

Université de Montréal

**Exploration des mécanismes responsables de la dichotomie entre la
chimiotaxie et la division cellulaire**

Par David Rhains

Département de biochimie et médecine moléculaire
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de
l'obtention du grade de Maîtrise en biochimie et médecine moléculaire

Octobre 2017

Membres du jury :

Dr Nikolaus Heveker – Directeur de recherche

Dr Luis Rokeach – Président

Dre Julie Lavoie – Membre du jury

Résumé

La division cellulaire (mitose) et la migration cellulaire dirigée vers un gradient de chimioattractants (chimiotaxie) sont deux processus fondamentaux en biologie cellulaire qui impliquent tous les deux la polarisation de la cellule. Dans la mitose, la polarisation de la cellule est bipolaire, définissant des pôles opposés de la cellule vers lesquels les chromosomes et le contenu cellulaire des futures cellules filles en division sont attirés. En revanche, la chimiotaxie nécessite une polarisation unipolaire, définissant un pôle dirigeant (avant) et une queue traînante (arrière). Ces modes de polarisation différents sont fondamentalement incompatibles. Il est donc intuitivement évident qu'une cellule en division aigüe ne peut pas simultanément déclencher un mécanisme de polarisation contradictoire, mais qu'elle doit rester insensible aux signaux chimiotactiques. Étonnamment, la démonstration d'une dichotomie entre mitose et chimiotaxie n'avait pas été faite. De plus, on ignore quand et comment une cellule en division devient insensible aux signaux chimiotactiques.

Dans cette étude, nous démontrons l'existence de la dichotomie entre la chimiotaxie et les phases du cycle cellulaire dont le mode de polarisation est bipolaire, soit la fin de la phase G2 et M dans un modèle humain, les cellules souches pré-B. Nous démontrons que ceci n'est pas dû à une réduction d'expression du récepteur chimioattractant en surface des cellules en phases G2 et M; de plus, la signalisation proximale du récepteur semble intacte. D'autres mécanismes qu'une régulation négative du récepteur chimioattractant lors des phases G2 et M doivent alors être envisagés.

Mots clés :

Phase de G2, phase de mitose, chimiotaxie, dichotomie, CXCR4, CXCL12, synchronisation cellulaire, endocytose, G α i, β -arrestine, ERK 1/2

Abstract

Cell division (mitosis) and directed cell migration towards chemoattractants (chemotaxis) are two central processes in cell biology that both involve cell polarization. In mitosis, cell polarization is bipolar, defining opposite poles on the cell towards which chromosomes and cellular content of the eventually separating daughter cells are attracted. In contrast, chemotaxis ascending a concentration gradient of exogenous chemoattractants requires unipolar polarization, defining a leading edge (front) and a trailing end (rear). These different polarization patterns are fundamentally incompatible. It is thus intuitively obvious that an acutely dividing cell cannot simultaneously set off a conflicting polarization program, but must remain unresponsive to chemotactic cues. Surprisingly, no demonstration of the chemotaxis-mitosis dichotomy has been published. Furthermore, it remains unknown when, and how, a dividing cells become unresponsive to chemotactic cues.

In this study, we demonstrate the existence of the dichotomy between chemotaxis and mitosis in pre-B human cells. More specifically, we demonstrate that the dichotomy is not a cause of the reduction of cell surface expression of chemokine receptor during the cell synchronisation at the G2 and M phases's border. We also prove that cells undergoing bipolarization at the G2 and M border still keep their proximal chemokine receptor-dependant signaling pathways. Other mechanisms than a negative regulation of the chemokine receptor must be investigated.

Keywords :

G2 phase, mitosis, chemotaxis, dichotomy, CXCR4, CXCL12, cell synchronisation, endocytosis, Gai, β -arrestine, ERK 1/2

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract	iii
Table des matières	iv
Table des figures	ix
Abréviations	x
Remerciements	xv
Dédicace	xvi
1. Introduction	1
1.1 Chimiotaxie	1
1.1.1 Polarisation unipolaire.....	2
1.1.2 Aspect dose-dépendant de la chimiotaxie	2
1.1.3 Chimioattractants	2
1.1.3.1 Chimiokines.....	4
1.1.3.1.1 Nomenclature des chimiokines	4
1.1.4 RCPG	4
1.1.4.1 Récepteurs de chimiokines	6
1.1.4.2 Signalisation des récepteurs de chimiokines.....	6
1.1.4.2.1 Les protéines G hétérotrimériques et leur activation.....	6

1.1.4.2.2	Les $G\alpha$	7
1.1.4.2.3	La $G\beta\gamma$	8
1.1.4.2.4	Les cascades signalétiques G-dépendante.....	8
1.1.4.2.4.1	Cascade $G\alpha i/G\beta\gamma$ -dépendante.....	8
1.1.4.2.4.2	Cascade $G\alpha_{12/13}$ -dépendante.....	11
1.1.4.2.5	La β -arrestine et la désensibilisation.....	11
1.1.4.3	Polarisation des cascades signalétiques des protéines G.....	14
1.1.4.3.1	Au pôle dirigeant.....	14
1.1.4.3.2	Dans la queue traînante.....	15
1.1.4.4	Maintien de l'asymétrie des voies de signalisation protéines G-dépendantes.	16
1.1.5	CXCR4 comme modèle de récepteur de chimiokine.....	16
1.2	Cycle cellulaire.....	17
1.2.1	Les phases du cycle cellulaire.....	17
1.2.1.1	La phase G1.....	18
1.2.1.2	La phase S.....	18
1.2.1.3	La phase G2.....	18
1.2.1.4	La mitose.....	19
1.2.1.5	La phase G0.....	19
1.2.2	Les CDK/cyclines.....	19
1.2.3	Polarisation bipolaire.....	21
1.3	Rôles, lors de la mitose, des protéines impliquées dans la chimiotaxie....	22
1.3.1	Les effecteurs de la chimiotaxie impliqués dans la division cellulaire.....	22
1.4	Objectifs.....	25

2. Matériels et méthodes	26
2.1 Plasmide.....	26
2.2 Les cellules Reh et CXCR4	26
2.3 Culture cellulaire	26
2.4 Arrêt de cycle cellulaire et marquage au propidium iodide	26
2.5 Essais de chimiotaxie.....	27
2.6 Endocytose de CXCR4.....	28
2.7 Infection lentivirale	28
2.8 Détection de l'AMPc par BRET comme mesure de l'activation de la protéine G α i.....	29
2.9 Détection de l'activation de ERK 1/2 par immunobuvardage de type Western	30
2.10 Analyse et traitement des données	30
3. Résultats	31
3.1 Mesure de la synchronisation des cellules Reh à diverses phases du cycle cellulaire.....	31
3.2 Mesure de la chimiotaxie des cellules Reh synchronisées à la frontière des phases G2/M.....	33
3.3 Mesure de l'expression en surface cellulaire de CXCR4 lors de la phase G2	35

3.3 Mesure de la capacité de CXCR4 à endocyter selon différentes concentrations de CXCL12.....	37
3.4 Mesure de la capacité de CXCR4 à endocyter lors de la synchronisation en phase G2	39
3.5 Mesure de l'activation de la protéine G α i liée à CXCR4 durant la synchronisation en phase G2	39
3.6 Mesure de l'activation de la voie des MAPKKK durant la synchronisation en phase G2	44
4. Discussion et perspectives	49
4.1 Retour sur les résultats.....	49
4.1.1 Absence de chimiotaxie pendant les phases G2 et M du cycle cellulaire	49
4.1.2 Les paramètres explorés.....	50
4.1.2.1 Expression en surface du récepteur	50
4.1.2.2 Fonctionnalité de CXCR4 exprimé en surface lors des phases G2/M.....	51
4.1.2.3 Les voies des protéines G.....	52
4.1.2.4 La voie de signalisation de la β -arrestine	55
4.2 Les mécanismes alternatifs et les perspectives	56
4.2.1 L'hypothèse alternative	57
4.2.2 Les perspectives.....	57
4.2.2.1 La distribution des marqueurs de polarisation PIP3 et les RhoGEFs.....	58
4.2.2.1.1 <i>La polarisation de la cellule par PIP3</i>	<i>58</i>
4.2.2.1.2 <i>La polarisation de la cellule par Rac/Cdc42 et RhoA.....</i>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>

5. Conclusion	65
6. Références.....	66

Table des figures

Figure 1. La chimiotaxie d'une population de cellules est donnée de façon dose-dépendante par la concentration de chemoattractants, formant une courbe en cloche.	3
Figure 2. Structure simplifiée des chimiokines.	5
Figure 3. Illustration de la cascade G α /G $\beta\gamma$ -dépendante.	9
Figure 5. Représentation des diverses phases du cycle cellulaires	20
Figure 6. Les modes de polarisation unipolaire (chimiotaxie) et bipolaire (mitose) sont incompatibles de par leur nature.	23
Figure 7. Le traitement au propidium iodide (PI) permet d'observer la synchronisation des cellules lorsque traitées avec du RO3306 et du PD0339921 pendant 20 heures.	32
Figure 8. La synchronisation des cellules Reh en G2 inhibe la réponse chimiotactique au gradient chimiotactique de CXCL12.	34
Figure 9. L'expression de CXCR4 en surface des cellules n'est pas affectée par la synchronisation en G2.	36
Figure 10. Les cellules Reh non synchronisées endocytent le récepteur CXCR4 exprimé en surface lorsque stimulées avec du CXCL12.	38
Figure 11. L'endocytose de CXCR4 en présence de CXCL12 n'est pas affectée par la synchronisation des cellules en G2.	40
Figure 12. Schéma du rapporteur GFP10-Epac-Rluc3.	42
Figure 13. La réponse G α CXCR4/CXCL12-dépendante n'est pas affectée par la synchronisation en G2.	43
Figure 14. La stimulation des cellules Reh avec CXCL12 permet la phosphorylation de ERK 1/2.	45
Figure 15. La voie menant à la phosphorylation de ERK 1/2 n'est pas affectée par la synchronisation en G2.	47
Figure 16. Mécanismes explorés et conclusions posées durant la présente étude.	59
Figure 17. Mécanismes à explorer pour les perspectives du projet et conclusions attendues.	60

Abréviations

Les abréviations ci-dessous sont présentées sous le format « abréviation – définition ». Lorsque la définition française ne reflète pas l'abréviation commune, nous avons jugé pertinent d'ajouter la définition anglaise.

7TMR	Récepteur à 7 domaines transmembranaires 7-Transmembrane domains receptor (anglais)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BRET	Transfert d'énergie par résonance de bioluminescence Bioluminescence resonance energy transfer (anglais)
Ca ²⁺	Ion de calcium bivalent
Cdc42	Homologue de la protéine 42 contrôlant la mitose Cell division control protein 42 homolog (anglais)
CDK	Kinase cycline-dépendante Cyclin-dependant kinase (anglais)
Cellules HEK	cellules embryonnaires de rein humain Human embryonic kidney cells (anglais)
CFP	Protéine fluorescente cyan Cyan fluorescent protein (anglais)
CXCL11	Ligand de type CXC 11 CXC Ligand 11 (anglais)
CXCL12	Ligand de type CXC 12 CXC Ligand 12 (anglais)

CXCR3	Récepteur de Ligand de type CXC 3 CXC Ligand-Receptor 3 (anglais)
CXCR4	Récepteur de Ligand de type CXC 4 CXC Ligand-Receptor 4 (anglais)
CXCR7	Récepteur de Ligand de type CXC 7 CXC Ligand-Receptor 7 (anglais)
DMEM	Milieu de culture « <i>Dubleco's Modified Eagle's Medium</i> »
DMSO	Diméthylsulfoxyde
Domaine PH	Domain homologue à plekstrine Plekstrin-homology domain (anglais)
DTT	Dithithréitol
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EGF	Facteur de croissance épidermique Epidermal growth factor (anglais)
EPAC	Facteur d'échange activé par l'AMPc Exchange factor activated by cAMP (anglais)
EphB2	Récepteur Éphrine de type-B 2
ERK 1/2	Kinases, régulées par signaux extracellulaires, 1 et 2 Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (anglais)
FAK	Kinase d'adhésion focale Focal adhesion kinase (anglais)
FRET	Transfert d'énergie par résonance de fluorescence Fluorescence resonance energy transfer (anglais)
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Facteur d'échange de guanosine Guanosine exchange factor (anglais)
GFP	Protéine fluorescente verte Green fluorescent protein

GFP10	Protéine fluorescente verte, altération 10 Green fluorescent protein, alternate form 10
Giv	Protéine associée aux vésicules interagissant avec G α G α -interacting vesicle associated protein (anglais)
GRK	Kinase couplée aux RCPGs GPCR coupled kinase (anglais)
GTP	Guanosine triphosphate
G α 12/13	Protéine G de type 12/13
G α i	Protéine G de type α inhibitrice
G α q	Protéine G de type α q
G α s	Protéine G de type α stimulatrice
G β	Protéine G de type β
G $\beta\gamma$	Complexe hétérodimérique composé de G β et G γ
G γ	Protéine G de type γ
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HRP	Peroxydase de raifort Horseradish peroxidase (anglais)
HSP 90	Protéine de choc thermique 90 Heat shock protein 90 (anglais)
IEGs	Premiers gènes immédiats Immediate early genes (anglais)
IP3	Inositol triphosphate
MAPK	Kinases des protéines activées par la mitose Mitogen-activated protein kinases (anglais)
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
MLCK	Kinase de la chaîne légère de la myosine Myosin light-chain kinase (anglais)

MLCP	Phosphatase de la chaîne légère de la myosine Myosin light-chain phosphatase (anglais)
NaCl	Chlorure de sodium
NaF	Fluorure de sodium
NETO	Apparition de la nouvelle extrémité New end take off (anglais)
PAKa	Kinase a activée par p21 P21-activated kinase a (anglais)
Phase G0	Intervalle 0 post-mitotique Gap 0, resting phase (anglais)
Phase G1	Intervalle 1 Gap 1 (anglais)
Phase G2	Intervalle 2 Gap 2 (anglais)
Phase M	Phase de mitose
Phase S	Phase de synthèse de l'ADN
PI	Iodure de propidium Propidium iodide (anglais)
PI3K	Kinase du phosphoinositide 3 Phosphoinositide 3-kinase
PIP2	Phosphatidyinositol-4,5-biphosphate
PIP3	Phosphatidyinositol-3,4,5-triphosphate
PKA	Protéine kinase A
PLC β	Phospholipase C, isoforme β
PMSF	Fluorure de phénylméthysulfonyle Phenylmethylsulfonyl fluoride (anglais)
PTEN	Phosphatase homologue de la tensin
PTX	Pertussis toxine

Rac	Substrat C3, en relation avec Ras, de la toxine botulique Ras-related C3 botulinum toxin (anglais)
Ras	Protéine dérivée de virus causant des sarcomes aux rats Rat sarcoma virus-derived protein (anglais)
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RGS3	Protéine régulatrice 3 de la signalisation des protéines G Regulator of G protein signaling 3
RhoA	Homologue de la famille de gènes Ras, membre A Ras homolog gene family, member A (anglais)
Rluc3	Luciférase de <i>renilla reniformis</i> , altération 3 <i>Renilla reniformis</i> luciferase, alternate form 3 (anglais)
ROCK	Kinase associée à Rho Rho-associated kinase (anglais)
RPMI	Milieu de culture « <i>Roswell Park Memorial Institute</i> »
TBST	Solution tampon Tris avec détergeant Tween Tris-buffer solution-Tween (anglais)
TMEM16A	Récepteur transmembranaire de membre 16A Transmembrane member 16A (anglais)
VSVG	Protéine G du virus de la stomatite vésiculaire Vesicular stomatitis Indiana virus G protein (anglais)
WASP	Protéine du syndrome de Wiscott-Aldrich Wiscott-Aldrich syndrom protein (anglais)
YFP	Protéine fluorescente jaune Yellow fluorescent protein (anglais)

Remerciements

Il en va de soi que mon parcours aux études graduées n'aurait pas été l'ombre de ce qu'il a été sans la présence de mon directeur de recherche Nikolaus Heveker. À vous, Dr Heveker, un merci pour le mentorat fourni durant ces deux dernières années. Merci d'avoir apporté des réponses justes et claires lors de mes périodes de questionnements et d'hésitation. J'ai eu la chance et l'honneur de travailler sous votre tutelle ces dernières années et je suis redevable de l'éthique de travail, de la patience et de l'esprit d'analyse que vous m'avez transmis.

Un merci à l'équipe actuelle du laboratoire, Geneviève et Mélanie, pour l'ambiance agréable de travail et la complicité d'équipe. Merci à Geneviève pour ton éthique de travail irréprochable permettant toujours de trouver ce que l'on cherche et merci à Mélanie d'avoir apporté une touche d'humour dans les moments les plus laborieux.

Je voudrais aussi remercier les anciens du laboratoire, Nicolas et François, pour avoir servi de mentors dans mon initiation au monde de la recherche. Merci également à Mathias et à Ivan pour les bons rires et les cafés.

Un merci tout particulier à mon bon ami, complice et collègue de laboratoire Julien. Merci pour tout.

J'aimerais remercier mes parents, Francine et Pierre, mes beaux-parents, Josée et Daniel, mes sœurs, Chanel et Julie, pour leurs encouragements inépuisables et leurs visions externes. Je remercie également tous les membres de ma belle-famille.

Dédicace

À ma conjointe Vickie,

Un remerciement du fond du cœur à toi, qui m'a soutenu dans mes meilleurs moments et mes pires. Merci d'avoir passé tes fins de semaines et plusieurs soirées avec moi à travailler au laboratoire. Merci de m'avoir encouragé au cours des dernières années et d'être restée avec moi dans les moments les plus difficiles.

Sans toi, je n'y serais jamais arrivé.

1. Introduction

1.1 Chimiotaxie

Le mouvement de déplacement d'un organisme ou d'un groupe d'organismes est appelé la migration cellulaire. Le terme de « migration » signifie des mouvements aléatoires plutôt que directionnelles. Si la migration est directionnelle, on parle de « -taxie ». Celle-ci peut être orientée selon divers stimulus tels que la concentration d'oxygène (aérotaxie), la température (thermotaxie), la lumière (phototaxie) ou un courant électrique (électrotaxie), pour ne nommer que quelques exemples. À noter que sous certaines conditions, la migration cellulaire apparaît non directionnelle, mais ce n'est pas le cas de la chimiotaxie [1]. La chimiotaxie est le nom commun donné à la migration directionnelle cellulaire conduite par les chimioattractants, des messagers chimiques externes [2].

Les cellules telles que certains mycètes, les cellules souches et les leucocytes nécessitent la chimiotaxie pour accomplir de façon adéquate leurs rôles respectifs. Ces mouvements ne sont pas générés de façon aléatoire; les cellules migrent vers ou en direction contraire à des tissus, des organes ou encore des régions riches en chimioattractants. Elles suivent ou fuient ces stimuli chimiques externes. La chimiotaxie est un phénomène fréquent : les lymphocytes T migrent vers un site d'inflammation en réponse au relâchement de chimioattractants lors de la réponse immunitaire, alors que les cellules souches du corps sont attirées dans les niches tissulaires jusqu'à leur différenciation [3, 4]. L'amibe *Dictyostelium discoideum* oriente sa migration vers la présence de bactéries pour les phagocyter et ainsi s'en nourrir, mais a tendance à engager une chimiotaxie afin de s'éloigner les unes des autres lorsqu'elles sont dans un état végétatif [5, 6].

1.1.1 Polarisation unipolaire

La direction de la chimiotaxie est donnée par un gradient de concentration de chimioattractants détecté par la cellule et traduit en une polarité cellulaire. Cette polarisation est essentielle à la direction de la migration, car elle permet de définir un pôle dirigeant (ou « leading edge » en anglais), et une queue trainante (« trailing end ») dans la cellule, à l'opposé et sur les côtés du front. Cette polarisation consiste en une réorganisation asymétrique du contenu cellulaire.

1.1.2 Aspect dose-dépendant de la chimiotaxie

La détection du gradient est opérée par l'occupation inégale des récepteurs du front comparé à l'arrière de la cellule. La chimiotaxie n'est pas possible à toutes les concentrations de chimioattractants, tel que décrit par Zigmond et Hirsch en 1973. En effet, une concentration trop faible ne permet pas la détection d'un gradient par les cellules, ce qui empêche la polarisation [7]. Dans le cas d'une concentration trop élevée, la polarisation se produira, mais les cellules ne pourront pas détecter de gradient, car tous les récepteurs seront occupés, et il n'y aura plus de différentiel d'occupation [7]. Toutefois, chaque cellule d'une population engagera le processus de migration dans une direction aléatoire, sans toutefois créer une direction dans le mouvement général de la population de cellules, résultant en un mouvement stochastique des cellules (voir Figure 1). Une concentration uniforme de chimioattractants ne permet pas non plus la détection d'un gradient, résultant aussi en un mouvement stochastique des cellules [7]. Ces phénomènes expliquent la forme classique de cloche observable en migration cellulaire par rapport à une concentration variable de stimuli (voir Figure 1) [7].

1.1.3 Chimioattractants

Tel que mentionné précédemment, le nom « chimioattractants » est donné à tout composé chimique externe à une cellule qui permet de déclencher la chimiotaxie chez cette dernière en direction du gradient de la concentration du chimioattractant. Les chimioattractants se retrouvent sous plusieurs formes. Certains peuvent être inorganiques : le chlorure de sodium agit comme agent chimioattractant chez les macrophages [8]. Or, la majorité des

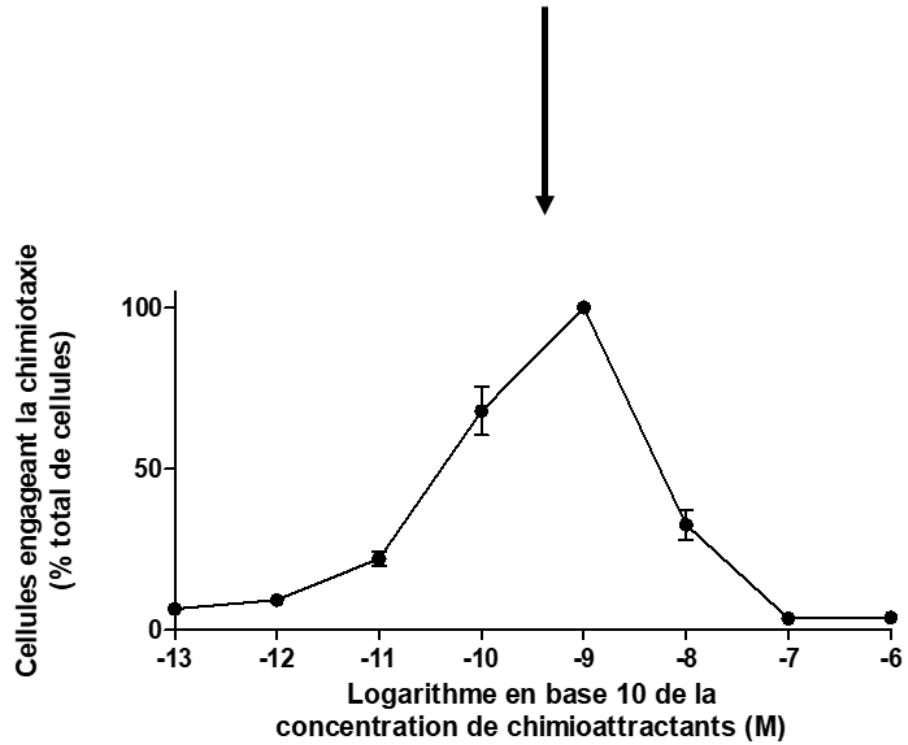
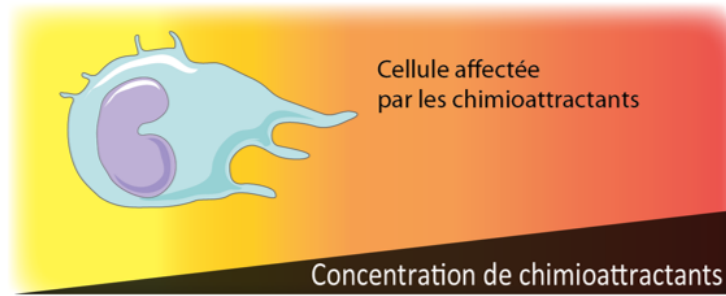


Figure 1. La chimiotaxie d'une population de cellules est donnée de façon dose-dépendante par la concentration de chemoattractants, formant une courbe en cloche.

Cette image fut créée à partir de la banque d'images vectorielles Servier's Vectorial Powerpoint images bank. La courbe de chimiotaxie est créée à partir de données fictives.

chimioattractants se retrouvent sous forme organique; les peptides formylés en N-terminale, des marqueurs de la présence de bactéries et de mitochondries, sont de forts chimioattractants pour les leucocytes dans la réponse immunitaire [9-12]. Il existe par ailleurs une large famille de chimioattractants organiques produits par les cellules de l'organisme, appelée les chimiokines.

1.1.3.1 Chimiokines

Les chimiokines sont de petites protéines dont la taille varie de 8 à 12 kDa [13]. Leur nom provient de la contraction des mots « cytokines » et « chimiotactiques » (ou encore « chemotactic cytokines », chemokines, en anglais). Comme leur nom indique, il s'agit de messagers peptidiques dont le rôle est de guider la chimiotaxie des cellules dans divers systèmes du corps [13]. La transduction du signal de toutes les chimiokines est assurée par des récepteurs de chimiokines, une famille de récepteurs appartenant à la classe des récepteurs couplés aux protéines G.

1.1.3.1.1 Nomenclature des chimiokines

Selon la dernière nomenclature de Zlotnik et Yoshie en 2012 [14], les chimiokines sont divisées en quatre grandes classes selon leur structure de pont(s) disulfure(s): Les chimiokines CC, les chimiokines CXC, les chimiokines C et les CX₃C (voir Figure 2). Par exemple, la chimiokine CXCL12 possède deux ponts disulfures dont l'origine se trouve dans le domaine N-terminale, et dont les cystéines (C) sont séparées par un autre acide aminé quelconque (X). Le « L » signifie « Ligand ». À noter que l'ancienne nomenclature est encore présente dans la littérature; CXCL12 se présente parfois sous le nom SDF-1 α pour « Stromal-derived factor 1 alpha ».

