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

Résumé

Dock1 (aussi nommé Dock180) est le membre prototypique de la famille Dock d'activateurs des petites GTPases de la famille Rho. Dock1 agit au sein d'une voie de signalisation conservée au cours de l'évolution et des études génétiques ont démontré que les orthologues de Dock1, myoblast city (mbc) chez la drosophile et Ced-5 chez le nématode, activent Rac dans divers processus biologiques. Notamment, mbc est un important régulateur de la fusion des myoblastes lors de la formation des fibres musculaires de drosophile. Mbc est aussi essentiel à la migration collective d'un groupe de cellules, appelées cellules de bordures, lors de leur migration dans la chambre de l'oeuf suite à l'activation de récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). La migration collective des cellules de bordures récapitule certains des événements observés lorsque des cellules tumorales envahissent le tissu environnant lors de la formation de métastases. Chez les mammifères, des études réalisées en lignées cellulaires suggèrent que Dock1 est aussi un régulateur du cytosquelette lors de la migration cellulaire. De plus, certaines études ont démontré que la voie Dock1/Rac agit en aval de RTKs lors de l'invasion de cellules de glioblastome. Néanmoins, les fonctions in vivo de Dock1 chez les mammifères demeurent méconnues et le but de cette thèse est d'identifier et de caractériser certaines de ses fonctions.

Guidés par la fonction de mbc, nous démontrons dans l'objectif no 1 un rôle essentiel pour ce gène au cours du développement embryonnaire grâce à la caractérisation d'une souris *Dock1* knock-out. Des défauts sévères de fusion des myoblastes sont observés en absence de l'expression de *Dock1* et ils contribuent à la réduction de la masse musculaire des souris mutantes. De plus, nous avons constaté une contribution du gène *Dock5*, un membre de la famille *Dock* proche de *Dock1*, au développement des fibres musculaires.

ii

Dans l'objectif no 2, nous avons observé que des hauts niveaux d'expression de *DOCK1* corrèlent avec un mauvais pronostic chez les patientes atteintes de cancer du sein possédant une forte expression du gène codant pour le RTK *HER2*. Une surexpression ou une amplification du locus codant pour le récepteur HER2 est associée à près de 20% des cas de cancer du sein. Les cancers de ces patientes développent fréquemment des métastases et sont associés à un mauvais pronostic. Des études biochimiques ont révélé que DOCK1 interagit avec le récepteur HER2 dans des cellules de cancer du sein. De plus, DOCK1 est essentiel à l'activation de RAC et à la migration cellulaire induite par HER2 chez la souris combiné avec l'inactivation du gène *Dock1* dans les glandes mammaires, nous a permis d'identifier Dock1 et Rac comme de nouveaux effecteurs de la croissance tumorale et de la formation de métastases régulées par l'oncogène HER2.

Nous concluons que l'utilisation de différents modèles de souris knock-out pour le gène *Dock1* nous a permis d'identifier des fonctions clés de ce gène. Tout comme son orthologue mbc, Dock1 joue un rôle important lors du développement embryonnaire en régulant notamment la fusion des myoblastes. Nos études ont également contribué à démontrer un important degré de conservation des mécanismes moléculaires de fusion entre les espèces. De plus, DOCK1 agit en aval du RTK HER2 et son expression dans les cellules épithéliales de glandes mammaires contribue au développement tumoral et à la formation de métastases induits par cet oncogène.

Mots-clés : Dock1, Dock180, Dock5, Fusion des myoblastes, Cancer du sein

iii

Abstract

Dock1 (also known as Dock180) is the prototypical member of the Dock family of Rho GTPase activators (RhoGEFs). Genetic studies in *Drosophila* and *C. elegans* have demonstrated that Dock1 orthologues act upstream of the Rac GTPase to activate it during various biological processes. Myoblast city (mbc), Dock1 ortholog in the *Drosophila*, is an important regulator of myoblast fusion during muscle fiber formation. Moreover, mbc regulates the collective migration of a cluster of border cells downstream of the activation of some tyrosine kinase receptors (RTKs). Migration of border cells is often view as a model for studying the invasive migration of cancer cells during metastasis development. Work done in cell lines also suggests that Dock1/Rac pathway was also shown to act downstream of some RTKs to promote the invasion of glioblastoma cells. Yet, the *in vivo* functions of Dock1 in mammals are still poorly understood and the identification and characterization of some of these functions is the main objective of my thesis.

Guided by the function of mbc, in Aim #1 we revealed that *Dock1* is essential to embryonic development by characterizing a *Dock1* knock-out mouse model. A deficiency in myoblast fusion was observed in *Dock1*-null embryos which led to a reduction in their muscle mass. Furthermore, we uncovered a contribution of the other *Dock1*-related GEF, *Dock5*, to myofiber development.

In Aim #2 a correlation between high level of *DOCK1* expression and a poor prognosis in HER2+ breast cancer patients was revealed. Amplification or overexpression of the HER2 receptor tyrosine kinase is associated with near 20% of breast cancer cases. The presence of this genetic abnormality correlates with a poor prognosis and the development of metastasis. Biochemical and *in vitro* studies led us to identify that DOCK1 interacts with HER2 and is essential to HER2-mediated RAC activation and migration. The use of a HER2 breast cancer mouse model with *Dock1*

iv

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

Préface

Cette thèse est un manuscrit rédigé par articles. Elle contient 2 articles publiés et un manuscrit en préparation pour soumission. La thèse est divisée en 3 chapitres suivis d'une discussion.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

La section 1.1 du Chapitre 1 contient un article de revue. Une version modifiée de ce manuscrit sera soumise comme article de revue à Genes & Development. Les sections 1.2 et 1.3 contiennent une revue de la littérature sur le développement musculaire et le cancer du sein respectivement.

CHAPITRE 2 : LA RACGEF ATYPIQUE DOCK180 (DOCK1) RÉGULE LA FUSION DES MYOBLASTES *IN VIVO*

Ce chapitre contient un article publié :

Laurin M, Fradet N, Blangy A, Hall A, Vuori K and Côté JF (2008). The atypical Rac activator Dock180 (Dock1) regulates myoblast fusion *in vivo*. **PNAS 105**, 15446-15451

CHAPITRE 3 : LA RACGEF DOCK1 EST UN IMPORTANT RÉGULATEUR DU DÉVELOPPEMENT MÉTASTATIQUE DANS LE CANCER DU SEIN HER2+

Ce chapitre contient un article publié :

Laurin M, Huber J, Pelletier A, Houalla T, Park M, Fukui Y, Haibe-Kains B, Muller WJ and Côté JF (2013). Rac-specific guanine nucleotide exchange factor DOCK1 is a critical regulator of HER2-mediated breast cancer metastasis. **PNAS 110**, 7434-7439

Table des matières

Préfacevi
Liste des tableauxx
Liste des figuresxi
Liste des abréviations xiv
INTRODUCTION1
CHAPITRE 12
1.1 LES FONCTIONS IN VIVO DES GEFs DOCK CHEZ LES MAMMIFÈRES3
Insights into the biological functions of DOCK GEFs from in vivo studies4
Abstract5
Rho GTPases' regulation and signaling6
Dock GEFs in development12
Dock1 and Elmo1 contribute to cardiovascular development
Dock1 regulates Rac in the neuronal growth cone: from attraction to repulsion
Dock3 integrates actin and microtubule dynamics to promote axon outgrowth
Tug of war between Akt and PP2: activation of Rac by Dock6 is controlled by
phosphorylation during axonal outgrowth17
Dock7 regulates pigmentation and metabolism18
GEF-independent functions of Dock7 in neurogenesis: controling interkinetic
nuclear migration18
Unraveling the role of the Dock1 pathway in myoblast fusion
Bone resorption: Dock5 promotes osteoclast adhesion
DOCK family in disease22
The Adams-Oliver Syndrome and misregulation of CDC42/RAC: genetic
mutations in DOCK6 and ARHGAP31 in familial cases
DOCK1 as a promoter of cell invasion downstream of oncogenic kinases24
1 2 LES MUSCLES SOUELETTIQUES 27

1.2.1 Le développement musculaire chez la drosophile	30
1.2.2 La spécification des progéniteurs musculaires chez la drosophile	30
1.2.3 La fusion des myoblastes chez la drosophile	32
1.2.3.1 Les événements cellulaires observés lors de la fusion	32
1.2.3.2 Les voies de signalisation nécessaires à la fusion	33
1.2.4 Le développement musculaire chez les vertébrés	41
1.2.4.1 Le développement musculaire chez la souris et le poulet	41
1.2.4.2 Le développement musculaire chez le poisson zèbre	44
1.2.5 La fusion des myoblastes chez les mammifères	47
1.2.5.1 Les événements cellulaires observés lors de la fusion	47
1.2.5.2 Les voies de signalisation régulant la fusion des myoblastes	48
1.2.6 Conclusion	58
1.3 LES GLANDES MAMMAIRES ET LE CANCER DU SEIN	59
1.3.1 Les glandes mammaires	60
1.3.2 Le cancer du sein	63
1.3.3 Le récepteur HER2 et le cancer du sein	66
1.3.3.1 HER2 et la famille de récepteur à l'EGF	66
1.3.3.2 HER2 et le développement des glandes mammaires	67
1.3.3.3 Le cancer du sein HER2+	69
1.3.3.4 Les modèles de cancer du sein induits par l'oncogène HER2	70
1.3.4 Le développement des métastases	77
1.3.4.1 La cascade métastatique	77
1.3.4.2 Les modes de migration cellulaire	78
1.3.5 HER2 et la signalisation en aval dans le cancer du sein	84
1.3.6 DOCK1 et les récepteurs à activité tyrosine kinase	88
1.3.7 Conclusion	90
1.4 LES OBJECTIFS DE RECHERCHE	91
1.4.1 Objectif 1 (Chapitre 2)	91
1.4.2 Objectif 2 (Chapitre 3)	92
RÉSULTATS	93
CHAPITRE 2	94

LA	RACGEF	ATYPIQUE	DOCK180	(DOCK1)	RÉGULE	LA	FUSION	DES
MY	OBLASTES	IN VIVO						94
C	ontributions	Figures						95
Т	he atypical l	Rac Activator	Dock180 (De	ock1) regula	ates myobla	st fus	sion <i>in vivo</i> .	96
А	bstract							97
Ir	ntroduction							98
F	esults							101
C	iscussion							109
N	lateriel and	Methods						113
А	cknowledgn	nents						114
S	upplementa	I Information.						115
CH	APITRE 3							132
LA	RACGEF D	OCK1 EST U	N IMPORTA	NT RÉGUL	ATEUR DU	J DÉ	VELOPPEN	ЛЕNT
MÉ	TASTATIQU	JE DANS LE (CANCER DU	SEIN HER	2+			132
C	ontributions	Figures						133
F	AC-specific	guanine nuc	eotide excha	ange factor	DOCK1 is	a cri	tical regula	tor of
F	IER2-media	ted breast car	icer metasta	sis				135
А	bstract							136
Ir	ntroduction							137
F	esults							139
D	iscussion							151
N	lateriel and	Methods						154
А	cknowledge	ements						155
S	upplementa	I Information.						156
DIS	CUSSION							186
BIB	LIOGRAPH	IE						206

Liste des tableaux

CHAPITRE1

Table 1 I	In vivo models of Dock GEEs	11	

CHAPITRE 2

Table 2.SI	Viability of embryos and pups	129
Table 2.SII	E14.5 embryos and P21 pups derived from <i>Dock1^{+/-}Dock5^{+/-}</i> >	< Dock1+/-
	Dock5 ^{+/-} crosses	130
Table 2.SIII	PCR primers for different procedures	131

CHAPITRE 3

Table 3.SI	RNA-Seq analysis overview	184
Table 3.SII	Primers for different procedures	185

Liste des figures

CHAPITRE 1

Figure 1.1.1	Dock GEF Family8
Figure 1.1.2	Structural basis of Dock GEF activity, localization and signaling9
Figure 1.1.3	Elmo scaffolds: spatio-temporal orchestrators of Dock-mediated Rac
	activation10
Figure 1.1.4	The role of Dock GEFs in development13
Figure 1.1.5	Docks in neurogenesis15
Figure 1.1.6	Eliminating apoptotic cells via the Elmo-Dock1-Rac pathway:
	implications in tissue homeostasis21
Figure 1.1.7	Moving ameboid or mesenchymal? DOCKs tip the balance23
Figure 1.1.8	DOCK1 in cancer26
Figure 1.2.1	Le muscle squelettique et son architecture29
Figure 1.2.2	La spécification des progéniteurs musculaires chez la drosophile31
Figure 1.2.3	Les événements cellulaires observés lors de la fusion des myoblastes
	de drosophile34
Figure 1.2.4	Schéma des voies de signalisation impliquées dans la fusion des
	myoblastes de drosophile
Figure 1.2.5	La myogenèse chez les mammifères42
Figure 1.2.6	Les vagues de myogenèse46
Figure 1.2.7	Les voies de signalisation impliquées la fusion des myoblastes chez
	les mammifères57
Figure 1.3.1	Anatomie de la glande mammaire des humains61
Figure 1.3.2	Le développement des glandes mammaires chez la souris62

Figure 1.3.4	HER2 et les variants NEU oncogéniques	73
Figure 1.3.5	La cascade métastatique	79
Figure 1.3.6	Les modes de migration lors de l'invasion tumorale	80
Figure 1.3.7	La migration mésenchymale en 5 étapes	83

CHAPITRE 2

Figure 2.1	Generation and analysis of <i>Dock1</i> and <i>Dock5</i> mutant mice102
Figure 2.2	Expression profile and characterization of the skeletal muscle in the
	absence of <i>Dock1</i> and <i>Dock5</i> 103
Figure 2.3	The absence of <i>Dock1</i> affects myoblast fusion <i>in vivo</i> 105
Figure 2.4	Genetic interactions between Dock1 and Dock5 in muscle development

Figure 2.S1 Disruption of <i>Dock1</i> and <i>Dock5</i> genes in mi	ce123
Figure 2.S2 Expression profile of <i>Dock1</i> and <i>Dock5</i> du	ring mouse development
Figure 2.S3 General and dramatic reduction of muscle	e mass in embryos lacking
Dock1	126
Figure 2.S4 Loss of Dock1 does not affect determination	n of myoblast and migration
of muscle progenitors	127
Figure 2.S5 Proliferative and apoptotic status of muscle	cells in Dock1-null embryos

CHAPITRE 3

Figure 3.1	DOCK1, a negative prognostic factor for human breast cancer survival,
	activates RAC and promotes cell migration downstream of HER2141
Figure 3.2	Dock1 contributes to HER2 tumorigenesis in a mouse model of breast
	cancer
Figure 3.3	Dock1 regulates HER2-mediated lung metastasis146
Figure 3.4	Identification of a Dock1-null gene signature enriched in interferon
	response genes148

Figure 3.S1	DOCK1 is expressed in human breast cancer166
Figure 3.S2	DOCK1, is phosphorylated by SRC kinase downstream of HER2
	activation167
Figure 3.S3	Portrait of Rho GTPase regulation in Neu-induced tumors169
Figure 3.S4	Generation of a <i>Dock1</i> conditional knockout mouse171
Figure 3.S5	Dock1 signaling regulates tumor growth by promoting cell proliferation
	and blocking apoptosis
Figure 3.S6	Dock1 regulates c-Jun and Stat3 activation in HER2-driven MINs and
	Stat1 expression levels in HER2-driven tumors
Figure 3.S7	Reduced levels and activation of Stat1 in HER2-driven tumors in the
	absence of <i>Dock1</i> expression174
Figure 3.S8	Dock1 is expressed in lung metastasis175
Figure 3.S9	Deletion of <i>Dock1</i> expression in NIC ⁺ tumor does not affect white blood
	cell recruitment176
Figure 3.S10	Dock1 is essential for HER2-mediated lung metastasis in experimental
	metastasis assay177
Figure 3.S11	Components upstream of Dock1 in the integrin-signaling pathways are
	activated correctly in <i>Dock1</i> -null tumors178
Figure 3.S12	Validation of the differential expression data obtained by RNA-
	sequencing using Q-PCR analysis180
Figure 3.S13	Oncogenic HER2 elevates interferon-response gene expressions in
	culture
Figure 3.S14	Expression levels of some $Dock1^{n \times n \times}$ -signature genes are predictive of
	disease free survival in HER2 ⁺ breast cancer
Figure 3.S15	Model of signaling downstream of Dock1 in <i>NIC</i> ⁺ MINs and tumors

Liste des abréviations

- ADAM12 : ADAM METALLOPEPTIDASE DOMAIN 12
- α-PIX : RAC/CDC42 GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR (GEF) 6
- ANTS : ANTISOCIAL
- AOS : Adams-Oliver Syndrome
- **ARF6** : ADP-RIBOSYLATION FACTOR 6
- ARHGP31 : RHO GTPASE ACTIVATING PROTEIN 31
- **BAI** : BRAIN-SPECIFIC ANGIOGENESIS INHIBITOR
- **BDNF** : BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR
- **BNIP2** : BCL2/ADENOVIRUS E1B 19KDA INTERACTING PROTEIN 2
- **BOC** : BROTHER OF CDO
- **β-PIX** : RHO GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR (GEF7)
- BRAG2 : BREFELDIN-RESISTANT ARF-GEF 2 PROTEIN
- **BSA** : Bovine serum albumin
- **BST2** : BONE MARROW STROMAL CELL ANTIGEN 2
- CDC42 : CELL DIVISION CYCLE 42
- CDO : CELL ADHESION MOLECULE-RELATED/DOWN-REGULATED BY ONCOGENES
- **CD31** : PLATELET/ENDOTHELIAL CELL ADHESION MOLECULE 1
- CD45 : PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE, RECEPTOR TYPE, C
- **CED** : CELL DEATH
- c-JUN : JUN PROTO-ONCOGENE

- CMPK2 : CYTIDINE MONOPHOSPHATE (UMP-CMP) KINASE 2, MITOCHONDRIAL
- **CRK** : V-CRK SARCOMA VIRUS CT10 ONCOGENE HOMOLOG
- CRK-L : V-CRK SARCOMA VIRUS CT10 ONCOGENE HOMOLOG (AVIAN)-LIKE
- **CRMP-2**: COLLAPSIN RESPONSE MEDIATOR PROTEIN 2
- CSN2 : CASEIN BETA
- CSN1S1 : CASEIN ALPHA S1
- CXCL12 : CHEMOKINE (C-X-C MOTIF) LIGAND 12
- **CXCR4** : CHEMOKINE (C-X-C MOTIF) RECEPTOR 4
- **DBL** : DIFFUSE B-CELL LYMPHOMA
- DCC : DELETED IN COLORECTAL CARCINOMA
- **DDX60** : DEAD (ASP-GLU-ALA-ASP) BOX POLYPEPTIDE 60A
- DH : DBL-HOMOLOGY
- DHR : DOCK-HOMOLOGY REGION
- DHX58 : DEXH (ASP-GLU-X-HIS) BOX POLYPEPTIDE 58
- **DOCK** : DEDICATOR OF CYTOKINESIS
- **DSG1C** : DESMOGLEIN 1 GAMMA
- **DUF** : DUMBFOUNDED
- E: Embryonic day
- EHD2 : EH-DOMAIN CONTAINING 2
- **EGF** : EPIDERMAL GROWTH FACTOR
- EGFRvIII: EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR VARIANT III
- **ELMO** : ENGULFMENT AND CELL MOTILITY

ER : ESTROGEN RECEPTOR

- **ES** : Embryonic stem
- ESR1 : ESTROGEN RECEPTOR 1 (ALPHA)
- FAK : FOCAL ADHESION KINASE
- FARP1 :FERM, RHOGEF (ARHGEF) AND PLECKSTRIN DOMAIN PROTEIN 1
(CHONDROCYTE-DERIVED)
- FBLN5 : FIBULIN 5
- FBS : Fetal bovine serum
- **FCM** : Fusion competent myoblasts
- FLX : Flox allele
- FM : Founder myoblast
- FuRMAS : Fusion-Restricted-Myogenic-Adhesive-Structure
- **GAP** : GTPase Activating Protein
- **GBP3** : GUANYLATE BINDING PROTEIN 3
- **GBP7** : GUANYLATE BINDING PROTEIN 7
- GDI : Guanine nucleotide dissociation Inhibitor
- **GDP** : Guanosine diphosphate
- **GEF** : Guanine nucleotide exchange factors
- **GO** : Gene ontology
- **GPCR**: G Protein-coupled receptor
- **GSK3β** : GLYCOGEN SYNTHASE KINASE 3 BETA
- **GTP** : Guanosine triphosphate
- H&E : Hematoxylin and eosin
- **HEK** : Human embryonic kidney

- HER1 : EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR 1
- HER2 : V-ERB-B2 ERYTHROBLASTIC LEUKEMIA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 2, NEURO/GLIOBLASTOMA DERIVED ONCOGENE HOMOLOG (HUMAN)
- HER3: V-ERB-B2 ERYTHROBLASTIC LEUKEMIA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 3, NEURO/GLIOBLASTOMA DERIVED ONCOGENE HOMOLOG (HUMAN)
- HER4: V-ERB-A ERYTHROBLASTIC LEUKEMAIA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 4, NEURO/GLIOBLASTOMA DERIVED ONCOGENE HOMOLOG (HUMAN)
- HERC6: HECT DOMAIN AND RLD 6
- HBS : HIBRIS
- **HGF** : HEPATOCYTE GROWTH FACTOR
- HRG : HEREGULIN
- IHC : Immunohistochemistry
- **IFIH1** : INTERFERON-INDUCED WITH HELICASE C DOMAIN 1
- IFI272IA : INTERFERON, ALPHA-INDUCIBLE PROTEIN 27 LIKE 2A
- IFI44 : INTERFERON-INDUCED PROTEIN 44
- IFI47 : INTERFERON GAMMA INDUCIBLE PROTEIN 47
- IKK : INHIBITOR OF KAPPAB KINASE
- IL-4 : INTERLEUKIN-4
- **INF**: INTERFERON
- **INM** : Interkinetic nuclear migration
- ITG : INTEGRIN
- **IRES** : INTERNAL RIBOSOME ENTRY SITE

- **IRF9**: INTERFERON REGULATORY FACTOR 9
- **IRGM1**: IMMUNITY-RELATED GTPASE FAMILY M MEMBER 1
- **IRRE-C** : IRREGULAR-CHIASM-C
- ISG15 : ISG15 UBIQUITIN-LIKE MODIFIER
- KIRRE : KIN OF IRRE
- KIRREL : KIN OF IRRE LIKE
- KO: Knock-out
- LALBA : LACTALBUMIN, ALPHA
- LARG : RHO GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR (GEF) 12
- LBX1 : LADYBIRD HOMEOBOX 1
- LGALS3BP : LECTIN, GALACTOSIDE-BINDING, SOLUBLE, 3 BINDING PROTEIN
- LGALS9 : LECTIN, GALACTOSE BINDING, SOLUBLE 9
- LTR : Long terminal repeat
- MBC : MYOBLAST CITY
- MHC : MYOSIN HEAVY CHAIN
- **MIN** : Mammary intraepithelial neoplastic lesions
- MLC : MYOSIN LIGHT CHAIN
- MMP12 : MATRIX METALLOPEPTIDASE 12
- MMTV : MOUSE MAMMARY TUMOR VIRUS
- MRF4 : MUSCLE-SPECIFIC REGULATORY FACTOR 4
- MX1 : MYXOVIRUS (INFLUENZA VIRUS) RESISTANCE 1
- **MX2** : MYOVIRUS (INFLUENZA VIRUS) RESISTANCE 2
- MYF5 : MYOGENIC FACTOR 5
- **MYOD** : MYOGENIC DIFFERENTIATION

- NCK2 : NCK ADAPTOR PROTEIN 2
- NEPH1 : NEPHRIN-LIKE PROTEIN 1
- **NEPH2** : NEPHRIN-LIKE PROTEIN 2
- **NEPH3** : NEPHRIN-LIKE PROTEIN 3
- **NEU**: V-ERB-B2 ERYTHROBLASTIC LEUKEMIA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 2 (RAT)
- **NFATC2** : NUCLEAR FACTOR OF ACTIVATED T CELLS, CYTOPLASMIC, CALCINEURIN DEPENDENT 2
- NF-KB : NUCLEAR FACTOR OF KAPPA-B
- NIC : NEUNDL2-5-IRES-CRE
- NMuMG : Normal murine mammary gland epithelial cell
- **OAS1A** : 2'-5' OLIGOADENYLATE SYNTHETASE 1A
- **OAS1B** : 2'-5' OLIGOADENYLATE SYNTHETASE 1B
- **OAS2** : 2'-5' OLIGOADYNYLATE SYNTHETASE 2
- **OBSL1** : OBSCURIN-LIKE 1
- PARP12 : POLY (ADP-RIBOSE) POLYMERASE FAMILY, MEMBER 12
- PARP14 : POLY (ADP-RIBOSE) POLYMERASE FAMILY, MEMBER 14
- PAX3 : PAIRED BOX GENE 3
- PAX7 : PAIRED BOX GENE 7
- **PBS** : Phosphate buffer saline
- **PCR** : Polymerase chain reaction
- **PDGF** : PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR
- **PFA** : Paraformaldehyde
- **PGF** : PLACENTAL GROWTH FACTOR

PGI2 : PROSTACYCLIN

- PH : Pleckstrin Homology
- PI3K : PHOPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE
- **PIP₃**: PHOSPHATIDYLINOSITOL 3,4,5-TRIPHOSPHATES
- **PSMB8** : PROTEASOME (PROSOME, MACROPAIN) SUBUNIT, BETA TYPE, 8 (LARGE MULTIFUNCTIONAL PEPTIDASE 7)
- P-REX : PHOSPHATIDYLINOSITOL-3,4,5-TRIPHOSPHATE-DEPENDENT RAC EXCHANGE FACTOR 2

p190RHOGEF : Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 28

- **PS**: PHOSPHATIDYLSERINE
- **RAC** : RAS-RELATED C3 BOTULINUM TOXIN SUBSTRATE 1
- RAS : RAT SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG
- **RHO** : RAS-LIKE GTP-BINDING PROTEIN RHO
- RHOA : RAS HOMOLOG FAMILY MEMBER A
- **RHOG** : RAS HOMOLOGY GROWTH-RELATED
- **RGC** : Radial glial cells
- **RNA** : RIBONUCLEIC ACID
- **ROLS** : ROLLING PEBBLES
- **RPL34** : RIBOSOMAL PROTEIN L34
- **RST** : ROUGHEST
- **RSAD2** : RADICAL S-ADENOSYL METHIONINE DOMAIN CONTAINING 2
- **RTK** : Receptor tyrosine kinase
- **RTP4** : RECEPTOR (CHEMOSENSORY) TRANSPORTER PROTEIN 4
- SH3 : SRC-HOMOLOGY DOMAIN 3

- SING : SINGLE-BAR
- SLFN2 : SCHLAFEN 2
- SLFN8 : SCHLAFEN 8
- SMOC1 : SPARC RELATED MODULAR CALCIUM BINDING 1
- **SNS** : STICKS AND STONES
- **SOS**1 : SON OF SEVENLESS HOMOLOG 1 (DROSOPHILA)
- **SPF** : Specific pathogen Free
- SRC : V-SARCOMA (SCHMIDT-RUPPIN A-2) VIRAL ONCOGENE HOMOLOG
- **STAT1** : SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION 1
- **STAT3** : SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION 3 (ACUTE-PHASE RESPONSE FACTOR)
- TACC3 : TRANSFORMING, ACIDIC COILED-COIL CONTAINING PROTEIN 3
- TARG : Targeted
- **TEB** : Terminal end bud
- TIAM1 : T CELL LYMPHOMA INVASION AND METASTASIS 1
- TRIO : TRIO RHO GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR
- UBA7 : UBIQUITIN-LIKE MODIFIER ACTIVATING ENZYME 7
- UNC5B : UNC-5 HOMOLOG B
- **UPAR** : UROKINASE PLASMINOGEN ACTIVATOR RECPTOR
- USP18 : UBIQUITIN SPECIFIC PEPTIDASE 18
- VASP : VASODILATOR-STIMULATED PHOSPHOPROTEIN
- **VEGF** : VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR
- VZ : Ventricular zone

- **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,

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont participé à ce travail.

Je tiens plus particulièrement à remercier mon directeur de recherche Dr Jean-François Côté pour son soutien tout au long de ma thèse de doctorat. Je le remercie d'avoir été un aussi bon mentor et d'avoir su transmettre sa rigueur, son enthousiasme, son ouverture et sa passion pour la recherche académique. Je le remercie pour son acharnement à travailler constamment de façon à créer les meilleures opportunités pour chacun de ses étudiants. Merci JF pour ta patience, pour ton écoute, et ta persévérance à faire sortir le meilleur de moi-même, même quand disons-le je n'y croyais pas de mon côté!

Je souhaite aussi à remercier les membres de mon comité de doctorat; Dr Jean Vacher, Dr David Hipfner et Dr Paul Holland. Ils m'ont aidé à développer mon esprit critique et je suis reconnaissante pour leurs recommandations qui mon permis de progresser dans mes différents projets de recherche. J'aimerais aussi remercier les membres de mon comité de thèse pour avoir accepté de juger et critiquer ce manuscrit.

Je tiens à remercier nos collaborateurs, Dr Anne Blangy et Dr Allan Hall pour leur support lors du projet de recherche sur le rôle de DOCK1 dans la fusion des myoblastes. Je remercie aussi nos collaborateurs, Dr Morag Park, Dr William Muller, Dr Benjamin Haibe-Kains et Dr Yoshinori Fukui pour leur contribution au projet de recherche sur le rôle de DOCK1 dans le cancer du sein.

J'aimerais enfin remercier les membres des plateformes de l'IRCM pour leur aide à la réalisation de ces projets de recherche, plus particulièrement Dominic Filion en microscopie, Annie Vallée, Geneviève Brindle et Dominique Lauzier en histologie et Odile Neyret en biologie moléculaire. Je remercie aussi Suzie Riverin et Claudia Toulouse pour leur aide précieuse à la gestion des colonies de souris.

xxiv

J'aimerais remercier les membres présents et passés du laboratoire Côté pour leur contribution aux différents projets grâce aux discussions, mais aussi et surtout pour avoir su créer et maintenir une super atmosphère de travail.

Merci à Nad, en qui je serai toujours reconnaissante d'avoir été l'instigatrice de mon opportunité à joindre le laboratoire Côté! Merci Nad pour ton aide irremplaçable dans tous mes projets et pour avoir été bien plus qu'une collègue de travail pendant toutes ces années!

Merci à Mani, ma « soul sister »! I can't imagine what those years would have been without you. I have so much to thank you for that I don't know where to start...Thanks for paving the way for me, thanks for understanding my higher level of sarcasm, thanks for the late night choreography, thanks for the hip hop initiation, thanks for your support... This could go on forever so I guess I will finish by saying that I think you were right...you would be Batman!

Merci à Nou, Ari et Jen pour avoir été non seulement des supers collègues de travail, mais pour avoir été de véritables amies! Merci à Nou pour avoir été présente avec son support moral de toutes heures pendant les révisons. Contente miss que nos prédictions se soient révélées fausses! Merci à Ari pour son aide inestimable à la révision du papier et pour être toujours disponible pour discuter de « belle science »! Contente miss que nos vies aient finalement « matchées ». Merci à Jen pour avoir initié d'aussi belle façon le projet de cancer du sein. Contente Jen, que nos vies parallèles se soient finalement croisées! Je vous aime les filles!

Enfin, j'aimerais remercier les membres de l'équipe sportive la plus geek en ville, les PRIMERS Julien, Jen, Stephen, Ludi, Alex, American Steve, Joe, Aurèle, Sarah, Jin, Vas, Max, et Gab. Merci guys pour avoir contribué à ce que je sois aussi heureuse durant cette dernière année de thèse malgré l'intensité du travail, que se soit sur le terrain ou à l'extérieur du terrain pendant une pratique, une retraite, un bbq, un souper ou un show! Un merci particulier à Jules et Alex pour leur dévouement à tenter de nous expliquer comment faire un stack vertical, une cut et un flick qui ont de l'allure! PRIMERS HYBRIDIZE, PRIMERS AMPLIFY...GOOO PRIMERS!

XXV

Je remercie aussi les membres du club de la petite cuillère, Marie, Damien et MiniJen pour nos cafés du vendredi. Toujours agréable de débuter 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 patiente 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

Insights into the biological functions of DOCK GEFs from *in vivo* studies

Mélanie Laurin^{1,2} and Jean-François Côté¹⁻⁴

¹Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, QC, Canada H2W 1R7.

²Département de Médecine (Programmes de Biologie Moléculaire), Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H3T 1J4.

³Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H3T 1J4. ⁴Division of Experimental Medicine, McGill University, Montréal, QC, Canada H3A 1A3.

Short Title: Biological functions of DOCK GEFs

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.

Rho GTPases' regulation and signaling

Rho proteins represent 22 members within the Ras superfamily of small GTPases. By orchestrating cytoskeleton remodeling, these molecular switches regulate numerous processes throughout embryonic development including axon guidance, migration of hematopoietic cells and fusion of myoblasts (1-3). Rho proteins are also implicated in diseases such as cancer progression where their abnormal regulation contributes to the ability of tumor cells to escape the primary tumor to form life-threatening metastases (4). Rho proteins continuously switch between inactive (GDP-bound) and active (GTP-bound) conformations; three groups of proteins tightly coordinate the cycling states of these GTPases. GTPase-activating proteins (GAPs) and Rho guanine nucleotide-dissociation inhibitors act as negative regulators by promoting their intrinsic GTPase activity or sequester them in the cytoplasm, respectively. The guanine nucleotide exchange factors (GEFs), which can be divided into Dbl and Dock subfamilies, act as positive regulators by mediating GDP to GTP exchange on Rho GTPases to ultimately promote their binding to specific effectors pathways (5). Dockrelated GEFs form an 11 member subfamily in mammals. Dock1, initially named Dock180, is the prototypical member of this family and was originally identified as a binding partner to the adaptor protein Crk (6). From that point, the name Dock180 was used to designate this "<u>180kDa protein Downstream of Crk</u>. However, the literature was since modified so that "Dock" now stands for "Dedicator of cytokinesis". This revision still remains obscure and unexplained in the field especially since no evidence suggests so far that Dock180 regulates cytokinesis. Members of the Dock subfamily of GEFs are characterized by the presence of two evolutionarily conserved Dock Homology Region (DHR) domains: the lipid-binding DHR-1 and the GEF DHR-2 modules. Members of this family can be further classified into 4 subgroups that each differ in their composition of additional protein domains and their specificity toward Rac or Cdc42 GTPases (Figure 1.1.1 page 8). In particular, novel regulatory phosphorylation sites and the Phosphatidic Acid-binding domain play key roles in spatio-temporal activation of these GEFs (Figure 1.1.1 page 8 and Figure 1.1.2 page 9). We discuss the substantial progress made in the understanding of the

6

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.I 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.



Figure 1.1.1 Dock GEF Family

Dock proteins, subdivided into four subfamilies, are characterized by the evolutionarily conserved Dock Homology Region (DHR)-1, mediating binding to PIP₃, and DHR-2, encompassing the GEF activity towards Rac/Cdc42 GTPases (8). The N-terminus of Dock-A/B GEFs, including a SH3 domain, mediates their interaction with Elmo scaffolding proteins, while the C-terminal PxxP region coordinates interactions with SH3-containing adaptor proteins, such as Crk and Grb2 (8). Dock-D members have a N-terminal localized PH domain involved in phosphoinositides binding for membrane translocation (9, 10). Several studies have identified that Dock GEFs are post-translationally modified by kinases and phosphatases. Of *in vivo* relevance, phosphorylation of DOCK1 (D1) on Y⁷²², Y¹⁸¹¹ or S¹²⁵⁰ increases its GEF activity towards RAC and is elevated in brain cancers (11-13). Akt binds to Dock6 (D6) and phosphorylates its S¹¹⁹⁴ and inhibits by this means its GEF activity; while binding of Dock6 to the phosphatase Pp2a counteracts this inhibition (14).



Dock2 PBR binds to phosphatidic acid lipid (PA)

Figure 1.1.2 Structural basis of Dock GEF activity, localization and signaling.

