

Université de Montréal

**Étude sur les fonctions *in vivo* des GEFs DOCK chez  
les mammifères**

par

Mélanie Laurin

Programmes de Biologie Moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de PhD  
en Programmes de Biologie Moléculaire

Septembre, 2013

© Mélanie Laurin, 2013







inactivation in the mammary gland led us to identify DOCK1-RAC signaling as novel effectors in HER2-mediated tumor growth and metastasis.

We conclude that the use of *Dock1* mouse models allowed us to identify some of the key functions regulated by this gene *in vivo*. Much like its ortholog mbc, Dock1 is essential to embryonic development and regulates myoblast fusion. Our study also reveals important degree of conservation of the mechanisms that regulate fusion between species. In addition, DOCK1 acts downstream of the HER2 RTK in mammary epithelial cells where it contributes to the progression of breast cancer pathology and the formation of metastasis induced by this oncogene.

**Keywords** : Dock1, Dock180, Dock5, Myoblast fusion, Breast cancer

































**WASP** : WISKOTT-ALDRICH SYNDROME PROTEIN  
**WAVE1** : WISKOTT-ALDRICH SYNDROME PROTEIN FAMILY MEMBER 1  
**WIP** : WASP-INTERACTING PROTEIN  
**WISH** : Whole mount in situ hybridization  
**WT** : Wild-type  
**XAF1** : XIAP ASSOCIATED FACTOR 1  
**ZBP1** : Z-DNA BINDING PROTEIN 1

*Pour papou et mamou,*





*Je remercie aussi les membres du club de la petite cuillère, Marie, Damien et MiniJen pour nos cafés du vendredi. Toujours agréable de débiter la fin de semaine avec vous à philosopher sur la vie, notre avenir et bien sûr la science toujours la science!*

*Je remercie JF Clément pour avoir toujours été là depuis le début de mon parcours de biologiste, mais aussi disons-le depuis le début de mon parcours de vie « adulte » ! Humm...*

*Enfin, je tiens à remercier plus particulièrement ma famille. Mon père et ma mère qui m'ont toujours encouragé et soutenu pendant mes études. Merci pour avoir toujours tenté de me faciliter la vie afin de me permettre de me concentrer sur mes études. Merci pour votre patience et pour avoir toujours démontré le plus grand intérêt pour mes projets de recherche. Merci à ma grand-mère pour avoir toujours pris des nouvelles et avoir envoyé autant d'ondes positives. Merci à mon frère que je sollicite aux moindres travaux ou déménagement. Je vous aimexxxx.*

# **INTRODUCTION**

# CHAPITRE 1

## **1.1 LES FONCTIONS *IN VIVO* DES GEFs DOCK CHEZ LES MAMMIFÈRES**



## **Abstract**

Rho GTPases are implicated in several aspects of embryonic development and aberrant regulation of their activity contributes to the progression of numerous diseases. The Rho guanine exchange factors (GEFs), which can be classified into Dbl and Dock subfamilies, mediate the spatio-temporal activation of Rho proteins and their ability to engage effector pathways. Recently, the combination of structural, biochemical and *in vitro* studies has allowed for major advancements in our understanding of the molecular mechanisms regulating the activity and function of atypical GEFs of the Dock family. In this review, we focus on genetic and mouse studies that have unearthed exciting key and unexpected roles for individual Dock family members in development and diseases.



contribution of Elmo scaffold proteins in the spatio-temporal activation of Rac by a subset of Elmo-binding Dock GEFs in Figure 1.1.3 (**Figure 1.1.3 page 10**). In addition, recent genetic studies offered important insights into the *in vivo* roles played by Dock GEFs (**Table 1.1 page 11**). In particular, the precise roles of Dock2 and Dock8 in immunology are being unraveled and these advances have recently been discussed in detail elsewhere (7). Here, we review the emerging and unsuspected biological functions controlled by Dock family members in development and diseases.







































## **1.2 LES MUSCLES SQUELETTIQUES**



































du dermomyotome du poulet et de la souris (145). Chez le poisson zèbre, on observe la formation de deux types de fibres musculaires provenant de la différenciation de deux populations distinctes de progéniteurs musculaires soient les fibres dites à contraction lente et les fibres dites à contraction rapide. Les premières sont des fibres mononucléées alors que les secondes sont le résultat de la fusion de myoblastes entre eux et sont plurinucléées (146).





















n'ont pas de défaut de fusion des myoblastes. Toutefois, il a été observé que les myotubes formés ont des problèmes d'attachement à l'épiderme (104).



## 1.2.6 Conclusion

La drosophile s'est avérée un modèle fructueux pour identifier des voies de signalisation essentielles à la fusion des myoblastes. De plus, plusieurs études ont notamment mis en évidence l'importance de la régulation du cytosquelette d'actine lors de la formation des fibres plurinucléées. Au moment de l'étude, les mécanismes moléculaires régulant la fusion des myoblastes chez les mammifères *in vivo* étaient très peu connus. La majorité des études avait été réalisée dans des modèles cellulaires et peu de molécules impliquées dans la fusion des myoblastes en culture se sont avérées essentielles au développement musculaire de la souris. De plus, le rôle des orthologues des molécules impliquées dans la machinerie de fusion de la drosophile n'avait pas été évalué chez la souris. Par conséquent, il devenait urgent de déterminer si les orthologues des molécules régulant la fusion chez la drosophile exerçaient des fonctions similaires chez d'autres espèces et si de façon plus générale les mécanismes de fusion des myoblastes identifiés chez la drosophile étaient conservés dans d'autres espèces.

## **1.3 LES GLANDES MAMMAIRES ET LE CANCER DU SEIN**





























































de glioblastome surexprimant EGFRvIII dans le cerveau de souris entraîne la formation de tumeurs invasives et l'expression d'un mutant DOCK1Y22F dans ces cellules compromet leur capacité à former ces tumeurs (12). Ainsi, ces différentes études suggèrent que mbc et DOCK1 sont essentiels pour la migration de différents types cellulaires en aval de l'activation de RTKs.

### **1.3.7 Conclusion**

Près de 20% des cas de cancer du sein présentent une amplification du locus codant pour HER2 ou une surexpression de ce récepteur. Les patientes HER2+ développent fréquemment des métastases et ont généralement un mauvais pronostic. Au cours des années, plusieurs stratégies ont été développées avec succès afin de traiter ces patientes. Toutefois, plusieurs d'entre elles développent éventuellement une résistance au traitement et développent des tumeurs secondaires. Par conséquent, il demeure une priorité d'identifier les mécanismes moléculaires menant à la formation de ces métastases. D'un point de vue moléculaire, nous savons que les RHO GTPases sont d'importants intermédiaires de signalisation contrôlant la migration des cellules cancéreuses. Néanmoins, les mécanismes moléculaires régulant la formation des métastases en aval de l'oncogène HER2 demeurent méconnus.



*Dock1* et ils contribuent à la réduction dramatique de la masse musculaire des souris mutantes. De plus, nous avons constaté une contribution du gène *Dock5*, un membre de la même famille proche de *Dock1*, au développement musculaire.

### **1.4.2 Objectif 2 (Chapitre 3)**

L'activation du récepteur HER2 entraîne l'activation de RAC et contribue à l'invasion cellulaire. Les RACGEFs qui agissent en aval d'HER2 demeurent toutefois méconnus. Étant donné le rôle de *mbc* dans l'invasion cellulaire et les études qui ont rapporté l'activation de la voie DOCK1/RAC en aval les RTKs, nous avons émis comme hypothèse que DOCK1 puisse être l'une de ces RACGEFs. Nous avons observé que des hauts niveaux d'expression de *DOCK1* corrèlent avec un mauvais pronostic chez les patientes de cancer du sein HER2+. Nos études ont révélé que DOCK1 interagit avec le récepteur HER2 et qu'il est essentiel à l'activation de RAC et à la migration cellulaire induites par HER2 dans des cellules de cancer du sein. L'utilisation d'un modèle de souris de cancer du sein médié par HER2 combinée avec l'inactivation du gène *Dock1* dans les glandes mammaires, nous a permis d'identifier DOCK1 et RAC comme de nouveaux effecteurs de la progression tumorale induite par HER2.

## **RÉSULTATS**

## **CHAPITRE 2**

LA RACGEF ATYPIQUE DOCK180 (DOCK1) RÉGULE  
LA FUSION DES MYOBLASTES *IN VIVO*



# The atypical Rac Activator Dock180 (Dock1) regulates myoblast fusion *in vivo*

Mélanie Laurin<sup>\*†</sup>, Nadine Fradet<sup>\*</sup>, Anne Blangy<sup>‡</sup>, Alan Hall<sup>§</sup>, Kristiina Vuori<sup>¶</sup>, and Jean-François Côté<sup>\*†\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, QC, Canada H2W 1R7.

<sup>†</sup>Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H3C 3J7.

<sup>‡</sup>Centre de Recherche en Biochimie Macromoléculaire, Centre National de la Recherche Scientifique, 34293 Montpellier, France.

<sup>§</sup>Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY 10065.

<sup>¶</sup>Burnham Institute for Medical Research, La Jolla, CA 92037.

<sup>\*\*</sup>Division of Experimental Medicine, McGill University, Montréal, QC, Canada H3A 1A3

## **Abstract**

Dock1 (also known as Dock180) is a prototypical member of a new family of atypical Rho GTPase activators. Genetic studies in *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* have demonstrated that Dock1 orthologues in these organisms have a crucial role in activating Rac GTPase signaling. We generated mutant alleles of the closely related *Dock1* and *Dock5* genes to study their function in mammals. We report that while *Dock5* is dispensable for normal mouse embryogenesis, *Dock1* has an essential role in embryonic development. A dramatic reduction of all skeletal muscle tissues is observed in *Dock1*-null embryos. Mechanistically, this embryonic defect is attributed to a strong deficiency in myoblast fusion, which is detectable both *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, we have uncovered a contribution of *Dock5* toward myofiber development. These studies identify *Dock1* and *Dock5* as critical regulators of the fusion step during primary myogenesis in mammals and demonstrate that a specific component of the myoblast fusion machinery identified in *Drosophila* plays an evolutionarily conserved role in higher vertebrates.

**Keywords** : Dock5, mouse model, myogenesis, myoblast city





additional biological processes, including thorax closure, dorsal closure, phagocytosis, and border cell migration (8). Mbc is the *Drosophila* orthologue of mammalian Dock1 (also known as Dock180) and *Caenorhabditis elegans* Ced-5, and these proteins are prototypical members of a novel superfamily of guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases (GEFs) (369-371). In mammals, Dock1, Dock2 and Dock5 proteins are members of the same subfamily of Dock1-related proteins. Dock1 is implicated in the control of Rac-mediated cell polarization, cell migration, phagocytosis of apoptotic cells, and fusion of myoblasts and macrophages *in vitro* (208, 372, 373). Additionally, interfering with *dock1* and *dock5* in zebrafish interfered with myoblast fusion (209).

We report that the formation of primary skeletal muscle fibers is severely impaired in *Dock1*-null animals. Our data demonstrate a central role for Dock1 in myoblast fusion *in vivo*. Genetic analyses further uncovered functional redundancy between *Dock1* and *Dock5* in myoblast fusion. We demonstrate a conserved function for a specific component of the *Drosophila* fusion-signaling pathway in mammalian myoblast fusion.