1.1.4 RCPG

Les récepteurs couplés aux protéines G, ou RCPG, constituent la plus grande superfamille de récepteurs transmembranaires produits chez l'humain [15]. Ces récepteurs ont en commun leur structure conservée comportant sept domaines (hélices α) transmembranaires. On les nomme d'ailleurs 7TMR, ou « 7-TransMembrane domains Receptor ». Les protéines G

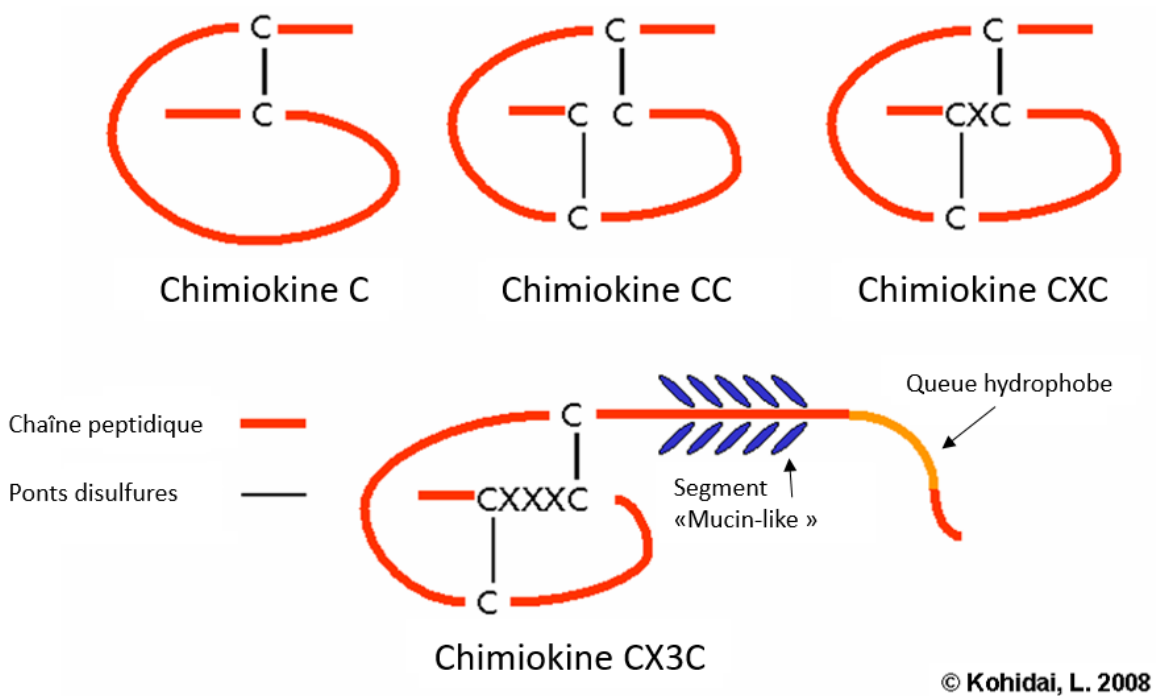


Figure 2. Structure simplifiée des chimiokines.

Image modifiée de « *Strukturen der Chemokinen* » par Kohidai, 2008.

auxquelles sont liés les RCPG sont sous forme trimérique : la protéine $G\alpha$ et le complexe $G\beta/\gamma$ [16-19]. La sous-unité α est liée au GDP/GTP [18, 20]. La nature des sous-unités varie selon les récepteurs. Par exemple, la sous-unité $G\alpha$ peut se retrouver sous l'isoforme $G\alpha_i$ ou $G\alpha_s$, selon son activité inhibitrice ou stimulante de l'adénylate cyclase, sous l'isoforme $G\alpha_{12/13}$ si elle active les RhoGEFS (« Rho-Guanosine Exchange Factors », ou Facteurs d'échanges de Guanosine de Rho) ou encore sous l'isoforme $G\alpha_q$ si elle active la phospholipase C (PLC) [21].

1.1.4.1 Récepteurs de chimiokines

Les récepteurs de chimiokines sont, tel qu'il a été mentionné précédemment, responsables de la transduction du signal apportée par les chimiokines, résultant normalement en une migration dirigée des cellules. À noter que certains récepteurs de chimiokines tels que CXCR7 ne peuvent pas enclencher les voies de chimiotaxie, mais jouent toutefois un rôle de régulateur de celles-ci [22]. Ils sont associés à la membrane externe des cellules, permettant ainsi la détection des messagers externes. Les voies de signalisation régulées par les récepteurs de chimiokines peuvent varier d'un récepteur à un autre. Cependant, il est pertinent de noter que seuls les récepteurs liés à la sous-unité $G\alpha_i$, non pas $G\alpha_s$, $G\alpha_{12/13}$ ou $G\alpha_q$, peuvent induire les processus de chimiotaxie via leur sous-unité $G\beta\gamma$ [23]. Ainsi, les voies de signalisation menant à la chimiotaxie sont relativement universelles et conservées à travers les récepteurs de chimiokines induisant la chimiotaxie.

1.1.4.2 Signalisation des récepteurs de chimiokines

1.1.4.2.1 Les protéines G hétérotrimériques et leur activation

Tel que leur nom l'indique, les RCPGs sont liés à des protéines G hétérotrimériques. Ce complexe protéique est lui-même séparé en trois sous-unités : la sous-unité $G\alpha$, la sous-unité $G\beta$ et la sous-unité $G\gamma$. Les sous-unités $G\beta$ et $G\gamma$ sont référées en tant qu'une seule sous-unité appelée « sous-unité hétérodimérique $G\beta\gamma$ ». Contrairement à la protéine $G\alpha$, elles forment un complexe indissociable lors de la signalisation intracellulaire, et ne peuvent se séparer que sous des conditions dénaturantes [24].

La liaison non covalente de la chimiokine au récepteur entraînera un changement de conformation dans la structure tridimensionnelle du récepteur de chimiokines; le récepteur est ainsi sous sa forme active [25-27]. Ce changement de conformation favorisera l'échange du GDP de la sous-unité $G\alpha$ pour un GTP [28]. La sous-unité $G\alpha$ ainsi activée peut se détacher du récepteur ainsi que de la sous-unité $G\beta\gamma$, et se relocaliser auprès de son ou ses effecteurs. La relâche de la protéine $G\alpha$ permet par la suite à la sous-unité hétérodimérique $G\beta\gamma$ d'activer ses propres effecteurs [28].

1.1.4.2.2 Les $G\alpha$

Chez les mammifères, la sous-unité $G\alpha$ se présente sous diverses formes selon le récepteur impliqué : il peut s'agir de la $G\alpha_i$, la $G\alpha_s$, la $G\alpha_q$, la $G\alpha_{12/13}$ ou de la $G\alpha_t$. Tel qu'il a été mentionné antérieurement, seuls les récepteurs liés à la $G\alpha_i$ engagent la chimiotaxie. Cependant, même si les conditions exactes de son implication restent incomprises, nous aborderons aussi le rôle possible de la sous-unité $G\alpha_{12/13}$ dans les processus signalétiques de la chimiotaxie.

Lorsque le récepteur est activé par sa chimiokine, la sous-unité $G\alpha_i$ activée se dissocie du récepteur afin de réguler négativement l'adénylate cyclase [17]. L'adénylate cyclase est l'enzyme responsable de la conversion de l'ATP en AMPc, une molécule pouvant activer la PKA (Protéine Kinase A), une kinase ubiquitaire qui permet, entre autre, d'inactiver la « Myosine Light Chain (MLC) Kinase (MLCK)», ou kinase des chaînes légères de la myosine I, et favorise le recrutement du phosphatidyinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3) à la membrane [29-32].

L'activation de la $G\alpha_{12/13}$ permet à celle-ci de se dissocier du récepteur et ainsi d'activer les RhoGEFs. Les effets de cette activation seront approfondis à la section « 1.1.4.2.4.2 Cascade $G\alpha_{12/13}$ -dépendante ».

1.1.4.2.3 La Gβγ

L'activation de la protéine Gα permet à l'hétérodimère Gβγ de se dissocier du récepteur, le rendant ainsi actif [28]. La chimiotaxie est produite par la cascade signalétique des protéines G [33]. Ainsi, il a été démontré que lorsque la Gαi est inhibée par la toxine pertussique (*pertussis toxin*, ou PTX), elle ne peut plus échanger son GDP pour un GTP et ne peut se dissocier du complexe, empêchant la chimiotaxie CXCR4/CXCL12 chez les cellules T [34]. Les cibles primaires de Gβγ sont la protéine « Rat sarcoma virus-derived » (Ras) et la kinase de PIP3, PI3K.

1.1.4.2.4 Les cascades signalétiques G-dépendante

Les voies de signalisation des protéines G influençant la chimiotaxie peuvent être divisées en deux grandes cascades : la première, celle de la Gαi/Gβγ, et la deuxième, celle de la Gα12/13.

1.1.4.2.4.1 Cascade Gαi/Gβγ-dépendante

La Figure 3 ci-suivante illustre la cascade signalétique Gαi/Gβγ-dépendante.

La sous-unité Gβγ, tel que mentionné précédemment, se dissocie du récepteur lors de l'activation de la protéine Gαi. Ceci lui permet d'aller activer Ras, un activateur de PI3K, ainsi que PI3K, une kinase permettant la transformation du phosphatidyinositol-4,5-bisphosphate, ou PIP₂ en phospholipide chargé phosphatidyinositol-3,4,5-trisphosphate, ou PIP3 [35]. Le PIP3 contient un site de recrutement de protéines contenant des domaines « pleckstrin-homology » (PH) tels qu'Akt, les RacGEFs (« Ras-related C3 botulinum toxin Guanosine Exchange Factors ») et la myosine I [36-38]. La liaison à PIP3 permet l'activation de ces protéines reconnues comme jouant, entre autres, des rôles clés dans la chimiotaxie des cellules.

Les mécanismes d'implication de la kinase Akt dans la chimiotaxie ne sont pas encore tout à fait clairs, mais leur implication dans la chimiotaxie est sans équivoque : en 1999, par la

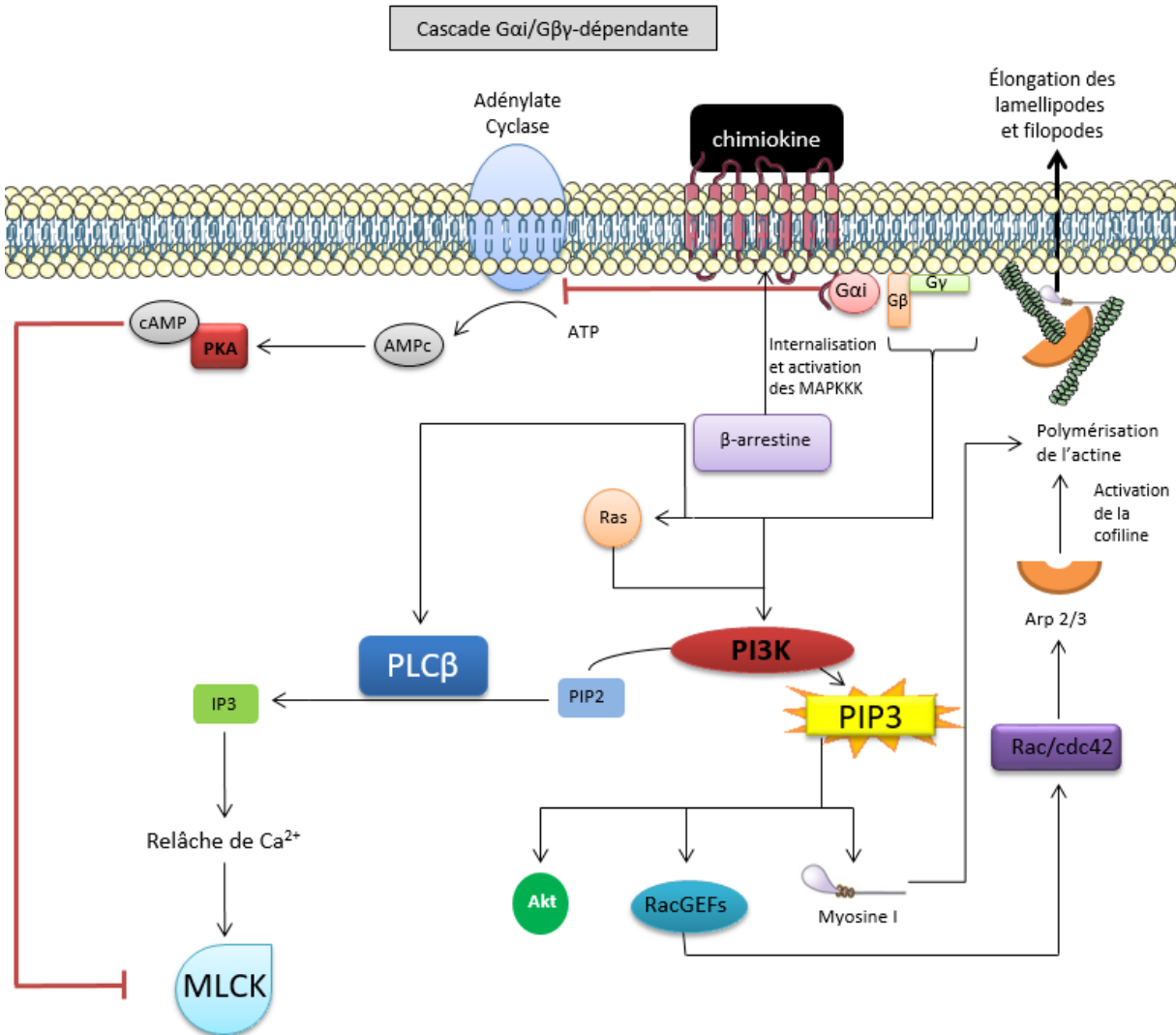


Figure 3. Illustration de la cascade Gαi/Gβγ-dépendante.

Cette image fut créée à partir de la banque d'images vectorielles *Servier's Vectorial Powerpoint images bank*. À noter que la représentation spatio-temporelle des protéines n'est pas respectée. Gαi, Gβ et Gγ signifient « les protéines G trimériques, sous-unité α, β ou γ ». cAMP ou AMPc signifie « adénosine monophosphate cyclique ». PKA signifie « protéine kinase A ». ATP signifie « adénosine triphosphate ». MAPKKK signifie « kinases des kinases des kinases des protéines activées par la mitose ». Ras signifie « rat sarcoma virus-derived ». IP3 signifie « inositol triphosphate ». PLCβ signifie « phospholipase Cβ ». PIP2 et PIP3 signifie « phophatidyinositol-4,5-bisphosphate » et « phophatidyinositol-3,4,5-trisphosphate », respectivement. Rac/cdc42 signifie « substrat C3, en relation avec Ras, de la toxine botulique/ Homologue de la protéine 42 contrôlant la mitose ». PI3K signifie « kinase de PIP3 ». Ca²⁺ signifie « ion calcium ». MLCK signifie « kinase de la chaîne légère de la myosine ». RacGEFs signifie « facteurs d'échange du guanosine de Rac (substrat C3, en relation avec Ras, de la toxine botulique) ». Une flèche signifie une relation de stimulation ou production, alors qu'une barre rouge signifie une relation d'inhibition.

méthode de mutation dirigée et imagerie de protéines de fusion, l'équipe du Dr Firtel réussit à démontrer l'activation d'Akt et sa relocalisation dans le cytoplasme chez *Dictyostelium discoideum* [39]. Un an plus tard, l'équipe du Dr Ratajczak démontra la phosphorylation d'Akt dans les progéniteurs des érythrocytes humains lors de l'activation des CXCR4 par CXCL12 [40]. Il semblerait qu'une des cibles de cette kinase soit la « p21-Activated Kinase a » (PAKa), une kinase requise dans l'assemblage de la myosine II [41].

Les RacGEFs permettent l'activation des GTPases Rac et Cdc42, que nous référerons sous la forme Rac/Cdc42. L'activation de Rac/Cdc42 amène à l'activation de WASP, la « Wiscott-Aldrich syndrom protein » ou protéine du syndrome de Wiscott-Aldrich, et de PAK1, qui eux-mêmes mènent à l'activation de Arp2/3 et la cofiline, respectivement [42-45].

L'activation de la cofiline permet à celle-ci de venir se lier à de nouveaux filaments d'actine. Cette liaison d'actine/cofiline favorise le recrutement de la protéine Arp2/3 lors de la polymérisation des filaments d'actine : elle n'est cependant pas essentielle à ce dit recrutement [46, 47]. La myosine I, activée par le PIP3, vient stabiliser cette polymérisation, ce qui permet à la cellule de produire des formations d'actines sous forme de pseudopodes.

Il existe une autre cible de la sous-unité G $\beta\gamma$, soit la Phospholipase C β , ou PLC β , dont le rôle primaire est la transformation de PIP2 (généralisé à partir de PIP3 par la phosphatase PTEN) en inositol trisphosphate, ou IP3 [48]. La formation d'IP3 contribue directement à la relâche d'ions calcium, Ca²⁺, dans le cytosol de la cellule; la présence de fortes concentrations de Ca²⁺ affecterait négativement la stabilité de l'adhésion des intégrines à la matrice extracellulaire [49, 50].

L'ion de calcium pourrait jouer un rôle dans la stabilité du cytosquelette en rendant ce dernier plus rigide et moins dynamique, tel qu'il a été démontré en 2005 par microscopie à force atomique par l'équipe du Dre Ostafin [51]. La libération de Ca²⁺ mène aussi à l'activation de la MLCK par des voies Ca²⁺/Calmoduline dépendantes [31]. Par ailleurs, il est intéressant de

noter que la phosphorylation de la MLCK par la PKA induit une inactivation de celle-ci; la PKA étant une kinase AMPc-dépendante, son activité est elle-même indirectement inhibée par l'action de la $G\alpha_i$ [52].

1.1.4.2.4.2 Cascade $G\alpha_{12/13}$ -dépendante

La Figure 4 illustre cette cascade signalétique.

La protéine $G\alpha_{12/13}$, quant à elle, permet l'activation des RhoGEFs, malgré que les détails exacts de cette activation soient, à ce jour, inconnus [53-55]. Cependant, l'activation des RhoGEFs mène à l'activation de la GTPase RhoA, qui elle-même mène à l'activation du complexe ROCK/RhoA (où ROCK signifie « kinase associée à Rho ») [56-58]. Ce complexe permet la phosphorylation de la sous-unité liant la myosine sur la MLC phosphatase (MLCP), la rendant ainsi inactive [59, 60]. Cette inhibition de la MLCP favorise l'activité kinase de la MLCK, permettant la phosphorylation de la myosine II; lorsque phosphorylée, la myosine II peut se lier aux filaments d'actine et déstabiliser leur formation tridimensionnelle par des mouvements de contractions [61].

1.1.4.2.5 La β -arrestine et la désensibilisation

Ces signalisations se poursuivront jusqu'à la désensibilisation du récepteur, c'est-à-dire le moment où de nouvelles protéines G ne pourront plus se lier au complexe récepteur/chimiokine et ainsi s'activer. La partie cytosolique du récepteur, son C-terminal, se fera phosphoryler à certains sites cibles par une GRK, « G proteins-coupled Receptor Kinase », permettant ainsi le recrutement de la β -arrestine au C-terminal du récepteur [62]. Cette liaison termine la première vague de signalisation (protéines G-dépendante) et commence la deuxième vague de signalisation, la β -arrestine-dépendante.

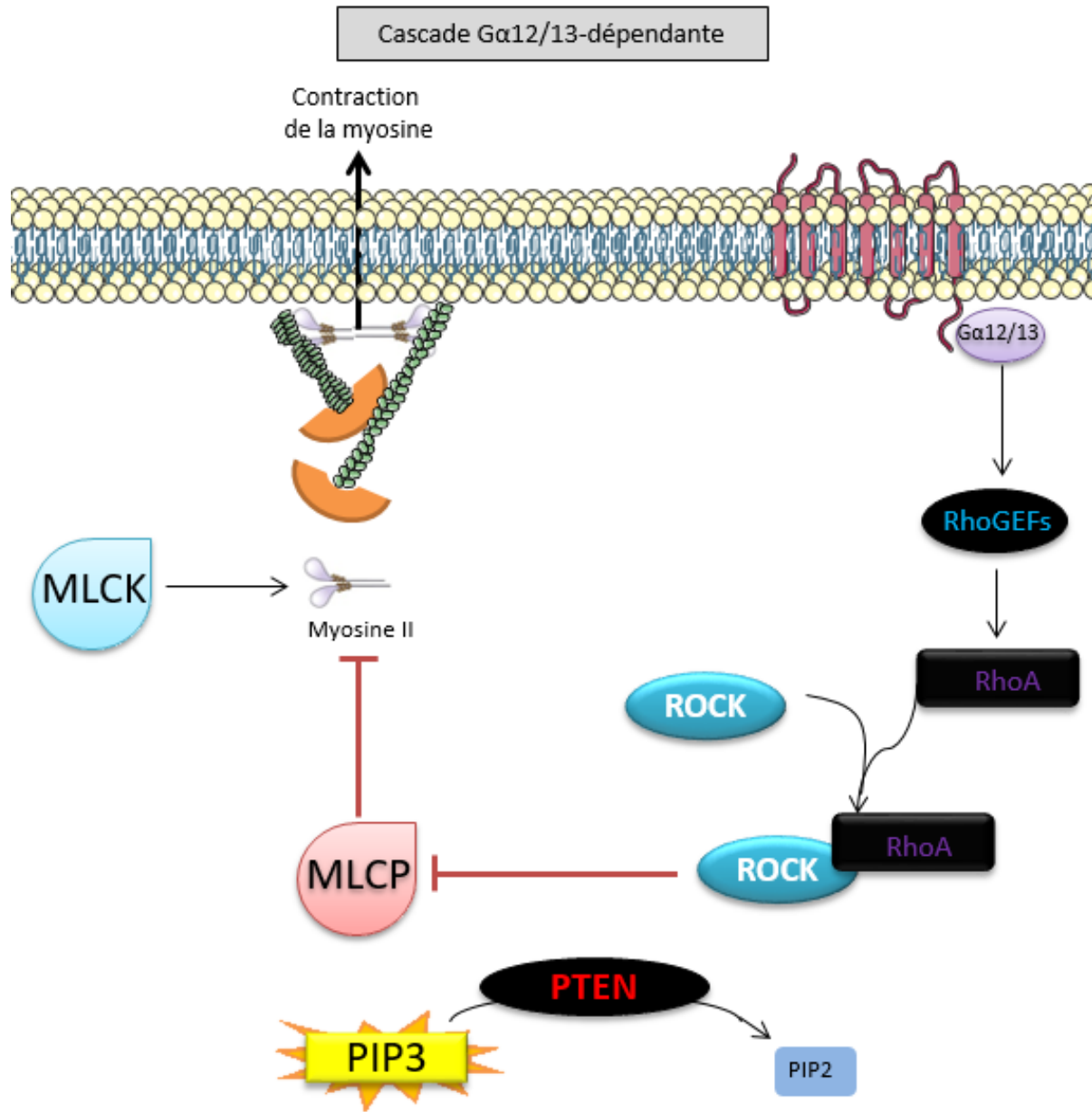


Figure 4. Illustration de la cascade Gα12/13-dépendante.

Cette image fut créée à partir de la banque d'images vectorielles *Servier's Vectorial Powerpoint images bank*. À noter que la représentation spatio-temporelle des protéines n'est pas nécessairement respectée. Gα12/13 signifie « les protéines G trimériques, sous-unité α12/13. MLCK signifie « kinase de la chaîne légère de la myosine ». RhoGEFs signifie « facteurs d'échange du guanosine de Rho (Homologue de la famille de gènes Ras) ». ROCK signifie « kinase associée à Rho ». RhoA signifie « Homologue de la famille de gènes Ras, membre A ». MLCP signifie « phosphatase de la chaîne légère de la myosine ». PTEN signifie « Phosphatase homologue de la tensin ». PIP2 et PIP3 signifie « phophatidyinositol-4,5-bisphosphate » et « phophatidyinositol-3,4,5-trisphosphate », respectivement. Une flèche signifie une relation de stimulation ou production, alors qu'une barre rouge signifie une relation d'inhibition.

La voie de signalisation β -arrestine-dépendante la mieux connue est certainement celle des *mitogen-activated protein kinase kinase kinase* ou MAPKKK, dont le résultat est l'activation de la kinase ERK 1/2 par phosphorylation. Les mécanismes de ERK 1/2 dans la chimiotaxie restent mal caractérisés, mais une étude menée en 2012 chez les neutrophiles suggère que le rôle de p-ERK 1/2 serait de terminer la migration des cellules. Toutefois, cette activité serait inhibée par la p38 activant les GRK lorsque la polarisation unipolaire n'est plus détectable [63]. De plus amples études seront requises pour mieux comprendre ce phénomène de terminaison possiblement engendré par la phosphorylation de ERK 1/2. À noter que certaines voies dépendantes des protéines G hétérotrimériques permettent aussi l'activation de ERK 1/2, mais les mécanismes restent à explorer [64].

La liaison de la β -arrestine au récepteur promeut aussi la formation des puits de clathrines [65]. Les puits de clathrines permettent l'endocytose du récepteur toujours lié à sa chimiokine, amenant ainsi à la dégradation de cette dernière et au recyclage ou à la dégradation du récepteur. Ce phénomène est appelé le « scavenging » des chimiokines et est nécessaire au maintien d'un gradient favorable à la chimiotaxie lorsque les concentrations de chimiokines deviennent trop élevées *in vivo*, tel que démontré par Boldajipour en 2008 : lorsqu'un *knockdown* de CXCR7 est effectué dans les embryons de poissons-zèbres, le développement embryonnaire révèle que les cellules n'ont pu suivre les gradients chimiotactiques [66]. Ce phénomène est aussi observable par l'injection de morpholinos dans les embryons, mais est réversible lorsque des morpholinos réduisent la production de CXCL12 : Boldajipour et ses collaborateurs démontrent donc que ce phénomène dépend de la proportion et relation entre les niveaux d'expression du récepteur CXCR7 et de la chimiokine CXCL12.