The DHR-1 domain of Dock GEFs facilitates their recruitment at the membrane downstream of PI3-Kinase signaling by directly binding to PIP, A polybasic region (PBR, see Figure 1) was also identified in Dock1 and Dock2 and suspected to bind PIP, but recent advances instead suggest that it bind the signaling lipid phosphatidic acid lipid (PA). What is the role and biological relevance of this second lipid-binding activity? (A) Insight into this came from analyzing the cytokine-induced temporal production of these lipids in neutrophils. These studies disclosed that PIP, is produced early following stimulation while PA production peaked later. Dock2 is critical for migration and its rapid and broad recruitment at the membrane where cytokine receptors are getting activated is mediated by a direct DHR-1/PIP, interaction. Neutrophil polarization is next dependent on Phospholipase-D-dependent production of PA that serves to narrow the recruitment of Dock2 to the pseudopod via the PBR (15). It is therefore through such sequential lipid-binding events that Dock2 is ideally positioned to promote polarized neutrophil migration. (B) In fibroblasts, activation of PDFG receptor by its ligand promotes both peripheral membrane ruffles and dorsal ruffles, the later being dependent on the production of PA. PDGF treatment promotes a rapid PIP₃-dependant recruitment of both Dock1 and Dock5 at the membrane to activate Rac and promote peripheral ruffles. PA, again produced sequentially to PIP,, narrows the localization of Dock1, but not Dock5 that does not contain a PBR, in the membrane to generate the characteristic PDGFinduced dorsal ruffles via Rac activation (16). It is therefore through such sequential lipid-binding events that Dock1 and Dock2 are ideally positioned in specialized membranes to promote polarized cytoskeletal dynamics. (C) The molecular basis of DOCK-mediated Rho proteins activation remained elusive until structural studies identified a novel mechanism exploiting a nucleotide sensor region in the DHR-2 of DOCK2, DOCK8 and DOCK9 that promotes the release of GDP. Crystal structures revealed that the DHR-2 folds in three lobes and Lobe B and Lobe C are important for activity and binding to the target GTPase. (i) GTPases tightly bind nucleotide and the Switch 1 region directly coordinates a magnesium molecule bound to GDP. (ii) Upon contact with a DOCK GEF, an a10 helix insert in the Lobe C of the DHR-2 domain (green), characterized by a conserved valine residue, mediates Mg++ exclusion while the Lobe B displaces the Switch 1 region to contribute to GDP release and exposing the nucleotide-binding site. These interactions also disturb interactions of the GTPase P-loop with the nucleotide to facilitate nucleotide release. (iii) Binding of GTP, and its interaction with Mg++, induces conformation changes that uncouple the GEF from the GTPase (17-19).



Figure 1.1.3 Elmo scaffolds: spatio-temporal orchestrators of Dock-mediated Rac activation

Elmo proteins are established Dock-A/B binding partners (Figure 1.1.1). Although interaction between Docks and Elmos is not essential for Rac activation per se, complex formation is mandatory to achieve cytoskeleton remodeling (10). Recent studies highlight the key role played by Elmo in positioning Dock1 to discrete area of the cells to allow for Rac activation in a polarized fashion post cell stimulation. (A) At basal level. Elmo and Dock1 are proposed to be autoinhibited by intramolecular interactions between Elmo EID and EAD domains and between Dock SH3 and DHR-2 domains (20-22). While Elmo and Dock1 are believed to be in a constitutive complex in cells, it remains unclear whether other Dock-A/B members are pre-bound or rather exist as single molecules at basal state. Further studies will be essential to clarify the dynamic of the interaction between Elmos and Dock-A/B members. Cell stimulation may sequentially release the autoinhibition constraints on Elmo followed by activation of Dock1 and Rac signaling (20). In contrast, Elmo and Dock2 may exist as individual proteins that enter in complex poststimulation. Formation of a complex is proposed to directly and mutually relieve both proteins from their inhibited state (22). Finally, another level of complexity is added through the ability of Dock proteins to homo- or hetero-dimerize by their DHR-2 (20). (B) Upon cell stimulation, the recruitment of Elmo/Dock1 complex at the membrane can be more precisely guided by Elmo's repertoire of interacting proteins. Engagement of RhoG or Arl4A to Elmo's Ras-Binding Domain (RBD) contributes to both the relief of Elmo autoinhibition and promotes positioning of Elmo/Dock1 proteins at the membrane for Rac-dependent cytoskeleton reorganization (21, 23). Elmo also directly interacts with the microtubule- and actin-binding spectraplakin Acf7 (24). Upon integrin stimulation, cells expressing Elmo and Acf7 formed long and persistent membrane protrusions. Mechanistically, Elmo is required for Acf7 ability to capture and stabilize the microtubule network at the cell cortex during integrin-mediated cell spreading (24). Recruitment of Elmo at the membrane was also observed via activation of the GPCR Cxcr4 by the cytokine Cxcl12. In this system, the released G protein G α i2 directly bound Elmo and promoted Rac activation and cell invasion (25). The importance of Elmo/Dock1/Rac signaling downstream of this prometastatic cytokine during breast cancer progression will warrant full investigation.
	Gene	Species	Model	Phenotype	References
Dock-A	Dock1	Chicken	electroporation siRNA	- Commissural axons projections defect	Li & al. 2008
	Dock1	Zebrafish	Morpholino	- Myoblast fusion defect	Moore & al. 2007
	Dock1	Mouse	Classical Knockout	- Myoblast fusion defect - Cardiovascular defect	Laurin & al. 2008 Sanematsu & al. 2010
	Dock1	Mouse	dSH3 Conditional Knockout	 Myoblast fusion defect Cardiovascular developmental defect 	Sanematsu & al. 2010
	Dock1	Mouse	Conditional Knockout	- Reduced growth and metastasis	Laurin & al. 2013
	Dock2	Mouse	Classical Knockout	- T and B cells migration defect	Fukui & al. 2001
	Dock2	Mouse	GFP Knockin	- Express GFP from endogenous locus	Kunisaki & al. 2006
	Dock5	Zebrafish	Morpholino	- Myoblast fusion defect	Moore & al. 2007
	Dock5	Mouse	Gene trap	- Myoblast fusion defect - Bone resorption defect	Laurin & al. 2008 Vives & al. 2011
	Dock5	Mouse	RLC spontaneous mutant	- Rupture of lens cataract	Omi & al. 2008
Dock-B	Dock3	Mouse	Classical knockout	- Axonal degeneration causing sensorimotor impairments	Chen & al. 2009
	Dock3	Mouse	Transgenic	- Enhanced opitic nerve regeneration after injury	Namekata & al. 2010
	Dock4	No model	-	-	-
Dock-C	Dock6	Mouse	shRNA transgenic	- Axon extension defect by dorsal root ganglion neuron	Miyamoto & al., 2013
	Dock7	Mouse	misty spontanous mutant	- Hypopigmentation and white-spotting	Blasius & al. 2009
	Dock7	Mouse	moonlight spontanous mutant	- Hypopigmentation and white-spotting	Blasius & al. 2009
	Dock7	Mouse	shRNA transgenic	- Enhanced myelin thickness in sciatic nerves	Yamauchi & al. 2011
	Dock7	Mouse	in utero shRNA delivery in utero overexpression	 Neuronal differentiation defects Increased neuronal differentiation 	Yang & al. 2012
	Dock8	Mouse	Classical knockout	- Dendritic cell migration defect	Harada & al. 2012
Dock-D	Dock9	No model	-	-	-
	Dock10	No model	-	-	-
	Dock11	No model -		-	-
Elmo	Elmo1	Mouse	Conditional knockout	 Cell clearance defect by Sertoli cells Cell clearance defect by neuronal precursors 	Elliot & al. 2010 Lu & al. 2010
	Elmo2	No model	-	-	-
	Elmo3	No model -		-	-

Table 1.I In vivo models of Dock GEFs

Dock GEFs in development

Rho GTPases are viewed as essential molecular intermediates during development, yet the full impact of their upstream regulation through GEFs is only starting to be appreciated (26). Genetic screens in *C. elegans* and *Drosophila* shed light on the potential functions of Dock GEFs in mammals during development by regulating cell migration, myogenesis and clearance of apoptotic cells (8). Recent studies, summarized in Table 1.I (**Table 1.I page 11**), have moved away from cell culture models and focused on various vertebrate *in vivo* models to explore the biological functions of Dock GEFs. In this section, we focus on emerging functions of Docks in development.

Dock1 and Elmo1 contribute to cardiovascular development.

The chemokine Cxcl12 and its receptor Cxcr4, a member of the G-Protein Coupled Receptors (GPCRs) family, provide an important homing signal during the migration of endothelial progenitors, but the effector pathways involved in this system have remained elusive (27, 28). Characterization of two independent mutant mice revealed an essential role for Dock1 downstream of Cxcr4 during cardiovascular development (29) (Table 1.1 page 11). Inactivation of *Dock1* was lethal at birth and mutant mice displayed severe edema as a consequence of multiple cardiac abnormalities (27, 29). When *Dock1*-mutant hearts were explanted, endothelial cells failed to invade matrigel despite their ability to undergo epithelial to mesenchymal transition suggesting a key function for this GEF in migration. Rac activation, cytoskeletal changes and cell migration in *Dock1*-mutant explanted endothelial cells were impaired following treatment with Cxcl12, but interestingly not with Vegf, demonstrating a central signaling role for Dock1 downstream of Cxcr4 (29). While a role for Dock1 orthologs in migration is well established in lower organisms, these mouse studies were the first to uncover that Dock1 contributes in vivo to cell migration in mammals. It will be important to address how Dock1 molecularly connects to Cxcr4 receptor activation (Figure 1.1.4 page 13). Furthermore, as Cxcr4 is implicated in a plethora of



Figure 1.1.4 The role of Dock GEFs in development

(A) Dock1 is required downstream of Cxcl12-mediated activation of Cxcr4 to promote Rac activation and induce migration of endothelial progenitors. How the Elmo1/Dock1/Rac complex is coupled to Cxcr4 signaling remains to be determined. (B) Bai1's ability to recognize apoptotic cells and interact with Elmo is proposed to trigger signaling that favors the fusion of myoblasts in order to help regenerate injured muscle tissue. (C) Bai3 is expressed by myoblasts and is essential for myoblast fusion. Activation of Bai3 through a yet to be determined mechanism and its interaction with Elmo is required for myoblast fusion. (D) In osteoclasts, Dock5 was shown to be essential dowstream of Integrin $\alpha \nu \beta 3$ signaling to promote p130Cas phosphorylation and Rac activation, which is essential for the formation and maturation of the sealing zone.

developmental processes and diseases, it is possible that Dock1 contributes to other aspects of Cxcr4 signaling. Additional pathways provide guidance during vascular development (30). Among them, Netrin and its receptor Unc5B, promote the migration of endothelial cell progenitors through Rac activation (30, 31). In a zebrafish model, silencing *dock1* or *elmo1* robustly impaired Rac activation and ultimately vasculature development (31). Since Rac1 is critical for vascular development in mice, investigating the function of Elmo and Dock1 in Netrin-induced cardiac progenitor migration may reveal new pathways regulating this process (32). Collectively, these studies revealed specificity in the requirement of Elmo/Dock1 signaling downstream of different pro-migratory receptors to mediate Rac1 activation and migration of endothelial cells. A deeper characterization of the signaling pathway involved in developmental angiogenesis might also provide a better understanding of how these pathways could contribute to cancer progression by regulating tumor vascularisation.

Dock1 regulates Rac in the neuronal growth cone: from attraction to repulsion

Axon guidance is critical in brain development and deregulation of this process can have serious implications in mental diseases (33). Netrin, a classical guidance cue, acts via the receptor Dcc to induce Rac- and Cdc42-dependent attraction of commissural axons towards the neural tube floor plate (34, 35). Dock1 was shown to colocalize with Dcc in the growth cone following treatment with Netrin *in vitro* (**Figure 1.1.5 page 15**). Loss-of-function of *Dock1* demonstrated the important role of this GEF in Netrin-induced Rac activation leading to impaired axon outgrowth and abnormal commissural axons reorientation towards the guidance factor. These cell-based experiments hold true *in vivo* as electroporation of a siRNA targeting *DOCK1* in the developing chicken neural tube caused misguidance of commissural axons (**Table 1.1 page 11**). These data provided a long-sought mechanism to connect Dcc activation to Rac-mediated axon outgrowth and attraction towards Netrin. In contrast to Netrin/Dcc endorsed attraction, Ephrin-B3 favor hippocampal axonal repulsion (36). In this case, the adaptor protein Nck2 connects Ephrin-B3 to Dock1 to induce axon pruning (**Figure 1.1.5 page 15**).



Figure 1.1.5 Docks in neurogenesis

(A) In commissural neurons, Dock1 mediates Rac activation and promotes reorientation of the growth cone following activation of Dcc by the presence of a Netrin-1 gradient at the floor plate. (B) In the hippocampus, Ephrin-B3 mediates fiber axon pruning. After their engagement to their receptor, Ephrin-B3 molecules become phosphorylated and recruit the adaptor protein Nck2. Nck2 is essential to relocalize Dock1 to the membrane and induce Rac activation to promote repulsions of the axon. (C) In hippocampal neurons, TrkB activation by BDNF recruits Dock3 to the membrane in a Fyn kinase-dependent manner. Recruitment of Dock3 to the receptor is essential to promote Rac-dependent BDNF-induced axon outgrowth. Dock3 also directly binds WAVE1 through its DHR-1 domain to induce actin remodeling. Dock3 regulates the microtubule network through its interaction with GSK3 β and facilitates the phosphorylation of the kinase on an inhibitory site. Inhibition of GSK3 β leads to the dephosphorylation of CRMP-2 and allows for microtubule elongation and axonal growth. (D) At early developmental stages, Dock6 is found in complex with PP2A via its binding to the DHR-2 domain. This interaction prevents phosphorylation of Dock6 on Ser¹¹⁹⁴ by Akt and allows axon growth. At later developmental stages, the abundance of Akt increases. Akt interacts with Dock6 DHR-1 domain and phosphorylates it to prevent axon growth. (E) During cell cycle progression, the INM of RGCs along the apical to basal axis contributes to cell fate decision after division. Dock7, via its binding to Tacc3, regulates the speed of INM (left). Downregulation of Dock7 expression accelerates the baso-lateral to apical INM and leads to the proliferation of the radial glial progenitor (RGC) pool at the expense of a reduction in the number of basal progenitors (right).

While these studies exploited *in vivo* and *in vitro* models, it remains unknown whether commissural and hippocampal axons are misguided in *Dock1-null* mice. Could abnormal DOCK1 and RAC signaling be at the base of some neuronal defects and mental illness? Future behavioral studies might shed light on the importance of this pathway in brain development.

Dock3 integrates actin and microtubule dynamics to promote axon outgrowth

Expression of *Dock3* is largely restricted to neuronal tissues hinting towards a role for this GEF in brain development (37). Interestingly, transgenic animals overexpressing Dock3 repaired injured optic nerves more effectively than control animals suggesting an essential contribution by *Dock3* in axonal growth (38) (Table 1.1 page 11). In hippocampal neurons, activation of TrkB receptor tyrosine kinase by its ligand brainderived neurotrophic factor (BDNF) promoted Rac activation via the recruitment of Dock3 to the membrane in a Fyn kinase-dependent manner for axonal growth (38) (Figure 1.1.5 page 15). Dock3 also directly regulates actin remodeling following BDNF stimulation by recruiting the actin nucleation-promoting factor WAVE1 through its DHR-1 domain (Figure 1.1.5 page 15). Whether the sole function of the DHR-1 of Dock3 is to bind WAVE1 or if it additionally serves a membrane recruitment function through PIP₃-binding was not investigated. Dock3 was also shown to impact the microtubule network via an interaction with Gsk3ß, a broad action kinase that is important in microtubule dynamics, which facilitates the phosphorylation of the kinase at an inhibitory site (39). Consequently, this sequestering and inhibition of Gsk3ß upon BDNF treatment lead to the dephosphorylation of CRMP-2 and allowed this protein to promote microtubule elongation and axonal growth (Figure 1.1.5 page 15). Further studies will be needed to fully understand the molecular mechanisms downstream of Dock3 that orchestrate crosstalk between the actin and microtubule cytoskeletons during axonal growth. The impact of Dock GEFs on the microtubules is also emerging from various studies and will need to be further investigated (Figure 1.1.3 page 10 and Figure 1.1.5 page 15). While overexpression of Dock3 in mice promoted axonal growth during regeneration, knock-out animals displayed axonal degeneration and impaired sensorimotor functions (40) (**Table 1.I page 11**). *In vivo*, Dock3 was shown to control the activation of LIM kinase, and therefore, the phosphorylation of its target, cofilin. Reduced activation of the kinase was proposed to induce axonal dystrophy characterized by the accumulation of organelles, autophagic vacuoles and disorganized cytoskeletons (40). Pharmacological treatments aimed to increase DOCK3 signaling could be of therapeutic benefit for patients requiring axonal regeneration.

Tug of war between Akt and PP2: activation of Rac by Dock6 is controlled by phosphorylation during axonal outgrowth

The expression of *Dock6* in dorsal root ganglions *in vivo* prompted for studies on its potential role in axon extension (14). Transgenic mice expressing shRNAs specific to *Dock6 in vivo* showed a reduction in the length of peripheral axons at embryonic day 11 and also failed to form neuronal fibers extension in an injury model in vivo (14) (**Table 1.I page 11**). In agreement with *in vivo* observations, downregulation of Dock6 expression in dorsal root ganglion explants impaired axon outgrowth and the number of side branching. Likewise, knockdown of Rac decreased both the number of axons and branch points while Cdc42 knockdown only affected branching. These finding were in agreement with biochemical data suggesting that Dock6 is a Rac GEF in this system. At developmental stages when axons are growing, Dock6 is initially unphosphorylated and gradually becomes phosphorylated on Ser¹¹⁹⁴ and biochemical studies highlighted a GEF inhibitory function for this modification. In search for regulators of Dock6 phosphorylation, Akt was identified as a binding partner of the DHR-1 and was shown to directly phosphorylate Ser¹¹⁹⁴; in contrast, the phosphatase Pp2a interacted with the DHR-2 and was dephosphorylating this site (Figure 1.1.5 **page 15**). Accordingly, Dock6 was found in complex with Pp2a at early developmental stages when low levels of Akt are present in dorsal root ganglion neurons, while high Akt expression and binding to Dock6 correlated with Dock6 phosphorylation at later time points when the axons had completed their migration. This work is the first in vivo model describing complicity between a kinase and a

phosphatase in the regulation of a Dock family member and is likely to emerge as an important mechanism in the regulation of other Dock GEFs.

Dock7 regulates pigmentation and metabolism

Two independent spontaneous mouse mutant lines, *misty* and *moonlight* (**Table 1.I page 11**), display a similar hypo-pigmented and white-spotted phenotype owing to genomic deletions in the *Dock7* locus. Both mutations generate truncations in Dock7 that produce proteins lacking GEF activity (41). Surprisingly, the cellular and molecular basis for hypo-pigmentation have not yet been addressed in these models; an attractive hypothesis would be that Dock7 is involved in melanocytes development and migration. Further analyses of the *misty* mouse suggest that Dock7 could also be a critical regulator of bone remodeling and brown fat functions. Could these phenotypes be due to truncated proteins acting as dominant negatives or do they represent real biological processes regulated by Dock7? Clean mouse genetics would provide important insight into these questions.

GEF-independent functions of Dock7 in neurogenesis: controling interkinetic nuclear migration

Dock7 is highly expressed in the developing brain. Via its ability to regulate Racdependent microtubule dynamics through Stathmin phosphorylation, Dock7 contributes to the important decision facing a hippocampal neuron in dedicating one of its neurites to become an axon (8, 42). An additional important issue in neurogenesis is to address the molecular mechanisms orchestrating progenitor selfrenewal versus differentiation. Dock7 is expressed in apical progenitors of the ventricular zone (VZ) and elegant mouse *in utero* electroporations of these cells were conducted to address its role in neurogenesis (43) (**Table 1.1 page 11**). Knockdown of Dock7 led to proliferation of the radial glial progenitor (RGC) pool at the expense of reduced number of basal progenitors; conversely, ectopic expression of Dock7 forced their differentiation (**Figure 1.1.5 page 15**). During cell cycle progression, the movement of RGCs nucleus along the apical to basal axis, a process termed interkinetic nuclear migration (INM), is emerging as an important mechanism in cell fate decision (44). In agreement with the phenotypes described above, downregulation of Dock7 accelerated the baso-lateral to apical INM, whereas its ectopic expression decreased this transition. Surprisingly, structure/function assays uncovered that Dock7 functions in a Rac-independent manner in this context. To this date, Dock7 is the only Dock GEFs reported to have GEF independent role in cells. Instead, Dock7 directly interacts with Tacc3 to promote microtubule growth between the centrosome and the nucleus providing a molecular explanation for the regulation of INM (**Figure 1.1.5 page 15**). By influencing RGCs INM, Dock7 could be a key protein involved in cell fate decision during neurogenesis. Surprisingly, *misty* and *moonlight* mice did not display abnormal neurological behaviors and more detailed analyses are therefore required to investigate if neurogenesis is altered in these models.

Unraveling the role of the Dock1 pathway in myoblast fusion

Successive rounds of myoblast fusion govern the formation of primary muscle fibers, yet this process is poorly understood at the molecular level in vertebrates (45). Genetic screens in *Drosophila* were instrumental to uncover cytoskeleton regulators, including *myoblast city* (ortholog of *Dock1*) and Rac, which control the fusion steps (45). Mutant mice for *Dock1* and *Rac1* were generated to address whether this pathway plays a universal role in myoblast fusion. *Dock1* mutants died at birth and are characterized by a strong block in primary myoblast fusion both *in vivo* and *ex vivo* (46) (**Table 1.1 page 11**). Likewise, muscle-specific inactivation of *Rac1*, and also *Cdc42*, severely impaired myoblast fusion *in vivo* (47). Mechanistically, both *Rac1* and *Cdc42*-null myoblasts were able to form cell:cell interactions, but the recruitment of F-actin, Vinculin and Vasp at the sites of contact was impaired (47). Identification of direct targets of Rac and precise understanding of actin dynamics is necessary to explain this unique fusion event. How is fusion triggered *in vivo*? Two receptors, Bai1 and Bai3, were reported to promote myoblast fusion by engaging the Dock1/Rac

pathway through an interaction with Elmo (48) (Figure 1.1.4 page 13). Downregulation of Bai3 expressed by C2C12 myoblasts completely blocked fusion; and this phenotype could be rescued by re-expression of wildtype Bai3 but not by mutants unable to engage Elmo. In agreement with these data, uncoupling Bai3-Elmo interactions *in vivo* in muscle progenitors of chicken embryos prevented myoblast fusion. Furthermore, Bai1 was shown to promote apoptotic cell engulfment through the Elmo/Dock1 pathway (Figure 1.1.6 page 21) and its overexpression endorsed fusion in C2C12 myoblasts in an Elmo-dependent manner (49). Mice lacking *Bai1* had smaller muscle fibers and were less efficient at repairing injured muscle tissue. As regeneration is likely to involve cell death, apoptotic cells themselves have been shown to activate Bai1 and promote cell fusion, thus providing a unique mechanism where tissue damage recognition and repair activity are coupled.

Bone resorption: Dock5 promotes osteoclast adhesion

Regulation of bone mass is under the control of osteoblast and osteoclast activities (50). Osteoclasts are multinucleated cells that tightly adhere to bones and are involved in their resorption through the secretion of proteolytic enzymes (50). The bone remodeling activity of osteoclasts is dependent on the proper assembly and disassembly of the sealing zone, an actin-rich ring structure, generated by the association of multiple podosomes (51). In the absence of Dock5 expression, the sealing zone is not established properly and the resorbing activity of *Dock5*-null osteoclast is impaired. Mechanistically, Dock5 was shown to be essential for the generation of this adhesive structure by promoting Integrin $\alpha v\beta 3$ signaling via p130Cas phosphorylation and Rac activity (52) (Figure 1.1.4 page 13). In vivo, *Dock5* mutant mice displayed an increased trabecular bone mass, a characteristic of improper bone resorption (Table 1.1 page 11). Pharmacological targeting of the $\alpha v\beta 3/p130Cac/Dock5$ pathway could represent a novel avenue to counteract the oscteoclastic activity in osteoporosis patients.



Figure 1.1.6 Eliminating apoptotic cells via the Elmo-Dock1-Rac pathway: implications in tissue homeostasis.

During embryogenesis, programmed cell death is essential to remodel tissues or eliminate transitory cells such as in digit formation. Prompt clearance of apoptotic cells is also essential throughout life to prevent cellular leakage that could induce autoimmune reactions (53). Pioneering work by Horvitz and colleagues identified genes in C. elegans that controls apoptotic cell clearance, including the orthologues of Dock1, Elmo and Rac, but whether this signaling module is universal to promote phagocytosis of corpses was not known (54). The "eat-me" signal of apoptotic cells, PtdSer exposed on the outer leaflet of the plasma membrane, facilitates their recognition by phagocytes but the receptors involved in such clearance have remained elusive in vertebrates. The GPCR Bai1 was identified as an Elmo-binding protein and defined as the first bona fide phagocytic receptor by its ability to couple apoptotic cell recognition (PtdSer-binding) to cytoskeletal changes (activation of the Rac pathway) (55). Overexpression of Bai1 in phagocytes increased their ability to uptake apoptotic targets and this activity is dependent both on its PtdSer- and Elmo-binding capacity. Elmo1 knockout animals allowed testing the importance of cell clearance in mammals in vivo (56). During spermatogenesis, Sertoli cells act as nursing cells but also as phagocytes to remove the large amount of nonviable germ cells generated. Elmo1-null mice display defects in the clearance of dying germ cells and their accumulation was accompanied by a disruption in the organization of the seminiferous epithelium and a reduction in sperm count. This study therefore established the importance of promptly removing dying cells for proper development of testes. Likewise, neurons frequently die in adults and how they are removed have remained elusive until recently when Elmo1 was shown to control their clearance. Doublecortin-positive (DCX+) neuronal progenitors act as a new population of non-professional phagocytes that engulfs dying neurons, in a PtdSer-dependent manner, and the inactivation of Elmo1 prevented such clearance resulting in impaired neuronal differentiation (57). These studies shed light on the essential importance of clearing dying cells for tissue homeostasis.

DOCK family in disease

RHO GTPases can contribute to the progression of several pathologies. Notably, elevated levels of Rac activation were shown to promote the progression of proteinuric kidney diseases in mouse models (58, 59). Through their regulation of the cell cytoskeleton RHO GTPase are also key orchestrators of cancer cells ability to invade tissues to form deadly metastasis by promoting an appropriate type of migration (4, 60). Interestingly, signaling by two DOCK GEFs were shown to contribute to the adoption of a specific migration mode by cancer cells (**Figure 1.1.7 page 23**). Since they provide specificity in effector pathway activation, GEFs represent interesting and ideal therapeutic targets to block the exacerbate activity of RHO GTPases. In this section we focus on emerging functions of DOCK GEFs in disease progression.

The Adams-Oliver Syndrome and misregulation of CDC42/RAC: genetic mutations in *DOCK6* and *ARHGAP31* in familial cases

The Adams-Oliver Syndrome (AOS) is an inherited heterogeneous disorder where patients are afflicted with a range of aplasia cutis congenita, terminal transverse limb defects and other varying malformations (61). The genetic basis of the disease was unknown but recent exome sequencing identified two mutations in *DOCK6*, as well as, one mutation leading to ARHGAP31 truncation in three unrelated AOS patients (62, 63). Mutations in *DOCK6* corresponded to a 4bp deletion and a 1bp duplication that created stop codons located either upstream of the DHR-1 or DHR-2 suggesting for the presence of truncated and GEF-dead proteins in patients. In addition to abnormal hands and feet, patients with *DOCK6* mutations demonstrated microencephaly, pointing to a possible function of *DOCK6* during brain development (see above). Isolation of fibroblasts from these patients uncovered severe cytoskeletal defects with more cells being round and abnormally elongated while lacking lamellipodia. Interestingly, the patient mutation in *ARHGAP31* was proposed to truncate an auto-inhibition fragment and generate a constitutively active GAP for



Figure 1.1.7 Moving ameboid or mesenchymal? DOCKs tip the balance.

During cancer progression, cancer cells acquire the ability to become motile and escape, collectively or individually, from the primary tumor. Individual cancer cell migrates either via a mesenchymal or an amoeboid migration mode (60). During mesenchymal movement, cells adopt typical RAC phenotypes including elongated morphology, lamellipodia formation and protease activity (60). In contrast, amoeboid migration is portrayed by round cells with plasma membrane blebbing that is dependent on RHO signaling for the generation of actomyosin contractile forces (60). These modes are inter-convertible and can be exploited by cancer cells to adapt to their microenvironment and sustain invasion. While RHO GTPases are important players to choose between these types of movement, GEFs orchestrating their signaling have remained elusive. Elegant RNAi screens in melanoma cells narrowed on two DOCK GEFs, namely DOCK3 and DOCK10, as central regulators of mesenchymal and ameboid migration (64, 65). The melanoma A375M2 cell line can switch between mesenchymal and ameboid morphologies when grown in 3D matrixes. Silencing DOCK3 in these cells enriched for a population migrating in an amoeboid manner. During mesenchymal movement, a complex between the scaffold protein NEDD9 and DOCK3 is required to orchestrate RAC activation and signaling to the effector protein WAVE2 that negatively regulate the levels of phospho-Myosin Light Chain-2 to decrease actomyosin contractility. In contrast, ROCK signaling, which promotes amoeboid migration, was shown to repress mesenchymal migration by promoting the inactivation of RAC1 via the ARHGAP22 (65, 66). In a model of head and neck cancer, a master regulator of epithelial to mesenchymal transition, TWIST, regulates the level of NEDD9 and DOCK3 expression to promote RAC-dependant mesenchymal migration (67). TWIST cooperates with BMI1 to repress the expression of let-7i, a miRNA targeting NEDD9 and DOCK3. Silencing of DOCK10 in melanoma cells grown in a 3D matrix reduced the levels of activated CDC42 and phosphorylated Myosin Light Chain and converted round cells into mesenchymal cells (65). Consistent with a role of DOCK10 in promoting amoeboid migration, overexpression of DOCK10-DHR-2 domain led to an increase in the amount of round cells while silencing of the two CDC42 effectors, N-WASP and PAK2, favored elongated cells. Overall, these studies highlighted the existence of signaling pathways that promote one type of migration while at the same time support a repression of the other mode. Thus, cancer cells are well equipped to alternate between migration modes to ensure invasion suggesting that clinical therapies targeting both modes of migration would be more efficient to prevent metastasis.

RAC/CDC42. These independent studies suggest that a reduction in RAC and/or CDC42 activities, via inactivation of a GEF or hyper-activation of a GAP, leads to the development of this disease.

DOCK1 as a promoter of cell invasion downstream of oncogenic kinases.

The *Drosophila* PDGF/VEGF receptor tyrosine kinase (RTK) signals through the delmo/mbc complex to promote border cells migration, an *in vivo* model reflecting cancer cell invasion, hinting that DOCK1 might play a role in human cancers downstream of receptors tyrosine kinases, which are recurrently amplified or mutated in cancer (68).

DOCK1 regulates growth and invasion of glioblastomas:

Amplifications of the $PDGFR\alpha$ or EGFR locus define subclasses of glioblastomas that correlate with poor prognosis (69). In an attempt to identify molecular players that could mediate tumor spreading, high expression of DOCK1 and ELMO1 proteins were observed in invasive area of glioblastoma sections (70). In glioblastoma cell lines overexpressing PDGFR α ligand or EGFRvIII, the suppression of DOCK1 expression prevented cell migration, AKT, ERK1/2 and RAC activation (11, 12). When PDGFR α ligand expressing cells were injected *in vivo* they failed to extensively proliferate and invade the brain when DOCK1 expression was abrogated pointing to DOCK1 as an important downstream effector of this RTK (11). Mechanistically, both oncogenic kinases activated DOCK1 by inducing its tyrosine phosphorylation. PDGFR α promoted SRC kinase-dependent phosphorylation of DOCK1 on Y¹⁸¹¹ to increase its affinity for RAC and to promote GTP-loading (Figure 1.1.8 page 26). Functionally, *in vivo*, glioblastoma cells expressing PDGFR α ligand failed to invade when a DOCK1^{Y1811F} mutant replaced endogenous DOCK1 (11). In patients, survival significantly decreased when tumors stained positive for both pDOCK1^{Y1811} and PDGFR α . Similarly, oncogenic EGFRvIII promoted the phosphorylation of DOCK1 on 2 different sites: Y⁷²², through SFK kinases and S¹²⁵⁰ via Protein Kinase A (12, 13) (Figure 1.1.8 page 26). Phosphorylation of both of these sites is required functionally since expression of DOCK1^{Y722F} or DOCK1^{S1250A} strikingly prevented growth and invasion of EGFRvIII-overexpressing glioblastoma cells when injected in the brain of mice (12, 13).

DOCK1 regulates breast cancer metastasis:

Mining of genomic data uncovered a correlation between high levels of DOCK1 mRNA expression and poor prognosis for cancer patients afflicted with HER2-positive and basal breast cancers, the two most invasive subtypes of this disease (71). The receptor tyrosine kinase HER2 is amplified or overexpressed in 20-30% of breast cancers (72). In breast cancer cell lines, oncogenic HER2 or activation of endogenous HER2-containing heterodimers by the ligand Heregulin β 1, promoted DOCK1 phosphorylation on its positive regulatory site, Y¹⁸¹¹ (71) (**Figure 1.1.8 page** 26). Pharmacological inhibition or knockdown of DOCK1 expression in breast cancer cell lines demonstrated an essential role for this GEF in HER2-mediated RAC activation and migration. The effector pathways of HER2 that promote metastasis in vivo remain incompletely defined. To address whether DOCK1 is a mediator of invasion in vivo, Dock1 was conditionally deleted in mammary epithelial cells in a murine HER2 breast cancer model that mimics the human disease including metastasis (73, 74) (Table 1.1 page 11). Genetic ablation of Dock1 in HER2 mammary gland reduced the total tumor burden per animal and protected mice from developing lung metastases. One clear explanation for the defects in metastasis is via impaired RAC activation, yet gene expression profiling of HER2-mammary tumors identified a gene set, under the control of Dock1, enriched in genes responding to interferon type I. As some of these genes correlate with poor survival in HER2 patients, further analysis will be required to understand their contribution to cancer progression. These findings demonstrate that HER2 exploits the DOCK1/RAC module during breast cancer progression to metastasis and further emphasize the central role played by this signaling pathway downstream of RTKs in various forms of tumor progression and metastasis. These studies point to inhibition of DOCK1 signaling as a promising avenue for the treatment of invasive cancers.



Figure 1.1.8 DOCK1 in cancer

Several studies have showed that DOCK1 is phosphorylated downstream of oncogenic RTKs. (A) In glioblastoma cells, activation of the PDGFR by its ligand promotes the phosphorylation of DOCK1 at Y¹⁸¹¹ through the SRC kinase. Phosphorylation of DOCK1 is critical for its interaction with Crk and p130CAS and to induce RAC activation. In these cells, DOCK1 is also essential for AKT and ERK1/2 activation mediated by PDGFR. (B) In glioblastoma cells, overexpression EGFRvIII induces the phosphorylation of DOCK1 at Y⁷²² via SFK kinases and at S¹²⁵⁰ via PKA. DOCK1 is essential to promote RAC, AKT and ERK1/2 activation mediated by oncogenic EGFRvIII. (C) HER2 activation or overexpression of its oncogenic form induces phosphorylation of DOCK1 at the Y¹⁸¹¹ through the SRC kinase in breast cancer cells. **1.2 LES MUSCLES SQUELETTIQUES**

Chez les vertébrés, les muscles squelettiques sont les organes moteurs du corps. Ils sont attachés aux os grâce aux tendons et leur action est contrôlée par le système nerveux central. Chaque muscle est composé de plusieurs faisceaux contenant chacun de nombreuses fibres musculaires plurinucléées dont la contraction est régulée par les jonctions neuromusculaires. Dans les fibres matures, les noyaux sont accolés à la membrane plasmique en périphérie de l'appareil contractile. Ce dernier est caractérisé par une architecture du cytosquelette organisée en différentes bandes qui sont responsables de l'apparence striée du muscle squelettique. Plus particulièrement, les filaments épais de myosine et les filaments fins d'actine sont disposés de façon parallèle l'un à l'autre. Les filaments fins sont fixés à un complexe protéique nommé disque Z. Le sarcomère est la sous-unité fonctionnelle de la fibre musculaire. Il correspond à la portion se retrouvant entre deux disques Z (75). C'est le glissement des filaments d'actine sur les filaments de myosine suite à l'influx nerveux qui entraîne la contraction musculaire (**Figure 1.2.1 page 29**).