(**Figure 2.4 A and B page 108**). Notably, double *Dock1*<sup>+/-</sup>*Dock5*<sup>+/-</sup> heterozygous mutant animals also developed their muscles normally (**Figure 2.4 D page 108**). Interestingly, *Dock1*<sup>+/-</sup>*Dock5*<sup>-/-</sup> animals, which survived development, developed thinner myofibers (**Figure 2.4 A-C page 108**). This reduction in fiber thickness was, however, not completely penetrant because we observed a mixture of thin/thick fibers in some sections (data not shown). In *Dock1*<sup>-/-</sup>*Dock5*<sup>+/-</sup> mutants, MF20-positive cells remained mononucleated as expected, but striking severe defects in MHC organization, cell elongation, and alignment were additionally uncovered (**Figure 2.4 E and F page 108**). Together, these data establish functional redundancy between *Dock1* and *Dock5* in the fine-tuning of myoblast fusion and fiber growth.









myoblast fusion, which is detectable, both *in vitro* and *in vivo*. Genetic analyses further uncovered functional redundancy between *Dock1* and *Dock5* as regulators of myoblast fusion during muscle development in mammals and demonstrate that a specific component of the machinery identified in *Drosophila* plays an evolutionarily conserved role in higher vertebrates.







































## **CHAPITRE 3**

LA RACGEF DOCK1 EST UN IMPORTANT  
RÉGULATEUR DU DÉVELOPPEMENT  
MÉTASTATIQUE DANS LE CANCER DU SEIN HER2+











cancer, also established that mammalian DOCK1 is a regulator of cell migration and invasion downstream of integrin signaling (385). The DOCK1-RAC pathway was uncovered to promote glioblastoma cell migration driven by oncogenic RTKs including the PDGFR and the EGFR variant type III (11, 12). Both receptors orchestrate tyrosine phosphorylation of DOCK1 to increase its GEF activity. These data establish the DOCK1-RAC pathway as a potential drug target to limit the spread of brain cancer.

In search for RAC GEFs promoting metastasis downstream of HER2, we hypothesized that DOCK1 could be such a regulator. We report that DOCK1 enters in a complex with HER2 to promote RAC activation and cell migration. Mammary-gland-specific inactivation of *Dock1* decreased tumor growth and metastasis to lungs. We also identified a *Dock1*-associated gene signature that predicts overall survival in human breast cancer patients. Collectively, this work demonstrates DOCK1-RAC signaling as an HER2 effector pathway essential for breast cancer metastasis.















































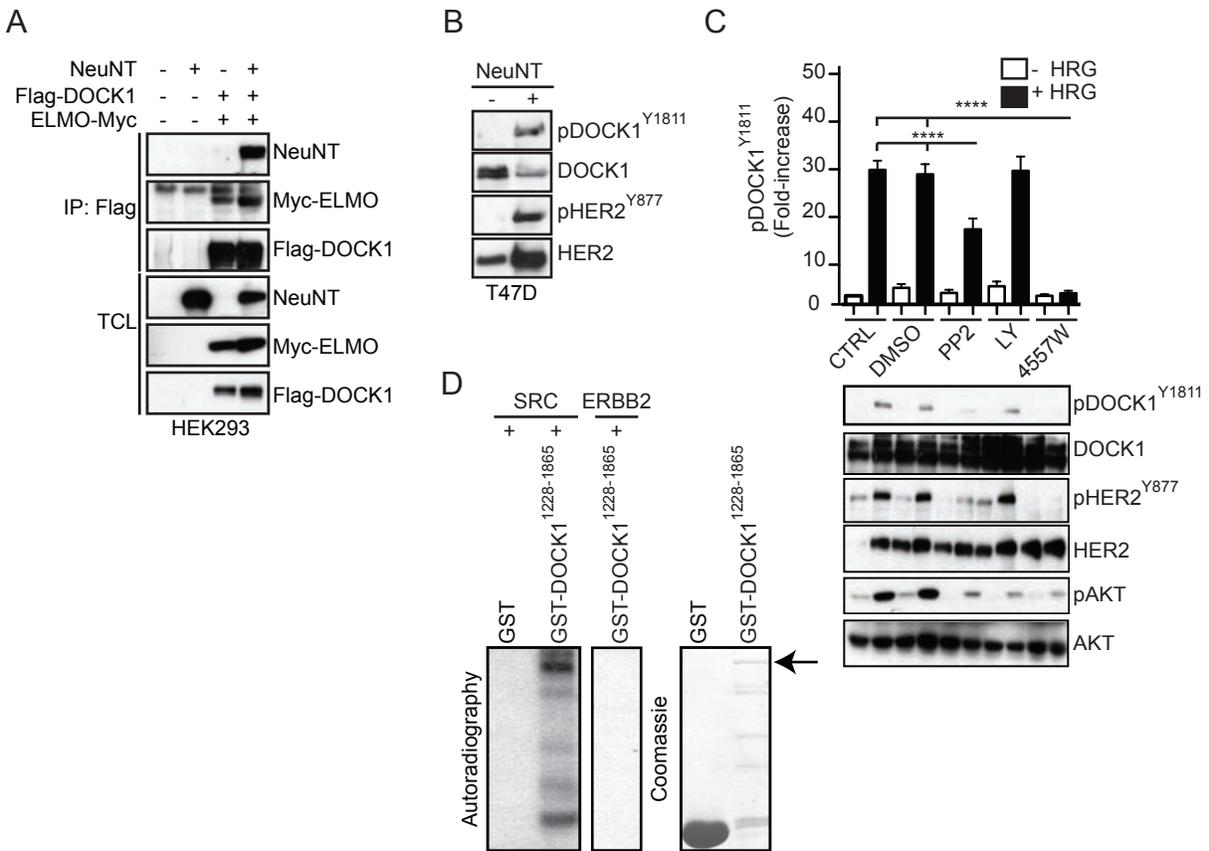












**Figure 3.S2 DOCK1, is phosphorylated by SRC kinase downstream of HER2 activation.**

(A) DOCK1 is found in a complex with oncogenic NeuNT. Flag-DOCK1, Myc-ELMO1 and NeuNT were coexpressed and DOCK1 was immunoprecipitated with anti-FLAG beads (n=3). (B) Induction of DOCK1 phosphorylation at Y<sup>1811</sup> in T47D breast cancer cells upon overexpression of NeuNT (n=5) (C) DOCK1 phosphorylation on Y<sup>1811</sup> is SRC dependent. T47D cells breast cancer cells were treated with 20 ng/ml of HRG for 15 min in the absence or presence of DMSO, 5 μM SRC PP2, 10 μM PI3K LY-294002 or 50 μM EGFR/ERBB2 4557W inhibitors. Quantification of the pDOCK1<sup>Y1811</sup> signal is shown in the top panel (n=7). (D) Active recombinant SRC and ERBB2 kinases were incubated with recombinant GST or the GST-DOCK1<sup>1228-1865</sup> fragment, followed by *in vitro* kinase assay (n=3). Data were expressed as mean ± SD. One-way ANOVA followed by a Bonferroni test calculated the indicated P values. \* P = ≤0,05; \*\*P= ≤ 0,01; \*\*\*P= ≤ 0,001; \*\*\*\*P= ≤ 0,000 1.

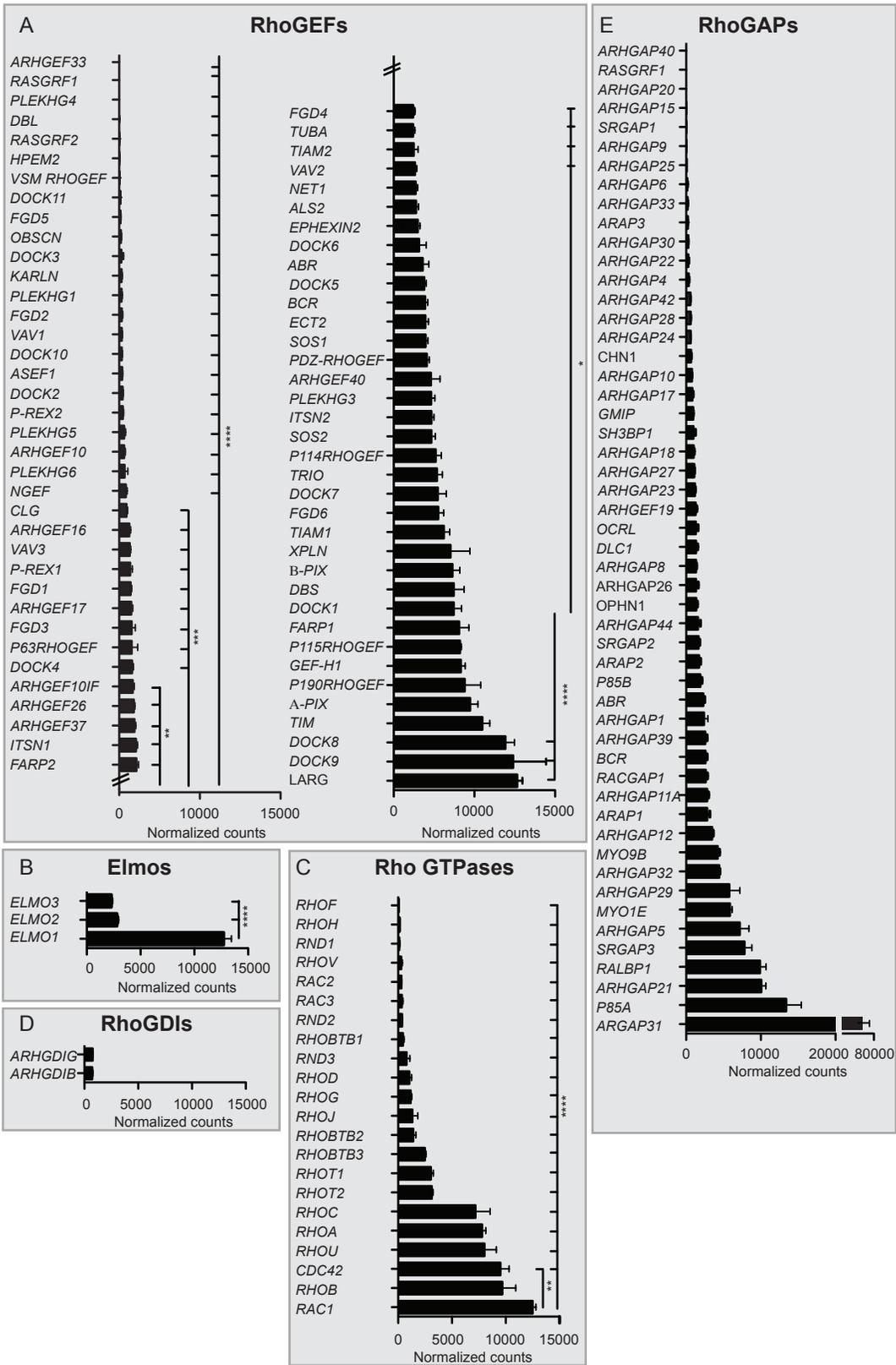
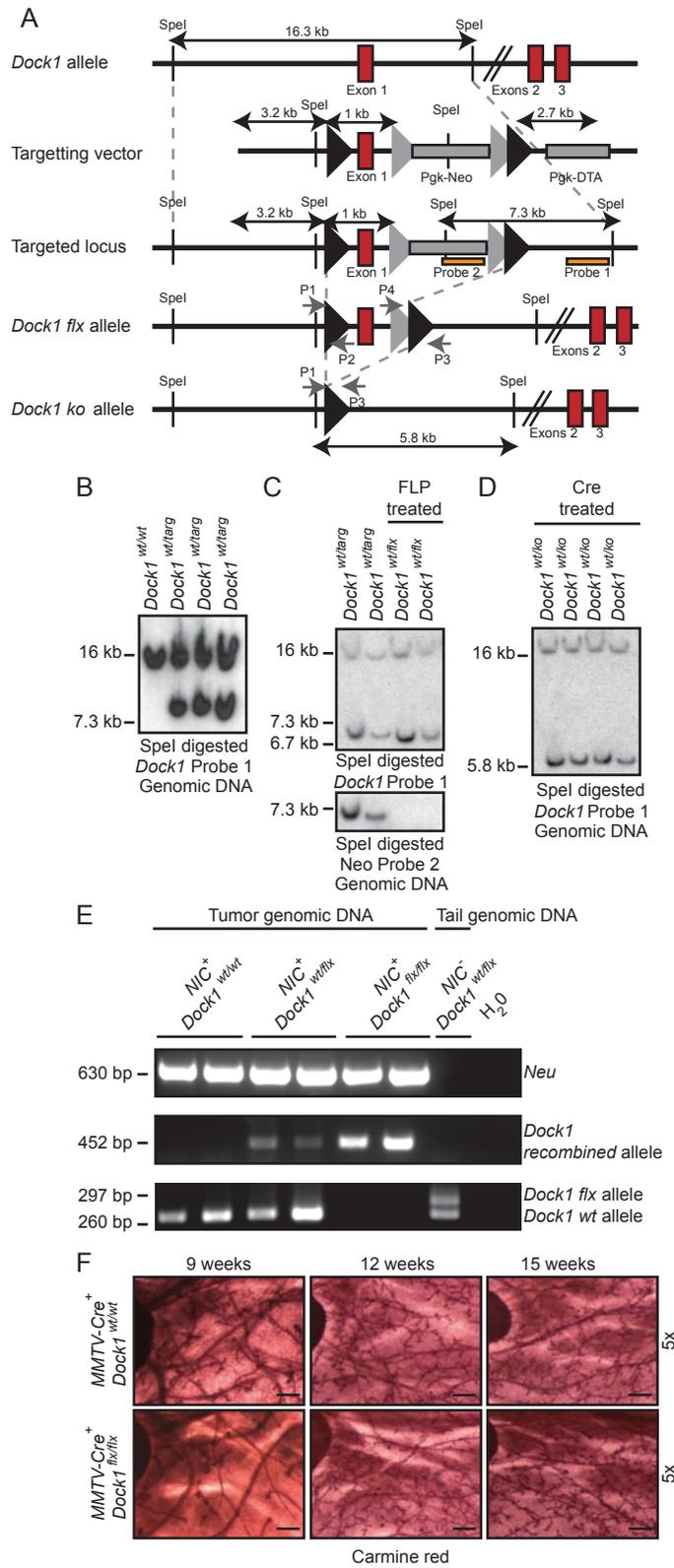