Dans le cas de la chimiokine CXCL12, il est à noter que seul CXCR7 démontre une activité de *scavenging*. Aucune preuve à ce jour, ni dans les publications connues, ni dans les expériences au laboratoire, n'a pu démontrer une activité de dégradation de CXCL12 par CXCR4 [67]. Le rôle de la β -arrestine par rapport à la signalisation de CXCR4 semble donc être simplement d'internaliser le récepteur afin d'arrêter la signalisation par les protéines G hétérotrimériques

et non de maintenir un gradient externe de chimiokines par *scavenging*. Le manque de récepteurs *scavenger* n'inhibe cependant pas la réponse chimiotactique, mais la limite à des concentrations plus faibles de chimioattractants.

1.1.4.3 Polarisation des cascades signalétiques des protéines G

La distribution intracellulaire des cascades signalétiques des différentes protéines G impliquées dans la chimiotaxie mentionnées précédemment n'est pas uniforme. Effectivement, si la cellule doit acquérir une direction dans son mouvement, il faut que les cascades signalétiques au pôle dirigeant soient différentes de celles à la queue traînante et sur les côtés de la cellule.

1.1.4.3.1 Au pôle dirigeant

Le pôle dirigeant est l'extrémité de la cellule où le cytosquelette est le plus actif, car cette extrémité doit promouvoir l'extension des pseudopodes sur la matrice extracellulaire sur laquelle se déplace la cellule.

C'est ici qu'on retrouve la cascade G α i/G $\beta\gamma$ -dépendante menant à l'activation de la PI3K, des RacGEFs et de la polymérisation d'actine liée à la myosine I. Lorsque marquée avec une protéine fluorescente, il est possible de voir par microscopie que la PI3K n'est recrutée qu'à la membrane du pôle dirigeant, tel que l'a démontré Funamoto en 2002 [68]. Lorsque stimulées par un gradient chimioattractants, les cellules de levure altèrent la composition spatio-temporelle de leur cytoplasme, le tout marqué par une redistribution de la PI3K au pôle dirigeant. Par conséquent, il en va de même pour la présence de PIP, normalement associé au cytosquelette actif [69].

L'activation de Rac menant à la polymérisation de nouveaux filaments d'actine par embranchement sur le cytosquelette de microtubules permet à la cellule de former des extensions aplaties de son cytoplasme appelées les lamellipodes [70, 71]. Ceux-ci servent à propulser la cellule [72]. Sur ces lamellipodes se formeront des filopodes, de plus petites

extensions d'actine cylindriques dont le rôle est de trouver des points d'ancrage dans la matrice extracellulaire [72]. Leur formation est dirigée par Cdc42 [70, 73].

La combinaison lamellipodes/filopodes permet donc à la cellule de se projeter vers le gradient de chimiokines favorables et de créer un point d'ancrage dans la matrice extracellulaire. Cependant, c'est la contraction dans la queue traînante qui donne le mouvement de propulsion.

1.1.4.3.2 Dans la queue traînante

La queue traînante est l'extrémité qui se contractera afin de donner la force motrice à la cellule pour permettre le déplacement. Elle est en opposition diamétrale quant à ses modes d'activation par rapport à la prolongation des pseudopodes du pôle dirigeant. Cette extrémité implique la voie $G\alpha_{12/13}$ passant par les RhoGEFs, la formation du complexe ROCK/RhoA et l'activation de la myosine II engendrant la contraction des filaments d'actine déjà formés.

De plus, cette extrémité ne comportant pas la voie $G\alpha_i/G\beta\gamma$ -dépendante, l'activation de PI3K n'est ici pas possible. En fait, on y retrouve la protéine exerçant le rôle opposé, soit PTEN [68]. Dans la queue traînante, c'est donc le phospholipide PIP_2 qui prédomine. PIP_2 peut être transformé en IP3 par la $PLC\beta$, elle-même activée par le dimère $G\beta\gamma$, menant à la relâche de Ca^{2+} et donc, l'activation de MLCK et de la myosine II. Il a été démontré que les concentrations d'ions calcium dans la cellule sont sous forme de gradient avec la portion plus concentrée au niveau de la queue traînante et la moins concentrée au niveau du pôle dirigeant [74].

C'est donc dans cette extrémité que la contraction de la myosine sur les filaments d'actine déjà présents permet de créer un mouvement de propulsion du contenu de la cellule vers les lamellipodes/filopodes.

1.1.4.4 Maintien de l'asymétrie des voies de signalisation protéines G-dépendantes

Le phénomène d'asymétrie dans la polarité de la cellule est bien documenté. Néanmoins, la question à savoir quels sont les mécanismes exacts impliqués dans ce phénomène n'a toujours pas été résolue à ce jour. Toutefois, il a été démontré que Rac/Cdc42 et RhoA joueraient un rôle essentiel dans le maintien de la polarisation de la cellule. Nous avons précédemment illustré que ces GTPases sont responsables, respectivement, du prolongement des lamellipodes et des filopodes par la polymérisation de nouveaux filaments d'actine au pôle dirigeant et de la contraction des structures d'actines existant dans la queue traînante par l'entremise de la myosine II. Afin d'assurer une migration dirigée, il est essentiel que Rac/Cdc42 et RhoA n'entrent pas en conflit spatiotemporel l'une avec l'autre.

Ainsi, en 2003, une équipe de New York a démontré la régulation négative de RhoA par des mécanismes Rac-dépendant [75]. Ainsi, Rac activerait des dérivés réactifs de l'oxygène, ou ROS pour « Reactive Oxygen Species ». Ces ROS permettent l'activité de la GTPase responsable d'inhiber RhoA [75]. C'est ainsi que Rac prévient l'activité de RhoA au pôle dirigeant.

Afin de prévenir l'apparition de lamellipodes et filopodes dans la queue traînante, des mécanismes RhoA-dépendant sont requis pour inhiber l'activité de Rac, tel qu'il a été démontré par Ohta et al. en 2006 [76]. La formation du complexe ROCK/RhoA permet la phosphorylation du complexe Filamina/FilGAP, un complexe protéique exerçant une activité inhibitrice de Rac [76]. De plus, le complexe ROCK/RhoA permet l'activation de la LIM Kinase, une enzyme dont l'activité de phosphorylation permet de rendre inactif la cofiline [76]. Tel que mentionné, la cofiline est essentielle dans la polymérisation des filaments d'actine au pôle dirigeant.

1.1.5 CXCR4 comme modèle de récepteur de chimiokine

Dans le cadre du projet actuel, nous avons décidé de choisir le récepteur de chimiokines CXCR4 comme modèle de récepteur de chimioattractants. Typiquement, CXCR4 est associé aux cellules souches et permet leur migration dans les niches de la moelle osseuse [4, 77].

Cette migration est orientée par la seule chimiokine de CXCR4 : CXCL12 [78-80]. À noter, CXCR4 n'est pas le seul récepteur de CXCL12; le récepteur de chimiokine CXCR7 peut aussi engendrer des cascades signalétiques lorsque stimulé par CXCL12 [81]. Le récepteur CXCR7 n'enclenche cependant pas la chimiotaxie, car il ne lie pas G α i; il est plutôt responsable du « scavenging » de CXCL12 [66].

CXCR4 est typiquement connu pour s'associer à G α i [82, 83]. Par contre, son interaction avec G α 12/13 a été démontrée en 2006 par Tan et al. par des essais d'immunoprécipitation, en plus de démontrer leur rôle commun d'activation de la voie RhoGEFs dans la chimiotaxie [54]. Cette même interaction fut reportée quelques années plus tard par deux autres équipes de façon plus exhaustive [53, 55]. Malgré cela, l'association préférentielle de CXCR4 pour G α i ou G α 12/13 selon les conditions reste partiellement incomprise.

1.2 Cycle cellulaire

La division cellulaire est le processus biologique permettant l'accroissement d'une population de cellules. Elle permet la réplication d'une cellule mère en deux cellules filles, doublant ainsi la population initiale de cellules. Dans le corps, ce processus permet la production de cellules spécialisées à partir des cellules souches, ou encore la duplication de cellules spécialisées lorsque nécessaires : lors de la présentation d'antigènes durant la réponse immunitaire, les lymphocytes T spécifiques amplifieront leur population afin de mieux combattre l'agent infectieux [84, 85].

1.2.1 Les phases du cycle cellulaire

Avant de pouvoir se dupliquer, une cellule doit traverser diverses phases et points de contrôle cellulaires afin d'assurer la réussite de la réplication : c'est ce qu'on appelle le cycle cellulaire.

1.2.1.1 La phase G1

La cellule doit d'abord accumuler les ressources nécessaires à la duplication de son matériel génétique : les protéines impliquées dans la réplication de l'ADN, les nucléotides qui serviront à répliquer le matériel génétique, les sources d'énergie comme l'ATP, etc. Celles-ci s'accumuleront dans le cytoplasme de la cellule et l'amèneront ainsi à augmenter sa taille. Cette phase est appelée le « Gap 1 », ou phase G1 et permet à la cellule d'assurer le bon déroulement de la prochaine phase, la phase de synthèse ou phase S.

1.2.1.2 La phase S

Comme son nom l'indique, la phase de synthèse (phase S) permet à la cellule de dupliquer son matériel génétique en préparation de la division cellulaire. Elle passe donc d'un état « $2n$ » de l'ensemble de chromosomes (diploïdie) à un état dit « $4n$ » (tétraploïdie). Afin de doubler son matériel génétique, la cellule doit consommer une certaine portion des ressources accumulées durant la phase G1. Avant de pouvoir se diviser en deux cellules filles, elle doit repasser par un deuxième « Gap » appelé la phase G2.

1.2.1.3 La phase G2

La phase G2 possède essentiellement le même rôle que la phase G1. Effectivement, la cellule accumulera des ressources au cours de la G2, mais cette fois, en prévision de la division cellulaire. Cependant, cette étape permet aussi à la cellule d'établir des points de contrôle, car les dommages à l'ADN causent l'activation du suppresseur de tumeur p53 [86]. Ainsi, la présence de la phosphoprotéine p53 amène à l'arrêt de la progression du cycle cellulaire, et ce, jusqu'à la réparation des dommages à l'ADN ou jusqu'à la mort cellulaire [86].

À un certain moment durant la phase G2, mais juste avant la phase de mitose, l'état de polarisation de la cellule passera à un état bipolaire, afin de pouvoir procéder à la séparation des cellules filles.

1.2.1.4 La mitose

La phase M, ou mitose, comporte toutes les étapes entre la condensation des chromosomes, leur alignement sur le fuseau mitotique jusqu'à la séparation de la cellule mère afin d'obtenir deux cellules filles. À noter que certains types cellulaires emploient la mitose sans toutefois donner deux cellules identiques, mais nous n'aborderons pas cet aspect.

1.2.1.5 La phase G0

Certaines cellules peuvent sortir des quatre étapes du cycle cellulaire : leur rôle n'est donc plus de se reproduire. On appelle cette phase la phase G0, où la cellule n'accumule que les ressources nécessaires à sa survie, souvent dans le cas de cellules matures. Cette phase ne sera pas abordée dans la présente étude.

La représentation du cycle cellulaire est illustrée à la Figure 5.

1.2.2 Les CDK/cyclines

La progression entre les phases du cycle cellulaire n'est pas aléatoire : elle est régulée par des points de contrôle biochimiques qui permettent d'assurer que la cellule est passée par certaines étapes, ou qu'elle a accumulé assez de réserves avant de procéder à l'étape suivante. Ces régulateurs du cycle cellulaire sont appelés les cyclines. Elles ont été observées pour la première fois par microscopie en 1983 par Evans et Hunt sous la forme de mRNAs qui apparaissaient et disparaissaient avant et après la mitose [87]. Leur transcription et synthèse sont donc régulées par le cycle cellulaire. À l'époque, Evans et Hunt ne purent donner un rôle spécifique à ces protéines. Nous savons maintenant que les cyclines sont des protéines régulatrices qui permettent d'activer les *cyclin-dependant kinase* ou CDK [88]. Les CDK sont des kinases qui normalement ne possèdent qu'une très faible activité enzymatique. Cependant, lorsque liées aux cyclines, elles deviennent hautement actives et permettent la phosphorylation de certaines cibles spécifiques. Par exemple, le couple CDK1/cycline B est un complexe ATP-dépendant permettant la progression de la cellule de la phase G2 jusqu'à la mitose. Une inhibition de ce complexe mène à un arrêt de la cellule à la frontière G2/M. La

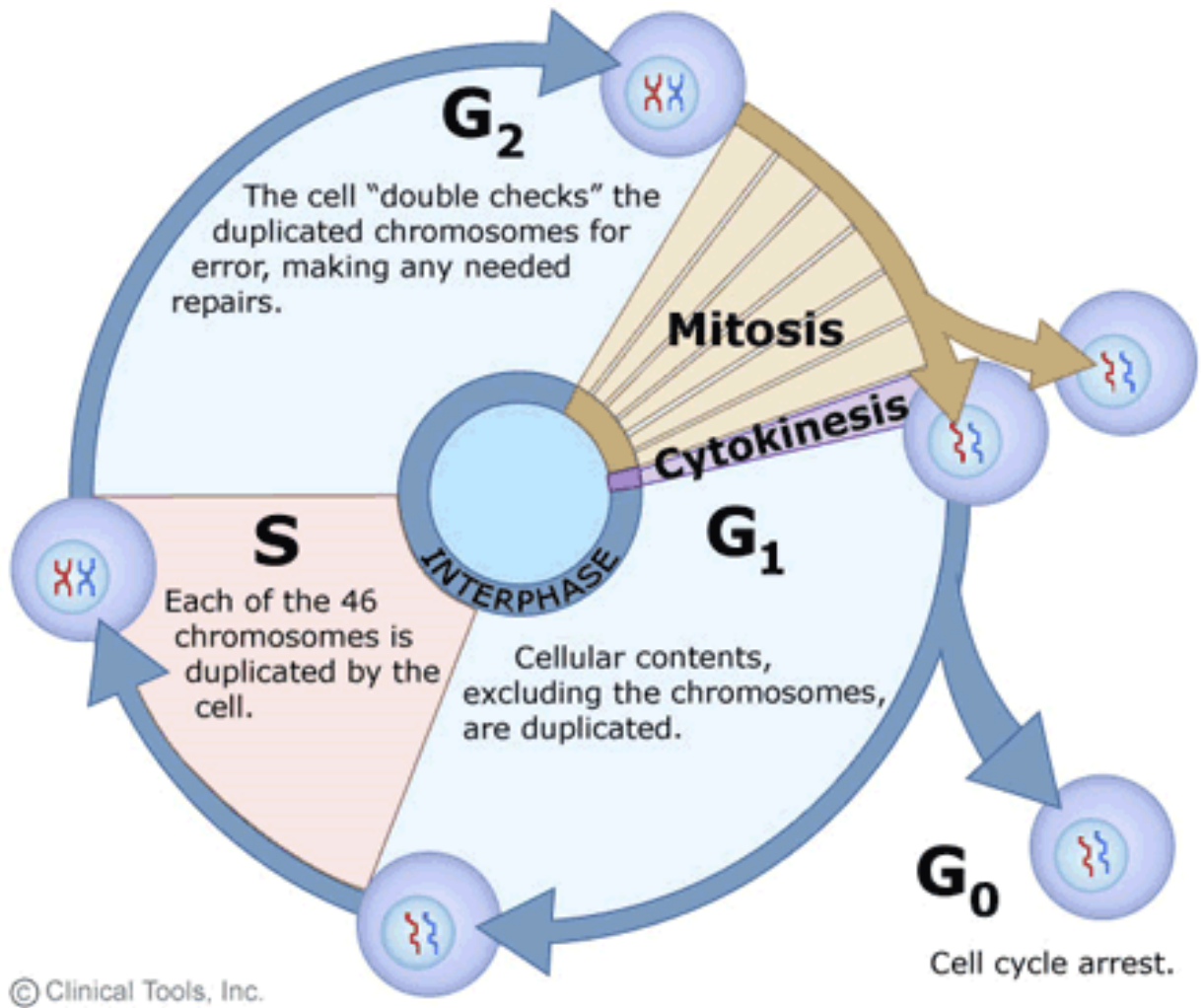


Figure 5. Représentation des diverses phases du cycle cellulaires

Cette image est tirée de « University of Leicester, Department of Genetic, The cell cycle, mitosis and meiosis, [En ligne], <http://www2.le.ac.uk/departments/genetics/vgec/schoolscolleges/topics/cellcycle-mitosis-meiosis> » (Page consultée le 4 avril 2016).

transition entre la phase G1 et la phase S est induite par la cycline D couplée au dimère CDK4/6. L'inhibition de la formation du complexe Cdk4/6 bloque la transition vers la phase S du cycle cellulaire.

La sous-unité cycline du complexe CDK/cycline permet donc de réguler l'activation du complexe, alors que la sous-unité CDK est responsable de l'activité catalytique du complexe.

1.2.3 Polarisation bipolaire

La mitose requiert un mode de polarisation dit bipolaire. Afin de pouvoir assurer une division efficace qui résultera en deux cellules identiques et fonctionnelles, les deux moitiés de la cellule devront attirer de façon équitable les ressources disponibles ainsi que le matériel génétique. Le matériel génétique est condensé sous forme de chromosomes à la plaque mitotique : la plaque mitotique forme ligne de symétrie dans la polarisation bipolaire. C'est aussi à la plaque mitotique que l'anneau contractile scindera la cellule mère en deux cellules filles [89].

Les extrémités opposées à la plaque mitotique qui formeront les cellules filles sont à l'origine du cytosquelette actif dans la mitose. Lors de la phase S, le centrosome, composé de deux centrioles, se dupliquera en prévision de la phase de bipolarité [90]. À la fin de la phase G2 et au début de la mitose, les centrosomes commencent à migrer aux deux extrémités opposées de la cellule [90]. Lorsque migrés aux extrémités de la cellule, les kinétochores liés aux microtubules forment la structure cytosquelettique permettant aux centrosomes de tirer sur le matériel génétique condensé lors de la phase M.

La cellule en mitose forme donc une structure polarisée de manière bipolaire : les extrémités tirant sur les chromosomes et la plaque mitotique. Or, cette phase de bipolarité doit déjà être entamée lorsque la cellule commence la mitose. C'est ainsi qu'en 1985, Mitchison et Nurse ont remarqué par microscopie que chez la levure *S. pombe*, durant la phase G2, la cellule commençait à faire croître son extrémité correspondant à l'une des futures

cellules filles; c'est ce qu'ils ont appelé le *New End Take Off* ou NETO [91]. Le NETO serait l'étape où la cellule entame son remodelage du cytosquelette passant d'un état unipolaire à un état bipolaire.

1.3 Rôles, lors de la mitose, des protéines impliquées dans la chimiotaxie

En contraste avec le mode de polarisation unipolaire de la chimiotaxie mentionné précédemment, il semble évident que ce dernier et le mode de polarisation bipolaire de la mitose ne peuvent coexister (voir Figure 6). C'est ainsi dire qu'il existe un phénomène de dichotomie entre la chimiotaxie et la mitose (et donc par extension la phase G2 post-bipolarisation). Cette dichotomie inclut effectivement la phase G2 à la frontière de la phase M, car selon le modèle du NETO, une cellule en phase G2 doit déjà avoir engagé un mode de polarisation bipolaire avant son entrée en mitose.

Cependant, ces deux phénomènes possèdent plusieurs similarités. Le pôle dirigeant de la cellule, responsable de l'extension des lamellipodes et filopodes durant la chimiotaxie, ressemble aux deux extrémités polarisées qui attireront les chromosomes durant la phase G2/M. De plus, la queue traînante responsable de la contraction de la cellule lors de la chimiotaxie comporte de fortes similarités avec le centre d'une cellule qui donnera, lors de la mitose, la contraction nécessaire afin de diviser la cellule mère en deux cellules filles.

1.3.1 Les effecteurs de la chimiotaxie impliqués dans la division cellulaire

En effet, plusieurs effecteurs de la chimiotaxie précédemment mentionnés possèdent un rôle dans le processus de division cellulaire.

La protéine Gai est retrouvée à la plaque mitotique durant la mitose et se lie aux kinétochores afin de créer un lien entre ceux-ci et les chromosomes, tel que l'a démontré Crouch en 1997 chez les fibroblastes [92]. De plus, lorsque les fibroblastes sont traités à la PTX, un inhibiteur de la protéine Gai, il devient impossible pour les cellules de compléter la scission

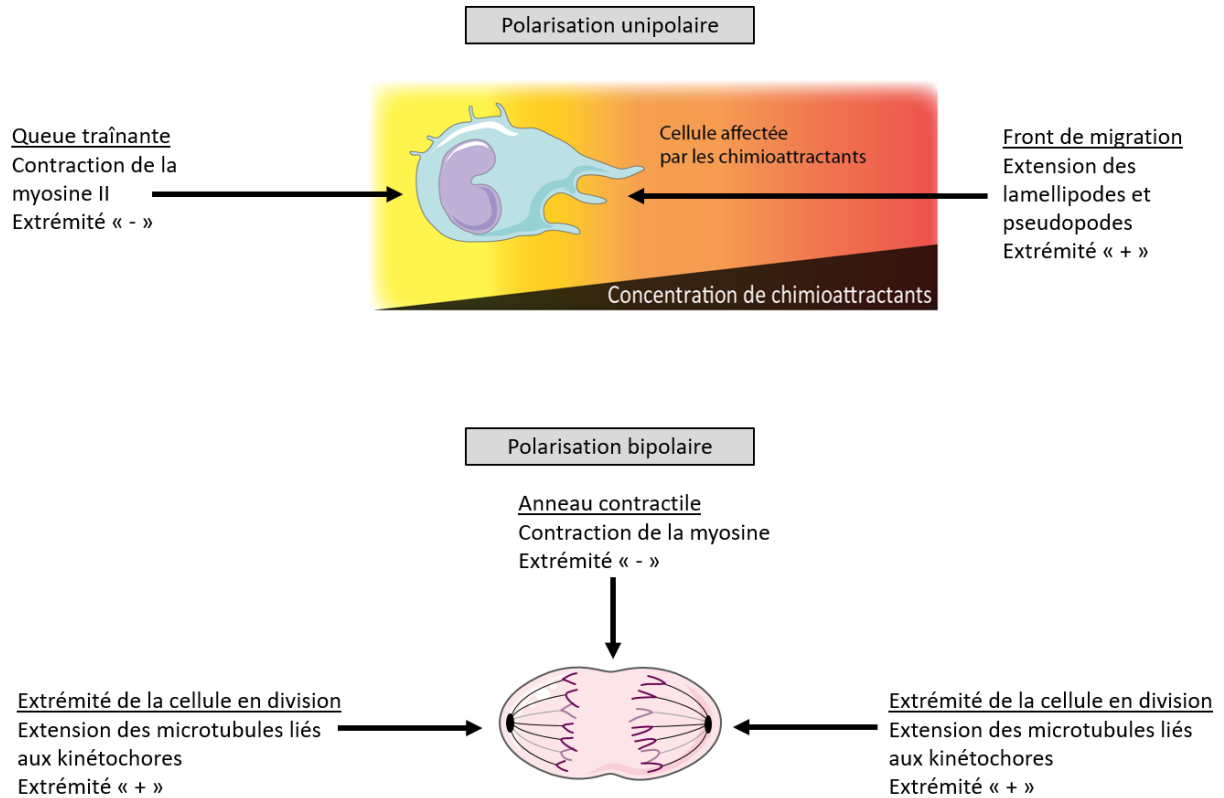


Figure 6. Les modes de polarisation unipolaire (chimiotaxie) et bipolaire (mitose) sont incompatibles de par leur nature.

La nomenclature des extrémités « + » et « - » est utilisée afin d'accentuer le parallèle entre les modes de polarisation. Cette image fut créée à partir de la banque d'images vectorielles *Servier's Vectorial Powerpoint images bank*.

en phase M, et ainsi procéder à la phase G1; elles ne peuvent se séparer et restent figées en mitose [92].

Durant la mitose, le dimère $G\beta\gamma$ et la β -arrestine se relocalisent aux centrosomes afin d'interagir avec la $\beta\gamma$ -tubuline (une protéine structurale requise dans l'assemblage des microtubules); une inhibition du dimère $G\beta\gamma$ ou de la β -arrestine altère l'orientation de la plaque mitotique. [93, 94].

Dans la chimiotaxie, la PI3K est séquestrée au pôle dirigeant, alors que PTEN est assigné à la queue traînante. Ainsi, Janetopoulos a démontré en 2005 que cette distribution se transpose au niveau de la mitose : lors de la division chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*, PI3K se retrouve aux extrémités qui donneront les cellules filles, alors que PTEN se retrouve sur la plaque mitotique [95]. Leur rôle respectif reste à ce jour incompris, mais nous savons que PIP3 est normalement associé à la membrane cellulaire du cytosquelette actif (polymérisation de l'actine lors de la chimiotaxie, extension des microtubules à partir des centrosomes lors de la mitose).

Finalement, les Rho GTPases jouent aussi des rôles cruciaux dans la mitose : Rac/Cdc42 est un régulateur de l'attachement des bras de microtubules sur les kinétochores alors que RhoA est requis à la plaque mitotique dans l'assemblage de l'anneau contractile [96-98].

