B., DeGraff, W.G., Tsokos, M., Wink, D.A., Isenberg, J.S., and Roberts, D.D. (2009). Radioprotection in Normal Tissue and Delayed Tumor Growth by Blockade of CD47 Signaling. Science Translational Medicine *1*, 3ra7-3ra7.

Mayor, R., and Carmona-Fontaine, C. (2010). Keeping in touch with contact inhibition of locomotion. Trends in Cell Biology *20*, 319–328.

Mayor, R., and Etienne-Manneville, S. (2016). The front and rear of collective cell migration. Nature Reviews Molecular Cell Biology *17*, 97–109.

Mazzone, M., Baldassarre, M., Beznoussenko, G., Giacchetti, G., Cao, J., Zucker, S., Luini, A., and Buccione, R. (2004). Intracellular processing and activation of membrane type 1 matrix metalloprotease depends on its partitioning into lipid domains. Journal of Cell Science *117*, 6275–6287.

McCardle, T.W., Messina, J.L., and Sondak, V.K. (2009). Completely Regressed Cutaneous Melanocytic Lesion Revisited. Seminars in Oncology *36*, 498–503.

McCracken, M.N., Cha, A.C., and Weissman, I.L. (2015). Molecular Pathways: Activating T Cells after Cancer Cell Phagocytosis from Blockade of CD47 "Don't Eat Me" Signals. Clinical Cancer Research *21*, 3597–3601.

McDonald, J.F., Dimitry, J.M., and Frazier, W.A. (2003). An Amyloid-Like C-Terminal Domain of Thrombospondin-1 Displays CD47 Agonist Activity Requiring Both VVM Motifs. Biochemistry *42*, 10001–10011.

McDonald, J.F., Zheleznyak, A., and Frazier, W.A. (2004). Cholesterol-independent Interactions with CD47 Enhance $\alpha_v\beta_3$ Avidity. Journal of Biological Chemistry *279*, 17301–17311.

McFarlane, S., McFarlane, C., Montgomery, N., Hill, A., and Waugh, D.J.J. (2015). CD44-mediated activation of

α5β1-integrin, cortactin and paxillin signaling underpins adhesion of basal-like breast cancer cells to endothelium and Fibronectin-enriched matrices. Oncotarget *6*, 36762–36773.

Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M.A.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. Nature *436*, 720–724.

Middleton, M.R., Lorigan, P., Owen, J., Ashcroft, L., Lee, S.M., Harper, P., and Thatcher, N. (2000). A randomized phase III study comparing dacarbazine, BCNU, cisplatin and tamoxifen with dacarbazine and interferon in advanced melanoma. British Journal of Cancer *82*, 1158–1162.

Miller, N.L.G., Lawson, C., Kleinschmidt, E.G., Tancioni, I., Uryu, S., and Schlaepfer, D.D. (2013). A non-canonical role for Rgnef in promoting integrin-stimulated focal adhesion kinase activation. Journal of Cell Science *126*, 5074–5085.

Miller, T.W., Isenberg, J.S., Shih, H.B., Wang, Y., and Roberts, D.D. (2010). Amyloid-β Inhibits No-cGMP Signaling in a CD36- and CD47-Dependent Manner. PLoS ONE *5*, e15686.

Mishima, T., Naotsuka, M., Horita, Y., Sato, M., Ohashi, K., and Mizuno, K. (2010). LIM-kinase is critical for the mesenchymal-to-amoeboid cell morphological transition in 3D matrices. Biochemical and Biophysical Research Communications *392*, 577–581.

Mitra, S.K., Hanson, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. Nature Reviews Molecular Cell Biology *6*, 56–68.

Mizutani, K., Miki, H., He, H., Maruta, H., and Takenawa, T. (2002) Essential Role of Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein in Podosome Formation and Degradation of Extracellular Matrix in src-transformed Fibroblasts. Cancer research *62*, 669-74.

Mohanty, S., Aghighi, M., Yerneni, K., Theruvath, J.L., and Daldrup-Link, H.E. (2019). Improving the efficacy of osteosarcoma therapy: combining drugs that turn cancer cell 'don't eat me' signals off and 'eat me' signals on. Molecular Oncology *13*, 2049–2061.

Montagnac, G., Sibarita, J.-B., Loubéry, S., Daviet, L., Romao, M., Raposo, G., and Chavrier, P. (2009). ARF6 Interacts with JIP4 to Control a Motor Switch Mechanism Regulating Endosome Traffic in Cytokinesis. Current Biology *19*, 184–195.

Montanez, E., Ussar, S., Schifferer, M., Bosl, M., Zent, R., Moser, M., and Fassler, R. (2008). Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. Genes & Development *22*, 1325–1330.

Monteiro, P., Rossé, C., Castro-Castro, A., Irondelle, M., Lagoutte, E., Paul-Gilloteaux, P., Desnos, C., Formstecher, E., Darchen, F., Perrais, D., et al. (2013). Endosomal WASH and exocyst complexes control exocytosis of MT1-MMP at invadopodia. The Journal of Cell Biology *203*, 1063–1079.

Moon, S., and Zheng, Y. (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. Trends in Cell Biology *13*, 13–22.

Moser, M., Nieswandt, B., Ussar, S., Pozgajova, M., and Fässler, R. (2008). Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. Nature Medicine *14*, 325–330.

Mueller, S.C., and Chen, W.-T. (1991). Cellular invasion into matrix beads: localization of ft integrins and fibronectin to the invadopodia. Journal of cell science *99*, 213-225.

Mueller, S.C., Ghersi, G., Akiyama, S.K., Sang, Q.-X.A., Howard, L., Pineiro-Sanchez, M., Nakahara, H., Yeh, Y., and Chen, W.-T. (1999). A Novel Protease-docking Function of Integrin at Invadopodia. Journal of Biological Chemistry *274*, 24947–24952.

Murphy, D.A., and Courtneidge, S.A. (2011). The "ins" and "outs" of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. Nature Reviews Molecular Cell Biology *12*, 413–426.

Nabeshima, K., Inoue, T., Shimao, Y., Okada, Y., Itoh, Y., Seiki, M., and Koono, M. (2000). Front-Cell-specific Expression of Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase and Gelatinase A during Cohort Migration of Colon Carcinoma Cells Induced by Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor. Cancer research *60*, 3364-3369.

Nader, G.P.F., Ezratty, E.J., and Gundersen, G.G. (2016). FAK, talin and PIPKIγ regulate endocytosed integrin activation to polarize focal adhesion assembly. Nature Cell Biology *18*, 491–503.

Nagy, T., Wei, H., Shen, T.-L., Peng, X., Liang, C.-C., Gan, B., and Guan, J.-L. (2007). Mammary Epithelial-specific Deletion of the Focal Adhesion Kinase Gene Leads to Severe Lobulo-Alveolar Hypoplasia and Secretory Immaturity of the Murine Mammary Gland. Journal of Biological Chemistry *282*, 31766–31776.

Najjar, S., Homan, S., Sheehan, C., and Carlson, J.A. (2020). SERINE-910 Phosphorylated Focal Adhesion Kinase Expression Predicts Better Overall and Disease-free Survival in Melanoma: Applied Immunohistochemistry &

Molecular Morphology *28*, 130–138.

Nakahara, H., Nomizu, M., Akiyama, S.K., Yamada, Y., Yeh, Y., and Chen, W.-T. (1996). A mechanism for regulation of melanoma invasion: ligation of $\alpha_6\beta_1$ integrin by laminin g peptides. Journal of Biological Chemistry *271*, 27221–27224.

Nakahara, H., Mueller, S.C., Nomizu, M., Yamada, Y., Yeh, Y., and Chen, W.-T. (1998). Activation of β1 Integrin Signaling Stimulates Tyrosine Phosphorylation of $p190^{RhoGAP}$ and Membrane-protrusive Activities at Invadopodia. Journal of Biological Chemistry *273*, 9–12.

Naser, R., Aldehaiman, A., Díaz-Galicia, E., and Arold, S. (2018). Endogenous Control Mechanisms of FAK and PYK2 and Their Relevance to Cancer Development. Cancers *10*, 196.

N'Diaye, E.-N., and Brown, E.J. (2003). The ubiquitin-related protein PLIC-1 regulates heterotrimeric G protein function through association with Gβγ. Journal of Cell Biology *163*, 1157–1165.

Niewiadomska, P., Godt, D., and Tepass, U. (1999). DE-Cadherin Is Required for Intercellular Motility during Drosophila Oogenesis. Journal of Cell Biology *144*, 533–547.

Nocula-Lugowska, M., Lugowski, M., Salgia, R., and Kossiakoff, A.A. (2015). Engineering Synthetic Antibody Inhibitors Specific for LD2 or LD4 Motifs of Paxillin. Journal of Molecular Biology *427*, 2532–2547.

Nolasco-Quiroga, M., Rosas-Diaz, M., Moreno, J., Godinez-Aguilar, R., Lopez-Ibarra, M., Pina-Sanchez, P., Alvarado-Cabrero, I., Vazquez-Gomez, G., Rocha-Zavaleta, L., Arenas-Aranda, D., et al. (2019). Increased expression of FAK isoforms as potential cancer biomarkers in ovarian cancer. Oncology Letters *17*, 4479-4486.

Nowakowski, J., Cronin, C.N., McRee, D.E., Knuth, M.W., Nelson, C.G., Pavletich, N.P., Rogers, J., Sang, B.-C., Scheibe, D.N., Swanson, R.V., et al. (2002). Structures of the Cancer-Related Aurora-A, FAK, and EphA2 Protein Kinases from Nanovolume Crystallography. Structure *10*, 1659–1667.

Ogura, T., Noguchi, T., Murai-Takebe, R., Hosooka, T., Honma, N., and Kasuga, M. (2004). Resistance of B16 Melanoma Cells to CD47-induced Negative Regulation of Motility as a Result of Aberrant *N* -Glycosylation of SHPS-1. Journal of Biological Chemistry *279*, 13711–13720.

Oikawa, T., Itoh, T., and Takenawa, T. (2008). Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. The Journal of Cell Biology *182*, 157–169.

Oktay, M., Wary, K.K., Dans, M., Birge, R.B., and Giancotti, F.G. (1999). Integrin-mediated Activation of Focal Adhesion Kinase Is Required for Signaling to Jun NH2-terminal Kinase and Progression through the G1 Phase of the Cell Cycle. Journal of Cell Biology *145*, 1461–1470.

Oldenborg, P.-A. (2000). Role of CD47 as a Marker of Self on Red Blood Cells. Science *288*, 2051–2054.

Onder, T.T., Gupta, P.B., Mani, S.A., Yang, J., Lander, E.S., and Weinberg, R.A. (2008). Loss of E-Cadherin Promotes Metastasis via Multiple Downstream Transcriptional Pathways. Cancer Research *68*, 3645–3654.

Oser, M., Yamaguchi, H., Mader, C.C., Bravo-Cordero, J.J., Arias, M., Chen, X., DesMarais, V., van Rheenen, J., Koleske, A.J., and Condeelis, J. (2009). Cortactin regulates cofilin and N-WASp activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation. Journal of Cell Biology *186*, 571–587.

Osmani, N., Peglion, F., Chavrier, P., and Etienne-Manneville, S. (2010). Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic. The Journal of Cell Biology *191*, 1261–1269.

Ossovskaya, V., Lim, S.-T., Ota, N., Schlaepfer, D.D., and Ilic, D. (2008). FAK nuclear export signal sequences. FEBS Letters *582*, 2402–2406.

Owen, J.D., Ruest, P.J., Fry, D.W., and Hanks, S.K. (1999). Induced Focal Adhesion Kinase (FAK) Expression in FAK-Null Cells Enhances Cell Spreading and Migration Requiring Both Auto- and Activation Loop Phosphorylation Sites and Inhibits Adhesion-Dependent Tyrosine Phosphorylation of Pyk2. Molecular and Cellular Biology *19*, 4806–4818.

Owen, K.A., Pixley, F.J., Thomas, K.S., Vicente-Manzanares, M., Ray, B.J., Horwitz, A.F., Parsons, J.T., Beggs, H.E., Stanley, E.R., and Bouton, A.H. (2007). Regulation of lamellipodial persistence, adhesion turnover, and motility in macrophages by focal adhesion kinase. Journal of Cell Biology *179*, 1275–1287.

Pai, S., Bamodu, O.A., Lin, Y.-K., Lin, C.-S., Chu, P.-Y., Chien, M.-H., Wang, L.-S., Hsiao, M., Yeh, C.-T., and Tsai, J.-T. (2019). CD47-SIRPα Signaling Induces Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stemness and Links to a Poor Prognosis in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. Cells *8*, 1658.

Pan, Y.-R., Chen, C.-L., and Chen, H.-C. (2011). FAK is required for the assembly of podosome rosettes. The Journal of Cell Biology *195*, 113–129.

Parekh, A., and Weaver, A.M. (2009). Regulation of cancer invasiveness by the physical extracellular matrix

environment. Cell Adhesion & Migration *3*, 288–292.

Park, S.J., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2005). Interaction of HSP90 to N-WASP leads to activation and protection from proteasome-dependent degradation. The EMBO Journal *24*, 1557–1570.

Parsons, J.T., Horwitz, A.R., and Schwartz, M.A. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. Nature Reviews Molecular Cell Biology *11*, 633–643.

Parthasarathy, R., Subramanian, S., Boder, E.T., and Discher, D.E. (2006). Post-translational regulation of expression and conformation of an immunoglobulin domain in yeast surface display. Biotechnology and Bioengineering *93*, 159–168.

Pasapera, A.M., Schneider, I.C., Rericha, E., Schlaepfer, D.D., and Waterman, C.M. (2010). Myosin II activity regulates vinculin recruitment to focal adhesions through FAK-mediated paxillin phosphorylation. Journal of Cell Biology *188*, 877–890.

Paterson, E.K., and Courtneidge, S.A. (2018). Invadosomes are coming new insights into function and disease relevance. The FEBS Journal *285*, 8–27.

Peacock, J.G., Miller, A.L., Bradley, W.D., Rodriguez, O.C., Webb, D.J., and Koleske, A.J. (2007). The Abl-related Gene Tyrosine Kinase Acts through p190RhoGAP to Inhibit Actomyosin Contractility and Regulate Focal Adhesion Dynamics upon Adhesion to Fibronectin. Molecular Biology of the Cell *18*, 3860-3872.

Peláez, R., Pariente, A., Pérez-Sala, Á., and Larrayoz, I.M. (2019). Integrins: Moonlighting Proteins in Invadosome Formation. Cancers *11*, 615.

Petit, V., Boyer, B., Lentz, D., Turner, C.E., Thiery, J.P., and Vallés, A.M. (2000). Phosphorylation of Tyrosine Residues 31 and 118 on Paxillin Regulates Cell Migration through an Association with Crk in Nbt-II Cells. The Journal of Cell Biology *148*, 957–970.

Petrova, P.S., Viller, N.N., Wong, M., Pang, X., Lin, G.H.Y., Dodge, K., Chai, V., Chen, H., Lee, V., House, V., et al. (2017). TTI-621 (SIRPαFc): A CD47-Blocking Innate Immune Checkpoint Inhibitor with Broad Antitumor Activity and Minimal Erythrocyte Binding. Clinical Cancer Research *23*, 1068–1079.

Pettersen, R.D., Hestdal, K., Olafsen, M.K., Lie, S.O., and Lindberg, F.P. (1999). CD47 Signals T Cell Death. The journal of immunology 162, 7031-7040.

Phan, G.Q., Attia, P., Steinberg, S.M., White, D.E., and Rosenberg, S.A. (2001). Factors Associated With Response to High-Dose Interleukin-2 in Patients With Metastatic Melanoma. Journal of Clinical Oncology *19*, 3477–3482.

Pignatelli, J., Tumbarello, D.A., Schmidt, R.P., and Turner, C.E. (2012). Hic-5 promotes invadopodia formation and invasion during TGF-β–induced epithelial–mesenchymal transition. The Journal of Cell Biology *197*, 421–437.

Poincloux, R., Lizarraga, F., and Chavrier, P. (2009). Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. Journal of Cell Science *122*, 3015–3024.

Poullet, P., Gautreau, A., Kadaré, G., Girault, J.-A., Louvard, D., and Arpin, M. (2001). Ezrin Interacts with Focal Adhesion Kinase and Induces Its Activation Independently of Cell-matrix Adhesion. Journal of Biological Chemistry *276*, 37686–37691.

Pourfarhangi, K.E., Bergman, A., and Gligorijevic, B. (2018). ECM Cross-Linking Regulates Invadopodia Dynamics. Biophysical Journal *114*, 1455–1466.

Proux-Gillardeaux, V., Rudge, R., and Galli, T. (2005). The Tetanus Neurotoxin-Sensitive and Insensitive Routes to and from the Plasma Membrane: Fast and Slow Pathways? Tetanus Neurotoxin-Sensitive and Insensitive Routes. Traffic *6*, 366–373.

Qin, Q., Qian, J., Ge, L., Shen, L., Jia, J., Jin, J., and Ge, J. (2014). Effect and Mechanism of Thrombospondin-1 on the Angiogenesis Potential in Human Endothelial Progenitor Cells: An In Vitro Study. PLoS ONE *9*, e88213.

Quintavalle, M., Elia, L., Condorelli, G., and Courtneidge, S.A. (2010). MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. Journal of Cell Biology *189*, 13–22.

Rajadurai, C.V., Havrylov, S., Zaoui, K., Vaillancourt, R., Stuible, M., Naujokas, M., Zuo, D., Tremblay, M.L., and Park, M. (2012). Met receptor tyrosine kinase signals through a cortactin–Gab1 scaffold complex, to mediate invadopodia. Journal of Cell Science *125*, 2940–2953.

Rath, G.M., Schneider, C., Dedieu, S., Rothhut, B., Soula-Rothhut, M., Ghoneim, C., Sid, B., Morjani, H., El Btaouri, H., and Martiny, L. (2006). The C-terminal CD47/IAP-binding domain of thrombospondin-1 prevents camptothecin- and doxorubicin-induced apoptosis in human thyroid carcinoma cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research *1763*, 1125–1134.

Redman, J.M., Gibney, G.T., and Atkins, M.B. (2016). Advances in immunotherapy for melanoma. BMC Medicine

14.

Reinhold, M.I., Lindberg, F.P., Plas, D., Reynolds, S., Peters, M.G., and Brown, E.J. (1995). In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associatedprotein (CD47). Journal of cell science 108, 3419-3425.

Reiske, H.R., Kao, S.-C., Cary, L.A., Guan, J.-L., Lai, J.-F., and Chen, H.-C. (1999). Requirement of Phosphatidylinositol 3-Kinase in Focal Adhesion Kinase-promoted Cell Migration. Journal of Biological Chemistry *274*, 12361–12366.

Remacle, A., Murphy, G., and Roghi, C. (2003). Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface. Journal of Cell Science *116*, 3905–3916.

Resovi, A., Pinessi, D., Chiorino, G., and Taraboletti, G. (2014). Current understanding of the thrombospondin-1 interactome. Matrix Biology *37*, 83–91.

Revach, O.-Y., Weiner, A., Rechav, K., Sabanay, I., Livne, A., and Geiger, B. (2015). Mechanical interplay between invadopodia and the nucleus in cultured cancer cells. Scientific Reports *5*.

Rho, J., Chung, J., Im, H., Liong, M., Shao, H., Castro, C.M., Weissleder, R., and Lee, H. (2013). Magnetic Nanosensor for Detection and Profiling of Erythrocyte-Derived Microvesicles. ACS Nano *7*, 11227–11233.

Rico, B., Beggs, H.E., Schahin-Reed, D., Kimes, N., Schmidt, A., and Reichardt, L.F. (2004). Control of axonal branching and synapse formation by focal adhesion kinase. Nature Neuroscience *7*, 1059–1069.

Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, MH., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. Science *302*, 1704–1709.

Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., et al. (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. Nature Methods *5*, 605–607.

Rigel, D.S., Rivers, J.K., Kopf, A.W., Friedman, R.J., Vinokur, A.F., Heilman, E.R., and Levenstein, M. (1989). Dysplastic nevi. Cancer *63*, 386–389.

Ritt, M., Guan, J.L., and Sivaramakrishnan, S. (2013). Visualizing and Manipulating Focal Adhesion Kinase Regulation in Live Cells. Journal of Biological Chemistry *288*, 8875–8886.

Rivera, G.M., Vasilescu, D., Papayannopoulos, V., Lim, W.A., and Mayer, B.J. (2009). A Reciprocal Interdependence between Nck and PI(4,5)P2 Promotes Localized N-WASp-Mediated Actin Polymerization in Living Cells. Molecular Cell *36*, 525–535.