Figure 3.S3

**Figure 3.S3 Portrait of Rho GTPase regulation in Neu-induced tumors**

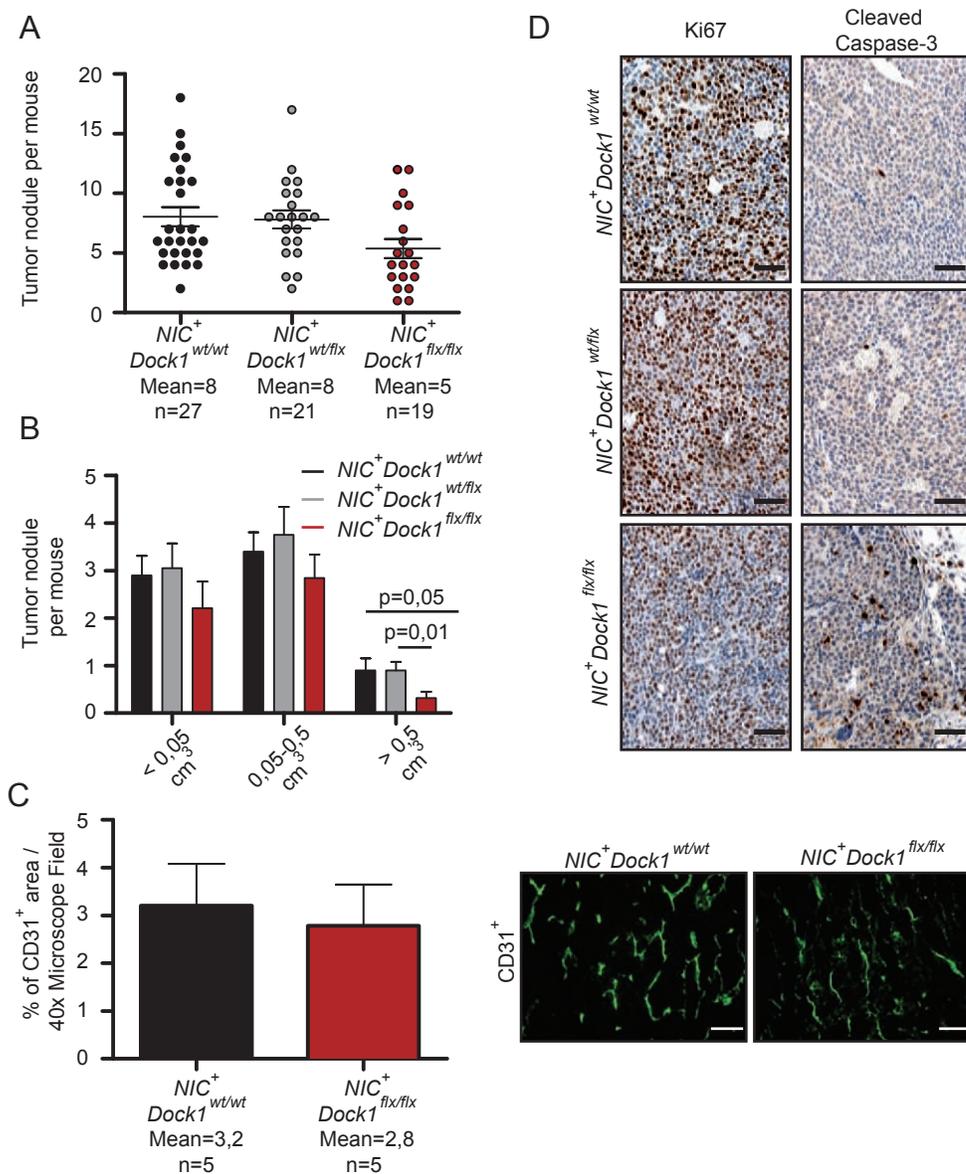
Expression profiling of all RhoGEFs (A), Elmos (B), Rho GTPases (C), RhoGDIs (D) and RhoGAPs (E) in Neu(NDL2-5)-induced mouse mammary tumors. (A-E) Expression was determined by mRNA deep sequencing. Data were expressed as mean  $\pm$  SD. n=4. One-way ANOVA followed by a Bonferroni test calculated the indicated P values. \*  $P = \leq 0,05$ ; \*\* $P = \leq 0,01$ ; \*\*\* $P = \leq 0,001$ ; \*\*\*\* $P = \leq 0,0001$ .



**Figure 3.S4**

**Figure 3.S4      Generation of a *Dock1* conditional knockout mouse**

(A) Partial representation of the *Dock1* locus, structure of the targeting vector, organization of the rearranged *Dock1* targeted locus (*targ*) and rearranged flox allele (*flx*) after FLP treatment and knockout allele (*ko*) after Cre treatment. The probes used for Southern blot and the expected size of the *SpeI* fragments are indicated. Locations of PCR primers used for genotyping are also indicated. (B) Southern blot analysis using a *Dock1* genomic probe (probe 1). *Wt* and *targ* alleles produced 16 kb and 7.3 kb bands, respectively. (C) Southern blot analysis using DNA isolated from ES cells treated with FLP recombinase confirmed removal of the PGK-neo cassette. Genomic DNA was digested with *SpeI* and analyzed using *Dock1* (probe 1) and Neo (probe 2) probes. *WT*, *targ* and *flx* alleles produced 16 kb, 7.3 kb and 6.7 kb bands, respectively. (D) Southern blot analysis using a *Dock1* genomic probe (probe 1) confirming recombination of the *flx* allele after Cre recombinase treatment. *Wt* and *ko* alleles generated 16 kb and 5.8 kb bands, respectively. (E) PCR analysis using P1, P2, P3 and Neu primers sets on genomic DNA extracted from mammary tumors or tails from mice of the indicated genotype. (F) Whole mount inguinal mammary glands from *MMTV-Cre<sup>+</sup>Dock1<sup>wt/wt</sup>* and *MMTV-Cre<sup>+</sup>Dock1<sup>flx/flx</sup>* mice at 9, 12 and 15 weeks of age stained with carmine red showing normal ductal trees (Scale bar: 200 $\mu$ m, 5x). n=3 for each genotype.

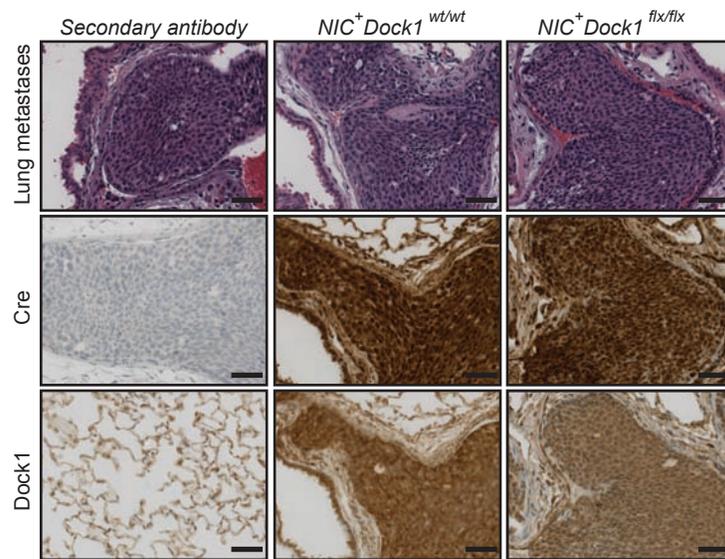


**Figure 3.S5 Dock1 signaling regulates tumor growth by promoting cell proliferation and blocking apoptosis**

(A) Quantification of tumor nodules per animal for  $NIC^+Dock1^{wt/wt}$ ,  $NIC^+Dock1^{wt/flx}$  and  $NIC^+Dock1^{flx/flx}$  mice. (B) Size distribution of tumor nodules in all three genotypes.  $NIC^+Dock1^{flx/flx}$  mice show a significant reduction in the amount of large tumors. The indicated  $P$  values were calculated from a two-tailed Student t test. (C) Average percentage of the area covered by CD31<sup>+</sup> staining per 40x microscope field (left) and representative immunohistochemistry analysis on frozen tumor sections showing CD31<sup>+</sup> expression in  $NIC^+Dock1^{wt/wt}$  and  $NIC^+Dock1^{flx/flx}$  tumors (right). (Scale bar: 50  $\mu$ m, 40x)  $P$  value was calculated using a two-tailed Student t test. (D) Immunohistochemistry analysis on paraffin embedded tumor sections showing Ki67 (left) and cleaved Caspase-3 (right) expression in  $NIC^+Dock1^{wt/wt}$ ,  $NIC^+Dock1^{wt/flx}$  and  $NIC^+Dock1^{flx/flx}$  tumors. (Scale bar: 50  $\mu$ m, 40x).