Ainsi, il semble évident qu'afin de préserver l'intégrité d'une cellule, celle-ci n'engagera pas les mécanismes de chimiotaxie lorsqu'elle se divise et vice-versa. En 2005, Janetopoulos fut le premier à décrire cette dichotomie entre chimiotaxie et mitose chez l'amibe *Dictyostelium discoideum* [95]. Cependant, aucune équipe n'a démontré le modèle de type NETO, qui prévoit la bipolarisation de la cellule avant son entrée en G2, chez les cellules humaines. De plus, aucune recherche à ce jour ne s'est penchée sur les mécanismes régulant ce phénomène de dichotomie. Finalement, cette dichotomie n'a toujours pas été démontrée chez les cellules du corps humain.

1.4 Objectifs

Dans cette étude, nous tenterons de démontrer la dichotomie entre chimiotaxie et la mitose/G2-post bipolarisation, laquelle n'a jamais été mise en évidence dans les cellules de mammifères. Dans un deuxième temps, nous tenterons de contribuer à la compréhension des mécanismes impliqués dans cette dichotomie. Nous utiliserons comme modèle les cellules Reh, une lignée cellulaire de lymphocytes pré-B exprimant le récepteur CXCR4 à leur surface et répondant par chimiotaxie à la présence d'un gradient de concentration de la chimiokine CXCL12 [99].

Pour ce faire, nous poursuivrons les objectifs suivants :

- i) Tester si les cellules Reh synchronisées à la frontière de la phase G2 et de la mitose répondent toujours par chimiotaxie aux chimiokines;
- ii) Tester l'expression en surface de CXCR4 des cellules Reh lors de la synchronisation à la frontière des phases G2/M;
- iii) Tester l'endocytose de CXCR4 par la stimulation avec CXCL12 sur les cellules Reh lors de la synchronisation à la frontière des phases G2/M;
- iv) Tester la réponse de la voie $G\alpha i$ CXCR4/CXCL12-dépendante lors de la synchronisation des cellules Reh à la frontière des phases G2/M;
- v) Tester la phosphorylation de ERK 1/2 lors de la stimulation au CXCL12 des cellules Reh lors de la synchronisation à la frontière des phases G2/M;

2. Matériels et méthodes

2.1 Plasmide

Le plasmide pcDNA3.1+-GFP10-Epac-Rluc3 fut digéré à l'aide de NheI et XbaI, puis inséré dans pCCLsin-hPGK vide par la méthode de Gibson Assembly (New England Biolab, Canada) afin d'obtenir le plasmide pCCLsin-hPGK-GFP10-Epac-Rluc3 [100]. pCCLsin est un vecteur dont l'expression est possible lors de l'infection lentivirale, hPGK est un promoteur endogène chez l'humain, et GFP10-Epac-Rluc3 nous permettra d'obtenir le rapporteur BRET nécessaire à l'étude des mesures de l'activité de la protéine Gai [101-103].

2.2 Les cellules Reh et CXCR4

La lignée cellulaire lymphoïde pré-B Reh possède un taux de division élevé (le temps de duplication est de 18 heures). Elle exprime fortement le récepteur CXCR4 à leur surface, et répond aux signaux chimiotactiques engendrés par la chimiokine CXCL12 [99]. Cette lignée est donc dotée des capacités requises pour l'étude de la dichotomie entre chimiotaxie et mitose, et a été choisie comme cellule modèle.

2.3 Culture cellulaire

Les cellules Reh ont été cultivées dans un milieu *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) complétement avec 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté (Wisent, Rocklin, CA) et 100 unités/mL de pénicilline/streptomycine, selon les spécifications techniques de ATCC [104].

2.4 Arrêt de cycle cellulaire et marquage au propidium iodide

Afin de synchroniser les cellules Reh en phase G2 ou G1, et pour le contrôle « non synchronisées », elles sont mises en présence des inhibiteurs RO3306 10 μ M (resuspendu dans le DMSO), PD0339921 3 μ M (resuspendu dans le DMSO), ou une quantité équivalente de DMSO pendant 20 heures, respectivement. Le RO3306 est un inhibiteur compétitif de l'ATP sur le couple CDK 1/cycline B, bloquant ainsi la progression des cellules de la phase G2 à la

mitose : les cellules sont donc à la frontière G2/M, mais ne sont pas en mitose [105]. Quant au PD0339921, il s'agit d'un inhibiteur compétitif sur la CDK4, inhibant les cellules en phase G1. Les quantités utilisées proviennent de tests d'optimisation faits au laboratoire de recherche et non dévoilés dans le présent travail. Les cellules sont ensuite diluées dans de l'éthanol 70 % froid dans un rapport 1 : 9 (volume final 10 mL) goutte à goutte, puis incubées à -20 °C pendant 24 heures [106]. L'incubation dans l'éthanol froid permet de créer des pores dans les cellules, sans endommager le matériel génétique ni déchirer les cellules, en plus de retirer les molécules d'eau à l'intérieur de la cellule, ce qui facilitera la coloration au propidium iodide (PI) [107]. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans la solution de coloration au PI (PBS RNase A 100 µg/mL, PI 100 µg/mL) où elles ont incubées pendant 30 minutes à température ambiante. Le PI est un agent intercalant de l'ADN dont la fluorescence peut être détectée à une longueur d'onde d'excitation/émission de 550/635 nm [108]. Les cellules ont ensuite été passées au cytomètre en flux (BD FACScalibur, BD Bioscience, USA) afin de quantifier la fluorescence du PI : l'intensité de la fluorescence (exprimée en unités arbitraires) est proportionnelle à la quantité d'ADN contenue dans la cellule. Un signal de 200 u.a. nous indique la présence de deux molécules d'ADN dans les cellules, alors qu'un signal à 400 u.a. nous indique la présence de quatre molécules d'ADN (elles ont donc été dupliquées) [109]. Un signal étendu entre ces deux pics « 2n » et « 4n » nous indique un état intermédiaire entre deux et quatre séries de chromosomes. Les données sont montrées en nombre de cellules en fonction des u.a. de PI.

2.5 Essais de chimiotaxie

La chimiokine CXCL12 recombinante (Peprotech, USA) est resuspendue à des concentrations indiquées variant de 1 µM à 1 pM dans le milieu de migration (RPMI 1 % BSA) et distribuées dans les puits d'une plaque 96 puits de migration Chemo Tx © de Neuro Probe, inc [110]. Les cellules Reh sont resuspendues à 4×10^6 cellules/mL dans le milieu de migration, puis distribuées sur la membrane de migration à 10 000 cellules/puits (un puits mesure 3,2 mm de diamètre, donc 8 mm²), où elles incuberont à 37 °C pendant 3 heures. La membrane est ensuite retirée et les cellules ayant migré dans les puits sont comptées avec des plaques

de comptage et un compteur Bio Rad TC 20 *Automated Cell Counter* [110]. Les données sont montrées en cellules ayant migrées en fonction de la concentration de CXCL12.

2.6 Endocytose de CXCR4

Les cellules Reh sont resuspendues à 4×10^6 cellules/mL dans du RPMI non complémenté pendant 1 heure avant l'essai. La chimiokine CXCL12 est diluée dans du RPMI non complémenté, puis mise en présence des cellules Reh à 37 °C. Des fractions sont recueillies à différents temps; l'endocytose est arrêtée par mélange à du PBS froid, sur glace, à proportion de 1 : 9 [111]. Les cellules sont ensuite centrifugées à 500 g pendant 7 minutes à 4 °C, avant d'être incubées pour 30 minutes dans une solution de marquage (PBS 1 % sérum de veau foetal décomplémenté, 10 µg/mL d'anticorps Anti-CXCR4 couplé à la phycoérythrine (1D9) (BD Bioscience) à 4 °C [111]. Les cellules sont ensuite analysées au cytomètre en flux afin de quantifier la fluorescence de la phycoérythrine à 575 nm [111, 112]. Les données sont montrées en pourcentage de récepteurs demeurant en surface. L'intensité de fluorescence de cellules non-traitées au CXCL12, moins la fluorescence de cellules non-marquées, constituent alors 100%.

2.7 Infection lentivirale

Des cellules fibroblastiques embryonnaires de reins humains (HEK) 293T ont été cultivées dans un milieu *Dupleco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) complémenté avec 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté (Wisent, Rocklin, CA) et 100 unités/mL de pénicilline/streptomycine, jusqu'à ce qu'elles atteignent environ 50 % de confluence (5×10^6 cellules/mL) dans un flasque T175. Les cellules ont ensuite été transfectées par la méthode du polyéthylènimine avec un mélange de 6 µg de plasmide REV, 7,8 µg de plasmide VSVG, 15 µg de plasmide gag-pol, 10 µg de plasmide pCCLsin-hPGK-GFP10-Epac-Rluc3 [101, 103]. Les cellules ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 24 heures, avant de récupérer le surnageant qui a été conservé à 4 °C. Les cellules ont ensuite été remises en culture dans du DMEM complet pour 24 heures supplémentaires. Le surnageant a ensuite été récupéré et ajouté à la

fraction précédente, et centrifugé à 50 000 g pendant 2 heures à 4 °C [101]. Le culot contenant les particules virales a été resuspendu dans 50 µL de PBS. Les cellules Reh ont ensuite été incubées 48 heures en présence de différents volumes de la préparation virale [101]. La fluorescence de la GFP10 a ensuite été quantifiée à l'aide d'un lecteur de plaques Mithras LB940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) et le programme d'acquisition de données MicroWin2000.

2.8 Détection de l'AMPC par BRET comme mesure de l'activation de la protéine Gαi

Les cellules ont été concentrées à 2×10^6 cellules/mL dans le RPMI complétement et elles ont ensuite été distribuées à 40 000 cellules/puits dans une plaque à 96 puits à fond plat préalablement traitée à la poly(D-lysine) [101, 113]. La plaque à 96 puits est ensuite centrifugée à 500 g pendant 7 minutes à 4 °C pour sédimenter les cellules. Le RPMI complétement est ensuite retiré et remplacé par le tampon BRET (PBS, 0,5 mM MgCl₂, 0,1 % sérum d'albumine bovine). Les cellules ont ensuite été stimulées par des concentrations variables de CXCL12 resuspendue dans du tampon BRET contenant 10 µM de forskoline dans le DMSO. Le substrat de Rluc, la coelentérazine 400A (Biotinum, Hayward, CA), a été ajouté à une concentration de 50 µM aux différents puits contenant des cellules [101, 113]. La forskoline permet d'activer adénylate cyclase; c'est l'inhibition de cette activation par la forskoline que représente l'activité de la protéine Gαi (=inhibitrice). La concentration d'AMPC est mesurée par le rapporteur GFP10-Epac-Rluc3; la liaison d'AMPC à l'Epac réduit la transmission du signal entre le donneur (Rluc3) et l'accepteur (GFP10) [101, 113]. Un contrôle de cellules n'ayant pas été incubée avec de la forskoline représente le potentiel maximum d'inactivation de l'adénylate cyclase. Les lectures BRET (ratio entre le signal de la Rluc à 390 nm et le signal de la GFP à 510 nm) ont été recueillies à l'aide d'un lecteur de plaques Mithras LB940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) et le programme d'acquisition de données MicroWin2000.

2.9 Détection de l'activation de ERK 1/2 par immunobuvardage de type Western

Les cellules ont été concentrées à 2×10^6 cellules/mL dans le RPMI complétement puis stimulées avec 200 nM de CXCL12 lorsqu'indiqué. Des fractions sont recueillies à 2 minutes et 10 minutes, puis incubées dans du PBS froid, sur glace, à proportion de 1 : 9. Les cellules sont ensuite sédimentées à 500 g pendant 7 minutes à 4 °C avant d'être resuspendues dans 75 µL de tampon de lyse (0,8 % SDS, 1 % triton X-100, 0.5 % deoxycholate de sodium, 150mM NaCl, 20mM HEPES, 5mM EDTA, orthovanadate 200mM, PMSF 100mM, NaF 1M et inhibiteurs de protéases de Roche); du tampon Laemmli 2X (0,125 M Tris-HCl / 4,1 % SDS, 20 % glycérol, 0,2 mM DTT + bleu de bromophénol, pH6,8) est rajouté dans une proportion 1 : 1 [114]. Les échantillons sont ensuite bouillis trois fois pour 5 minutes avec intervalles d'incubation sur glace [114]. Les lysats ont été chargés sur un gel SDS-PAGE 10 % puis transférés sur membrane de PVDF. La membrane a ensuite été bloquée avec une solution de TBST (Tris-HCl 137 µM, Tris-Base 137 µM, NaCl 150 mM, 0.1 % Tween, pH 7,6) contenant 5 % de lait écrémé, et incubée pendant la nuit à 4 °C sur plaque pivotante avec l'anticorps Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (4370), ou p44/42 MAPK (Erk1/2) (9102) ou HSP90 C45G5 (4877) (Cell Signaling Technologies, Boston, MA) [114, 115]. Les membranes ont ensuite été lavées plusieurs fois avec du TBST avant d'être incubées avec l'anticorps secondaire (chèvre anti-lapin IgG-HRP (Santa Cruz)) pour 1 h à température ambiante sur plaque pivotante [115]. Les membranes ont été lavées à plusieurs reprises dans du TBST, et visualisées en utilisant une G:BOX Chemi XRQ (Syngene) et du substrat Clarity Western ECL (Biorad) [115].

2.10 Analyse et traitement des données

Le traitement des données de cytométrie en flux a été réalisé à l'aide du logiciel *FlowJo v10*, alors que les données numériques ont été traitées à l'aide du logiciel *GraphPad Prism 5*. Les tests statistiques utilisés furent le ANOVA pour les figures 9 et 11 afin de comparer les différents points.

3. Résultats

3.1 Mesure de la synchronisation des cellules Reh à diverses phases du cycle cellulaire

La Figure 7 représente l'intensité d'émission du PI tel que mesuré par cytométrie en flux. Le PI est un agent intercalant de l'ADN dont la longueur d'onde d'émission est de 575 nm. Le profil d'intensité de fluorescence permet de déterminer si une population de cellules possède de l'ADN « 2n », c'est-à-dire deux séries de chromosomes non répliqués (phase G1 du cycle cellulaire, représentée par un pic à l'extrême gauche du spectre), ou si les cellules ont répliqué leur ADN, donc possèdent « 4n » d'ADN (quatre séries de chromosomes, en phase G2/M, représentée par un pic à l'extrême droite du spectre), ou si les cellules sont en répllication de l'ADN, donc $2n < \text{signal} < 4n$ (phase S, représentée par une plage de signal étalée entre les deux extrémités du profil). Plus les pics d'intensité du PI sont prononcés, plus la fréquence de cellules détectées à l'intensité du signal du PI est élevée.

Le spectre des cellules non synchronisées (noir, en haut à gauche) démontre qu'en l'absence de synchronisation, la majorité des cellules seront en G1 et en phase de répllication S. La présence d'un faible pic à l'extrémité droite montre la faible proportion de cellules en G2/M (moins de 20 % des cellules sur trois expériences indépendantes).

Lorsque les cellules sont traitées avec du RO3306 à 10 μM pendant 20 heures (orange, en haut à droite), on remarque que la population de cellules est fortement enrichie en cellules synchronisées à la frontière G2/M. Le RO3306 est un inhibiteur compétitif de l'ATP sur le couple CDK 1/cycline B, bloquant ainsi la progression des cellules de la phase G2 à la mitose : les cellules sont donc à la frontière G2/M, mais ne sont pas en mitose [105]. Il est important de noter que la synchronisation n'est pas uniforme : une certaine portion (moins de 20 % sur trois expériences indépendantes) de la population de cellules est en G1/S, ce qui doit être considéré

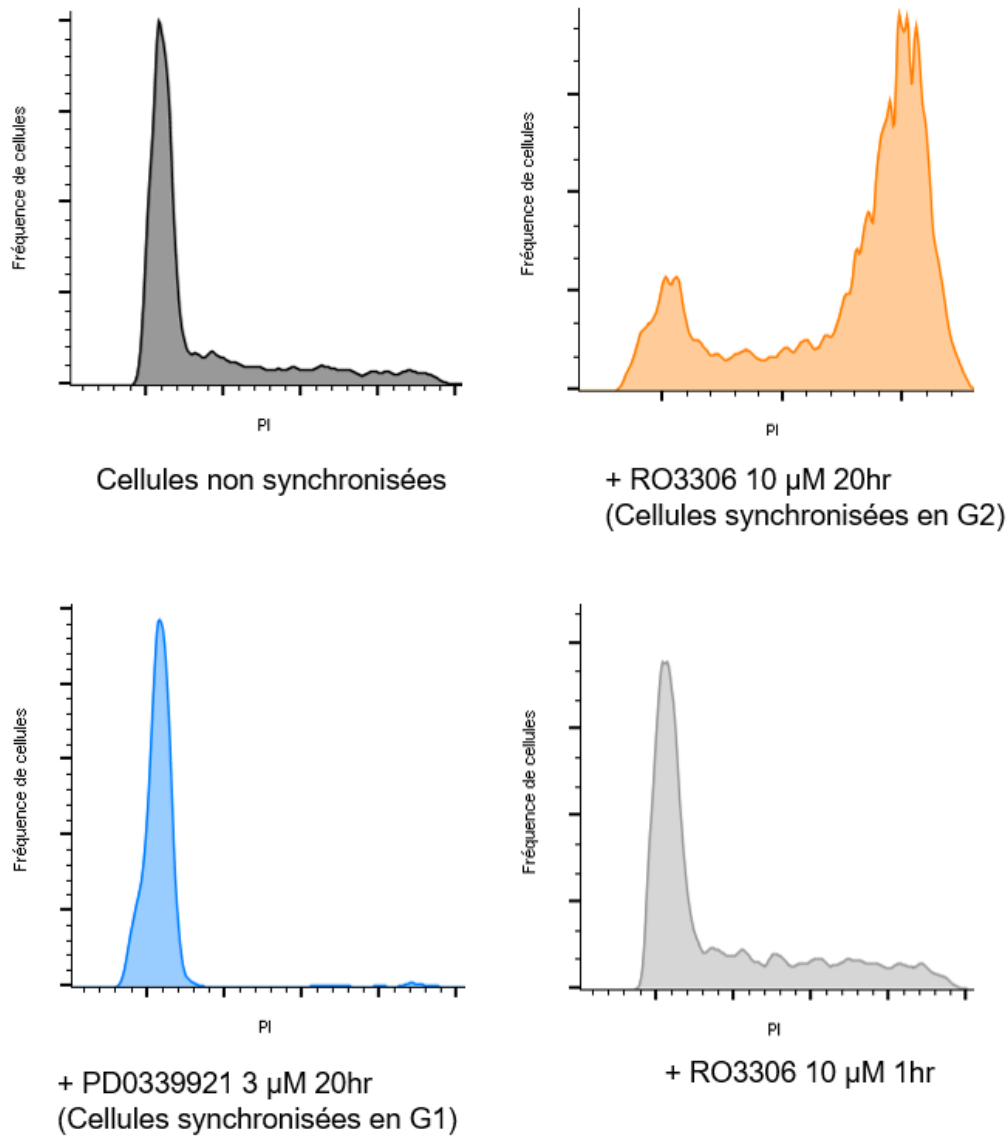


Figure 7. Le traitement au propidium iodide (PI) permet d’observer la synchronisation des cellules lorsque traitées avec du RO3306 et du PD0339921 pendant 20 heures.

Les cellules Reh furent incubées en présence de différents agents de synchronisation du cycle cellulaire, soit RO3306 et PD0339921, à différents temps. Les cellules furent ensuite incubées 24 heures dans de l’éthanol -20 °C afin de créer des pores dans les membranes. Les cellules furent ensuite traitées avec une solution de PI et passées au cytomètre en flux. Les données sont représentatives de trois expériences et présentées sous forme fréquence de cellules détectées en fonction du signal PI.

lors de l'interprétation de nos résultats des expériences subséquentes. Il est aussi pertinent de noter que cette technique ne permet pas de différencier les cellules en G2 des cellules en mitose. Le traitement au RO3306 10 μ M pendant 1 heure (gris, en bas à droite) n'a aucun effet apparent sur la synchronisation des cellules, tel qu'attendu. Cependant, cette condition nous permettra d'exclure des effets secondaires potentielles de la molécule sur d'autres kinases dans les expériences subséquentes, et ainsi de nous assurer que les effets observés seront spécifiques à la synchronisation, et non pas à une potentielle cible secondaire du RO3306.

Le traitement des cellules au PD0339921 à 3 μ M pendant 20 heures (bleu, en bas à gauche) permet la synchronisation presque parfaite de toutes les cellules en phase G1. Le PD0339921 est un inhibiteur compétitif sur la CDK4, mais pas de l'ATP. La synchronisation en phase G1 nous permettra de déterminer si les effets observés dans les essais de migration sont dus à la synchronisation en général, ou spécifiquement à la synchronisation en phase G2.

3.2 Mesure de la chimiotaxie des cellules Reh synchronisées à la frontière des phases G2/M

La Figure 8 représente la chimiotaxie en fonction de la concentration de CXCL12 dans le puits inférieur des plaques de migration. Typiquement en forme de cloche en fonction de la concentration de la chimiokine, ce type de courbe permet de déterminer la capacité d'une population de cellules à exercer la chimiotaxie à travers la membrane de migration. Il est possible d'observer que la chimiotaxie est dose-dépendante : ni les fortes concentrations, ni les faibles concentrations de CXCL12 ne permettent une migration des cellules Reh. Effectivement, les fortes concentrations de chimiokines ne permettent pas aux cellules de détecter le gradient, ce qui en conséquence ne permet pas la direction de la chimiotaxie. La migration dirigée n'est véritablement observable qu'entre 10 nM et 0,1 nM de CXCL12, avec un maximum autour de 1 ou 5 nM, tel que démontré par la Figure 8.

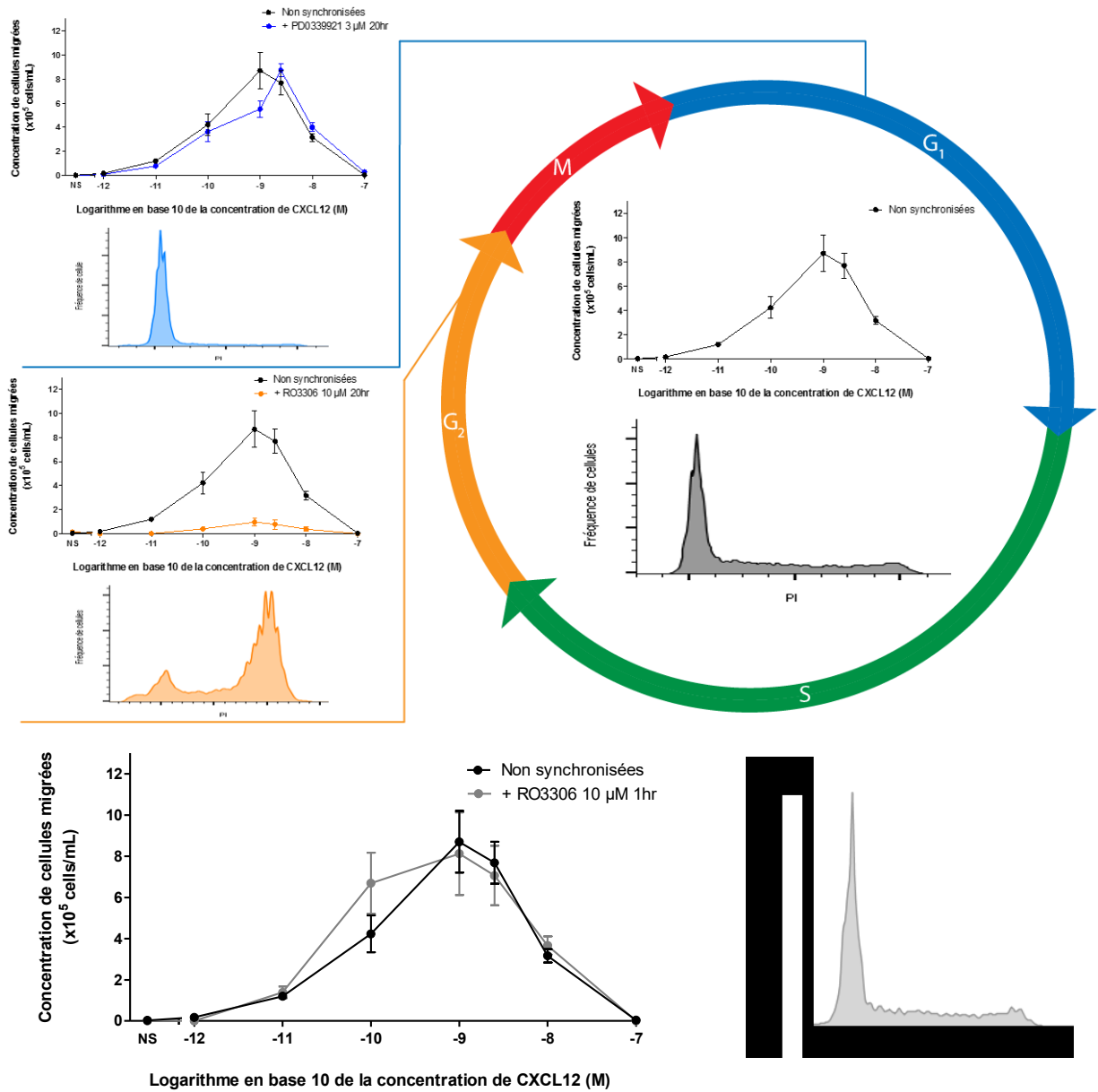


Figure 8. La synchronisation des cellules Reh en G₂ inhibe la réponse chimiotactique au gradient chimiotactique de CXCL12.

Les cellules Reh furent incubées à 37 °C sur une membrane de plaque de migration en présence d'un gradient de chimiokine pendant 3 heures. Les fractions furent recueillies dans les puits de migration et quantifiés. Les données proviennent de trois expériences indépendantes et sont présentées sous forme de moyenne ± S.E.M.