Roberts, W.G., Ung, E., Whalen, P., Cooper, B., Hulford, C., Autry, C., Richter, D., Emerson, E., Lin, J., Kath, J., et al. (2008). Antitumor Activity and Pharmacology of a Selective Focal Adhesion Kinase Inhibitor, PF-562,271. Cancer Research *68*, 1935–1944.

Robertson, L.K., and Ostergaard, H.L. (2011). Paxillin Associates with the Microtubule Cytoskeleton and the Immunological Synapse of CTL through Its Leucine-Aspartic Acid Domains and Contributes to Microtubule Organizing Center Reorientation. The Journal of Immunology *187*, 5824–5833.

Rodríguez, M.M., Fiore, E., Bayo, J., Atorrasagasti, C., García, M., Onorato, A., Domínguez, L., Malvicini, M., and Mazzolini, G. (2018). 4Mu Decreases CD47 Expression on Hepatic Cancer Stem Cells and Primes a Potent Antitumor T Cell Response Induced by Interleukin-12. Molecular Therapy *26*, 2738–2750.

Roh-Johnson, M., Bravo-Cordero, J.J., Patsialou, A., Sharma, V.P., Guo, P., Liu, H., Hodgson, L., and Condeelis, J. (2014). Macrophage contact induces RhoA GTPase signaling to trigger tumor cell intravasation. Oncogene *33*, 4203–4212.

Rosse, C., Lodillinsky, C., Fuhrmann, L., Nourieh, M., Monteiro, P., Irondelle, M., Lagoutte, E., Vacher, S., Waharte, F., Paul-Gilloteaux, P., et al. (2014). Control of MT1-MMP transport by atypical PKC during breast-cancer progression. Proceedings of the National Academy of Sciences *111*, E1872–E1879.

Rossman, K.L., Der, C.J., and Sondek, J. (2005). GEF means go turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. Nature Reviews Molecular Cell Biology *6*, 167–180.

Rothenberg, K.E., Scott, D.W., Christoforou, N., and Hoffman, B.D. (2018). Vinculin Force-Sensitive Dynamics at Focal Adhesions Enable Effective Directed Cell Migration. Biophysical Journal *114*, 1680–1694.

Rowe, R.G., and Weiss, S.J. (2008). Breaching the basement membrane: who, when and how? Trends in Cell Biology *18*, 560–574.

Ruiter, D., Bogenrieder, T., Elder, D., and Herlyn, M. (2002). Melanoma–stroma interactions: structural and functional aspects. The Lancet Oncology *3*, 35–43.

Sabeh, F., Shimizu-Hirota, R., and Weiss, S.J. (2009). Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion

programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. The Journal of Cell Biology *185*, 11–19.

Sadallah, S., Eken, C., Martin, P.J., and Schifferli, J.A. (2011). Microparticles (Ectosomes) Shed by Stored Human Platelets Downregulate Macrophages and Modify the Development of Dendritic Cells. The Journal of Immunology *186*, 6543–6552.

Sadok, A., McCarthy, A., Caldwell, J., Collins, I., Garrett, M.D., Yeo, M., Hooper, S., Sahai, E., Kuemper, S., Mardakheh, F.K., et al. (2015). Rho kinase inhibitors block melanoma cell migration and inhibit metastasis. Cancer Res. *75*, 2272–2284.

Saengsawang, W., Taylor, K.L., Lumbard, D.C., Mitok, K., Price, A., Pietila, L., Gomez, T.M., and Dent, E.W. (2013). CIP4 coordinates with phospholipids and actin-associated proteins to localize to the protruding edge and produce actin ribs and veils. Journal of Cell Science *126*, 2411–2423.

Sahai, E. (2005). Mechanisms of cancer cell invasion. Current Opinion in Genetics & Development *15*, 87–96.

Sahai, E. (2007). Illuminating the metastatic process. Nature Reviews Cancer *7*, 737–749.

Sakurai-Yageta, M., Recchi, C., Le Dez, G., Sibarita, J.-B., Daviet, L., Camonis, J., D'Souza-Schorey, C., and Chavrier, P. (2008). The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is required for tumor cell invasion downstream of Cdc42 and RhoA. The Journal of Cell Biology *181*, 985–998.

Sanz-Moreno, V., Gaggioli, C., Yeo, M., Albrengues, J., Wallberg, F., Viros, A., Hooper, S., Mitter, R., Féral, C.C., Cook, M., et al. (2011). ROCK and JAK1 Signaling Cooperate to Control Actomyosin Contractility in Tumor Cells and Stroma. Cancer Cell *20*, 229–245.

Saumet, A., Slimane, M.B., Lanotte, M., and Lawler, J. (2005). Type 3 repeat/C-terminal domain of thrombospondin-1 triggers caspase-independent cell death through CD47/αvβ3 in promyelocytic leukemia NB4 cells. *106*, 10.

Scales, T.M., and Parsons, M. (2011). Spatial and temporal regulation of integrin signalling during cell migration. Current Opinion in Cell Biology *23*, 562–568.

Schaller, M.D., Borgman, C.A., and Parsons, J.T. (1993). Autonomous expression of a noncatalytic domain of the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125FAK. Molecular and Cellular Biology *13*, 785–791.

Schlaepfer, D.D., Hanks, S.K., Hunter, T., and P van der Geer. (1994). lntegrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *372*, 786-791.

Schlaepfer, D.D., and Mitra, S.K. (2004). Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. Current Opinion in Genetics & Development *14*, 92–101.

Schlaepfer, D.D., Jones, K.C., and Hunter, T. (1998). Multiple Grb2-Mediated Integrin-Stimulated Signaling Pathways to ERK2/Mitogen-Activated Protein Kinase: Summation of Both c-Src- and Focal Adhesion Kinase-Initiated Tyrosine Phosphorylation Events. Molecular and Cellular Biology *18*, 2571–2585.

Schlaepfer, D.D., Mitra, S.K., and Ilic, D. (2004). Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research *1692*, 77–102.

Schmitz, K.J., Grabellus, F., Callies, R., Otterbach, F., Wohlschlaeger, J., Levkau, B., Kimmig, R., Schmid, K.W., and Baba, H.A. (2005). High expression of focal adhesion kinase (p125FAK) in node-negative breast cancer is related to overexpression of HER-2/neu and activated Akt kinase but does not predict outcome. Breast Cancer Research *7*.

Schoumacher, M., Goldman, R.D., Louvard, D., and Vignjevic, D.M. (2010). Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. The Journal of Cell Biology *189*, 541–556.

Schoumacher, M., Louvard, D., and Vignjevic, D. (2011). Cytoskeleton networks in basement membrane transmigration. European Journal of Cell Biology *90*, 93–99.

Schultze, A., and Fiedler, W. (2010). Therapeutic potential and limitations of new FAK inhibitors in the treatment of cancer. Expert Opinion on Investigational Drugs *19*, 777–788.

Scolyer, R.A., Long, G.V., and Thompson, J.F. (2011). Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. Molecular Oncology *5*, 124–136.

Seals, D.F., Azucena, E.F., Pass, I., Tesfay, L., Gordon, R., Woodrow, M., Resau, J.H., and Courtneidge, S.A. (2005). The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. Cancer Cell *7*, 155–165.

Seetharamu, N., Ott, P.A., and Pavlick, A.C. (2009). Novel therapeutics for melanoma. Expert Review of Anticancer Therapy *9*, 839–849.

Sefton, B.M., Trowbridge, I.S., Cooper, J.A., and Scolnick, E.M. (1982). The transforming proteins of Rous sarcoma

virus, Harvey sarcoma virus and Abelson virus contain tightly bound lipid. Cell *31*, 465–474.

Seftor, R.E.B., Seftor, E.A., Stetler-Stevenson, W.G., and Hendrix, M.J.C. The 72 kDa Type IV Collagenase Is Modulated via Differential Expression of αvβ3 and α5β3 integrins during Human Melanoma Cell Invasion. 6.

Seiler, C., Davuluri, G., Abrams, J., Byfield, F.J., Janmey, P.A., and Pack, M. (2012). Smooth Muscle Tension Induces Invasive Remodeling of the Zebrafish Intestine. PLoS Biology *10*, e1001386.

Seong, J., Tajik, A., Sun, J., Guan, J.-L., Humphries, M.J., Craig, S.E., Shekaran, A., Garcia, A.J., Lu, S., Lin, M.Z., et al. (2013). Distinct biophysical mechanisms of focal adhesion kinase mechanoactivation by different extracellular matrix proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences *110*, 19372–19377.

Serrels, A., McLeod, K., Canel, M., Kinnaird, A., Graham, K., Frame, M.C., and Brunton, V.G. (2012). The role of focal adhesion kinase catalytic activity on the proliferation and migration of squamous cell carcinoma cells. International Journal of Cancer *131*, 287–297.

Serrels, A., Lund, T., Serrels, B., Byron, A., McPherson, R.C., von Kriegsheim, A., Gómez-Cuadrado, L., Canel, M., Muir, M., Ring, J.E., et al. (2015). Nuclear FAK Controls Chemokine Transcription, Tregs, and Evasion of Anti-tumor Immunity. Cell *163*, 160–173.

Shain, A.H., and Bastian, B.C. (2016). From melanocytes to melanomas. Nature Reviews Cancer *16*, 345–358.

Shain, A.H., Yeh, I., Kovalyshyn, I., Sriharan, A., Talevich, E., Gagnon, A., Dummer, R., North, J., Pincus, L., Ruben, B., et al. (2015). The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. New England Journal of Medicine *373*, 1926–1936.

Sharma, V.P., Eddy, R., Entenberg, D., Kai, M., Gertler, F.B., and Condeelis, J. (2013). Tks5 and SHIP2 Regulate Invadopodium Maturation, but Not Initiation, in Breast Carcinoma Cells. Current Biology *23*, 2079–2089.

Shen, T.-L., Park, A.Y.-J., Alcaraz, A., Peng, X., Jang, I., Koni, P., Flavell, R.A., Gu, H., and Guan, J.-L. (2005). Conditional knockout of focal adhesion kinase in endothelial cells reveals its role in angiogenesis and vascular development in late embryogenesis. Journal of Cell Biology *169*, 941–952.

Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Keir, S.T., Song, L., Wickman, S., Jackson, D., Ohmori, O., Bigner, D.D., Friedman, H.S., and Rich, J.N. (2007). A novel low-molecular weight inhibitor of focal adhesion kinase, TAE226, inhibits glioma growth. Molecular Carcinogenesis *46*, 488–496.

Shinohara, M., Ohyama, N., Murata, Y., Okazawa, H., Ohnishi, H., Ishikawa, O., and Matozaki, T. (2006). CD47 regulation of epithelial cell spreading and migration, and its signal transduction. Cancer Science *97*, 889–895.

Sick, E., Boukhari, A., Deramaudt, T., Rondé, P., Bucher, B., André, P., Gies, J.-P., and Takeda, K. (2011). Activation of CD47 receptors causes proliferation of human astrocytoma but not normal astrocytes via an Akt-dependent pathway. Glia *59*, 308–319.

Sick, E., Jeanne, A., Schneider, C., Dedieu, S., Takeda, K., and Martiny, L. (2012). CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest: CD47 in the tumour microenvironment. British Journal of Pharmacology *167*, 1415–1430

Sieg, D.J. (1998). Pyk2 and Src-family protein-tyrosine kinases compensate for the loss of FAK in fibronectin-stimulated signaling events but Pyk2 does not fully function to enhance FAK- cell migration. The EMBO Journal *17*, 5933–5947.

Sieg, D.J., Hauck, C.R., Ilic, D., Klingbeil, C.K., Schaefer, E., Damsky, C.H., and Schlaepfer, D.D. (2000). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. Nature Cell Biology *2*, 249–256.

Sipes, J.M., Krutzsch, H.C., Lawler, J., and Roberts, D.D. (1999). Cooperation between Thrombospondin-1 Type 1 Repeat Peptides and αvβ3 Integrin Ligands to Promote Melanoma Cell Spreading and Focal Adhesion Kinase Phosphorylation. The journal of biological chemistry *274*, 22755-22762.

Siqueira, A.S., Pinto, M.P., Cruz, M.C., Smuczek, B., Cruz, K.S.P., Barbuto, J.A.M., Hoshino, D., Weaver, A.M., Freitas, V.M., and Jaeger, R.G. (2016). Laminin-111 peptide C16 regulates invadopodia activity of malignant cells through β1 integrin, Src and ERK 1/2. Oncotarget *7*, 47904–47917.

Slack-Davis, J.K., Martin, K.H., Tilghman, R.W., Iwanicki, M., Ung, E.J., Autry, C., Luzzio, M.J., Cooper, B., Kath, J.C., Roberts, W.G., et al. (2007). Cellular Characterization of a Novel Focal Adhesion Kinase Inhibitor. Journal of Biological Chemistry *282*, 14845–14852.

Sleeman, J.P. (2012). The metastatic niche and stromal progression. Cancer and Metastasis Reviews *31*, 429–440.

Sonoda, Y., Matsumoto, Y., Funakoshi, M., Yamamoto, D., Hanks, S.K., and Kasahara, T. (2000). Anti-apoptotic Role of Focal Adhesion Kinase (FAK): induction of inhibitor-of-apoptosis proteins and apoptosis suppression by the overexpression of fak in a human leukemic cell line, HL-60. Journal of Biological Chemistry *275*, 16309–16315.

Sood, A.K., Coffin, J.E., Schneider, G.B., Fletcher, M.S., DeYoung, B.R., Gruman, L.M., Gershenson, D.M., Schaller, M.D., and Hendrix, M.J.C. (2004). Biological significance of focal adhesion kinase in ovarian cancer: role in migration and invasion. Am. J. Pathol. *165*, 1087–1095.

Sosman, J.A., Kim, K.B., Schuchter, L., Gonzalez, R., Pavlick, A.C., Weber, J.S., McArthur, G.A., Hutson, T.E., Moschos, S.J., Flaherty, K.T., et al. (2012). Survival in BRAF V600–Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. New England Journal of Medicine *366*, 707–714.

Soto-Pantoja, D.R., Stein, E.V., Rogers, N.M., Sharifi-Sanjani, M., Isenberg, J.S., and Roberts, D.D. (2013). Therapeutic opportunities for targeting the ubiquitous cell surface receptor CD47. Expert Opinion on Therapeutic Targets *17*, 89–103.

Soto-Pantoja, D.R., Terabe, M., Ghosh, A., Ridnour, L.A., DeGraff, W.G., Wink, D.A., Berzofsky, J.A., and Roberts, D.D. (2014). CD47 in the Tumor Microenvironment Limits Cooperation between Antitumor T-cell Immunity and Radiotherapy. Cancer Research *74*, 6771–6783.

Soto-Pantoja, D.R., Kaur, S., and Roberts, D.D. (2015). CD47 signaling pathways controlling cellular differentiation and responses to stress. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology *50*, 212–230.

Stahl, E., Nott, R., Koessel, K., Cance, W., and Marlowe, T. (2020). Computational-based discovery of FAK FERM domain chemical probes that inhibit HER2-FAK cancer signaling. Chemical Biology & Drug Design.

Steffen, A., Le Dez, G., Poincloux, R., Recchi, C., Nassoy, P., Rottner, K., Galli, T., and Chavrier, P. (2008). MT1-MMP-Dependent Invasion Is Regulated by TI-VAMP/VAMP7. Current Biology *18*, 926–931.

Stevens, M.F.G., Hickman, J.A., Langdon, S.P., Chubb, D., Vickers, L., Stone, R., Baig, G., Goddard, C., Gibson, N.W., Slack, J.A., et al. (1987). Antitumor activity and Pharmacokinetics in Mice of 8-Carbamoyl-3-methyl-imidazo[5,l-on-l,2,3,5-tetrazin-4(37/)-one, a Novel Drug with Potential as an Alternative to Dacarbazine. Cancer research *47*, 5846-5852.

Stoker, M., and Perryman, M. (1985). An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. Journal of cell science *77*, 209-223.

Stokes, J.B., Adair, S.J., Slack-Davis, J.K., Walters, D.M., Tilghman, R.W., Hershey, E.D., Lowrey, B., Thomas, K.S., Bouton, A.H., Hwang, R.F., et al. (2011). Inhibition of Focal Adhesion Kinase by PF-562,271 Inhibits the Growth and Metastasis of Pancreatic Cancer Concomitant with Altering the Tumor Microenvironment. Molecular Cancer Therapeutics *10*, 2135–2145.

Sudo, T., Takahashi, Y., Sawada, G., Uchi, R., Mimori, K., and Akagi, Y. (2017). Significance of CD47 expression in gastric cancer. Oncology Letters *14*, 801–809.

Sulzmaier, F.J., Jean, C., and Schlaepfer, D.D. (2014). FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. Nature Reviews Cancer *14*, 598–610.

Suzuki, S., Yokobori, T., Tanaka, N., Sakai, M., Sano, A., Inose, T., Sohda, M., Nakajima, M., Miyazaki, T., Kato, H., et al. (2012). CD47 expression regulated by the miR-133a tumor suppressor is a novel prognostic marker in esophageal squamous cell carcinoma. Oncology Reports *28*, 465–472.

Swayampakula, M., McDonald, P.C., Vallejo, M., Coyaud, E., Chafe, S.C., Westerback, A., Venkateswaran, G., Shankar, J., Gao, G., Laurent, E.M.N., et al. (2017). The interactome of metabolic enzyme carbonic anhydrase IX reveals novel roles in tumor cell migration and invadopodia/MMP14-mediated invasion. Oncogene *36*, 6244–6261.

Swift, J., Ivanovska, I.L., Buxboim, A., Harada, T., Dingal, P.C.D.P., Pinter, J., Pajerowski, J.D., Spinler, K.R., Shin, J.-W., Tewari, M., et al. (2013). Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation. Science *341*, 1240104–1240104.

Tachibana, K., Urano, T., Fujita, H., Ohashi, Y., Kamiguchi, K., Iwata, S., Hirai, H., and Morimoto, C. (1997). Tyrosine Phosphorylation of Crk-associated Substrates by Focal Adhesion Kinase: a putative mechanism for the integrin-mediated tyrosine phosphorylation of crk-associated substrates. Journal of Biological Chemistry *272*, 29083–29090.

Takenaka, K., Prasolava, T.K., Wang, J.C.Y., Mortin-Toth, S.M., Khalouei, S., Gan, O.I., Dick, J.E., and Danska, J.S. (2007). Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. Nature Immunology *8*, 1313–1323.

Takino, T., Miyamori, H., Kawaguchi, N., Uekita, T., Seiki, M., and Sato, H. (2003). Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. Biochemical and Biophysical Research Communications *304*, 160–166.

Tan, T.-W., Lai, C.-H., Huang, C.-Y., Yang, W.-H., Chen, H.-T., Hsu, H.-C., Fong, Y.-C., and Tang, C.-H. (2009).

CTGF enhances migration and MMP-13 up-regulation via αvβ3 integrin, FAK, ERK, and NF-κB-dependent pathway in human chondrosarcoma cells. Journal of Cellular Biochemistry *107*, 345–356.

Tanjoni, I., Walsh, C., Uryu, S., Tomar, A., Nam, J.-O., Mielgo, A., Lim, S.-T., Liang, C., Koenig, M., Patel, N., et al. (2010). PND-1186 FAK inhibitor selectively promotes tumor cell apoptosis in three-dimensional environments. Cancer Biology & Therapy *9*, 764–777.

Tanzer, M.L. (2006). Current concepts of extracellular matrix. Journal of Orthopaedic Science *11*, 326–331.

Tapial Martínez, P., López Navajas, P., and Lietha, D. (2020). FAK Structure and Regulation by Membrane Interactions and Force in Focal Adhesions. Biomolecules *10*, 179.

Tarhini, A.A., Kirkwood, J.M., Gooding, W.E., Cai, C., and Agarwala, S.S. (2007). Durable Complete Responses With High-Dose Bolus Interleukin-2 in Patients With Metastatic Melanoma Who Have Experienced Progression After Biochemotherapy. Journal of Clinical Oncology *25*, 3802–3807.

Tarone, G., Cirillo, D., Giancotti, F.G., Comoglio, P.M., and Marchisio, P.C. (1985). Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. Experimental Cell Research *159*, 141–157.

Tavora, B., Batista, S., Reynolds, L.E., Jadeja, S., Robinson, S., Kostourou, V., Hart, I., Fruttiger, M., Parsons, M., and Hodivala-Dilke, K.M. (2010). Endothelial FAK is required for tumour angiogenesis. EMBO Molecular Medicine *2*, 516–528.

Tehrani, S., Faccio, R., Chandrasekar, I., Ross, F.P., and Cooper, J.A. (2006). Cortactin Has an Essential and Specific Role in Osteoclast Actin Assembly□V. Molecular Biology of the Cell *17*, 14.