Les fibres musculaires sont post-mitotiques et peuvent atteindre plusieurs microns. Elles sont générées grâce à la fusion des myoblastes, les progéniteurs musculaires mononucléés (45, 76). La croissance et la réparation des fibres musculaires sont assurées par les cellules satellites, soient les cellules souches du muscle adulte (77). Ces cellules sont situées en périphérie des fibres musculaires. Les mécanismes régissant la fusion des myoblastes au cours du développement et la fusion des cellules satellites chez l'adulte sont toujours incompris. Néanmoins, plusieurs études réalisées en lignée cellulaire ou chez les organismes modèles comme la drosophile ont permis d'identifier des événements cellulaires ainsi que des effecteurs moléculaires nécessaires à la fusion.



Figure 1.2.1 Le muscle squelettique et son architecture

Adapté de Braun et al., Nature Reviews in Molecular Cell Biology 2011 (78)

Les muscles squelettiques sont reliés aux os grâce aux tendons. Ils sont composés de plusieurs faisceaux contenant chacun plusieurs fibres musculaires. Les fibres musculaires contiennnent les sarcomères, les sous-unités contractiles se retrouvant entre deux disques Z, qui sont caractérisées par une organisation en bande du cytosquelette. C'est le glissement des filaments d'actine et de myosine qui permet la contraction musculaire suite à l'influx nerveux reçu à la jonction neuromusculaire. Les cellules satellites sont les cellules souches du muscle. Elles sont situées en périphérie des fibres musculaires.

1.2.1 Le développement musculaire chez la drosophile

Chez la drosophile, les muscles somatiques sont l'équivalent des muscles squelettiques des mammifères. Étant donné leur formation rapide, leur facilité d'observation et la disponibilité via criblage de nombreux mutants génétiques, la drosophile s'est avérée un modèle particulièrement profitable pour identifier des molécules régulant le développement musculaire. Chez la larve de drosophile, chaque hémisegment comprend 30 muscles abdominaux qui différent chacun par leur taille, leur position et leur orientation (79, 80). Contrairement aux mammifères, chaque muscle est composé d'une seule myofibre plurinucléée qui est le résultat de la fusion entre deux populations de progéniteurs musculaires; les myoblastes fondateurs (Fonder Myoblast; FCM). Les caractéristiques individuelles de chacun des muscles sont déterminées par un seul FM qui orchestre la formation d'une fibre en attirant et fusionnant avec plusieurs FCMs (81).

1.2.2 La spécification des progéniteurs musculaires chez la drosophile

Les progéniteurs musculaires FMs et FCMs de la drosophile sont dérivés du mésoderme somatique. Suite à la gastrulation, le mésoderme est divisé en alternance de région exprimant de hauts ou de faibles niveaux du facteur de transcription Twist (**Figure 1.2.2 A page 31**). Les sites exprimant les hauts niveaux de Twist correspondent aux régions myogéniques (**Figure 1.2.2 B page 31**). Dans ces régions se retrouvent les domaines d'équivalence myogénique caractérisés par l'expression du facteur de transcription Lethal of scute (82) (**Figure 1.2.2 C page 31**). Grâce à un processus d'inhibition latérale médié par le récepteur Notch et son ligand Delta, un seul progéniteur musculaire est spécifié par domaine d'équivalence myogénique (83) (**Figure 1.2.2 D page 31**). Ce dernier se divise ensuite de façon symétrique afin de générer deux FMs ou de façon asymétrique afin de générer un FM et un précurseur musculaire adulte.



Figure 1.2.2 La spécification des progéniteurs musculaires chez la drosophile.

Adapté de Chen et Olsen, Trends in Cell Biology 2004 (84)

(A) Après la gastrulation, le mésoderme est divisé en région exprimant des hauts et des bas niveaux du facteur de transcription Twist. (B) Les domaines myogéniques expriment de haut niveaux de Twist. (C) Les domaines de compétence myogénique expriment le facteur de transcription lethal of scute. (D) Un seul progéniteur est déterminé par inhibition latérale via Notch par domaine d'équivalence myogénique. (E) Les progéniteurs se différentient afin de donner les cellules FM ou les cellules progénitrices adultes et les autres cellules du domaine deviennent les cellules FCM. Les autres cellules du groupe d'équivalence se différencient en FCMs (85) (**Figure 1.2.2 E page 31**). Les FMs coordonnent la fusion en attirant un nombre défini de FCMs et génèrent un muscle ayant une taille, une position et une orientation précises. Cette identité est attribuée aux FMs par l'expression d'un ou d'une combinaison de facteur de transcription sélecteur tel que nautilus, Kruppel, slouch, Apertus, vestigial, even skipped et ladybird (86). Suite à leur fusion avec les FMs, les FCMs sont reprogrammés et adoptent l'identité génique des FMs en exprimant à leur tour les mêmes facteurs de transcription sélecteurs.

1.2.3 La fusion des myoblastes chez la drosophile

1.2.3.1 Les événements cellulaires observés lors de la fusion

La fusion des myoblastes est divisée en plusieurs événements cellulaires. Premièrement, les FMs reconnaissent et attirent les FCMs de leur entourage. Les FCMs migrent et étendent des filopodes qui entrent en contact avec les FMs (87) (Figure 1.2.3 A page 34). Des récepteurs transmembranaires complémentaires médient la reconnaissance et l'adhésion des deux types cellulaires (Figure 1.2.3 B page 34). Des études de microscopie électronique ont révélé l'apparition de vésicules denses aux électrons aux sites de contact cellulaire (87). Ces vésicules arrivent à la membrane plasmique en provenance du Golgi et leur association fréquente avec les microtubules suggère qu'elles sont transportées grâce à ce réseau de filaments (88) (Figure 1.2.3 C page 34). La fonction de ces vésicules demeure obscure, mais il peut être envisagé qu'elles servent à localiser un fusogène nécessaire à la fusion. C'est la présence de foyers d'actine au site de contact cellulaire qui permet d'orienter la livraison des vésicules au site éventuel de fusion (88). Une fois à la membrane, les vésicules sont recouvertes d'actine filamenteuse et s'alignent de part et d'autre des membranes pour former les paires de vésicule dense aux électrons (88) (Figure **1.2.3 D page 34**). Il a été suggéré que ces vésicules donnent ensuite naissance aux plaques denses aux électrons observées lors de la fusion des myoblastes (87). Une polymérisation active de l'actine dans les FCMs génère ensuite une structure

s'apparentant à un podosome qui envahie la FM (89) (Figure 1.2.3 E page 34). Les podosomes sont définis comme des structures d'adhésion formées par un noyau d'actine filamenteuse entouré d'un anneau de molécule d'adhésion (90). Dans les FMs, seulement une fine couche d'actine est observée. Des pores de fusion sont générés, les membranes se désintègrent, les foyers d'actine sont dissous et la FCM est ultimement intégrée à la FM. (Figure 1.2.3 F page 34). Le noyau de la FCM est incorporé dans la FM et s'aligne à son noyau. De plus, les noyaux des myoblastes ayant fusionnés se déplacent rapidement au centre de la myofibre vers le noyau central grâce au réseau de microtubule (91). La fusion des myoblastes s'organise en deux phases. La première donne naissance à des cellules bi- ou tri- nucléées et la deuxième est caractérisée par plusieurs vagues additionnelles de fusion permettant la formation des myotubes plurinucléés (91, 92) (Figure 1.2.3 G page 34).

1.2.3.2 Les voies de signalisation nécessaires à la fusion

Au fil des années, la caractérisation de mutants génétiques combinée avec l'amélioration des techniques d'imagerie ont permis d'identifier plusieurs molécules essentielles à la fusion des myoblastes en plus d'interpréter à quels événements cellulaires leurs actions contribuent. Par exemple, des allèles du gène *myoblast city* (*mbc*), l'orthologue de *Dock1* chez la drosophile, ont été identifiés dans un criblage conçu pour induire des mutations dans le chromosome 3 (93). Les mutants de *mbc* ont des défauts sévères de fusion qui mènent à la formation de fibres musculaires mononucléées (93, 94). La découverte de *mbc* a été une étape importante dans ce domaine. Elle a grandement contribué à la validation de l'hypothèse qui suggérait l'existence d'une population de FMs et de FCMs. De plus, sa découverte a contribué à initier les premières études sur les mécanismes de fusion chez la drosophile. De façon plus générale, les études chez la drosophile ont permis de mettre en évidence la contribution primordiale du cytosquelette lors de la fusion en démontrant que les récepteurs des FMs et FCMs activent plusieurs voires de signalisation qui convergent vers une régulation du cytosquelette d'actine (**Figure 1.2.4 page 35**).



Figure 1.2.3 Les événements cellulaires observés lors de la fusion des myoblastes de drosophile

(A) Les FCMs forment des filopodes et migrent vers les FMs. (B) Les FCMs et FMs adhèrent grâce aux récepteurs transmembranaires. (C) Suite à l'adhésion des cellules, des foyers d'actine sont générés et servent à orienter le déplacement de vésicules dérivées du Golgi vers la membrane plasmique. Il est suggéré que ces vésicules sont délivrées grâce au réseau de microtubules. Les vésicules à la membrane sont recouvertes d'actine. (D) Les vésicules denses aux électrons s'alignent de chaque côté des membranes. (E) Les FCM envahissent les cellules FM grâce à une structure s'apparentant à un podosome. (F) La formation d'un pore entraîne la dissolution du foyer d'actine. (G) Les FCM fusionnent avec les myotubes en formation en employant un cycle similaire.



Figure 1.2.4 Schéma des voies de signalisation impliquées dans la fusion des myoblastes de drosophile

Résumé des molécules et voies de signalisation impliquées dans la fusion des FMs avec les FCMs.

- La migration des FCMs et leur adhésion aux FMs

Plusieurs études suggèrent que les FCMs migrent vers les FMs (87, 95). Cette migration est dépendante de certains récepteurs transmembranaires membres de la superfamille des immunoglobulines. Plus particulièrement, les FMs expriment les récepteurs dumfounded (duf) aussi appelé kin of irregular-chiasm-C (kirre) et roughest (rst) aussi nommé Irregular optic chiasma C (Irre-C) (96, 97). Ces récepteurs agissent de façon redondante en se liant aux récepteurs sticks and stones (sns) et hibris (hbs) exprimés à la surface des FCMs (98-100). Les FCMs expriment aussi rst, mais sa capacité à former des interactions homotypiques ou d'interagir avec duf est grandement inférieure à sa capacité à interagir avec sns et hbs. Ainsi, le rôle de rst dans les FCMs demeure inexploré (97, 101). Lors de leur migration, les FCMs forment des filopodes dont la formation requière l'expression de sns (98). Les mécanismes responsables de médier l'attraction entre les deux types cellulaires restent méconnus. En effet, il demeure incompris si les filopodes des FCMs sont émis de façon aléatoire et stabilisés par leur interaction avec les FMs ou s'il existe un mécanisme permettant d'orienter leur formation. Une forme tronquée de la protéine duf a été observée dans le milieu de culture de cellules S2 de drosophile lorsqu'elles surexpriment la forme complète de cette protéine (102). Cette observation qui doit être validée in vivo suggère néanmoins que duf puisse agir comme chimioattractant et ainsi attirer les FCMs de façon active. L'abolition de l'expression de duf et rst entraîne un bloc complet de la fusion des myoblastes et l'absence d'expression de sns entraîne aussi une forte diminution de la fusion (97, 98). Le rôle de hbs semble toutefois moindre, puisque son élimination génétique entraîne seulement des défauts mineurs et son expression est incapable de corriger les défauts de fusion générés par l'absence de sns (100, 101). De plus, hbs est exprimé seulement par un petit groupe de FCM (99).

Le cytosquelette des FCMs contribue à la formation des filopodes leur permettant de se diriger vers les FMs. Quelques molécules ont été identifiées comme étant essentielles à cette étape. Kette, un membre du complexe SCAR qui régule l'activité du complexe Arp2/3, permet la relocalisation du complexe SCAR dans le filopode. L'expression de Kette est essentielle à la fusion (103). Il a également été suggéré que la petite GTPase Rac qui régule aussi le complexe SCAR contribue à la migration des FCMs. Dans le mutant triple de *Rac (Rac1/Rac2/Mtl)*, on observe des défauts sévères de fusion et la présence de nombreuses cellules sans protrusion indique qu'une des étapes compromises est la formation des structures migratoires (95, 103-105). Une augmentation du nombre de cellules mononucléées sans structure migratoire est aussi observée dans les mutants de *mbc* (103).

- La formation des structures d'actine

Une fois les premiers événements d'adhésion établis entre les FMs et les FCMs, les deux cellules consolident leur interaction et s'alignent afin d'augmenter leur surface de contact grâce à l'interaction de duf et rst avec sns et hbs. Ces récepteurs vont s'organiser de façon à former un anneau au site de contact. Cette structure caractéristique baptisée FuRMAS pour « <u>Fusion-Restricted-Myogenic-Adhesive-Structure</u> » sert de plateforme de signalisation et permet le recrutement de la machinerie de fusion (106, 107). Les FuRMAS encerclent les foyers d'actine naissants et limitent leur expansion (106).

Certaines molécules sont recrutées par les récepteurs de fusion aux FuRMAS. C'est le cas de la molécule adaptatrice Antisocial (Ants) aussi nommée rolling pebbles (rols). Chez les mutants d'*Ants*, on observe des fibres bi ou trinucléées mais aucune fibre plurinucléée suggérant qu'Ants agit lors de la deuxième phase de fusion ou de façon redondante durant la première phase (102, 108, 109). Ants est exprimé spécifiquement dans les FMs dans lesquels il interagit avec le domaine cytoplasmique de duf (102, 108). Chez le double mutant *duf/rst*, Ants n'est pas relocalisé à la membrane et demeure distribué uniformément dans le cytoplasme (102, 108). En accord avec un rôle de Ants en aval de ces récepteurs, les FMs et FCMs sont capables d'adhérer en son absence sans toutefois compléter leur fusion. L'interaction entre duf et Ants est aussi essentielle pour maintenir les niveaux de duf

à la membrane et cette fonction peut expliquer l'éventuel détachement des myoblastes observé en son absence (108). Ants peut aussi interagir avec mbc et peut-être ainsi relayer le signal de duf à la GTPase Rac (102). Des études plus récentes ont toutefois démontré que l'expression de mbc dans les FMs n'est pas essentielle à la fusion (discuté subséquemment). Ainsi, l'importance de l'interaction entre Ants et mbc demeure inexpliquée (110).

Duf peut aussi recruter la GEF Loner au FuRMAS bien qu'aucune interaction directe entre ces molécules n'ait été identifiée à ce jour (111). Tout comme Ants, Loner est essentiel à la fusion des myoblastes (111). Des expériences *in vitro* ont montré que Loner est une GEF pour la petite GTPase Arf6 et l'expression d'un dominant négatif d'Arf6 dans les FMs bloque leur fusion (111). Néanmoins, une seconde étude a démontré que la fusion des myoblastes n'est pas affectée en absence d'Arf6 suggérant qu'Arf6 agit de façon redondante lors de la fusion ou que Loner est important pour activer une autre GTPase *in vivo* (112). Chez les mutants de *Loner*, Rac1 n'est pas recruté au site de fusion. Il est par conséquent envisageable que Loner régule la fusion en médiant la relocalisation de Rac1 bien qu'il n'est pas exclu que Loner possède des fonctions additionnelles (95, 111). Loner est aussi exprimé dans les FCMs et d'autres études seront nécessaires pour déterminer sa fonction dans ces cellules (95).

La formation de foyer d'actine au FuRMAS et leur dissolution à l'instant précédent la fusion est indispensable à la génération des myotubes. La polymérisation de l'actine est notamment contrôlée par le complexe Arp2/3 qui initie la formation de nouveaux filaments en les fixant aux filaments existants (113). L'activité de nucléation du complexe Arp2/3 est régulée par les facteurs de promotion de la nucléation, soient les complexes SCAR et WASP chez la drosophile (114, 115). Plusieurs études ont mis en évidence une asymétrie entre les deux types cellulaires quant à la polymérisation de l'actine. Dans les FMs, on observe la formation d'une mince couche d'actine à la membrane alors que la formation d'un réseau dense est restreint aux FCMs (89). L'activation de voies de signalisation distinctes chez les FMs

et FCMs serait à la base de cette différence. L'activité du complexe SCAR est essentielle aux deux types cellulaires et les mutants de la sous-unité SCAR ou les mutants de KETTE qui régule l'activité du complexe SCAR ont d'importants blocs de fusion (89, 95, 103, 116, 117). La régulation du complexe ARP2/3 par WASP est requise seulement dans les FCMs (88, 117, 118).

Dans les FCMs, WIP, un partenaire d'interaction du complexe WASP, permet le recrutement de WASP au site de fusion. Il a été suggéré que WIP est recruté à la membrane via son interaction avec la molécule adaptatrice Crk qui elle-même interagit avec sns. (88, 118). L'activité de WIP est aussi régulée par la molécule blow. Il a été proposé que l'interaction de WIP avec blow compétitionne son interaction avec WASP et l'équilibre entre la dissociation des complexes WIP/blow et WIP/WASP mène à la formation du podosome (87, 119). Blow peut aussi interagir avec Crk et cette interaction pourrait médier son recrutement à la membrane (119). L'analyse des mutants WIP a aussi révélé que cette molécule contribue au transport vésiculaire et les vésicules provenant du Golgi ne sont pas dirigées correctement à la membrane chez le mutant (88). Une accumulation anormale de ces vésicules a aussi été observée chez les mutants singles bar (sing), une protéine transmembranaire de la famille MARVEL (120). Suite à l'envahissement des FMs par le podosome, il y a formation d'un pore de fusion, bien qu'il demeure controversé si un ou plusieurs pores sont formés. Le modèle actuel suggère que c'est la force engendrée par la polymérisation du réseau d'actine qui entraîne la formation du pore. Dans les mutants de blow, sing et KETTE il n'y a pas de formation du pore de fusion (87, 116, 120). Certaines études suggèrent que WIP est essentiel à la formation de ce pore alors que d'autres suggèrent que son expression n'est pas indispensable (88, 118). Des méthodologies différentes pourraient être à l'origine de ces dissemblances.

Les Rho GTPases sont d'importants régulateurs du cytosquelette. Les larves surexprimant un dominant actif ou un dominant négatif de Rac1 tout comme les mutants génétiques de *Rac1/Rac2* présentent des défauts de fusion importants (104, 105, 121). Un bloc de fusion sévère est aussi observé chez les mutants de la

RacGEF *mbc* tel que mentionné précédemment (93, 94). Des défauts de fusion sont aussi présents chez les mutants de *delmo*, le partenaire d'interaction de mbc (122). Tout comme Dock, mbc possède un domaine SH3, un domaine DHR-1, un domaine DHR-2 ainsi qu'un domaine riche en proline. La contribution de chacun de ces domaines lors de la fusion a été testée en évaluant la capacité de mutants de délétion à corriger les défauts de fusion observés chez le mutant *mbc* (123). Ces études ont permis de démontrer que l'habileté de mbc à lier les lipides à la membrane ainsi que sa capacité d'interagir avec delmo sont requises pour la fusion (123). Cependant, la région riche en proline de mbc n'est pas essentielle et par conséquent l'interaction de mbc avec la molécule adaptatrice Crk via ce domaine ne semble pas nécessaire (110, 123). De plus, l'incapacité d'un mutant sans activité GEF à corriger les défauts du mutant indique que mbc exerce sa fonction via l'activation de Rac1 (123). Enfin, l'expression de la forme dominante active de Rac1 dans le mutant *mbc* corrige les défauts de fusion suggérant encore une fois que la fonction principale de mbc lors de la fusion est d'activer Rac (110).

Étant donné que les protéines delmo, mbc et Rac sont exprimées dans les FMs et FCMs, cette voie de signalisation a longtemps été considérée comme essentielle aux deux types cellulaires. Néanmoins, la réexpression de mbc dans les FMs ne permet pas de corriger les défauts de fusion du mutant mbc comparativement à sa réexpression dans les FCMs (110, 123). De plus, un enrichissement de mbc et de la forme active de Rac au site de contact cellulaire est observé seulement dans les FCMs où les deux molécules contribuent à la formation des foyers d'actine (110). L'activité du complexe ARP2/3 est régulée par Rac dans plusieurs systèmes biologiques. Par conséquent, il est souvent suggéré que l'activation de Rac par mbc dans les myoblastes mène à la régulation du complexe SCAR et à l'augmentation de l'activité du complexe ARP2/3. Cependant, il reste à démontrer d'une façon biochimique que l'activation de Rac par mbc permet l'activation de ces effecteurs. Plus récemment, les effecteurs de Rac Pak1 et Pak3 exercent des fonctions partiellement redondantes bien que Pak3 semble jouer un plus grand rôle (124).

Dans les FCMs, le recrutement de Pak3 au foyer d'actine est induit par Rac et l'activité kinase de Pak3 est essentielle à la formation du podosome (124).

- La validité du modèle de fusion des myoblastes de la drosophile

Bien que les mécanismes permettant la dissolution des membranes menant à la continuité des cytoplasmes demeurent obscurs, les études réalisées chez la drosophile ont permis d'identifier des voies de signalisation clés essentielles à la fusion chez cet organisme. De plus, ces études ont mis en évidence l'importance de la réorganisation du cytosquelette d'actine lors de la formation des fibres plurinucléées. Toutefois, au moment de l'étude, la validité du modèle de drosophile afin d'identifier des mécanismes de fusion et d'étudier de façon plus générale le développement musculaire demeurait contestée. La notion de FM et FCM n'a jamais été démontrée chez les vertébrés. De plus, aucun des orthologues des molécules identifiées chez la drosophile n'avaient été confirmés comme essentiels à la fusion des myoblastes chez les vertébrés.

1.2.4 Le développement musculaire chez les vertébrés

1.2.4.1 Le développement musculaire chez la souris et le poulet

Chez les vertébrés, les cellules souches et les progéniteurs des muscles squelettiques thoraciques et des membres proviennent des somites. Les somites sont des structures épithéliales sphériques formées lors de la segmentation du mésoderme paraxial de chaque côté du tube neural et de la notocorde (**Figure 1.2.5 page 42**). La portion ventrale du somite se transforme en mésenchyme et engendre le sclérotome à l'origine de la formation des os et du cartilage. La portion dorsale du somite génère le dermomyotome dont la composition demeure épithéliale. Le dermomyotome est à l'origine notamment du derme et du myotome primaire (125, 126). Peu de temps après la formation du dermomyotome, des cellules situées dans



Figure 1.2.5 La myogenèse chez les mammifères

Adapté de Sambasivan et Tajbakhsh, Seminars in Cell and Developmental Biology 2007 (77).

Les cellules souches des muscles squelletiques thoraciques et des membres originent dans les somites. Les somites sont formés lors de la segmentation du mésoderme paraxial de chaque côté du tube neural. La portion ventrale du somite génère le sclérotome et la portion dorsale génère le dermomyotome. Des cellules situées dans la portion centrale du dermomyotome migrent sous le dermomyotome et se différentient en myocytes afin de former le myotome. Au niveau des membres, des progéniteurs musculaires du dermomyotome se détachent et migrent dans les membres pour les coloniser.

sa portion centrale migrent sous celui-ci et se différencient en myocytes mononucléés ce qui initie la formation du myotome primaire. Ces myocytes sont rejoints par des cellules post-mitotiques provenant des lèvres dorsales, ventrales et latérales du dermomyotome (127). Ces cellules s'alignent et s'étirent de façon parallèle aux fibres déjà présentes. Dans le modèle de poulet, il a été démontré que l'orientation antéropostérieure des myocytes dans le myotome est régulée par Wnt11 produit par la lèvre médiale du somite et dont l'expression est induite par le tube neural (128). Le myotome primaire constitue le premier compartiment musculaire où les myocytes mononucléés allongés de façon parallèle au tube neural occupent l'espace entre deux futures vertèbres. Par la suite, les cellules du dermomyotome central subissent une transformation épithéliale à mésenchymale et se déplacent dans le myotome. Ces cellules sont les progéniteurs musculaires, elles expriment Pax3 et Pax7 et sont mitotiquement actives (129-132). Leur auto-renouvellement et leur différentiacion myogénique assurent la croissance du myotome en augmentant le nombre de fibres musculaires ou en fusionnant avec les fibres existantes. Le myotome est éventuellement clivé afin de former les différentes masses musculaires qui continueront de croître grâce à la différenciation des progéniteurs musculaires et à leur fusion avec les fibres musculaires.

Au niveau des membres en développement, les progéniteurs musculaires de la lèvre ventrolatérale du dermomyotome se détachent et migrent à l'intérieur des membres (133). Comparativement aux autres progéniteurs musculaires, ces cellules expriment le facteur de transcription Pax3, mais n'expriment pas Pax7 (134). Ces cellules expriment aussi le récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) Met et leur migration est dépendante de son activation par son ligand Hgf présent dans le membre en bourgeonnement. Par conséquent, les muscles squelettiques des membres sont absents chez les embryons mutants *Met* et *Hfg* (135, 136). La migration des progéniteurs dans les membres dépend aussi de l'expression du facteur de transcription Lbx1. Chez les mutants *Lbx1*, les progéniteurs musculaires se détachent du dermomytome mais n'entreprennent pas leur migration et s'en suivent des défauts de formation des muscles des membres (137-139). Une des cibles

transcriptionnelles de Lbx1 est le récepteur Cxcr4. Ce dernier régule la migration d'une population de progéniteur musculaire dans le membre et des défauts de migration sont observés chez les souris *Cxcr4-nulles* (140). Une fois dans le membre, les progéniteurs musculaires prolifèrent et se différencient et fusionnent pour former les muscles des membres.

L'identité musculaire est acquise dans les cellules progénitrices Pax3 et Pax7 positives grâce à l'action des facteurs de régulation myogéniques qui activent un important réseau de cibles transcriptionnelles qui coordonnent la spécification et la différenciation musculaire (78). Chez les mammifères, il existe 4 facteurs de régulation myogéniques soient Myf5, Myod, Mrf4 et Myogenin (77, 78) (Figure 1.2.6 page 46). Myf5 et Myod permettent aux progéniteurs d'adopter un destin musculaire et de se spécifier en devenant des myoblastes. L'expression de Myogenin permet la différenciation. Le rôle de Mrf4 semble double puisqu'il est essentiel au destin musculaire dans l'embryon, mais son expression permet aussi l'activation de Myogenin. Par conséquent, les souris dont les gènes *Myf5, Myod* et *Mrf4* ont été inactivés n'ont aucun muscle squelettique (131, 141). Afin de se différencier, les myoblastes doivent sortir du cycle cellulaire et exprimer les protéines nécessaires à la formation de l'appareil contractile comme les myosines. Au terme de la différenciation musculaire les myoblastes fusionnent afin de former les fibres matures plurinucléées.

1.2.4.2 Le développement musculaire chez le poisson zèbre.

Au fil des années, le poisson zèbre a émergé comme modèle d'étude du développement musculaire. Chez le poisson zèbre, le somite et le myotome sont présents et d'apparence très simple. Le dermomyotome tel qu'observé chez le poulet et la souris est toutefois absent, mais plusieurs études ont révélé l'existance d'une couche de cellules nommées « cellules extérieures » qui exercent une fonction similaire au dermomyotome et qui contribuent à la croissance musculaire (142-145). De plus, ces cellules possèdent un profil d'expression génique similaire aux cellules

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).



Figure 1.2.6 Les vagues de myogenèse

Adapté de Sambasivan et Tajbakhsh. Seminars in Cell and Developmental Biology 2007 (77).

L'identité musculaire est acquise dans les cellules progénitrices Pax3 et Pax7 positives grâce aux facteurs de régulation myogéniques Myf5, Myod, Mrf4 et Myogenin. La myogenèse procède en plusieurs vagues chez les mammifères. Lors de la myogenèse primaire, les myoblastes embryonnaires fusionnent pour former les fibres primaires. Lors la myogenèse secondaire, les myoblastes fœtaux fusionnent pour former les fibres secondaires. À l'age adulte, une population de cellules souches, les cellules satellites, peuvent proliférer et fusionner avec les fibres existantes afin de permettre la croissance musculaire ou afin d'assurer la regénération du tissu endommagé.
1.2.5 La fusion des myoblastes chez les mammifères

1.2.5.1 Les événements cellulaires observés lors de la fusion

La myogenèse procède en plusieurs vagues chez les mammifères. Lors de la myogenèse primaire, les myoblastes embryonnaires fusionnent pour former les fibres primaires (Figure 1.2.6 page 46). Durant la myogenèse secondaire, une nouvelle génération de fibre, nommée fibre secondaire, est formée grâce à la fusion des myoblastes fœtaux entre eux.

Les myoblastes fœtaux utilisent la surface des fibres primaires afin de faciliter leur attachement lors de la formation des fibres secondaires. Une fois formées, les fibres secondaires se détachent des fibres primaires (77, 147). Des expériences de traçage clonal ont révélé que les myoblastes fœtaux peuvent aussi contribuer à la croissance des fibres primaires en fusionnant avec ces dernières (148). La majorité des fibres primaires deviendront des fibres musculaires lentes responsables du maintien de la posture alors que la majorité des fibres secondaires deviendront des fibres musculaires deviendront des fibres musculaires secondaires deviendront des fibres fibres secondaires deviendront des fibres fibres secondaires deviendront des fibres musculaires responsables du mouvement (147). Enfin à l'âge adulte, une population de cellules souches, les cellules satellites, peuvent fusionner avec les fibres existantes afin de permettre la croissance musculaire ou afin d'assurer la régénération du muscle à la suite d'une blessure (77).

Lorsqu'elle est observée en culture, la fusion des myoblastes peut être divisée en quelques étapes. Au début de leur différenciation, les myoblastes s'allongent et deviennent des myocytes. Ces derniers doivent ensuite migrer les uns vers les autres afin de former des contacts cellule:cellule pour ultimement fusionner (149). La formation d'une fibre musculaire peut être séparée en deux phases. Dans la première, les myoblastes fusionnent entre eux pour générer des myotubes. Par la suite, la croissance des myotubes est assurée par la fusion de nouveaux myoblastes avec ces myotubes. La fusion de myotubes entre eux a aussi été observée (150).

Bien que ces événements de fusion semblent très similaires, certaines molécules semblent réguler spécifiquement chacune de ces étapes (149).

1.2.5.2 Les voies de signalisation régulant la fusion des myoblastes

Chez les mammifères, les mécanismes moléculaires régulant la fusion des myoblastes sont beaucoup moins résolus que chez la drosophile notamment parce qu'il est difficile de visualiser la fusion *in vivo* chez la souris. Chez les mammifères, différentes lignées cellulaires comme les C2C12 et l'utilisation de myoblastes primaires ont permis d'étudier la fusion in vitro et plusieurs événements cellulaires décrits lors de la fusion des myoblastes de drosophile sont observés dans ces modèles (151). Ces études ont permis d'identifier des molécules qui régulent la fusion in vitro, mais peu de gènes lorsque inactivés chez la souris se sont avérés essentiels au développement musculaire. De plus, la notion de FM et FCM n'a jamais été établie chez les mammifères et cette différence a contribué à alimenter le débat à savoir si la machinerie moléculaire nécessaire à la fusion chez la drosophile est conservée chez les mammifères. Par conséquent, il devenait primordial de déterminer si la drosophile s'avérait être un modèle utile pour étudier les mécanismes de fusion en déterminant le degré de conservation des mécanismes de fusion entre les espèces. Les molécules régulant la fusion chez les mammifères connues au moment de notre étude sont discutées dans les prochaines sections et sont présentées selon l'événement cellulaire auquel elles sont sujettes de contribuer.

- La migration des myoblastes

Afin de fusionner, les myoblastes doivent se trouver et adhérer. Les myoblastes en culture ont initialement une grande motilité ce qui leur permet d'identifier leur partenaire de fusion. Au cours de leur différenciation, leur motilité diminue ce qui favorise la formation des contacts cellulaires nécessaires à la fusion (152, 153). Par conséquent, certaines molécules peuvent réguler positivement ou négativement la fusion en modifiant les propriétés migratoires des myoblastes.

Lorsque les premiers myotubes sont formés, les myoblastes sont redirigés vers eux ce qui suggère que les myotubes produisent des facteurs comme les cytokines permettant d'attirer les myoblastes. De plus, il a été observé que les myocytes expriment une variété de récepteur pour les cytokines (154) (Figure 1.2.7 page 57).

L'un des récepteurs exprimés par les myoblastes est le récepteur couplé aux protéines G CXCR4 et les myotubes en formation expriment son ligand Cxcl12 (154) (Figure 1.2.7 page 57). En culture, les myoblastes migrent vers un gradient de Cxcl12. Une inhibition de l'expression de Cxcr4 diminue la migration des myoblastes et entraîne des défauts de fusion (154). Chez la souris, le récepteur Cxcr4 est exprimé de façon transitoire par une population de progéniteurs musculaires lors de leur migration dans le membre en développement où le ligand Cxcl12 est produit (140). Chez les souris Cxcr4 knock-out (KO), on observe des défauts de migration des progéniteurs musculaires du membre (140). La molécule Cd164, membre de la famille des sialomucines, agit comme corécepteur de Cxcr4 dans plusieurs systèmes et ces deux protéines coprécipitent dans des extraits de myoblastes en culture (155). Cd164 est exprimé dans les somites chez la souris et son expression augmente lors de la différenciation musculaire en culture (155, 156). Une diminution ou une augmentation des niveaux d'expression de Cd164 entraîne respectivement une diminution ou une augmentation de la fusion des myoblastes (155, 156). De plus, la migration des myoblastes induite par Cxcl12 est inhibée en son absence. Néanmoins, la contribution de Cd164 au développement musculaire in vivo reste à déterminer.

La cytokine IL-4 est aussi sécrétée par les myotubes en culture alors que les myoblastes et myotubes expriment son récepteur IL-4 α (157, 158). Les souris KO pour le gène *IL-4* ou pour le gène codant pour son récepteur ont des muscles plus petits et les myoblastes primaires dérivés de ces souris présentent des défauts de fusion *in vitro* (157). Il a été montré que l'expression d'IL-4 est contrôlée par le facteur de transcription Nfatc2. Les muscles des souris *Nfatc2* KO présentent aussi des défauts de croissance et les myoblastes primaires isolés de ces souris ont des défauts de fusion *in vitro* (159). Notamment, les défauts de fusion des myoblastes

Nfatc2 KO peuvent être corrigés par l'ajout d'IL-4 au milieu de culture ou par l'ajout du milieu provenant de myoblastes sauvages en différenciation. Ces résultats suggèrent qu'une des fonctions primordiales de Nfatc2 au cours de la fusion est de réguler la production d'IL-4 par les myotubes. Enfin, l'absence d'expression d'IL-4 ou de Nfatc2 affecte spécifiquement la fusion des myoblastes avec les myotubes et non la fusion des myoblastes entre eux. *In vivo*, la fonction de l'IL-4 est peut-être plus vaste puisque cette cytokine est relâchée par le muscle endommagé (157). De plus, la présence d'IL-4 augmente l'expression de certaines intégrines ce qui pourrait contribuer à réguler son action promigratoire (158).

La cytokine IL-4 induit l'expression du récepteur du mannose dans plusieurs types cellulaires (160, 161) (**Figure 1.2.7 A page 57**). Le récepteur du mannose est une protéine transmembranaire de type I capable de lier les glycoprotéines solubles ou à la surface cellulaire (162). Dans les cultures de myoblastes traitées à l'IL-4, on observe une augmentation de l'expression du récepteur du mannose et l'expression de ce récepteur augmente aussi au cours de la différenciation des myoblastes en culture (160). Les souris KO pour le récepteur du mannose ont des fibres musculaires plus petites que les souris sauvages. *In vitro*, les myoblastes dérivés de ces souris mutantes ont des défauts de fusion. En absence du récepteur, c'est la fusion des myoblastes avec les myotubes qui est affectée et non la fusion des myoblastes entre eux (160). Des expériences de vidéomicroscopie ont révélé que les myoblastes n'exprimant pas le récepteur du mannose migrent sur une plus petite distance étant donné la diminution de leur vélocité de migration. De plus, les myoblastes mutants internalisent significativement moins de collagène que les cellules contrôles.