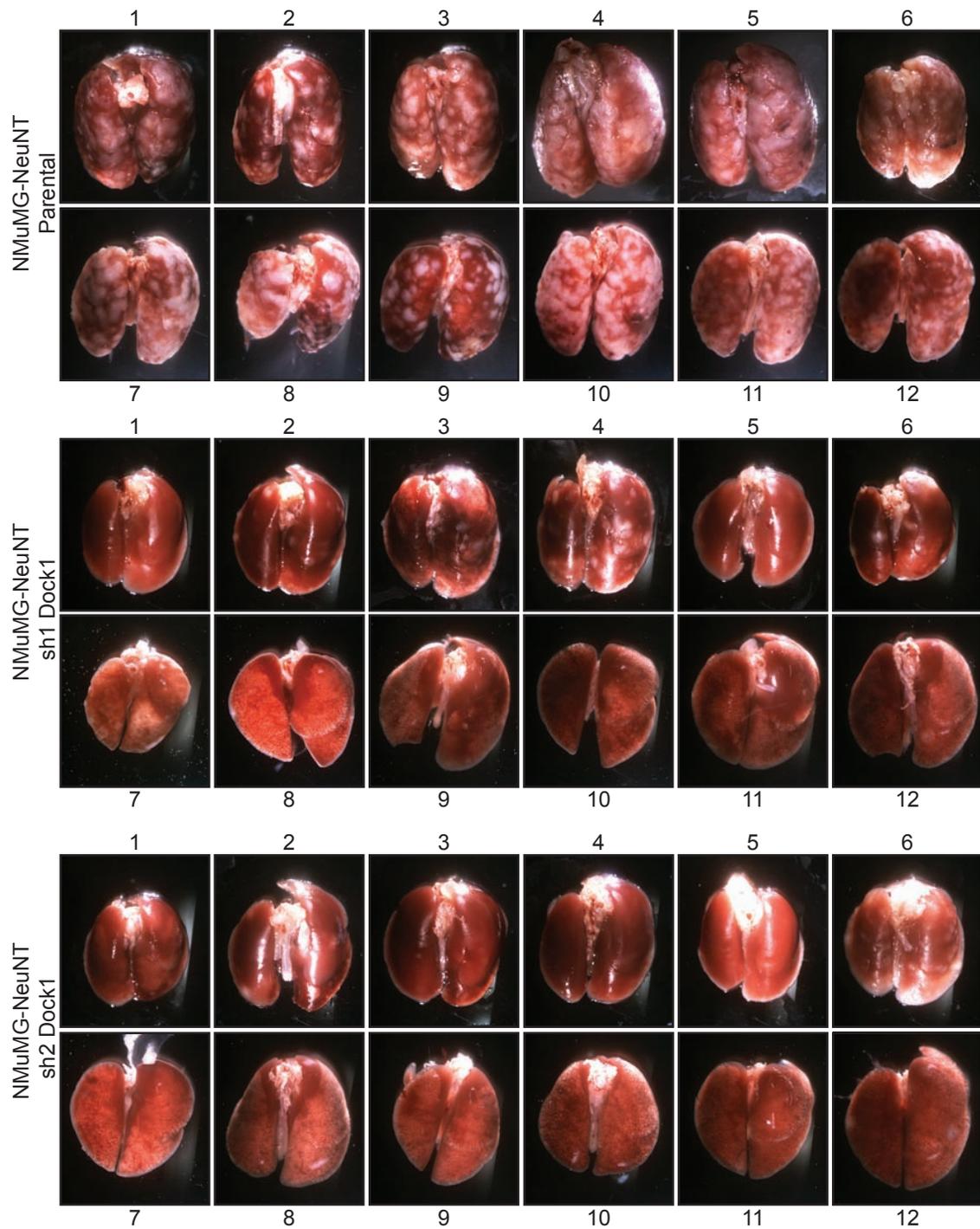




**Figure 3.S8 Dock1 is expressed in lung metastasis.**

Immunohistochemistry analysis on paraffin embedded lung sections showing H&E-staining (*Upper*), Cre (*Middle*), and Dock1 (*Lower*) expression in *NIC<sup>+</sup>Dock1<sup>wt/wt</sup>* and *NIC<sup>+</sup>Dock1<sup>flx/flx</sup>* metastasis. (Scale bar: 50 μm, 40x)





**Figure 3.S10 Dock1 is essential for HER2-mediated lung metastasis in experimental metastasis assay.**

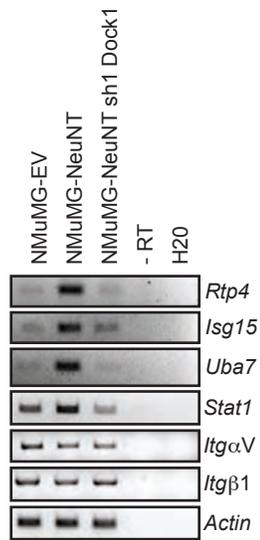
Picture of collected lungs from mice injected with NMuMG-NeuNT, NMuMG-NeuNT<sup>sh1Dock1</sup> and NMuMG-NeuNT<sup>sh2Dock1</sup> cells.





**Figure 3.S12 Validation of the differential expression data obtained by RNA-sequencing using Q-PCR analysis**

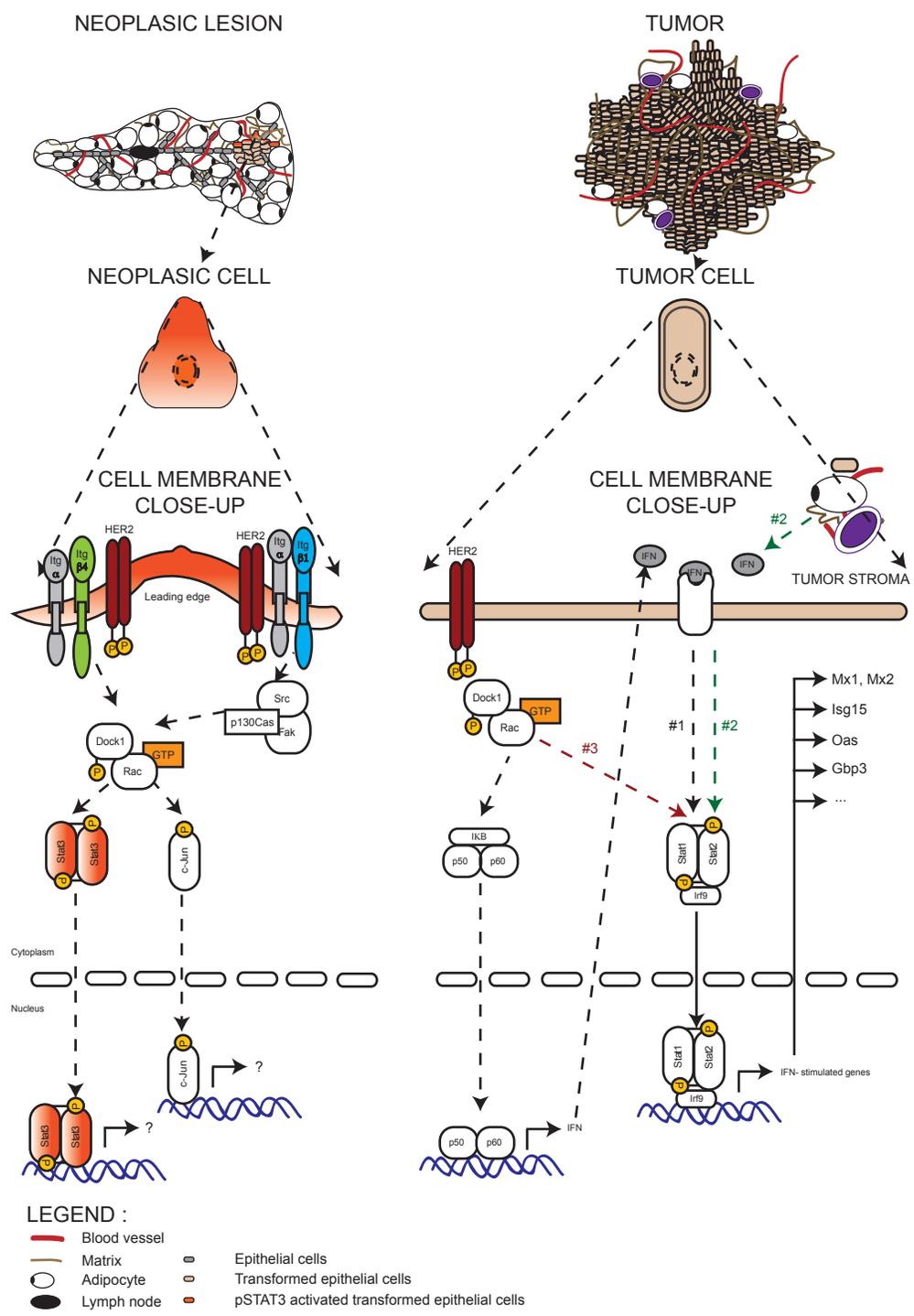
(A) Q-PCR validation of the expression levels of a panel of genes identified as being decreased in *NIC<sup>+</sup>Dock1<sup>flx/flx</sup>* tumors by mRNA deep sequencing. Left graph represents deep sequencing analysis and right graphs represent Q-PCR analysis. (B) Q-PCR validation of the expression levels of a panel of genes identified as being increased in *NIC<sup>+</sup>Dock1<sup>flx/flx</sup>* tumors by mRNA deep sequencing. Left graphs represent deep sequencing analysis and right graphs represent Q-PCR analysis. The indicated *P* values were calculated from a two-tailed Student *t* test.



**Figure 3.S13 Oncogenic HER2 elevates IFN-response gene expressions in culture.**

NMuMG-EV, NMuMG-NeuNT, and NMuMG-NeuNT<sup>shDock1</sup> were grown for 24h after plating and analyzed for the expression of selected IFN response genes by RT-PCR.





**Figure 3.S15 Model of signaling downstream of Dock1 in  $NIC^+$  MINs and tumors.**

See Discussion for a description of the model.





## **DISCUSSION**









mononucléés et non dans les myotubes. *In vivo*, les muscles qui ont incorporé un siRNA contre MOR23 ont une diminution de leur capacité de régénération (414). Il sera intéressant d'observer le développement musculaire en absence de MOR23 chez la souris. De plus, plusieurs membres de la famille des récepteurs de l'olfaction sont exprimés au cours de la myogenèse et leur rôle reste à déterminer.

Plus récemment, Millay et collègues ont identifié le gène *Tmem8c*, renommé par la suite *Myomaker*, comme étant un régulateur potentiel du développement musculaire grâce à son profil d'expression similaire aux gènes *Myod* et *Myogenin* (416). Au cours du développement embryonnaire, *Myomaker* est exprimé spécifiquement dans le myotome et le muscle en développement et son expression diminue une fois le développement musculaire terminé (416). L'expression de *Myomaker* peut aussi être observée dans le muscle adulte suite à l'induction d'une blessure. L'élimination de l'expression de *Myomaker* chez la souris entraîne la mort des nouveau-nés peu de temps après la naissance. Bien que le tissu musculaire soit correctement spécifié, un bloc important de la fusion des myoblastes est observé chez les embryons mutants. Il a été observé que la surexpression de *Myomaker* dans des C2C12 augmente leur fusion. De plus, la surexpression de *Myomaker* dans des fibroblastes permet aussi leur fusion avec des myoblastes. Tel que prédit par l'analyse de son hydrophobicité, *Myomaker* est situé à la membrane cellulaire et au site de contact des myoblastes en différenciation. Ainsi, *Myomaker* est la première molécule membranaire identifiée comme étant essentielle à la fusion des myoblastes primaires et dont l'inactivation entraîne d'importants blocs de fusion lors de la formation des fibres primaires chez la souris. De plus amples études seront nécessaires pour caractériser cette nouvelle protéine et identifier les mécanismes moléculaires par lesquels elle favorise la fusion. Par exemple, il sera intéressant d'évaluer si la signalisation par la voie Dock1/Rac module l'expression de *Myomaker* au cours de la différenciation musculaire.

Plus récemment, une étude a rapporté que le récepteur de la PS Bai1 régule la fusion des myoblastes (48). Bai1 est une molécule transmembranaire membre de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Bai1 reconnaît les molécules de PS exprimées à la surface des cellules apoptotiques et il a été montré que Bai1 induit la phagocytose de ces cellules via l'activation de la voie Elmo/Dock1/Rac1 (55). Il a récemment été observé qu'une surexpression de Bai1 dans une lignée de myoblaste induit une augmentation de leur fusion (48). De plus, il a été rapporté que les muscles des souris *Bai1* KO sont plus petits et ont des défauts de régénération suite à une blessure (48). Il a été proposé que les myoblastes exprimant le récepteur Bai1 lient les molécules de PS présentes à la surface de myoblastes apoptotiques. Ce contact cellulaire entre des myoblastes sains et les myoblastes apoptotiques favoriserait l'activation de voie de signalisation permettant la fusion des myoblastes sains entre eux (48). Ainsi, l'ajout de cellules apoptotiques au milieu de culture favorise la fusion des myoblastes entre eux (48).

Bien que cette étude est intrigante d'un point de vue conceptuel, plusieurs éléments soulèvent la discussion. Notamment, il n'a pas été démontré via une diminution des niveaux d'expression de Bai1 dans les C2C12 que la fusion de ces cellules requiert l'expression du récepteur (48). De plus, la capacité de fusion des myoblastes primaires isolés des souris *Bai1* mutantes n'a pas été adressée *in vitro* (48). Enfin, il n'a pas été démontré que l'action de Bai1 dans les myoblastes était dépendante de sa liaison à la PS (48). L'expression de molécules de PS sur la face extracellulaire lors du développement musculaire et au cours de la différenciation musculaire avait préalablement été rapportée et ces études avaient démontré que l'expression de la PS par les myoblastes n'était pas accompagnée des changements caractéristiques de la mort cellulaire par apoptose (202, 203). Toutefois, l'étude du Dr Ravichandran suggère qu'un important degré de mort cellulaire est nécessaire à la fusion ce qui est en contradiction avec les études précédentes (48).