Testori, A., Rutkowski, P., Marsden, J., Bastholt, L., Chiarion-Sileni, V., Hauschild, A., and Eggermont, A.M.M. (2009). Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma. Annals of Oncology *20*, vi22–vi29.

Theocharis, S.E., Kouraklis, G.P., Kakisis, J.D., Kanelli, H.G., Apostolakou, F.E., Karatzas, G.M., and Koutselinis, A.S. (2003). Focal adhesion kinase expression is not a prognostic predictor in colon adenocarcinoma patients. European Journal of Surgical Oncology (EJSO) *29*, 571–574.

Theodosiou, M., Widmaier, M., Böttcher, R.T., Rognoni, E., Veelders, M., Bharadwaj, M., Lambacher, A., Austen, K., Müller, D.J., Zent, R., et al. (2016). Kindlin-2 cooperates with talin to activate integrins and induces cell spreading by directly binding paxillin. ELife *5*.

Thiery, J.P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. Nature Reviews Cancer *2*, 442–454.

Thuault, S., Mamelonet, C., Salameh, J., Ostacolo, K., Chanez, B., Salaün, D., Baudelet, E., Audebert, S., Camoin, L., and Badache, A. (2020). A proximity-labeling proteomic approach to investigate invadopodia molecular landscape in breast cancer cells. Scientific Reports *10*.

Tobin, D.J. (2006). Biochemistry of human skin—our brain on the outside. Chem. Soc. Rev. *35*, 52–67.

Tolde, O., Rösel, D., Veselý, P., Folk, P., and Brábek, J. (2010). The structure of invadopodia in a complex 3D environment. European Journal of Cell Biology *89*, 674–680.

Tomita, N., Hayashi, Y., Suzuki, S., Oomori, Y., Aramaki, Y., Matsushita, Y., Iwatani, M., Iwata, H., Okabe, A., Awazu, Y., et al. (2013). Structure-based discovery of cellular-active allosteric inhibitors of FAK. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters *23*, 1779–1785.

Toutant, M., Costa, A., Studler, J.-M., Kadaré, G., Carnaud, M., and Girault, J.-A. (2002). Alternative Splicing Controls the Mechanisms of FAK Autophosphorylation. Molecular and Cellular Biology *22*, 7731–7743.

Trinh, V.A. (2008). Current management of metastatic melanoma. American Journal of Health-System Pharmacy *65*, S3–S9.

Tulasne, D., Judd, B.A., Johansen, M., Asazuma, N., Best, D., Brown, E.J., Kahn, M., Koretzky, G.A., and Watson, S.P. (2001). C-terminal peptide of thrombospondin-1 induces platelet aggregation through the Fc receptor γ-chain–associated signaling pathway and by agglutination. Blood *98*, 3346-3452.

Turner, C.E. (2000). Paxillin and focal adhesion signalling. Nature Cell Biology *2*, E231–E236.

Turner, C.E., Glenney, J.R., and Burridge, K. (1990). Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. Journal of Cell Biology *111*, 1059–1068.

Vanarotti, M.S., Finkelstein, D.B., Guibao, C.D., Nourse, A., Miller, D.J., and Zheng, J.J. (2016). Structural Basis for the Interaction between Pyk2-FAT Domain and Leupaxin LD Repeats. Biochemistry *55*, 1332–1345.

Veillette, A., and Chen, J. (2018). SIRPα–CD47 Immune Checkpoint Blockade in Anticancer Therapy. Trends in Immunology *39*, 173–184.

Vernon-Wilson, E.F., Kee, W.-J., Willis, A.C., Barclay, A.N., Simmons, D.L., and Brown, M.H. (2000). CD47 is a ligand for rat macrophage membrane signal regulatory protein SIRP (OX41) and human SIRPα 1. European Journal of Immunology *30*, 2130–2137.

Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L., Choi, C.K., and Horwitz, A.F. (2007). Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. Journal of Cell Biology *176*, 573–580.

Vicente-Manzanares, M., Choi, C.K., and Horwitz, A.R. (2009). Integrins in cell migration - the actin connection. Journal of Cell Science *122*, 1473–1473.

Vitale, S., Avizienyte, E., Brunton, V., and Frame, M. (2008). Focal adhesion kinase is not required for Src-induced formation of invadopodia in KM12C colon cancer cells and can interfere with their assembly. European Journal of Cell Biology *87*, 569–579.

Walker, V.G., Ammer, A., Cao, Z., Clump, A.C., Jiang, B.-H., Kelley, L.C., Weed, S.A., Zot, H., and Flynn, D.C. (2007). PI3K activation is required for PMA-directed activation of cSrc by AFAP-110. American Journal of Physiology-Cell Physiology *293*, C119–C132.

Walkiewicz, K.W., Girault, J.-A., and Arold, S.T. (2015). How to awaken your nanomachines: Site-specific activation of focal adhesion kinases through ligand interactions. Progress in Biophysics and Molecular Biology *119*, 60–71.

Walsh, C., Tanjoni, I., Uryu, S., Tomar, A., Nam, J.-O., Luo, H., Phillips, A., Patel, N., Kwok, C., McMahon, G., et al. (2010). Oral delivery of PND-1186 FAK inhibitor decreases tumor growth and spontaneous breast to lung metastasis in pre-clinical models. Cancer Biology & Therapy *9*, 778–790.

Wang, X.-Q., and Frazier, W.A. (1998). The Thrombospondin Receptor CD47 (IAP) Modulates and Associates with α2β1 Integrin in Vascular Smooth Muscle Cells. Molecular Biology of the Cell *9*, 10.

Wang, H., Tan, M., Zhang, S., Li, X., Gao, J., Zhang, D., Hao, Y., Gao, S., Liu, J., and Lin, B. (2015). Expression and Significance of CD44, CD47 and c-met in Ovarian Clear Cell Carcinoma. International Journal of Molecular Sciences *16*, 3391–3404.

Wang, S.-Y., Hao, H.-L., Deng, K., Li, Y., Cheng, Z.-Y., Lv, C., Liu, Z.-M., Yang, J., and Pan, L. (2012). Expression levels of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) and focal adhesion kinase in patients with multiple myeloma and their relationship to clinical stage and extramedullary infiltration. Leukemia & Lymphoma *53*, 1162–1168.

Wang, X.-Q., Lindberg, F.P., and Frazier, W.A. (1999). Integrin-associated Protein Stimulates α2β1-dependent Chemotaxis via Gi-mediated Inhibition of Adenylate Cyclase and Extracellular-regulated Kinases. The Journal of Cell Biology *147*, 11.

Wang, Y., Cao, H., Chen, J., and McNiven, M.A. (2011). A direct interaction between the large GTPase dynamin-2 and FAK regulates focal adhesion dynamics in response to active Src. Molecular Biology of the Cell *22*, 1529–1538.

Wang, Y., Xu, Z., Guo, S., Zhang, L., Sharma, A., Robertson, G.P., and Huang, L. (2013). Intravenous Delivery of siRNA Targeting CD47 Effectively Inhibits Melanoma Tumor Growth and Lung Metastasis. Molecular Therapy *21*, 1919–1929

Watanabe, N., Takaoka, M., Sakurama, K., Tomono, Y., Hatakeyama, S., Ohmori, O., Motoki, T., Shirakawa, Y., Yamatsuji, T., Haisa, M., et al. (2008). Dual Tyrosine Kinase Inhibitor for Focal Adhesion Kinase and Insulin-like Growth Factor-I Receptor Exhibits Anticancer Effect in Esophageal Adenocarcinoma In vitro and In vivo. Clinical Cancer Research *14*, 4631–4639.

Watanabe, T., Noritake, J., and Kaibuchi, K. (2005). Regulation of microtubules in cell migration. Trends in Cell Biology *15*, 76–83.

Weaver, A.M. (2009). Regulation of Cancer Invasion by Reactive Oxygen Species and Tks Family Scaffold Proteins. Science Signaling *2*, pe56–pe56.

Webb, D.J., Parsons, J.T., and Horwitz, A.F. (2002). Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells – over and over and over again. Nature Cell Biology *4*, E97–E100.

Webb, D.J., Donais, K., Whitmore, L.A., Thomas, S.M., Turner, C.E., Parsons, J.T., and Horwitz, A.F. (2004). FAK–Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. Nature Cell Biology *6*, 154–161.

Weijer, C.J. (2009). Collective cell migration in development. Journal of Cell Science *122*, 3215–3223.

Weis, S.M., Lim, S.-T., Lutu-Fuga, K.M., Barnes, L.A., Chen, X.L., Göthert, J.R., Shen, T.-L., Guan, J.-L., Schlaepfer, D.D., and Cheresh, D.A. (2008). Compensatory role for Pyk2 during angiogenesis in adult mice lacking endothelial cell FAK. The Journal of Cell Biology *181*, 43–50.

Weiskopf, K. (2017). Cancer immunotherapy targeting the CD47/SIRPα axis. European Journal of Cancer *76*, 100–109.

Weiskopf, K., Ring, A.M., Ho, C.C.M., Volkmer, J.-P., Levin, A.M., Volkmer, A.K., Özkan, E., Fernhoff, N.B., van de Rijn, M., Weissman, I.L., et al. (2013). Engineered SIRPα Variants as Immunotherapeutic Adjuvants to Anticancer Antibodies. Science *341*, 88–91.

Weiskopf, K., Jahchan, N.S., Schnorr, P.J., Cristea, S., Ring, A.M., Maute, R.L., Volkmer, A.K., Volkmer, J.-P., Liu, J., Lim, J.S., et al. (2016). CD47-blocking immunotherapies stimulate macrophage-mediated destruction of small-cell lung cancer. Journal of Clinical Investigation *126*, 2610–2620.

Wen, L.-P., Fahrni, J.A., Troie, S., Guan, J.-L., Orth, K., and Rosen, G.D. (1997). Cleavage of Focal Adhesion Kinase by Caspases during Apoptosis. Journal of Biological Chemistry *272*, 26056–26061.

Westhoff, M.A., Serrels, B., Fincham, V.J., Frame, M.C., and Carragher, N.O. (2004). Src-Mediated Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase Couples Actin and Adhesion Dynamics to Survival Signaling. Molecular and Cellular Biology *24*, 8113–8133.

Wiesner, C., Faix, J., Himmel, M., Bentzien, F., and Linder, S. (2010). KIF5B and KIF3A/KIF3B kinesins drive MT1-MMP surface exposure, CD44 shedding, and extracellular matrix degradation in primary macrophages. Blood *116*, 1559–1569.

Williams, K.C., and Coppolino, M.G. (2011). Phosphorylation of Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) and Its Vesicle-associated Membrane Protein 7 (VAMP7)-dependent Trafficking Facilitate Cell Invasion and Migration. Journal of Biological Chemistry *286*, 43405–43416.

Williams, K.C., McNeilly, R.E., and Coppolino, M.G. (2014). SNAP23, Syntaxin4, and vesicle-associated membrane protein 7 (VAMP7) mediate trafficking of membrane type 1–matrix metalloproteinase (MT1-MMP) during invadopodium formation and tumor cell invasion. Molecular Biology of the Cell *25*, 2061–2070.

Willingham, S.B., Volkmer, J.-P., Gentles, A.J., Sahoo, D., Dalerba, P., Mitra, S.S., Wang, J., Contreras-Trujillo, H., Martin, R., Cohen, J.D., et al. (2012). The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences *109*, 6662–6667.

Wolf, K., and Friedl, P. (2006). Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity: Mechanisms of tumour cell invasion, plasticity, metastasis. British Journal of Dermatology *154*, 11–15.

Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U.H., Deryugina, E.I., Strongin, A.Y., Bröcker, E.-B., and Friedl, P. (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration. Journal of Cell Biology *160*, 267–277.

Wolf, K., Wu, Y.I., Liu, Y., Geiger, J., Tam, E., Overall, C., Stack, M.S., and Friedl, P. (2007). Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. Nature Cell Biology *9*, 893–904.

Wolf, K., te Lindert, M., Krause, M., Alexander, S., te Riet, J., Willis, A.L., Hoffman, R.M., Figdor, C.G., Weiss, S.J., and Friedl, P. (2013). Physical limits of cell migration: Control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. The Journal of Cell Biology *201*, 1069–1084.

Worby, C.A., and Dixon, J.E. (2014). PTEN. Annual Review of Biochemistry *83*, 641–669.

Wu, X., Suetsugu, S., Cooper, L.A., Takenawa, T., and Guan, J.-L. (2004). Focal Adhesion Kinase Regulation of N-WASP Subcellular Localization and Function. Journal of Biological Chemistry *279*, 9565–9576.

Wu, X., Gan, B., Yoo, Y., and Guan, J.-L. (2005). FAK-Mediated Src Phosphorylation of Endophilin A2 Inhibits Endocytosis of MT1-MMP and Promotes ECM Degradation. Developmental Cell *9*, 185–196.

Xing, C., Lee, S., Kim, W.J., Wang, H., Yang, Y.-G., Ning, M., Wang, X., and Lo, E.H. (2009). Neurovascular effects of CD47 signaling: Promotion of cell death, inflammation, and suppression of angiogenesis in brain endothelial cells in vitro. Journal of Neuroscience Research *87*, 2571–2577.

Yamaguchi, H., and Hendrickson, W.A. (1996). Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lek upon tyrosine phosphorylation. *384*, 6.

Yamaguchi, H., and Oikawa, T. (2010). Membrane lipids in invadopodia and podosomes: Key structures for cancer invasion and metastasis. Oncotarget *1*, 320–328.

Yamaguchi, H., Lorenz, M., Kempiak, S., Sarmiento, C., Coniglio, S., Symons, M., Segall, J., Eddy, R., Miki, H., Takenawa, T., et al. (2005). Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP–Arp2/3 complex pathway and cofilin. The Journal of Cell Biology *168*, 441–452.

Yamaguchi, H., Takeo, Y., Yoshida, S., Kouchi, Z., Nakamura, Y., and Fukami, K. (2009). Lipid Rafts and Caveolin-1 Are Required for Invadopodia Formation and Extracellular Matrix Degradation by Human Breast Cancer Cells.

Cancer Research *69*, 8594–8602.

Yamaguchi, H., Yoshida, S., Muroi, E., Yoshida, N., Kawamura, M., Kouchi, Z., Nakamura, Y., Sakai, R., and Fukami, K. (2011). Phosphoinositide 3-kinase signaling pathway mediated by p110α regulates invadopodia formation. The Journal of Cell Biology *193*, 1275–1288.

Yamaguchi, N., Mizutani, T., Kawabata, K., and Haga, H. (2015). Leader cells regulate collective cell migration via Rac activation in the downstream signaling of integrin β1 and PI3K. Scientific Reports *5*.

Yamauchi, T., Takenaka, K., Urata, S., Shima, T., Kikushige, Y., Tokuyama, T., Iwamoto, C., Nishihara, M., Iwasaki, H., Miyamoto, T., et al. (2013). Polymorphic Sirpa is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment. Blood *121*, 1316–1325.

Yamauchi, Y., Kuroki, M., Imakiire, T., Uno, K., Abe, H., Beppu, R., Yamashita, Y., Kuroki, M., and Shirakusa, T. (2002). Opposite effects of thrombospondin-1 via CD36 and CD47 on homotypic aggregation of monocytic cells. Matrix Biology *21*, 441–448.

Yana, I., and Weiss, S.J. (2000). Regulation of Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase Activation by Proprotein Convertases. Molecular Biology of the Cell *11*, 2387–2401.

Yang, S.Y., Choi, S.A., Lee, J.Y., Park, A.-K., Wang, K.-C., Phi, J.H., Koh, E.J., Park, W.-Y., Park, S.-H., Hwang, D.W., et al. (2015). miR-192 suppresses leptomeningeal dissemination of medulloblastoma by modulating cell proliferation and anchoring through the regulation of *DHFR* , integrins, and *CD47*. Oncotarget *6*, 43712–43730.

Yao, M., Roberts, D.D., and Isenberg, J.S. (2011). Thrombospondin-1 inhibition of vascular smooth muscle cell responses occurs via modulation of both cAMP and cGMP. Pharmacological Research *63*, 13–22.

Yilmaz, M., and Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. Cancer and Metastasis Reviews *28*, 15–33.

Yin, M., Ma, W., and An, L. (2017). Cortactin in cancer cell migration and invasion. Oncotarget *8*.

Yook, J.I., Li, X.-Y., Ota, I., Fearon, E.R., and Weiss, S.J. (2005). Wnt-dependent Regulation of the E-cadherin Repressor Snail. Journal of Biological Chemistry *280*, 11740–11748.

Yoon, H., Dehart, J.P., Murphy, J.M., and Lim, S.-T.S. (2015). Understanding the Roles of FAK in Cancer: Inhibitors, Genetic Models, and New Insights. Journal of Histochemistry & Cytochemistry *63*, 114–128.

Yu, Q., Xu, L., Chen, L., Sun, B., Yang, Z., Lu, K., and Yang, Z. (2020). Vinculin expression in non-small cell lung cancer. Journal of International Medical Research *48*, 030006051983952.

Yu, X., Zech, T., McDonald, L., Gonzalez, E.G., Li, A., Macpherson, I., Schwarz, J.P., Spence, H., Futó, K., Timpson, P., et al. (2012). N-WASP coordinates the delivery and F-actin–mediated capture of MT1-MMP at invasive pseudopods. The Journal of Cell Biology *199*, 527–544.

Zaidel-Bar, R., Ballestrem, C., Kam, Z., and Geiger, B. (2003). Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. Journal of Cell Science *116*, 4605–4613.

Zaidel-Bar, R., Milo, R., Kam, Z., and Geiger, B. (2006). A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. Journal of Cell Science *120*, 137–148.

Zak, T.J., Koshman, Y.E., Samarel, A.M., and Robia, S.L. (2017). Regulation of Focal Adhesion Kinase through a Direct Interaction with an Endogenous Inhibitor. Biochemistry *56*, 4722–4731.

Zalaudek, I., Whiteman, D., Rosendahl, C., Menzies, S.W., Green, A.C., Hersey, P., and Argenziano, G. (2011). Update on melanoma and non-melanoma skin cancer. Expert Review of Anticancer Therapy *11*, 1829–1832.

Zhai, J., Lin, H., Nie, Z., Wu, J., Cañete-Soler, R., Schlaepfer, W.W., and Schlaepfer, D.D. (2003). Direct Interaction of Focal Adhesion Kinase with p190RhoGEF. Journal of Biological Chemistry *278*, 24865–24873.

Zhang, H., Wong, C.C.L., Wei, H., Gilkes, D.M., Korangath, P., Chaturvedi, P., Schito, L., Chen, J., Krishnamachary, B., Winnard, P.T., et al. (2012). HIF-1-dependent expression of angiopoietin-like 4 and L1CAM mediates vascular metastasis of hypoxic breast cancer cells to the lungs. Oncogene *31*, 1757–1770.

Zhang, H., Lu, H., Xiang, L., Bullen, J.W., Zhang, C., Samanta, D., Gilkes, D.M., He, J., and Semenza, G.L. (2015). HIF-1 regulates CD47 expression in breast cancer cells to promote evasion of phagocytosis and maintenance of cancer stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences *112*, E6215–E6223.

Zhang, J., He, D.-H., Zajac-Kaye, M., and Hochwald, S.N. (2014). A small molecule FAK kinase inhibitor, GSK2256098, inhibits growth and survival of pancreatic ductal adenocarcinoma cells. Cell Cycle *13*, 3143–3149.

Zhang, J., Li, L., Peng, Y., Chen, Y., Lv, X., Li, S., Qin, X., Yang, H., Wu, C., and Liu, Y. (2018). Surface chemistry induces mitochondria-mediated apoptosis of breast cancer cells via PTEN/PI3K/AKT signaling pathway.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research *1865*, 172–185.

Zhang, M., Liu, P., Xu, F., He, Y., Xie, X., and Jiang, X. (2019). Vinculin promotes gastric cancer proliferation and migration and predicts poor prognosis in patients with gastric cancer. Journal of Cellular Biochemistry *120*, 14107–14115.

Zhang, X., Jiang, G., Cai, Y., Monkley, S.J., Critchley, D.R., and Sheetz, M.P. (2008). Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. Nature Cell Biology *10*, 1062–1068.

Zhang, X., Kazerounian, S., Duquette, M., Perruzzi, C., Nagy, J.A., Dvorak, H.F., Parangi, S., and Lawler, J. (2009). Thrombospondin-1 modulates vascular endothelial growth factor activity at the receptor level. The FASEB Journal *23*, 3368–3376.

Zhao, H., Wang, J., Kong, X., Li, E., Liu, Y., Du, X., Kang, Z., Tang, Y., Kuang, Y., Yang, Z., et al. (2016a). CD47 Promotes Tumor Invasion and Metastasis in Non-small Cell Lung Cancer. Scientific Reports *6*.