Les molécules décrites précédemment favorisent chacune à leur manière la migration des myoblastes vers les myotubes et régulent positivement la fusion des myoblastes. Comparativement à ces molécules la prostacyclin (PGI2), une molécule de la famille des prostaglandines, inhibe la migration des myoblastes tout en favorisant la fusion (163) (**Figure 1.2.7 A page 57**). *In vitro*, l'inactivation du récepteur de la PGI2 entraîne des blocs de fusion due à une augmentation de la motilité (163).

Par conséquent, il est proposé que PGI2 favorise la fusion en ralentissant la migration des myoblastes et en favorisant les contacts cellulaires.

- L'adhésion des myoblastes

Chez la drosophile comme mentionné précédemment, les récepteurs de fusion médient l'adhésion entre les myoblastes. Leurs interactions engendrent les FuRMAS, une structure qui agit comme plateforme de signalisation permettant de limiter et d'orienter la polymérisation de l'actine au site de fusion. À ce jour, cette structure n'a pas été observée chez les mammifères. De plus, l'adhésion des myoblastes a surtout été étudiée dans des modèles de cultures cellulaires chez les mammifères. Les molécules d'adhésion impliquées dans la fusion des myoblastes au moment de cette étude sont décrites dans cette section.

Des études réalisées chez le poisson zèbre ont démontré que kirrel, l'un des orthologues de duf, est exprimé dans les somites. L'expression de morpholinos ciblant kirrel entraîne l'accumulation de myofibres mononucléées (164). Chez les mammifères, il existe trois orthologues de duf soient Neph1, Neph2 et Neph3 (165). Ces molécules sont principalement exprimées dans le rein où elles contribuent à la formation de la barrière de filtration par les podocytes (166). L'inactivation de *Neph1* chez la souris entraîne une protéinurie sévère. Des défauts musculaires ne sont pas rapportés chez ces souris suggérant qu'il ne s'agit pas d'un récepteur majeur de la fusion primaire (167).

Les mammifères semblent donc utiliser un répertoire de molécule différent de celui de la drosophile afin de médier l'adhésion des cellules musculaires. Plusieurs études utilisant une variété d'approche ont démontré que l'inhibition de la fonction des cadherin entraîne des blocs de fusion des myoblastes *in vitro* (168-172). De plus, il a été montré que M-, N- et R- cadherin sont exprimés dans le muscle en développement (172-178) (**Figure 1.2.7 B page 57**). Bien que plusieurs études suggèrent que la signalisation médiée par M- et R- cadherin soit essentielle à la

fusion, leur inactivation chez la souris n'entraîne pas de défauts musculaires (179-181). Toutefois, il est possible que dans ces contextes, leur absence soit compensée par la présence des autres cadherin. L'inactivation de N-cadherin chez la souris entraîne la mort de l'embryon à un stade trop précoce pour étudier la myogenèse (180). Par conséquent, l'utilisation de mutant double ou triple et l'utilisation de mutant tissu spécifique permettront d'évaluer plus spécifiquement l'importance de ces molécules lors de la fusion primaire.

Les molécules transmembranaires Cdo et Boc font partie d'un sous-groupe membre de la famille des immunoglobulines. Ces deux molécules interagissent en cis dans les myoblastes et la surexpression de chacune accélère leur différenciation et augmente leur index de fusion (182, 183). Les souris *Cdo* KO ont un délai de formation des fibres primaires qui est éventuellement corrigé après la naissance (184-186). Les myoblastes primaires isolés de ces souris ont des défauts de différenciation en culture et forment peu de myotubes (186). Il a été démontré que Cdo lie N-Cadherin en cis dans les myoblastes indépendamment de la liaison des Cadherin entre elles (187) (**Figure 1.2.7 B page 57**). Suite à l'adhésion de Cdo avec N-cadherin, son domaine intracellulaire s'associe aux protéines d'échafaudage BNIP-2 et JLP. La liaison de Cdo à BNIP-2 induit l'activation de Cdc42 qui à son tour permet l'activation de la MAP kinase p38 en aval de JLP. L'activation de p38 incite la différenciation myogénique en induisant la phosphorylation d'un cofacteur de Myod et en permettant l'hétérodimérisation de ce cofacteur avec Myod (186, 188, 189).

Cdo peut aussi interagir en cis avec neogenin, un récepteur pour la famille des molécules netrin (190) (**Figure 1.2.7 B page 57**). La surexpression de neogenin dans les myoblastes en culture augmente leur fusion alors que l'inhibition de son expression la bloque. De plus, le traitement des cultures de myoblaste avec la protéine recombinante netrin-3 favorise la fusion (191). Chez la souris, neogenin et ses ligands netrin-1 et netrin-3 sont exprimés dans les somites et le muscle en développement (190, 192, 193). Les souris mutantes pour le gène *neogenin* ont de plus petites fibres musculaires (190). L'activation du récepteur par netrin entraîne

l'activation de Fak (190). Il a été montré qu'une diminution de l'expression de Fak ou la surexpression d'un dominant négatif de cette kinase dans les myoblastes bloque leur fusion (194).

Les intégrines (Itg) sont des récepteurs pour plusieurs composantes de la matrice extracellulaire et les muscles squelettiques expriment de nombreuses Itg à différentes étapes de leur développement (195). Notamment, l'expression de l'Itg α 3 et de l'Itg α 9 est augmentée au cours de la différenciation myogénique et une diminution de la fusion des myoblastes est observée lorsque ces molécules sont bloquées in vitro (196, 197). Adam12 est membre d'une famille de glycoprotéines transmembranaires et plusieurs membres de cette famille sont impliqués dans des événements de fusion chez les mammifères (198). Adam12 entre en complexe avec Itg α 9 β 1 et Itg α 3 β 1 dans les myoblastes et son élimination via des siRNA entraîne aussi des blocs de fusion in vitro (196, 197, 199) (Figure 1.2.7 B page 57). L'inactivation de l'*ltg\beta1* dans le compartiment musculaire cause la mort des embryons mutants à la naissance (199). Dans ces mutants, tous les groupements musculaires sont réduits et l'on observe des défauts d'assemblage de l'appareil contractile des fibres. In vitro, les myoblastes primaires dérivés de ces souris ont des défauts de fusion. Les conséquences de l'inactivation de l'Itg $\beta 1$ sur la fusion primaire ou secondaire *in vivo* n'ont pas été étudiées bien qu'une accumulation de myoblastes non fusionnés est observée. Il demeure à déterminer comment l' $ltg\beta 1$ contribue à la fusion des myoblastes et si elle contribue notamment à l'activation de Fak.

La phosphatidylserine (PS) est un phospholipide et un important constituant des membranes cellulaires dans lesquelles elle est distribuée de façon asymétrique et restreinte au côté intracellulaire. Une perte de cette asymétrie et une exposition de la PS du côté extracellulaire est observée à la surface des cellules apoptotiques et agit comme signal de reconnaissance pour les phagocytes (200, 201). Des études ont toutefois révélé l'exposition transitoire de la PS au site de contact cellulaire lors de la fusion (202-204) (**Figure 1.2.7 B page 57**). On observe ce phénomène non

seulement en culture, mais aussi chez l'embryon de souris au jour E13 lorsque la fusion primaire est en cours. Dans le muscle en différenciation, l'exposition de la PS n'est toutefois pas accompagnée des changements moléculaires associés à la mort par apoptose comme l'activation des caspases et la rupture des membranes mitochondriales. La formation des myotubes est inhibée par l'addition de l'annexine V, une protéine capable de lier la PS. Ces études suggèrent que l'exposition de la PS est essentielle à la fusion. Néanmoins, il demeure à déterminer quels sont les mécanismes moléculaires induits par l'exposition de la PS et quelle est l'importance de ces mécanismes dans la fusion *in vivo*.

- La régulation du cytosquelette d'actine et la fusion des myoblastes

Comme pour la drosophile, la régulation du cytosquelette d'actine demeure une étape importante permettant de médier la fusion des myoblastes de mammifère. La formation d'une couche d'actine dans l'un des myoblastes avant la fusion a aussi été observée chez les mammifères (205, 206). Parmi les régulateurs du cytosquelette identifiés chez la drosophile, des études ont permis de démontrer que certaines de ces molécules exercent un rôle similaire chez les mammifères *in vitro*.

L'activation de la petite GTPase Rac augmente au cours de la différenciation des myoblastes en culture et son inactivation à l'aide d'un inhibiteur chimique entraîne des blocs de fusion *in vitro* (207) (**Figure 1.2.7 B page 57**). Rac1 est exprimé de façon ubiquitaire lors du développement du poisson zèbre et il a été observé que l'inhibition de son expression grâce à l'injection de morpholino affecte la fusion des myoblastes lors de la formation des fibres musculaires rapides chez cette espèce (164). Il est intéressant de noter que chez la drosophile, l'expression d'une forme constitutivement active de Rac inhibe la fusion. Or, l'expression de cette forme chez le poisson zèbre entraîne une augmentation de la fusion et l'on observe la formation de larges syncytiums (105, 164).

Étant donné leur importante contribution à la réorganisation du cytosquelette d'actine, il n'est pas surprenant que quelques GEFs aient été démontrées essentielles à la fusion des myoblastes de mammifères. Plus particulièrement, on observe une diminution de l'index de fusion des myoblastes en culture lorsque l'expression de l'orthologue de Loner, BRAG2 est inhibé grâce à des shRNA (208). En son absence, les myotubes formés sont plurinucléées, mais ils ne sont pas capables de s'allonger (208). Dans les myoblastes, l'inhibition de l'expression de BRAG2 induit une réduction de l'activation d'Arf6. Il a été observé que la formation d'un complexe contenant Arf6, paxillin et l'Itgβ1 est compromise en l'absence de BRAG2 et pourrait contribuer aux défauts d'élongation des myotubes (208) (**Figure 1.2.7 B page 57**). La contribution de BRAG2 au développement musculaire *in vivo* n'a pas été testée.

Une diminution de l'index de fusion des myoblastes est aussi observée lorsque l'expression de l'orthologue de mbc, Dock1, est diminuée par des shRNA dans des myoblastes *in vitro* (208) (**Figure 1.2.7 B page 57**). L'inhibition de l'expression de Dock1 entraîne une diminution de l'activation de Rac au cours de la différenciation (208). De plus, une étude a démontré que l'inhibition de l'expression de dock1 et du membre proche de la famille dock5 chez le poisson zèbre entraîne des défauts de fusion des myoblastes chez cette espèce lors de la formation des fibres musculaires à contraction rapide (209). Toutefois, la contribution de ces deux GEFs au développement musculaire chez les mammifères *in vivo* n'a pas été testée.

La GEF Trio est essentielle au développement embryonnaire et les embryons *Trio* KO meurent entre les jours E15.5 et E18.5. Leur décès est attribué à des défauts de formation des muscles squelettiques et du tissu neuronal (210). Chez les mutants, on observe plus spécifiquement des défauts de myogenèse secondaire (210). D'un point de vue moléculaire, des études *in vitro* ont aussi montré que l'inhibition de l'expression de Trio via des shRNA bloque l'activation de Rac induite par M-cadherin (207) (**Figure 1.2.7 B page 57**). Les mutants de *Trio* chez la drosophile ont des défauts de guidage axonal (211-214). Les mutants maternels et zygotiques de *Trio*

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).

A Migration des myoblastes



B L'adhésion, interaction cellule-cellule et fusion des myoblastes



Figure 1.2.7 Les voies de signalisation impliquées dans la fusion des myoblastes chez les mammifères

(A) Molécules qui régulent la migration des myoblastes. (B) Molécules impliquées dans l'adhésion, l'interaction cellule-cellule et la fusion des myoblastes. Voir le texte pour de plus amples informations.

1.2.6 Conclusion

La drosophile s'est avérée un modèle fructueux pour identifer 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

1.3.1 Les glandes mammaires

Les glandes mammaires sont les organes féminins qui produisent le lait permettant de nourrir les nouveau-nés chez les mammifères et elles sont situées dans les seins chez les humains (215) (**Figure 1.3.1 page 61**). À leur naissance, les hommes et les femmes possèdent chacun des rudiments des glandes mammaires, mais leur développement est initié seulement chez la femme suite aux changements hormonaux accompagnant la puberté. Les glandes mammaires sont formées d'une série de canaux et d'alvéoles qui sont drainés au niveau du mamelon. Les canaux sont formés par les cellules épithéliales luminales qui seront responsables de la production du lait suite à la grossesse et par les cellules myoépithéliales qui ont des propriétés contractiles. Les canaux sont entourés du stroma de la glande formé majoritairement par le tissu adipeux, mais il contient aussi des fibroblastes, des vaisseaux sanguins, des cellules hématopoïétiques et des cellules neuronales. Pendant la vie de la femme, les glandes mammaires cyclent entre des périodes de croissance et de régression qui sont contrôlées par le cycle menstruel, la grossesse et l'allaitement (215).

Le développement des glandes mammaires a surtout été étudié chez la souris où il est initié au cours des stades embryonnaires et se termine après la naissance (216). À E10.5, des lignes de lait sont définies de chaque côté de l'embryon par un épaississement et une stratification de l'ectoderme (**Figure 1.3.2 page 62**). Le jour suivant, on observe la formation de 5 placodes à partir de chacune de ces lignes de lait ce qui est accompagné d'une condensation du mésenchyme sous-jacent. Par la suite, ces placodes s'invaginent et envahissent le derme. À E15.5, le bouton d'épithélium mammaire prolifère abondamment et traverse le mésenchyme mammaire afin d'atteindre le stroma de la glande. Au jour E18.5, on observe des rudiments de canaux dans le stroma de la glande et les cellules du mésenchyme ont formé le mamelon (216, 217).



Figure 1.3.1 Anatomie de la glande mammaire des humains

Adapté de Simak Ali et R. Charles Coombes, Nature Review Cancer 2002 (215)

Les glandes mammaires sont situées dans les seins chez les humains qui sont situés devant les muscles des pectoraux et la cage thoracique formée par les côtes. Les glandes sont recouvertes de la peau et contiennent chacunes 15-20 lobes formés d'une série d'alvéoles et de canaux qui sont drainés au niveau du mamelon. Ils sont entourés du tissus adipeux et des fibroblastes du stroma.



Figure 1.3.2 Le développement des glandes mammaires chez la souris

Adapté de Nikolce Gjorevski et Celeste M. Nelson, Nature Review Molecular Cell Biology 2011 (218)

(A) Le développement des glandes mammaires est initié par la formation de 5 paires de placodes à E11.5. Ces placodes envahissent le derme et forment le bouton d'épithélium mammaire à E15.5. À E18.5, cet épithélium a envahi le stroma de la glande mammaire en formant une série de canaux rudimentaires. (B) À la puberté, les hormones ovariennes stimulent la prolifération et la formation des boutons terminaux (TEB) qui grâce à des cycles de prolifération, branchement et d'envahissement formeront l'épithélium de la glande adulte. Les hormones de grossesses entraînent la différentiation des cellules luminales en cellules productrices de lait et la formation des alvéoles. (C) Le TEB est formé d'un épithélium stratifié. Les cellules "cap" du TEB donnent naissance aux cellules myoépithéliales alors que les cellules "body" forment les cellules épithéliales luminales.

À la puberté, la production des hormones ovariennes, l'œstrogène et la progestérone, entraîne la prolifération des terminaisons des canaux rudimentaires et la formation d'un épithélium stratifié nommé bouton terminal (Terminal end bud; TEB) (219). Ces structures entreprennent des cycles de croissances, de branchements latéraux et de migrations jusqu'à ce qu'elles atteignent l'extrémité du stroma de la glande (220). Les cellules « Cap » du TEB donneront naissance aux cellules basales myoépithéliales alors que les cellules « Body » formeront les cellules épithéliales luminales. À maturité, la totalité du stroma mammaire est comblée par les canaux épithéliaux. Les hormones de grossesse; la prolactine, le lactogène et la progestérone, entraînent la prolifération des cellules luminales, leur différenciation en cellules productrices de lait et la formation des alvéoles (221, 222) (**Figure 1.3.2 page 62**). À la fin de la lactation, on observe une apoptose massive de l'épithélium mammaire et cette phase est nommée involution (223).

Enfin, plusieurs des voies de signalisation contribuant au développement ou à la croissance des glandes mammaires sont dérégulées dans le cancer du sein. Par conséquent, l'étude de leur développement et une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régulant la prolifération, la différenciation et la mort par apoptose des cellules épithéliales de ces glandes permettront de mieux comprendre l'importance de ces voies de signalisation dans la progression du cancer du sein.

1.3.2 Le cancer du sein

Le cancer du sein est incontestablement le cancer le plus fréquent chez les femmes et il représentait près de 23% des nouveaux cas de cancer diagnostiqués en 2008 dans le monde (224). Selon les données de statistique Canada, près d'une Canadienne sur 9 sera diagnostiquée atteinte d'un cancer du sein à un certain point dans sa vie. Malgré les percées importantes au niveau des traitements disponibles, la progression de la maladie demeure associée à de nombreux décès.

Le cancer du sein est une maladie hétérogène résultant d'une variété d'anomalies génétiques et il se développe selon une série de changements morphologiques (225). L'épithélium normal du sein est fait de lobes et de canaux formés d'une couche de cellules luminales épithéliales et d'une couche de cellules basales myoépithéliales. Une hyperplasie atypique est présente lorsqu'on observe une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales qui conservent néanmoins leur aspect presque normal. Cette augmentation de prolifération mène à la présence de couches cellulaires additionnelles dans les canaux ou les lobes. Cette lésion est considérée comme prémaligne. Il a été proposé que le carcinome in situ provienne de la progression des hyperplasies. Ce dernier est défini par la présence de cellules anormales qui prolifèrent tout en restant confinées à l'intérieur des canaux ou des lobes. Le carcinome canalaire in situ (DCIS pour Ductal carcinoma in situ) est le plus fréquent des cancers du sein non invasif chez la femme et il est le résultat d'un important spectrum d'anomalies génétiques modifiant la fonction d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeur (226). Les carcinomes invasifs sont observés lorsque les cellules cancéreuses acquièrent la capacité de se propager à l'extérieur des canaux et des lobes en envahissant la membrane basale et le stroma de la glande. Le risque de développer des métastases augmente considérablement chez les patientes présentant ces lésions. Il est généralement proposé que la progression du cancer du sein dans ces différentes étapes soit induite par une accumulation d'anomalies génétiques et de changements dans le microenvironnement. Par conséquent, la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la progression du cancer du sein permettra d'améliorer les thérapies en ciblant différentes étapes de la tumorigenèse.

Au fil du temps, les cliniciens ont développé différentes méthodes permettant de classifier le cancer du sein selon l'histologie (227), le grade (228), le stage (229), l'expression des récepteurs de l'œstrogène et de la progestérone (230) et l'expression du RTK HER2 (72). De plus, le profilage moléculaire a initialement permis de diviser le cancer du sein en cinq sous-types; les cancers du sein dits luminaux A et luminaux B, les cancers du sein dits HER2+, les cancers du sein de

phénotype basal et les cancers du sein de phénotype normal (231). La classification du cancer de la patiente dans un sous-type aura des conséquences sur la stratégie de traitement adoptée et sur le pronostic. Grâce aux avancées technologiques en génomique et en séquençage à haut débit, des études plus récentes ont permis de définir plusieurs nouveaux sous-types qui sont associés avec un pronostic chez les patientes. Il sera par conséquent intéressant d'observer les conséquences que ces études entraîneront dans le futur dans le traitement clinique de ces patientes (232-234).

Les cancers luminaux sont les plus fréquents et sont généralement associés à un bon pronostic. Ils expriment le récepteur de l'œstrogène et les luminaux B sont généralement de plus haut grade que les luminaux A (235). Une amplification du locus codant pour le récepteur HER2 ou une surexpression de la protéine HER2 est associée à près de 20% des cas de cancer du sein. Les cancers HER2+ développent fréquemment des métastases et présentent un plus faible pronostic (72). Enfin, les cancers de phénotype basal sont hétérogènes et regroupent près de 15 à 20% des cas (236). Ce groupe est caractérisé par la présence de cellules myoépithéliales exprimant les CYTOKERATIN 5/6. Ils sont souvent associés à une forme agressive de la maladie et présentent un mauvais pronostic. On retrouve dans ce sous-type les cas de cancer du sein familiaux présentant une mutation dans le gène BRCA1 (237). De plus certains des cancers dit triple négatif; soit ceux présentant une absence de l'expression des récepteurs de l'œstrogène et de la progestérone et une absence d'expression du RTK HER2 se retrouvent dans cette catégorie (238). Étant donné leur profil d'expression et l'absence de cible thérapeutique le traitement clinique de ces cancers est difficile (239).

1.3.3 Le récepteur HER2 et le cancer du sein

1.3.3.1 HER2 et la famille de récepteur à l'EGF

HER2 est un RTK membre de la famille des récepteurs à l'EGF contenant 4 membres; EGFR/HER1, HER2, HER3 et HER4 (240). Les récepteurs de cette famille sont composés de trois domaines fonctionnels; un domaine extracellulaire responsable de la liaison au ligand; un segment transmembranaire fait d'une hélice α; une queue cytoplasmique contenant les domaines à activité tyrosine kinase et d'interaction avec des intermédiaires de signalisation. Les récepteurs EGFR, HER3 et HER4 sont dans une conformation dite « fermée » à l'état basal et cette conformation rend leur domaine de dimérisation inaccessible (241). EGFR, HER3 et HER4 peuvent lier un répertoire de 10 ligands différents (240) (**Figure 1.3.3 page 68**). Le récepteur HER2 fait partie de la famille des récepteurs orphelins c'est-à-dire qu'il ne possède pas de ligand à lui seul. Des études cristallographiques ont toutefois démontré que ce récepteur est dans une conformation dite « ouverte » à l'état basal le rendant constitutivement disponible pour interagir avec les autres membres de la famille (242). Le récepteur HER3 ne possède pas de domaine kinase actif et dépend de son partenaire à ce niveau (243).

D'un point de vue moléculaire, la liaison des récepteurs avec un de leur ligands entraîne un changement de conformation permettant leur homo- ou leur hétérodimérisation avec les autres membres de la famille (244). Il est proposé que la dimérisation des récepteurs entraîne le rapprochement des domaines transmembranaires et cytoplasmiques permettant leur transphosphorylation sur la boucle d'activation (A) du domaine kinase résultant en une activation de ce domaine (245). La phosphorylation de la boucle A permet sa stabilisation dans une forme ouverte et étendue qui permet la liaison au substrat (246). Plus récemment, des études ont toutefois montré que la dimérisation du récepteur de l'EGF entraîne la formation de contact direct entre les domaines tyrosine kinase des deux récepteurs du dimère en trans. Plus précisément, le lobe C du domaine kinase d'un récepteur interagit avec le lobe N du domaine kinase de l'autre récepteur permettant l'activation

du domaine kinase de ce dernier de façon allostérique (245, 247). Il est envisageable que les autres membres de la famille soient régulés de façon similaire. De plus, il a été montré que la phosphorylation du site de régulation de la boucle A, les tyrosines 845 et 877 d'EGFR et d'HER2 respectivement, peut être induite par SRC directement indiquant que la kinase contribue à l'activation des récepteurs (248, 249). Enfin, l'activation du domaine kinase des récepteurs induit la phosphorylation des nombreux résidus tyrosines situés dans le domaine intracellulaire C-terminal. Ces résidus servent de site d'ancrage pour différentes voies de signalisation (**Figure 1.3.3 page 68**). Les récepteurs de la famille EGFR régulent notamment l'activité des MAP kinases, de la PI3 kinase, des SRC kinases et des facteurs de transcription de la famille STAT (250-252). Cette signalisation abondante permet à ces récepteurs de réguler la croissance, la survie et la différenciation cellulaire. L'activation constitutive des récepteurs à l'EGF est impliquée dans le développement de nombreux types de cancers et par conséquent les membres de cette famille représentent des cibles thérapeutiques hautement convoitées.

1.3.3.2 HER2 et le développement des glandes mammaires

HER2 chez l'humain est l'homologue du gène *Erbb2* chez la souris et du gène *NEU* chez le rat initialement identifié comme composante transformante des cellules de neuroblastome et similaire à l'oncogène viral *v-ERBB* (253, 254). Chez la souris, l'expression d'Erbb2 est essentielle à l'embryogenèse et les souris *Erbb2* KO meurent avant E11 des suites de défauts de développement cardiaque et neuronal (255). Toutefois, l'inactivation conditionnelle d'*Erbb2* spécifiquement dans les glandes mammaires a permis de révéler que ce gène est essentiel pour l'élongation des canaux de l'épithélium mammaire et le branchement latéral lors du développement de la glande (256). Toutefois, ces défauts ont peu d'impact sur la capacité de la glande à produire du lait (256).



Figure 1.3.3 Les récepteurs de la famille de l'EGF, leurs ligands et les voies de signalisation activées par ces récepteurs

Adapté de Nancy E. Hynes et Heidi A. Lane, Nature Review Cancer 2005 (240)

(A) EGFR/HER1, HER2, HER3 et HER4 forment la famille des récepteurs à l'EGF. EGFR, HER3 et HER4 peuvent lier 10 ligands entraînant leur homo- ou hétérodimérisation avec les autres membres de la famille. HER2 ne lie pas à lui seul de ligand et est à l'état basal dans une conformation favorisant son hétérodimérisation avec les autres membres de la famille. HER2 est surexprimé dans plusieurs cas de cancer du sein. (B) Représentation des sites majeurs de phosphorylation des récepteurs à l'EGF et des intermédiaires de signalisation liant ces sites.

1.3.3.3 Le cancer du sein HER2+

Tel que mentionné précédemment, une surexpression ou une amplification du locus codant pour le récepteur HER2 est présente dans 20% à 30% des cas de cancer du sein et cette anomalie corrèle avec un mauvais pronostic (72). Une surexpression du récepteur est aussi observée dans des cas de cancer des ovaires, de cancer gastrique et de cancer des glandes salivaires (257-259). Étant donné l'importance de ce récepteur, plusieurs stratégies ont été développées afin de cibler les cellules cancéreuses du sein surexprimant HER2. Depuis son approbation clinique en 1998, les patientes HER2+ peuvent recevoir le Trastuzumab (Herceptin) en combinaison avec la chimiothérapie (260). Le Trastuzumab est un anticorps monoclonal liant le domaine IV de la portion extracellulaire du récepteur HER2 qui s'est avéré cliniquement efficace pour augmenter la survie des patientes HER2+ (261-263). Le Trastuzumab inhibe la prolifération et la survie des cellules tumorales notamment en bloquant la signalisation en aval du récepteur HER2 et en marguant les cellules tumorales pour leur reconnaissance par les cellules immunitaires cytotoxiques (264-271). Toutefois, certaines patientes ne répondent pas au traitement avec le Trastuzumab et d'autres développent une résistance à ce traitement. Notamment, il a été observé que certaines patientes possédant des mutations permettant une activation de la voie de la PI3K indépendamment du récepteur HER2 ne répondent pas au Trastuzumab (268, 272).

D'autres stratégies exploitant la liaison d'anticorps au récepteur HER2 ont été développées et sont présentement testées en clinique. C'est le cas notamment du Trastuzumab-DM1. Dans cette méthode, l'anticorps est couplé à l'agent antimicrotubules DM1. La liaison de l'anticorps aux cellules cancéreuses permet de délivrer l'agent de façon spécifique. L'anticorps est internalisé suite à sa liaison à la cellule et permet à la drogue d'exercer son action cytotoxique seulement dans les cellules tumorales (273, 274). Enfin, le Pertuzumab est un anticorps monoclonal liant le domaine II de la portion extracellulaire du récepteur. Comparativement au Trastuzumab, le Pertuzumab empêche l'hétérodimérisation d'HER2 avec les autres membres de la famille EGFR lorsqu'ils sont liés à des ligands (275). En 2012, le Pertuzumab a été approuvé aux Etats-Unis pour le traitement des patientes HER2+ ayant des métastases. Enfin, certaines études cliniques suggèrent qu'il serait avantageux d'utiliser une combinaison du Pertuzumab et du Trastuzumab pour le traitement de ces patientes (276).

Enfin, d'autres stratégies cliniques visent à inhiber la signalisation induite par HER2 en bloquant son activité tyrosine kinase. Le Lapatinib (Tykerb) est un inhibiteur des tyrosines kinase dirigé contre EGFR et HER2 (277). Le traitement des patientes avec le Lapatinib en combinaison avec le Capecitabine est maintenant accepté pour les patientes avec un stade avancé de cancer du sein et ayant préalablement reçu de la chimiothérapie avec Anthracycline, Taxane et Trastuzumab (277). Étant donné sa petite taille, le Lapatinib peut traverser la barrière sanguine ce qui peut contribuer à la diminution des métastases observée chez les patientes. L'utilisation du Lapatinib en combinaison avec le Trastuzumab est présentement testée (278, 279).

De nombreux progrès ont été réalisés au cours des dernières années pour améliorer le traitement des patientes de cancer du sein HER2+ grâce à la disponibilité du Trastuzumab et du Lapatinib. Ces stratégies sont de réels succès cliniques. Toutefois, certaines patientes ne répondent pas à ces traitements ou développement éventuellement des résistances et la maladie progresse vers le développement de métastases. Par conséquent, la compréhension des mécanismes moléculaires favorisant la progression de la maladie au stade métastatique demeure essentielle afin de développer de nouveaux agents qui pourraient êtres utilisés en combinaison avec les agents existants.

1.3.3.4 Les modèles de cancer du sein induits par l'oncogène HER2

Suite à la découverte d'une corrélation entre les niveaux d'expression du récepteur HER2 et un mauvais pronostic chez les patientes de cancer du sein, des modèles de souris ont été développés afin de comprendre le rôle de ce récepteur

dans la tumorigenèse (72). Ces modèles ont permis d'illustrer qu'une surexpression du récepteur était suffisante à l'initiation de tumeur (73). De plus, l'utilisation de modèle bigénique a permis d'identifier des molécules qui agissent en aval d'HER2 et d'ainsi mieux concevoir les mécanismes moléculaires employés par cet oncogène à certaines étapes de la progression tumorigénique.

La majorité de ces modèles de souris permet l'expression de *NEU*, l'orthologue d'*HER2* chez le rat, dans les glandes mammaires grâce au promoteur LTR du virus des tumeurs mammaires de souris (MMTV). MMTV est un rétrovirus associé au développement de carcinomes des glandes mammaires chez la souris (280). L'utilisation des LTR de MMTV permet de diriger l'expression de transgènes spécifiquement dans les cellules épithéliales luminales des canaux et des alvéoles et dans les cellules myoépithéliales basales de la glande entre la première et la troisième semaine suivant la naissance (281, 282). L'activité du promoteur augmente avec la puberté et elle est régulée par les hormones stéroïdiennes soit la progestérone et de la dihydrotestostérone (281). Néanmoins, un certain niveau d'expression des transgènes est aussi observé dans d'autres tissus (283).

- Le modèle MMTV-NEU-NT

Le premier modèle de souris développé à la fin des années 1980 par le groupe du Dr Leder permet d'exprimer la forme *NEU-NT* sous le contrôle du promoteur *MMTV* dans les glandes mammaires (283). Le mutant *NEU-NT* consiste en une substitution de la Valine 664 située dans le domaine transmembranaire de NEU par un résidu Glutamate (284). Cette mutation permet la dimérisation du récepteur NEU indépendamment de la présence de ligand et le rend constitutivement actif (285). Les souris *MMTV-NEU-NT* développent des tumeurs très rapidement, soit près de 3 mois après leur naissance et la totalité de l'épithélium de la glande est transformée par la présence de tumeurs multifocales (283). Peu après cette étude, le groupe du Dr Jolicoeur rapporte la création d'un modèle similaire (286). Dans cette étude, l'initiation du développement tumoral nécessite toutefois une période de latence beaucoup plus

longue. Des différences au niveau du site d'intégration et du nombre de copies du transgène menant à des niveaux d'expression différents de *NEU-NT* sont proposées pour expliquer les distinctions entre les phénotypes de ces deux modèles.

- Le modèle MMTV-NEU sauvage

Malgré les différences observées entre les modèles de Leder et de Jolicoeur, il demeurait clair que l'expression de la forme NEU-NT entraînait la formation de tumeurs dans les glandes mammaires (283, 286). Néanmoins, des mutations similaires à la forme NEU-NT dans le locus d'HER2 chez les patientes HER2+ ne sont pas observées. Le modèle MMTV-NEU a été créé afin d'étudier le potentiel tumorigénique du récepteur sauvage (287) (Figure 1.3.4 page 73). Les souris MMTV-NEU développent des tumeurs focales dans les glandes mammaires. Cependant, la latence est d'environ 7 mois ce qui est beaucoup plus long que ce qui est observé chez les souris MMTV-NEU-NT. De plus, il a été observé que la majorité des tumeurs provenant des souris MMTV-NEU n'exprime pas la forme sauvage de la protéine (287). Le récepteur NEU exprimé dans ces tumeurs contient des délétions ou des insertions de cystéines dans le cDNA du transgène codant pour le domaine extracellulaire (288). Ces mutations ont pour conséquence de permettre la dimérisation du récepteur et elles le rendent constitutivement actif (Figure 1.3.4 page 73). Encore une fois, aucune mutation somatique entraînant ces délétions ou ces insertions de cystéine n'a été rapportée chez les patientes.

- Le modèle MMTV-NEU-NDL

Plusieurs études ont toutefois décrit l'expression d'un transcrit alternatif du récepteur HER2 qui entraîne la délétion de 16 acides aminés près du domaine transmembranaire chez les patientes HER2+ (289, 290) (**Figure 1.3.4 page 73**). Ce transcrit alternatif est aussi constitutivement actif étant donné sa capacité à former des homodimères. Ce transcrit ne représente cependant qu'une faible proportion de récepteurs HER2 surexprimés chez les patientes. Des souris exprimant des formes



Figure 1.3.4 HER2 et les variants NEU oncogéniques

Adapté de Josie Ursini-Siegel et al., Nature Review Cancer 2007 (73)

Les délétions observées dans l'oncogène NEU ressemblent au transcrit alternatif de HER2 observé chez les patientes de cancer du sein. Ces délétions entraînent un débalancement de cystéine permettant la formation de pont disulphide entre deux molécules du récepteur permettant son activation constitutive. Les séquences représentées correspondent à la région juxtamembranaire du récepteur.

du récepteur (NEU-NDL1 et NEU-NDL2) contenant des délétions dans le domaine extracellulaire similaire au transcrit alternatif observé chez les patientes et aux mutations observées dans le cDNA du transgène des tumeurs MMTV-NEU ont été générées (289). La contribution de ces mutants de délétion à la tumorigenèse a été évaluée. Les souris MMTV-NDL développent des tumeurs dans les glandes mammaires avec une latence intermédiaire aux mutants MMTV-NEU-NT et MMTV-NEU suggérant que ces formes du récepteur sont oncogéniques et que le transcrit alternatif observé chez les patientes contribue à la pathologie. Chez les patientes, on observe une augmentation de l'expression d'HER3 et une augmentation de l'expression d'Erbb3 est aussi observée chez les souris MMTV-NDL. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression d'Erbb3 est un aspect important de la progression de la maladie (289). Plus récemment, des études ont démontré que l'élimination de l'expression d'Erbb3 dans les glandes mammaires de souris exprimant la forme oncogénique NEU-NDL entraînait une diminution dramatique de l'incidence tumorale indiguant qu'Erbb3 contribue à la transformation oncogénique induite par NEU (291).

-Le modèle MMTV-rTA;TetO-NEU-NT

Ces différents modèles ne permettaient toutefois pas de déterminer si l'expression de l'oncogène doit être maintenue une fois que les tumeurs sont présentes. Un modèle bigénique a été développé afin de tester cette hypothèse. Dans ce modèle, l'expression de *NEU-NT* est sous le double contrôle du promoteur de *MMTV* et des éléments de régulation de la tétracycline (*MMTV-rTA;TetO*) (292). L'administration de la doxycycline permet l'expression de *NEU-NT* et entraîne la formation de tumeur rapidement chez les souris transgéniques. Il a été observé que l'arrêt de l'administration de la doxycyline entraîne une perte rapide de l'expression de *NEU-NT* en plus de la régression des tumeurs et des métastases aux poumons. Ces résultats suggèrent que les tumeurs induites par NEU suivent le concept d'addiction à un oncogène. Ce phénomène suggère que la croissance et la survie des cellules tumorales puissent souvent être compromises par l'inactivation d'un seul

oncogène malgré les nombreuses anomalies génétiques présentes dans une tumeur (293). Suite à l'arrêt de la doxycycline, plusieurs souris vont toutefois développer des tumeurs indépendamment de l'expression de *NEU-NT* et il est possible que la réapparition des tumeurs provienne de la réactivation de cellules de la tumeur primaire qui seraient restées dormantes (292).