Les récepteurs membre de la famille Bai (Bai1, Bai2 et Bai3) demeurent toutefois des candidats intéressants pour promouvoir la fusion en amont de la voie

Elmo/Dock1/Rac (417). Notamment, la surexpression d'un mutant du domaine intracellulaire de Bai1 incapable de lier Elmo dans les C2C12 entraîne un bloc de leur fusion tout comme l'inhibition de l'expression d'Elmo2 via des shRNA (48). Un modèle de souris KO pour le gène *Elmo1* a été généré. Ces mutants sont viables et sans défauts musculaires apparents (56). Il sera intéressant dans le futur de générer des souris mutantes pour les gènes *Elmo2* et *Elmo3* ainsi que pour les gènes *Bai2* et *Bai3* afin d'observer le développement musculaire en absence de l'expression de ces gènes. La génération de ces modèles de souris et leur croisement permettra aussi d'évaluer la redondance entre la fonction de ces gènes en plus d'éliminer les mécanismes de compensation possiblement existants.

Ainsi, un des défis actuels menant à la compréhension des mécanismes de fusion des myoblastes est de déterminer s'il existe d'autres récepteurs majeurs de la fusion des myoblastes primaires ou si plusieurs familles de molécules exercent une fonction redondante à cette étape du développement musculaire. De plus, il sera intéressant de mieux comprendre les voies moléculaires qui sont activés par ces récepteurs afin de promouvoir la fusion cellulaire.

### ***La régulation de la migration des progéniteurs musculaires dans le membre***

Au cours du développement musculaire, les progéniteurs du dermomyotome situés au niveau des membres se détachent et migrent dans le membre où ils se différencient en muscle (133). Il a été montré que la migration de ces progéniteurs musculaires dépend principalement du RTK Met et du récepteur couplé aux protéines G Cxcr4. Toutefois, les voies de signalisation en aval de ces récepteurs sont très peu connues (135, 140). Les Rho GTPases et leurs activateurs les GEFs sont incontestablement d'importants régulateurs de la migration cellulaire (26) et Dock1 était un candidat intéressant pour médier la migration des progéniteurs musculaires. Notamment, certains travaux ont rapporté l'activation de la voie Dock1/Rac par les RTKs (11, 12). Plusieurs études ont maintenant démontré une activation de la voie Elmo/Dock1/Rac sous les récepteurs couplés aux protéines G et dans certains types

cellulaires, Dock1 est essentiel à l'activation de Rac en aval de Cxcr4 (25, 29, 418, 419). Or, nos études indiquent que l'expression de Dock1 n'est pas requise dans les progéniteurs musculaires et que ces cellules migrent correctement dans le membre en son absence. Néanmoins, il est possible que Dock1 agisse de façon redondante avec Dock5 à cette étape du développement musculaire. Malheureusement, les doubles mutants *Dock1<sup>-/-</sup>Dock5<sup>-/-</sup>* meurent trop tôt au cours du développement embryonnaire nous empêchant de tester cette hypothèse.

Enfin, il a aussi été observé que la migration des progéniteurs musculaires n'est pas affectée malgré l'inactivation de *Rac1* ou *Cdc42* dans ces cellules (46, 47). Cette observation est très surprenante puisque ces deux molécules sont d'importants régulateurs de la migration cellulaire. Il sera intéressant d'identifier si d'autres Rho GTPases sont requises lors de la migration dans le membre des progéniteurs musculaires et d'investiguer quel est le mode de migration employé par ces cellules. Enfin, il est aussi envisageable que Rac1 et Rac2 agissent de façon redondante ou que l'absence de Rac1 ou Cdc42 est compensée par une autre GTPase. Somme toute, la régulation de la migration des progéniteurs musculaires dans le membre demeure un domaine très peu exploré à ce jour.

### ***Dock1 et Dock5 des GEFs aux fonctions multiples***

Depuis notre étude, d'autres fonctions biologiques au cours du développement ont été identifiées par nos collaborateurs pour les gènes *Dock1* et *Dock5* grâce à l'utilisation de modèles de souris. Ces études sont brièvement décrites dans cette section.

En utilisant deux modèles de souris, les souris *Dock1<sup>deltaSH3</sup>* et les souris *Dock1* KO, nos collaborateurs ont identifié un rôle important pour *Dock1* dans le développement cardiovasculaire (29). Chez les souris *Dock1<sup>deltaSH3</sup>*, l'expression d'une protéine tronquée sans domaine SH3 de Dock1 est induite suite à leur

croisement avec des souris transgéniques exprimant la Cre recombinase. Chez ces souris, l'expression de la forme Dock1<sup>deltaSH3</sup> est toutefois grandement réduite comparativement à la protéine sauvage et est probablement la conséquence d'une plus grande instabilité de la protéine mutante. Tout comme les souris *Dock1* KO, les souris *Dock1*<sup>deltaSH3</sup> meurent aux alentours de la naissance et ont des défauts de fusion lors de la formation des fibres musculaires primaires (29). Ces deux modèles de souris développent aussi un œdème sévère lors de l'embryogenèse qui est la conséquence directe de défauts de développement cardiaque (29). La cytokine Cxcl12 et son récepteur Cxcr4 favorisent la migration des progéniteurs des cellules endothéliales et les souris mutantes pour ces gènes développent des anomalies cardiaques similaires aux défauts remarquables chez les souris *Dock1* mutantes (27, 420). Il a été observé que les cellules endothéliales purifiées des souris *Dock1*<sup>deltaSH3</sup> sont incapables de migrer vers un gradient de Cxcl12 comparativement aux cellules provenant des souris contrôles. De plus, l'activation de Rac dans les cellules endothéliales en réponse à un traitement avec Cxcl12 est compromise en absence de l'expression de Dock1 (29). Ces résultats ont démontré que Dock1 induit l'activation de Rac et la migration cellulaire dans les cellules endothéliales en aval du récepteur Cxcr4 et que l'expression de Dock1 est essentielle au développement cardiaque.

Un rôle pour Dock5 à la régulation du tissu osseux a aussi été identifié par nos collaborateurs (52). Les ostéoclastes tout comme les fibres musculaires sont des cellules plurinucléées qui proviennent de la différenciation de progéniteurs de la lignée des monocytes et des macrophages. Les ostéoclastes sont responsables de la résorption du tissu osseux (50). L'activité de résorption de ces cellules est dépendante de l'assemblage d'une zone de scellement composée de multiples podosomes où les protons et les protéases sont relâchés (51, 421). Dock5 a été identifié comme étant l'une des GEFs dont l'expression est la plus augmentée au cours de la différenciation des ostéoclastes (422). L'analyse des souris *Dock5* mutantes a révélé que la masse de l'os trabéculaire était augmentée chez ces souris ce qui est souvent une indication de défauts de résorption (52). *In vitro*, il a été

démontré que Dock5 était essentiel à la génération de la zone d'étanchéité des ostéoclastes et par conséquent la capacité de résorption de ces cellules est compromise en son absence. D'un point de vue moléculaire, il a été observé que la phosphorylation de p130Cas suite en l'engagement de l'Itg $\alpha$ v $\beta$ 3 était réduite en absence de l'expression de Dock5 et pourrait contribuer au défaut de développement de la zone d'étanchéité. Enfin, l'activité des ostéoclastes est exacerbée chez les patients souffrant d'ostéoporose et il serait donc intéressant d'évaluer si DOCK5 contribue à la résorption osseuse dans ce contexte. L'inhibition de DOCK5 pourrait représenter une cible thérapeutique intéressante pour ces patients.

### ***Dock1 et les cancers du sein métastatiques***

En plus de son rôle dans le développement, nos études ont permis de déterminer que DOCK1 contribue à la progression du cancer du sein. La fonction de mbc dans la régulation de la migration des cellules de bordure suggérait que la voie DOCK1/RAC pouvait être importante lors de l'invasion tumorale et d'autres études avaient démontré l'activation de cette voie suite à l'activation de RTKs. Ainsi, nous avons démontré que DOCK1 interagit et est phosphorylé suite à l'activation d'HER2 dans des cellules de cancer du sein. De plus, son expression est essentielle à l'activation de RAC et à la migration induite par HER2. Nous avons observé que chez les patientes atteintes d'un cancer du sein HER2+ ou de phénotype basal, des hauts niveaux d'expression de DOCK1 sont associés à un moins bon pronostic. À l'inverse, aucune corrélation n'a été observée entre les niveaux d'expression de DOCK1 et le pronostic des patientes atteintes d'un cancer du sein de type luminal. Ces données suggèrent que DOCK1 contribue à la progression des cancers du sein qui développent fréquemment des métastases. Grâce à l'utilisation du modèle de souris *MMTV-NIC*, nous avons déterminé que Dock1 contribuait à la progression tumorale et au développement de métastases induites par HER2+.

Étant donné la corrélation entre les niveaux d'expression de DOCK1 et les cancers du sein dit basal, il sera maintenant important d'étudier le rôle de DOCK1

dans ce sous-type en particulier. Les cancers du sein de phénotype basal sont un groupe hétérogène identifié initialement par profil d'expression et caractérisé notamment par l'expression de nombreux marqueurs des cellules basales myoépithéliales (231). Ces cancers développent fréquemment des métastases et ils sont associés à un mauvais pronostic pour la patiente (423). Les cancers du sein résultant de mutation dans le gène *BRCA1* ont généralement un phénotype basal et la majorité des cancers dit triples négatifs sont aussi habituellement de ce phénotype. L'absence de cible thérapeutique rend le traitement clinique des cancers dit triples négatifs difficile et une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans leur développement demeure une priorité.

Chez la souris, les cancers du sein de phénotype basal ont peu été étudiés. L'expression d'une forme mutée du gène *BRCA1* combinée avec la perte d'un allèle du gène *P53* dans les glandes mammaires entraîne la formation de tumeurs s'apparentant aux tumeurs de type basal chez l'humain (424). Or, les cas de cancer *BRCA1* représentent seulement une fraction des cas de cancer de type basal. Une surexpression du RTK MET est observée dans près de 20 à 30 % des cas de cancers du sein et corrèle avec un mauvais pronostic pour la patiente. De plus, il a été observé que l'expression de ce récepteur corrèle avec le sous-type basal (425-430). Chez la souris, l'expression d'une forme oncogénique du RTK MET dans les glandes mammaires entraîne la formation de tumeurs après une longue période de latence et certaines de ces lésions s'apparentent à des tumeurs de type basal chez l'humain (429). L'insertion de mutations activatrices dans le locus endogène du récepteur MET entraîne aussi la formation de tumeurs d'histologie multiple (430). Des mutations entraînant une perte de fonction du gène *P53* sont observées dans près de 80% des cas de cancer du sein dit triple négatif (423). Afin d'étudier la synergie entre MET et p53, des souris ont été générées afin de permettre l'expression d'un variant oncogénique du récepteur dans les glandes mammaires où un allèle de *P53* a été enlevé. Chez ces souris, l'incidence de formation des tumeurs est grandement augmentée, de plus les tumeurs observées ont un profil d'expression similaire aux cancers du sein de type basal triple négatif (431). Par conséquent, il est envisageable

de penser que le récepteur MET puisse être une cible thérapeutique intéressante pour le traitement de ce type de cancer. De plus, étant donné le rôle de la voie DOCK1/RAC en aval des RTKs et les corrélations cliniques observées entre les niveaux d'expression de DOCK1 et le pronostic des patientes de cancer du sein de type basal, il serait intéressant d'évaluer la contribution de cette voie à la progression tumorale dans le modèle de souris *MET/P53*.

### ***La signalisation par les RTKs entraîne la phosphorylation de DOCK1 sur plusieurs sites***

Tel que mentionné, plusieurs études ont maintenant démontré la phosphorylation de DOCK1 suite à l'activation de RTKs. L'activation du PDGFR $\alpha$  et l'expression du EGFRvIII induisent respectivement la phosphorylation de DOCK1 à la tyrosine 1811 et à la tyrosine 722 dans des lignées de glioblastome via les SRC kinases (11, 12). Dans ces études, il a été montré que la phosphorylation de DOCK1 est requise pour son activité GEF et pour sa capacité à promouvoir la prolifération et l'invasion des cellules de glioblastome (11, 12). Nous avons pu observer que l'activation d'HER2 entraîne la phosphorylation de DOCK1 à la tyrosine 1811 sans toutefois évaluer les niveaux de phosphorylation de la tyrosine 722. Récemment, il a été démontré que l'expression de EGFRvIII entraîne aussi la phosphorylation de DOCK1 à la sérine 1250 via la protéine kinase A dans des cellules de glioblastome (12, 13). La phosphorylation de DOCK1 sur cette sérine située dans le domaine DHR2 est aussi requise pour sa capacité à activer RAC et induire la prolifération et l'invasion des cellules de glioblastome. Ainsi, la phosphorylation de DOCK1 sur plusieurs sites semble être nécessaire à son activité. Il sera intéressant dans le futur de comprendre la fonction de ces sites de phosphorylation. Par exemple est-ce que la phosphorylation de DOCK1 est requise pour induire des changements de conformation permettant son activation ou est-elle requise pour favoriser des interactions protéiques avec des partenaires? Finalement, il serait intéressant d'évaluer sur des sections de cancers du sein provenant de patientes si les niveaux

de phosphorylation de DOCK1 corrélient avec le pronostic de façon plus significative que son profil d'expression seulement.