Zhao, J., Pestell, R., and Guan, J.-L. (2001). Transcriptional Activation of Cyclin D1 Promoter by FAK Contributes to Cell Cycle Progression. Molecular Biology of the Cell *12*, 4066–4077.

Zhao, S., Chen, C., Chang, K., Karnad, A., Jagirdar, J., Kumar, A.P., and Freeman, J.W. (2016b). CD44 Expression Level and Isoform Contributes to Pancreatic Cancer Cell Plasticity, Invasiveness, and Response to Therapy. Clinical Cancer Research *22*, 5592–5604.

Zhao, X.W., van Beek, E.M., Schornagel, K., Van der Maaden, H., Van Houdt, M., Otten, M.A., Finetti, P., Van Egmond, M., Matozaki, T., Kraal, G., et al. (2011). CD47-signal regulatory protein-SIRPα interactions form a barrier for antibody-mediated tumor cell destruction. Proceedings of the National Academy of Sciences *108*, 18342–18347.

Annexe

Biol. Cell (2020) **112,** 53–72 DOI: 10.1111/boc.201900041

Research article

FAK regulates dynein localisation and cell polarity in migrating mouse fibroblasts

Marta Fructuoso*†, Marlène Legrand*, Antoine Mousson*, Tania Steffan*, Romain Vauchelles*, Jan De Mey*, Emilie Sick*, Philippe Rondé* and Denis Dujardin*[1]

*Migration, invasion and microenvironnement, Faculté de Pharmacie, UMR7021 CNRS, LBP, Université de Strasbourg, Illkirch, France and †ICM Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, CNRS UMR7225, INSERM U1127, UPMC, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France

Background. Fibroblasts executing directional migration position their centrosome, and their Golgi apparatus, in front of the nucleus towards the cell leading edge. Centrosome positioning relative to the nucleus has been associated to mechanical forces exerted on the centrosome by the microtubule-dependent molecular motor cytoplasmic dynein 1, and to nuclear movements such as rearward displacement and rotation events. Dynein has been proposed to regulate the position of the centrosome by exerting pulling forces on microtubules from the cell leading edge, where the motor is enriched during migration. However, the mechanism explaining how dynein acts at the front of the cells has not been elucidated.

Results. We present here results showing that the protein Focal Adhesion Kinase (FAK) interacts with dynein and regulates the enrichment of the dynein/dynactin complex at focal adhesions at the cell the leading edge of migrating fibroblasts. This suggests that focal adhesions provide anchoring sites for dynein during the polarisation process. In support of this, we present evidence indicating that the interaction between FAK and dynein, which is regulated by the phosphorylation of FAK on its Ser732 residue, is required for proper centrosome positioning. Our results further show that the polarisation of the centrosome can occur independently of nuclear movements. Although FAK regulates both nuclear and centrosome motilities, downregulating the interaction between FAK and dynein affects only the nuclear independent polarisation of the centrosome.

Conclusions. Our work highlights the role of FAK as a key player in the regulation of several aspects of cell polarity. We thus propose a model in which the transient localisation of dynein with focal adhesions provides a tuneable mechanism to bias dynein traction forces on microtubules allowing proper centrosome positioning in front of the nucleus.

Significance. We unravel here a new role for the cancer therapeutic target FAK in the regulation of cell morphogenesis.

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Introduction

The ability of cells to adapt their organisation in response to their microenvironment requires complex regulatory and mechanotransduction mechanisms that are crucial for proper cell differentiation and

[1]To whom correspondence should be addressed (email denis.dujardin@unistra.fr)

Key words: cell migration, centrosome polarity, cytoplasmic dynein, FAK.

Abbreviations: APC, adenomatous polyposis coli; CHO, Chinese Hamster Ovary; DIC, cytoplasmic dynein intermediate chain; FAK, Focal Adhesion Kinase; GKAP, guanylate kinase-associated protein; LINC, linker of nucleoskeleton and cytoskeleton; MEF, mouse embryo fibroblasts; Nesprin, nuclear envelope spectrin repeat proteins; NR, nuclear rotation; PDE4D, phosphodiesterase 4D; RACK1, receptor for activated C kinase 1; SUN, Sad1/UNC-84; TIRF, total internal reflection fluorescence.

© 2019 Société Française des Microscopies and Société de Biologie Cellulaire de France. Published by John Wiley & Sons Ltd

function. One illustration of such mechanisms is the acquisition of a polarised organisation of the cytoskeleton during cell migration. In many cell types grown on two-dimensional extracellular matrixes, the centrosome as well as its associated microtubules and membranous organelles, are positioned in front of the nucleus, toward the leading edge of cells (Elric and Etienne-Manneville, 2014; Luxton and Gundersen, 2011). This polarisation is at the crossroad of several signalling pathways including non-canonical Wnt, Cdc42/Par6/aPKC, as well as integrin-dependent pathways (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Gomes et al., 2005; Palazzo et al., 2001; Schlessinger et al., 2007).

Sharing some similarities with mitotic spindle orientation during cell division, centrosome positioning during interphase is affected by pulling forces on microtubules from the cell cortex as elegantly revealed by the effects of local delivery of a microtubule depolymerising drug (Burakov et al., 2003). Moreover, centrosome orientation during migration was shown to require the molecular motor cytoplasmic dynein 1 (hereafter referred to as "dynein") and its associated complex dynactin in fibroblasts, astrocytes, and CHO cells (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Palazzo et al., 2001; Yvon et al., 2002). In mouse fibroblasts, dynein has been proposed to regulate the position of the centrosome by exerting pulling forces on microtubules from the cell leading edge, where the motor is enriched during migration (Dujardin et al., 2003). The motor was also shown to be functioning at cell–cell contact cortical sites containing Par3 (Schmoranzer et al., 2009), where it was also proposed to tether and/or pull on microtubules, thus achieving a force equilibrium with front edge traction forces leading to centrosome positioning. How dynein is anchored at the leading edge of cells still remains speculative. An interesting possibility is raised by the interaction between the focal adhesion proteins FAK and paxillin with dynein shown in endothelial and NRK cells (Park et al., 2009; Rosse et al., 2012). Moreover, FAK was reported to be required for proper centrosome positioning in mouse fibroblasts (Tomar et al., 2009) as well as other cell types (Maninova et al., 2013; Serrels et al., 2010; Tilghman et al., 2005). However, whether dynein interacts with FAK and paxillin in fibroblasts is still unknown, and the role of these interactions during polarisation was never investigated.

In addition, dynein was proposed to be anchored to the nucleus of mice neuronal cells via the SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 complexes (Zhang et al., 2009). Interestingly, centrosome orientation was linked to the intracellular behaviour of the nucleus. Indeed, in mouse fibroblasts, centrosome polarisation was shown to rely on the actin- and Nesprin2G/SUN2-dependent rearward movement of the nucleus (Gomes et al., 2005; Luxton et al., 2011). Defects in centrosome positioning were correlated with nuclear rotation (NR) inhibition after disruption of the SUN-Nesprin interaction within the LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton) complex in RAT 2 fibroblasts (Maninova et al., 2013). Regulating nuclear positioning, orientation and shape are thought to help cells migrating in a 3D environment to cope with narrow constraints imposed by the extracellular matrix (Friedl et al., 2011), and was also proposed to promote centrosome/Golgi polarisation (Maninova et al., 2014). However, in 2D cultured fibroblasts, NR depends on dynein and can be observed without affecting the position of the centrosome (Gerashchenko et al., 2009; Levy and Holzbaur, 2008). Thus, to what extent NR could promote centrosome orientation remains unclear.

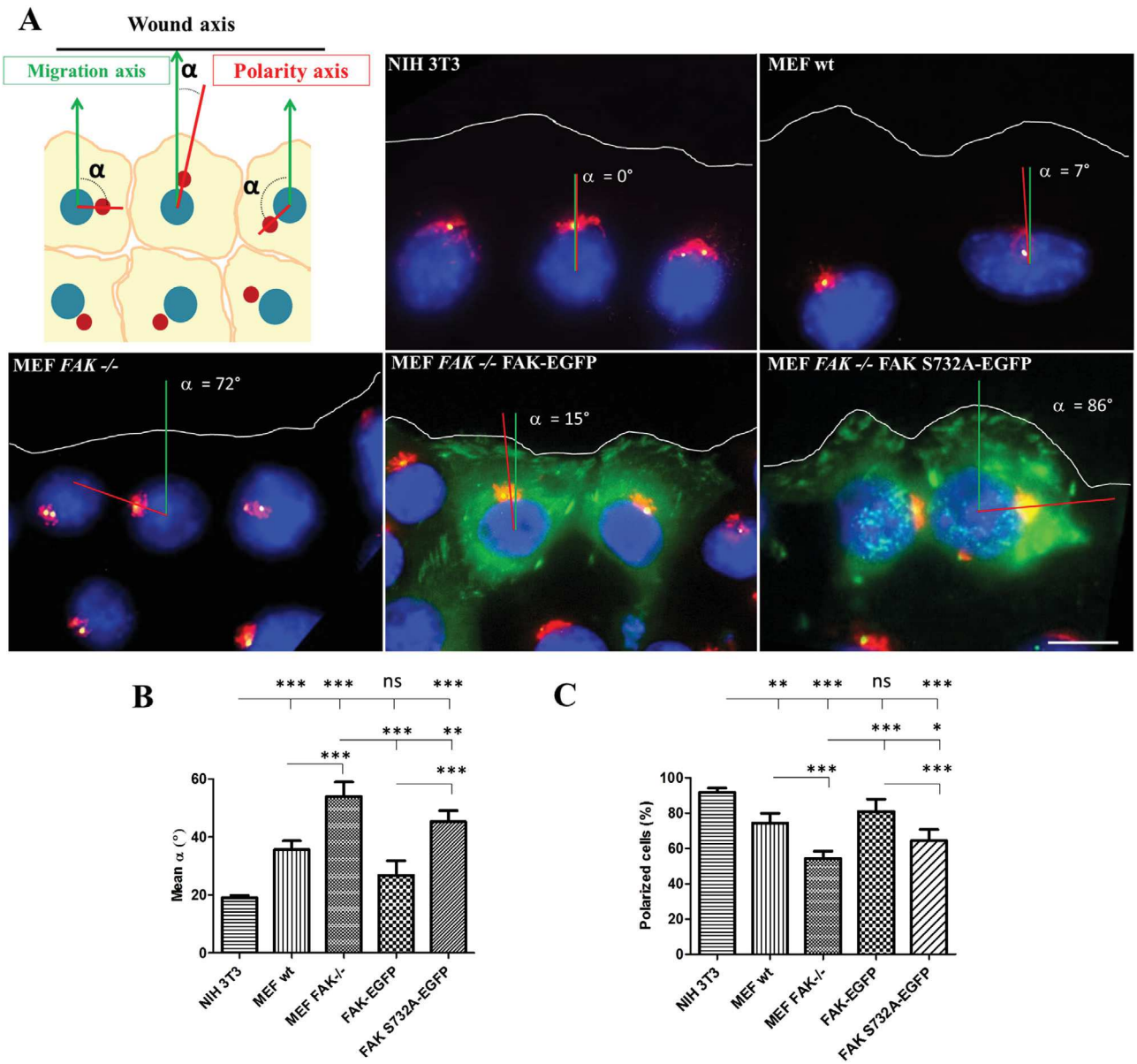
In this study, we provide evidences suggesting that focal adhesions are transient anchoring sites for dynein at the leading edge of migrating fibroblasts. We show that dynein interacts with the focal adhesion proteins FAK and paxillin, and that FAK is required for the proper enrichment of dynein and its cofactor dynactin at the leading edge of cells. Our data also show that FAK is required for the dynamic co-localisation of dynactin spots with focal adhesions at the cell leading edge. Further functional tests indicate that the regulation of the interaction of FAK with dynein affects the polarisation of the centrosome and associated Golgi apparatus. Finally, we clarify the role of different nuclear behaviour during polarisation, and show that the interaction of FAK with dynein allows centrosome polarisation independently of nuclear motility.

Results

FAK-Dynein interaction regulates Golgi orientation

To test for the requirement of FAK and its interaction with dynein in the positioning of the centrosome and the Golgi apparatus in front of the nucleus during

Figure 1 | See Legend on next page



migration, we compared the ability of mouse fibroblasts, expressing wt and mutated FAK constructs, to polarise. To do so, we used the wound healing assay, in which all cells move homogeneously toward the wound and polarise efficiently within a couple of hours of migration (Palazzo et al., 2001). To get a precise measurement of the efficiency of polarisation, we measured the 'polarity angle' α (Figure 1A) in migrating fibroblasts fixed and processed for immunofluorescence 4 h after wounding. Low angles are indicative of well-polarised cells, and angles up to 180° indicate defaults in centrosome/Golgi orientation. *FAK*$^{-/-}$ Mouse Embryo Fibroblasts (MEF) cells display significantly higher polarisation angles (54.1 ± 4.8°; Figures 1A and 1B) as compared to two MEF controls referred to as wt MEF (35.6 ± 3°) or NIH 3T3 fibroblasts (19.2 ± 0.7°). This polarisation defect is specific to FAK as indicated by the rescue of a low polarisation angle (26.8 ± 4.9°) in FAK$^{-/-}$ fibroblasts transfected by a plasmid encoding for FAK

© 2019 Société Française des Microscopies and Société de Biologie Cellulaire de France. Published by John Wiley & Sons Ltd

Figure 1 | FAK is required for centrosome/Golgi orientation in migrating mouse fibroblasts
Measurement of the polarity angles (α) formed between cell migration (green) and polarisation (red) axis in different types of fibroblasts. (**A**) Schematic representation of the method used to calculate α. The migration axis is defined as a line perpendicular to the wound. The polarity axis is defined by the line passing through the centroid of the nucleus and through either the centroid of the Golgi, or the centrosome closest to the wound. Measurements were made on cells subjected to wound healing assays, fixed with 3% PFA 4 h after wounding and processed for immunofluorescence. The nuclei were stained with DAPI (blue). FAK$^{-/-}$ MEFs expressing FAK-EGFP were localised using the EGFP signal (green), centrosomes were stained using an anti γ-tubulin antibody (yellow dots), and the Golgi apparatus was stained using anti GM130 antibody (red). The white lines represent the position of the leading edge of migrating cells. Scale bar: 10 μm. (B) Mean α values using the centroid of the Golgi apparatus as polarity marker. FAK$^{-/-}$ cells displayed significantly higher α (54.1 ± 4.8°; 9 experiments, 983 cells) as compared to NIH 3T3 cells (19.2 ± 0.7°; 3 experiments, 386 cells), wt MEFs (35.6 ± 3°; 5 experiments, 372 cells), and FAK$^{-/-}$ MEFs expressing FAK-EGFP (26.8 ± 4.9°; 14 experiments, 567 cells). FAK$^{-/-}$ cells expressing FAK S732A-EGFP displayed significantly higher α (44.3 ± 3.9°, 7 experiments, 312 cells) compared to FAK expressing cells. wt MEFs also polarised significantly less efficiently than NIH 3T3 cells and FAK$^{-/-}$ cells expressing FAK-EGFP. A significant difference was also detected between FAK$^{-/-}$ cells and FAK S732A-EGFP expressing cells, suggesting a partial recovery of the orientation of the Golgi with the S732A-EGFP construct. (**C**) Mean percentage of polarised cells from the data set in (**B**). Cells with α>45° were filed as non-polarised cells. A significantly lower proportion of FAK$^{-/-}$ cells (54.3 ± 4.2%), or FAK S732A-EGFP (64.5 ± 6.2%) expressing cells, display polarised Golgi as compared to NIH 3T3 cells (91.7 ± 2.5%), wt MEFs, and FAK$^{-/-}$ MEFs expressing FAK-EGFP (81.1 ± 6.9%). wt MEFs (74.3 ± 5.7%) also polarised also significantly less frequently than NIH 3T3 cells.

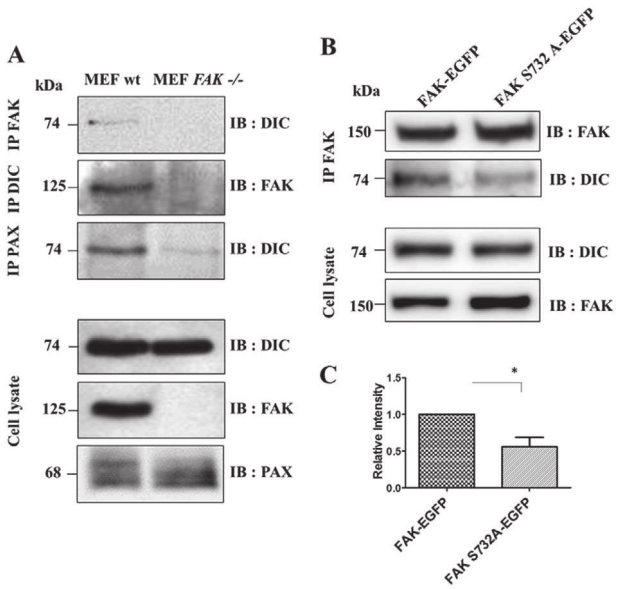
tagged with EGFP. Similar results were obtained using γ-tubulin as centrosome marker to measure the polarity angle (Figure 1A and data not shown).

The interaction of the molecular motor dynein with FAK was already reported in endothelial cells, and its inhibition using the mutated FAK S732A form was shown to trigger mitotic defects (Park et al., 2009). Therefore, to test whether FAK association with dynein is important for Golgi polarisation, we constructed a version of FAK fused to EGFP harbouring the non-phosphorylatable S732A mutation and expressed it in MEF FAK$^{-/-}$ cells. FAK activation was not affected by the S732A mutation as shown by ratiometric analysis of Y397-FAK versus total FAK in both cell extracts (Figures S1A and S1B), and individual focal adhesions (Figures S1C, S1D, and S1E). Moreover, tyrosine phosphorylation of Y861 and Y925, two major binding sites for protein such as p130CAS, paxillin, or Grb2 (Mousson et al., 2018), were not affected by S732A mutation (Figures S1A and S1B), suggesting that this mutation does not have major impact on FAK structure. FAK S732A-EGFP expressing cells failed to restitute proper Golgi orientation, as indicated by their significantly higher mean angle of polarisation (Figures 1A and 1B; 44.3 ± 3.9°), compared to cells expressing FAK-EGFP (26.8 ± 4.9°). To evaluate the proportion of cells able to polarise, we used a polarity angle limit of 45° as a cut-off value (Figure 1C). As previously reported (Tomar et al., 2009), around 80% of cells are polarised when expressing endogenous FAK or after FAK reintroduction in FAK$^{-/-}$ cells. This value decreases significantly in FAK$^{-/-}$ cells (54.3 ± 4.2%) and FAK S732A-EGFP expressing cells (64.5 ± 6.2%) confirming the requirement of FAK for proper centrosome and Golgi positioning, and suggesting that FAK interaction with dynein is also necessary.

To confirm that the observed polarisation defects were linked to the altered interaction of FAK with dynein, we performed immunoprecipitation assays. Our results show that endogenous FAK and dynein co-immunoprecipitate in MEFs cell extracts using either anti-dynein intermediate chain (DIC), or anti-FAK antibodies (Figure 2A). We also observed that the co-immunoprecipitation of dynein with paxillin decreases markedly in MEF FAK$^{-/-}$, suggesting that FAK regulates the interaction between dynein and paxillin. To verify whether the S732A mutation affects the interaction between FAK and dynein in MEFs, endogenous DIC was co-immunoprecipitated in cells expressing either FAK S732A-EGFP or FAK-EGFP. As expected, we observed that the S732A mutation induces a significant 50% decrease of the interaction of FAK with dynein in mouse fibroblasts (Figures 2B and 2C). Together, these results suggest that the regulation of FAK interaction with dynein is required for proper Golgi positioning.

Figure 2 | Dynein co-immunoprecipitates with FAK and paxillin in MEFs and the association of Dynein with FAK is required for proper polarisation

(**A**) The upper three panels are representative western blots showing co-immunoprecipitation experiments using wt and FAK$^{-/-}$ cell extracts. Antibodies used for immunoprecipitation are indicated on the left side of the figure (IP), and antibodies used to reveal the western blot are indicated on the right side (IB). The lower three panels are western blots probing for the different proteins studied in the cell extracts used for the immunoprecipitations. (**B**) Representative FAK immunoprecipitation using FAK$^{-/-}$ cell extracts expressing either FAK-EGFP or FAK S732A-EGFP and probed by either FAK or DIC. (**C**) Quantification of the level of dynein co-immunoprecipitating with FAK S732A-EGFP (0.56 ± 0.12) normalised on FAK-EGFP. Values are from 3 independent experiments.