- Le modèle MMTV-NIC

Les souris *MMTV-NIC* ont été créées dans l'optique de développer des modèles bigéniques et d'évaluer la contribution de molécule d'intérêt à la tumorigenèse induite par HER2 (74). Dans ces souris, on retrouve l'expression du variant *NEU-NDL2.5* sous le contrôle du promoteur MMTV. Le transcrit *NEU* est aussi couplé à un IRES permettant l'expression de la Cre recombinase spécifiquement dans les cellules des glandes mammaires surexprimmant l'oncogène. Cette stratégie permet d'éviter l'émergence d'une population de cellule exprimant l'oncogène mais n'exprimant pas la Cre recombinase. Le croisement des souris *MMTV-NIC* avec des souris possédants des allèles floxés pour un gène d'intérêt permet d'évaluer la contribution de ce dernier au développement tumoral. Les souris *MMTV-NIC* développent de multiples adénocarcinomes entre 4 et 5 mois après leur naissance et plus de la moitié des souris développent des métastases (74).

- Le modèle NEU-NT « knock-in »

Tous les modèles décrits précédemment ont tiré avantage de l'expression forcée des transgènes dans les glandes mammaires grâce au promoteur MMTV. Néanmoins, ces modèles comportent certains désavantages. Notamment, plusieurs copies du transgène sont intégrées de façon aléatoire dans le génome ce qui peut influencer les niveaux d'expression de ce transgène et rend la comparaison entre les clones de souris et les différents modèles plus difficiles. De plus, l'expression du transgène *NEU* n'est pas soumise à la même régulation que le locus endogène ou amplifié des patientes HER2+. Par conséquent, un nouveau modèle de souris a été

développé permettant l'expression d'une copie du transgène *NEU-NT* sous le contrôle du promoteur endogène du gène *Erbb2* de la souris (294). L'expression de cet allèle entraîne la formation de structure lobulo-alvéolaire dans les glandes mammaires et l'on observe l'apparition de tumeurs dans l'une des glandes mammaires après une longue période de latence. Ces tumeurs sont très peu métastatiques (294). La présence de tumeurs dans ce modèle corrèle avec une augmentation de l'expression de *NEU*. Dans plus de la majorité des cas, cette surexpression est le résultat direct d'une amplification du transgène *NEU-NT* ce qui récapitule l'amplification du locus *HER2* observée chez les patientes (294).

- Les modèles de souris versus le cancer du sein chez les humains

Les différents modèles de souris du cancer du sein ont été un outil précieux afin d'évaluer la contribution de certains oncogènes et de gènes suppresseurs au développement tumoral en plus de permettre d'identifier certains de leur collaborateur. Les modèles de souris récapitulent plusieurs aspects de la maladie chez les humains comme le développement de métastases. De plus, les cancers du sein originent généralement des cellules luminales de la glande et une observation similaire a été notée chez les modèles de souris (295-298). Toutefois, certains éléments doivent être pris en considération lors de leur analyse et sont discutés brièvement.

Premièrement, plusieurs études ont démontré que le stroma contribue activement à la progression tumorale. Les cellules cancéreuses et les cellules du stroma entretiennent une relation étroite et elles influencent les réponses de chacune (299). Or chez la souris, le stroma contient majoritairement des adipocytes alors que l'on observe une grande proportion de fibroblastes chez les humains. Par conséquent, il est possible que les réponses observées chez la souris. De plus, près de la moitié des cas de cancer du sein exprime le récepteur de l'œstrogène alors que la majorité des lésions générées chez la souris n'exprime pas ce récepteur.

Il est par conséquent difficile d'évaluer la contribution de cette hormone chez la souris (234, 298).

Enfin, le cancer du sein se propage initialement aux ganglions lymphatiques chez les patientes. Par la suite, les organes ciblés par la formation des métastases sont majoritairement les os, le cerveau, les glandes surrénales, le foie et les poumons. Suite au développement d'une tumeur primaire chez la souris, les métastases spontanées se développent presque exclusivement aux poumons. Par conséquent, les mécanismes régissant la formation des métastases dans les autres organes ne peuvent êtres investigués grâce à ces modèles. Des modèles expérimentaux ont été développés afin d'étudier la formation des métastases dans d'autres organes. Bien que ces différences existent, les modèles de souris demeurent une ressource inestimable pour évaluer la contribution d'un gène d'intérêt au sein d'une voie de signalisation oncogénique dans le contexte d'un organisme où de nombreux types cellulaires influencent la progression tumorale.

1.3.4 Le développement des métastases

1.3.4.1 La cascade métastatique

Les cancers HER2+ développent fréquemment des métastases et de façon plus générale la majorité des décès associés au cancer du sein sont attribués au développement de métastases, soit à l'apparition de tumeurs secondaires situées à distance de la tumeur originale. De ce fait, l'identification de molécules régulant différents aspects de la cascade métastatique demeure une priorité. La formation de métastases est un processus complexe, mais qui demeure somme toute inefficace. Il requiert l'acquisition de plusieurs caractéristiques par la cellule cancéreuse et nécessite la contribution du stroma. De plus, les cellules cancéreuses semblent coloniser seulement certains microenvironnements pour lesquels elles ont une affinité. C'est ce qui est à la base de l'hypothèse de la « graine » et du « sol » proposée par le Dr Paget à la fin du 19^e siècle (300). Chez les patientes atteintes du

cancer du sein, les métastases se développent en majorité au niveau des os, mais on en retrouve aussi au niveau du foie, des poumons et du cerveau (301).

La cascade métastatique est divisée en plusieurs étapes (302) (Figure 1.3.5 page 79). L'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur permet la croissance et la survie des cellules de la tumeur primaire (Figure 1.3.5 A page 79). Parmi les cellules tumorales certaines deviennent motiles et acquièrent la capacité d'envahir la membrane basale et le stroma (Figure 1.3.5 B page 79). Ces cellules se propagent aux ganglions lymphatiques ou entrent à l'intérieur des vaisseaux sanguins (Figure 1.3.5 C, D page 79). Certaines cellules ayant survécu à la circulation sanguine peuvent ensuite s'arrêter et sortir des vaisseaux pour coloniser un organe distant de la tumeur primaire (Figure 1.3.5 E page 79). Les cellules métastatiques peuvent rester dormantes dans cet organe pendant plusieurs années et ensuite proliférer pour générer les métastases (Figure 1.3.5 F, G page 79). L'augmentation de la motilité des cellules cancéreuses et de leur capacité à envahir la membrane basale constitue l'une des étapes limitantes au développement des métastases. Les cellules cancéreuses ont développé une variété de méthode leur permettant de se propager.

1.3.4.2 Les modes de migration cellulaire

Plusieurs modes de migration ont été décrits permettant aux cellules d'envahir le tissu environnant (60) (**Figure 1.3.6 page 80**) Notamment, les cellules cancéreuses peuvent migrer collectivement ou de façon individuelle (303, 304). De plus, les cellules individuelles peuvent utiliser le mode de migration dit amiboïde ou mésenchymal. Le choix du type de migration est notamment influencé par le type cellulaire, le microenvironnement et les voies de signalisation activées. De plus, ces différentes possibilités permettent aux cellules cancéreuses de s'adapter aux changements de microenvironnement rencontrés en plus de favoriser le développement d'une résistance face à des thérapies qui viseraient à éliminer un mode de migration en particulier.



Figure 1.3.5 La cascade métastatique

Adapté de PS Steeg, Nature Review Cancer 2003 (302)

(A) Les cellules tumorales prolifèrent et génèrent une tumeur primaire. (B) Des cellules de la tumeurs acquièrent la capacité d'envahir la membrane basale et le stroma. (C) Ces cellules peuvent se propager dans les ganglions lymphatiques ou (D) entrer dans la circulation sanguine. (E) Certaines cellules ayant survécu à la circulation sanguine s'arrêtent et sortent des vaisseaux pour coloniser un nouvel organe. (F) Les cellules cancéreuses peuvent rester en dormance dans cet organe pendant une longue période pour éventuellement (G) proliférer et générer des tumeurs secondaires.



Figure 1.3.6 Les modes de migration lors de l'invasion tumorale

Adapté de Peter Friedl and Katarina Wolf, Nature Review Cancer 2003 (60)

Les cellules tumorales peuvent envahir le tissu environnant de façon collective ou individuellement. Les cellules seules peuvent migrer selon le mode dit amiboïde ou mésenchymal. La migration collective requiert la fonction des cadhérines et les jonctions intracellulaires sont maintenues. Lors de la migration mésenchymale, les contacts focaux médiés par l'interaction des intégrines avec la matrice extracellulaire sont requis au front de migration ainsi que la dégradation de la matrice extracellulaire par les protéases. La migration amiboïde est indépendente des intégrines et des protéases.

- La migration individuelle

Lors de la migration amiboïde, les cellules tumorales utilisent les interstices dans la matrice extracellulaire pour se déplacer en se contractant et elles requièrent peu d'adhésion avec cette matrice (60, 305, 306) (**Figure 1.3.6 page 80**). Les cellules demeurent rondes et migrent grâce à la formation de bourgeons par une augmentation de la contractilité cellulaire induite par l'actine corticale. La migration amiboïde est donc dépendante de l'activation de la voie de signalisation Rho/ROCK alors que l'action des protéases et la formation de contacts focaux médiés par les intégrines ne sont pas requises (60, 307). Ce type de migration est généralement observé dans les lymphomes et les leucémies (308).

En contraste, les cellules se déplaçant selon le type de migration mésenchymale forment d'importants contacts avec la matrice extracellulaire et requièrent l'action des intégrines et des protéases (60) (**Figure 1.3.6 page 80**). Plus spécifiquement, on peut diviser ce type de migration en cinq grandes étapes qui sont brièvement décrites (60) (**Figure 1.3.7 page 83**) :

1) La formation d'une protusion au front de migration :

Les récepteurs des cytokines et des facteurs de croissances entraînent notamment l'activation de la voie de la PI3K menant à la formation de PIP3 (309). Des RHO GEFs sont activées et médient l'activation des RHO GTPases au front de migration (310). La polymérisation des filaments d'actine induite par l'activation du complexe ARP2/3 par WASP permet de repousser la membrane cellulaire et entraîne la formation de protusion (311). Plus spécifiquement, l'activation de RAC entraîne la formation d'un lamellipode et l'activation de CDC42 contribue à la formation de filopodes (310).

2) La formation de contact focaux :

Au front de migration, les intégrines interagissent avec la matrice extracellulaire ce qui induit leur agrégation à la membrane (312). Leur domaine

intracellulaire recrute de nombreuses protéines adaptatrices et de signalisation. Notamment, le recrutement de FAK contribue à la formation des contacts focaux. Les contacts focaux sont des structures d'adhésion qui permettent d'ancrer la terminaison des filaments d'actine et induisent un attachement solide au substrat de la cellule (313).

3) La dégradation de la matrice extracellulaire :

De nombreuses protéases sont recrutées et se retrouvent regroupées au site de contact avec la matrice où elles agissent en coupant les composantes de cette matrice extracellulaire comme le collagène, la fibronectine et la laminine. Les matrices metalloprotéases (MMP) sont les principales protéases impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire (314). Elles permettent de réorganiser la matrice au front de migration afin de favoriser la migration.

4) La contraction d'actomyosine :

La myosine à chaîne légère (MLC) active la MYOSIN II suite à sa phosphorylation. La petite GTPase RHO régule la contraction d'actomyosine via son effecteur ROCK qui phosphoryle et ainsi inhibe la phosphatase de myosine à chaîne légère (MLCPtase) ce qui l'empêche de déphosphoryler la MLC. La MYOSIN II activée lie l'actine et génère les contractions d'actomyosine. La contraction du réseau d'actomyosine permet de générer suffisamment de traction pour relocaliser le noyau et le corps cellulaire à l'avant (315).

5) Le détachement de l'arrière de la cellule :

Les contacts focaux à l'arrière de la cellule sont désassemblés. Une augmentation de l'activité des phosphatases à l'arrière de la cellule prévient la formation de nouveaux contacts (316). Les intégrines sont internalisées et recyclées à l'avant de la cellule (317).


1) Formation d'une protusion au front de migration



4) Contraction d'actomyosine



3) Dégradation de la matrice extracellulaire







 Filament d'actine
Complexe Arp2/3
WASP
Intégrine
Fragments de matrice extracellulaire
FAK
Matrice extracellulaire partiellement dégradée
Phosphatases
Myosine II

Figure 1.3.7 La migration mésenchymale en 5 étapes

Adapté de Peter Friedl et Katarina Wolf, Nature Review Cancer 2003 (60)

Voir texte pour description.

- La migration collective

Enfin plutôt que de migrer seule, les cellules peuvent migrer en groupe. Les contacts cellulaires sont maintenus lors de la migration collective (318) (**Figure 1.3.6 page 80**). Les cellules situées à l'avant du groupe ont une grande motilité et elles génèrent des pseudopodes (318, 319). Elles se déplacent selon un mode ressemblant à la migration mésenchymale et leur force de migration permet d'entraîner les cellules de l'arrière sur leur route. Deux types de migration collective ont pu être observés dans les tumeurs. Dans le premier, on observe la formation d'un groupe de cellules détaché de la tumeur primaire qui se déplacent en empruntant la route offrant le moins de résistance (60). Le second décrit la migration d'un feuillet de cellules qui envahit le tissu en gardant contact avec la tumeur primaire (60).

De façon générale, les RHO GTPases sont d'importants régulateurs de la migration cellulaire et elles représentent une importante famille de molécule permettant la migration des cellules cancéreuses. Leur activité a été identifiée et varie selon les types de migration cellulaire.

1.3.5 HER2 et la signalisation en aval dans le cancer du sein

L'étude de la signalisation en aval d'HER2 est un champ d'investigation particulièrement actif (240). Plusieurs molécules contribuant à la transformation par HER2 ont été identifiées et parmis ces molécules un grand nombre favorise la survie et la croissance des cellules tumorales (320-327). Les patientes HER2+ développement fréquemment des métastases, or les mécanismes moléculaires régulant l'invasion cellulaire en aval d'HER2 demeurent toutefois méconnus et les molécules identifiées qui contribuent à l'invasion tumorales *in vivo* sont décrites brièvement dans cette section.

- Tgf**β**

Le Tfg β est une cytokine qui régule différents processus cellulaires comme la différenciation, la prolifération et la motilité (328, 329). Le rôle de cette voie de signalisation dans les glandes mammaires est complexe et il est généralement accepté qu'elle agisse à titre de régulateur négatif de la prolifération des cellules épithéliales (330, 331). Or, plusieurs études ont montré qu'une activation de la voie du Tgf β entraîne une transformation épithéliale à mésenchymale (332). La contribution de cette voie à la tumorigenèse induite par HER2 a été évaluée et il a été observé dans plusieurs modèles de souris *MMTV-NEU* que l'activation de la signalisation du Tgf β augmente la capacité des cellules tumorales à former des métastases notamment en favorisant leur extravasation dans le parenchyme des poumons (333-335).

- AKT

Une augmentation de l'activité d'AKT-1 est observée dans un grand nombre de cancer du sein et corrèle avec un mauvais pronostic (336, 337). L'expression d'une forme constitutivement active d'Akt-1 spécifiquement dans les glandes mammaires de souris *MMTV-NEU-NDL* entraîne une accélération de la formation des tumeurs (338). Les cellules tumorales surexprimant la forme active d'Akt prolifèrent plus, mais elles sont plus différenciées et les souris surexprimant Akt-1 développent moins de métastases que les souris *MMTV-NEU-NDL* (338).

- PTEN

Pten est une phosphatase des lipides qui déphosphoryle le PIP₃ et ainsi régule négativement la voie de la PI3K/Akt. Une inactivation de PTEN via différents mécanismes est associée à près de 50% des cancers humains (339). De plus, une perte de son expression est reliée aux mécanismes de résistance au Trastuzumab chez les patientes de cancer du sein HER2+ (268). Afin d'évaluer le rôle de PTEN dans la progression tumorale induite par HER2, l'expression de Pten a été éliminée

spécifiquement dans les glandes mammaires des souris *MMTV-NIC* (340). Une accélération significative de la formation des tumeurs, de l'incidence des métastases et de leur nombre est observée en absence de son expression (340). De plus, on observe une augmentation de la vascularisation et une hyperactivation de la voie de la PI3K/AKT dans les tumeurs dérivées des souris *Pten*-nulles (340).

- PTP1B

PTP1B est une protéine tyrosine phosphatase encrée dans les membranes du réticulum endoplasmique et dont la portion catalytique se retrouve dans le compartiment cytoplasmique (341). L'action de PTP1B est généralement associée à une régulation négative du métabolisme, mais plusieurs études ont maintenant contribué à révéler que l'activité de la phosphatase semble aussi exercer un rôle positif dans la prolifération cellulaire (342). En effet, PTP1B est surtout connue pour son rôle dans l'inhibiton de la signalisation par l'insuline en déphosphorylant le récepteur de l'insuline et les protéines IRS (343). PTP1B régule aussi négativement la signalisation par la leptine en entraînant la déphosphorylation de JAK2 (343). Or, PTP1B peut aussi déphosphoryler un site de régulation négative de la kinase Src (344). Il a été observé que la phosphatase est surexprimée dans un grand nombre de cancer et l'expression de NEU dans des cellules de cancer du sein augmente l'expression de PTP1B (345, 346). Afin d'étudier la contribution de cette phosphatase au développement tumoral, une souris PTP1B KO a été croisée avec les souris MMTV-NEU-NDL et avec les souris MMTV-NEU-NT (347, 348). Une augmentation de la période de latence avant l'apparition des premières tumeurs est observée en absence de PTP1B dans ces deux modèles (347, 348). Une diminution de l'incidence de la formation des métastases a aussi été décrite dans le modèle MMTV-NEU-NDL en absence de PTP1B (347). De plus, le traitement des souris MMTV-NEU-NDL avec un inhibiteur pharmacologique de PTP1B entraîne un délai dans la formation des tumeurs. L'élimination de PTP1B dans ces tumeurs réduit l'activation des MAP kinase et de la voie AKT (347). Toutefois, l'élimination de PTP1B est totale dans ces deux modèles de souris et non restreinte au compartiment épithélial de la glande

mammaire (347, 348). Néanmoins, il a été observé que la surexpression de PTP1B spécifiquement dans le compartiment épithélial des glandes mammaires entraîne la formation d'adénocarcinomes chez les souris suite à des grossesses répétées (347).

- Les intégrines

De nombreuses études ont montré que l'activation des intégrines via leur liaison à la matrice extracellulaire module l'activité de RTKs dans plusieurs systèmes biologiques (349, 350). Le croisement d'une souris avec un allèle *ltgβ1* conditionnel avec le modèle de souris *MMTV-NIC* a été réalisé afin d'étudier la contribution de cette intégrine dans la progression tumorale induite par HER2 (351). L'inactivation de l'*ltgβ1* entraîne un délai quoi que faible dans l'apparition des premières tumeurs. Le volume tumoral est réduit en absence de l'expression de l'Itgβ1 et corrèle avec une augmentation de l'apoptose des cellules tumorales et une diminution de la vascularisation des tumeurs. Une diminution de l'incidence et du nombre de métastases est aussi observée en absence de l'Igtgβ1. Il a été observé que l'élimination de l'expression de cette intégrine en particulier entraîne une diminution de l'activation des molécules impliquées dans la formation des contacts focaux (351).

La contribution de l'Itgβ4 a aussi été évaluée en exprimant une protéine tronquée sans la queue cytoplasmique dans un modèle de souris *MMTV-NEU* (352). Chez ces souris, l'élimination de la signalisation par l'Itgβ4 entraîne un délai dans l'apparition des tumeurs en plus de diminuer de façon significative la croissance tumorale et la formation de métastases (352). Il a été montré que l'Itgβ4 forme un complexe avec HER2 ce qui permet de potentialiser l'activation des facteurs de transcription c-Jun et Stat3 en aval de la kinase Src (352). L'activation de Stat3 contribue à la perte de polarité de ces cellules et ainsi contribue à leur capacité d'invasion (352).

- STAT3

STAT3 est constitutivement activé dans une grande proportion de cancer et des hauts niveaux d'expression ou d'activation de ce facteur de transcription corrèlent avec un mauvais pronostic (353-357). Tel que mentionné, Stat3 contribue à la perte de polarité cellulaire en aval du module HER2/Itgβ4 (352). Afin d'étudier plus spécifiquement sa contribution à la progression tumorale, des souris *MMTV-NIC* ont été croisées avec des souris ayant un allèle *Stat3* conditionnel (358). Dans ces souris, l'élimination de l'expression de Stat3 n'affecte pas l'incidence et l'initiation des tumeurs. Toutefois, l'incidence des métastases et le nombre de métastases par souris sont significativement réduits (358). Des études de profil d'expression ont révélé que l'expression de Stat3 est essentielle pour l'expression d'un réseau de gènes impliqués dans l'inflammation et l'angiogenèse dans ces tumeurs (358). D'autres études ont montré que l'expression d'une forme constitutivement active de Stat3 chez des souris *MMTV-NEU* accélère la formation des tumeurs mammaires en plus d'augmenter le potentiel invasif de ces tumeurs (359).

1.3.6 DOCK1 et les récepteurs à activité tyrosine kinase

Plusieurs études ont maintenant démontré une activation de la voie DOCK1/RAC suite à l'activation de RTKs. Tout d'abord, chez la drosophile, mbc est essentiel à la migration des cellules de bordure en aval du récepteur relié au PDGF et VEGF (PVR) (68). Les cellules de bordures sont un ensemble de cellules formé de 6 cellules migratoires situées à l'extérieur et de 2 cellules non-migratoires situées au centre du groupe (360). Les cellules de bordures se détachent de l'épithélium folliculaire au pôle antérieur et migrent vers l'oocyte au pôle postérieur durant l'oogenèse. Une fois au pôle postérieur, le groupe de cellule migre ensuite dorsalement vers le noyau de l'oocyte sur une courte distance (361). La migration postérieure est contrôlée par le PVR et le RTK de l'EGF (EGFR) qui agissent de façon redondante (68, 362). La voie mbc/Rac agit en aval du PVR et la migration des cellules de bordure est compromise chez les mutants de *mbc* (68). La migration

postérieure est divisée en deux phases (363). Dans la première, une ou deux cellules deviennent polarisées à l'avant du groupe et dirigent la migration en émettant des protusions et en tirant le reste du groupe (363). Il a été montré que delmo est essentiel à cette première phase de migration (363). Dans la deuxième phase, les cellules deviennent rondes et alternent de position à l'avant du groupe de façon plus aléatoire. Ces résultats suggèrent que la voie ELMO/DOCK1/RAC pourrait contribuer à l'invasion cellulaire et à la formation de métastases.

Chez les patients ayant un glioblastome, une amplification du locus codant pour le RTK du PDGF (PDGFR α) ou une surexpression du variant III du récepteur de l'EGF (EGFRvIII) est souvent observée et ces anomalies corrèlent avec un mauvais pronostic. Dans des sections de glioblastome provenant de patients, une augmentation de l'expression de DOCK1 et d'ELMO1 est observée dans les régions invasives des tumeurs (70). Le traitement de lignée de glioblastome avec le ligand du PDGFR α entraîne l'activation d'AKT, d'ERK1/2 et de RAC en plus d'augmenter la migration cellulaire. Il a été observé que l'élimination de l'expression de DOCK1 dans ces cellules bloque ces réponses induites par le PDGF-A (11). La formation de tumeurs invasives est observée lorsque des cellules de glioblastome exprimant le PDGF-A sont injectées dans le cerveau de souris. L'élimination de l'expression de DOCK1 dans ces cellules bloque leur capacité à proliférer et à former ces tumeurs invasives suggérant que DOCK1 agit en aval du récepteur. Il a été montré que l'activation du PDGFR α entraîne le recrutement de DOCK1 et sa phosphorylation via la kinase SRC à la tyrosine 1811 (11).

Le traitement de cellules de glioblastome à l'EGF ou l'expression de l'EGFRvIII entraîne aussi la phosphorylation de DOCK1, mais cette fois-ci c'est la tyrosine 722 qui est phosphorylée par les SFK kinases (12). L'expression d'EGFRvIII dans les cellules de glioblastome active AKT, ERK1/2 et RAC en plus de promouvoir la migration cellulaire. L'élimination de l'expression de DOCK1 dans ces cellules bloque ces réponses suggérant que DOCK1 agit en aval de l'EGFRvIII. L'injection de cellules

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+ développement 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. Néamoins, les mécanismes moléculaires régulant la formation des métastases en aval de l'oncogène HER2 demeurent méconnus.

1.4 LES OBJECTIFS DE RECHERCHE

Dock1 est membre de la famille des Dock GEFs, une famille atypique d'activateur des petites GTPases de la famille Rho. Dock1 agit au sein d'une cascade de signalisation conservée au cours de l'évolution et des études réalisées dans des organismes modèles ont montré que les orthologues de Dock1 activent Rac dans différents processus biologiques. Lors du développement de la drosophile, mbc est exprimé dans les FCMs et agit en amont de Rac afin de promouvoir la fusion de ces cellules avec les FMs et ainsi former les fibres musculaires plurinucléées. Mbc est aussi essentiel à la migration collective des cellules de bordures lors de leur invasion dans la chambre de l'oocyte suite à l'activation du RTK PVR. La migration collective des cellules de bordures récapitule certains des événements observés lors de la formation de métastases. Chez les mammifères, des études réalisées en lignée cellulaire suggèrent que DOCK1 est un important régulateur du cytosquelette et son expression est essentielle à la migration de certaines lignées de cancer du sein. DOCK1 agit aussi en aval des RTKs PDGFR α et EGFRvIII lors de l'invasion de cellules de glioblastome. Les fonctions in vivo de Dock1 chez les mammifères demeurent toutefois méconnues et l'objectif de cette thèse est d'identifier et de caractériser certaines de ses fonctions.

Nous avons émis comme hypothèse centrale que certaines des fonctions biologiques de mbc ont été conservées au cours de l'évolution et que Dock1 exercent des fonctions similaires à mbc chez les mammifères.

1.4.1 Objectif 1 (Chapitre 2)

Dans l'objectif no 1, nous avons testé si Dock1 contribuait au développement musculaire tout comme mbc en générant et analysant une souris KO pour ce gène. Nos études ont révélé une fonction essentielle pour Dock1 au cours du développement puisque les embryons mutants meurent à la naissance. Des défauts sévères de fusion des myoblastes sont observés en absence de l'expression de

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*

Contributions Figures

- Figure 2.1 (A) : Dr Jean-François Côté
- Figure 2.1 (B-C) : Mélanie Laurin
- Figure 2.1 (D,E) : Nadine Fradet
- Figure 2.2 (A-C) : Mélanie Laurin
- Figure 2.3 (A-H) : Mélanie Laurin
- Figure 2.4 (A-F) : Mélanie Laurin
- Figure 2.S1 (A,E) : Nadine Fradet
- Figure 2.S1 (B, D, G) : Mélanie Laurin
- Figure 2.S1 (C) : Dr Jean-François Côté
- Figure 2.S2 (A-E) : Mélanie Laurin
- Figure 2.S2 (F) : Nadine Fradet
- Figure 2.S3 (A-I) : Mélanie Laurin
- Figure 2.S4 : Mélanie Laurin
- Figure 2.S5 : Mélanie Laurin
- * Mélanie Laurin, Dr Kristiina Vuori et Dr Jean-François Côté ont planifié les expériences.
- * Mélanie Laurin, Nadine Fradet et Dr Jean-François Côté ont réalisé les expériences.
- * Dr Anne Blangy et Dr Alan Hall ont fourni des réactifs.
- * Mélanie Laurin et Dr Jean-François Côté ont analysé les résultats.
- * Le manuscrit a été écrit par Dr Jean-François Côté.

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

Mélanie Laurin^{*†}, Nadine Fradet^{*}, Anne Blangy[‡], Alan Hall[§], Kristiina Vuori[¶], and Jean-François Côté^{*†**}

^{*}Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, QC, Canada H2W 1R7.

[†]Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H3C 3J7.

[‡]Centre de Recherche en Biochimie Macromoléculaire, Centre National de la Recherche Scientifique, 34293 Montpellier, France.

[§]Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY 10065.

[¶]Burnham Institute for Medical Research, La Jolla, CA 92037.

^{**}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

Introduction

The various developmental stages of mammalian myogenesis are characterized by mononucleated myoblasts fusing with each other and with existing myotubes to form syncytial muscle fibers (149). During embryogenesis, a first wave of myoblast fusion occurs to form primary fibers. At later fetal stages, myoblasts will undergo a second wave of fusion to form secondary fibers using the primary fibers as scaffolds (147). During adulthood, satellite cells, which are the muscle progenitor cells of the adult, fuse to existing myofibers to accomplish post-natal muscle growth and help regenerate injured tissues (77). Proper regulation of these various fusion events controls muscle fiber diameter and is central for appropriate contractile strength and muscle function (364). At the cellular level, myoblast fusion is divided into steps of cell-cell adhesion, alignment of cell membranes, and formation of membrane prefusion compartments, and the fusion is ultimately completed by the union of the two membranes (365). The molecular mechanisms regulating myoblast fusion in higher vertebrates remain poorly understood (366). The current understanding of myoblast fusion in mammals is largely derived from experiments with myoblast cell culture systems wherein the fusion step can be recapitulated *in vitro*. In contrast, myoblast fusion is a biological process prone to genetic analysis in *Drosophila*, and research over the last decade has suggested several candidate genes whose functions might be conserved in mammals (365). Surprisingly, none of these candidates have been confirmed thus far in mouse models.

The ease of visualization of muscle development in fly and zebrafish has greatly facilitated the identification and study of genes implicated in signaling cascades regulating myoblast fusion (365). Early in *Drosophila* development, myoblast precursors segregate into founder (FM) and fusion competent myoblasts (FCM) (365). Mechanistically, the FM attracts the FCM and thus serves as the nucleating entity during fiber formation. Receptors expressed in myoblasts known as duf/kirre, rst, sns and hbs connect the cell membranes of the interacting FM and FCM

and activate pathways that ultimately converge on the modulation of the actin cytoskeleton (96-98).

In FM, duf-rst receptors recruit the intracellular ants/rols and myoblast city (mbc) proteins to activate the Rac GTPase (102, 109). In parallel, Arf6 becomes activated by the guanine nucleotide exchange factor loner, and this pathway is thought to spatially position the Rac GTPase for proper activation by mbc (111). In FCM, the sns receptor couples to mbc to activate Rac, and in a parallel pathway sns recruits the solitary-wasp complex to the cell membrane via the adapter protein Crk (88). The solitary-wasp pathway promotes the formation of actin patches involved in positioning Golgi-derived prefusion vesicles at the site of membrane fusion (88).

Zebrafish emerged as a potentially useful vertebrate genetic model for studying myoblast fusion *in vivo*. Zebrafish orthologue of the receptor kirre, named kirrel, was demonstrated to regulate myoblast fusion (164). Much like in *Drosophila*, kirrel is thought to signal to the Rac GTPase to mediate fusion (164). However, in contrast to what was observed in flies, overexpression of rac in myoblasts dramatically promoted myoblast fusion to form large syncytia, suggesting that rac may regulate additional signaling cascades in fish myoblasts (164). Using morpholinos to interfere with gene function, Moore and colleagues (209) demonstrated an important role for *dock1*, *dock5*, *crk* and *crkl* in myoblast fusion. Nonetheless, the relevance of these findings for mammalian myoblast fusion is not clear. For example, the closest related orthologue of kirrel in mammals is a Nephrin-like protein (366). Nephrin has been studied in mammals and is implicated in kidney development (367). It thus remains to be demonstrated whether the machinery of myoblast fusion in fly and fish have a conserved role in mammals (366).

Genetic lesions in the *mbc* and *Rac* genes lead to myoblast fusion defects in *Drosophila* (93, 94), and *mbc* acts upstream of the *Rac* GTPase in this process (368). Mutation of *delmo*, a mbc binding partner, was reported to disrupt myoblast fusion (122). In addition to its role in fusion, Rac activation by mbc/delmo is critical in

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.

Results

Disruption of Dock1 and Dock5 genes in mice

Dock1 (also know as Dock180) and Dock5, two closely related Rac GEFs, are orthologues of *D. melanogaster* mbc and *C. elegans* Ced-5. To obtain insight into the in vivo roles of Dock1 and Dock5 in mammals, we generated mice with disrupted *Dock1* or *Dock5* loci by homologous recombination and gene trapping, respectively (Figure 2.1 page 102 and detailed in Supporting Information (SI)). Western blot analyses confirmed the proper elimination of the expression of the corresponding proteins in *Dock1*- and *Dock5*-mutant embryos (Figure 2.1 B and E page 102). Breeding of $Dock1^{+/-}$ mice demonstrated an essential role for Dock1 during development as no viable *Dock1^{-/-}* offspring was obtained (**Table 2.SI page 129**). Breeding of *Dock5*^{+/-} mice established that homozygous mutant animals are viable (Table 2.SI page 129) and have no obvious morphological abnormality. Dock1 mutant newborns were smaller, failed to straighten their body at birth, and became cyanotic within minutes after birth, possibly as a result of noninflated lungs (Figure 2.1 C page 102 and Figure 2.S1 page 123). These defects in breathing and posture are hallmarks of myogenesis defects and prompted us to perform characterization of the developing muscle in *Dock1* mutants.

Aberrant muscle development in the absence of Dock1

We studied the embryonic expression profile of Dock1 and detected expression, both at the mRNA and protein levels, in the dermomyotome and myotome of developing embryonic day (E) E10.5 and E11.5 mice embryos, respectively (**Figure 2.2 A** and **B page 103** and **Figure 2.S2 page 124**). Although *Dock5* mRNA expression was not detectable at similar developmental stages by whole-mount *in situ* hybridization (data not shown), we detected the Dock5 protein in the myotome of E11.5 embryo by immunohistochemistry (**Figure 2.2 B page 103**). Overall, these observations suggested that Dock1 and Dock5 could play an evolutionarily conserved role in mammalian myogenesis.



Figure 2.1 Generation and analysis of Dock1 and Dock5 mutant mice

(A) Partial representation of the *Dock1* locus, the structure of the targeting vector, and the organization of the rearranged *Dock1* targeted allele. The probe used for Southern blot and the expected size of the HindIII fragments is indicated. (B) Western blot analysis showing the abrogation of protein expression in *Dock1*-null embryos. Anti-Tubulin antibody was used to confirm equal loading of lysates. (C) Mice lacking *Dock1* expression die at birth with noninflated lungs (see also **Figure 2.S1 page 124**). (D) Partial representation of the *Dock5* locus surrounding exon 29 and the structure of the trapped locus. (E) Western blot analysis using anti-Dock5 antibody showing proper abrogation of the protein expression in the *Dock5* mutant. Anti-Tubulin antibody was used to confirm equal loading of lysates.



Figure 2.2 Expression profile and characterization of the skeletal muscle in the absence of Dock1 and Dock5

(A) Whole-mount RNA in situ hybridization with *Dock1* anti-sense and sense probes demonstrate specific staining of the *Dock1* in the dermomyotome of E10.5 and myotome of E11.5 embryos. (B) Immunohistochemistry with anti-Dock1 and anti-Dock5 antibodies demonstrated the presence of the proteins in the myotome and limb bud of E11.5 embryos. *Dock1*-null embryos were used to demonstrate the specificity of the primary antibody against Dock1. Nuclei are revealed by Hoechst staining (blue). M, myotome. (C) Sagittal sections through E16.5 WT and mutant *Dock1* and *Dock5* embryos stained with H&E. *Dock1*-null embryos display a severe reduction of their respiratory muscle. Mice lacking *Dock5* display normal muscle phenotype. (Magnifications: A, X4; B, X10; C, X40) (Scale bars: B, 250 μm; C, 75 μm.)