Ce résultat nous permet aussi de démontrer que lorsque les cellules Reh sont synchronisées en G2 (courbe orange), il n'est plus possible aux cellules d'exercer la chimiotaxie vers CXCL12 de façon aussi puissante que lorsque les cellules ne sont pas synchronisées (courbe noire) : en phase G2, seulement 100 000 cellules démontrent une activité migratoire à 1 nM de CXCL12, alors que ce nombre augmente à 1 000 000 pour les cellules non synchronisées à la même concentration de CXCL12. Afin de nous assurer que la réduction du nombre de cellules ayant migrées n'était pas occasionnée par une cible secondaire du RO3306, nous avons incubé des cellules Reh avec du RO3306 10 μ M pendant 1 heure (courbe grise); aucune variation significative sur la chimiotaxie n'est observable.

Nous voulions éliminer la possibilité que l'inhibition de la chimiotaxie puisse être l'effet d'un arrêt quelconque du cycle cellulaire, alors nous avons aussi synchronisé des cellules Reh en phase G1 avec du PD0992331 à 3 μ M pendant 20 heures (courbe bleue), sans toutefois observer un effet sur la chimiotaxie. Il semble donc clair que l'inhibition de la chimiotaxie est spécifique à l'arrêt en phase G2 du cycle cellulaire.

3.3 Mesure de l'expression en surface cellulaire de CXCR4 lors de la phase G2

Nous avons ensuite évalué l'expression en surface de CXCR4 selon la synchronisation afin de tester si l'inhibition de la chimiotaxie était due à l'absence du récepteur en surface. En effet, il a été suggéré par l'équipe de M. O. Aksoy que l'expression à la surface cellulaire d'un récepteur de chimiokine (ici CXCR3) peut être affectée durant la progression des différentes phases du cycle cellulaire [116].

La Figure 9 montre l'expression de CXCR4 en surface des cellules Reh, mesurée selon l'intensité du fluorochrome couplé à l'anticorps anti-CXCR4 et mis en pourcentage d'expression selon la condition non traitée, en fonction du temps d'incubation au RO3306 à 10 μ M. Aucune différence significative n'a pu être observée entre l'expression de CXCR4 en surface des cellules lorsqu'elles sont non synchronisées (points noirs), incubées 1 heure en présence de RO3306 à 10 μ M (points gris) ou lorsqu'elles sont synchronisées

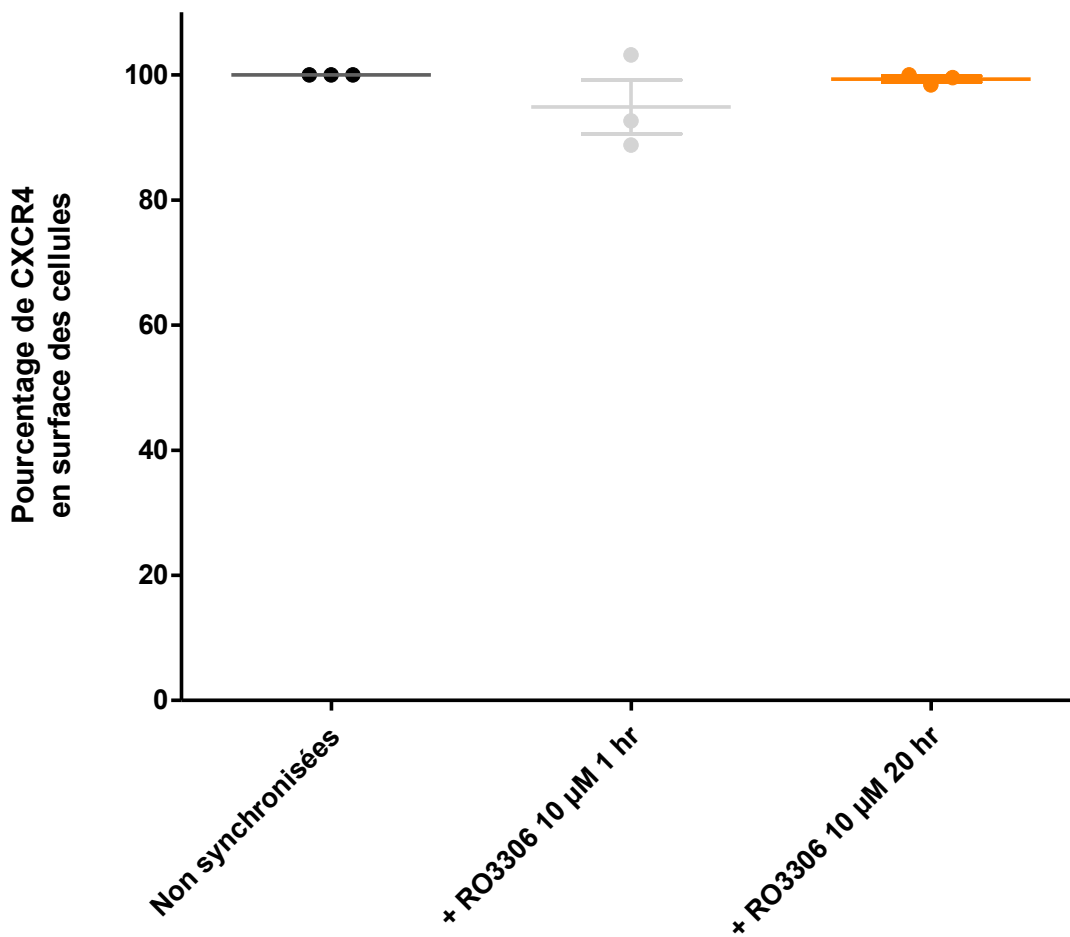


Figure 9. L'expression de CXCR4 en surface des cellules n'est pas affectée par la synchronisation en G2.

Les cellules Reh furent synchronisées, puis marquées avec un anticorps anti-CXCR4 couplé à la phycoérythrine. Les résultats furent recueillis au cytomètre en flux et proviennent de trois expériences indépendantes et sont présentés sous forme de moyenne \pm S.E.M où « 100 % » d'expression représente le signal obtenu sur les cellules non traitées.

en phase G2 par une incubation de 20 heures au RO3306 à 10 μ M (points orange). Nous n'observons aucune variation de l'expression de CXCR4. Ainsi, selon nos expériences, l'absence de chimiotaxie lors de l'arrêt en phase G2 ne peut s'expliquer par une expression réduite de CXCR4 en surface cellulaire. Cependant, même si l'expression moyenne du récepteur CXCR4 ne varie pas significativement pour les trois expériences des cellules incubées 1 heure, il semble que les données tendent à être plus basses que les autres conditions : un plus grand nombre d'expériences seront nécessaires afin de valider nos observations.

3.3 Mesure de la capacité de CXCR4 à endocyter selon différentes concentrations de CXCL12.

Nous avons ensuite testé l'endocytose de CXCR4. L'endocytose est une mesure de la fonctionnalité du récepteur. Elle sert à désensibiliser le récepteur et à inhiber la signalisation des protéines G. L'endocytose est aussi une mesure indirecte du recrutement de la β -Arrestine. Selon le modèle de Luttrell et Lefkowitz émis en 2002, le recrutement de la β -Arrestine sur le récepteur est essentiel à l'endocytose de ce dernier [117].

Afin de tester l'endocytose de CXCR4 sur les cellules Reh, il était d'abord impératif de mettre au point un système expérimental d'étude de l'endocytose fiable et reproductible dans des conditions non saturantes. Les cellules Reh furent incubées en présence de différentes concentrations de CXCL12. La Figure 10 démontre que l'endocytose de CXCR4 est dépendante de la dose de CXCL12. De plus, cette expérience nous permet d'établir que l'endocytose est observable jusqu'à des concentrations de CXCL12 de 1 nM (courbe rouge). Cependant, une telle concentration ne permet pas d'atteindre l'endocytose maximale après 10 minutes d'incubation. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser 10 nM de CXCL12 (courbe orange) pour les expériences subséquentes : cette concentration permet d'atteindre l'endocytose maximale de CXCR4 sans toutefois risquer de mettre le système en saturation de ligand comme dans les essais à 25 nM (courbe verte) et 50 nM (courbe bleu). En effet, au-delà de 10 nM, la concentration de CXCL12 n'a plus d'effets sur la capacité de CXCR4 à endocyter la chimiokine.

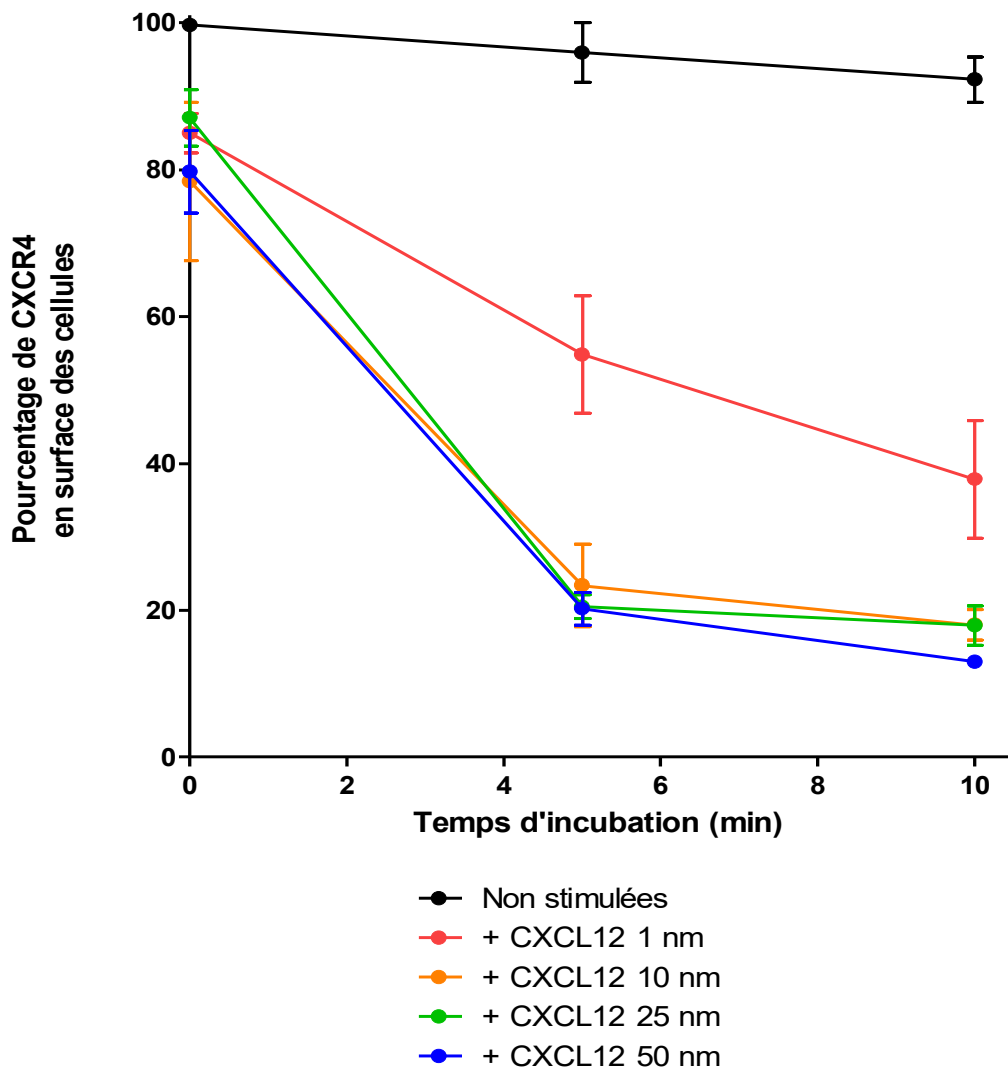


Figure 10. Les cellules Reh non synchronisées endocytent le récepteur CXCR4 exprimé en surface lorsque stimulées avec du CXCL12.

Les cellules Reh furent incubées à 37 °C en présence des concentrations indiquées de CXCL12. Des fractions sont recueillies à différents temps, et les cellules sont marquées avec un anticorps anti-CXCR4 couplé à la phycoérythrine. Les résultats furent recueillis au cytomètre en flux, proviennent de trois expériences indépendantes, et sont présentés sous forme de moyenne \pm S.E.M.

3.4 Mesure de la capacité de CXCR4 à endocyter lors de la synchronisation en phase G2

Les cellules Reh arrêtées à la frontière G2/M pourraient ne pas endocyter CXCR4; l'absence d'endocytose pourrait indiquer la non-fonctionnalité du récepteur exprimé en surface. La Figure 11 nous permet de tester cette hypothèse en comparant la présence de CXCR4 sur les cellules Reh avant et après stimulation avec 10 nM de CXCL12 dans le temps, en fonction de la synchronisation en phase G2. Par rapport à la condition de cellules non synchronisées (courbe pleine, points noirs), nous n'observons pas de différence de l'endocytose de CXCR4 lorsque les cellules sont synchronisées en G2 (courbe pleine, points orange) ou incubées avec du RO3306 à 10 μ M pendant 1 heure (courbe pleine, points gris). Il semble donc que même synchronisées en G2, les cellules Reh continuent d'exercer les mécanismes d'endocytose et donc, probablement, poursuivre la transduction du signal apporté par CXCL12, sans toutefois déclencher de la chimiotaxie. La condition non synchronisée et non stimulée (courbe pointillée, carrés noirs) démontre que la quantité de CXCR4 en surface dans le temps est relativement stable sans la présence de CXCL12 en solution durant cette expérience.

3.5 Mesure de l'activation de la protéine G α i liée à CXCR4 durant la synchronisation en phase G2

La protéine G α i – et donc l'inhibition de l'adénylate cyclase – est l'un des principaux effets de la cascade signalétique CXCL12/CXCR4. Alors que la G α i n'est typiquement pas directement reliée à la chimiotaxie, l'activation de la protéine G α i permet la libération de la sous-unité dimérique G β / γ du récepteur. Cette sous-unité, lorsque libérée de son association avec la G α i, est reliée à l'extension des lamellipodes et filopodes durant la chimiotaxie par l'intermédiaire de la voie PI3K/PIP3/Rac/Cdc42.

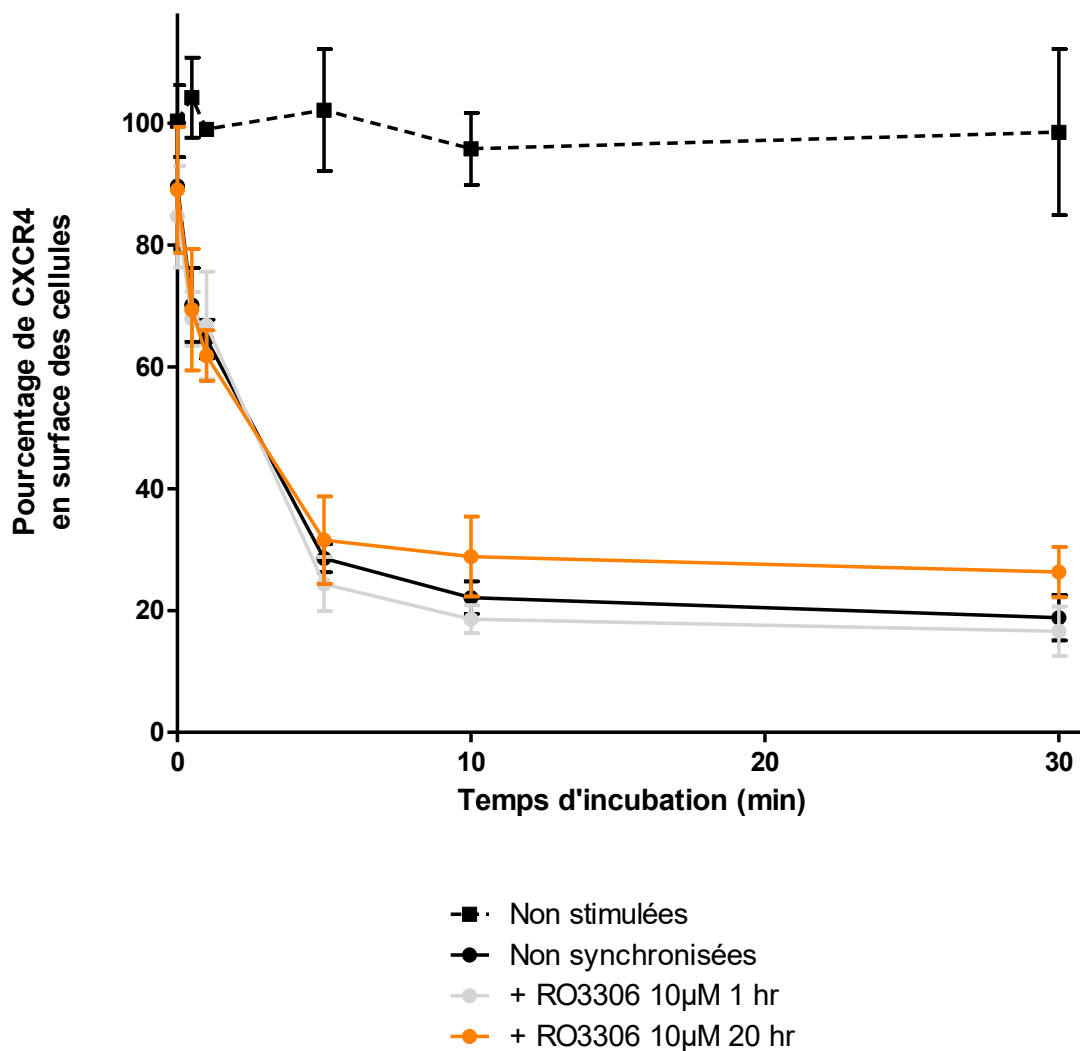


Figure 11. L'endocytose de CXCR4 en présence de CXCL12 n'est pas affectée par la synchronisation des cellules en G2.

Les cellules Reh furent synchronisées puis incubées à 37 °C en présence de 10 nM de CXCL12. Des fractions sont recueillies à différents temps, puis les cellules sont marquées avec un anticorps anti-CXCR4 couplé à la phycoérythrine. Les résultats furent recueillis au cytomètre en flux et proviennent de trois expériences indépendantes et sont présentés sous forme de moyenne \pm S.E.M.

Afin d'étudier cette voie, nous avons jugé pertinente l'utilisation d'un biosenseur GFP10-EPAC-Rluc3. EPAC est une protéine d'échafaudage dont la conformation tridimensionnelle est affectée par la liaison à l'AMPc; la production d'AMPc est inhibée par l'activation de la G α i (voir Figure 12). Ainsi, grâce au biosenseur GFP10-EPAC-Rluc3, il est possible de suivre le changement de conformation de la protéine EPAC : lorsque liée à l'AMPc, la conformation de EPAC ne permettra pas à la R-luciférase de transmettre un signal à la GFP10. Nous pouvons donc calculer un ratio entre le signal détecté à 405 nm de la R-luciférase stimulée et le signal détecté à 515 nm de la GFP10. Pour pouvoir tester le rôle inhibiteur de la G α i, nous avons utilisé la forskoline, une molécule qui active la formation d'AMPc par l'adénylate cyclase. Le ratio BRET résultant est donc une mesure de l'inhibition causée par G α i de la stimulation induite par la forskoline : un haut ratio démontre une forte activité inhibitrice alors qu'un plus faible ratio démontre une faible activité inhibitrice. Il est à noter que les ratios BRET (dont le « bruit de fond » ou *background* fut retiré, aussi appelé les données de BRET NET) sont transformées ici en pourcentage d'inhibition de l'adénylate cyclase pour mieux représenter la voie de signalisation étudiée, soit celle de la protéine G α i.

En se référant à la Figure 13, il est possible de constater que la production d'AMPc est affectée de façon dose-dépendante par la concentration de CXCL12, et donc par l'activation de la protéine G α i. Nous pouvons voir par la courbe sigmoïdale qu'il y a transfert d'énergie entre la Rluc3 et la GFP10 lorsque la concentration de CXCL12 est plus élevée que 10 nM (haut ratio BRET), alors que ce transfert diminue avec la concentration jusqu'à atteindre un plateau en-dessous de 0,1 nM de CXCL12 (bas ratio BRET). Les données ont été transformées en pourcentage d'inhibition de l'adénylate cyclase afin de faciliter la compréhension.

Aucune différence significative n'est observée entre les cellules non synchronisées (courbe noire) et les cellules synchronisées en phase G2 du cycle cellulaire (courbe orange). La protéine G α i continue donc d'être activée et ainsi d'exercer son rôle d'inhibition lorsque CXCR4 est stimulé avec CXCL12, même lors de la phase G2 du cycle cellulaire. Ce résultat démontre alors qu'une des signalisations principales de CXCR4 demeure intacte lors de l'arrêt en phase G2 du

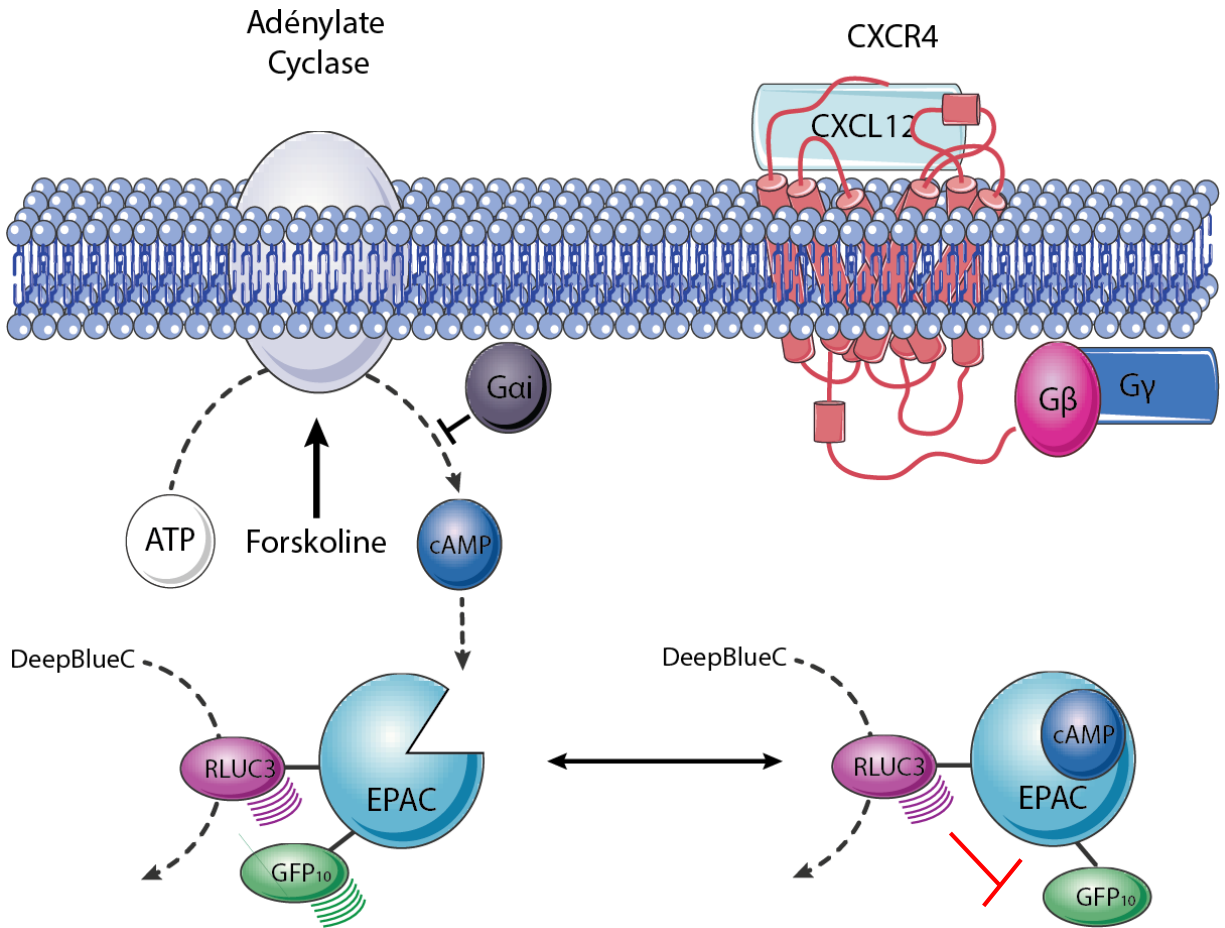


Figure 12. Schéma du rapporteur GFP10-Epac-Rluc3.

La forskoline permet de stimuler l'adénylate cyclase. L'activation de la Gαi permet à celle-ci d'exercer son rôle inhibiteur sur la conversion de l'ATP en AMPc par l'adénylate cyclase. L'AMPc, si présente, se lie sur la portion EPAC du rapporteur GFP10-Epac-Rluc3, empêchant la transmission du signal de Rluc3 vers GFP10 (tel que démontré par la barre rouge) lorsque Rluc3 est stimulée par la DeepBlueC (coelentérazine 400A). Le ratio BRET calculé permet d'évaluer l'inhibition de Gαi de la stimulation causée par la forskoline. Cette image fut créée à partir de la banque d'images vectorielles *Servier's Vectorial Powerpoint images bank*. . Gαi, Gβ et Gγ signifient « les protéines G trimériques, sous-unité α, β ou γ ». cAMP ou AMPc signifie « adénosine monophosphate cyclique ». ATP signifie « adénosine triphosphate ». Rluc3 signifie « luciférase de renilla reniformis, altération 3 ». GFP10 signifie « protéine fluorescente verte, altération 10 ». Epac signifie « facteur d'échange activé par l'AMPc ».