### ***CXCR4 est essentiel à l'invasion cellulaire induite par HER2***

En plus de son rôle notamment dans la migration des cellules endothéliales, il a été démontré que l'activation du récepteur CXCR4 dans des cellules de cancer du sein entraîne une polymérisation de l'actine et régule la migration lors de la formation de métastases aux organes exprimant de haut niveau de son ligand CXCL12 (432). L'activation des récepteurs couplés aux protéines G par leur ligand entraîne la dissociation des protéines G hétérotrimériques,  $G_{\alpha i}$  et  $G_{\beta\gamma}$ , qui ensuite activent différentes voies de signalisation (433). Plusieurs études ont aussi démontré la présence de mécanismes de transactivation entre les RTKs et les récepteurs couplés aux protéines G (434, 435). Dans des cellules de cancer du sein, il a été observé que l'expression d'HER2 entraîne une augmentation de l'expression de CXCR4. La signalisation en aval d'HER2 n'affecte pas directement les niveaux du messager de CXCR4 mais favorise plutôt la synthèse protéique du récepteur en plus de prévenir sa dégradation en inhibant son ubiquitination (436). Dans ces cellules, l'expression de CXCR4 est essentielle à l'invasion et à la formation de métastases induites par HER2. De plus, une corrélation positive entre les niveaux d'expression d'HER2 et de CXCR4 est observée chez les patientes atteintes de cancer du sein (436). Étant donné l'importance de CXCR4 dans la formation des métastases, il devient important de comprendre la signalisation en aval de ce récepteur nécessaire à l'invasion tumorale. Dans des MCF7, l'activation de RAC et la migration cellulaire induite par l'Heregulin  $\beta 1$  (HRG $\beta 1$ ) est réduite lorsque l'expression de CXCR4 est éliminée via des siRNA (384). Il a été observé que le traitement par l'HRG $\beta 1$  entraîne la phosphorylation de CXCR4 à des sites qui régulent son activation indépendamment de la présence de son propre ligand (384). Cette transactivation de CXCR4 par HER2 serait importante pour favoriser notamment l'activation de la PI3K $\gamma$  via les petites protéines G et induire la formation de PIP $_3$  nécessaire à la relocalisation de la

RACGEF P-REX à la membrane (384). Les voies moléculaires responsables et activées par la transactivation de CXCR4 par HER2 demeurent néanmoins très peu connues.

Dans les cellules endothéliales, l'activation de Rac suite à une exposition des cellules à Cxcl12 est induite par Dock1 (29). De plus, une étude a récemment démontré qu'une stimulation de cellules de cancer du sein avec CXCL12 favorise une interaction entre ELMO1 et  $G\alpha_i$ . Il a aussi été montré que l'expression d'ELMO1 est essentielle pour la migration de différentes lignées de cancer du sein induite par CXCL12 (25). Enfin, l'inhibition de l'expression d'ELMO1 prévient aussi la formation de métastases aux poumons lorsque des cellules de cancer du sein sont injectées dans la circulation. Étant donné l'importance de DOCK1 dans la tumorigenèse induite par HER2 et le rôle émergent de la voie ELMO/DOCK1/RAC en aval de la signalisation par les GPCRs et plus particulièrement par CXCR4, il sera intéressant de caractériser le rôle de DOCK1 dans la signalisation induite par CXCL12 dans les cellules de cancer du sein exprimant HER2.

### ***L'identification d'une signature associée aux tumeurs Dock1-null***

Grâce à la génération du profil d'expression des tumeurs isolées des souris *MMTV-NIC-Dock1<sup>wt/wt</sup>* et *MMTV-NIC-Dock1<sup>flx/flx</sup>*, nous avons identifié une liste de gènes dont l'expression est significativement différente entre ces populations de tumeurs. Parmi les gènes identifiés, nous avons observé une diminution significative de l'expression des gènes stimulés par les interférons (Interferons stimulated genes; ISG). Les interférons sont une famille de molécules sécrétées connues pour moduler la réponse immunitaire et la résistance aux infections virales en plus d'influencer la survie et la mort des cellules normales et cancéreuses (437, 438). Lorsque présentes, ces cytokines se lient et stimulent les récepteurs IRNAR1 et IRNAR2 qui transmettent ce signal en activant les kinases TYK2 et JAK1. Ces dernières activent ensuite via leur phosphorylation les facteurs de transcription STAT1 et STAT2 (439). Au final, l'activation de ces facteurs de transcription entraîne la transcription d'un

nombre important de gènes de réponse aux interférons (439). Le traitement de patients avec des interférons a été utilisé dans plusieurs types de cancer (439). Ces derniers se sont montrés parfois très efficaces pour inhiber l'angiogénèse et moduler la réponse immunitaire anti-tumorale en plus de bloquer la prolifération des cellules cancéreuses et promouvoir leur apoptose (437, 438, 440). Toutefois, il a aussi été rapporté qu'une signature tumorale correspondant à une augmentation de l'expression des gènes réponses aux interférons chez des patientes atteintes de cancer du sein corrèle avec une résistance à la chimiothérapie (441). De plus, l'expression des oncogènes SRC et RAR dans des lignées de cancer du sein promouvoit la sécrétion d'INF- $\beta$  et par conséquent l'expression des gènes de réponse aux interférons (392). Ainsi, les interférons et les gènes de réponse aux interférons semblent jouer à la fois des rôles pro-tumorigéniques et anti-tumorigéniques selon le type de tumeur.

Parmi les gènes de réponses aux interférons identifiés, nous avons observé une diminution considérable des gènes responsables de l'ISGylation, soit *Isg15*, *Herc6*, *Usp18* et *Uba7*, en absence de l'expression de *Dock1* dans les tumeurs induites par HER2. *Isg15* est une molécule s'apparentant à l'ubiquitine et elle peut être couplée aux protéines via l'ISGylation de façon similaire à l'ubiquitination. Dans la cellule, on retrouve *Isg15* sous deux formes, soit libre ou soit couplée aux protéines. Comparativement à l'ubiquitination, l'ISGylation des protéines ne favorise toutefois pas leur dégradation et sa fonction précise dans la cellule demeure obscure à ce jour (442). Selon le contexte, ISGylation peut augmenter l'activité d'une cible en empêchant son ubiquitination ou en contraste directement diminuer son activité. Il a été observé dans plusieurs études que l'expression d'ISG15 est augmentée chez les patients dans différents cas de cancer (442). Toutefois, une augmentation de l'expression d'ISG15 corrèle avec une augmentation de l'agressivité de la maladie seulement dans certains cas (391, 443-446). L'augmentation de l'expression d'ISG15 peut être expliquée par une augmentation de l'inflammation dans le milieu tumoral et le recrutement des cellules immunitaires. Toutefois certaines études ont aussi démontré que l'expression de cette molécule est régulée en aval de la signalisation

par différents oncogènes dans les cellules cancéreuses (392, 447). Plus particulièrement, ISG15 contribue à la motilité cellulaire et à la transformation induite par RAS dans des cellules de cancer du sein en prévenant la dégradation de facteurs de transcription impliqués dans l'invasion cellulaire (393). De plus, l'ISGylation de Ki-RAS prévient son ubiquitination et par conséquent sa dégradation dans des cellules de cancer du sein (447). Enfin, il a aussi été observé que la molécule ISG15 peut être sécrétée dans le milieu extracellulaire et des niveaux élevés d'ISG15 ont été observés dans le sérum de patients atteints de cancer nasaux pharyngiens en comparaison aux niveaux observés chez des individus en santé (448, 449). Ainsi, le rôle d'ISG15 dans la progression tumorale demeure obscur et cette molécule semble exercer des fonctions pro-tumorigénique et anti-tumorigénique selon le contexte tumoral. Nos études suggèrent que la signalisation en aval d'HER2 induit l'expression d'ISG15 et des enzymes responsables du système d'ISGylation. Il sera donc intéressant d'investiguer si ISG15 est essentielle à la progression tumorale induite par HER2 en plus d'identifier quelles sont les cibles d'ISG15 dans ce contexte. Il est envisageable qu'HER2 induit l'expression d'ISG15 afin de favoriser l'ISGylation de certaines molécules et ainsi contribuer à leur stabilisation en empêchant leur ubiquitination. Plus spécifiquement, il serait intéressant de vérifier si HER2 ou le récepteur CXCR4 qui est stabilisé par l'expression d'HER2 sont des cibles directes d'ISG15.

Enfin, parmi les gènes identifiés dans notre signature, nous avons aussi observé que le profil d'expression de certains d'entre eux permettait de prédire de façon très significative le pronostic de patientes atteintes de cancer du sein HER2+. Notamment, des hauts niveaux d'expression du gène RTP4 sont associés à un mauvais pronostic chez ces patientes. RTP4 est membre d'une famille de chaperone qui cible les récepteurs couplés aux protéines G à la membrane (397). Plus particulièrement, il a été démontré que RTP4 lie des dimères des récepteurs des opioïdes et régule leur expression à la membrane (450). En son absence, ces récepteurs s'accumulent dans le Golgi et sont dégradés (450). Peu d'études à ce jour ont été réalisées sur l'expression et la fonction de ce gène. Ainsi, il sera intéressant d'évaluer la contribution de RTP4 à la progression tumorale induite par HER2 grâce à

des essais fonctionnels. Nos résultats suggèrent que la signalisation en aval d'HER2 entraîne une augmentation de l'expression de RTP4. Il serait envisageable de penser que l'expression de RTP4 est importante pour faciliter l'expression à la membrane de récepteurs couplés aux protéines G essentiels à la progression tumorale. Plus spécifiquement, il serait intéressant d'évaluer si l'une des cibles de RTP4 est le récepteur CXCR4.

### **Conclusion**

En conclusion, il devient évident que la RacGEF Dock1 exerce de multiples fonctions chez les mammifères. Nos études ont révélé que ce gène est essentiel au développement embryonnaire durant lequel il régule notamment la fusion des myoblastes primaires lors de la formation des fibres musculaires. Cette étude a aussi contribué de façon significative à démontrer l'important degré de conservation des mécanismes moléculaires de fusion entre les espèces. Il sera intéressant dans le futur d'identifier les récepteurs qui agissent en amont de Dock1/Rac en plus d'identifier les effecteurs de cette voie lors de la fusion des myoblastes. Il sera important aussi de mieux caractériser la contribution des membres de la famille Elmo lors de la fusion. Puisqu'il est maintenant clair que les embryons *Dock1* mutant possèdent plusieurs défauts de développement, il sera intéressant d'évaluer si l'inactivation de *Dock1* dans le compartiment musculaire seulement entraîne toujours la mort des embryons à la naissance grâce à l'utilisation du modèle de souris *Dock1* conditionnel. Grâce à la génération de ce modèle de souris, il sera aussi maintenant possible d'évaluer l'éventail des autres fonctions effectuées par ce gène dans certains compartiments cellulaires.

Enfin, grâce à l'utilisation de ce modèle de souris conditionnel combiné à un modèle de souris de cancer du sein HER2+, nous avons démontré que DOCK1 contribue à la progression tumorale et au développement de métastase induits par cet oncogène. D'un point de vue moléculaire, DOCK1 interagit avec HER2 et est phosphorylé suite à l'activation du récepteur. De plus, nous avons observé que

DOCK1 est essentiel à l'activation de RAC et à la migration cellulaire induite par HER2. Nous avons observé que chez les patientes de cancer du sein HER2+ et de phénotype basal, des hauts niveaux d'expression de *DOCK1* corrèlent avec un mauvais pronostic. Grâce à l'émergence de modèle de souris de cancer de phénotype basal, il sera intéressant d'évaluer la contribution de Dock1 à la progression tumorale *in vivo* de ce type de cancer.