A systematic histological analysis of different muscle groups showed a dramatic and general reduction in muscle content in *Dock1^{-/-}* embryos compared with *Dock1*^{+/+} embryos at E16.5. We observed that the diaphragm was strikingly thinner and its attachment to the intercostal muscle was severely impaired in *Dock1* mutants (Figure 2.S3 page 126). Identical defects are already present and detectable at E14.5 (data not shown). Intercostal muscles are also significantly reduced in size to the extent that ribs were observed to be stacked more closely together in Dock1--embryos (Figure 2.2 C page 103 and Figure 2.S3 page 126). As mentioned above, these malformations strongly suggest respiratory failure as a cause of death for Dock1-null animals. However, histological analyses of the lungs at E16.5 did not reveal any gross abnormalities in any of the genotypes studied (Figure 2.S3 page **126**). Reduction in muscle mass was not only associated with respiratory muscles but was common in all skeletal muscle studied, including deep back muscles, tongue and limb muscles (Figure 2.S3 page 126). Moreover, this reduction in muscle mass correlated with a striking reduction in fiber diameter at E18.5 (Figure 2.S3 page 126). In marked contrast, no obvious defects were noticeable in diaphragm and intercostal muscles of E16.5 *Dock5^{-/-}* embryos (Figure 2.2 C page 103 and Figure 2.S3 page 126).

Impaired myoblast fusion *in vivo* in *Dock1*-null embryos

We performed experiments to demonstrate that the establishment of myogenesis was normal in *Dock1*-null embryos (see SI and **Figure 2.S4 page 127** and **Figure 2.S5 page 128**). Muscle development *in vivo* was further characterized at the molecular level by staining against the muscle-specific myosin heavy chain (MHC; MF20 antibody) to track the origin of the observed myogenesis defect. Although the diameter and number of myofibers were similar at E11.5 (**Figure 2.3 A and B page 105**), defects were found in *Dock1*-null muscles at E12.5 (not shown) and E13.5



Figure 2.3 The absence of Dock1 affects myoblast fusion in vivo

(A and B) Cross section through E11.5 embryos stained with MF20 antibody (green) showing comparable myotomes (A) and fiber diameter (B) between WT and *Dock1*-null embryos. Nuclei are revealed by Hoechst staining (blue). (C and D) Crosssections (C) and longitudinal sections (D) through E13.5 embryos stained with MF20 showing reduction in fibers diameter (C) in *Dock1*-null. Multinucleated fibers are present in *Dock1⁺ⁱ⁺* embryos but absent in *Dock1*-null animals (D). Nuclei are revealed by Hoechst staining (blue). (E and F) Sections through E14.5 WT and *Dock1* mutant embryos stained with MF20 showing reduction of the intercostal muscles. Longitudinal sections of the intercostals muscles demonstrate the fusion defect (F). Nuclei are revealed by Hoechst staining (blue). (G) Primary myoblasts isolated from E18.5 WT and mutant embryos were used in an *in vitro* fusion assay. Cell fusion was evaluated by staining cells with an antidesmin antibody. Nuclei are revealed by DAPI staining. (H) Quantification of the experiment in G. (Magnifications: A, X10; B, E, and F, X40; C, D, and G, X20.) (Scale bars: A, 250 µm; B-D and F, 30 µm; E, 60 µm; G, 130 µm.)

(Figure 2.3 C and D page 105). Reduction in muscle mass and in fusion became more prominent at E14.5 when compared with WT embryos (Figure 2.3 E and F page 105). Notably, we detected that most of the MF20-positive fibers aligned with one another but remained mononucleated in E13.5-E14.5 Dock1^{-/-} embryos (Figure 2.3 D and F page 105). These results establish a role for Dock1 in primary myoblast fusion. To address specifically the requirement for Dock1 in the process of myoblast fusion, primary myoblasts were isolated from E18.5 *Dock1*^{+/+} and *Dock1*^{-/-} embrvos. Upon selection and expansion of the primary cells in proliferation media, we tested the ability of desmin-positive myoblasts to undergo fusion in vitro and found that Dock1-null cells were unable to form long multinucleated fibers after 4 days in differentiating conditions in contrast to $Dock1^{+/+}$ myoblasts (Figure 2.3 G page 105). Quantification of the fusion index revealed that most of the mutant desmin-positive myoblasts remained mononucleated and a portion of the cells (~20%) could form binucleated syncytia after differentiation (Figure 2.3 H page 105). The presence of mononucleated fibers at these stages of development is highly reminiscent of the fusion defect observed in *mbc* mutants in *Drosophila*, suggesting an evolutionarily conserved role for *Dock1* in mammalian myoblast fusion.

Genetic interaction between *Dock1* and *Dock5* in myogenesis

Because Dock5 expression pattern overlapped with DOCK1 in the myotome, we tested the hypothesis that *Dock5* could also participate in myoblast fusion. To directly address this idea, we interbred *Dock1^{+/-}Dock5^{+/-}* animals with the aim of studying muscle development in the progeny. No double-mutant embryos were recovered in this cross at E14.5 (**Table 2.SII page 130**). In parallel, we noted an increase of necrotic embryos, which likely represent double-mutant animals failing to undergo early embryogenesis. Embryos lacking one allele of *Dock1* in a *Dock5^{-/-}* background, and conversely, embryos lacking one allele of *Dock5* in a *Dock1^{-/-}* background were recovered and their muscle phenotype was analyzed.

Consistent with the histological data presented above (**Figure 2.2 page 103**), MF20-positive fibers developed normally in intercostal muscles of *Dock5*^{-/-} embryos

(Figure 2.4 A and B page 108). Notably, double *Dock1^{+/-}Dock5^{+/-}* heterozygous mutant animals also developed their muscles normally (Figure 2.4 D page 108). Interestingly, *Dock1^{+/-}Dock5^{-/-}* 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^{-/-}Dock5^{+/-}* 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.



Figure 2.4 Genetic interactions between Dock1 and Dock5 in muscle development

Sections of intercostal muscle of E14.5 embryos isolated from intercrosses of *Dock1^{+/-}Dock5^{+/-}* animals were stained with MF20. Nuclei are revealed by Hoeschst staining (blue). (A-C) While *Dock5* mutant animals have normal fibers (A-B), *Dock1^{+/-}Dock5^{+/-}* displayed thinner multinucleated fibers (C). (D) *Dock1^{+/-}Dock5^{+/-}* mutants undergo normal muscle development. (E and F) *Dock1^{+/-}Dock5^{+/-}* mutants display abnormal muscle development characterized by disorganized myosin heavy chain. (Magnification: X40) (Scale bar: 30µm)

Discussion

Genetic analyses in *Drosophila* have led to the understanding of some of the signaling cascades that regulate the fusion of myoblasts with each other and with developing myofibers, but it has remained unclear whether similar or different mechanisms operate *in vivo* in higher vertebrates (365, 366). One of the first genes identified to regulate myoblast fusion in *Drosophila* was *mbc* (93, 94). In this article, we investigated whether the mouse orthologues of *mbc*, namely *Dock1* and *Dock5*, are also involved in muscle development. *In vivo*, we demonstrate that while *Dock1*^{-/-} myoblasts are specified properly, differentiated MF20-positive cells remain mononucleated at the time of primary myogenesis. In addition, we have uncovered a contribution of *Dock5* toward myofiber development. We conclude from these results that these GEFs play an evolutionarily conserved function at the step of myoblast fusion in mouse.

A number of Rho-family GEFs have been analyzed by genetic means in mice. Surprisingly, only two RhoGEFs, Sos1 and Trio, are required for proper mammalian development (210). In the case of Sos1, mice die of placental defects likely attributed to impaired Ras activation (374). Whether the RacGEF activity of Sos1 also contributes to embryogenesis remains to be investigated in vivo. Trio mutants are also afflicted with myogenic development defects. However, these are phenotypically different from the ones reported here for *Dock1*. Briefly, myogenesis in *Trio*-null animals appeared normal until E14.5, but significant defects in muscle fibers arise at E16.5. Interestingly, Trio is a dual GEF for RhoA and Rac1; whether either one or both of these activities are important for muscle development is currently unknown. Recent data in C2C12 myoblasts in vitro suggest a major contribution of Trio in the fusion process, raising the possibility that other GEFs can compensate for the loss of Trio in vivo (207). More work will be required to fully appreciate the spatial and temporal activation of Rho GTPases in myoblast fusion. Together, these results suggest a role for *Trio* in secondary myogenesis (210) while our work supports a key role for *Dock1* in primary myogenesis.

Recently, Pajcini et al. (208) reported that mammalian Dock1 is part of a common fusion machinery in myoblasts and in macrophages. In this study, siRNAmediated knockdown of Dock1 interfered with, but did not block, fusion in C2C12 cells. It was suggested that incomplete knockdown of *Dock1* could explain why only a partial block in fusion was observed. Our data suggest the possibility that Dock5 is also expressed in C2C12 cells and could act redundantly with Dock1 in the fusion process. Pajcini et al. also proposed that silencing of Dock1 has no effect on cell proliferation but instead delayed cells from exiting the cell cycle after serum withdrawal. As a result, a delay in expression of myogenin and MHC was observed in Dock1-silenced C2C12 cells in differentiation conditions. Likewise, we observed normal proliferation of *Dock1*-null desmin-positive myoblasts in vivo (Figure 2.S5 page 128). However, a delay in the apparition of MHC was not apparent in vivo. Remarkably, ex vivo, Dock1-null primary myoblasts also delayed their expression of MHC much like in C2C12 in vitro (data not shown). These observations highlight some of the limitations of *in vitro* analyses in myoblast fusion. While most *Dock1*-null cells remained mononucleated, we also observed binucleated cells in our in vitro fusion assay. This finding could represent cells undergoing cell division or, alternatively, it may suggest that in vitro myoblast-myoblast fusion is permissive but myoblast-fiber is not in *Dock1*-null cells.

Recent studies suggest a degree of similarity in the mechanisms of myoblast fusion between *Drosophila* and zebrafish (164, 209). In marked contrast to the results presented in this article, an equally important contribution for *dock1* and *dock5* in myoblast fusion was uncovered in zebrafish when morpholinos were used to knock down their expression. It is interesting to note that the splice morpholinos designed by Moore *et al.* (209) resulted in mRNA coding for the expression of truncated dock1 and dock5 proteins that contained the N-terminal elmo-binding regions. Thus, it is possible that the experimentally generated mutant dock1 and dock5 proteins could act as dominant-negative proteins *in vivo* and therefore amplify the fusion phenotypes observed in Moore *et al.*'s study, thereby explaining the discrepancy with our results.

However, the fact that we failed to observe the presence of *Dock1^{-/-}Dock5^{-/-}* double mutants at E14.5 strongly suggests that these genes have redundant roles in fundamental biological processes. Here, we specifically investigated the contribution of these two genes in myogenesis and uncovered a functional redundancy in myoblast fusion. Most strikingly, in addition to remaining mononucleated, MF20-positive cells in *Dock1^{-/-}Dock5^{+/-}* mutants displayed and abnormal morphology characterized by poorly organized MHC. Furthermore, they failed to elongate and align with each other. One possibility is that Dock5, redundant with Dock1, is playing a role in cytoskeletal organization. It will be important to clarify the exact contribution of *Dock5* and *Dock1* to muscle fiber formation.

It would not necessarily be surprising that *Dock1* and *Dock5* do not play entirely identical roles in mouse and fish. The muscles in fish and mouse are quite different. For example, myoblasts are specified in two populations in zebrafish myotome (146). The "fast-twitch" are fusion competent cells that will generate classical syncytial myotubes in the myotome (164). The "slow-twitch" fibers are mononucleated and specified by Sonic Hedgehog. These mononucleated fibers are maintained fusion incomptetent via the *u-boot* gene (146). While the myotomes of mouse and chick also develop initially from mono-nucleated fibers (375), to our knowledge, no equivalent of the zebrafish fusion incompetent slow-twitch have been identified in mammals. In *Drosophila*, there are two myoblast subpopulations known as the founder and fusion-competent cells (365). In fusion mutant flies, such as *mbc*null, fusion-competent but not founder cells will undergo apoptosis and get cleared by macrophages (93). In mammals, such a concept of "leader" and "follower" myoblasts is not yet experimentally supported. Intriguingly, we observed at E13.5 that a subset of *Dock1*-null MF20-positive myoblasts undergoes apoptosis (Fig. 2.S5 page 128). One hypothesis is that the apoptotic cells and the surviving cells could represent different populations of myoblasts, much like in Drosophila.

In conclusion, we observed a reduction of all skeletal muscles in *Dock1* mutants. We demonstrate that this embryonic defect is caused by a defect in

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.

Materiel and Methods

Dock1 mouse knockout and Dock5 gene trapping. See SI Text.

Histology and immunohistochemistry

For histology, embryos were fixed in 4% PFA, embedded in paraffin, sectioned, and stained with H&E. For immunohistochemistry analysis, embryos were embedded in OCT (Electron Corp.) and cryosectioned at 10 μm. For MF20 staining, an antigen retrieval technique was performed using 10 mM citrate buffer, pH 6 according to standard procedures. Sections were blocked in PBS/0.2% Tween-20 (PBT) and 5% BSA for 1 h and incubated with primary antibody (MF20 1:20; Developmental Hybridoma) diluted in PBT 5% BSA overnight. For detecting the Dock1 and Dock5 proteins, sections were blocked in PBS and 1% BSA and stained overnight in blocking buffer (anti-DOCK1 1:100, C-19; Santa Cruz and rabbit polyclonal anti-Dock5 1:250). Sections were incubated with appropriate secondary antibodies for 1 h. Slides were mounted with Mowiol (VWR) reagent with Hoechst (Invitrogen).

Primary myoblast cell cultures

Primary myoblasts were isolated from limbs of E18.5 mouse embryos from *Dock1* heterozygous crosses as described (376) and maintained in growth media [HAM's F-10 medium (Invitrogen) supplemented with 20% FBS and 2.5 ng/ml basic fibroblast growth factor (Invitrogen)]. For differentiation experiments, cells were plated and switched 4 days later to differentiation media [DMEM (Invitrogen) with 2% horse serum]. Differentiated myotubes were stained with anti-desmin monoclonal antibody and DAPI.

Acknowledgments

We thank Dr. M. Rudnicki (Ottawa Health Research Institute, Ottawa) for helpful discussions, reagents and protocols and Drs D. Hipfner and M. Kmita for critical reading of the manuscript. The MF20 antibody developed by Dr. D. Fischman was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa City, IA). This work was supported by a Canadian Institutes of Health Research operating grant (to J.-F.C.) and National Institutes of Health Grant CA102583 (to K. V.). M.L. was supported by a scholarship from the Canadian Institutes of Health Research. J.-F.C. holds a Canadian Institutes of Health Research New Investigator Award.

Supplemental Information

Disruption of Dock1 (Dock180) and Dock5 genes in mice

A targeting construct to disrupt the *Dock1* gene was created (**Figure 2.1 A page 102**). Mice with the desired mutation were confirmed by Southern blot analysis (**Figure 2.S1 A page 123**). Northern blot analyses confirmed the proper elimination of the expression of the corresponding mRNA in *Dock1*-null embryos (**Figure 2.S1 B page 123**). Genotype analysis at various embryonic stages indicated that *Dock1*^{-/-} embryos could survive fetal development at near Mendelian ratios (**Figure 2.S1 C page 123** and **Table 2.S1 page 129**). The mutant pups became cyanotic within few minutes after birth, probably as a result of noninflated lungs (**Figure 2.1 D page 102**).

The *Dock5* locus was disrupted by retroviral insertion of a β -geo cassette in the intron flanked by exons 29 and 30 (**Figure 2.1 D page 102**). Mice with the desired mutation were confirmed by Southern blot analysis (**Figure 2.S1 E page 123**). The efficacy of gene trapping was verified by RT-PCR: a specific PCR product using oligos to exons 29 and 30 could be found only in WT conditions, whereas a specific PCR product using oligos to exons 29 and β -galactosidase was only detected only in homozygous mutant conditions (**Figure 2.S1 F page 123**). Breeding of *Dock5*^{+/-} mice demonstrated that homozygous mutant animals are viable (**Figure 2.S1 G page 123**) and **Table 2.SI page 129**). Finally, no obvious abnormality was detected in *Dock5* mutants.

Dock1 and Dock5 expression profiles during mouse development

Because the expression profile of the *Dock1* mRNA during embryogenesis had not been characterized previously, whole mount *in situ* hybridizations were performed on embryos of E9.5-11.5. Dig-labeled mRNA anti-sense probe specific for *Dock1* stained distinctively the dermomyotome and myotome of the developing E10.5 and E11.5 embryos (**Figure 2.2 A page 103** and **Figure 2.S2 A-C page 124**). Comparable results were obtained with two additional independent probes for *Dock1* (data not shown). At E10.5 and E11.5 developmental stages, we also observed a broad, albeit weak, and diffuse surface staining of the ectoderm, suggesting that the *Dock1* mRNA might also be expressed in the developing skin (**Figure 2.2 A page 103** and **Figure 2.S2 A-C page 124**). At E9.5, no significant staining for the *DOCK1* mRNA was observable (data not shown), suggesting a developmentally regulated expression for this gene starting somewhere between E9.5 and E10.5. These results were also confirmed by immunohistochemistry where the Dock1 protein was specifically detected in the myotome, the limb bud and the skin at E11.5 (**Figure 2.S2 D page 124** and **Figure 2.2 B page 103**). In these experiments, *Dock1*-null embryos were used to demonstrate the specificity of the antibody in immunohistochemistry. In addition, we detected the Dock1 protein in extracts of limb buds at E12.5 (**Figure 2.1 B page 102**) and in all established myoblast cell lines tested (data not shown).

We also attempted to study the expression profile of *Dock5* by whole mount *in situ* hybridizations. Using two different probes, we failed to detect specific staining in WT E9.5-E11.5 embryos (data not shown). We detected the Dock5 protein by immunohistochemistry in the myotome of E11.5 WT and *Dock1*-mutant embryos (**Figure 2.S2 E page 124**). In adult mice, we found broad expression of *Dock5* and *Dock1* mRNAs by Northern blotting (**Figure 2.S2 F page 124**).

Normal establishment of myogenesis in *Dock1*-null embryos

Although *Dock1* may play an evolutionarily conserved function in myoblast fusion, it is also possible that the observed abnormalities are a subsequent result of either a failure of establishing the myogenic cell fate or abnormal cell proliferation/survival. To distinguish between these hypotheses, we first investigated whether this gene is required in the early establishment of myogenesis. We analyzed the expression pattern of the determination transcription factor *Myod*. No significant difference in *Myod* expression was detected between WT and *Dock1* mutant embryos (**Figure 2.S4 page 127**). Supporting this observation, the territory covered by the myotome, and the number and diameter of the MF20-positive nascent primary fibers,

at E11.5 in *Dock1*-null embryos was similar to WT (**Figure 2.3 A** and **B page 105**). To evaluate the proliferation status, myotomes of E11.5 embryos were stained with antiphospho-Histone3 antibody. Similar overall proliferation of desmin-positive myoblasts was observed between WT and *Dock1*-mutants (**Figure 2.S5 A page 128**). Apoptosis, as measured by the TUNEL assay, was similar in the myotome of E11.5 embryos; however, an increase in apoptosis was evident at E13.5 in *Dock1*-null embryos (**Figure 2.S5 B page 128** and also see *Discussion*). Thus, we conclude that the early establishment of the myogenic program is not affected by the lack of the Dock1 protein.

Normal myoblast colonization of limb buds in Dock1-null embryos

Muscles of the forelimb and hindlimb of E18.5 embryos were analyzed for additional insight into the role of Dock1 during muscle development, as the formation of these muscles involves long-range migration of myoblasts (133). A dramatic reduction in muscle mass in both forelimbs and hindlimbs was detectable at this stage (Figure 2.S3 D-E page 126). Interestingly, despite this reduction in size, all limb muscle groups were found to be present in the mutant animals, suggesting that Dock1 is dispensable for long-range muscle progenitor migration in mice (Figure **2.S3 D-E page 126** and see below). Cross-sections through E18.5 hindlimb illustrate the reduction in the amount of large fibers in mutant embryos, indicative of a potential defect in myoblast fusion (Figure 2.S3 G-H page 126). Quantification revealed a statistically significant 50% decrease in the average diameter of mutant fibers (8,756 μm for WT fibers and 4,380 μm for *Dock1*-mutant fibers; *P*=0.0026) (Figure 2.S3 I page 126). Because the progenitors that delaminate from the dermomyotome undergo long-range migration to reach the limb buds, they were tracked in order to address if *Dock1* is regulating migration in this context. Importantly, *Myod* is not expressed in progenitor cells migrating toward the limb bud, but its expression is turned on once the final destination is reached (377). As seen in Figure 2.S4 page **127**, the intensity of *Myod* staining in the myoblasts present in limb buds is virtually identical in WT and *Dock1* mutant animals. This suggests that Dock1 does not regulate cell migration in this biological system and that muscle progenitors colonized the limb bud in *Dock1*^{-/-} animals.

Analysis of newborn lungs

Newborn pups from *Dock1*^{+/-} crosses were killed minutes after birth and lungs were dissected. To determine if the lungs had been inflated from respiration, they were overlayed on PBS. Lungs filled with air floated, whereas noninflated lungs sunk in such experiments (378). Each embryo was genotyped for the *Dock1* allele.

Gene Targeting and Genotype Analysis

The Dock1 locus spans 502 kb in C57BL/6 mice and consists of 52 exons (genome browser: genome.ucsc.edu). Because of the large intron between exons 1 and 2 (\approx 53.5 kb), we decided to only target part of the promoter and exon 1 (including the ATG). A targeting vector was designed to delete 889 bp upstream of exon 1 and exon 1 (156 bp) and also 400 bp in intron 1 in 129 Sv ES cells and replace theses regions by a Neo cassette (Figure 2.1 A page 102). Such a strategy is expected to completely inactivate the locus (see Figure 2.S1 A-D page 123 and Figure 2.1 B page 102 for confirmation of this hypothesis). Briefly, to construct the targeting vector, a 5' 1,200-bp short arm was amplified by PCR from purified 129 Sv genomic DNA and cloned into a Mlul site on the 5' side of the Neo gene cassette (see Table 2.SIII page 131 for primers used in this study). A 6.5 kb mouse genomic DNA clone was isolated from a mouse 129 Sv lambda genomic library using a 300-bp cDNA probe from the 5' coding region of the murine *Dock1* gene. This genomic DNA clone contained the predicted proximal promoter region before the exon 1 (which contains the ATG), exon 1, and ≈ 6 kb of intron 1. We obtained the 5.5-kb 3' long arm by digesting the genomic clone with Smal (one site internal in intron 1 and one site in the polylinker of the lambda phage). This fragment was cloned in Smal on the 3' side of the Neo gene cassette.
To obtain recombinant ES cells with the desired homologous recombination in the Dock1 locus, 10 µg of Notl linearized targeting vector was electroporated into 129 Sv ES cells using standard procedures. After selection in G418 antibiotic, >200 surviving clones were expanded and screened by PCR and Southern blots to identify recombinant cells. To screen by PCR, a primer outside of the short arm (5' side) was used in combination with a reverse primer in the Neo gene to produce a 1.5-kb fragment. One positive recombinant ES cell clone was identified. The recombinant ES cell line was also characterized by Southern blot analysis. Purified genomic DNA was digested with HindIII (one site upstream of the short arm, one site in the Neo gene cassette and one site in intron 1; see Figure 2.1 A page 102). A 600-bp genomic probe, outside of the short arm, was amplified by PCR for use in Southern blot analysis. For the WT and mutant allele, bands of 9.0 and 7.5 kb, respectively, were expected. The validated clone 43 was selected for injection in C57BL/6 blastocysts. From the first injection, one male chimera (100% agouti-coat color) and two female chimeras (1:100% and 1:80% agouti) were obtained. A second injection produced five chimeric males (3:100% and 2:80% agouti) and four chimeric females (all 100% agouti). The highest chimeric males were set up for mating with C57BL/6 females and germ-line transmission of the disrupted *Dock1* locus was successful. The genotype of these F₁ animals was confirmed by Southern blot analysis.

Genomic DNA from tail biopsies or vitelline sacs was extracted by using Genomic DNA extraction kits (Invitrogen and Qiagen), and mouse or embryo genotypes were determined by using Southern blot (see above) or PCR analyses (see **Table 2.SIII page 131** for primers).

Gene trapping to inactivate the Dock5 locus

We took advantage of a gene disruption project by retroviral gene trapping in 129 Ola mouse ES cells to study the role of *Dock5* in mouse myogenesis (Genome Research Limited, Wellcome Trust Sanger, Cambridge, UK). Clone AN0268 was obtained and is expected to contain a retroviral insertion in the *Dock5* genomic locus.

The *Dock5* locus contains 52 exons and spans more >500 kb on chromosome 14. The insertion of the pGTOlxr retroviral cassette (En2 exon2 splice acceptor-geo-SV40 polyA) occurred between exons 29 and 30, which corresponds to a trapping event at bp 3225 of the *Dock5* cDNA (Figure 2.1 D page 102). This trapping event is expected to truncate the DHR-2 domain and any protein generated would be catalytically dead. Cells were expanded on gelatin-coated dishes in ES cell media (1XGMEM, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 1X nonessential amino acids, 10% ES-grade FBS and 500 units/ml of leukocyte inhibitory factor). Before generating the mouse line, we confirmed the insertion in the *Dock5* locus by Southern blotting and PCR (the product of primers 1 and 3 in Figure 2.1 D page 102 was cloned and sequenced; data not shown). From these studies, we confirmed that the trapping cassette is correctly inserted as expected in the *Dock5* locus. Mutant cells were then injected into C57BL/6 blastocysts according to standard techniques. Several low chimerism males (10-30% agouti) were produced in one injection. The chimeric males were set up for mating with C57BL/6 females and germline transmission of the disrupted *Dock5* locus was successful. The genotype of these F₁ animals was confirmed by Southern blot (Figure 2.S1 E page 123). Heterozygote animals were crossed and offsprings were genotyped by PCR (Figure 2.S1 G page 123 and see **Table 2.SIII page 131** for primers). The disruption of the *Dock5* locus is viable and gross examination of the homozygote mutant mice did not reveal any major developmental defects. Embryos from heterozygote crosses were isolated and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA).

Northern blot analysis

Total RNA from limb buds of E11.5 embryos of *Dock1* heterozygous crosses and total RNA of *Dock5* mutant mice were extracted using TRIzol reagent (Invitrogen). Commercially available RNAs were from Ambion. All RNAs were separated on formaldehyde-agarose gels and transferred to Hybond-XL membrane (Amersham Biosciences). Membranes were prehybridized, hybridized, and washed using standard molecular biology procedures. *Dock1* and *Dock5* probes were inserted into pGEM-T vector (Promega) (**Table 2.SIII page 131**) and labeled with ³²P-dCTP using a random primer extension kit (Roche).

Western Blot Analysis

Limb buds were dissected from E12.5 embryos isolated from *Dock1* heterozygous crosses and lysed in RIPA buffer [10 mM Tris-HCI (pH8), 140 mM NaCl, 0.025% NaN₃, 1% Triton X-100, 0.1% deoxycholic acid and 1x Complete protease inhibitors (Roche)] for 20 min. Cleared extracts (50 µg) were separated by 8% SDS/PAGE, blotted on PVDF (Millipore), and incubated with the appropriate antibodies (Dock1 1:1,000, C-19; Santa Cruz, and Tubulin 1:5,000; Sigma) according to standard procedures. Two independent rabbit polyclonal antibodies were raised against peptides to the extreme C terminus of human DOCK5 and murine Dock5. Both antibodies were used in Western blot analyses, and the antibody against mouse Dock5 was used in immunohistochemistry.

Whole-mount RNA *in situ* hybridization (WISH)

WISH with a digoxigenin-labeled RNA probe was performed using established procedures (379). Briefly, embryos were dissected in PBS and fixed overnight in 4% PFA. Embryos were dehydrated through a methanol series (30%, 50%, 70%) in PBS/0.1% Tween-20 (PBST) and stored at -20°C. On the first day of the WISH, embryos were rehydrated into PBST, bleached with 6% H_2O_2 in PBST, and washed. Embryos were treated with 10 µg/ml proteinase K (Roche) in PBST according to stage (10 min for E10.5 and 13 min for E11.5) and the reaction was stopped by washing with glycine at 2 mg/ml in PBST. Embryos were rinsed and postfixed in 4% PFA. Prehybridization was done at 68°C for 2 h in hybridization mix (50% deionized formamide, 5XSSC, 1% SDS, 0.1% Tween-20, 5 mg/ml Torula RNA, and 0.05 mg/ml heparin). Embryos were left with denatured RNA probe in hybridization mix overnight at 68°C. After washing, embryos were blocked and incubated overnight at 4°C with a 1:3,000 dilution of anti-Dig Fab fragment (Roche) in blocking buffer [TBS/1% Tween-20 (TBST), 2% serum, 2 mg/ml BSA]. The next day, embryos were washed five times

and left overnight in TBST. After three washes with NTMT [0.1M NaCl, 0.1M Tris (pH 9.5), 1% Tween-20], color was developed using BM Purple AP Substrate (Roche) until the desired intensity was reached.

Antisense and sense probes for *Dock1* consisted of a 900-bp fragment containing 600 bp of the coding region and 300 bp of the flanking 3' UTR (amplified by PCR from a 129/Sv mouse EST clone) cloned in pGEM-T vector (Promega). The RNA-DIG (Roche)-labeled probes were generated by linearizing the vector with SacII or SpeI and by using T7 or Sp6 promoter for antisense and sense probe, respectively. The plasmid used to generate the antisense probe for *Myod* was previously described and obtained from Dr. M. Rudnicki (380).

Immunohistochemistry (TUNEL and pHistone H3)

Apoptotic cells were detected on cryosections using the TUNEL kit according to manufacturer's guidelines (Promega). Mitotic cells were detected by staining with the anti-phospho Histone H3 (Ser-10, 1:100, Cell Signaling).



Figure 2.S1 Disruption of Dock1 and Dock5 genes in mice

(A) Southern blot analysis using DNA isolated from pups derived from heterozygous crosses confirming proper rearrangement in the locus. Genomic DNA was digested with HindIII and analyzed using a *Dock1* genomic probe. WT and mutant alleles generate a 9.0 and 7.5 kb band, respectively. (B) Northern blot analysis using a *Dock1* cDNA probe demonstrating the absence of *Dock1* transcript in E11.5 limb buds derived from *Dock1*-null embryos (*Upper*). The 28S rRNA was used as a loading control (*Lower*). (C) PCR analysis of the WT and mutant alleles on genomic DNA isolated from viable and dead newborns derived from *Dock1* heterozygous mice crosses. The genotyping strategy highlights that viable pups are either *Dock1^{+/+}* or *Dock1^{+/-}* and that all dead pups are *Dock1^{-/-}*. (D) Lungs from newborn pups derived from *Dock1* heterozygous crosses were isolated and dropped into PBS. Lungs from *Dock1*-null embryos were noninflated and sank whereas those from *Dock1^{+/+}* and *Dock1^{+/-}* pups were inflated and floated. (E) Southern blot analysis, using tail genomic DNA isolated from WT and *Dock5* mutant mice confirms predicted rearrangement of the locus. DNA was digested with EcoRI and analyzed using a *Dock5* genomic probe. (F) RT-PCR analysis using RNA isolated from WT and *Dock5* mutant adult kidneys confirms proper abrogation of the WT transcript in *Dock5* mutant mice. (G) PCR analysis of genomic DNA isolated from viable pups derived from heterozygous crosses using primer sets for the WT and mutant *Dock5*.



Figure 2.S2 Expression profile of Dock1 and Dock5 during mouse development.

(A-C) WISH with *Dock1* anti-sense and sense probes demonstrates specific staining of the *Dock1* transcript in the dermomyotome of E10.5 (A) and myotome of E11.5 (B and C) embryos. Such a signal is absent from the sense controls despite some superficial background. (D) Immunohistochemistry with anti-Dock1 antibody demonstrated the presence of the proteins in the limb bud of E11.5 WT embryos. *Dock1*-null embryos were used to demonstrate the specificity of the primary antibody against Dock1. Nuclei are revealed by Hoechst staining (blue). (E) Immunohistochemistry with anti-Dock5 antibody demonstrated the presence of the proteins in the myotome of E11.5 wild-type and *Dock1*-null embryos. Nuclei are revealed by Hoechst staining (blue). (F) *Dock5* mRNA was not detectable by WISH and was instead analyzed by Northern blotting using commercially available RNAs isolated from embryonic and adult tissues as indicated. Blots were exposed for 2 weeks (*Dock5*) or 2 days (*Dock1*). Ethidium bromide-stained gel was photograph before transfer to membrane to assure equal loading of all samples. (Magnifications: A, X4; B, X2; C, X3; D, X20; E, X10) (Scale bars: D, 100 µm; E, 250 µm)



Figure 2.S3

Figure 2.S3 General and dramatic reduction of muscle mass in embryos lacking Dock1

(A,B) Sagittal sections through E16.5 WT *Dock1* and *Dock5* mutant embryos stained with H&E. *Dock1*-null embryos display severe reduction of their respiratory muscles. Sections highlight thinness of their diaphragm (A), its precarious attachment (B, arrow) and the reduction of the intercostal muscles (B) in *Dock1*-null embryos. Mice lacking *Dock5* expression display gross normal muscle phenotype and no reduction in muscle mass were observed between WT and mutant mice. D, diaphragm; Lu, lung and Li, liver. (C) Transverse section through E16.5 WT and *Dock1*-null embryos stained with H&E showing that reduction in muscle mass and disorganization of the tissues were also present in back muscle. (D and E) Transverse section through E18.5 *Dock1* WT and mutant forelimb (D) and hindlimb (E) stained with H&E showing a reduction, but presence, of all muscle groups. (F) Transverse section through E16.5 wild-type and *Dock1*-null embryos stained with H&E showing that reduction in muscle mass and disorganization of the tissues were also present in the tongue. (G and H) Transverse section through E18.5 WT and mutant hindlimb showing reduction in the content of large fibers in mutant embryo. (H) Close-up of the box area in G. (I) Quantification of the fiber diameter of E18.5 WT and mutant hindlimb shows a reduction of ~ 50% of the fiber diameter in mutant animals. (Magnifications : A, D, and E, X10; B, X20; C and F, X40; G and H, X100.) (Scale bars : A, D, E, 500 µm; B, 200 µm; C and F, 75 µm; G and H 40 µm).



Figure 2.S4 Loss of Dock1 does not affect determination of myoblast and migration of muscle progenitors

WISH with MyoD DIG-labeled RNA anti-sense probe demonstrates and identical expression profile for this gene in E11.5 WT and *Dock1*-mutant embryos. Different views of the embryos are presented to appreciate the 3D structure of the staining. Embryos of equal somites were compared. The boxed areas demonstrate identical width of the myotome between wild-type and mutant embryos. The arrows highlight the result of a normal migration of muscle progenitors in the limb buds of embryos of WT and mutant genotype.