FAK regulates the enrichment of dynein as well as other cell polarisation markers at the leading edge of migrating fibroblasts

Traction forces from the cell cortex exerted by dynein were proposed to be responsible for centrosome positioning in migrating mouse fibroblasts (Dujardin et al., 2003; Schmoranzer et al., 2009). As dynein was shown to be enriched at the leading edge of fibroblasts (Dujardin et al., 2003), we tested whether FAK affects the localisation of dynein during migration. To do so, we performed immunofluorescence experiments to compare the localisation of dynein in cells expressing FAK or not (Figure 3A). Measuring the ratio between the mean dynein signal at the leading edge and the mean dynein signal in the whole cell reveals an approximately two-fold enrichment of dynein at the leading edge in wt MEFs (2.2 ± 0.6, $n = 30$), that is lost in FAK$^{-/-}$ cells (1.1 ± 0.2, $n = 30$; Figure 3B). This result, along with the important decrease of the proportion of cells displaying dynein enrichment at the leading edge in FAK$^{-/-}$ cells (5.5 ± 1.9%, $n = 300$) compared to wt MEFs (68.2 ± 2.4%, $n = 300$; Figure 3C), clearly show that FAK is required for dynein enrichment at the leading edge as visualised by both standard (EPI) or TIRF microscopy. This suggests that FAK regulates the localisation of dynein during cell migration and polarisation. FAK removal did not affect the amount of the motor in cell extracts (Figure S1F) indicating that the absence of dynein at the leading edge of FAK$^{-/-}$ cell is not due to a downregulation of dynein synthesis.

Dynein is also required for centrosome polarisation in astrocytes where its interaction with microtubules at the protrusion of migrating cells depends on its association with GKAP (guanylate kinase-associated protein) protein (Elric and Etienne-Manneville, 2014; Manneville et al., 2010). In this cell type, the APC (adenomatous polyposis coli) tumour suppressor also affects centrosome orientation and could act as another microtubule anchoring system at the cell leading edge (Etienne-Manneville et al., 2005). However, APC was showed to affect only microtubule stabilisation in mouse fibroblasts (Wen et al., 2004). To determine whether FAK also affects the localisation of these proteins, we performed immunofluorescence experiments to detect APC and GKAP proteins. Our results show that APC and GKAP are enriched at the leading edge of migrating fibroblasts as compared to whole cells (Figure 3A). The analysis of this phenotype revealed that 80.9 ± 4.2% and 85.7 ± 13.4% of wt MEF are enriched in APC and GKAP, respectively, ($n \geq 300$ randomly chosen cells for each condition). These values dropped to 10 ± 2.6% and 13.4% in FAK$^{-/-}$ cells (Figure 3C). These enrichments are mostly visible using TIRF microscopy indicating that they are mainly located at the base of cells. Moreover, precise measurement of the ratio between the mean APC or GKAP signals at the leading edge and the mean APC or GKAP signals in whole wt MEFs reveals an approximately two-fold enrichment of APC (2.6 ± 0.8) and GKAP (2.2 ± 0.6) at the leading

© 2019 Société Française des Microscopies and Société de Biologie Cellulaire de France. Published by John Wiley & Sons Ltd

Figure 3 | See Legend on next page

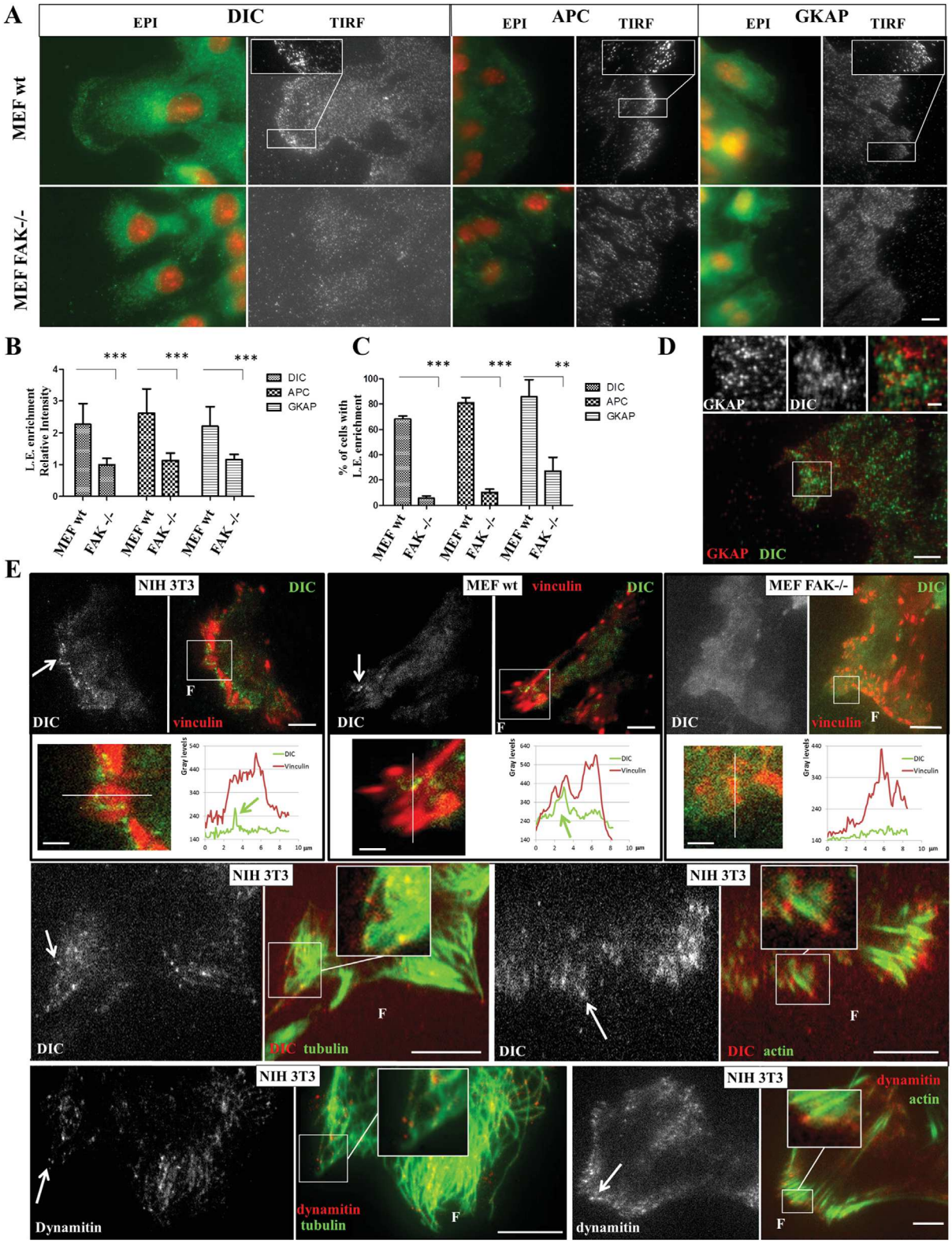


Figure 3 | FAK is required for proper enrichment of dynein, APC and GKAP at the leading edge of migrating cells
(**A**) Confluent MEF wt and MEF FAK$^{-/-}$ cells were fixed 3 h after wounding using methanol (dynein), or paraformaldehyde (APC and GKAP) fixation, followed by an immunostaining and imaged via either standard (EPI) or TIRF microscopy. Immunostainings using DIC, APC or GKAP directed antibodies reveal an enrichment of the proteins at the leading edge (arrows). This enrichment is reduced in FAK$^{-/-}$ cells. Scale bar: 10 μm. (**B**) Quantification of the relative enrichment of dynein, APC and GKAP at cell leading edge. The mean signal intensities, corrected from background, were measured at leading edge cell protrusions and in the whole cell to calculate a ratio. (**C**) Quantification of the percentage of cells displaying enrichment of dynein, APC and GKAP proteins at the leading edge. (**D**) wt MEFs were immunostained for GKAP (red) and DIC (green). Scale bar: 5 μm. Upper panels are magnified views of the indicated region of interest (Scale bar: 1 μm). (**E**) Cells co-expressing low levels (10 % population displaying the lowest expression level of dynamitin-EGFP among all expressing cells) of EGFP tagged versions of DIC or dynamitin, and mCherry tagged vinculin, were imaged within 3h after wounding. DIC enrichment at the leading edge (top row, arrows and boxed region of interest) was observed in 90 % of NIH 3T3 ($n = 15$) or wt MEF ($n = 14$) cells, but not in FAK$^{-/-}$ cells (n = 20). Scale bars: 10 μm. Magnified views of the regions of interest (Scale bars: 2 μm) are also presented, along with a line intensity profile quantification (white line in magnified views). Green arrows represent dynein spots present at the level of focal adhesions. Cells of the two bottom rows were transfected only by EGFP tagged versions of DIC or dynamitin and were fixed 3 h after wounding using paraformaldehyde/glutaraldehyde fixation followed by tubulin immunostaining or actin (phalloidin) staining; Scale bars: 5 μm.

edge (Figure 3B, $n = 30$). As for dynein, these enrichments are strongly inhibited in FAK$^{-/-}$ MEFs (APC: 1.1 ± 0.2; GKAP: 1.2 ± 0.2), with no effect on APC and GKAP synthesis (Figure S1F). The modification of the distribution of APC in FAK$^{-/-}$ fibroblast is consistent with the decreased stabilisation of microtubules monitored in the same cell type (Palazzo et al., 2004). However, performing co-immunostaining experiments for GKAP and dynein intermediate chain, no obvious co-localisation between the two proteins were detected. Indeed, they appeared to be enriched at different sub-locations of the cells leading edges (Figure 3D). Thus, it remains uncertain whether GKAP and dynein are part of a complex in mouse fibroblasts, as proposed in astrocytes (Manneville et al., 2010; Melkonian et al., 2007). To analyse dynein enrichment at the leading edge of living cells, we co-expressed EGFP and mCherry tagged versions of DIC and the focal adhesion marker vinculin in mouse fibroblasts. Cells co-expressing DIC and vinculin and located at the wound edge were monitored by TIRF microscopy within 3 h after wounding. Time laps sequences reveal an enrichment of dynein spots at the front of cells in 90% of NIH 3T3 ($n = 15$) or wt MEFs ($n = 14$) cells (Figure 3E top rows, white and green arrows), consistent with the enrichment of the motor observed by immunofluorescence. The spots appeared very dynamic and persisted only several seconds (Movie S2). Consistent with our previous results, such enrichment was not observed in FAK$^{-/-}$ cells ($n = 20$, Figure 3E and Movie S3). Moreover, immunofluorescence experiments indicate that 85% of EGFP spots associate with microtubules in FAK expressing fibroblasts (Figure 3E middle left row, arrows, $n = 250$ spots from 13 cells), which is consistent with previously reported co-localisation of dynein with microtubules (Dujardin et al., 2003). Also, 97% of the spots appeared to be present at the extremity of actin stress fibers possibly ending in focal adhesions (Figure 3E middle right row, see arrows, $n = 275$ spots from nine cells). However, no clear colocalisation between dynein and focal adhesion was previously detected in fixed fibroblasts (Dujardin et al., 2003). On the other hand, overexpressed p62 subunit of dynactin or dynein intermediate chain 2 were detected at focal adhesions in COS7 and NRK cells (Garces et al., 1999; Rosse et al., 2012), and our experiments in living cells show DIC spots localised on, or in close proximity to focal adhesions (Figure 3E, top row and associated magnified inserts and line intensity profile measurement). This suggests that the association of dynein with FAK may be transient. To test this hypothesis, we performed TIRF video microscopy on cells co-expressing mCherry tagged vinculin, and low levels of EGFP tagged dynamitin, a subunit of the dynein cofactor dynactin that co-localises with dynein at the leading edge (Dujardin et al., 2003) and is required for cell polarisation (Palazzo et al., 2001). The distribution of dynamitin resembles that of dynein, with >94% of the spots associated with microtubules (Figure 3E bottom left row; $n = 375$ spots from 30 FAK expressing cells),

© 2019 Société Française des Microscopies and Société de Biologie Cellulaire de France. Published by John Wiley & Sons Ltd

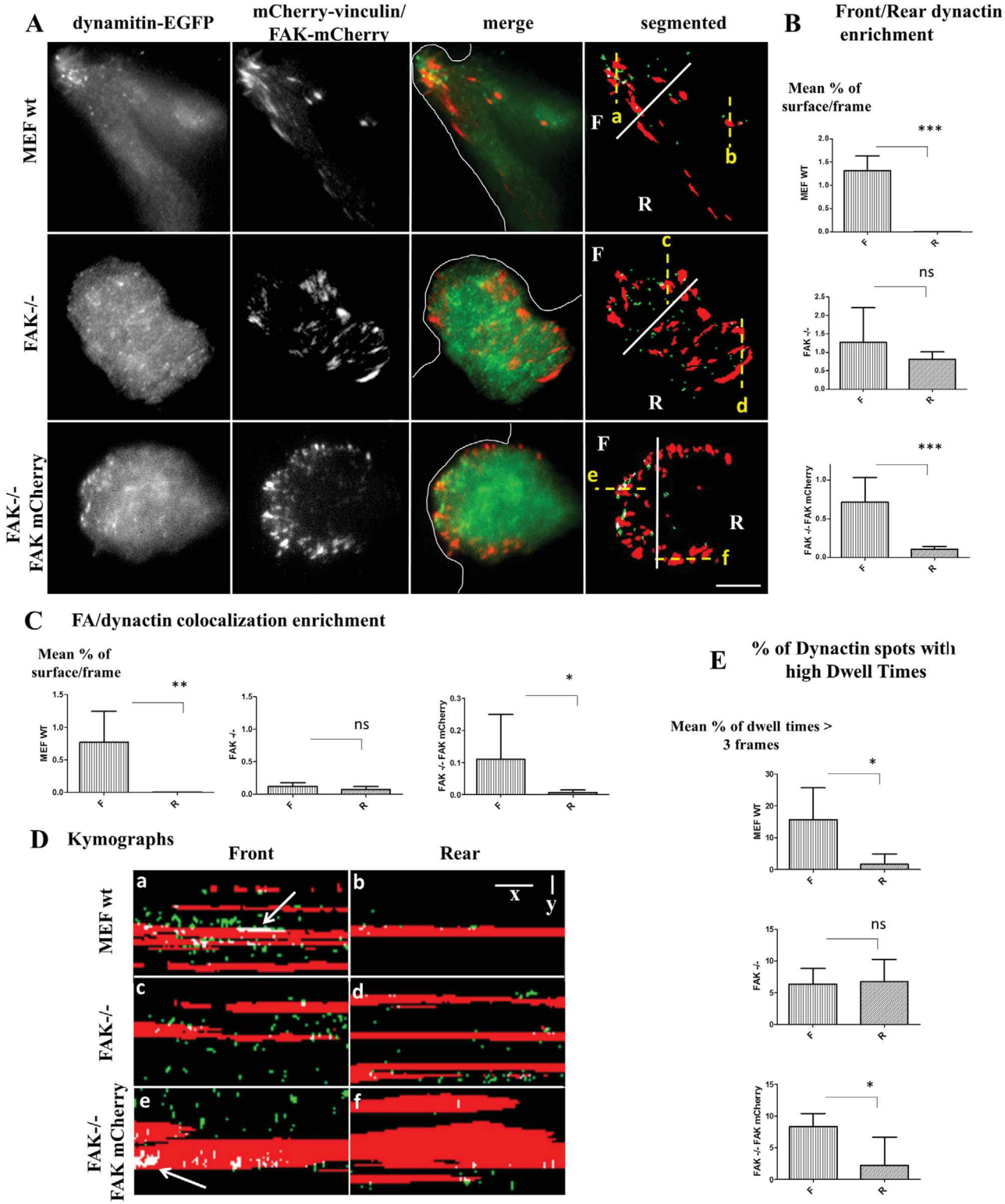
and 90% of the spots associated with the extremity of stress fibres (Figure 3E bottom right row; $n = 111$ spots from 17 cells). As for dynein, a clear enrichment of dynactin spots at the front of 95% of living cells was observed ($n > 50$ cells, Figure 4A upper panels). These spots appeared very dynamic and persisted only several seconds (Movie S4). The distribution of the dynactin spots changed markedly in FAK$^{-/-}$ MEFs, where no enrichment at the front of these cells was detected (Figure 4A lower panels, Movie S5). Quantification of the percentage of cell base surface displaying dynamitin staining at the front or the rear of cells, reveals a strong and statistically significant enrichment of dynactin at the front of living migrating cells that is lost in FAK$^{-/-}$ MEFs (Figure 4B). These results are consistent with a role for FAK in regulating a polarised distribution of dynein and its cofactors at the front of migrating cells. To determine whether this enrichment is localised at focal adhesions, we next analysed the percentage of cell base surface where the dynactin signal co-localises with vinculin at the front or at the rear of cells. Figure 4C shows a strong and significant enrichment of dynactin co-localisation with focal adhesions at the front of MEFs that is lost in FAK$^{-/-}$ MEFs. This suggests that FAK is required to locally increase the frequency of transient associations between dynactin and focal adhesions. To further investigate this aspect, we measured the persistence or "dwell time" of co-localising spots. Kymographs clearly show longer stretches of co-localising signal at the front of wt MEFs (Figure 4D white lines and arrow) that are less frequent at the rear (Figure 4E). Again, this front/rear asymmetric behaviour is lost in FAK$^{-/-}$ MEFs. On the other hand, expressing FAK-mCherry in FAK$^{-/-}$ MEFs led to a rescue of the Front/Rear asymmetry (Figure 4B–E and Movie S6). Together, our results show a new role for FAK in regulating the front/rear asymmetry of co-localisation and dwell time of dynactin clusters at focal adhesions, and are consistent with FAK regulation of dynein functions at frontal focal adhesions.

FAK and dynein regulate Golgi positioning independently of nuclear behaviour

The position of the centrosome and associated Golgi apparatus in front of the nucleus can theoretically result from the intracellular motion of the centrosome and/or the displacement of the nucleus itself. Indeed, in non-migrating mouse fibroblasts induced to polarise by lysophosphatidic acid, an actin- and nesprin2G/SUN2-dependent rearward nucleus movement responsible for the orientation of the centrosome was observed (Gomes et al., 2005; Luxton et al., 2010). These observations highlighted an initial nuclear-dependent polarisation event that occurs before the onset of migration. Nuclear rotation events were also proposed to promote Golgi polarisation toward the front of cells (Maninova et al., 2013). We then explored whether Golgi motion is linked to these different nuclear behaviours in migrating fibroblasts, and whether FAK is involved in their regulation. For this purpose, we tracked both the Golgi apparatus and the nucleus in living cells during polarisation. Confluent fibroblasts expressing, or not, FAK constructs along with fluorescent Golgi markers were wounded, and non-polarised cells at the migratory front were monitored by time lapse microcopy within 30 min after wounding.