De plus, nos études *in vitro* ont démontré qu'il était possible de bloquer l'activation de RAC et la migration cellulaire induite par HER2 grâce à un inhibiteur pharmacologique des DOCKs du groupe A. À ce jour, deux composés ont été caractérisés comme ayant la capacité d'inhiber la fonction de certaines GEF de la famille DOCK (52, 387). Le 4-[3'-(2''-chlorophenyl)-2'-propen-1'ylidene]-1-phenyl-3,5-pyrazolidinedione (CPYPP) a été identifié, tout comme 131 autres molécules, dans un criblage de 9, 392 composés chimiques comme ayant la capacité de prévenir la liaison entre le domaine DHR-2 de DOCK2 et RAC. Le CPYPP lie directement le domaine DHR-2 de DOCK2 de façon réversible et inhibe par la même occasion son activité catalytique (387). Plus spécifiquement, le CPYPP inhibe l'activité des GEFs DOCK-A (DOCK2, DOCK5 et DOCK1), mais non l'activité des GEFs DOCK des autres sous-groupes ou les GEFs de la famille Dbl. Lorsque injecté de façon intrapéritonéale, le CPYPP est toléré chez la souris et il inhibe la migration des lymphocytes médié par Dock2 (387). Enfin en utilisant un essai de criblage chez la levure, le N-(3,5-diclorophenyl)benzenesulfonamide (C21) a été identifié comme composé permettant d'inhiber l'activation de Rac médié par le domaine DHR-2 de Dock5 (52). En culture, ce composé a la capacité d'inhiber la résorption osseuse, un processus auquel Dock5 contribue. Toutefois, une meilleure caractérisation du mécanisme d'action et de la spécificité de ce composé sera nécessaire dans le future. Néanmoins, en utilisant comme propriété la liaison de composé au domaine DHR-2 des GEFs DOCK, il est envisageable de penser que de nouveaux inhibiteurs pourront être identifiés, améliorés et développés. Notamment, il est envisageable de penser que des composés de seconde génération pourront être utilisés en

combinaison avec d'autres traitements afin de limiter le développement de métastases chez les patientes atteintes de cancer du sein.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Hall A & Lalli G (2010) Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(2):a001818.
2. Cancelas JA & Williams DA (2009) Rho GTPases in hematopoietic stem cell functions. *Curr Opin Hematol* 16(4):249-254.
3. Bryan BA, Li D, Wu X, & Liu M (2005) The Rho family of small GTPases: crucial regulators of skeletal myogenesis. *Cell Mol Life Sci* 62(14):1547-1555.
4. Sahai E & Marshall CJ (2002) RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2(2):133-142.
5. Rossman KL, Der CJ, & Sondek J (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(2):167-180.
6. Hasegawa H, *et al.* (1996) DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane. *Mol Cell Biol* 16(4):1770-1776.
7. Nishikimi A, Kukimoto-Niino M, Yokoyama S, & Fukui Y (2013) Immune regulatory functions of DOCK family proteins in health and disease. *Exp Cell Res*.
8. Cote JF & Vuori K (2007) GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends Cell Biol* 17(8):383-393.
9. Meller N, Westbrook MJ, Shannon JD, Guda C, & Schwartz MA (2008) Function of the N-terminus of zizimin1: autoinhibition and membrane targeting. *Biochem J* 409(2):525-533.
10. Komander D, *et al.* (2008) An alpha-helical extension of the ELMO1 pleckstrin homology domain mediates direct interaction to DOCK180 and is critical in Rac signaling. *Mol Biol Cell* 19(11):4837-4851.
11. Feng H, *et al.* (2011) Activation of Rac1 by Src-dependent phosphorylation of Dock180(Y1811) mediates PDGFRalpha-stimulated glioma tumorigenesis in mice and humans. *J Clin Invest* 121(12):4670-4684.

12. Feng H, *et al.* (2012) Phosphorylation of dedicator of cytokinesis 1 (Dock180) at tyrosine residue Y722 by Src family kinases mediates EGFRvIII-driven glioblastoma tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(8):3018-3023.
13. Feng H, *et al.* (2013) EGFRvIII stimulates glioma growth and invasion through PKA-dependent serine phosphorylation of Dock180. *Oncogene*.
14. Miyamoto Y, *et al.* (2013) Akt and PP2A reciprocally regulate the guanine nucleotide exchange factor Dock6 to control axon growth of sensory neurons. *Sci Signal* 6(265):ra15.
15. Nishikimi A, *et al.* (2009) Sequential regulation of DOCK2 dynamics by two phospholipids during neutrophil chemotaxis. *Science* 324(5925):384-387.
16. Sanematsu F, *et al.* (2013) Phosphatidic acid-dependent recruitment and function of the Rac activator DOCK1 during dorsal ruffle formation. *J Biol Chem* 288(12):8092-8100.
17. Yang J, Zhang Z, Roe SM, Marshall CJ, & Barford D (2009) Activation of Rho GTPases by DOCK exchange factors is mediated by a nucleotide sensor. *Science* 325(5946):1398-1402.
18. Kulkarni K, Yang J, Zhang Z, & Barford D (2011) Multiple factors confer specific Cdc42 and Rac protein activation by dedicator of cytokinesis (DOCK) nucleotide exchange factors. *J Biol Chem* 286(28):25341-25351.
19. Harada Y, *et al.* (2012) DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses. *Blood* 119(19):4451-4461.
20. Patel M, Pelletier A, & Cote JF (2011) Opening up on ELMO regulation: New insights into the control of Rac signaling by the DOCK180/ELMO complex. *Small GTPases* 2(5):268-275.
21. Patel M, *et al.* (2010) An evolutionarily conserved autoinhibitory molecular switch in ELMO proteins regulates Rac signaling. *Curr Biol* 20(22):2021-2027.
22. Hanawa-Suetsugu K, *et al.* (2012) Structural basis for mutual relief of the Rac guanine nucleotide exchange factor DOCK2 and its partner ELMO1 from their autoinhibited forms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(9):3305-3310.
23. Patel M, Chiang TC, Tran V, Lee FJ, & Cote JF (2011) The Arf family GTPase Arl4A complexes with ELMO proteins to promote actin cytoskeleton remodeling and

reveals a versatile Ras-binding domain in the ELMO proteins family. *J Biol Chem* 286(45):38969-38979.

24. Margaron Y, Fradet N, & Cote JF (2013) ELMO recruits actin cross-linking family 7 (ACF7) at the cell membrane for microtubule capture and stabilization of cellular protrusions. *J Biol Chem* 288(2):1184-1199.

25. Li H, *et al.* (2013) Association between Galphai2 and ELMO1/Dock180 connects chemokine signalling with Rac activation and metastasis. *Nat Commun* 4:1706.

26. Heasman SJ & Ridley AJ (2008) Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(9):690-701.

27. Tachibana K, *et al.* (1998) The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393(6685):591-594.

28. Sierro F, *et al.* (2007) Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(37):14759-14764.

29. Sanematsu F, *et al.* (2010) DOCK180 is a Rac activator that regulates cardiovascular development by acting downstream of CXCR4. *Circ Res* 107(9):1102-1105.

30. Larrivee B, Freitas C, Suchting S, Brunet I, & Eichmann A (2009) Guidance of vascular development: lessons from the nervous system. *Circ Res* 104(4):428-441.

31. Epting D, *et al.* (2010) The Rac1 regulator ELMO1 controls vascular morphogenesis in zebrafish. *Circ Res* 107(1):45-55.

32. Tan W, *et al.* (2008) An essential role for Rac1 in endothelial cell function and vascular development. *FASEB J* 22(6):1829-1838.

33. Nugent AA, Kolpak AL, & Engle EC (2012) Human disorders of axon guidance. *Curr Opin Neurobiol* 22(5):837-843.

34. Round J & Stein E (2007) Netrin signaling leading to directed growth cone steering. *Curr Opin Neurobiol* 17(1):15-21.

35. Li X, *et al.* (2008) Netrin signal transduction and the guanine nucleotide exchange factor DOCK180 in attractive signaling. *Nat Neurosci* 11(1):28-35.

36. Xu NJ & Henkemeyer M (2009) Ephrin-B3 reverse signaling through Grb4 and cytoskeletal regulators mediates axon pruning. *Nat Neurosci* 12(3):268-276.
37. Kashiwa A, *et al.* (2000) Isolation and characterization of novel presenilin binding protein. *J Neurochem* 75(1):109-116.
38. Namekata K, *et al.* (2010) Dock3 induces axonal outgrowth by stimulating membrane recruitment of the WAVE complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(16):7586-7591.
39. Namekata K, *et al.* (2012) Dock3 stimulates axonal outgrowth via GSK-3beta-mediated microtubule assembly. *J Neurosci* 32(1):264-274.
40. Chen Q, *et al.* (2009) Loss of modifier of cell adhesion reveals a pathway leading to axonal degeneration. *J Neurosci* 29(1):118-130.
41. Blasius AL, *et al.* (2009) Mice with mutations of Dock7 have generalized hypopigmentation and white-spotting but show normal neurological function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(8):2706-2711.
42. Watabe-Uchida M, John KA, Janas JA, Newey SE, & Van Aelst L (2006) The Rac activator DOCK7 regulates neuronal polarity through local phosphorylation of stathmin/Op18. *Neuron* 51(6):727-739.
43. Yang YT, Wang CL, & Van Aelst L (2012) DOCK7 interacts with TACC3 to regulate interkinetic nuclear migration and cortical neurogenesis. *Nat Neurosci* 15(9):1201-1210.
44. Taverna E & Huttner WB (2010) Neural progenitor nuclei IN motion. *Neuron* 67(6):906-914.
45. Abmayr SM & Pavlath GK (2012) Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development* 139(4):641-656.
46. Laurin M, *et al.* (2008) The atypical Rac activator Dock180 (Dock1) regulates myoblast fusion in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(40):15446-15451.
47. Vasyutina E, Martarelli B, Brakebusch C, Wende H, & Birchmeier C (2009) The small G-proteins Rac1 and Cdc42 are essential for myoblast fusion in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(22):8935-8940.
48. Hochreiter-Hufford AE, *et al.* (2013) Phosphatidylserine receptor BAI1 and apoptotic cells as new promoters of myoblast fusion. *Nature* 497(7448):263-267.





























224. Soerjomataram I, *et al.* (2012) Global burden of cancer in 2008: a systematic analysis of disability-adjusted life-years in 12 world regions. *Lancet* 380(9856):1840-1850.
225. Vargo-Gogola T & Rosen JM (2007) Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat Rev Cancer* 7(9):659-672.
226. Osborne C, Wilson P, & Tripathy D (2004) Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* 9(4):361-377.
227. Bocker W (2002) [WHO classification of breast tumors and tumors of the female genital organs: pathology and genetics]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 86:116-119.
228. Elston CW & Ellis IO (2002) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410. *Histopathology* 41(3A):151-152, discussion 152-153.
229. Singletary SE & Connolly JL (2006) Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin* 56(1):37-47; quiz 50-31.
230. Lim E, Metzger-Filho O, & Winer EP (2012) The natural history of hormone receptor-positive breast cancer. *Oncology (Williston Park)* 26(8):688-694, 696.
231. Perou CM, *et al.* (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406(6797):747-752.
232. Gray J & Druker B (2012) Genomics: the breast cancer landscape. *Nature* 486(7403):328-329.
233. Curtis C, *et al.* (2012) The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 486(7403):346-352.
234. Herschkowitz JI, *et al.* (2007) Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol* 8(5):R76.
235. Tran B & Bedard PL (2011) Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets. *Breast Cancer Res* 13(6):221.

236. Fadare O & Tavassoli FA (2008) Clinical and pathologic aspects of basal-like breast cancers. *Nat Clin Pract Oncol* 5(3):149-159.
237. Fackenthal JD & Olopade OI (2007) Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat Rev Cancer* 7(12):937-948.
238. Seal MD & Chia SK (2010) What is the difference between triple-negative and basal breast cancers? *Cancer J* 16(1):12-16.
239. Hudis CA & Gianni L (2011) Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. *Oncologist* 16 Suppl 1:1-11.
240. Hynes NE & Lane HA (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5(5):341-354.
241. Ferguson KM, *et al.* (2003) EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* 11(2):507-517.
242. Garrett TP, *et al.* (2003) The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* 11(2):495-505.
243. Pinkas-Kramarski R, *et al.* (1996) Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J* 15(10):2452-2467.
244. Burgess AW, *et al.* (2003) An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 12(3):541-552.
245. Hubbard SR (2006) EGF receptor activation: push comes to shove. *Cell* 125(6):1029-1031.
246. Huse M & Kuriyan J (2002) The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109(3):275-282.
247. Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, & Kuriyan J (2006) An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 125(6):1137-1149.
248. Tice DA, Biscardi JS, Nickles AL, & Parsons SJ (1999) Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4):1415-1420.