Figure 2.S5 Proliferative and apoptotic status of muscle cells in Dock1-null embryos

(A) Sections encompassing the myotome of WT and *Dock1* mutant E11.5 embryos were stained with anti-desmin and antiphospho Histone H3 antibodies to reveal mitotic cells. Quantification of multiple independent sections revealed similar proliferation of desmin positive cells in both genotypes. (B) Sections encompassing intercostal muscles of WT and *Dock1*-mutant E11.5 (data not shown) and E13.5 embryos were costained with anti-MF20 (red) and TUNEL (green) assay. Quantification from multiple sections revealed similar increase in apoptosis of MF20-positive cells at E11.5 in both genotypes. However, a marked increase in apoptosis of MF20-positive cells was detected starting at E13.5 in the intercostal muscle of *Dock1*-mutant embryos. Nuclei are revealed by Hoechst staining (blue). (Magnifications: X40) (Scale bars: A, 60 µm; B, 30 µm)

Table 2.SI Viability of embryos and pups

Embryos/pups	No. of pups	% of +/+ % of +/-		% of -/-		
Derived from Doc		-				
E10.5	27	22	63	15		
E11.5	52	29	42	29		
E12.5	35	26	43	31		
E14.5	64	36	45	19		
E16.5	39	26	41	33		
E18.5	109	23	56	21		
P21	115	35	65	0		
Derived from Dock5 heterozygous crosses						
P21	47	26	51	23		

	No. of	D1 ^{+/+}	D1 ^{+/-}	D1-/-	D1 ^{+/+}	D1 ^{+/-}	D1-/-	D1 ^{+/+}	D1+/-	D1-/-	Necrotic
Embryos/pups	pups	$D5^{+/+}$	D5 ^{+/+}	D5 ^{+/+}	D5+/-	D5+/-	D5*′-	D5-/-	D5''-	D5''-	
E14.5	70	8	9	3	6	19	5	2	5	0	13
P21	60	6	14	0	11	16	0	6	7	0	N/A
Expected Ratio		1	2	1	2	4	2	1	2	1	

Table 2.SII E14.5 embryos and P21 pups derived from *Dock1+/-Dock5+/-* X *Dock1+/-Dock5+/-* crosses

Table 2.SIII	PCR Primers	for different	procedures

Procedure	Forward	Reverse
Dock1 targeting vector short arm	5'-GTGCTCCTGAAATCCATCTTCCTG-3'	5'-AGATCTCTTTGGGTGTTGAGGGTC-3'
Screening Dock1 recombinant ES	Outside primer	Neo
cells	5'GTTGTTCTCAACACAAGCCATCTG-3'	5'-TGCGAGGCCAGAGGCCACTTGTGTAGC-3'
Dock1 probe for southern blot	5'-TACTCATATCTATTGAGCCCATCTC-3'	5'-GCCTTTACTATGCAAACCCAGGAG-3'
analysis		
Genotyping Dock1 WT allele	5'-TCATTCATTCATTCAAAGTGGGCAC-3'	5'-GTGCTCCTGAAATCCATCTTCCTG-3'
Genotyping Dock1 mutant allele	5'-CTTTCAAGGACTGTTGGATCTCAG-3'	5'-TGCGAGGCCAGAGGCCACTTGTGTAGC-3'
Dock1 probe for WISH and	5'-GATTTGCTCTAGAGCCTCTGCTGC-3'	5'-GTCATTTGGCACAAAAGGAAAGAGTTTCAGG-3'
Northern blot analysis		
Dock5 probe for Southern blot	5'-GGTGTTTGCCATGTGTTCAG-3'	5'-CAGGGCCACTCTCTGATGAT-3'
Genotyping Dock5 WT allele	5'-GATGAGAGCAAGGAGAACCGCATG-3'	5'-GCCAGGGCATTTCCTTCACTTACC-3'
Genotyping Dock5 mutant allele	5'GATGAGAGCAAGGAGAACCGCATG-3'	5'-GTTGTCATGGAGGAGAAAGGGCAG-3'

CHAPITRE 3

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

Contributions Figures

- Figure 3.1 (A) : Dr Benjamin Haibe-Kains
- Figure 3.1 (B) : Ariane Pelletier
- Figure 3.1 (C, D) : Mélanie Laurin
- Figure 3.1 (E) : Ariane Pelletier et Mélanie Laurin
- Figure 3.1 (F-H) : Mélanie Laurin
- Figure 3.2 (A) : Jennifer Huber et Mélanie Laurin
- Figure 3.2 (B-D) : Jennifer Huber
- Figure 3.2 (E-G) : Jennifer Huber et Mélanie Laurin
- Figure 3.2 (H, I) : Jennifer Huber
- Figure 3.2 (J) : Mélanie Laurin
- Figure 3.3 (A-C) : Jennifer Huber et Mélanie Laurin
- Figure 3.3 (D) : Dr Tarek Houalla et Mélanie Laurin
- Figure 3.3 (E-G) : Mélanie Laurin
- Figure 3.4 (A-B) : Mélanie Laurin
- Figure 3.4 (C-D): Dr Benjamin Haibe-Kains et Mélanie Laurin
- Figure 3.S1 (A) : Jennifer Huber et Mélanie Laurin
- Figure 3.S1 (B-C): Dr Benjamin Haibe-Kains
- Figure 3.S2 (A-C): Mélanie Laurin
- Figure 3.S2 (D): Ariane Pelletier
- Figure 3.S3: Mélanie Laurin
- Figure 3.S4 (A-D): Nadine Fradet

Figure 3.S4 (E): Jennifer Huber

- Figure 3.S4 (F): Jennifer Huber et Mélanie Laurin
- Figure 3.S5 (A, B): Jennifer Huber et Mélanie Laurin
- Figure 3.S5 (C): Mélanie Laurin
- Figure 3.S5 (D): Jennifer Huber
- Figure 3.S6: Mélanie Laurin
- Figure 3.S7: Mélanie Laurin
- Figure 3.S8: Mélanie Laurin
- Figure 3.S9: Mélanie Laurin
- Figure 3.S10: Mélanie Laurin
- Figure 3.S11: Nadine Fradet et Mélanie Laurin
- Figure 3.S12: Mélanie Laurin
- Figure 3.S13: Mélanie Laurin
- Figure 3.S14: Dr Benjamin Haibe-Kains et Mélanie Laurin
- Figure 3.S15: Mélanie Laurin

* Dr Jean-François Côté a planifié les expériences.

* Mélanie Laurin, Jennifer Huber, Ariane Pelletier, Dr Tarek Houalla et Dr Benjamin Haibe-Kains ont réalisé les expériences.

* Dr Morag Park, Dr Yoshinori Fukui et Dr William J Muller ont fourni des réactifs.

* Mélanie Laurin, Jennifer Huber, Ariane Pelletier, Dr Tarek Houalla et Dr Jean-François Côté ont analysé les résultats.

* Le manuscrit a été écrit par Mélanie Laurin et Dr Jean-François Côté.

RAC-specific guanine nucleotide exchange factor DOCK1 is a critical regulator of HER2-mediated breast cancer metastasis

Mélanie Laurin^{1,2}, Jennifer Huber¹, Ariane Pelletier¹, Tarek Houalla¹, Morag Park³, Yoshinori Fukui⁴, Benjamin Haibe-Kains^{1,5}, William J. Muller³ and Jean-François Côté^{1,2,5-6}

¹Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, QC, Canada H2W 1R7.

²Département de Médecine (Programmes Biologie Moléculaire), Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H3T 1J4.

³Goodman Cancer Centre, McGill University, Montréal, QC, Canada H3A 1A3.

⁴Division of Immunogenetics, Department of Immunobiology and Neuroscience,

Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuda, Japan 812-8582.

⁵Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H3T 1J4.

⁶Experimental Medicine, McGill, Montréal, QC, Canada H3A 1A3.

Abstract

Progression of solid tumors to the metastatic stage is accountable for the majority of cancer-associated deaths. Further understanding of the molecular mechanisms governing metastasis is essential for the development of antimetastatic regimens. Here, we aimed to identify RAC activators that could promote metastasis downstream of human epithelial growth factor receptor 2 (HER2). We investigated if Dedicator of Cytokinesis 1 (DOCK1), based on its evolutionarily conserved role in receptor tyrosine kinases (RTKs)-mediated RAC activation and cell invasion, could be a regulator of metastasis. We report that high expression of *DOCK1* in HER2⁺ and Basal breast cancer subtypes inversely correlates with human patients' survival. Mechanistically, DOCK1 interacts with HER2 and promotes HER2-induced RAC activation and cell migration. To gain further insights, we developed a HER2 breast cancer mouse model with mammary-gland-specific inactivation of *Dock1*. In this in vivo model, a significant decrease in tumor growth and metastasis in lungs was found in animals where *Dock1* is inactivated. Furthermore, we found that Dock1 is required for maximal activation of two HER2 effectors, c-Jun and Stat3. Using an unbiased gene profiling approach, we identified a mammary tumor *Dock1*-associated gene signature enriched for genes implicated in response to IFN type I. This analysis revealed a unique set of genes, including Receptor Transporter Protein 4 (Rtp4) and Stat1, for which the expression levels can be used to independently predict breast cancer outcome in HER2⁺ patients. Our work demonstrates DOCK1-RAC signaling as a novel HER2 effector pathway essential for HER2-mediated breast cancer progression to metastasis and offers a therapeutic opportunity to limit the spread of metastatic breast cancers.

Keywords: ERBB2 | DOCK180 | RhoGEF | tumorigenesis

Introduction

Despite breakthroughs in the treatment of breast cancer, the most prevalent cancer in women, progression of the disease remains an important cause of death. Virtually all fatalities can be attributed to complications due to the appearance of secondary tumors at distant sites. The identification and therapeutic targeting of proteins regulating the metastatic step is therefore a priority for improving the lifespan of afflicted patients (381). Two major breast cancer subtypes, basal-like and HER2⁺, are linked to aggressive and recurrent primary and metastatic tumors, and ultimately, to poor survival (231). HER2 is a member of the EGF receptor family of receptor tyrosine kinases (RTKs) also comprising HER1, HER3 and HER4 (382). Amplification of the HER2 locus, or aberrant expression of its protein product, is observed in near 20% of human breast cancers (72). Mouse models expressing various forms of HER2 in the mammary gland recapitulate most aspects of the human disease, including metastasis, and are powerful tools to gain insight into signaling pathways controlling tumorigenesis *in vivo* (73). Nonetheless, regulators of HER2-mediated metastasis remain poorly characterized.

Metastasis is a complex and deadly, yet inefficient, step in breast cancer that involves cancer cells leaving the primary tumor, entering blood vessels and exiting the circulation to colonize foreign soils (383). Aggressive migration and invasion behaviors of breast cancer cells are presumed to be essential for metastatic dissemination. RHO GTPases are established as central signaling intermediates controlling the migration of cancer cells (383). RAC promotes mesenchymal cell movement (66), but also contributes to cell proliferation and survival. Whereas HER2 can activate RAC in cell lines (384), the exact guanine exchange factors (GEFs) responsible for its activation downstream of HER2 remain poorly defined *in vivo*. The Dedicator of Cytokinesis 1 (DOCK1) family GEFs are an important class of cytoskeletal regulators controlling cell migration (8). In oogenesis, the *Drosophila* ortholog myoblast city acts downstream of the RTK Pdgf/Vegf receptor to control the invasive migration of the border cell cluster (68). Studies in cell lines, including breast

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.

Results

Expression of *DOCK1* Is Associated with an Adverse Clinical Outcome for HER2⁺ and Basal Breast Cancer Patients.

Immunohistochemistry (IHC) was performed on a panel of breast tumors to assess if DOCK1 is expressed in this disease. DOCK1 protein was detectable in the tumor epithelial cells of 144/145 samples (Figure 3.S1 A page 166). We examined the relationship between DOCK1 mRNA expression and the probability of survival of breast cancer patients according to clinical subtypes using a large set of microarray data linked to clinical outcome (n=6327, including 3466 patients for whom survival data was available) (386). DOCK1 was broadly expressed but higher in estrogen receptor (ER)⁺/HER2⁻ high proliferation (Luminal B) subtype (**Figure 3.S1 B page** 166). As shown in Kaplan-Meier survival curves of patients classified based on DOCK1 expression, high levels of its expression was significantly associated with poor disease-free survival in HER2⁺ (*P=0.048) and ER⁻/HER2⁻ (*P=0.03) subtypes (Figure 3.1 A page 141); association with survival was not observed for the luminal subtypes ($ER^{+}/HER2^{-}$ low and high proliferation tumors; Figure 3.S1 C page 166). These analyses indicated that *DOCK1* expression is linked to survival of patients afflicted with aggressive breast cancers and provided the impetus for investigating the mechanism(s) whereby this GEF contributes to breast cancer.

DOCK1, a Target of HER2, Promotes Heregulin-Mediated RAC Activation.

Since DOCK1 binds RTKs and activate RAC during cell motility (11, 12, 68), we examined if it can enter in a protein complex with HER2. In human ductal breast epithelial tumor cell line T47D, breast cancer cells, endogenous HER2 coimmunoprecipitated with DOCK1 only when cells were treated with Heregulin β 1 (HRG) (**Figure 3.1 B page 141**). We also expressed Flag-DOCK1 and an oncogenic form of HER2 (NeuNT) and performed coimmunoprecipitation assays. A robust coprecipitation of NeuNT was detected in Flag-DOCK1 immunoprecipitates (**Figure** **3.S2 A page 167**). Treatment of T47D cells with HRG, or overexpression of NeuNT, resulted in the phosphorylation of DOCK1 on a regulatory site, Y¹⁸¹¹, known to promote its RacGEF activity (**Figure 3.1 C page 141, Figure 3.S2 B page 167**) (11). Phosphorylation on Y¹⁸¹¹ was not directly regulated by HER2 but instead mediated by SRC protein kinases (**Figure 3.1 D page 141, Figure 3.S2 C,D page 167**). HRG-mediated activation of HER2 is reported to activate RAC and increase cell motility (384). To examine whether DOCK1 can facilitate HRG-induced RAC activation and cell migration, its GEF activity was inhibited via a small molecule, 4-[3'-(2"-chlorophenyl)-2'-propen-1'-ylidene]-1-phenyl-3,5-pyrazolidinedione (CPYPP) (387). Treatment of T47D cells with HRG induced a ninefold increase in RAC activation that was blocked in the presence of the inhibitor (**Figure 3.1 E page 141**). Whereas treatment of T47D cells with HRG induced cell migration, this effect was abrogated either in the presence of CPYPP or when *DOCK1* expression levels were reduced using RNAi (**Figure 3.1 F,G page 141**). These results demonstrate that DOCK1 is activated and mediates RAC activation and migration downstream of HER2.

Quantitative Expression Profile of Rho GTPases and Their Regulators in Tumors.

Based on the clinical data and mechanistic insights above suggesting that DOCK1 is operating downstream of HER2, we aimed to investigate its function in an *in vivo* model of HER2 breast cancer. We first examined what are the major Rho GTPases, GEFs, GTPase Activating Proteins (GAPs), and guanine nucleotide dissociation inhibitors (GDIs) expressed in HER2 mouse breast tumors. mRNA deep sequencing was used to generate a quantitative transcriptome of mouse mammary tumor virus (*MMTV*)-*Neu* (variant NDL2-5) transgenic tumors (n=4). The most expressed GEFs included *Larg*, *Dock9*, *Dock8*, *Tiam1*, α -*Pix*, *p190Rhogef*, *Farp1* and *Dock1* (Figure 3.S3 A page 169). α -*Pix*, *Dock1*, β -*Pix*, *Tiam1* and *Dock7* are the highest expressed RacGEFs (Figure 3.1 H page 141).





(A) High levels of *DOCK1* expression are associated with poor prognostic for HER2+ and Basal-like breast cancer patients. (B) DOCK1 is found in a complex with HER2 upon treatment of T47D cells with HRG (n=3). (C) DOCK1 is phosphorylated on Y¹⁸¹¹ in T47D breast cancer cells upon treatment with 20 ng/ml HRG for 15 min (n=5). (D) DOCK1 is phosphorylated on Y¹⁸¹¹ by SRC kinase. *In vitro* kinase assay was performed using recombinant SRC and purified GST and GST-DOCK1¹²²⁸⁻¹⁸⁶⁵ proteins (n=3). (E-F) Pharmacological inhibition of DOCK1 impairs HRG-mediated RAC activation and migration in T47D cells. (E) Cells were treated with 20 ng/ml HRG for 15 minutes in the presence of 100 M CPYPP and active RAC was measured by GST-PAK-PBD pulldowns (n=5). (F) Migration of T47D cells toward 20 ng/ml HRG was measured in a Boyden chamber assay in the presence or absence of 100 M CPYPP (n=7). (G) Migration of T47D cells transfected with 100 µM NON-targeting or ON-TARGET SMART pool DOCK1 siRNA toward 20 ng/ml HRG was measured in Boyden chamber assay (n=7). (H) Expression profiling uncovers *Dock1* as a highly expressed RacGEF in HER2-induced mouse mammary tumors. Data were expressed as mean + SD (n=4). One-way ANOVA followed by Bonferroni test calculated the *P* values. *= < 0,05; **= < 0,01; ***= < 0,001; ****= < 0,000 1.

The partner of Dock1, *Elmo1*, was highly expressed in comparison to *Elmo2/3* in these tumors (**Figure 3.S3 B page 169**). Moreover, *Rac1* was found to be the most expressed Rho GTPase in tumors (**Figure 3.S3 C page 169**). In term of negative regulators, RhoGDIs are minimally expressed (*RhoGDI* β/γ , *RhoGDIa* was not detected) and the RhoGAP *Arhgap31/Cdgap* stood out as the majorly expressed member (**Figure 3.S3 D,E page 169**). These data provide a snapshot of the Rho regulation system and confirmed that *Dock1* is highly express in HER2 tumors.

Dock1 contributes to tumor growth.

To examine the role of Dock1 in HER2-induced tumorigenesis *in vivo*, a conditional mutant mouse line of *Dock1* was generated (**Figure 3.S4 A-E page 171**). Before carrying out tumorigenesis studies, we investigated whether deletion of *Dock1* in mammary glands would have adverse effects on the development of the tissue. Whole-mount outgrowth analyses at 9, 12 and 15 weeks established that *Dock1* is dispensable for mammary development (**Figure 3.S4 F page 171**). Additionally, *MMTV-Cre⁺Dock1^{fix/fix}* mice were capable of nursing their offsprings to maturity suggesting that loss of *Dock1* does not impair mammary gland function.

To assess the role of Dock1 in a HER2 model of breast cancer, Mouse Mammary Tumor Virus (*MMTV*)-*NeuNDL2-5-Internal Ribosome Entry Site (IRES)-Cre* (*NIC*) transgenics were intercrossed with *Dock1*^{fix} mice and tumor progression was examined in females. In this model, expression of *NeuNDL2-5* and Cre recombinase are coupled and females develop ductal carcinoma *in situ* that progress to invasive carcinoma and lung metastasis (74). Three cohorts of mice were generated (*NIC*⁺*Dock1*^{wt/wt}, *NIC*⁺*Dock1*^{wt/fix} and *NIC*⁺*Dock1*^{fix/fix}), and animals were monitored weekly for apparition of tumors that were next allowed to grow for 5 wk. Mice developed mammary tumors irrespective of the genotype and a small delay of tumor onset in *NIC*⁺*Dock1*^{wt/fix} and *NIC*⁺*Dock1*^{fix/fix} animals was observed (**Figure 3.2 A page 144**). Histological analyses demonstrated that tumors from all genotypes displayed a solid adenocarcinoma appearance (**Figure 3.2 B page 144**). We further confirmed that Cre-mediated recombination of the *Dock1* floxed allele was efficient in

142

tumors (**Figure 3.S4 E page 171**). Furthermore, genetic ablation of *Dock1* in mammary tumors reduced the levels of Dock1 protein as verified by western blotting and IHC while it had no impact on the expression of Neu (**Figure 3.2 C,D page 144**). Whereas mammary tumor initiation is normal in *NIC⁺Dock1^{fix/fix}* animals, they presented fewer tumors nodules as well as a significant decrease in their cumulative tumor burden after 5 wk (**Figure 3.S5 A page 172**; **Figure 3.2 E page 144**). We observed less large tumors in *Dock1*-null mammary glands while the small and medium formed equally in all genotypes (**Figure 3.S5 B page 172**). A similar coverage of CD31⁺ blood vessels in *Dock1*-deficient and wild-type NIC tumors was observed ruling out a defect in angiogenesis to explain the growth defect (**Figure 3.S5 C page 172**). We next investigated an early time point of tumor onset by quantifying mammary intraepithelial neoplastic lesions (MINs) on inguinal mammary glands that did not develop tumors and noted a significant reduction in the *Dock1*-deficient mammary glands (**Figure 3.2 F,G page 144**).

The proliferative and apoptotic status of *Dock1*-null mammary tumor cells was assessed to gain mechanistic insights into the tumor growth phenotype. A statistically significant decrease of Ki67-positive cells in the *Dock1*^{fix/fix} tumors was noted when compared to heterozygote or wild-type tumors (**Figure 3.2 H page 144**; **Figure 3.S5 D page 172**). Conversely, a significant increase in Caspase-3 positive cells was detected in the *Dock1*-mutant tumors, suggesting that Dock1 provides a survival signal during Neu oncogenic stress (**Figure 3.2 I page 144**; **Figure 3.S5 D page 172**). One proliferative signal downstream of HER2/Integrin β 4 crosstalk is c-Jun (352). Interestingly, its activator Jnk is a target of Dock1-Rar signaling (388). We examined the levels of phosphorylated c-Jun (pc-Jun) in MINs and found a decrease in *Dock1*-mutant lesions in comparison to wild-type counterparts (**Figure 3.2 J page 144; Figure 3.S6 page 173**). Notably, this difference was only noticeable in MINs as pc-Jun levels were similar in fully developed wild-type and mutant tumors (**Figure 3.S6 page 173 Figure 3.S7 page 174**). These results indicate that Dock1 contributes to HER2-mediated tumor growth.



Figure 3.2 Dock1 contributes to HER2 tumorigenesis in a mouse model of breast cancer

(A) Kaplan-Meier analysis of tumor onset. *NIC***Dock1*^{wt/mx} and *NIC***Dock1*^{mt/mx} mice display a minor delay in tumor onset. (B) H&E-staining showing that all animals develop tumors with an adenocarcinoma histology. (Scale bar: 100 µm, 20x) (C) Western blot analyses demonstrating the absence of Dock1 and equal Neu expression in tumor lysates. (D) ICH analyses showing Cre (top) and Dock1 (bottom) expression in *NIC***Dock1*^{mt/mx} and *NIC***Dock1*^{flx/flx} tumors (Scale bar top: 250 µm, 10x; Scale bar bottom: 50 µm, 40x). (E) Dock1 contributes to HER2-induced tumor growth. Average cumulative tumor burden per animal (in cm³). (F) *NIC***Dock1*^{flx/flx} mice develop less mammary intraepithelial neoplasic lesions (MINs). Quantification of mammary MINs per tumor-free mammary gland 5 weeks after tumor onset is presented. (G) Representative carmine red staining of mammary glands showing MINs in all genotypes. (Scale bar: 1mm, 2,5x). (H) Dock1 promotes cell proliferation in HER2 tumors. Average percentage of Ki67-positive cells in tumors. (J) Impaired c-Jun activation in *Dock1*-null HER2 tumors. ICH analyses showing pc-Jun levels in MINs. (Scale bar: 100 µm, 20x). One-way ANOVA followed by a Bonferroni test calculated the *P* values. *= < 0,05; **= < 0,01.

Dock1 is Essential for HER2-Induced Metastasis.

NIC mice develop lung metastasis and we investigated whether inactivation of *Dock1* can protect from this cancer progression step. The incidence of metastasis was decreased in lungs from *NIC⁺Dock1^{fix/fix}* (39%) in comparison to lungs from NIC⁺Dock1^{wt/wt} (52%) and NIC⁺Dock1^{wt/flx} (55%) mice (Figure 3.3 A page 146). For animals afflicted with lung lesions, a fivefold reduction of the number of metastases was noted in NIC⁺Dock1^{fix/fix} compared to NIC⁺Dock1^{wt/wt} mice (Figure 3.3 B page **146**). Notably, 100% of the lung metastases in the *NIC⁺Dock1^{fix/fix}* mice were confined to the lung vasculature, whereas close to half the metastasis were extravascular in control animals, suggesting a role for Dock1 in lung invasion (Figure 3.3 C page **146**). In *NIC⁺Dock1^{wt/wt}* animals, lung metastases expressed high levels of Dock1 (Figure 3.S8 page 175) with respect to the expression detected in the primary tumors (Figure 3.2 D page 144). Notably, we also noted residual expression of Dock1 in metastases from *NIC⁺Dock1^{fix/fix}* animals suggesting that lung lesions are enriched in a small population of cells that resisted Cre-mediated gene inactivation (Figure 3.S8 page 175). We also examined if immune cells are differentially recruited to breast tumors in the mutant mouse. Equal amounts of CD45⁺ hematopoietic cells were present in tumors from all genotypes (Figure 3.S9 page 176) ruling out a major contribution of the immune stroma to the observed metastatic phenotype. We conclude that the loss of Dock1 is likely to have a cell intrinsic effect in NIC transformed cells.

Because a decrease in the primary tumor volume in *NIC*⁺*Dock1*^{fix/fix} mice could alter metastasis efficiency, an experimental metastasis assay was performed to validate our *in vivo* findings. NeuNT-transformed Normal Murine Mammary Gland epithelial (NMuMG) cells form lung metastases upon tail vein injection (389) and they were modified to express two independent shRNAs targeting *Dock1* (**Figure 3.3 D page 146**). An equal number of NMuMG-NeuNT, NMuMG-NeuNT^{sh1} ^{DOCK1} and NMuMG-NeuNT^{sh2} ^{DOCK1} cells were injected in nude mice and metastasis to lungs was quantified. We observed a 9.6- and 17.3-fold decrease in metastases in mice

145



Figure 3.3 Dock1 regulates HER2-mediated lung metastasis

(A) Incidence of lung metastases is reduced in *NIC***Dock1*^{fix/fix} animals. Quantification of the % of mice that develop lung metastases for the indicated genotypes. (B) *NIC***Dock1*^{fix/fix} mice have a reduction in the amount of lung lesions (C) H&E-staining showing that metastases in *NIC***Dock1*^{fix/fix} mice have a reduction in the amount of lung lesions (C) H&E-staining metastases in *NIC***Dock1*^{fix/fix} mice can be found residing inside blood vessel (left) and invading the lung parenchyma (middle). Metastases in *NIC***Dock1*^{fix/fix} were found inside blood vessels (right). (Scale bar: 250 µm, 10x). (D) Western blot analysis demonstrating two independent and stable shRNA-mediated knockdown of Dock1 in NMuMG-NeuNT cells. (E) Representative pictures of the lungs in (F). (F) Average lung lesions from animals injected with NMuMG–NeuNT, NMuMG-NeuNT^{sh1}Dock1 and NMuMG-NeuNT^{sh2}Dock1 cells. (G) Dock1 regulates Stat3 phosphorylation in HER2-driven MINs. ICH analyses showing pStat3 staining in mice lesions. (Scale bar top: 500 µm, 5X; Scale bar bottom: 100 µm, 20x) One-way ANOVA followed by a Bonferroni or a student t test was used to calculate the indicated *P* values. *= < 0,05; **= < 0,01.

injected with cells where *Dock1* was downregulated by shRNAs in comparison to control cells (**Figure 3.3 E,F page 146; Figure 3.S10 page 177**). Collectively, these results demonstrate that Dock1 is a central mediator of HER2-driven breast cancer metastasis.

As Dock1 and Rac act in the integrin-signaling pathway, we verified if upstream components were activated normally in *Dock1*-null tumors. In agreement with the position of Dock1 in the signaling cascade, we tested if intermediates were activated correctly (Figure 3.S11 page 178). An important mediator of metastasis downstream of HER2, and a partner of activated Rac, is Stat3 (*352*). We investigated the phosphorylation status of Stat3 in MINs and found that it is highly phosphorylated and distributed in a polarized manner in control MINs whereas only a faint and evenly distributed pStat3 signal is detectable in *Dock1*-deficient MINs (Figure 3.3G page 169; Figure 3.S6 page 173). This difference in Stat3 activation was only noted in MINs since a similar pStat3 signal was observed in all fully developed tumors (Figure 3.S6 page 173 Figure 3.S7 page 174). These data identify Dock1 as a critical component to promote Stat3 phosphorylation during the early stages of HER2 tumorigenesis.

Identification of a gene signature associated to *Dock1* expression in HER2 mammary tumors.

Dock1 is generally assumed to exert its function at the membrane via Rac activation and cytoskeleton remodeling (8). To further characterize the defects in tumor growth and metastasis occurring in *Dock1*-deficient HER2 tumors, we established the transcriptome of *NIC*⁺*Dock1*^{*wt/wt*} (n=4) and *NIC*⁺*Dock1*^{*flx/flx*} (n=4) mammary tumors by next generation RNA-sequencing and uncovered significant variations in the expression of 45 genes between our experimental conditions (>2 fold change; p value < 0.05; out of approximately 16 000 transcripts sequenced) (**Figure 3.4 A page 148 and Table S3.I page 184**). Globally, this represents a constrained change of 0.28% in gene expression. This differential expression data was confirmed



Figure 3.4 Indentification of a Dock1-null gene signature enriched in IFN response genes

(A) Heat map of the 45 genes differentially expressed between *NIC***Dock1*^{flx/flx} tumors. Red, elevated; green, decreased; intensity of color represents relative change. Genes in red are bona fide players of IFN signaling according to the literature. (B) Gene ontology analyses. (C) Expression levels of a subset of genes from the *NIC***Dock1*^{flx/flx} signature correlate with disease-free survival in human HER2* breast cancer patients. Correlation coefficient >1 means high expression of the gene correlate with a poor prognostic and <1 with a good prognostic. (D) Expression levels of *RTP4* and *STAT1* independently predicts disease-free survival in HER2* cancer patients.

by Q-PCR for a subset of the genes (**Figure 3.S12 page 180**). Among upregulated genes in the *Dock1*-knockout tumors were *Casein a/b* (*Csn1s1* and *Csn2*), *Lactalbumin* (*Lalb1*) and *Estrogen receptor 1* (*Esr1*) (**Figure 3.S.4 A page 171**), characteristic markers of differentiated mammary epithelial cells, suggesting that *Dock1*-mutant tumors are less de-differentiated.

We performed gene ontology (GO) analyses to gain insights into the biological processes regulated by the differentially expressed genes. Unexpectedly, 34/45 differentially expressed genes, and specifically 34/37 of the downregulated genes in *Dock1*-null tumors, are enriched for interferon response genes (**Figure 3.4 A,B page 148**; genes shown in red). These genes can be further broken down into four functional categories (**Figure 3.4 B page 148**). A number of the identified genes in our *Dock1*-null tumors have previously been linked to a Stat1-governed cancer gene signature that is predictive of risk of resistance to radiotherapy (390) (**Figure 3.4 A page 148**). Likewise, we identified Stat1 as a downregulated gene in our *Dock1*-null gene signature and we could confirm lower levels of Stat1 protein in our *Dock1*-null tumors both by ICH and western blot (**Figure 3.56 page 173; Figure 3.57 page 174**). As all the other downregulated genes are targets of Stat1, we envision that our *Dock1*-null gene signature could reflect variation in Stat1 activity.

STAT1 is known to regulate transcription of a large set of response genes when interferon signaling is engaged. Unexpectedly, oncogenic transformation by RAS was shown to induce the expression of INF-responsive genes including *ISG15* that is also linked to poor prognosis and increased cell migration (391-393). We investigated whether such a gene regulation profile could be reproduced *ex vivo* upon NeuNT transformation. For the genes tested (Rtp4, Isg15, Stat1, Uba7), higher expression could be detected in NMuMG-NeuNT in comparison to parental NMuMG-EV explants (**Figure 3.S13 page 181**). These genes are also regulated by DOCK1 as they were less expressed in NMuMG-NeuNT^{sh1 DOCK1} cells (**Figure 3.S13 page 181**). We examined the importance of our *Dock1*-null gene signature in breast cancer and found that expression levels of five genes (*UBA7*, *RTP4*, *CSN1S1*, *DDX60* and *IFI44*) are individually predictive of disease-free survival in HER2⁺ patients (**Figure 3.4 C page 148**). Furthermore, we examined the survival curves and identified six genes (*STAT1*, *RTP4*, *OASL*, *PARP12*, *LGALS9*, *LGALS3BP*) for which high levels of expression correlated with a worse survival prognostic in HER2⁺ patients (**Figure 3.4 D page 148**; **Figure 3.514 A page 182**). We tested if the *Dock1*-associated gene signature could predict breast cancer outcome in a cohort of patients irrespective of the molecular subtype and found that our *Dock1*^{fix/fix}-like signature correlates with good patient survival (**Figure 3.514 B page 182**). These data demonstrate that DOCK1 controls the expression of a gene signature that predicts the outcome of breast cancer patients.

Discussion

DOCK1 is established to promote RAC-dependent cell migration/invasion in a variety of in vitro cellular models (385). A key clinical finding of this report is that expression of *DOCK1* correlates with poor survival for HER2⁺ and Basal breast cancer patients (231, 381). These breast cancer subtypes present the worst clinical prognosis and remain challenging to treat due to their propensity to metastasize. Our findings that DOCK1 is activated by, and interacts with, HER2 to promote cell migration suggest that it is a critical and therapeutically targetable GEF during breast cancer metastasis. The DOCK1 inhibitor CPYPP (22, 387) blocked RAC activation and migration and it is conceivable that a next generation drug could be used in the clinic in combination with anti-HER2 regimens to limit metastasis. Further studies on the role of DOCK1 in Basal breast cancer are also warranted. GEFs responsible for driving migration downstream of HER2 remain poorly defined *in vivo*. We provide the first in vivo analysis supporting a role for Dock1 in cancer progression by demonstrating an essential contribution of this GEF to tumor growth and metastasis in a HER2 breast cancer mouse model. Interestingly, systemic inactivation of the RacGEF Tiam-1 was reported to protect mice from Neu-induced tumors suggesting a role in cell survival in vivo (394). P-REX1 was identified as a GEF mediating RAC activation in Luminal breast cancer cells upon HRG stimulation (384). DOCK1 and P-REX1 share similarities as they are recruited to the membrane by PIP₃ and can act downstream of G-protein Coupled Receptors to mediate RAC activation in migrating cells (29, 384). P-REX1 is likely to be involved in Luminal and Estrogen Receptor positive breast cancer progression according to its expression profile (384). In our in vivo tumor model, we found *P-REX1*, in contrast to *DOCK1*, to be minimally expressed in NIC tumors. While DOCK1 is also highly expressed in Luminal breast cancers, high levels of *DOCK1* correlated with poor prognosis only in HER2⁺ and Basal breast cancers. These findings suggest that these two GEFs are likely to contribute to the progression of different subtypes of breast cancers.

STAT3 is frequently activated in HER2⁺ and pSRC⁺ human invasive breast carcinomas (395). Additionally, joint HER2/Itg β 4 signaling promotes activation of Stat3 for efficient metastasis (352). Inactivation of *Stat3* in HER2 tumors supports a role for this protein in metastasis and in tumor growth (358). We reporte a decrease in pStat3 in *Dock1*-null MINs and observed similar phenotypes between *Dock1*- and *Stat3*-null mice in growth and metastasis suggesting that Dock1 could act upstream of Stat3 activation. It will be important to address if HER2/Itg β 4 co-signaling relies on Dock1/Rac for cell proliferation and migration. Deletion of *Dock1* also phenocopies loss of *Itg\beta1* in HER2 tumors suggesting that this GEF may signals at the crossroad of HER2/Itg β 1 signaling (351). Dock1 therefore appears to be a GEF integrating co-signaling of HER2 with integrins (**Figure 3.S15 page 183**).

We identified a gene signature composed of Interferon response genes under the control of HER2 and Dock1. The signaling events whereby HER2 promotes the expression of these genes are not understood. One possibility would be that HER2 overexpression could increase interferon production by the tumor cells through the IKK/NF-kB pathway (Figure 3.S15 page 183; arrow 1). However, it is unlikely that Dock1/Rac could be promoting transcription of IFNs since their mRNAs are not expressed in NIC tumors. Alternatively, stromal cells could be providing interferon for the tumor (Figure 3.S15 page 183; arrow 2). Since we could recapitulate HER2induced expression of Interferon response genes ex vivo, our data instead support a model where transcription of these genes is tumor cell autonomous. Our current working model is that Dock1/Rac could be promoting the expression of Interferon response genes by acting at the level of the Stat1/Irf9 module (Figure 3.S15 page **183**; arrow 3). We suggest that the observed downregulation of *Stat1* expression and activation in our *Dock1*-mutant tumors contribute to the reduction in transcription of Interferon response genes. How Dock1/Rac contributes to the reduction of Stat1 expression and whether it could directly contribute to activate the transcriptional activity of the Stat1/Irf9 unit remains to be fully investigated.

We identified at least two novel genes, *STAT1* and *RTP4*, which are individually predictive of patient outcome in the HER2⁺ breast cancer subtype. Recent genetic studies suggest that *STAT1* is a tumor suppressor during HER2 tumorigenesis (396). Similar to our findings here, others link a STAT1 gene network to poor patient outcomes (390). Collectively, these results suggest that STAT1 could be acting in a different manner at stages of tumor initiation, resistance and dissemination; temporal deletion of *Stat1* during HER2 oncogenesis would be informative. RTP4, a chaperone escorting GPCRs at the membrane (397), could be a novel regulator of HER2. We also found a robust modulation of genes regulating ISGylation (*Isg15, Herc6, Usp18, Uba7*). Recent findings demonstrated that oncogene transformation could induce the expression of ISG15, in a cell autonomous manner, and increase its conjugation on cytoskeletal proteins to modify their activity and promote cell migration (392, 393). Probing the function of this ubiquitin-like post-translational modification system in HER2 tumorigenesis will be important.