We observed that in most FAK expressing cells, the nucleus is already positioned at or close to the rear of cells at the beginning of the monitoring, and that complete Golgi polarisation takes place subsequently, as illustrated in Figure 5A (upper panel; Movie S7). This observation confirms that the nuclear rearward motion is an early process, but it also indicates that it is not sufficient to achieve proper Golgi polarisation in migrating fibroblasts. To evaluate the evolution of the position of the nucleus, we recorded the coordinates of the cell rear and cell front as well as the coordinates of nucleus centroid (Figure 5A). This allowed calculating the position of the nucleus as a percentage of total cell length (0 to 100% representing the back and the front, respectively) before and after polarisation. This quantification shows a limited but reproducible mean nuclear rearward displacement of approximatively 10% of cell length in NIH3T3, wt MEFs, or FAK-EGFP expressing cells (Figure 5B). In FAK$^{-/-}$ cells, this movement is inhibited and nuclei are allowed to move forward during cell protrusion toward the wound ($2.17 \pm 13.4\%$; Figure 5A and associated Movie S8, Figure 5B). This indicates that FAK is required for proper nuclear positioning. Interestingly, this positioning is independent of FAK interaction with dynein. Indeed, the rearward positioning of the nucleus is not altered in FAK S732A-EGFP expressing cells (Figures 5A and 5B, and associated Movie S9). Monitoring the position of the Golgi apparatus

Figure 4 | See Legend on next page



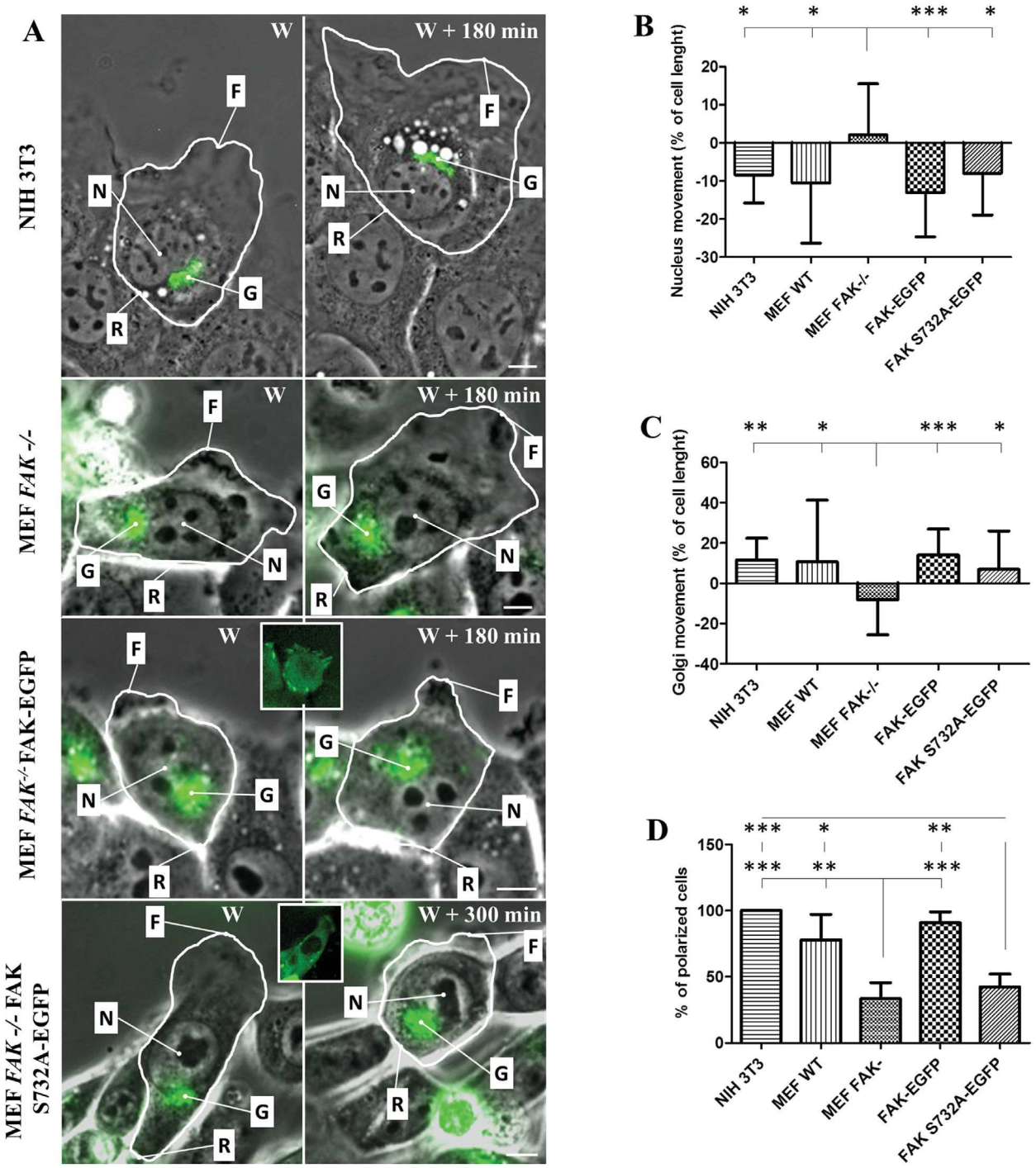
© 2019 Société Française des Microscopies and Société de Biologie Cellulaire de France. Published by John Wiley & Sons Ltd

Figure 4 | FAK regulates the dynamics of dynactin co-localisation with focal adhesions
Two to three hours after wounding, MEFs coexpressing dynamitin-EGFP and mCherry-vinculin or FAK-mCherry were monitored using time-lapse video TIRF microscopy every 6 s during 10 min (100 frames). For quantifications, the mean values from the 100 frames were calculated for five to seven representative cells. (**A**) Representative images showing the distribution of dynamitin (green) and vinculin (red) in living wt (upper panels), $FAK^{-/-}$ (middle panels), or FAK-mCherry expressing $FAK^{-/-}$ MEFs are represented. The right panels show co-localisation (white areas) between dynamitin and vinculin or FAK-mCherry. The white line represents the separation between the front (F, front one-third of total cell length) and the rear (R) of cells used for sub-region analysis, and the thin white curve represents the edge of the wound. Dashed yellow lines represent the zones selected for the kymographs. Scale bar: 5 μm. (**B**) Quantification of the mean percentage of sub-region surface (front or rear) displaying dynamitin positive signal per frame on wt (F: 1.31 ± 0.77 %; R: 0.005 ± 0.006 %), $FAK^{-/-}$ (F: 1.27 ± 0.93 %; R: 0.82 ± 0.44 %) or FAK-mCherry expressing $FAK^{-/-}$ MEFs (F: 0.71 ± 0.31%; R: 0.11 ± 0.09%). The enrichment of dynamitin is statistically significant between the front and the rear of only wt MEFs and $FAK^{-/-}$ cells expressing FAK-mCherry. (**C**) Quantification of the mean percentage of sub-region surface (front or rear) having both dynamitin and vinculin positive signal per frame on wt MEFs (F: 0.77 ± 0.48 %; R: 0.004 ± 0.003 %), $FAK^{-/-}$ (F: 0.12 ± 0.07 %; R: 0.07 ± 0.05 %) or FAK-mCherry expressing $FAK^{-/-}$ MEFs (F: 0.11 ± 0.13 %; R: 0.007 ± 0.007 %). The enrichment of co-localisation is statistically significant between the front and the rear of only wt MEFs and $FAK^{-/-}$ cells expressing FAK-mCherry. (**D**) Kymographs displaying the evolution of segmented signal (green: dynamitin; red: vinculin or FAK-mCherry, white: co-localisation) along the yellow dashed lines (a– f) drawn in panel (A) over time. Spots are indicative of the dynamic nature of dynamitin signal, and white lines are indicative of longer dwell times. These lines are clearly visible at the front of wt and FAK-mCherry expressing $FAK^{-/-}$ MEFs (arrows). Scale bar x axis (time): 2 min; Scale bar y axis: 1 μm. (**E**) Quantification of the mean percentage of dwell times superior to 3 frames (12 s) of colocalizing signals at the front or rear of wt (F: 15.64 ± 10%; R: 1.63 ± 3.24%),$FAK^{-/-}$ (F: 6.37 ± 2.46%; R: 6.73 ± 3.52 %) or FAK-mCherry expressing $FAK^{-/-}$ MEFs (F: 8.3 ± 2.08%; R: 2.2 ± 4.42%). Longer dwell times enrichment is statistically significant between the front and the rear of only wt MEFs and $FAK^{-/-}$ cells expressing FAK-mCherry.

in the same cells (Figure 5A) reveals a frontward movement in opposite direction of the nuclei in FAK expressing cells (approximately 10% of cell length, Figure 5C). Consistent with our results on fixed cells, the movement of the Golgi toward the front of cells is inhibited in $FAK^{-/-}$ cells with a rather rearward displacement (−8.1 ± 17.4%). However, FAK S732A-EGFP expressing cells displayed a very limited frontward displacement (6.7 ± 19.1%) not significantly different from FAK expressing cells, suggesting the Golgi is able to move frontward when FAK interaction with dynein is downregulated. Nevertheless, analysing the percentages of polarising cells using the same dataset indicates a defect in Golgi polarisation in FAK S732A-EGFP expressing cells (Figure 5D), as observed in fixed cells (Figure 1). These results suggest that other types of displacement, such as rotational events around the nucleus, may be necessary to fully polarise the Golgi.

We next evaluated the occurrence of Nuclear Rotations (NRs) in our cell models. Nucleoli observed by phase contrast microscopy were used as intranuclear markers to monitor NRs that were frequently observed during the migration process (Figure 6A, Movie S10). Quantifying the percentage of cells displaying NR events during the time frame of the experiment revealed that 44% to 62% of FAK expressing cells displayed such behaviours. This frequency is significantly decreased in $FAK^{-/-}$ cells (Movie S8), but not in FAK S732A-EGFP expressing cells compared to wt MEFs and FAK-EGFP control cells, indicating that FAK, but not its interaction with dynein, is required for NR (Figure 6B, see also Movies S11 and S12 for respectively FAK-EGFP and FAK S732A-EGFP expressing cells). To evaluate the contribution of NR events to the positioning of the Golgi apparatus, we monitored changes in Golgi orientation (Figure 7A red arrows) relative to NR events (yellow arrows) in the same dataset. Time-course analysis of both nucleus and Golgi angle revealed that persistent Golgi rotation events (superior to 10° and lasting more than three frames) were either accompanied with simultaneous rotation of the nucleus in the same direction (Figure 7A) or occurred completely independently of NR (Figure 8A). Quantification of these events has shown that Golgi polarisation occurs simultaneously to nuclear rotation in 40% to 50% of the cells expressing FAK or FAK-EGFP (Figure 7A, see also corresponding Movies S10 and S11). Consistent with previous

Figure 5 | See Legend on next page



results showing that FAK is required for NR, the removal of FAK significantly decreases the frequency of NR-linked polarisation (Figure 7, Movie S8). Interestingly, our results show that downregulating the interaction of dynein with FAK via the expression of FAK S732A-EGFP does not affect the polarisation associated with NR (Figures 7A and 7B, Movie S12). Most interestingly, Golgi polarisation was observed

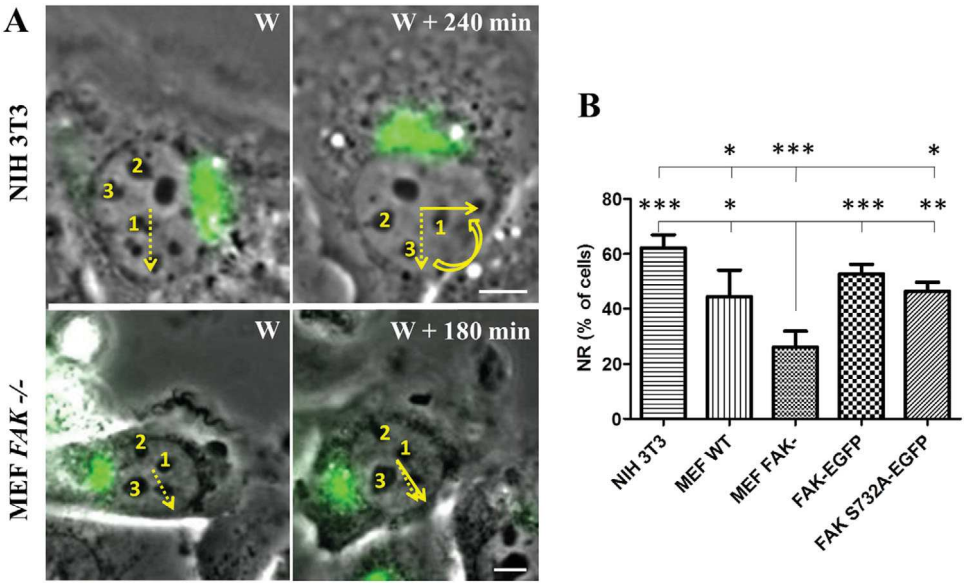
© 2019 Société Française des Microscopies and Société de Biologie Cellulaire de France. Published by John Wiley & Sons Ltd

Figure 5 | Contribution of nucleus rearward movement to Golgi polarisation in living mouse fibroblasts

Confluent monolayers of cells expressing either NAGFP or mCherry-GT and FAK-EGFP or FAK S732A-EGFP were wounded, and non-already polarised cells at the front were monitored to visualise phase contrast and fluorescent Golgi signal. The time lapse microcopy sequence started within 30 min after wounding, and was performed during 5 hours with one picture every 5 minutes (MEFs) or 10 minutes (NIH3T3). Shown results for the following figures were obtained from 3 to 4 independent experiments analyzing 24 (NIH3T3), 17 (wt MEFs), 32 (FAK$^{-/-}$), 33 (FAK S732A-EGFP), and 47 (FAK-EGFP) cells. (**A**) Measurement of the positions of the cell front (F), the cell rear (R), as well as the centroid of the nucleus (N) and the Golgi (G) before and after polarisation. (**B**) Quantification of nucleus displacement during polarisation as a percentage of total cell length for NIH 3T3 (−8.3 ± 7.4 %), wt MEFs (−10.5 ± 15.7%), MEFs expressing FAK-EGFP (−13.0 ± 11.6%) or FAK S732A-EGFP (−7.9 ± 10.9%), or FAK$^{-/-}$ cells (2.17 ± 13.4%). (**C**) Quantification of Golgi displacement during polarisation as a percentage of total cell length for NIH 3T3 (11.6 ± 10.8%), wt MEFs (10.6 ± 30.7%), MEFs expressing FAK-EGFP (14.1± 12.8%) or FAK S732A-EGFP (6.7 ± 19.1%), or FAK$^{-/-}$ cells (−8.1 ± 17.4%). (**D**) Percentage of cells that succeeded in orienting their Golgi toward the migratory front within the time frame of the video. A significant decrease in the frequency of orientation is visible for FAK$^{-/-}$ and cells expressing FAK S732A-EGFP (respectively 33.4 ± 12.1%, and 42.2 ± 9.7%) compared to NIH 3T3 (100 ± 0%), wt MEF (77.8 ± 19.2), and FAK$^{-/-}$ expressing FAK-EGFP (90.8 ± 8.3%). All combinations of comparison were tested via ANOVA, and only statistically significant differences are depicted. Scale bars: 5 μm.

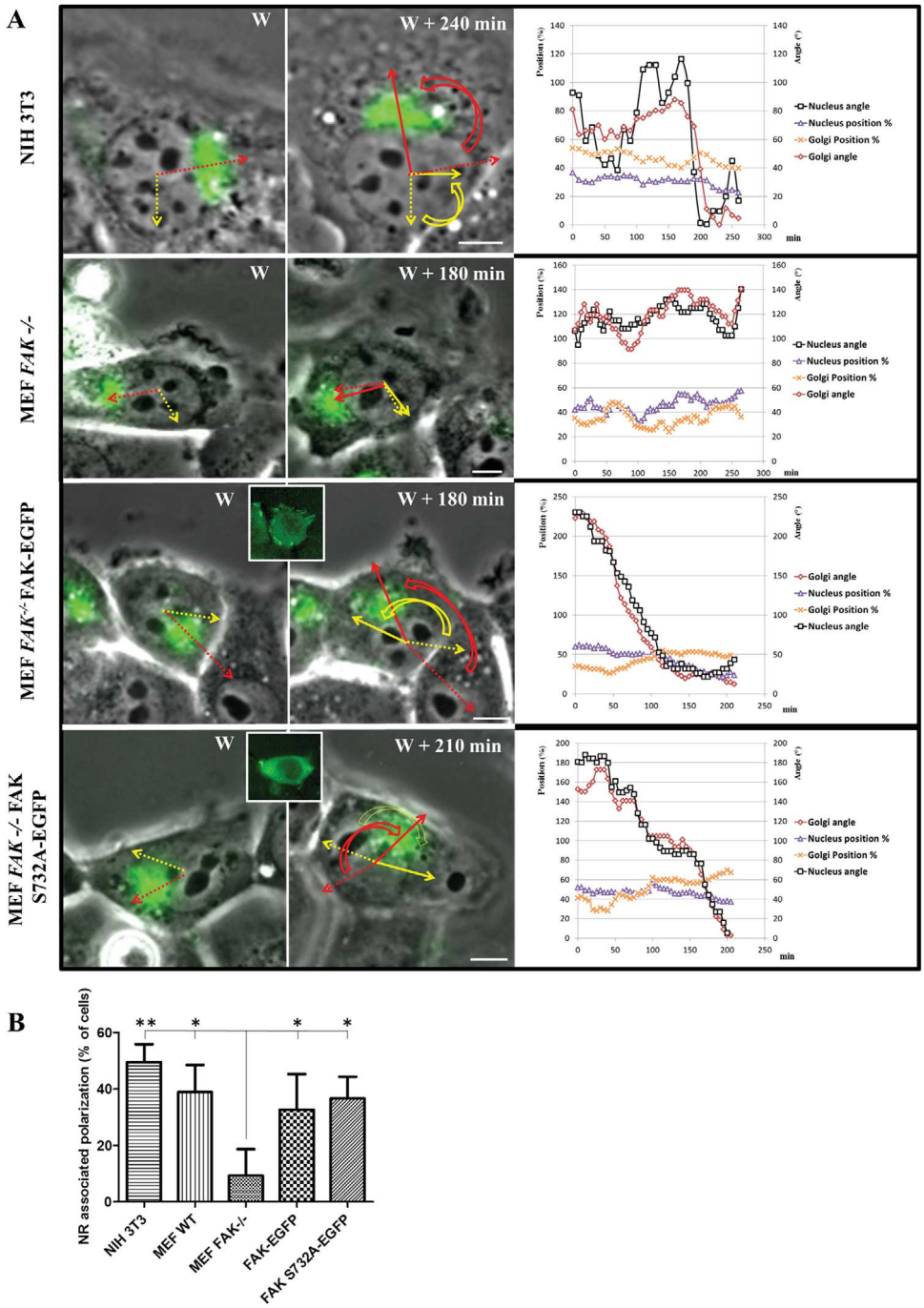
Figure 6 | Measurement of nucleus rotation events

(**A**) NRs were monitored using nucleoli as nucleus orientation markers (yellow numbers) allowing to draw an initial axis (yellow dotted arrows) and their subsequent evolution (yellow plain arrow). NR events were defined as persistent changes in the orientation of the nucleolus during at least three consecutive frames with a final amplitude superior to 10°. Scale bars: 5 μm. (**B**) Percentage of cells that displayed NR during the time frame of the video. FAK$^{-/-}$ MEFs have significantly reduced frequencies of NR (26.2 ± 5.7%) compared to NIH 3T3 (62.1 ± 4.8%), wt MEFs (44.4 ± 9.6%), and MEFs expressing FAK-EGFP (52.8 ± 3.4%) or FAK S732A-EGFP (46.4 ± 3.2%). The same times laps recordings and cell numbers as Figure 5 were used for this analysis. All combinations of comparison were tested via ANOVA, and only statistically significant differences are depicted.



to occur independently of NR in approximately 50% of FAK expressing cells (Figures 8A and 8B, compare the amplitudes of red and yellow arrows as well as the independent evolution of Golgi and nucleus angles; see also corresponding Movies S7 and S13 for respectively NIH 3T3 and FAK-EGFP expressing MEFs). FAK is required for NR-independent orientation of the Golgi as indicated by the significant

Figure 7 | See Legend on next page



decrease of its frequency in FAK$^{-/-}$ cells (Figure 8B, see Figure 7A, Movie S8, for typical behaviour illustration). Moreover, FAK S732A-EGFP expressing cells also displayed a strong inhibition of NR independent frequencies (Figure 8B), and Golgi orientations were almost seen uniquely associated with NR (Figure 7A, Movie S12). Our observations thus indicate that the regulation of FAK association with dynein is required for the positioning of the Golgi apparatus independently of nuclear motility.