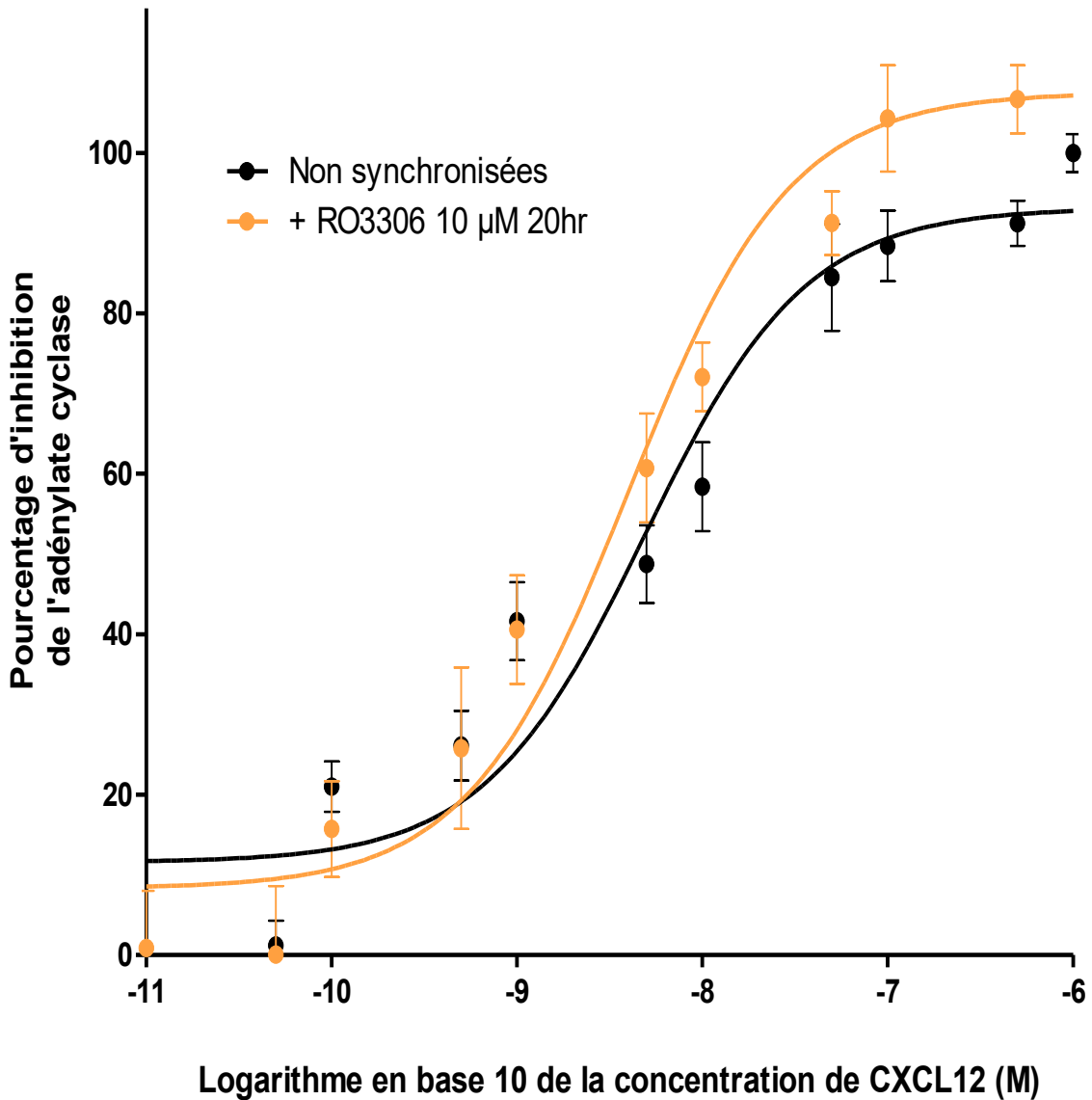


Figure 13. La réponse G α i CXCR4/CXCL12-dépendante n'est pas affectée par la synchronisation en G2.

Les cellules Reh furent infectées transitoirement par la technique d'infection lentivirale avec une construction GFP10-Epac-Rluc3. Les cellules furent incubées en présence de concentrations variables de la chimiokine et 20 μ M de forskoline, puis le ratio BRET résultant fut mesuré après 30 secondes à température ambiante. Les résultats proviennent de trois expériences indépendantes et sont présentés sous forme de moyenne \pm S.E.M, où 0% correspond à la condition sans forskoline et 100% correspond à la condition avec seulement la forskoline.

cycle. Ainsi, l'absence de chimiotaxie ne peut s'expliquer par une inhibition générale des capacités signalétiques du récepteur lors de l'arrêt en phase G2. Il est à noter que même si les données présentées ici sont sous forme de pourcentage, elles représentent fidèlement les ratios chiffrés observés lors de l'étude (BRET NET). Cependant, il est à noter que le traitement au RO3306 semblait faire augmenter de « bruit de fond », ce qui a été pris en considération lors de l'analyse des données.

3.6 Mesure de l'activation de la voie des MAPKKK durant la synchronisation en phase G2

La présence de l'endocytose de CXCR4 durant la phase G2 laisse entrevoir que la réponse β -arrestine est elle aussi présente, car le modèle actuel de Luttrell et Lefkowitz prévoit effectivement que la β -arrestine est l'instigateur principal de l'endocytose [117]. Le recrutement de la β -arrestine, tout comme l'activation de la protéine G α i, permet de déclencher la cascade signalétique des MAPKKK, dont p-ERK 1/2 est le dernier effecteur avant l'activation de messagers activant la régulation transcriptionnelle de l'expression de protéines cibles. Nous avons alors commencé à tester l'activation de ERK 1/2, pour établir si les cascades signalétiques en aval de G α i et β -arrestine demeurent également intactes lors de l'arrêt en phase G2.

Il fallait en premier lieu établir un système d'étude. Afin d'étudier la phosphorylation de ERK 1/2 (et donc son activation), nous avons décidé d'employer la technique de migration de protéines sur gel SDS-PAGE couplée à l'immunobuvardage et révélation avec des anticorps spécifiques à la forme phosphorylée de ERK 1/2. Afin d'établir le temps idéal nécessaire pour observer la phosphorylation de ERK 1/2, nous avons récolté des fractions de cellules non-synchronisées, et stimulées avec 200 nM de CXCL12 à différents points dans le temps. La Figure 14 démontre que la phosphorylation de ERK 1/2 est très rapide dans notre système : la première fraction recueillie à 2 minutes de stimulation montre la plus haute intensité de p-ERK 1/2, suivi d'une diminution dans le temps. Ainsi, en utilisant 2 millions de cellules par millilitre

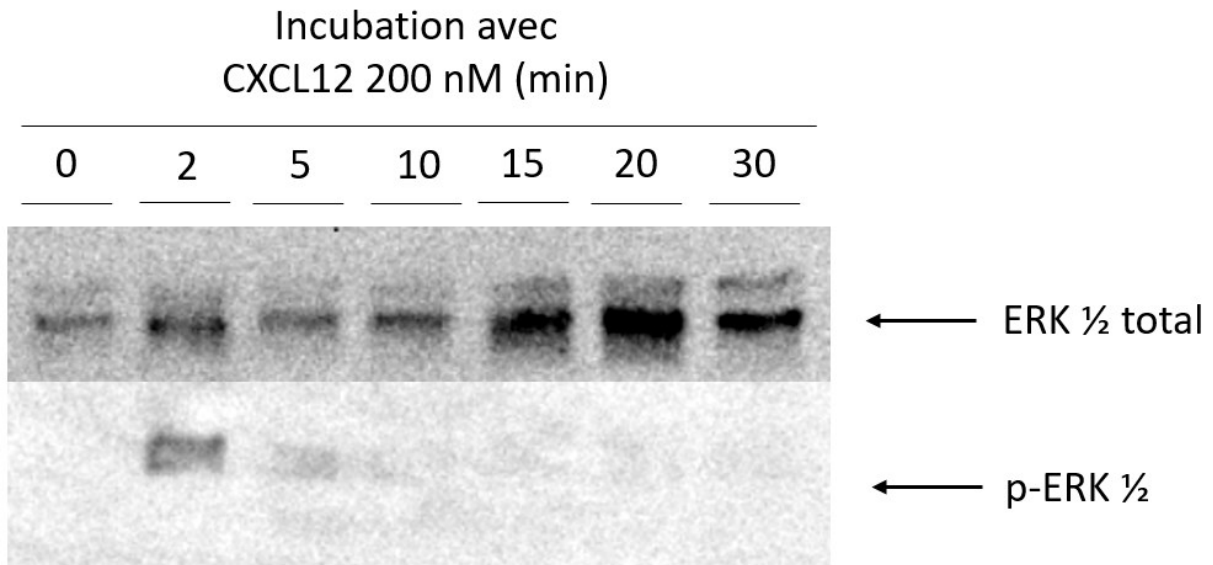


Figure 14. La stimulation des cellules Reh avec CXCL12 permet la phosphorylation de ERK 1/2.

Les cellules furent incubées en présence de 200 nM de CXCL12 pendant des temps variables à température ambiante. Le résultat représente la seule expérience conduite.

de milieu, 200 nM de CXCL12 et 2 minutes de stimulation, nous observons clairement la phosphorylation de ERK 1/2 en comparaison avec la fraction non stimulée. ERK 1/2 total fut utilisé comme contrôle pour la quantité de protéines par piste de chargement, mais on voit ici que la concentration totale de protéines fluctuait dans les différentes pistes, sans toutefois influencer significativement notre conclusion. Il est à noter que les résultats montrés ici ne représentent qu'une seule expérience; il sera donc nécessaire d'investiguer plus profondément la stimulation du système CXCR4/ERK 1/2 par CXCL12 dans le temps.

La Figure 15 représente la stimulation des cellules Reh avec 200 nM de CXCL12 à 0, 2 et 10 minutes, selon une incubation préalable avec RO3306 à 10 μ M de 0, 1 ou 20 heures. Les protéines ERK 1/2 total et HSP90 furent utilisées comme contrôle de quantité de protéines : nous voulions ainsi tester si HSP90 était plus stable en quantité suite aux traitements de synchronisation que ERK 1/2 total.

Dans la condition des cellules non stimulées (incubation au RO3306 à 10 μ M pendant 0 heure), nous pouvons observer que la stimulation par CXCL12 200 nM permet la phosphorylation de ERK 1/2, qu'elle soit de 2 ou 10 minutes, alors qu'il n'est pas possible d'observer p-ERK 1/2 lorsque les cellules ne sont pas stimulées. Ce profil de phosphorylation est conservé pour l'incubation à RO3306 10 μ M et pour les cellules synchronisées en G2. Cette expérience semble alors suggérer que les voies signalétiques de CXCR4 en aval de G α i et β -arrestine demeurent également intactes lors de l'arrêt en phase G2 du cycle cellulaire. À noter que nous avons observé une baisse d'intensité des bandes de ERK 1/2 total au temps zéro; cette baisse semble due à un chargement inégal des pistes (et non pas à une plus faible expression de ERK 1/2), tel qu'indiqué par le blot détectant hsp90 comme contrôle supplémentaire.

Cependant, de par la variabilité des protéines de contrôle et le faible nombre d'expériences, il nous est difficile d'analyser avec certitude les résultats observés : ceux-ci nécessiteront d'être refaits. De plus, la faible quantité de ERK 1/2 total détectée pour la condition traitée avec du

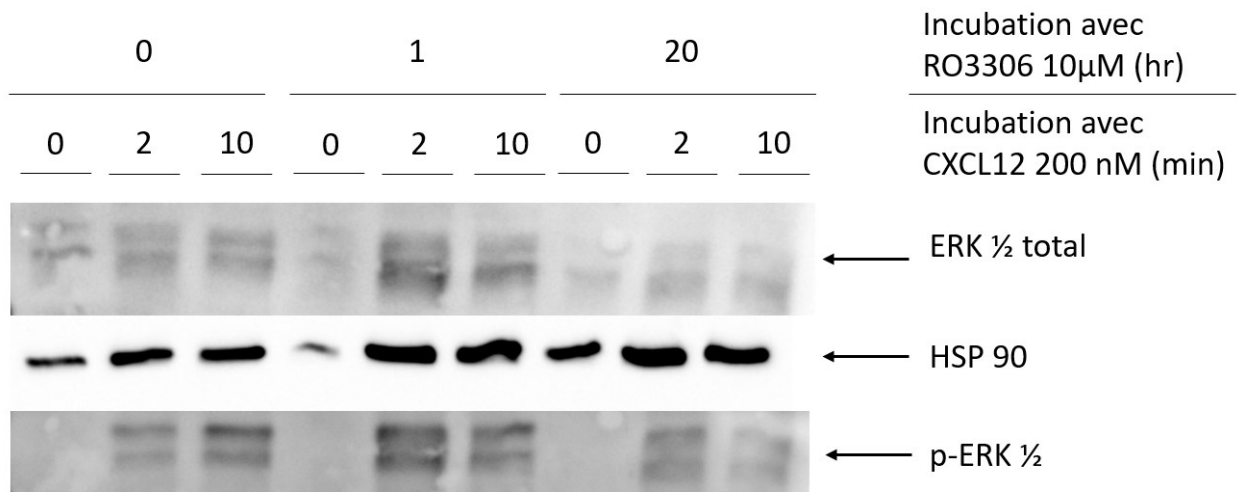


Figure 15. La voie menant à la phosphorylation de ERK 1/2 n'est pas affectée par la synchronisation en G2.

Les cellules furent incubées en présence de 200 nM de CXCL12 pendant des temps variables à température ambiante. Le résultat pour ERK 1/2 totale et p-ERK 1/2 est représentatif de trois expériences indépendantes. Le résultat pour HSP90 ne représente qu'une seule expérience, mais de la même membrane que ERK 1/2 totale et p-ERK 1/2 montrés ci-dessus.

RO3306 10 μ M pendant 1 heure ne nous permet pas d'estimer si l'absence de p-ERK 1/2 au temps sans stimulation est véritablement due à l'absence de stimulation par CXCL12.

4. Discussion et perspectives

Dans la section ci-dessous, nous revisiterons tout d'abord les objectifs ciblés dans cette étude afin de pouvoir mieux apprécier la signification de nos résultats. Nous revisiterons ensuite nos résultats par rapport aux objectifs et les interprétations qui en découlent. Nous explorons des explications alternatives et proposons par la suite des démarches d'investigation futures en tant que perspectives ouvertes par notre travail.

4.1 Retour sur les résultats

Dans cette étude, nous avons entrepris d'élucider le phénomène d'incompatibilité, ici nommé « dichotomie », entre la chimiotaxie et le processus de division cellulaire à la limite des phases G2 et M. Dans un premier temps, nous avons démontré que, effectivement, une dichotomie entre chimiotaxie et division cellulaire existe bien chez des cellules de mammifères, les cellules Reh. Dans un deuxième temps, nous avons exploré les voies de signalisation proximales du récepteur CXCR4, responsable de la chimiotaxie durant les phases de division cellulaire.

4.1.1 Absence de chimiotaxie pendant les phases G2 et M du cycle cellulaire

Comme nous l'avons présenté dans la section « **1. Introduction** », la littérature entourant cette dichotomie est peu abondante. Par observations préliminaires au laboratoire, et par réflexion sur les travaux de Janetopoulos effectués avec l'amibe *Dictyostelium discoideum*, nous avons émis l'hypothèse qu'une cellule ayant engagé les mécanismes de la mitose ne peut engager celles de la chimiotaxie : la chimiotaxie serait exclusive à l'absence de la division cellulaire. Cette dichotomie aurait comme conséquence de protéger l'intégrité des cellules filles en devenir lors de la mitose. À la lumière de ces réflexions, nous avons décidé de tester si les cellules Reh synchronisées à la limite des phases G2 et M répondent toujours au gradient attractant de la chimiokine CXCL12; le résultat s'est avéré négatif. Ainsi, en synchronisant les cellules Reh à la limite des phases G2 et M à l'aide de l'inhibiteur RO3306, nous avons observé

une inhibition presque complète de la chimiotaxie. Ces observations sur les cellules pré-B que sont les Reh sont la première démonstration de la dichotomie entre la chimiotaxie et les phases G2/M chez les cellules de mammifères.

4.1.2 Les paramètres explorés

La présence de la dichotomie ainsi démontrée dans les cellules pré-B humaines, nous avons tenté de déterminer quelles voies de signalisation de la chimiotaxie seraient régulées de façon négative lors des phases G2 et M.

4.1.2.1 Expression en surface du récepteur

Le principe du rasoir d'Ockham suggère que l'explication la plus simple est souvent la meilleure. Ainsi, si les cellules ne répondaient plus aux gradients chimiotactiques de CXCL12, le récepteur CXCR4 n'était possiblement plus exprimé à la limite des phases G2/M, ou à tout le moins rendu inactif. Une absence d'expression de CXCR4 à la surface cellulaire, à un moment précis du cycle cellulaire, demanderait une régulation de cette expression. Une telle régulation est effectivement supportée par des observations faites par Aksoy et al, par rapport au récepteur de chimiokine CXCR3. Ces auteurs trouvent que l'expression en surface du récepteur CXCR3-B serait régulée selon les phases du cycle cellulaire [116]. L'étude démontre que CXCR3 est davantage présent à la surface des cellules durant les phases S, G2 et M que durant la phase G1 chez les cellules épithéliales : l'expression de CXCR3-B lors de la phase G1 est environ 10 fois plus faible que lors des phases S, G2 et M. Ainsi, une stimulation du récepteur par sa chimiokine CXCL11 engendrerait une accrue des cellules en phases S, G2, et M, et la présence du récepteur en surface des cellules permettrait de réguler la transition dans le cycle cellulaire des cellules épithéliales. Si l'équipe d'Aksoy démontre ainsi une régulation de l'expression du récepteur en fonction du cycle cellulaire, ils ne proposent cependant pas de mécanisme expliquant cette régulation.

Nous avons testé l'hypothèse qu'un mécanisme semblable pourrait exister chez les cellules pré-B : les cellules en division cellulaire pourraient-elles réguler négativement l'expression de

CXCR4 en surface cellulaire afin de rester insensibles au gradient chimioattractant de CXCL12? Or, nos résultats le démontrent, l'expression en surface du récepteur CXCR4 n'est aucunement modulée lors de la synchronisation à la limite des phases G2 et M. Nous en concluons donc que la dichotomie chimiotaxie/mitose n'est donc pas la conséquence d'une régulation négative de l'expression du récepteur.

Cette différence pourrait s'expliquer par le type de cellules étudiées : l'étude d'Aksoy se penche sur les cellules épithéliales des bronches humaines (HBEC), alors que nous avons étudié des cellules Reh pré-B [116]. Contrairement aux cellules Reh, les cellules HBEC ne sont pas motiles : la présence de récepteurs de chimiokines ne peut donc pas être reliée à la chimiotaxie. Il semble que CXCR3B, lorsque présent sur les cellules épithéliales, promeut la prolifération cellulaire. Il est possible que les cellules HBEC internalisent CXCR3B lors de la phase G1 et, par des mécanismes qui nous sont encore inconnus, augmentent la présence du récepteur à la surface des cellules lors des phases S, G2 et M. Cette différence de rôle dans la cellule pourrait expliquer pourquoi Aksoy et ses collaborateurs ont pu observer la modulation de l'expression du récepteur de chimiokines durant le cycle cellulaire, alors que l'expression récepteur CXCR4 à la surface des cellules Reh reste constant durant le cycle cellulaire.

4.1.2.2 Fonctionnalité de CXCR4 exprimé en surface lors des phases G2/M

La fonctionnalité d'un récepteur, en tant que déclencheur de cascades signalétiques, peut être soumise à des régulations. À titre d'exemple, en 2015, l'équipe de Bandhari fait une découverte fort intéressante : la CDK5, une kinase régulée par des cyclines, orchestre les voies de signalisation des protéines G hétérotrimériques par la protéine associée aux vésicules interagissant avec $G\alpha$ (appelée « $G\alpha$ -interacting vesicle associated protein », GIV, aussi connue sous le nom Girdin) [118]. La protéine Giv/Girdin est une GEF activée lors de la stimulation d'un GPCR et permet la formation d'un complexe avec la $G\alpha_i$ [119]. Ceci suggère que, effectivement, une régulation transitoire de la signalisation en fonction de complexes CDK/cycline est possible.

Cette dernière observation de Bandhari est très intéressante, car elle suggère un mécanisme inverse à ce que nous voudrions observer. Cependant, cela démontre qu'il est possible d'avoir une activation transitoire par les CDK/cyclines afin d'activer, ou inhiber, certaines voies de signalisation.

Nous observons une signalisation de la protéine $G\alpha_i$ – par la voie de l'AMPC – mais pas des protéines $G\beta\gamma$ – par la chimiotaxie – : serait-il possible que les CDK/cyclines présentes à la frontière des phases G2 et M induisent non seulement la transition à travers les phases G2 et M, mais aussi l'inhibition des mécanismes de la chimiotaxie par la sous-unité $G\beta\gamma$? Cette avenue sera très certainement pertinente à explorer dans de futures expériences.

4.1.2.3 Les voies des protéines G

Sachant que l'expression du récepteur CXCR4 n'est pas négativement régulée lors de la division cellulaire, nous avons décidé de tester les voies de signalisation des protéines G hétérotrimériques. Nous avons décidé d'explorer les cascades de signalisation $G\alpha_i/G\beta\gamma$ -dépendante, celles-ci étant les voies proximales les mieux connues et étudiées dans la littérature – en contraste avec la cascade $G\alpha_{12/13}$ -dépendante [82, 83, 120].

Typiquement, c'est la sous-unité $G\beta\gamma$ du complexe hétérotrimérique des protéines G qui enclenche la réponse chimiotactique [23, 33]. Le modèle actuel d'activation de la sous-unité $G\beta\gamma$ du complexe hétérotrimérique des protéines G prévoit que celle-ci dépend de l'activation de la sous-unité $G\alpha_i$ [28]. Ainsi, la réception de la chimiokine sur le récepteur permet l'activation de la protéine $G\alpha_i$, qui à son tour permet l'activation de la sous-unité $G\beta\gamma$. Notre hypothèse étant que si la chimiotaxie n'est pas observable durant la division cellulaire, tel que démontré par nos essais de chimiotaxie, la voie de signalisation de la protéine $G\alpha_i$ pourrait effectivement être inhibée. Si inhibée, la protéine $G\alpha_i$ pourrait ne pas se dissocier du récepteur et ainsi empêcher l'activation (la libération) de la sous-unité $G\beta\gamma$: en 1985, Spangrude et son équipe ont effectivement montré qu'en utilisant la PTX, une toxine inhibitrice de la protéine $G\alpha_i$, la chimiotaxie des lymphocytes et neutrophiles était inhibée [121].

Cependant, nos résultats démontrent que l'activité inhibitrice de la protéine G α i n'est non seulement pas diminuée durant la division cellulaire, mais qu'elle est parfaitement intacte. La protéine G α i conserve son activité d'inhibition de production d'AMPc, suggérant alors qu'aucun mécanisme de régulation négative n'empêche son activation, et ainsi l'activation des sous-unités G $\beta\gamma$, tel que le propose le modèle actuel [28, 34]. Ce n'est cependant pas ce qu'on observe.

Tel qu'il a été mentionné dans la section « **1. Introduction** », l'activation des mécanismes de la migration dirigée – dont la chimiotaxie – est orchestrée par la sous-unité G $\beta\gamma$ et non la protéine G α i. Notre choix d'étudier la protéine G α i se basait sur le modèle présent des protéines G hétérotrimériques qui prédit que l'activation de l'hétérodimère G $\beta\gamma$ se fait lors de la dissociation de la sous-unité G α i. Cependant, puisque nous observons une réponse de la voie de la protéine G α i par la voie CXCR4 chez les cellules synchronisées à la limite des phases G2 et M, et puisque la chimiotaxie est inhibée, cela suggère donc que la dissociation de la protéine G α i suite à la réception de CXCL12 sur CXCR4 ne soit pas suffisante à l'activation de la sous-unité G $\beta\gamma$.

Bien que nos résultats aient démontré que la voie de signalisation G α i demeure intacte, nous proposons de tester à l'avenir l'axe de signalisation primordiale à la chimiotaxie, soit la voie G $\beta\gamma$. Pour tester si la sous-unité G $\beta\gamma$ resterait active durant les phases G2/M, nous proposons de tester si la sous-unité G $\beta\gamma$ continue d'activer la protéine PI3K. Ceci pourrait se faire en utilisant la technique d'étude des interactions protéine-protéine, le BRET.

Par recombinaison d'ADN, nous introduirons la séquence codante de la GFP10 dans la séquence codante de G β afin d'obtenir les plasmides GFP10-G β et G β -GFP10 (GFP10 à l'extrémité N- ou C-terminale de la sous-unité G β). C'est la sous-unité G β du complexe G $\beta\gamma$ qui fait le lien avec le récepteur. La séquence codante de Rluc3 serait introduite en N- ou C-terminale de la séquence de PI3K. Le vecteur final serait introduit par infection lentivirale dans les cellules Reh. Ainsi, nous pourrions suivre l'association de la sous-unité G $\beta\gamma$ à la protéine

PI3K (signal BRET élevé) en présence ou non de CXCL12. Effectivement, l'interaction directe entre la PI3K et la sous-unité $G\beta\gamma$ a été démontrée par essais de copurification et immunobuvardage par l'équipe du Dr Nürnberg en 1998 [122]. Notre hypothèse étant que la sous-unité $G\beta\gamma$ continue d'activer la PI3K, nous nous attendrions à observer une association de la $G\beta\gamma$ et de la PI3K même lorsque les cellules sont synchronisées en division cellulaire. Nous aurions ainsi démontré que la protéine Gai et l'hétérodimère $G\beta\gamma$ poursuivent la signalisation lors de la réception de la chimiokine sur son récepteur, durant la division cellulaire. Cela démontrerait qu'il est toujours possible d'activer les voies régulières de signalisation.

Un tel système de BRET serait le premier publié dans la littérature. Cependant, l'équipe de Funamoto a démontré, par fusion de la PI3K à une protéine fluorescente et par microscopie, que celle-ci demeure fonctionnelle durant la division cellulaire et pourrait alors être utilisée pour nos expériences [68]. Nous désirons cependant utiliser la méthode de BRET puisqu'elle permet une quantification plus facile de l'interaction entre deux protéines en plus de pouvoir observer l'effet d'une interaction dose-dépendante.