249. Xu W, Yuan X, Beebe K, Xiang Z, & Neckers L (2007) Loss of Hsp90 association up-regulates Src-dependent ErbB2 activity. *Mol Cell Biol* 27(1):220-228.
250. Yarden Y & Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2):127-137.
251. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, & Hynes NE (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19(13):3159-3167.
252. Holbro T & Hynes NE (2004) ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:195-217.
253. Shih C, Padhy LC, Murray M, & Weinberg RA (1981) Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 290(5803):261-264.
254. Schechter AL, *et al.* (1984) The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 312(5994):513-516.
255. Lee KF, *et al.* (1995) Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 378(6555):394-398.
256. Andrechek ER, White D, & Muller WJ (2005) Targeted disruption of ErbB2/Neu in the mammary epithelium results in impaired ductal outgrowth. *Oncogene* 24(5):932-937.
257. Vermeij J, *et al.* (2008) Genomic activation of the EGFR and HER2-neu genes in a significant proportion of invasive epithelial ovarian cancers. *BMC Cancer* 8:3.
258. Jaehne J, *et al.* (1992) Expression of Her2/neu oncogene product p185 in correlation to clinicopathological and prognostic factors of gastric carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 118(6):474-479.
259. Cornolti G, *et al.* (2007) Amplification and overexpression of HER2/neu gene and HER2/neu protein in salivary duct carcinoma of the parotid gland. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 133(10):1031-1036.
260. Carter P, *et al.* (1992) Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10):4285-4289.



272. Berns K, *et al.* (2007) A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 12(4):395-402.
273. Lewis Phillips GD, *et al.* (2008) Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res* 68(22):9280-9290.
274. Austin CD, *et al.* (2004) Endocytosis and sorting of ErbB2 and the site of action of cancer therapeutics trastuzumab and geldanamycin. *Mol Biol Cell* 15(12):5268-5282.
275. Franklin MC, *et al.* (2004) Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* 5(4):317-328.
276. Baselga J, *et al.* (2012) Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 366(2):109-119.
277. Spector NL, *et al.* (2005) Study of the biologic effects of lapatinib, a reversible inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, on tumor growth and survival pathways in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol* 23(11):2502-2512.
278. Konecny GE, *et al.* (2006) Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Res* 66(3):1630-1639.
279. Scaltriti M, *et al.* (2009) Lapatinib, a HER2 tyrosine kinase inhibitor, induces stabilization and accumulation of HER2 and potentiates trastuzumab-dependent cell cytotoxicity. *Oncogene* 28(6):803-814.
280. Bar-Sinai A, *et al.* (2005) Mouse mammary tumor virus Env-derived peptide associates with nucleolar targets in lymphoma, mammary carcinoma, and human breast cancer. *Cancer Res* 65(16):7223-7230.
281. Cardiff RD & Muller WJ (1993) Transgenic mouse models of mammary tumorigenesis. *Cancer Surv* 16:97-113.
282. Wagner KU, *et al.* (2001) Spatial and temporal expression of the Cre gene under the control of the MMTV-LTR in different lines of transgenic mice. *Transgenic Res* 10(6):545-553.

283. Muller WJ, Sinn E, Pattengale PK, Wallace R, & Leder P (1988) Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* 54(1):105-115.
284. Bargmann CI, Hung MC, & Weinberg RA (1986) Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell* 45(5):649-657.
285. Weiner DB, Liu J, Cohen JA, Williams WV, & Greene MI (1989) A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation. *Nature* 339(6221):230-231.
286. Bouchard L, Lamarre L, Tremblay PJ, & Jolicoeur P (1989) Stochastic appearance of mammary tumors in transgenic mice carrying the MMTV/c-neu oncogene. *Cell* 57(6):931-936.
287. Guy CT, et al. (1992) Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(22):10578-10582.
288. Siegel PM, Dankort DL, Hardy WR, & Muller WJ (1994) Novel activating mutations in the neu proto-oncogene involved in induction of mammary tumors. *Mol Cell Biol* 14(11):7068-7077.
289. Siegel PM, Ryan ED, Cardiff RD, & Muller WJ (1999) Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer. *EMBO J* 18(8):2149-2164.
290. Chan R, Muller WJ, & Siegel PM (1999) Oncogenic activating mutations in the neu/erbB-2 oncogene are involved in the induction of mammary tumors. *Ann N Y Acad Sci* 889:45-51.
291. Vaught DB, et al. (2012) HER3 is required for HER2-induced preneoplastic changes to the breast epithelium and tumor formation. *Cancer Res* 72(10):2672-2682.
292. Moody SE, et al. (2002) Conditional activation of Neu in the mammary epithelium of transgenic mice results in reversible pulmonary metastasis. *Cancer Cell* 2(6):451-461.

- 293. Weinstein IB & Joe A (2008) Oncogene addiction. *Cancer Res* 68(9):3077-3080; discussion 3080.
- 294. Andrechek ER, *et al.* (2000) Amplification of the neu/erbB-2 oncogene in a mouse model of mammary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7):3444-3449.
- 295. Gusterson BA, *et al.* (1982) Distribution of myoepithelial cells and basement membrane proteins in the normal breast and in benign and malignant breast diseases. *Cancer Res* 42(11):4763-4770.
- 296. Rudland PS, *et al.* (1993) Immunocytochemical identification of cell types in benign and malignant breast diseases: variations in cell markers accompany the malignant state. *J Histochem Cytochem* 41(4):543-553.
- 297. Trask DK, *et al.* (1990) Keratins as markers that distinguish normal and tumor-derived mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(6):2319-2323.
- 298. Cardiff RD, *et al.* (2000) The mammary pathology of genetically engineered mice: the consensus report and recommendations from the Annapolis meeting. *Oncogene* 19(8):968-988.
- 299. Joyce JA & Pollard JW (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9(4):239-252.
- 300. Fidler IJ (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3(6):453-458.
- 301. Paget S (1989) The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 8(2):98-101.
- 302. Steeg PS (2003) Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 3(1):55-63.
- 303. Yilmaz M & Christofori G (2009) EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 28(1-2):15-33.
- 304. Friedl P & Gilmour D (2009) Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(7):445-457.
- 305. Friedl P, Borgmann S, & Brocker EB (2001) Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement. *J Leukoc Biol* 70(4):491-509.



319. Friedl P, *et al.* (1995) Migration of coordinated cell clusters in mesenchymal and epithelial cancer explants in vitro. *Cancer Res* 55(20):4557-4560.
320. Reddy HK, *et al.* (2005) Cyclin-dependent kinase 4 expression is essential for neu-induced breast tumorigenesis. *Cancer Res* 65(22):10174-10178.
321. Landis MW, Pawlyk BS, Li T, Sicinski P, & Hinds PW (2006) Cyclin D1-dependent kinase activity in murine development and mammary tumorigenesis. *Cancer Cell* 9(1):13-22.
322. Bowe DB, Kenney NJ, Adereth Y, & Maroulakou IG (2002) Suppression of Neu-induced mammary tumor growth in cyclin D1 deficient mice is compensated for by cyclin E. *Oncogene* 21(2):291-298.
323. Bulavin DV, *et al.* (2004) Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nat Genet* 36(4):343-350.
324. Wulf G, Garg P, Liou YC, Iglehart D, & Lu KP (2004) Modeling breast cancer in vivo and ex vivo reveals an essential role of Pin1 in tumorigenesis. *EMBO J* 23(16):3397-3407.
325. Li B, Rosen JM, McMenamin-Balano J, Muller WJ, & Perkins AS (1997) neu/ERBB2 cooperates with p53-172H during mammary tumorigenesis in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 17(6):3155-3163.
326. Hult J, *et al.* (2006) p27Kip1 repression of ErbB2-induced mammary tumor growth in transgenic mice involves Skp2 and Wnt/beta-catenin signaling. *Cancer Res* 66(17):8529-8541.
327. Cabodi S, *et al.* (2006) p130Cas as a new regulator of mammary epithelial cell proliferation, survival, and HER2-neu oncogene-dependent breast tumorigenesis. *Cancer Res* 66(9):4672-4680.
328. Massague J (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753-791.
329. Massague J (1990) The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6:597-641.

330. Robinson SD, Silberstein GB, Roberts AB, Flanders KC, & Daniel CW (1991) Regulated expression and growth inhibitory effects of transforming growth factor-beta isoforms in mouse mammary gland development. *Development* 113(3):867-878.
331. Wakefield LM, Yang YA, & Dukhanina O (2000) Transforming growth factor-beta and breast cancer: Lessons learned from genetically altered mouse models. *Breast Cancer Res* 2(2):100-106.
332. Chambers AF, Groom AC, & MacDonald IC (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2(8):563-572.
333. Siegel PM, Shu W, Cardiff RD, Muller WJ, & Massague J (2003) Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14):8430-8435.
334. Muraoka RS, et al. (2003) Increased malignancy of Neu-induced mammary tumors overexpressing active transforming growth factor beta1. *Mol Cell Biol* 23(23):8691-8703.
335. Muraoka-Cook RS, et al. (2006) Activated type I TGFbeta receptor kinase enhances the survival of mammary epithelial cells and accelerates tumor progression. *Oncogene* 25(24):3408-3423.
336. Perez-Tenorio G & Stal O (2002) Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. *Br J Cancer* 86(4):540-545.
337. Sun M, et al. (2001) AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol* 159(2):431-437.
338. Hutchinson JN, Jin J, Cardiff RD, Woodgett JR, & Muller WJ (2004) Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. *Cancer Res* 64(9):3171-3178.
339. Salmena L, Carracedo A, & Pandolfi PP (2008) Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* 133(3):403-414.
340. Schade B, et al. (2009) PTEN deficiency in a luminal ErbB-2 mouse model results in dramatic acceleration of mammary tumorigenesis and metastasis. *J Biol Chem* 284(28):19018-19026.





366. Krauss RS (2007) Evolutionary conservation in myoblast fusion. *Nat Genet* 39(6):704-705.
367. Patrakka J & Tryggvason K (2007) Nephrin--a unique structural and signaling protein of the kidney filter. *Trends Mol Med* 13(9):396-403.
368. Nolan KM, *et al.* (1998) Myoblast city, the Drosophila homolog of DOCK180/CED-5, is required in a Rac signaling pathway utilized for multiple developmental processes. *Genes Dev* 12(21):3337-3342.
369. Cote JF & Vuori K (2002) Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *J Cell Sci* 115(Pt 24):4901-4913.
370. Brugnera E, *et al.* (2002) Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol* 4(8):574-582.
371. Meller N, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Del Pozo MA, & Schwartz MA (2002) Zizimin1, a novel Cdc42 activator, reveals a new GEF domain for Rho proteins. *Nat Cell Biol* 4(9):639-647.
372. Cote JF, Motoyama AB, Bush JA, & Vuori K (2005) A novel and evolutionarily conserved PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-binding domain is necessary for DOCK180 signalling. *Nat Cell Biol* 7(8):797-807.
373. Grimsley CM, *et al.* (2004) Dock180 and ELMO1 proteins cooperate to promote evolutionarily conserved Rac-dependent cell migration. *J Biol Chem* 279(7):6087-6097.
374. Wang DZ, *et al.* (1997) Mutation in Sos1 dominantly enhances a weak allele of the EGFR, demonstrating a requirement for Sos1 in EGFR signaling and development. *Genes Dev* 11(3):309-320.
375. Hollway GE & Currie PD (2003) Myotome meanderings. Cellular morphogenesis and the making of muscle. *EMBO Rep* 4(9):855-860.
376. Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Seale P, Asakura A, & Rudnicki MA (1999) Reduced differentiation potential of primary MyoD<sup>-/-</sup> myogenic cells derived from adult skeletal muscle. *J Cell Biol* 144(4):631-643.