© 2019 Société Française des Microscopies and Société de Biologie Cellulaire de France. Published by John Wiley & Sons Ltd

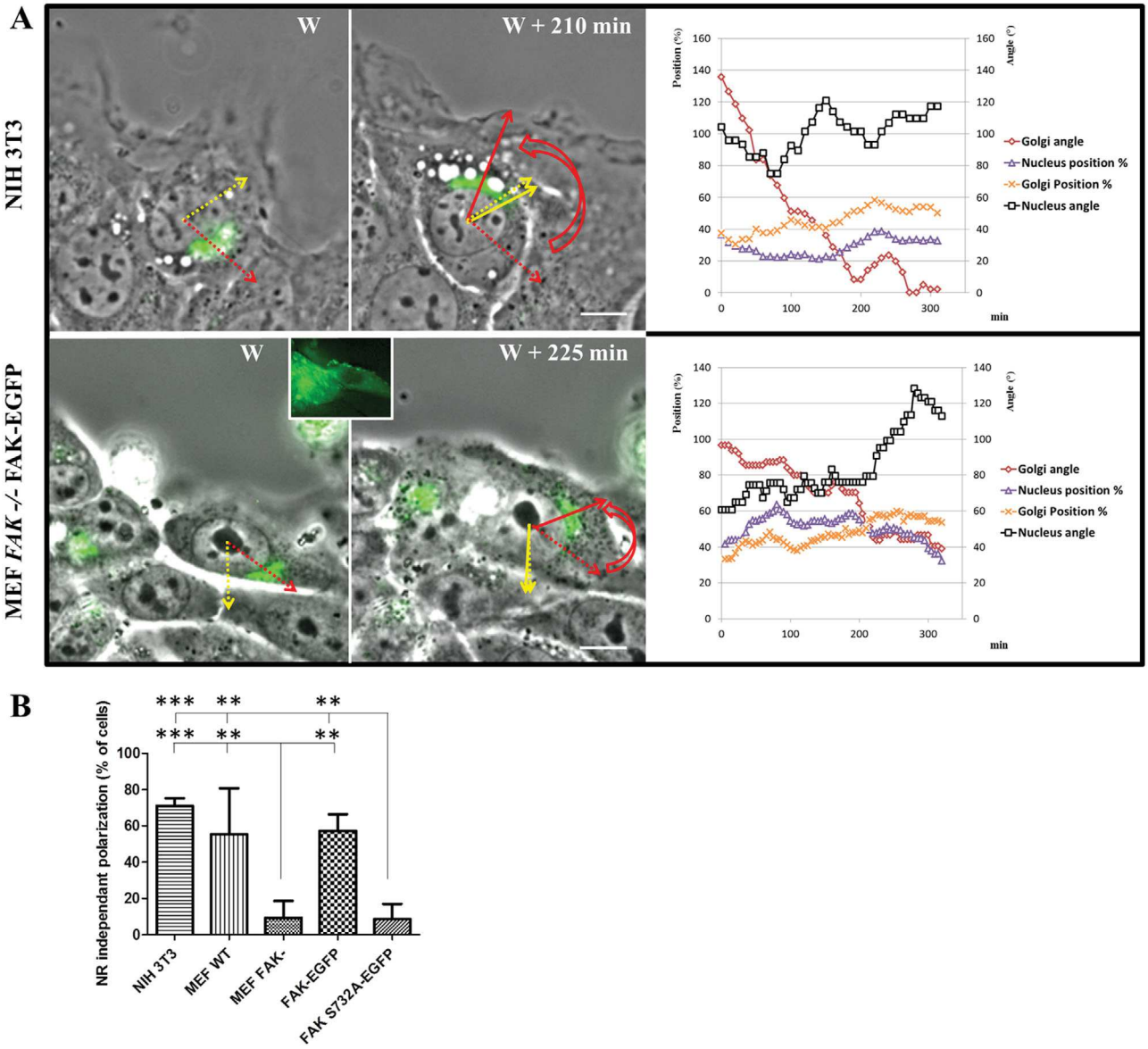
Figure 7 | FAK but not its interaction with dynein, is required for NR associated Golgi orientation
(**A**) Representative behavior of FAK-EGFP or FAK S732A-EGFP expressing FAK$^{-/-}$ cells displaying nuclear rotation associated Golgi orientation. Golgi orientation relative to the nucleus was monitored by following the evolution of the axis between the nucleus and the Golgi before (red doted axis) and after (red plain arrow) polarisation. Green inserts show the expression of the FAK construct in the monitored cells. Scale bars: 5 μm. A graphical representation displaying the time course measurements of the polarisation angles of the nucleus (black curve) and the Golgi (red curve), as well as the positioning of the nucleus (blue curve) and the Golgi (yellow curve) as a percentages of total cell length, is shown for each illustrated cell. (**B**) Percentage of cells that displayed Golgi orientation associated to NR during the time frame of the video. FAK$^{-/-}$ MEFs have significantly reduced frequencies of these events (9.3 ± 9.3%) compared to NIH 3T3 (49.5 ± 6.3%), wt MEFs (38.9 ± 9.6%), and MEFs expressing FAK-EGFP (32.7 ± 12.5%) or FAK S732A-EGFP (36.7 ± 7.6%). The same times laps recordings and cell numbers as Figure 5 were used for this analysis. All combinations of comparison were tested via ANOVA, and only statistically significant differences are depicted.

Discussion

The positioning of the centrosome, and thus most of the microtubule network, in front of the nucleus, was proposed to enhance cell migration by facilitating polarised membrane trafficking with the leading edge (Etienne-Manneville, 2013; Luxton and Gundersen, 2011). This asymmetric distribution of microtubules also polarises Rho and Rac GTPase signalling (Krendel et al., 2002; Waterman-Storer et al., 1999), which regulates cell protrusion and cell adhesion. Microtubules interaction with focal adhesion was already shown to regulate microtubules dynamics (Efimov et al., 2008; Small and Kaverina, 2003), as well as focal adhesion disassembly (Ezratty et al., 2005; Kaverina et al., 1999; Stehbens and Wittmann, 2012). Here, we show that FAK regulates the orientation of the centrosome and associated Golgi apparatus in mouse fibroblasts as well as the polarised enrichment of dynein and dynactin at the leading edge. Moreover, IP experiments show that FAK and paxillin interact with dynein in mouse fibroblasts, consistent with the interaction between dynein intermediate chain 2, paxillin, and FAK reported in mouse endothelial and NRK cells (Park et al., 2009; Rosse et al., 2012). These results indicate that focal adhesions could provide anchoring sites for dynein to exert traction forces on microtubules resulting in forward centrosome positioning relative to the nucleus. In agreement with this hypothesis, downregulating the interaction between dynein and FAK, by preventing its phosphorylation on residue 732 (Park et al., 2009), impaired Golgi polarisation. We observed that this mutation did not abolish completely the interaction between FAK and dynein. This suggests that this interaction may not rely only the S732 residue, and could also be indirect involving other proteins. Consistent with this hypothesis, we observed that dynein also co-immunoprecipitates with paxillin. The restriction of FAK S732 phosphorylation to a subset of focal adhesions at the leading edge could be a possible way to upregulate dynein-based pulling forces on the microtubules at the front of cells. Indeed, inhibiting the formation and function of the FAK/RACK1/PDE4D complex was shown to prevent nascent adhesions stabilisation as well as Golgi polarisation (Serrels et al., 2011; Serrels et al., 2010). Moreover, we were able to highlight a dynamic and FAK dependent concentration of EGFP-tagged dynein and dynactin spots at focal adhesions located at the front of migrating cells. These structures appeared to co-distribute with microtubules, consistent with previously reported co-localisation using immunofluorescence on endogenous proteins in fibroblasts (Dujardin et al., 2003) and astrocytes (Manneville et al., 2010). However, in astrocytes, dynein was shown to be responsible for the bending of microtubules toward the cell base at a location behind the focal adhesion–rich adhesive region (Manneville et al., 2010). This observation differs from the distribution of dynein we observed in fibroblasts and may represent mechanistic differences between astrocytes and fibroblasts. In our cell model, the increased attractiveness and dwell time of dynactin at cell front focal adhesions could reflect an enrichment of dynein traction activity on microtubules capable of moving the centrosome ahead. Thus, a picture emerges where FAK appears to be an essential mediator of the polarisation process via both formation and stabilisation of nascent adhesions (Deramaudt et al., 2011; Serrels et al., 2011), which then could serve as anchor points to promote dynein-dependent

Figure 8 | FAK interaction with dynein is required for NR independent orientation of the Golgi

(**A**) Representative behaviour of cells displaying Golgi orientation that are independent of NR events (NIH 3T3, FAK-EGFP). Scale bars: 5 μm. A graphical representation displaying the time course measurements of the polarisation angles of the nucleus (black curve) and the Golgi (red curve), as well as the positioning of the nucleus (blue curve) and the Golgi (yellow curve) as a percentages of total cell length, is shown for each illustrated cell. (**B**) Percentage of cells that displayed Golgi orientation independently of NR during the time frame of the video. FAK$^{-/-}$ and FAK S732A-EGFP expressing MEFs have significantly reduced frequencies of orientation (respectively 9.3 ± 9.3% and 8.6 ± 8.3%) compared to NIH 3T3 (71 ± 4.2%), wt MEFs (55.4 ± 25.3%) and MEFs expressing FAK-EGFP (57.3 ± 9.1%). The same times laps recordings and cell numbers as Figure 5 were used for this analysis. All combinations of comparison were tested via ANOVA, and only statistically significant differences are depicted.



© 2019 Société Française des Microscopies and Société de Biologie Cellulaire de France. Published by John Wiley & Sons Ltd

centrosome orientation. Both the FAK dependent behaviour of dynein at focal adhesion, and the coimmunoprecipitation between dynein and FAK and paxillin, points to focal adhesions as obvious candidates to anchor dynein. However, we cannot rule out that other cortical structures could also be involved in the polarisation of the centrosome. Indeed, the positioning of the centrosome inside the cell is expected to be influenced by several dynein pulling forces acting in opposite directions. Nuclear envelope associated dynein would act to keep the centrosome close to the nucleus (Robinson et al., 1999; Zhang et al., 2009). Meanwhile, dynein forces from cell to cell contact sites located at the rear of cells during a wound healing assay would also bias centrosome positioning to the rear (Schmoranzer et al., 2009). Thus, the regulation of the association of dynein with cell front focal adhesions via FAK could provide the fibroblasts with a tuneable mechanism to adjust centrosome and Golgi central positioning during migration.

Nuclear rotation events, leading to the alignment of the longer nuclear axis with the direction of migration, have been proposed to promote also centrosome orientation (Luxton and Gundersen, 2011; Maninova et al., 2014). Indeed, in mouse fibroblasts subjected to mechanical shear stress, both nucleus rotation and centrosome orientation are controlled via Cdc42 (Lee et al., 2005), and both depend on the molecular motor dynein in wound healing assays (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Levy and Holzbaur, 2008; Palazzo et al., 2001). Moreover, interfering with the connection between the cell cytoskeleton and the nuclear lamina resulted in both nuclear as well as centrosome disorientation (Houben et al., 2009; Lee et al., 2007; Luxton et al., 2010; Maninova et al., 2013; Osorio and Gomes, 2014). These results, together with our observations indicating that nuclear and Golgi orientation take place simultaneously, are strongly in favour of non-coincidental orientation events. Centrosome orientation and nuclear rotation were both shown to depend on FAK kinase activity and its substrate p190RhoGAP (Maninova et al., 2013; Tomar et al., 2009) supporting the idea of a common mechanism linking both phenomena. Consistent with that, we report here that $FAK^{-/-}$ cells display lower frequencies of NRs than FAK expressing cells, a phenotype that can be rescued by transfecting cells with FAK-EGFP. Interestingly, normal NR frequencies are also rescued after transfecting $FAK^{-/-}$ fibroblasts with the FAK S732A construct, suggesting that FAK interaction with dynein is not essential for NR. This correlates well with the fact that NR was reported to be independent of dynactin localisation at the leading edge (Levy and Holzbaur, 2008), and suggest that other anchoring points, such as nuclear envelope or cell–cell contact cortical sites (Burakov and Nadezhdina, 2013; Schmoranzer et al., 2009), could allow dynein to power NR. The requirement of an intact connection between the nuclear lamina and the cell cytoskeleton for proper centrosome positioning (Maninova et al., 2014) and the ability of cells to operate NR rotation without affecting centrosome positioning (Levy and Holzbaur, 2008) could at first sight appear to be contradictory. However, we show here that centrosome orientation can happen both associated and independently of NR in a same cell. Regulating the interaction of FAK with dynein could then modulate the behaviour of the centrosome, being capable of following the nucleus as a passenger during NR, or having its own independent motion ensuring to acquire and maintain its polarisation during cell migration. FAK S732 phosphorylation, which was shown to depend on CDK5 and VEGF/ROCK signalling in cultured neocortical neurons and endothelial cells (Le Boeuf et al., 2006; Xie and Tsai, 2004), thus appears to be an important target to regulate nuclear independent centrosome motility.

During migration, the centrosome can be oriented at the front or at the back of the nucleus depending on the cell type (Luxton and Gundersen, 2011; Yvon et al., 2002) or, surprisingly, the nature and geometry of their extracellular matrix (Doyle et al., 2009; Pouthas et al., 2008; Schutze et al., 1991). Our results predict that modifying the distribution of focal adhesions in cells is susceptible to affect centrosome positioning by affecting dynein anchoring points. Indeed, fibroblasts have been shown to switch between front or rear centrosome polarisation depending on the 2D or 3D structure of their extracellular matrix, which affected FAK and paxillin intracellular localisation (Cukierman et al., 2001). Fibroblasts are also capable of sensing the direction of the mechanical stress provided by a shear flow to orient their centrosome (Lee et al., 2005), which is consistent with the implication of mechanosensors in the regulation of cell polarity. Accordingly, focal adhesions and especially FAK are part of mechanosensing mechanisms allowing cells

to sense the physical characteristics of the microenvironment to regulate cell polarity (Plotnikov et al., 2012; Prager-Khoutorsky et al., 2011; Wang et al., 2001), and a role for FAK as a mechanosensor affected during the progression of cancer was already proposed (Tilghman and Parsons, 2008). The characterisation of how dynein functions are integrated in mechanotransduction signalling pathways during centrosome positioning remain important and challenging points to investigate.

Materials and methods

Plasmids

The plasmids encoding for the following fusion proteins were kindly provided by the following researchers: mCherry-Galactosyltransferase (mCherry-GT) (Miller et al., 2009) was provided by I. Kaverina (Vanderbilt University Medical Center, Nashville, USA), 2N-acetylglucosaminyltransferase I (NAGFP; Shima et al., 1997) was a gift from D. Shima and G. Warren (Imperial Cancer Research Fund, London, UK), dynamitin-EGFP (Dohner et al., 2002) is from the laboratory of R. Vallee (Columbia University, NY, USA) and mCherry-vinculin (Wolfenson et al., 2009) was provided by I. Lavelin (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel). Mouse EGFP-tagged dynein intermediate chain IC2C (DIC) was obtained from Addgene (King et al., 2003). Human wild-type FAK fused to C-terminus of EGFP or mCherry are described by Deramaudt et al. (2014). FAK-EGFP plasmid was used as template to generate the S732A and S732D substitution constructs with the QuikChange II XL site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies). The following sequences were used to design the primers used for the PCR reactions: S732A: 5'-GCGAAGGATTTTATCCC**GCT**CCACAGCACATGGTAC-3'; S732D: 5'-GCGAAGGATTTTATCCC**GAC**CCACAGCACATGGTAC-3'. All constructs were amplified and purified using Qiagen Hispeed Maxiprep kits and verified by sequencing.

Cell culture and transfection

NIH3T3 fibroblasts (Gomes et al., 2005), primary $FAK^{-/-}$ mouse embryonic fibroblasts (MEFs) (Illc et al., 1995), and wild-type (wt) MEFs (gift from Dr. P. Boucher, UMR7213, Illkirch, France), were maintained at 37°C 5% CO_2 in DMEM supplemented with 10% Fetal Bovine Serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Gibco) and tested for contamination. Cells were seeded to reach confluency in 48 h, either on cell culture Petri dishes to prepare cell extracts, or on 18 mm coverslips placed in six-well dishes for immunofluorescence labelling. Transfections were performed on the day of seeding in six-well dishes using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's directions. For cell polarisation assays, confluent cells plated on coverslips were wounded with a pipet tip, and either replaced in the incubator to allow for migration for 4 h before to be processed for immunofluorescence, or directly mounted in a Ludin Chamber for TIRF and video microscopy analysis (Life Imaging Services, Basel, Switzerland).

Immunocytochemistry and immunological reagents

For immunofluorescence, coverslips were briefly rinsed in 37°C PHEM buffer (120 mM PIPES, 50 mM HEPES, 20 mM EGTA and 4 mM magnesium acetate, pH 6.9) and fixed with 3% PFA in PHEM for 20 min followed by permeabilisation either during 20 min with 0.5% TritonX100 in PBS (Figures 1A, 3A GKAP, 3E, and S1C), or during 4 min in −20°C methanol (Figures 3A DIC and APC). Cells imaged in Figure 3F were fixed in PHEM buffer containing 0.05% glutaraldehyde, 3% PFA and 0.05% TritonX100 during 12 min, and subsequently incubated three times for 10 min in 1 mg/ml $NaBH_4$ in PBS to reduce the autofluorecence. Permeabilisation was then carried out during 20 min with 0.5% TritonX100 in PBS. For all experiments, coverslips were then incubated for 30 min with 0.05% BSA in PBS and incubated for 1 h in primary antibody at 37°C, washed, and incubated for 1 h in secondary antibodies at 37°C. After several washes in PBS and a final incubation with DAPI (0.1 µg/ml, Sigma–Aldrich), coverslips aimed at regular fluorescence analysis were mounted using Prolong Gold Antifade Reagent (Life Technologies). Coverslips aimed at TIRF microscopy analysis were kept in PBS. Antibodies (and dilution used for immunofluorescence), included mouse Anti-Golgi GM130 (1/200) from BD Transduction Laboratories, mouse anti Dynein Intermediate Chain MAB1618 (1/100) from Millipore, rabbit anti γ-tubulin (1/300) and Mouse anti α-tubulin (DM1A, 1/200) from Sigma, mouse anti APC (Ab-5, 1/50) from Oncogene Research Products, rabbit anti GKAP (SAPAP1, 1/50) from Santa Cruz, and rabbit anti FAK-P397 (1/100) from Invitrogen. Actin was stained using Alexa Fluor 568 phalloidin (1/200; Invitrogen). The antibodies used for western blotting were diluted either 10 times further compared to immunofluorescence, or to 1/1000 for the mouse anti FAK from BD Transduction Laboratories, rabbit anti FAK-P861 from Invitrogen, rabbit anti FAK-P925 from Cell Signaling Technologies and mouse anti Paxillin from BD Transduction Laboratories. Secondary antibodies were goat anti-rabbit or anti-mouse IgG Alexa Fluor 488, 568 and 680 from Life Technologies (1/350), and goat anti-mouse or rabbit IgG HRP conjugate from Bio-Rad (1/10000).

Immunoprecipitation and western blotting

For standard protein analysis by western blots to check for DIC or FAK constructs expression, cells grown in six-well dishes and transfected with the proper constructs were washed twice with ice cold PBS and lysed with modified RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8.0, 1% Triton X100) with Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Cells were recovered with a cell scrapper, incubated 20 min on ice, and spun at 13 000 × *g* for 10 min in a microfuge (Eppendorf). The supernatants were collected and placed at 95°C in 2× SDS-PAGE sample buffer for 5 min. Samples were loaded into 8% SDS-PAGE gels and transferred onto Immobilon-P membranes (Millipore). Immunoblotting was performed with various antibodies against specific proteins and revealed with Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad) and LAS 4000 imager (GE Healthcare).

For co-immunoprecipitation experiments, the polarisation of fibroblasts grown to confluency in Petri dishes was induced by applying several wounds to the monolayer, which extent was homogeneously reproduced from one dish to another by using a multichannel pipette, and allowed to migrate during 3 h. Cells were then washed twice with ice cold PBS and lysed with modified RIPA buffer (137 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8.0, 10% glycerol, 1% IGEPAL CA-630, 3mM Na3Vo4) with Complete protease inhibitor cocktail (Roche). Cells were then incubated

© 2019 Société Française des Microscopies and Société de Biologie Cellulaire de France. Published by John Wiley & Sons Ltd

on ice for 30 min, and cell extracts were recovered with a cell scrapper and spun at 13 000 × *g* for 10 min in a microfuge (Eppendorf). The protein concentration in the extracts was determined using the DC protein assay (Bio-Rad), and adjusted. 1 mg of total protein of precleared extracts were added with 4 μg of anti FAK antibodies or 2 μg of dynein or paxillin antibodies and incubated 2 h at 4°C with gentle rotation. Seventy-five microliters of RIPA-washed beads (Fast Flow Protein G sepharose from GE Healthcare) was then added followed by a 3 h incubation at 4°C with gentle rotation. Beads were then washed four times with RIPA, and placed at 95°C in 2× SDS-PAGE sample buffer for 5 min. A total of 30 μl samples were loaded into 8% SDS-PAGE gels and processed for immunoblotting.

Microscopy and live cell imaging

Immunofluorescence or live cell samples were analysed using a Leica DMIRE2 microscope equipped with a 37°C 5% CO_2 control system (Life Imaging Services). Live cell nuclei were stained 30 min with Hoesht-33342 (100 ng/ml; Sigma) before wounding the monolayers. The coordinates of several fields containing transfected cells localised with the EGFP/mCherry signals were memorised using a Märzhäuser (Wetzlar, Germany) automated stage piloted by the Leica FW4000 software. Images were then acquired with a 100× HCX PL APO (1.4 NA) objective (immunofluorescences), or a 40× HCX PL APO (1.25 NA) objective (time lapse experiments) every 5 min (MEFs), or 10 min (NIH3T3), during 5 h using a Leica DC350FX CCD camera piloted by the FW4000 software. The A4 (320–380 nm excitation (Ex), 400 nm beam splitter (Bs), 450–490 nm emission (Em), L5 (460–500 nm Ex, 505 nm Bs, 512–542 Em), Y3 (510–560 nm Ex, 565 nm Bs, 572.5–647.5 Em), and Y5 (590–650 nm Ex, 660 nm Bs, 662.5–737.5 Em) Leica filter sets were used for imaging. Time-lapse movies were then analysed using ImageJ software (National Institutes of Health, USA).