Cependant, et contrairement à ce qui est dit plus haut, il est aussi à envisager une hypothèse alternative : que des mécanismes biologiques empêchent l'activation de la sous-unité $G\beta\gamma$ lorsque la cellule est en polarisation bipolaire. Il existe effectivement une famille de protéines structurales appelées les régulatrices de la signalisation des protéines G (ou RGS pour « Regulators of G protein Signaling ») dont le rôle est, tel que leur nom le laisse prédire, de réguler l'activation des voies signalétiques des protéines G hétérotrimériques [123]. Dans cette famille se trouve la RGS3, une protéine dont l'activité inhibitrice de la sous-unité $G\beta\gamma$ a été démontrée [124]. Cette même protéine, lorsque modifiée pour ne pas pouvoir recruter les protéines G, a été liée à une augmentation de la chimiotaxie chez les lymphocytes T [125]. Les protéines de la famille des RGS, dont la RGS3, pourraient donc jouer un rôle de point de contrôle dans les mécanismes de la dichotomie.

Dans les cas où la sous-unité G β γ n'activerait pas la PI3K durant la synchronisation des cellules, il serait pertinent d'observer si l'inhibiteur de la sous-unité G β γ connu, la RGS3, est présent et actif. La protéine RGS3 est normalement située dans le cytoplasme, mais lors de son activation, elle est acheminée à la membrane cellulaire [126]. Ainsi, par microscopie et recombinaison d'ADN, nous pourrions suivre sa ségrégation à la membrane cellulaire, et donc, l'inhibition de la sous-unité G β γ .

4.1.2.4 La voie de signalisation de la β -arrestine

Nous avons testé l'endocytose de CXCR4 pour tester l'hypothèse que le récepteur puisse être rendu inactif par la présence de molécules antagonistes [127]. En effet, le modèle de Luttrell et Lefkowitz propose que l'endocytose d'un RCPG est dépendante de la protéine d'échafaudage β -arrestine [117]. En ce sens, tester l'endocytose de CXCR4 revient alors à sa capacité de recruter la β -arrestine en réponse à CXCL12. Rappelons que ce recrutement a été décrit comme essentiel à l'activité chimiotactique de CXCR4 [128].

Nos résultats démontrent alors qu'en phase G2/M, CXCR4 conserve sa capacité d'internaliser. Ainsi, nous pouvons établir la conclusion que le récepteur en lui-même demeure fonctionnel, en ce qui concerne le recrutement de la β -arrestine, aux stimuli chimiotactiques externes.

Sachant donc que le recrutement de la β -arrestine à CXCR4, ainsi que l'activation de la protéine G α i par ce récepteur demeurent fonctionnelles (tel qu'observé par l'endocytose et l'inhibition de production d'AMPc) lors de la division cellulaire, nous avons testé l'activation de la kinase MAPK ERK 1/2 comme paramètre supplémentaire. Effectivement, l'activation de ERK se situe en aval des voies de la β -arrestine et des voies des protéines G; en testant l'activation de ERK, nous abordons alors la question à savoir si la transmission du signal en aval de β -arrestine/protéines G demeure intacte. Ceci est intéressant dans la mesure où l'activation de la MAPK ERK 1/2 permet l'activation des facteurs du complexe tertiaire [129, 130]. Ces facteurs de transcription permettent l'expression des gènes IEGs (pour « Immediate Early

Genes », ou premiers gènes immédiats), des protéines impliquées, entre autres, dans la division cellulaire ainsi que la motilité [131-133].

Nos résultats suggèrent que l'activation de ERK 1/2 n'est ni augmentée ni réduite en fonction du cycle cellulaire, et que la synchronisation des cellules n'affecte ainsi pas l'activation de ERK 1/2. Il est cependant important de noter que ces résultats sont qualificatifs (présence ou non de p-ERK 1/2) et les expériences nécessiteront d'être refaites de par les problèmes concernant les quantités des protéines de contrôle inconstantes et de par le faible nombre d'expériences effectuées. Les résultats concernant l'activation des protéines ERK 1/2 n'ont cependant que très peu d'influence sur les conclusions posées dans cette étude.

Ensemble, nos résultats démontrent que les voies de signalisation de la protéine G α i et la β -arrestine ne sont pas affectées par la synchronisation à la limite des phases G2 et M. Les récepteurs CXCR4 en surface des cellules Reh synchronisées restent donc sensibles à la présence de la chimiokine CXCL12, tel qu'il a été démontré par les essais d'endocytose, d'inhibition de production de l'AMPc et par les résultats préliminaires d'activation de ERK 1/2. Nous démontrons ainsi que l'absence de chimiotaxie pendant les phases G2 et M ne serait pas due à une régulation négative temporaire des voies signalétiques du récepteur. Nous pensons que, dans leur ensemble, nos résultats invalident ainsi cette hypothèse.

Il conviendra alors d'explorer des hypothèses alternatives pour expliquer le phénomène que nous avons démontré.

4.2 Les mécanismes alternatifs et les perspectives

Même si nous avons démontré l'existence de la dichotomie entre la chimiotaxie et la limite des phases G2/M chez les cellules humaines, les mécanismes étudiés nous démontrent qu'au moins certaines voies de signalisation proximales restent intactes durant la division cellulaire. La section suivante aborde une proposition alternative sur le mécanisme de la dichotomie chimiotaxie/division cellulaire.

4.2.1 L'hypothèse alternative

Notre réflexion ne s'arrête cependant pas aux résultats observés dans la présente étude. Effectivement, ces résultats nous révèlent encore plus d'informations qu'il ne peut le sembler aux premiers abords : si les voies de signalisation découlant de CXCR4 sont toujours observables lors de la synchronisation des cellules, la chimiotaxie, elle, ne l'est pas. Nous émettons donc l'hypothèse que la polarisation unipolaire ne peut possiblement pas survenir lorsque les cellules sont engagées dans une polarisation bipolaire.

Ainsi, comme hypothèse alternative, nous envisageons que bien que les cascades signalétiques de CXCR4 demeurent intactes durant les phases G2/M, leur polarisation unipolaire, essentielle à la chimiotaxie, n'est plus possible en phases G2/M. En d'autres mots, la polarisation bipolaire caractéristique de la division cellulaire l'emporterait sur la polarisation unipolaire.

Cette hypothèse alternative concorderait effectivement avec des observations qu'à faites Janetopoulos avec les amibes : les cellules engagées dans le processus de division, dont la polarisation est bipolaire, ne peuvent engager la chimiotaxie, dont la polarisation est unipolaire [95]. De plus, ces résultats concordent avec le modèle de Mitchinson qui prédit que les cellules de levure *Schizosaccharomyces pombe* doivent avoir engagé le mode de bipolarisation avant l'entrée en phase M, et donc en phase G2 [91].

4.2.2 Les perspectives

Selon nos observations, nous envisageons que la dichotomie étudiée est la conséquence d'une impossibilité des cellules de réorganiser leur polarisation lors de la division cellulaire, sans pour autant inhiber les voies de signalisation proximales du récepteur. Nous présentons ici les mécanismes que nous étudierons afin de mieux comprendre la dichotomie chimiotaxie/mitose. En un premier temps, nous aborderons l'inhibition de la protéine G $\beta\gamma$ et dans un deuxième temps, nous explorerons les voies de polarisation cellulaire par l'étude du phospholipide PIP3 ainsi que la distribution des RhoGEFs RhoA et Rac/Cdc42.

Les figures 16 et 17 montrent, respectivement, les mécanismes étudiés durant cette étude et les mécanismes à explorer selon nos perspectives.

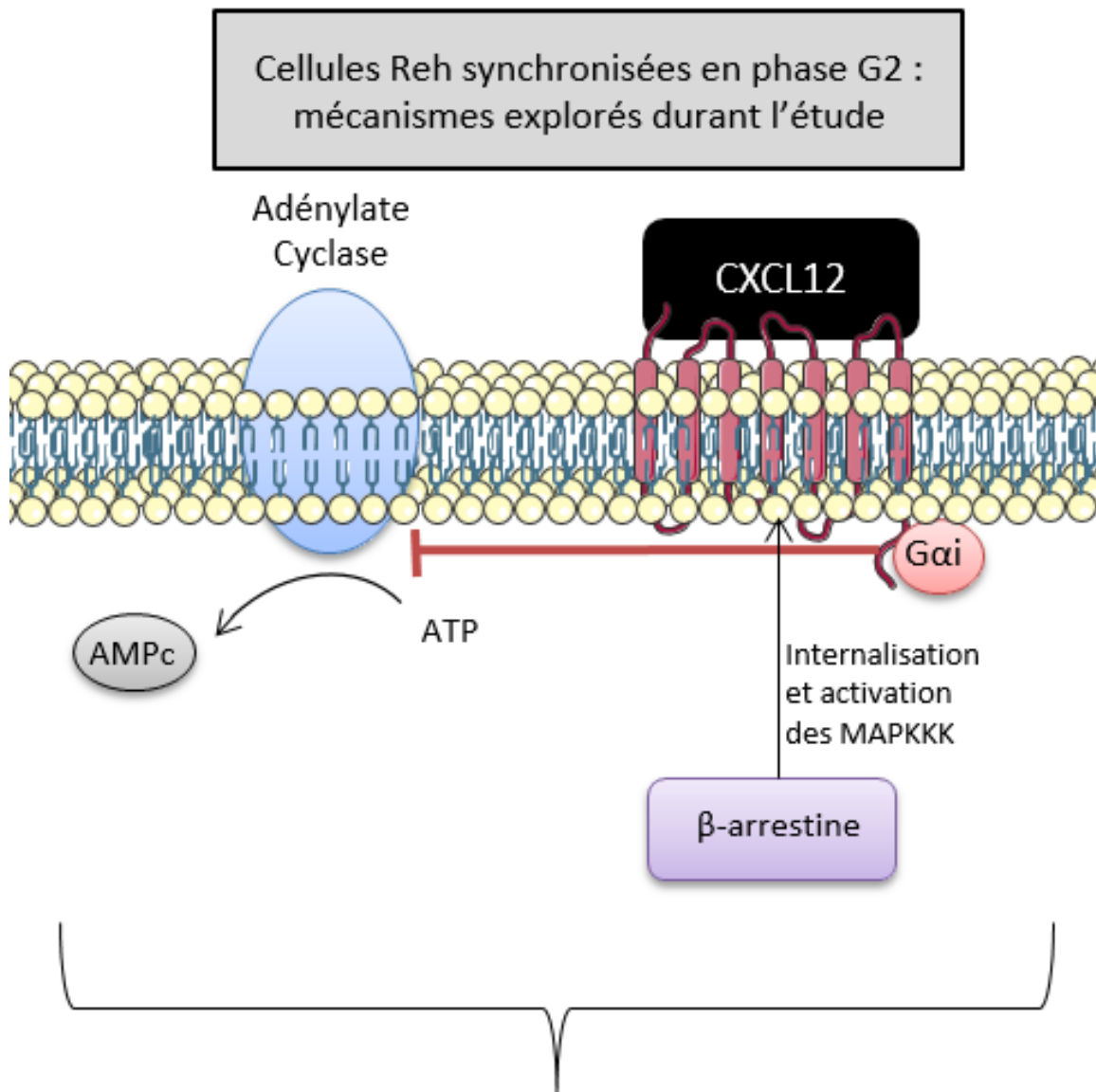
4.2.2.1 La distribution des marqueurs de polarisation PIP3 et les RhoGEFs

Nous allons maintenant proposer des démarches pour tester la deuxième hypothèse, selon laquelle non pas la signalisation, mais la polarisation de la réponse signalétique d'une cellule à la limite des phases G2 et M est altérée.

4.2.2.1.1 La polarisation de la cellule par PIP3

Nous avons mentionné que le PIP3 détermine le pôle dirigeant durant la chimiotaxie et les extrémités opposées à la plaque mitotique durant la mitose. Il sera donc pertinent d'étudier la répartition du PIP3 en réponse à la chimiokine CXCL12 lors de la synchronisation des cellules à la limite des phases G2/M. Ceci permettra alors de vérifier si la polarisation unipolaire peut – ou ne peut pas – s'exécuter.

Puisque PIP3 n'est pas une protéine, nous ne pouvons pas étudier directement sa répartition à la membrane cellulaire. Janetopoulos propose alors d'utiliser un domaine PH couplé à une protéine fluorescente : le PIP3 constitue effectivement le site de recrutement du domaine PH [36-38]. Ainsi, il nous sera possible, par l'entremise du PH-YFP, de suivre la répartition du PIP3 [95]. C'est en outre ce que démontre Janetopoulos dans son article : la protéine de fusion PH-YFP est bel et bien localisée à la membrane cellulaire de façon bipolaire lorsque les cellules des amibes sont en division. Lorsque les cellules suivent un gradient chimioattractants d'AMPC, PH-YFP ne se retrouve qu'au pôle dirigeant. Nous utiliserons une fois de plus la technique de recombinaison d'ADN afin de produire le plasmide PH-YFP et introduire ce plasmide par infection lentivirale dans les cellules Reh. Nous pourrons suivre la polarisation de PIP3, par l'entremise du domaine PH, par observation des cellules au microscope.



Pas de réponse chimiotactique, mais présence de CXCR4
réponse des mécanismes des protéines Gαi et β-arrestine
suite à la stimulation de CXCR4 par CXCL12

Figure 16. Mécanismes explorés et conclusions posées durant la présente étude.

Cette image fut créée à partir de la banque d'images vectorielles *Servier's Vectorial Powerpoint images bank*. À noter que la représentation spatio-temporelle des protéines n'est pas respectée. Gαi signifie « la protéine G trimérique, sous-unité α ». cAMP ou AMPc signifie « adénosine monophosphate cyclique ». PKA signifie « protéine kinase A ». ATP signifie « adénosine triphosphate ». Une flèche signifie une relation de stimulation ou production, alors qu'une barre rouge signifie une relation d'inhibition.

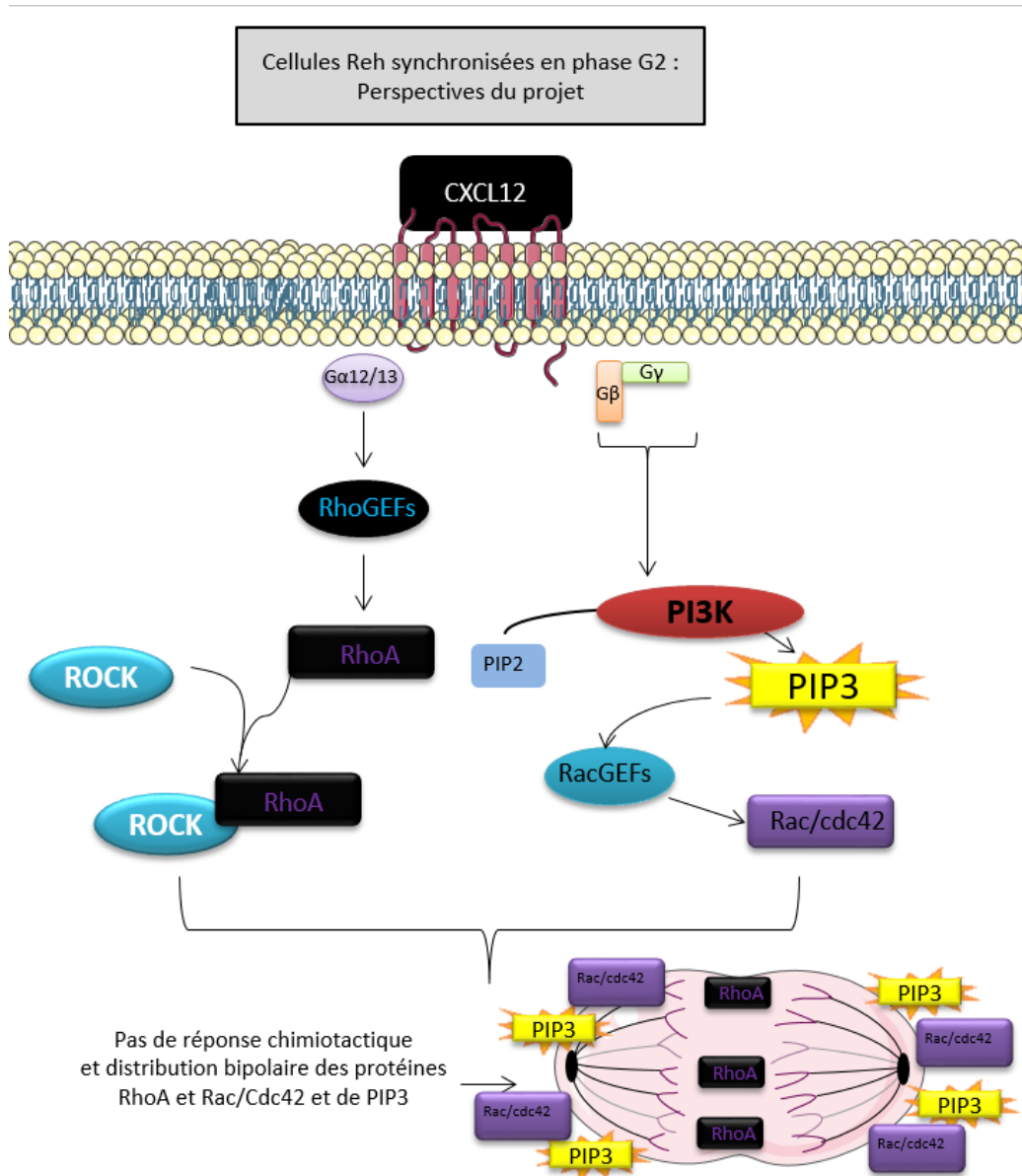


Figure 17. Mécanismes à explorer pour les perspectives du projet et conclusions attendues.

Cette image fut créée à partir de la banque d'images vectorielles *Servier's Vectorial Powerpoint images bank*. À noter que la représentation spatio-temporelle des protéines n'est pas respectée. G α 12/13, G β et G γ signifient « les protéines G trimériques, sous-unité α 12/13, β ou γ ». RhoGEFs signifie « facteurs d'échange du guanosine de Rho (Homologue de la famille de gènes Ras) ». ROCK signifie « kinase associée à Rho ». RhoA signifie « Homologue de la famille de gènes Ras, membre A ». PIP2 et PIP3 signifie « phophatidyinositol-4,5-bisphosphate » et « phophatidyinositol-3,4,5-trisphosphate », respectivement. Rac/cdc42 signifie « substrat C3, en relation avec Ras, de la toxine botulique/ Homologue de la protéine 42 contrôlant la mitose ». PI3K signifie « kinase de PIP3 ». RacGEFs signifie « facteurs d'échange du guanosine de Rac (substrat C3, en relation avec Ras, de la toxine botulique) ». Une flèche signifie une relation de stimulation ou production, alors qu'une barre rouge signifie une relation d'inhibition.

Nous savons que les cellules non synchronisées deviendraient polarisées de façon unipolaire en présence de chimiokine. Nous savons aussi que les cellules en division cellulaire (et en fin de la phase G2) sont polarisées de façon bipolaire. Selon l'hypothèse alternative, la stimulation des cellules pré-B avec la chimiokine CXCL12 ne devrait pas perturber la disposition du PIP3 aux deux extrémités polarisées d'une cellule en division : les cellules en division resteraient polarisées de façon bipolaire.

4.2.2.1.2 La polarisation de la cellule par Rac/Cdc42 et RhoA

Si le PIP3 définit la polarisation de la cellule, ce sont très certainement les RhoGEFs Rac/Cdc42 et RhoA qui jouent le rôle du maintien de cette polarisation. Nous désirons donc examiner, au même titre que le PIP3, leur répartition à la membrane cellulaire lors de la synchronisation des cellules à la limite des phases G2 et M, et lorsque stimulés par un chimioattractants.

Pour ce faire, nous utiliserons la technique de recombinaison d'ADN avec deux protéines fluorescentes différentes afin de suivre la ségrégation de Rac/Cdc42 et RhoA. Nous obtiendrons les plasmides Rac/Cdc42-YFP et RhoA-CFP (pour « Cyan Fluorescent Protein ») qui seront ensuite introduits dans les cellules Reh par la méthode d'infection lentivirale. Leur ségrégation serait suivie par microscopie.

En 2001, David Michaelson et ses collaborateurs ont justement utilisé des constructions des RhoGEFs Rac, Cdc42 et RhoA avec une GFP afin d'étudier au microscope leur localisation dans les cellules. Ils ont pu observer que Rac et Cdc42 sont généralement situés à la membrane cellulaire alors que RhoA est une protéine cytosolique [134]. Cependant, ils n'ont pas exploré la coexpression de Rac/Cdc42 et RhoA et donc la ségrégation réciproque de ces RhoGEFs.

De plus, ils n'ont pas étudié la réorganisation de ces RhoGEFs à la suite d'une stimulation chimioattractante chez les cellules motiles.

Selon notre hypothèse, dans des cellules non synchronisées, nous nous attendons à observer que Rac et Cdc42 sont redistribués au pôle dirigeant durant la chimiotaxie, alors que RhoA se retrouve dans la queue traînante. Cependant, Rac et Cdc42 seront ségrégués aux extrémités des cellules en division cellulaire, alors que la protéine RhoA sera présente à la plaque mitotique : le rôle de Rac/Cdc42 dans la stabilisation de l'adhésion du cytosquelette de microtubules aux kinétochores et le rôle de RhoA dans la formation de l'anneau contractile nous permettent d'émettre avec confiance ces prédictions [98, 135, 136]. L'hypothèse alternative prédirait en revanche que les cellules en division (et donc les cellules synchronisées en G2/M) ne pourront pas modeler la distribution des RhoGEFs afin d'adopter une polarisation unipolaire lorsque stimulées avec la chimiokine.

Nous explorerons, en même temps, l'hypothèse que les RhoGEFs peuvent être activés sans toutefois remodeler leur polarisation. Afin de démontrer que les RhoGEFs Rac et Cdc42 restent sensibles aux cascades signalétiques engendrées par la liaison de la chimiokine sur son récepteur, nous proposons d'utiliser un rapporteur BRET. Puisque l'activation de Rac/Cdc42 mène à l'activation de PAK1 par interaction protéine-protéine directe, nous proposons de construire un rapporteur de type Rluc3-PAK1-Rac/Cdc42-GFP10 [45]. Cette technique a déjà été utilisée auparavant dans la littérature. L'équipe du Dr Matsuda a utilisé un rapporteur semblable, mais en transfert d'énergie par fluorescence (FRET) : leur construction était un rapporteur YFP-PAK1-Rac/Cdc42-CFP, qui leur permettait d'observer où et quand l'activation de Rac/Cdc42 se produisait chez les cellules vivantes [137]. Cette technique ressemble d'ailleurs à celle que nous avons employée pour l'étude de l'activité de la protéine G α i par le rapporteur GFP10-Epac-Rluc3. Nous pourrions donc suivre si Rac/Cdc42 est activé (signal BRET élevé) ou non (signal BRET faible). L'avantage d'utiliser un biosenseur BRET plutôt que le rapporteur original de Matsuda réside dans la possibilité de quantifier le signal obtenu et d'observer la présence d'une activité de Rac/Cdc42 dose-dépendante à la stimulation par la chimiokine.

Ainsi, nous nous attendons à observer que malgré la synchronisation des cellules à la limite des phases G2 et M, la stimulation par la chimiokine CXCL12 permettra d'observer une activation de Rac et de Cdc42, démontrant ainsi que les voies de signalisation restent, en principe, intactes chez les cellules en division, mais non pas leur répartition dans la cellule.

4.3 « Go-or-Grow »

Nous avons mentionné que le phénomène de dichotomie que nous avons observé, démontré et étudié au courant de notre travail, n'avait que très peu été étudié et reporté dans la littérature. Il est cependant intéressant de noter qu'un phénomène apparenté a déjà été observé à maintes reprises dans la littérature. Ainsi, par ces observations, certaines équipes ont établi les fondations de notre projet. C'est ce que nous aborderons dans la section suivante.

Tel que mentionné, nous avons fondé notre étude sur la dichotomie entre la **chimiotaxie** et la **limite des phases G2/M** spécifiquement. Il est intéressant de noter que la dichotomie entre la **migration cellulaire** et la **prolifération d'une population de cellules** a été décrite sous le terme « Go-or-Grow » dans la littérature. Cependant, cette appellation est utilisée pour décrire une population de cellules cancéreuses et compare la capacité d'un cancer à proliférer avec sa capacité à métastaser. Le « Go-or-Grow » n'est pas applicable à ce que nous avons étudié avec le modèle de la dichotomie entre la chimiotaxie et les phases G2/M au niveau unicellulaire; il décrit la nature d'une population de cellules (e.g. un cancer) à diminuer sa réponse aux signaux de migration lorsque la prolifération est accrue.

Ces deux dichotomies ne réfèrent pas exactement aux mêmes mécanismes, mais la nature de ceux-ci pourrait être similaire. Effectivement, la dichotomie chez une cellule entre la chimiotaxie et les phases de polarisation bipolaire du cycle cellulaire (G2 et M) pourraient expliquer la tendance « Go-or-Grow » d'une population. Puisque le modèle « Go-or-Grow » est étudié dans la littérature, alors que la dichotomie sur laquelle nous nous penchons est

encore peu étudiée, nous avons décidé de développer un peu plus sur ce modèle afin de comparer nos observations.

Ainsi, en 1996, l'équipe de Giese fut la première à rapporter cette observation chez les astrocytes humains [138]. Leur conclusion, et celle des équipes qui suivirent ces recherches, est telle que plus une population de cellules a tendance à proliférer rapidement, moins celle-ci aura tendance à migrer. Ainsi, les astrocytes cancéreux les moins prolifères ont tendance à favoriser des rechutes lors des traitements [138]. Cette caractéristique s'explique par leur tendance à migrer plus facilement et ainsi de créer des métastases.

Cependant, le phénomène de « Go-or-Grow » ne fait pas l'unanimité. En 2003, Corcoran et Del Maestro entreprennent de tester l'hypothèse du « Go-or-Grow » dans les cellules de médulloblastomes et démontrent une corrélation positive entre le nombre d'événements de mitose et la prolifération d'une masse cancéreuse de médulloblastomes [139]. De façon assez intéressante, leurs résultats démontrent aussi que la mitose et la prolifération ne se produisent pas en même temps au niveau unicellulaire, et sont mutuellement exclusifs. Or, les auteurs ne font pas mention de ces résultats; ceux-ci sont soulignés par Peter D. Canoll et Jeffrey N. Bruce, dans la section « commentaires » du même article. Il semble donc que la dichotomie que nous étudions ait déjà été observée, sans pour autant avoir suscité un intérêt particulier.

De plus, le Dr Balázs Hegedűs et son équipe ont démontré en 2013 que la prolifération et la migration possèdent aussi une corrélation positive chez les mélanomes et les cancers du poumon [140]. Donc, chez certaines lignées cancéreuses, plus la population démontre une tendance à proliférer, plus elle a tendance à migrer et ainsi créer des métastases [140]. Ils expliquent leur observation en faisant le lien entre la durée de la division cellulaire et la migration : plus la division cellulaire d'une cellule est longue, moins la population cancéreuse aura tendance à migrer, peu importe la prolifération. Cette dernière observation ouvre la voie à notre projet : la cytokinèse étant une étape de la phase de mitose, elle possède donc une polarisation bipolaire.

5. Conclusion

Dans le présent travail, nous avons apporté la démonstration de la dichotomie entre la chimiotaxie et la division cellulaire à la frontière des phases G2 et M, chez les cellules humaines. Il s'agit de la première démonstration de cette dichotomie chez les cellules humaines. Effectivement, nous avons décidé de tester si le modèle NETO, apporté par Mitchison et Nurse en 1985, s'appliquait aux cellules humaines. L'hypothèse apportée par le modèle NETO prévoit que les cellules de levure doivent engager un mode de polarisation bipolaire *avant* leur entrée en mitose. Ainsi, nous avons synchronisé les cellules à la frontière des phases G2 et M afin de démontrer cette dichotomie chez les cellules pré-B humaines. Nos résultats démontrent donc que la dichotomie chimiotaxie/mitose s'applique avant même l'entrée des cellules en mitose : dès l'adoption d'un mode de polarisation bipolaire, les cellules ne peuvent plus engager la chimiotaxie.

Dans notre travail, nous avons aussi exploré les mécanismes impliqués dans la dichotomie. Nous avons étudié l'endocytose du récepteur CXCR4 lors de la stimulation avec CXCL12, un processus dépendant de la protéine β -arrestine. Nous avons aussi étudié l'inhibition de la production d'AMPc par la sous-unité $G\alpha$ des protéines G hétérotrimériques. Finalement, nous avons exploré l'activation des kinases ERK 1/2, un résultat de l'activation classique de la protéine β -arrestine et des protéines G hétérotrimériques : ces résultats nécessiteront cependant d'être refaits.

De façon intéressante, les voies des protéines G α i et β -arrestine explorées restent intactes durant la bipolarisation des cellules. Ainsi, il est raisonnable de conclure ces voies ne sont pas impliquées dans la régulation de la réponse chimiotactique durant la mitose. Nous discutons ainsi d'une hypothèse alternative pouvant expliquer cette dichotomie et nous présentons les méthodes que nous proposons d'utiliser afin d'explorer ces mécanismes dans les années à suivre. Entre autre, nous proposons d'étudier la répartition du phospholipide chargé PIP3 à la membrane cellulaire et celle des RhoGEFs RhoA et Rac/Cdc42.

6. Références

1. Nakatsuji, N. and K.E. Johnson, *Ectodermal fragments from normal frog gastrulae condition substrata to support normal and hybrid mesodermal cell migration in vitro*. J Cell Sci, 1984. **68**: p. 49-67.
2. Oppenheim, J.J., et al., *Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 617-48.
3. D'Apuzzo, M., et al., *The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4*. Eur J Immunol, 1997. **27**(7): p. 1788-93.
4. Mackay, C.R., *Chemokine receptors and T cell chemotaxis*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 799-802.
5. Keating, M.T. and J.T. Bonner, *Negative chemotaxis in cellular slime molds*. Journal of Bacteriology, 1977. **130**(1): p. 144-147.
6. Konijn, T.M., et al., *Identification of adenosine-3',5'-monophosphate as the bacterial attractant for myxamoebae of Dictyostelium discoideum*. J Bacteriol, 1969. **99**(2): p. 510-2.
7. Zigmond, S.H. and J.G. Hirsch, *LEUKOCYTE LOCOMOTION AND CHEMOTAXIS : NEW METHODS FOR EVALUATION, AND DEMONSTRATION OF A CELL-DERIVED CHEMOTACTIC FACTOR*. The Journal of Experimental Medicine, 1973. **137**(2): p. 387-410.
8. Muller, S., et al., *Salt-dependent chemotaxis of macrophages*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73439.
9. Schiffmann, E., B.A. Corcoran, and S.M. Wahl, *N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(3): p. 1059-62.
10. Carp, H., *Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils*. J Exp Med, 1982. **155**(1): p. 264-75.
11. Marasco, W.A., et al., *Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by Escherichia coli*. J Biol Chem, 1984. **259**(9): p. 5430-9.
12. Schiffmann, E., et al., *The isolation and partial characterization of neutrophil chemotactic factors from Escherichia coli*. J Immunol, 1975. **114**(6): p. 1831-7.
13. Laing, K.J. and C.J. Secombes, *Chemokines*. Dev Comp Immunol, 2004. **28**(5): p. 443-60.
14. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *The chemokine superfamily revisited*. Immunity, 2012. **36**(5): p. 705-16.
15. Hill, S.J., *G-protein-coupled receptors: past, present and future*. British Journal of Pharmacology, 2006. **147**(Suppl 1): p. S27-S37.
16. Casey, P.J., M.P. Graziano, and A.G. Gilman, *G protein beta gamma subunits from bovine brain and retina: equivalent catalytic support of ADP-ribosylation of alpha subunits by pertussis toxin but differential interactions with Gs alpha*. Biochemistry, 1989. **28**(2): p. 611-6.
17. Gilman, A.G., *G proteins and dual control of adenylate cyclase*. Cell, 1984. **36**(3): p. 577-9.
18. Northup, J.K., et al., *The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase. Resolution of the activated 45,000-dalton (alpha) subunit*. J Biol Chem, 1983. **258**(18): p. 11369-76.
19. Northup, J.K., P.C. Sternweis, and A.G. Gilman, *The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase. Resolution, activity, and properties of the 35,000-dalton (beta) subunit*. J Biol Chem, 1983. **258**(18): p. 11361-8.
20. Roberts, D.J. and M. Waelbroeck, *G protein activation by G protein coupled receptors: ternary complex formation or catalyzed reaction?* Biochemical Pharmacology, 2004. **68**(5): p. 799-806.
21. Albert, P.R. and L. Robillard, *G protein specificity*. Cellular Signalling, 2002. **14**(5): p. 407-418.

22. Torisawa, Y.S., et al., *Microfluidic platform for chemotaxis in gradients formed by CXCL12 source-sink cells*. *Integr Biol (Camb)*, 2010. **2**(11-12): p. 680-6.
23. Neptune, E.R. and H.R. Bourne, *Receptors induce chemotaxis by releasing the betagamma subunit of Gi, not by activating Gq or Gs*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(26): p. 14489-94.
24. Smigel, M.D., *Purification of the catalyst of adenylate cyclase*. *J Biol Chem*, 1986. **261**(4): p. 1976-82.
25. Bourne, H.R., *How receptors talk to trimeric G proteins*. *Curr Opin Cell Biol*, 1997. **9**(2): p. 134-42.
26. Hamm, H.E., *The many faces of G protein signaling*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(2): p. 669-72.
27. Samama, P., et al., *A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(7): p. 4625-36.
28. Gilman, A.G., *G proteins: transducers of receptor-generated signals*. *Annu Rev Biochem*, 1987. **56**: p. 615-49.
29. Corbin, J.D., S.L. Keely, and C.R. Park, *The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases in adipose, cardiac, and other tissues*. *J Biol Chem*, 1975. **250**(1): p. 218-25.
30. Keely, S.L., J.D. Corbin, and C.R. Park, *Regulation of adenosine 3:5-monophosphate-dependent protein kinase*. *J Biol Chem*, 1975. **250**(13): p. 4832-40.
31. Miller, J.R., P.J. Silver, and J.T. Stull, *The role of myosin light chain kinase phosphorylation in beta-adrenergic relaxation of tracheal smooth muscle*. *Mol Pharmacol*, 1983. **24**(2): p. 235-42.
32. Deming, P.B., et al., *Protein kinase A regulates 3-phosphatidylinositide dynamics during platelet-derived growth factor-induced membrane ruffling and chemotaxis*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(50): p. 35199-211.
33. Lehmann, D.M., A.M. Seneviratne, and A.V. Smrcka, *Small molecule disruption of G protein beta gamma subunit signaling inhibits neutrophil chemotaxis and inflammation*. *Mol Pharmacol*, 2008. **73**(2): p. 410-8.
34. Cinalli, R.M., et al., *T cell homeostasis requires G protein-coupled receptor-mediated access to trophic signals that promote growth and inhibit chemotaxis*. *European journal of immunology*, 2005. **35**(3): p. 786-795.
35. Wymann, M.P., et al., *Lipids on the move: phosphoinositide 3-kinases in leukocyte function*. *Immunol Today*, 2000. **21**(6): p. 260-4.
36. Baraldi, E., et al., *Structure of the PH domain from Bruton's tyrosine kinase in complex with inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate*. *Structure*, 1999. **7**(4): p. 449-60.
37. Ferguson, K.M., et al., *Structural basis for discrimination of 3-phosphoinositides by pleckstrin homology domains*. *Mol Cell*, 2000. **6**(2): p. 373-84.
38. Lietzke, S.E., et al., *Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains*. *Mol Cell*, 2000. **6**(2): p. 385-94.
39. Meili, R., et al., *Chemoattractant-mediated transient activation and membrane localization of Akt/PKB is required for efficient chemotaxis to cAMP in Dictyostelium*. *EMBO J*, 1999. **18**(8): p. 2092-105.
40. Majka, M., et al., *The role of HIV-related chemokine receptors and chemokines in human erythropoiesis in vitro*. *Stem Cells*, 2000. **18**(2): p. 128-38.
41. Chung, C.Y., G. Potikyan, and R.A. Firtel, *Control of cell polarity and chemotaxis by Akt/PKB and PI3 kinase through the regulation of PAKa*. *Mol Cell*, 2001. **7**(5): p. 937-47.
42. Higgs, H.N. and T.D. Pollard, *Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex*. *J Cell Biol*, 2000. **150**(6): p. 1311-20.

43. Rohatgi, R., et al., *The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly*. Cell, 1999. **97**(2): p. 221-31.
44. Arber, S., et al., *Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase*. Nature, 1998. **393**(6687): p. 805-9.
45. Yang, N., et al., *Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization*. Nature, 1998. **393**(6687): p. 809-12.
46. Ichetovkin, I., W. Grant, and J. Condeelis, *Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex*. Curr Biol, 2002. **12**(1): p. 79-84.
47. Koestler, S.A., et al., *Arp2/3 complex is essential for actin network treadmilling as well as for targeting of capping protein and cofilin*. Mol Biol Cell, 2013. **24**(18): p. 2861-75.
48. Maehama, T., G.S. Taylor, and J.E. Dixon, *PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 247-79.
49. Stewart, M.P., C. Cabanas, and N. Hogg, *T cell adhesion to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is controlled by cell spreading and the activation of integrin LFA-1*. J Immunol, 1996. **156**(5): p. 1810-7.
50. Stewart, M.P., A. McDowall, and N. Hogg, *LFA-1-mediated adhesion is regulated by cytoskeletal restraint and by a Ca²⁺-dependent protease, calpain*. J Cell Biol, 1998. **140**(3): p. 699-707.
51. Liu, F., et al., *Calcium-dependent human erythrocyte cytoskeleton stability analysis through atomic force microscopy*. J Struct Biol, 2005. **150**(2): p. 200-10.
52. Conti, M.A. and R.S. Adelstein, *The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3':5' cAMP-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 1981. **256**(7): p. 3178-81.
53. Yagi, H., et al., *A synthetic biology approach reveals a CXCR4-G13-Rho signaling axis driving transendothelial migration of metastatic breast cancer cells*. Sci Signal, 2011. **4**(191): p. ra60.
54. Tan, W., D. Martin, and J.S. Gutkind, *The Galpha13-Rho signaling axis is required for SDF-1-induced migration through CXCR4*. J Biol Chem, 2006. **281**(51): p. 39542-9.
55. Kumar, A., et al., *Galpha13 and Rho mediate endosomal trafficking of CXCR4 into Rab11+ vesicles upon stromal cell-derived factor-1 stimulation*. J Immunol, 2011. **186**(2): p. 951-8.
56. Ishizaki, T., et al., *The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase*. EMBO J, 1996. **15**(8): p. 1885-93.
57. Leung, T., et al., *A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes*. J Biol Chem, 1995. **270**(49): p. 29051-4.
58. Matsui, T., et al., *Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho*. EMBO J, 1996. **15**(9): p. 2208-16.
59. Kawano, Y., et al., *Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo*. J Cell Biol, 1999. **147**(5): p. 1023-38.
60. Kimura, K., et al., *Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)*. Science, 1996. **273**(5272): p. 245-8.
61. Totsukawa, G., et al., *Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts*. J Cell Biol, 2000. **150**(4): p. 797-806.
62. Sitaramayya, A. and P.A. Liebman, *Phosphorylation of rhodopsin and quenching of cyclic GMP phosphodiesterase activation by ATP at weak bleaches*. J Biol Chem, 1983. **258**(20): p. 12106-9.
63. Liu, X., et al., *Bidirectional regulation of neutrophil migration by mitogen-activated protein kinases*. Nat Immunol, 2012. **13**(5): p. 457-64.

64. Gutkind, J.S., *The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades.* J Biol Chem, 1998. **273**(4): p. 1839-42.
65. Goodman, O.B., Jr., et al., *Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor.* Nature, 1996. **383**(6599): p. 447-50.
66. Boldajipour, B., et al., *Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration.* Cell, 2008. **132**(3): p. 463-73.
67. Luker, K.E., et al., *Constitutive and chemokine-dependent internalization and recycling of CXCR7 in breast cancer cells to degrade chemokine ligands.* Oncogene, 2010. **29**(32): p. 4599-610.
68. Funamoto, S., et al., *Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis.* Cell, 2002. **109**(5): p. 611-23.
69. Haugh, J.M., et al., *Spatial sensing in fibroblasts mediated by 3' phosphoinositides.* J Cell Biol, 2000. **151**(6): p. 1269-80.
70. Nobes, C.D. and A. Hall, *Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia.* Cell, 1995. **81**(1): p. 53-62.
71. Ridley, A.J. and A. Hall, *The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors.* Cell, 1992. **70**(3): p. 389-99.
72. Taylor, D.L. and J.S. Condeelis, *Cytoplasmic structure and contractility in amoeboid cells.* Int Rev Cytol, 1979. **56**: p. 57-144.
73. Kozma, R., et al., *The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts.* Mol Cell Biol, 1995. **15**(4): p. 1942-52.
74. Brundage, R.A., et al., *Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils.* Science, 1991. **254**(5032): p. 703-6.
75. Nimnual, A.S., L.J. Taylor, and D. Bar-Sagi, *Redox-dependent downregulation of Rho by Rac.* Nat Cell Biol, 2003. **5**(3): p. 236-41.
76. Ohta, Y., J.H. Hartwig, and T.P. Stossel, *FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling.* Nat Cell Biol, 2006. **8**(8): p. 803-14.
77. Loetscher, M., et al., *Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes.* J Biol Chem, 1994. **269**(1): p. 232-7.
78. Nagasawa, T., et al., *Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1.* Nature, 1996. **382**(6592): p. 635-8.
79. Nagasawa, T., K. Tachibana, and T. Kishimoto, *A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection.* Semin Immunol, 1998. **10**(3): p. 179-85.
80. Tashiro, K., et al., *Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins.* Science, 1993. **261**(5121): p. 600-3.
81. Balabanian, K., et al., *The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes.* J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35760-6.
82. Kucia, M., et al., *CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion.* J Mol Histol, 2004. **35**(3): p. 233-45.
83. Di Salvo, J., et al., *The CXCR4 agonist ligand stromal derived factor-1 maintains high affinity for receptors in both Galpha(i)-coupled and uncoupled states.* Eur J Pharmacol, 2000. **409**(2): p. 143-54.
84. Miller, M.J., et al., *Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node.* Science, 2002. **296**(5574): p. 1869-73.

85. Stoll, S., et al., *Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes*. Science, 2002. **296**(5574): p. 1873-6.
86. Kastan, M.B., et al., *Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage*. Cancer Res, 1991. **51**(23 Pt 1): p. 6304-11.
87. Evans, T., et al., *Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division*. Cell, 1983. **33**(2): p. 389-96.
88. Russell, P. and P. Nurse, *Schizosaccharomyces pombe and Saccharomyces cerevisiae: a look at yeasts divided*. Cell, 1986. **45**(6): p. 781-2.
89. Schroeder, T.E., *Dynamics of the contractile ring*. Soc Gen Physiol Ser, 1975. **30**: p. 305-34.
90. Vorobjev, I.A. and S. Chentsov Yu, *Centrioles in the cell cycle. I. Epithelial cells*. J Cell Biol, 1982. **93**(3): p. 938-49.
91. Mitchison, J.M. and P. Nurse, *Growth in cell length in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe*. J Cell Sci, 1985. **75**: p. 357-76.
92. Crouch, M.F. and L. Simson, *The G-protein G(i) regulates mitosis but not DNA synthesis in growth factor-activated fibroblasts: a role for the nuclear translocation of G(i)*. FASEB J, 1997. **11**(2): p. 189-98.
93. Gotta, M. and J. Ahringer, *Distinct roles for Galpha and Gbetagamma in regulating spindle position and orientation in Caenorhabditis elegans embryos*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(3): p. 297-300.
94. Shankar, H., et al., *Non-visual arrestins are constitutively associated with the centrosome and regulate centrosome function*. J Biol Chem, 2010. **285**(11): p. 8316-29.
95. Janetopoulos, C., et al., *Temporal and spatial regulation of phosphoinositide signaling mediates cytokinesis*. Dev Cell, 2005. **8**(4): p. 467-77.
96. Kamijo, K., et al., *Dissecting the role of Rho-mediated signaling in contractile ring formation*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(1): p. 43-55.
97. Mabuchi, I., et al., *A rho-like protein is involved in the organisation of the contractile ring in dividing sand dollar eggs*. Zygote, 1993. **1**(4): p. 325-31.
98. Yasuda, S., et al., *Cdc42 and mDia3 regulate microtubule attachment to kinetochores*. Nature, 2004. **428**(6984): p. 767-71.
99. Greaves, M. and G. Janossy, *Patterns of gene expression and the cellular origins of human leukaemias*. Biochim Biophys Acta, 1978. **516**(2): p. 193-230.
100. Gibson, D.G., et al., *Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases*. Nature Methods, 2009. **6**: p. 343.
101. Dull, T., et al., *A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 8463-71.
102. Hong, S., et al., *Functional Analysis of Various Promoters in Lentiviral Vectors at Different Stages of In Vitro Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells*. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy, 2007. **15**(9): p. 1630-1639.
103. Jiang, L.I., et al., *Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G13 pathway*. J Biol Chem, 2007. **282**(14): p. 10576-84.
104. ATCC. *Reh (ATCC® CRL-8286™)*. [<https://www.atcc.org/en/Products/All/CRL-8286.aspx#documentation>] [cited 2017 2017-11-29]; [<https://www.atcc.org/en/Products/All/CRL-8286.aspx#documentation>].
105. Vassilev, L.T., *Cell cycle synchronization at the G2/M phase border by reversible inhibition of CDK1*. Cell Cycle, 2006. **5**(22): p. 2555-6.
106. Ormerod, M.G., B. Tribukait, and W. Giarretti, *DNA Consensus in Flow Cytometry*. Analytical Cellular Pathology. Vol. 17. 1998, United Kingdom.

107. Hobro, A.J. and N.I. Smith, *An evaluation of fixation methods: Spatial and compositional cellular changes observed by Raman imaging*. *Vibrational Spectroscopy*, 2017. **91**(Supplement C): p. 31-45.
108. Johnson, M.B. and A.K. Criss, *Fluorescence Microscopy Methods for Determining the Viability of Bacteria in Association with Mammalian Cells*. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 2013(79): p. 50729.
109. Hiraoka, Y., et al., *Flow Cytometry Analysis of Changes in the DNA Content of the Polychlorinated Biphenyl Degrader Comamonas testosteroni TK102: Effect of Metabolites on Cell-Cell Separation*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002. **68**(10): p. 5104-5112.
110. Frevert, C.W., et al., *Rapid fluorescence-based measurement of neutrophil migration in vitro*. *J Immunol Methods*, 1998. **213**(1): p. 41-52.
111. Naumann, U., et al., *CXCR7 Functions as a Scavenger for CXCL12 and CXCL11*. *PLOS ONE*, 2010. **5**(2): p. e9175.
112. Goding, J.W., *12 - Immunofluorescence*, in *Monoclonal Antibodies (Third Edition)*. 1996, Academic Press: London. p. 352-399.
113. Barak, L.S., et al., *Pharmacological characterization of membrane-expressed human trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) by a bioluminescence resonance energy transfer cAMP biosensor*. *Mol Pharmacol*, 2008. **74**(3): p. 585-594.
114. Mahmood, T. and P.-C. Yang, *Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting*. *North American Journal of Medical Sciences*, 2012. **4**(9): p. 429-434.
115. Paraiso, K.H.T., et al., *Measurement of constitutive MAPK and PI3K/AKT signaling activity in human cancer cell lines*. *Methods in enzymology*, 2010. **484**: p. 549-567.
116. Aksoy, M.O., et al., *CXCR3 surface expression in human airway epithelial cells: cell cycle dependence and effect on cell proliferation*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006. **290**(5): p. L909-18.
117. Luttrell, L.M. and R.J. Lefkowitz, *The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals*. *J Cell Sci*, 2002. **115**(Pt 3): p. 455-65.
118. Bhandari, D., et al., *Cyclin-dependent kinase 5 activates guanine nucleotide exchange factor GIV/Girdin to orchestrate migration-proliferation dichotomy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(35): p. E4874-83.
119. Ghosh, P., et al., *Activation of Galpha_i3 triggers cell migration via regulation of GIV*. *J Cell Biol*, 2008. **182**(2): p. 381-93.
120. Cheng, Z.-J., et al., *β -Arrestin Differentially Regulates the Chemokine Receptor CXCR4-mediated Signaling and Receptor Internalization, and This Implicates Multiple Interaction Sites between β -Arrestin and CXCR4*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(4): p. 2479-2485.
121. Spangrude, G.J., et al., *Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin*. *J Immunol*, 1985. **135**(6): p. 4135-43.
122. Leopoldt, D., et al., *Gbetagamma stimulates phosphoinositide 3-kinase-gamma by direct interaction with two domains of the catalytic p110 subunit*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(12): p. 7024-9.
123. De Vries, L., et al., *The regulator of G protein signaling family*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2000. **40**: p. 235-71.
124. Shi, C.S., et al., *Regulator of G-protein signaling 3 (RGS3) inhibits Gbeta1gamma 2-induced inositol phosphate production, mitogen-activated protein kinase activation, and Akt activation*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(26): p. 24293-300.
125. Williams, J.W., et al., *RGS3 controls T lymphocyte migration in a model of Th2-mediated airway inflammation*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013. **305**(10): p. L693-701.

126. Dulin, N.O., et al., *RGS3 inhibits G protein-mediated signaling via translocation to the membrane and binding to Galpha11*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(1): p. 714-23.
127. Khan, A., J. Greenman, and S.J. Archibald, *Small molecule CXCR4 chemokine receptor antagonists: developing drug candidates*. Curr Med Chem, 2007. **14**(21): p. 2257-77.
128. Sun, Y., et al., *Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49212-9.
129. Buchwalter, G., C. Gross, and B. Wasylyk, *Ets ternary complex transcription factors*. Gene, 2004. **324**: p. 1-14.
130. Olson, E.N. and A. Nordheim, *Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(5): p. 353-65.
131. Dhillon, A.S., et al., *MAP kinase signalling pathways in cancer*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3279-90.
132. Hollenhorst, P.C., L.P. McIntosh, and B.J. Graves, *Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors*. Annu Rev Biochem, 2011. **80**: p. 437-71.
133. Murphy, L.O. and J. Blenis, *MAPK signal specificity: the right place at the right time*. Trends in Biochemical Sciences, 2006. **31**(5): p. 268-275.
134. Michaelson, D., et al., *Differential Localization of Rho Gtpases in Live Cells: Regulation by Hypervariable Regions and Rhogdi Binding*. The Journal of Cell Biology, 2001. **152**(1): p. 111-126.
135. Kamijo, K., et al., *Dissecting the Role of Rho-mediated Signaling in Contractile Ring Formation*. Molecular Biology of the Cell, 2006. **17**(1): p. 43-55.
136. Mitsushima, M., F. Toyoshima, and E. Nishida, *Dual role of Cdc42 in spindle orientation control of adherent cells*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(10): p. 2816-27.
137. Itoh, R.E., et al., *Activation of Rac and Cdc42 Video Imaged by Fluorescent Resonance Energy Transfer-Based Single-Molecule Probes in the Membrane of Living Cells*. Molecular and Cellular Biology, 2002. **22**(18): p. 6582-6591.
138. Giese, A., et al., *Dichotomy of astrocytoma migration and proliferation*. Int J Cancer, 1996. **67**(2): p. 275-82.
139. Corcoran, A. and R.F. Del Maestro, *Testing the "Go or Grow" hypothesis in human medulloblastoma cell lines in two and three dimensions*. Neurosurgery, 2003. **53**(1): p. 174-84; discussion 184-5.
140. Garay, T., et al., *Cell migration or cytokinesis and proliferation?--revisiting the "go or grow" hypothesis in cancer cells in vitro*. Exp Cell Res, 2013. **319**(20): p. 3094-103.