TIRF or dual wide-field-TIRF experiments cells were imaged using an iMIC microscope piloted by the Live Aquisition software L.A. 2.4 (Till Photonics), and equipped with a Cobolt Dual Calypso Laser 491/532 nm, a monochromator Polychrome V, an Olympus 60× TIRFM (1.45 NA) objective, and an EMCCD camera (Andor Technology). EGFP was imaged via a selective 455–495nm Ex, 501 nm Bs and 500–551 nm Em filter set. mCherry was imaged via a selective 525–564nm Ex, 573 nm Bs and 578–638 nm Em filter set. DAPI was imaged via a four bands Bs equipped with a 427–464 nm Em filter. Live cells were maintained at 37°C in a 5% CO_2 humidified atmosphere using an environmental control system (Life Imaging Services).

Cell polarity analysis and statistics

The polarity angle α is formed between the polarity axis of the cells, defined by the line passing through the centroid of the nucleus and the centroid of either the Golgi or the centrosome (Figure 1A red line), and the migration axis of the cells (Figure 1A green arrow), defined as perpendicular to the wound axis. α was measured from pictures taken randomly along the wound. We wrote an ImageJ macro allowing for the semi-automatised segmentation of multichannel immunofluorescent pictures to determine the centroids of the Golgi apparatus and of the nuclei. Briefly, the DAPI channel pictures are treated by a 1 pixel radius Gaussian filter and thresholded using the algorithm of (Li and Tam, 1998). A watershed mask is then applied on the binary images to help separating the nuclei of neighbouring cells. A similar procedure is used for the Golgi image with a 3 pixels radius Gaussian filter and an Otsu thresholding algorithm (Otsu, 1979). The contour of each segmented object is drawn on the picture to allow for the visual verification of the quality of the segmentation process. Proper Golgi/Nuclei pairs are then selected manually. The migration axis is defined as perpendicular to the manually drawn wound axis, which can simply follow the main wound applied to the tissue, or can be defined individually for each cell by tracing a line joining the two last points of contact with its neighbouring cells. Same results were obtained using both methods of evaluation (not shown). The polarity angle is then calculated via simple trigonometry using the vector drawn from the centroid of the nuclei and the centroid of the Golgi, and the vector of the migration axis. The vectors are then overlaid on the pictures for visual validation of the measurement.

To analyse the co-localisation between dynamitin-EGFP and mCherry-vinculin in live cells, each TIRF image from time-lapse sequences was segmented using another ImageJ based macro. Briefly a Hi-Pass filter was applied to both channels to remove inhomogeneous background coming from cytosolic signal and images were binarised using the ImageJ tool detection of maximas in order to separate connected elements. Threshold values were adjusted to optimise object segmentation and regions of interest (front and rear of cell separated by a line located at one-third of total cell length) were hand drawn. The surface of segmented objects and their overlap in-between channels are then measured for each frame and exported in tables, segmented pictures and kymographs.

Statistical comparisons were based on three to seven independent experiments using either Student's *t*-tests for comparing two conditions (Figures 2–4; Figure S1) or one-way ANOVA followed by Turkey's multiple comparison test. Differences were judged significant when $P < 0.05$, and significance degrees are indicated on the figures by stars ($^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$). Error bars in the figures represent standard deviations.

Author contribution

Marta Fructuoso, Marlène Legrand, Antoine Mousson, Tania Steffan and Denis Dujardin carried out the experimental work. All authors contributed to data analysis and interpretation. Denis Dujardin, Philippe Rondé, Jan De Mey, Marta Fructuoso and Romain Vauchelles contributed to the writing of the article.

Funding

This work was supported in part by grants from the UMR7213 inter-team projects to D.D., the Ligue Contre le Cancer to P.R., and from the Institut National du Cancer to J.D.M. [INCA 2014–178)].

Acknowledgements

We would like to thank E. Gomes for the gift of NIH3T3 cells, P. Boucher for providing MEF cells and D. Ilic for the FAK$^{-/-}$ cell line. We would also like to thank I. Kaverina for providing the plasmid encoding mCherry-Galactosyltransferase (mCherry-GT), I. Lavelin for the mCherry-vinculin plasmid, D. Shima and G. Warren for the 2N-acetylglucosaminyltransferase I plasmid and R.B. Vallee for the dynamitin-EGFP plasmid. We thank the QUEST platform imaging facility.

Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest.

References

Burakov, A., Nadezhdina, E., Slepchenko, B. and Rodionov, V. (2003). Centrosome positioning in interphase cells. J. Cell Biol. **162**, 963–969

Burakov, A.V. and Nadezhdina, E.S. (2013). Association of nucleus and centrosome: magnet or velcro? Cell Biol. Int. **37**, 95–104

Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D.R. and Yamada, K.M. (2001). Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. Science **294**, 1708–1712

Deramaudt, T.B., Dujardin, D., Hamadi, A., Noulet, F., Kolli, K., De Mey, J., Takeda, K. and Ronde, P. (2011). FAK phosphorylation at Tyr-925 regulates cross-talk between focal adhesion turnover and cell protrusion. Mol. Biol. Cell **22**, 964–975

Deramaudt, T.B., Dujardin, D., Noulet, F., Martin, S., Vauchelles, R., Takeda, K. and Ronde, P. (2014). Altering FAK-paxillin interactions reduces adhesion, migration and invasion processes. PLoS One **9**, e92059

Dohner, K., Wolfstein, A., Prank, U., Echeverri, C., Dujardin, D., Vallee, R. and Sodeik, B. (2002). Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. Mol. Biol. Cell **13**, 2795–2809

Doyle, A.D., Wang, F.W., Matsumoto, K. and Yamada, K.M. (2009). One-dimensional topography underlies three-dimensional fibrillar cell migration. J. Cell Biol. **184**, 481–490

Dujardin, D.L., Barnhart, L.E., Stehman, S.A., Gomes, E.R., Gundersen, G.G. and Vallee, R.B. (2003). A role for cytoplasmic dynein and LIS1 in directed cell movement. J. Cell Biol. **163**, 1205–1211

Efimov, A., Schiefermeier, N., Grigoriev, I., Ohi, R., Brown, M.C., Turner, C.E., Small, J.V. and Kaverina, I. (2008). Paxillin-dependent stimulation of microtubule catastrophes at focal adhesion sites. J. Cell Sci. **121**, 196–204

Elric, J. and Etienne-Manneville, S. (2014). Centrosome positioning in polarized cells: common themes and variations. Exp. Cell Res. **328**, 240–248

Etienne-Manneville, S. (2013). Microtubules in cell migration. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **29**, 471–499

Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. Cell **106**, 489–498

Etienne-Manneville, S., Manneville, J.B., Nicholls, S., Ferenczi, M.A. and Hall, A. (2005). Cdc42 and Par6-PKCzeta regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization. J. Cell Biol. **170**, 895–901

Ezratty, E.J., Partridge, M.A. and Gundersen, G.G. (2005). Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. Nat. Cell Biol. **7**, 581–590

Friedl, P., Wolf, K. and Lammerding, J. (2011). Nuclear mechanics during cell migration. Curr. Opin. Cell Biol. **23**, 55–64

Garces, J.A., Clark, I.B., Meyer, D.I. and Vallee, R.B. (1999). Interaction of the p62 subunit of dynactin with Arp1 and the cortical actin cytoskeleton. Curr. Biol. **9**, 1497–1500

Gerashchenko, M.V., Chernoivanenko, I.S., Moldaver, M.V. and Minin, A.A. (2009). Dynein is a motor for nuclear rotation while vimentin IFs is a "brake." Cell Biol Int **33**, 1057–1064

Gomes, E.R., Jani, S. and Gundersen, G.G. (2005). Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. Cell **121**, 451–463

Houben, F., Willems, C.H.M.P., Declercq, I.L.J., Hochstenbach, K., Kamps, M.A., Snoeckx, L.H.E.H., Ramaekers, F.C.S. and Broers, J.L.V. (2009). Disturbed nuclear orientation and cellular migration in A-type lamin deficient cells. Biochim. Biophys. Acta **1793**, 312–324

Illc, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., Yamamoto, T., *et al*. (1995). Reduced sell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from Fak-deficient mice. Nature **377**, 539–544

Kaverina, I., Krylyshkina, O. and Small, J.V. (1999). Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. J Cell Biol **146**, 1033–1044

King, S.J., Brown, C.L., Maier, K.C., Quintyne, N.J. and Schroer, T.A. (2003). Analysis of the dynein-dynactin interaction in vitro and in vivo. Mol Biol Cell **14**, 5089–5097

Krendel, M., Zenke, F.T. and Bokoch, G.M. (2002). Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. Nat. Cell Biol. **4**, 294–301

Le Boeuf, F., Houle, F., Sussman, M. and Huot, J. (2006). Phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) on Ser732 is induced by rho-dependent kinase and is essential for proline-rich tyrosine kinase-2-mediated phosphorylation of FAK on Tyr407 in response to vascular endothelial growth factor. Mol Biol Cell **17**, 3508–3520

Lee, J.S.H., Chang, M.I., Tseng, Y., Wirtz, D., Wirtz, D. and Lee, J.S.H. (2005). Cdc42 mediates nucleus movement and MTOC polarization in Swiss 3T3 fibroblasts under mechanical shear stress. Mol Biol Cell **16**, 871–880

Lee, J.S.H., Hale, C.M., Panorchan, P., Khatau, S.B., George, J.P., Tseng, Y., Stewart, C.L., Hodzic, D. and Wirtz, D. (2007). Nuclear lamin A/C deficiency induces defects in cell mechanics, polarization, and migration. Biophys J **93**, 2542–2552

Levy, J.R. and Holzbaur, E.L. (2008). Dynein drives nuclear rotation during forward progression of motile fibroblasts. J Cell Sci **121**, 3187–3195

Li, C.H. and Tam, P.K.S. (1998). An iterative algorithm for minimum cross entropy thresholding. Pattern Recognit. Lett. **19**, 771–776

Luxton, G.W., Gomes, E.R., Folker, E.S., Vintinner, E. and Gundersen, G.G. (2010). Linear arrays of nuclear envelope proteins harness retrograde actin flow for nuclear movement. Science **329**, 956–959

Luxton, G.W., Gomes, E.R., Folker, E.S., Worman, H.J. and Gundersen, G.G. (2011). TAN lines: a novel nuclear envelope structure involved in nuclear positioning. Nucleus **2**, 173–181

Luxton, G.W. and Gundersen, G.G. (2011). Orientation and function of the nuclear-centrosomal axis during cell migration. Curr Opin Cell Biol **23**, 579–588

Maninova, M., Iwanicki, M.P. and Vomastek, T. (2014). Emerging role for nuclear rotation and orientation in cell migration. Cell Adhes Migr **8**, 42–48

Maninova, M., Klimova, Z., Parsons, J.T., Weber, M.J., Lwanicki, M.P. and Vomastek, T. (2013). The Reorientation of Cell Nucleus

© 2019 Société Française des Microscopies and Société de Biologie Cellulaire de France. Published by John Wiley & Sons Ltd

Promotes the Establishment of Front-Rear Polarity in Migrating Fibroblasts. J Mol Biol **425**, 2039–2055
Manneville, J.B., Jehanno, M. and Etienne-Manneville, S. (2010). Dlg1 binds GKAP to control dynein association with microtubules, centrosome positioning, and cell polarity. J Cell Biol **191**, 585–598
Melkonian, K.A., Maier, K.C., Godfrey, J.E., Rodgers, M. and Schroer, T.A. (2007). Mechanism of dynamitin-mediated disruption of dynactin. J Biol Chem **282**, 19355–19364
Miller, P.M., Folkmann, A.W., Maia, A.R., Efimova, N., Efimov, A. and Kaverina, I. (2009). Golgi-derived CLASP-dependent microtubules control Golgi organization and polarized trafficking in motile cells. Nat. Cell Biol. **11**, 1069–1080
Mousson, A., Sick, E., Carl, P., Dujardin, D., De Mey, J. and Ronde, P. (2018). Targeting focal adhesion kinase using inhibitors of protein-protein interactions. Cancers **10**
Osorio, D.S. and Gomes, E.R. (2014). Connecting the nucleus to the cytoskeleton for nuclear positioning and cell migration. Adv. Exp. Med. Biol. **773**, 505–520
Otsu, N. (1979). A threshold selection method from gray-level histograms. IEEE Trans. Syst. Man Cybern. **9**, 62–66
Palazzo, A.F., Eng, C.H., Schlaepfer, D.D., Marcantonio, E.E. and Gundersen, G.G. (2004). Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. Science **303**, 836–839
Palazzo, A.F., Joseph, H.L., Chen, Y.J., Dujardin, D.L., Alberts, A.S., Pfister, K.K., Vallee, R.B. and Gundersen, G.G. (2001). Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. Curr Biol **11**, 1536–1541
Park, A.Y.J., Shen, T.L., Chien, S. and Guan, J.L. (2009). Role of focal adhesion kinase Ser-732 phosphorylation in centrosome function during mitosis. J Biol Chem **284**, 9418–9425
Plotnikov, S.V., Pasapera, A.M., Sabass, B. and Waterman, C.M. (2012). Force fluctuations within focal adhesions mediate ECM-rigidity sensing to guide directed cell migration. Cell **151**, 1513–1527
Pouthas, F., Girard, P., Lecaudey, V., Ly, T.B., Gilmour, D., Boulin, C., Pepperkok, R. and Reynaud, E.G. (2008). In migrating cells, the Golgi complex and the position of the centrosome depend on geometrical constraints of the substratum. J Cell Sci **121**, 2406–2414
Prager-Khoutorsky, M., Lichtenstein, A., Krishnan, R., Rajendran, K., Mayo, A., Kam, Z., Geiger, B. and Bershadsky, A.D. (2011). Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing. Nat. Cell Biol. **13**, 1457–1465
Robinson, J.T., Wojcik, E.J., Sanders, M.A., McGrail, M. and Hays, T.S. (1999). Cytoplasmic dynein is required for the nuclear attachment and migration of centrosomes during mitosis in Drosophila. J Cell Biol **146**, 597–608
Rosse, C., Boeckeler, K., Linch, M., Radtke, S., Frith, D., Barnouin, K., Morsi, A.S., Hafezparast, M., Howell, M. and Parker, P.J. (2012). Binding of dynein intermediate chain 2 to paxillin controls focal adhesion dynamics and migration. J Cell Sci **125**, 3733–3738
Schlessinger, K., McManus, E.J. and Hall, A. (2007). Cdc42 and noncanonical Wnt signal transduction pathways cooperate to promote cell polarity. J Cell Biol **178**, 355–361
Schmoranzer, J., Fawcett, J.P., Segura, M., Tan, S., Vallee, R.B., Pawson, T. and Gundersen, G.G. (2009). Par3 and dynein associate to regulate local microtubule dynamics and centrosome orientation during migration. Curr. Biol. **19**, 1065–1074
Schutze, K., Maniotis, A. and Schliwa, M. (1991). The position of the microtubule-organizing center in directionally migrating fibroblasts depends on the nature of the substratum. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **88**, 8367–8371
Serrels, B., Sandilands, E. and Frame, M.C. (2011). Signaling of the direction-sensing FAK/RACK1/PDE4D5 complex to the small GTPase Rap1. Small GTPases **2**, 54–61
Serrels, B., Sandilands, E., Serrels, A., Baillie, G., Houslay, M.D., Brunton, V.G., Canel, M., Machesky, L.M., Anderson, K.I. and Frame, M.C. (2010). A complex between FAK, RACK1, and PDE4D5 controls spreading initiation and cancer cell polarity. Curr. Biol. **20**, 1086–1092
Shima, D.T., Haldar, K., Pepperkok, R., Watson, R. and Warren, G. (1997). Partitioning of the Golgi apparatus during mitosis in living HeLa cells. J Cell Biol **137**, 1211–1228
Small, J.V. and Kaverina, I. (2003). Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity. Curr Opin Cell Biol **15**, 40–47
Stehbens, S. and Wittmann, T. (2012). Targeting and transport: how microtubules control focal adhesion dynamics. J Cell Biol **198**, 481–489
Tilghman, R.W. and Parsons, J.T. (2008). Focal adhesion kinase as a regulator of cell tension in the progression of cancer. Semin. Cancer Biol. **18**, 45–52
Tilghman, R.W., Slack-Davis, J.K., Sergina, N., Martin, K.H., Iwanicki, M., Hershey, E.D., Beggs, H.E., Reichardt, L.F. and Parsons, J.T. (2005). Focal adhesion kinase is required for the spatial organization of the leading edge in migrating cells. J Cell Sci **118**, 2613–2623
Tomar, A., Lim, S.T., Lim, Y. and Schlaepfer, D.D. (2009). A FAK-p120RasGAP-p190RhoGAP complex regulates polarity in migrating cells. J Cell Sci **122**, 1852–1862
Wang, H.B., Dembo, M., Hanks, S.K. and Wang, Y. (2001). Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. Proc Natl Acad Sci U S A **98**, 11295–11300
Waterman-Storer, C.M., Worthylake, R.A., Liu, B.P., Burridge, K. and Salmon, E.D. (1999). Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. Nat. Cell Biol. **1**, 45–50
Wen, Y., Eng, C.H., Schmoranzer, J., Cabrera-Poch, N., Morris, E.J., Chen, M., Wallar, B.J., Alberts, A.S. and Gundersen, G.G. (2004). EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. Nat. Cell Biol. **6**, 820–830
Wolfenson, H., Lubelski, A., Regev, T., Klafter, J., Henis, Y.I. and Geiger, B. (2009). A role for the juxtamembrane cytoplasm in the molecular dynamics of focal adhesions. PLoS One **4**, e4304
Xie, Z.G. and Tsai, L.H. (2004). Cdk5 phosphorylation of FAK regulates centrosome-associated microtubules and neuronal migration. Cell Cycle **3**, 108–110
Yvon, A.-M.C., Walker, J.W., Danowski, B., Fagerstrom, C., Khodjakov, A. and Wadsworth, P. (2002). Centrosome reorientation in wound-edge cells is cell type specific. Mol Biol Cell **13**, 1871–1880
Zhang, X., Lei, K., Yuan, X., Wu, X., Zhuang, Y., Xu, T., Xu, R. and Han, M. (2009). SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 complexes connect centrosome to the nucleus during neurogenesis and neuronal migration in mice. Neuron **64**, 173–187

Received: 3 June 2019; Revised: 10 December 2019; Accepted: 12 December 2019; Accepted article online: 20 December 2019

Laboratoire de bioimagerie et pathologies | LBP de l'Université de Strasbourg et du cnrs

Antoine MOUSSON

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé STRASBOURG

Analyse du rôle des protéines FAK et CD47 dans l'invasion tumorale du mélanome

Résumé

L'invasion tumorale requière la coordination des processus de migration et de dégradation de la matrice extracellulaire (MEC), régulés respectivement par les adhérences focales et par les invadopodes, protrusions membranaires enrichies en métalloprotéases matricielles. Sur un modèle de mélanome, nous avons étudié les mécanismes moléculaires de l'invasion cellulaire sous-jacents.

La protéine FAK (*Focal Adhesion Kinase*) régule la balance entre migration et dégradation matricielle dans les cellules cancéreuses. Nous montrons que l'inhibition du domaine kinase de FAK diminue la migration cellulaire mais augmente la dégradation matricielle. En revanche, en inhibant l'interaction FAK-paxilline, nous montrons que la migration et l'invasion tumorale sont diminuées, soulignant la pertinence d'une nouvelle stratégie thérapeutique ciblant FAK.

Aussi, nous avons trouvé que l'activation du récepteur CD47 par la TSP-1 inhibe la migration mais favorise la dégradation de la MEC par la voie de signalisation MEK/ERK. Nous montrons ainsi pour la première fois l'implication directe de l'axe CD47-TSP-1 dans la formation et l'activité des invadopodes.

Mot clés: Mélanome, FAK, CD47, invasion, invadopode, inhibiteurs d'interaction protéine-protéine

Abstract

Tumour invasion requires the coordination of migration and degradation of the extracellular matrix (ECM). These processes are regulated respectively by focal adhesions and by invadopodia, which are membrane protrusions enriched in matrix metalloproteases. In a melanoma model, we have studied the molecular mechanisms underlying invasion.

FAK (Focal Adhesion Kinase) regulates the balance between migration and matrix degradation in cancer cells. We show that inhibition of the kinase domain of FAK decreases cell migration but increases matrix degradation. On the other hand, by inhibiting the interaction of FAK with paxillin, we found that migration and tumour invasion are inhibited. This suggests that targeting FAK might represent a new therapeutic strategy.

We also demonstrated that activation of CD47 by TSP-1 inhibits migration but promotes degradation of ECM by the MEK/ERK pathway. We thus show for the first time the involvement of the CD47-TSP-1 axis in the formation and activity of invadopodia.

Keywords: Melanoma, FAK, CD47, invasion, invadopodia, protein-protein interaction inhibitors