Materiel and Methods

Bioinformatics, clinical correlations and tumor microarray methods are described in SI Experimental Procedures. Cell lines. antibodies and methods for GTP coimmunoprecipitation, kinase and RAC assays, western blot. immunohistochemistry and cell migration assays are described in SI Experimental Procedures. Generation of the Dock1 conditional knockout is described in SI **Experimental Procedures**. Fore tumorigenesis studies, *Dock1* flox mice were crossed with NIC (MMTV-NeuNDL2-5-IRES-Cre) transgenic mice. Large cohorts of female mice were generated and analyzed in detail 5 weeks after tumor onset, which was determined by physical palpation. Further details are available in SI **Experimental Procedure**. RNA deep sequencing, bioinformatics analyses, Q-PCR validation and statistical analysis are described in **SI Experimental Procedures**.
Acknowledgements

We thank N. Fradet for technical assistance and M. Patel for reading the manuscript. We acknowledge the Cell Migration Consortium authorities (Drs R. Hynes, R. Horvitz and A. Burds) for help with the construction of the conditional *Dock1* mouse. We are grateful to Dr P. Siegel and J. Ranger for reagents and advice, and Dr M. Kazanietz (U. Pennsylvania) for discussions. We recognize the support from IRCM colleagues, Drs F. Robert and O. Neyret for deep sequencing, and S. Riverin for mouse colonies maintenance. The authors wish to acknowledge the "Next Generation Sequencing" platform of the McGill University and Genome Québec Innovation Center. This work was funded by a grant from the Canadian Cancer Society (#019104) to J.F.C. WJM is CRC chair in Molecular oncology. M.L. and J.H were supported by a U. Montréal and Invitrogen-IRCM scholarships, respectively. J.F.C. is a recipient of a Junior Investigator award from the Fonds de Recherche du Québec-Santé.

Supplemental Information

Materials and methods

Compendium of microarray breast cancer datasets

Gene expression datasets, gene annotations and clinical information have been downloaded from http://compbio.dfci.harvard.edu/pubs/sbtpaper/, companion website of the publication of Haibe-Kains *et al.* (386). To facilitate comparison between datasets, we applied a robust linear scaling to *DOCK1* expression measurements such that the quantiles 2.5% and 97.5% of the expression values were set to -1 and +1, respectively.

NIC⁺Dock1^{flx/flx}-like signature score

For a specific data set, the signature score was computed for each sample as $score = \sum s_i x_i / \sum |s_i|$

where x_i is the expression of a gene in the module that is present in the data set platform, and s_i is either +1 or -1 depending on the sign of the fold change (over- or underexpression) computed during comparison between *NIC*⁺*Dock1*^{fix/fix} and the control *NIC*+*Dock1*^{wt/wt} tumors. Similarly to scaling of *Dock1* expression levels, we applied a robust linear scaling such that the quantiles 2.5% and 97.5% of the signature scores were set to -1 and +1, respectively.

Survival analysis

All survival analyses have been performed with R version 2.15. Distant metastasis-free survival whenever available, relapse-free survival otherwise have been considered for clinical outcome. All survival data were censored at 10 years. Hazard ratios (HR) were calculated using Cox regression (using the survival package version 2.36-14) with the dataset as stratum indicator, allowing for different baseline

hazard functions between cohorts. Survival curves were estimated using the Kaplan-Meier estimator and compared using the two-sided log-rank test.

Cell culture, transfection and plasmids.

HEK293 and T47D cells were routinely cultured in DMEM supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and a cocktail of penicillin and streptomycin (Gibco). NMuMG cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES pH7.4, 10 µg/ml insulin and penicillin/streptomycin. HEK293 cells were transfected by the calcium phosphate method while Lipofectamine 2000 was used for transfection of NMuMG and T47D. NMuMG cells stably expressing empty vector (EV) or the NeuNT oncogene were generated by transfection of empty pcDNA3.1 or pcDNA3.1 rat NeuNT (Neo resistance; kind gift from Dr P. Siegel, McGill). Both cell populations were selected in G418 and injected in the mammary fat pads of Nude mice (Charles River) as described in (389). A cyst from the NMuMG-EV and tumors from NMuMG-NeuNT were harvested, dissociated and cells were explanted in culture in DMEM supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES pH7.4, 10 µg/ml insulin, 500 µg/ml G418 and penicillin/streptomycin. Downregulation of *Dock1* expression in NMuMG-NeuNT cells was achieved as follow: NMuMG-NeuNT explanted cells were independently transfected to express two different Dock1-specific shRNAs (Open Biosystems, Oligo ID: V2MM 203272 for sh1 Dock1 and V2MM 109441 for sh2 DOCK1 from the pSM2 Retroviral shRNAmir library). 1 µg/ml puromycin was added to the media and clones were isolated and tested for Dock1 protein knockdown. T47D cells were transfected with 100 nM ON-TARGET SMART pool Human Dock1 siRNA (Dharmacon) to achieve transient Dock1 downregulation or 100 nM NON-targeting siRNA (Dharmacon) as control. pCNX2 Flag-DOCK1 was obtained from Dr M. Matsuda (Kyoto University). pcDNA3.1 Myc-ELMO1 was described previously (369). pGEX-4T-1-DOCK1¹²²⁸⁻¹⁸⁶⁵ vector used for the production of the GST-DOCK¹²²⁸⁻¹⁸⁶⁵ recombinant protein, was generated by amplifying DOCK1 by PCR from pcDNA3 Zeo^R (see **Table S2** for primer details) from residue 1228 to 1865. After ligation of the PCR product into pGEM vector (Promega),

the insert was digested and transferred into pGEX-4T-1 using BamH1 and Notl enzymes.

Immunoprecipitation, RAC GTP assays and western blot analyses.

For total cell lysate preparation, minced tumor pieces and T47D cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris pH7.5, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholic acid, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA). For immunoprecipitation with M2-Flag beads (Sigma), HEK293 cells were lysed in NP-40 buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH7.5, 1% NP-40). For immunoprecipitation on endogenous DOCK1 with anti-DOCK1 (H4 beads, Santa Cruz Biotechnology), T47D cells were treated with or without HRG for 15 min, lysed in RIPA buffer and immediately diluted with HNTG buffer (50 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Triton-X100, 10% glycerol). For RAC activation assay, T47D cells were serum starved in DMEM for 48 hours, treated with DMSO or with 100 μ M CPYPP DOCK1 inhibitor (387) for 60 min prior to treatment with or without 20 ng/ml HRG for 15 min and lysed in the RAC/CDC42 buffer (20 mM Tris pH7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl2, 0.5% NP-40, 5 mM ß-glycerophosphate, 1 mM DTT). The RAC GTP status was analyzed by GST-PAK-PBD precipitation as previously described (369). Equal amounts of proteins lysates or pull downs were separated by SDS-PAGE and RAC was detected by immunoblotting.

GST-Protein purification and kinase assays

GST and GST-DOCK1¹²²⁸⁻¹⁸⁶⁵ recombinant proteins were prepared as previously described (3). For both hot and cold kinase assays, 2 μ g of GST and GST-DOCK1¹²²⁸⁻¹⁸⁶⁵ were mixed with either 400 ng ERBB2 (31166; Active motif) or 50 ng SRC (31195; Active motif) recombinant kinases and 40 μ l of KRB Buffer (60 mM Hepes pH 7.5, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 50 μ l ATP, 3 μ M NaVO₄, 1.2 mM DTT). For hot kinase assays, 10 μ Ci of ATP gamma ³²P was added (Perkin Elmer). Reactions were incubated for 60 min at 30 °C. Reactions were stopped by adding SDS Sample Buffer and denaturing for 5 min at 95 °C and were loaded on gel. Radioactive products were visualized by autoradiography while the non-radioactive product was detected with anti-pDOCK1^{Y1811}.

Cell migration assays

Cell migration assays were performed using 8-µm pores Boyden Chambers (Corning) coated with 25 ng/ml Collagen I (Roche) in 24 well plates as previously described (369). For chemical inhibition of DOCK1, serum starved T47D cells were pre-treated with either DMSO or 100 µM CPYPP DOCK1 inhibitor for 60 min before being detached and washed with DMEM 0.1% BSA. A total of 150 000 cells were seeded in DMEM/0.1% BSA-containing media supplemented with either DMSO or 100 µM CPYPP in the top chamber and cells were allowed to migrate for 5 hours toward the bottom chamber containing DMEM/0.1% BSA supplemented or not with 20 ng/ml HRG. For RNAi mediated inhibition of DOCK1, T47D cells were either transfected with a NON-targeting siRNA for control or ON-TARGET SMART pool DOCK1 siRNA. The next day cells were serum starved for 24h before being detached and washed with DMEM 0.1% BSA. A total of 150 000 cells were seeded in DMEM/0.1% BSA-containing media in the top chamber and cell were allowed to migrate for 5 hours toward the bottom chamber containing DMEM/0.1% BSA supplemented or not with 20 ng/ml HRG. Cells were then washed twice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde. The top surface of the membrane was wiped with a cotton swab and the membrane was mounted on a microscope slide using SlowFade Gold antifade reagent mounting media (Invitrogen). The average number of migrating cells in 10 independent 20x microscope fields was evaluated and each experiment was performed in duplicate (n=7).

Generation of the Dock1 conditional mouse line

Mice with a floxed *Dock1* allele were generated in collaboration with the Cell Migration Consortium (http://cellmigration.org). The *Dock1* locus spans 502 kb in C57BL/6 mice and consists of 52 exons (genome browser: genome.ucsc.edu). A conditional targeting vector was designed to delete a 1kb fragment that included a

part of the promoter region, exon 1 that contains the ATG and a part of intron 1 upon recombination between two inserted LoxP sites (Figure 3.S4 page 171). The targeting vector was also designed to insert a PGK-Neo sequence into intron 1 between two FRT sites. We previously had success abrogating *Dock1* expression when targeting the same region of the *Dock1* locus in a non-conditional knockout mouse model (46) and therefore a similar strategy was expected to completely inactivate *Dock1* upon Cre expression. Briefly, the targeting vector was designed by amplifying by PCR three genomic arms from a purified C57BI/6 BAC (#RP230347M11, Children's Hospital Oakland Research Institute) and by cloning them into a PGKNeoF2L2DTA vector provided by Dr. P. Soriano at Mount Sinai School of Medicine (see Table 3.SII page 185 for primer details). A first 3.2kb arm was cloned into a Not1 site, the 1kb conditional arm was cloned into a Sma1 site and the third 2.7kb arm was cloned into a HindIII site as depicted in Figure 3.S4 and all arms were fully sequenced. To obtain recombinant ES cells with the desired homologous recombination in the *Dock1* locus, 25 µg of XmnI linearized vector was electroporated in C57/B6 embryonic stem cells using standard procedures at MIT. Following selection with G418 antibiotics, more than 200 surviving clones were expanded and screened by southern blots to identify recombinant cells. Purified genomic DNA was digested with Spe1 and analyzed by Southern blotting with a 3' probe located in intron 1 in a region residing outside the targeting vector. This genomic probe was amplified by PCR from the C57/B6 BAC DNA and cloned into the TOPO vector. For the wild type and mutant allele, bands of 16.3 kb and 7.3 kb in sizes, respectively, were expected (Figure 3.S4 page 171 and Table 3.SII page 185).

The positive ES cell clones were electroporated with a plasmid coding for the FLP recombinase to remove the PGK-Neo cassette between the FRT sites. The ES clones were analyzed by southern blot with the same strategy as above. The FRT-recombined band is at 6.7kb and the final selected clones were used for injection in 129Sv blastocysts. Chimeras were obtained from the injection and the highest chimeric males were set up for mating with 129Sv females to result in the successful

160

germline transmission of the conditional *Dock1* locus. The genotype of these F1 animals was confirmed by Southern blot. From that point, genomic DNA from mice tails was extracted using standard procedures and mice were genotype by PCR as depicted in **Figure 3.S4 page 171** and **Table 3.SII page185** *Dock1* mice were backcrossed for 6 generations in the FVB/NJ genetic background prior to performing breast cancer studies.

Animal care and mouse strains.

Transgenic *NIC* (*MMTV-NeuNDL2-5-IRES-Cre*) FVB/NJ mice were previously described (398). FVB/NJ and athymic Nude (nu/nu) mice were obtained from Charles River. Transgenic *MMTV-Cre* mice were previously reported (294). Mice were housed in a mouse Specific Pathogen Free (SPF) facility. All mouse experiments were approved by the IRCM Animal Care Committee and complied with the Canadian Council of Animal Care rules.

Tumorigenesis studies

Dock1 flox mice were crossed with *NIC* (*MMTV-NeuNDL2-5-IRES-Cre*) transgenic mice. Large cohorts of *NIC⁺Dock1^{wt/wt}*, *NIC⁺Dock1^{wt/flx}* and *NIC⁺Dock1^{flx/flx}* female mice were generated. Each female with a genotype of interest was analyzed in detail 5 weeks after tumor onset, which was determined by physical palpation. At the time of necropsy, the amount and volume of tumor nodules, the presence of neoplastic lesions and lung metastases were determined exactly as done in (358). Tumor volume was calculated as previously described (399).

Experimental metastasis assay

2x10⁵ NMuMG-NeuNT, NMuMG-NeuNT^{sh1 DOCK1} and NMuMG-NeuNT^{sh2 DOCK1} cells were injected in the lateral tail vein of 12 athymic nu/nu mice per condition. 30 days after injection, lungs were harvested and fixed in 4% paraformaldehyde. The total number of metastatic lesions per animal's lung was counted under a dissection microscope (Zeiss).

Histology and immunohistochemistry

Tumors, mammary glands and lungs were fixed in 4% paraformaldehyde, paraffin-embedded, sectioned at 5 μ m and stained with H&E for histological analysis. Lung sections were collected every 50 μ m to determined metastases incidence and quantification. For immunohistochemistry analysis, tissue tumor microarray and paraffin sections were deparaffinized in xylene, rehydrated with ethanol gradient, treated using 10 mM sodium citrate buffer (pH 6) for antigen retrieval procedure according to standard method, blocked with 3% H₂O₂, permeabilized with IHC buffer (0,5% Triton-X100, 0.02% Tween-20/PBS), blocked with IHC buffer with 1% BSA and incubated with primary antibody overnight. (Primary antibodies are described in **Antibodies for western blotting and immunohistochemistry section**). Sections were washed 3 times with IHC buffer and incubated with biotinylated secondary antibody. Sections were washed 3 times with IHC buffer, and incubated with PBS and the reaction was revealed using DAB peroxidase substrate kit (SK-4100, Vector laboratories). Sections were counterstained with hematoxylin.

Tumor microarray staining

The human breast cancer tumor microarray was obtained from the Breast Cancer Genomic Group at the McGill University Health Centre Research Institute. Briefly, slides were subjected to an antigen retrieval procedure (See **Histology and immunohistochemistry section** for a complete description of the method). DOCK1 expression was visualized using DOCK1 (H4) as a primary antibody (1:100; Santa Cruz Biotechnology). Secondary antibody staining was performed as described above. Levels of DOCK1 expression on each breast tumor biopsy was attributed either a negative, weak, moderate or strong value.

Whole-mount analysis of mammary glands

To analyze if normal mammary gland development requires *Dock1*, we intercrossed *MMTV-Cre* and *Dock1*^{fix/fix} animals. Mammary gland #4 and #9 from 9, 12, and 15 weeks old *MMTVCre*⁺*Dock1*^{*wt/wt*} and *MMTVCre*⁺*Dock1*^{*fix/fix*} mice were

162

harvested. Mammary glands were fixed in 4% paraformaldehyde, removed from fat using two changes of acetone, and stained overnight in carmine red solution. Tissues were rehydrated following an ethanol gradient, cleared in xylene and mounted using Permount (SP15-500, Fisher). The developmental status of the mammary gland was assessed from micrograph of multiple glands per genotype.

Quantification of MINs (mammary intraepithelial neoplastic lesions)

Tumor-free mammary glands #4 and #9 from *NIC⁺Dock1^{wt/wt}*, *NIC⁺Dock1^{wt/flx}* and *NIC⁺Dock1^{flx/flx}* female mice were isolated at 5 weeks after tumor onset and mounted for whole-mount analysis as described above. The average number of neoplastic lesions from these mammary glands was determined by counting the total amount of MINs by counting under the microscope.

mRNA isolation, RNA-Sequencing and analysis, Q-PCR validation

The total mRNA from 4 $NIC^+Dock1^{wt/wt}$ and 4 $NIC^+Dock1^{flx/flx}$ average size tumors was extracted using TRIZOL reagent (Invitrogen) and according to recommended procedures. Total RNA was cleaned up using a RNeasy column (Qiagen) and on-column DNase treatment was performed using RNase-Free DNase Set (Qiagen). An initial input of 10 µg of total RNA for each sample was used to generate expression libraries, cBot cluster and to performed deep sequencing using Illumina TruSeq RNA Sample Preparation kit, Illumina TruSeq SR cluster kit v2 and Illumina TruSeq SBS Kit V2 50 cycles, respectively, and by following manufacturer procedures. Sequencing was performed at the McGill University and Genome Quebec Innovation Center using the Illumina HiSeg 2000 platform. Alignment of short reads was performed using TopHat version 1.4.1 (400); gene expression values were subsequently estimated using Cufflinks version 1.3.0 (401) Class comparisons were performed using DESeq version 1.8.3 (402). Genes were considered significantly differentially expressed when their nominal P value was less than 0.05 and genes presenting an average differential expression between the normalized counts of at least 2 fold between *NIC⁺Dock1^{wt/wt}* and *NIC⁺Dock1^{fix/fix}* conditions were selected to generate the *Dock1*-null signature.

To validate the differential gene expression data obtained using RNA-seq, cDNAs were generated from the total RNA isolated from 4 *NIC⁺Dock1^{wt/wt}* and 4 *NIC⁺Dock1^{flx/flx}* tumors using Superscript II (Invitrogen) and random primers (Invitrogen) as recommended by the manufacturer. The expression of 8 differentially expressed genes was confirmed by RT-qPCR (see **Table 3.SII page 185** for gene list and primer information). RT-qPCR was realized using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Specificity of the reaction was verified by melt curve analysis for each primer set. TATA box binding protein was used as an internal control. All qPCR reactions were performed for 5 min at 45°C, for 3 min at 95°C followed by 40 cycles of 15 sec at 45°C and 30 sec at 60°C.

Expression levels in NIC^+ tumors of all the currently described Rho GTPases, RhoGEFs, RhoGAPs, RhoGDIs and Elmos in the literature were obtained by performing mRNA deep sequencing. Expression levels were quantified by using the normalized raw count generated by mRNA deep sequencing after deseq analysis. Data was expressed as mean normalized raw count <u>+</u> SD.

To look at the expression level of downregulated genes in cell lines, 2.2x10⁶ NMuMG-EV, NMuMG-NeuNT and NMuMG-NeuNT^{sh1 DOCK1} were plated and allowed to grow for 24h. The total mRNA from NMuMG-EV, NMuMG-NeuNT, NMuMG-NeuNT^{sh1 Dock1} was extracted using TRIZOL reagent (Invitrogen) and according to recommended procedures (n=6 for each cell line). After DNAse I treatement (NEB), cDNAs were generated from the total RNA isolated using M-MuLV Reverse Transcriptase (NEB) and random primers (NEB) as recommended by the manufacturer. The expression of 7 genes was analyzed by RT-PCR (see **Table 3.SII page 185** for gene list and primer information).

Statistical analysis

Kaplan-Mayer curves were analyzed using Prism software and P value were calculated using log-rank test. For other statistical analysis, P values were calculated by using student-t test or by using ANOVA test and Bonferroni's post-test and Prism software. Gene ontology analysis was realized using DAVID tool (403).

Antibodies for western blotting and immunohistochemistry.

Antibody dilution and catalog numbers for western blots are shown in brackets. Antibodies from Santa Cruz Biotechnology include: Dock1 (1:5000; H-70), pNeu^{Y877} (1:1000; sc-101695), Neu (1:1000; C-18) and Myc-9E10 (1:2000; sc-40). M2-Flag (1:10 000; F3165) and Tubulin (1:10 000; T5168) antibodies were from Sigma. Rac (1:3000; 17-283) was obtained from Upstate Biotechnologies. Antibodies from Cell Signaling Technology include: pDOCK1^{Y1811} (1:1000, kind gift from Dr Susan Keezer), pStat3^{Y705} (1:1000; 9145S), pStat3^{S727} (1:1000; 9134S), Stat3 (1:1000; 9132S), pStat1^{Y701} (1:1000; 9167), Stat1 (1:1000; 9172), p-lkk $\alpha/\beta^{S76/180}$ (1:1000; 2697), lkk α (1:1000; 2682), pAkt^{S473} (1:1000, 9271S), Akt (1:1000; 9272), p-RS6K^{S235/236} (1:1000; 2211S), p-F130Cas (1:1000; 4011S), p-Src^{Y416} (1:1000; 2101S), Src (1:1000; 2108); p-Fak^{Y397} (1:1000; 3283S) pc-Jun^{S73} (1:1000; 3270S).

Antibodies used in immunohistochemistry include: Dock1 (1:100; C19; Santa Cruz Biotechnology), Cre (1:600; PRB106C; Covance), Ki67 (1:250; 275R-15; Cell Marque), Cleaved-caspase3 (1:200; 9661S; Cell Signaling), pStat3^{Y705} (1:100; 9145S; Cell signaling), Stat3 (1:500; 9132S; Cell Signaling), pStat1^{Y701} (1:100; 9167; Cell signaling), Stat1 (1:500; 9172; Cell Signaling), pc-Jun^{S73} (1:100; 3270S; Cell Signaling).

А

DOCK1 expression by immunohistochemistry in human breast cancer specimens (H4 antibody)



Figure 3.S1 DOCK1 is expressed in human breast cancer

(A) DOCK1 immunohistochemistry analysis on a breast tumor microarray containing 145 human breast tumor speciments. Levels of DOCK1 expression on each section was attributed either a negative, weak, moderate, or strong value. (B) Quantification of the levels of *DOCK1* expression in breast cancer subtypes. (C) High levels of *DOCK1* expression is not indicative of prognostic in luminal breast cancer subtypes.



Figure 3.S2 DOCK1, is phosphorylated by SRC kinase downsream 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 Y¹⁸¹¹ in T47D breast cancer cells upon overexpression of NeuNT (n=5) (C) DOCK1 phosphorylation on Y¹⁸¹¹ 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 μ M SRC PP2, 10 μ M Pl3K LY-294002 or 50 μ M EGFR/ERBB2 4557W inhibitors. Quantification of the pDOCK1^{Y1811} signal is shown in the top panel (n=7). (D) Active recombinant SRC and ERBB2 kinases were incubated with recombinant GST or the GST-DOCK1¹²²⁸⁻¹⁸⁶⁵ fragment, followed by *in vitro* kinase assay (n=3). Data were expressed as mean \pm SD. One-way ANOVA followed by a Bonferroni test calculated the indicated *P* values. * *P* = ≤0,05; ***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. * $P = \le 0.05$; ** $P = \le 0.01$; *** $P = \le 0.001$; *** $P = \le 0.0001$.



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 Spel 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 Spel 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*Dock1^{flx/flx}* mice at 9, 12 and 15 weeks of age stained with carmine red showing normal ductal trees (Scale bar: 200µm, 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 $NIC^+Dock1^{wt/wt}$, $NIC^+Dock1^{wt/wt}$ and $NIC^+Dock1^{fix/fix}$ mice. (B) Size distribution of tumor nodules in all three genotypes. $NIC^+Dock1^{fix/fix}$ 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⁺ staining per 40x microscope field (left) and representative immunohistochemistry analysis on frozen tumor sections showing CD31⁺ expression in $NIC^+Dock1^{fix/fix}$ tumors (right). (Scale bar: 50 µm, 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 $NIC^+Dock1^{wt/wt}$, $NIC^+Dock1^{wt/wt}$, $NIC^+Dock1^{fix/fix}$ tumors. (Scale bar: 50 µm, 40x).



Figure 3.S6 Dock1 regulates c-Jun and Stat3 activation in HER2-driven MINs and Stat1 expression levels in HER2-driven tumors.

Immunohistochemistry analyses showing pc-Jun, pStat3, Stat3, pStat1, Stat1 staining in *NIC*⁺*Dock1*^{wt/wt} and *NIC*⁺*Dock1*^{ft/vffx} mice mammary gland lesions and tumors. (Scale bar top: 100 μm, 20x)



Figure 3.S7 Reduced levels and activation of Stat1 in HER2-driven tumors in the absence of Dock1 expression.

Total tumor lysates were immunobloted with the indicated antibodies. Quantification of band intensity was done using Fiji software. *P* value was calculated from a two-tailed Student *t* test.



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⁺Dock1^{wt/wt}* and *NIC⁺Dock1^{fix/fix}* metastasis. (Scale bar: 50 µm, 40x)



Figure 3.S9 Deletion of Dock1 expression in NIC* tumor does not affect white blood cell recruitment.

Average percentage of the area covered by CD45⁺ staining per 40x microscope field (Left) and representative immunohistochemistry analysis on frozen sections showing CD45⁺ expression in *NIC*⁺*Dock1*^{wt/wt} and *NIC*⁺*Dock1*^{ftx/ftx} tumors (Right). (Scale bar: 50 um, 40x). *P* value was calculated from a two-tailed Student *t* test.



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^{sh1Dock1} and NMuMG-NeuNT^{sh2Dock1} cells.



Figure 3.S11 Components upstream of Dock1 in the integrin-signaling pathways are activated correctly in *Dock1*-null tumors.

Total tumor cell lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. Quantification of band intensity was done using Fiji software. *P* value was calculated from a two-tailed Student *t* test.





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 $NIC^{+}Dock1^{fix/fix}$ 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 $NIC^{+}Dock1^{fix/fix}$ 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^{shDock1} were grown for 24h after plating and analyzed for the expression of selected IFN response genes by RT-PCR.



Figure 3.S14 Expression levels of some *Dock1^{flx/flx-signature* genes are predictive of disease-free survival in HER2⁺ breast cancer.}

(A) High expression levels of *PARP12*, *OASL*, *LGAIS9*, or *LGALS3BP*, that are part of the genes down-regulated in the $NIC^+Dock1^{fix/fix}$ signature, are associated with poor disease-free survival in HER2⁺ breast cancer patients. (B) The *Dock1^{fix/fix-}* associated gene signature predicts outcome for all breast cancers.

182



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

See Discussion for a description of the model.

Gene	Norm count	Norm count	Norm Count	Norm count	Norm count	Norm Count	Norm Count	Norm count	Averado	Averade	Deser	Fold
Symbol	1 MIC ⁺ Dock1 wbwt	2 NIC ⁺ Dock1 wbwt	3 NIC+Dock1 Wew	4 NIC ⁺ Dock4 wtwt		2 MIC ⁺ Dock4 fix/fix	3 NIC ⁺ Dock4 ^{flx/flx}		Norm count	Norm count	P value	change
CSN2	247		1209	300	10532	9004	7720	10199	456.5	9363 75	3.5E-36	0.048731553
CSN1S1	457	33	750	347	4752	3686	3692	3454	396.75	3896	1,5E-22	0,101813445
0ASL2	4068	4298	5127	3781	403	1742	1200	391	4318,5	934	1,1E-11	4,623546826
IF144	3405	2795	3565	2229	131	1360	738	189	2998,5	604,5	2E-10	4,962269191
IFIT1	2456	2645	3887	2106	154	988	651	255	2773,5	512	0,00000004	5,41889991
XAF1	1211	1642	1864	1136	142	721	482	189	1463,25	383,5	0,00000013	3,813194181
MX2	593	925	891	544	56	327	259	116	738,25	189,5	0,00000036	3,896017074
MX1	722	675	623	367	146	237	190	64	596,75	159,25	0,00000059	3,74508899
GBP3	2707	3899	4835	2344	387	1141	965	532	3446,25	756,25	0,00000064	4,556733509
0AS2	758	851	617	505	151	397	155	74	682,75	194,25	0,00000064	3,513721873
ISG15	695	981	299	583	124	370	264	160	764,5	229,5	0,0000017	3,328794939
09XQQ	1151	1323	2182	1751	138	769	509	231	1601,75	411,75	0,0000024	3,89061979
RTP4	4760	4799	5816	4963	538	2861	2599	1626	5084,5	1906	0,0000087	2,668446339
UBA7	1754	2125	1588	1676	356	1145	0/6	311	1785,75	695,5	0,000036	2,568631618
PSMB8	2685	3891	3636	3309	822	2527	1539	897	3380,25	1446,25	0,000088	2,337554497
PARP12	2766	2791	3492	2408	883	1557	1450	1025	2864,25	1228,75	0,00012	2,331082396
ZBP1	1857	1481	1217	1161	354	941	787	281	1429	590,75	0,00016	2,418311352
LGAL S3BP	7523	9746	15019	10662	2267	6625	4464	1469	10737,5	3706,25	0,00017	2,897884309
IFI47	1250	791	1265	1287	328	885	418	157	1148,25	447	0,0002	2,568631618
BST2	2236	3252	5074	2750	580	1505	1256	875	3328	1054	0,00025	3,157975547
RPL34	2383	2279	2114	156	188	177	210	135	1733	177,5	0,00025	9,767572101
USP18	1521	2391	4670	1807	29	730	538	156	2597,25	375,75	0,00042	6,91629785
GBP7	2495	2955	3367	2616	877	1953	1359	1135	2858,25	1331	0,00045	2,148008943
LGAL S9	4649	4991	2911	2326	1112	2102	1606	828	3719,25	1412	0,00064	2,635359903
IRGM1	5708	5627	6721	7052	2235	4410	3538	2124	6277	3076,75	0,0008	2,040609318
CMPK2	1094	1128	2151	1250	248	853	531	261	1405,75	473,25	0,0008	2,971105841
PARP14	4775	4091	6104	3970	1144	3668	2588	1281	4735	2170,25	0,0009	2,182527754
HERC6	1505	1939	1781	2074	517	1444	1046	517	1824,75	881	0,0011	2,070529848
0AS1B	423	582	484	472	68	380	236	147	490,25	207,75	0,0012	2,355445579
ESR1	98	250	62	742	1088	1250	1907	588	288	1208,25	0,0015	0,238489888
DHX58	1988	2249	2233	1481	367	1022	1012	1513	1987,75	978,5	0,0016	2,030732202
0AS1A	996	1257	2073	1331	06	887	642	608	1406,75	556,75	0,0029	2,526254524
IFIH1	3599	3137	5633	4002	644	3298	1967	1269	4092,75	1794,5	0,0034	2,279946545
LALBA	566	276	9705	14849	8291	70245	24157	34113	6349	34201,5	0,022	0,185694115
PGF	9238	9637	7894	2471	3876	753	4362	3888	7310	3219,75	0,024	2,270484204
DSH1C	1982	3076	4165	893	425	1216	1207	892	2529	935	0,026	2,705696462
RSAD2	1065	1532	3939	690	125	457	610	129	1806,5	330,25	0,03	5,467949808
SLFN8	359	406	905	392	236	317	261	88	515,5	225,5	0,034	2,286276671
FBLN5	681	2391	281	1504	12829	6218	4944	882	1214,25	6218,25	0,036	0,19533197
SLFN2	1410	942	2538	1416	477	1256	915	253	1576,5	725,25	0,038	2,173469725
IFI2712A	289	335	1177	632	143	372	126	132	608,25	193,25	0,04	3,142690067
0BSL1	1635	1058	418	1295	276	306	785	679	1101,5	511,5	0,041	2,15546629
MMP12	738	340	412	198	2205	202	3354	1013	422	1693,5	0,043	0,249307813
SMOC1	920	1494	33	597	5591	816	1350	4818	761	3143,75	0,047	0,242154547
STAT1	3789	4318	11040	7050	1744	5077	3169	1708	6549,25	2924.5	0.047	2.239225777

Table 3.SI RNASeq analysis overview

Procedure	Forward	Reverse
To amplify 3.2 kb 5' first arm	5-TAG CGG CCG CCT AAC AGC CCA GAT CTC TTT GGG-3'	5'-TAG CGG CCG CCT AAC AGC CCA GAT CTC TTT GGG-3'
To amplify 1kb conditional arm	5'-TAG ATA TCT CAG ACC CTG GCA AAA TGG GTG-3'	5'-TAG ATA TCG AAT GAG GAG CAC GGT GGA CC-3'
To amplify 2.7kb 3' third arm	5'-TAA AGC TTC TGG CTT CAT ACA GAG GTC TAC T-3'	5'-GCT CTG GTT TTC TAC TAC TGC CA-3'
To amplify <i>Dock1</i> genomic probe	5'-CCC ATC ACG TTC CAC CTT CTG TTT-3'	5'-CAG ACT CAG ATC CTC GAA CAG AAA GC-3'
To screen 5' loxP site and	P1 5'-TCA GCA GGC CCA GTT CCT ACT-3'	P2 5'-GCA GAG CTA GGA GTT CAT CGT AGT TC-3'
To screen 3' loxP site	P4 5'-CAC CAA GCG AGA GGA GAA GTA CG-3'	P3 5'-CCT ATC TAC AAC CCT TCA TTC CCA AGG-3'
To genotype Dock1 recombined allele	P1 5'-TCA GCA GGC CCA GTT CCT ACT-3'	P3 5'-CCT ATC TAC AAC CCT TCA TTC CCA AGG-3'
To genotype Cre transgene	5'-GCT TCT GTC CGT TTG CCG-3'	5'-ACT GTG TCC AGA CCA GGC-3'
To genotype Neu transgene	5'-TTC CGG AAC CCA CAT CAG GCC-3'	5'-GTT TCC TGC AGC AGC CTA CGC-3'
To generate Dock1 ^{1228 - 1865}	5'-AGG ATC CAA GGA GTG TGA TAA CTA CAC CGA AGC G-3'	5'-ACT CGA GTC ACT GCA CGA TCC CGG AG-3'
Q-PCR Validation Isg15 and RT-PCR	5'-TGA CTA ACT CCA TGA CGG TGT CAG-3'	5'-GAC CCA GAC TGG AAA GGG TAA G-3'
Q-PCR Validation Oas/2	5'-GAT GGA TAT CCT CCC AGC TTA CG-3'	5'-TTG GTG AGA AGT CAC CAG GGT AG-3'
Q-PCR Validation Ifit1	5'-GGA GAA CAT GTT GAA GCA GAA GCA-3'	5'- CTG CAA GGC CCT GTT TAG AAG-3'
Q-PCR Validation /L23A	5'-TCT CGG AAT CTC TGC ATG CTA G-3	5'-CTT GTG GGT CAC AAC CAT CTT CAC-3'
Q-PCR Validation Dock1	5'-GTC CAT GCT CCT GAA TGG CAT T-3'	5'-CAG GTC CTT GAG CTT CTC AAT CTG-3'
Q-PCR Validation Csn2	5'-CCT TGC TCT TGC AAG AGA GAC-3'	5'-TGA ACT TTA GCC TGG AGC ACA TC-3'
Q-PCR Validation Rab17	5'-TGC GCT CCT GGT TTA TGA CAT CA-3'	5'-GAT CCG TTT TGT TGC CGA CCA-3'
Q-PCR Validation Ifi44	5'-CCA CAC TCC TGA CAG ATA CCA-3'	5'-TGT CCT TCA GCA GTF GGT CAT-3'
RT-PCR Gbp3	5'-CTA CAA CAG CAT GAG CAC CAT CAA CC-3'	5'-CTT CAG CTC CAG AGC AAA ATC TCG AAC-3'
RT-PCR Uba7	5'-CAT GGG ATC CTG ATG ATG CAG AGA CT-3'	5'-ATA ATG GCT GCC ATG GGG CTT AAG-3'
RT-PCR Stat1	5-'ACA GCT GGA CGA CCA GTA CA-3'	5'-TCC TGG GCC TGA TTA AAT CTT TGG G-3'

S
Φ
<u> </u>
5
σ
3
×
×
ų
5
-
1
5
Q
5
œ.
Ŧ
÷.
U
L
0
÷
ŝ
Ľ
Φ
č
Ξ.
ñ
=
S
က
D
<u>ــــــــــــــــــــــــــــــــــــ</u>
Ω
g
<u> </u>

DISCUSSION

Dock1 est le membre prototypique d'une famille d'activateurs des Rho GTPase. Des études réalisées dans les organismes modèles ont montré que les orthologues de Dock1 agissent en amont de la GTPase Rac dans différents processus biologiques. Au moment de débuter la thèse, le rôle de Dock1 chez les mammifères demeurait néanmoins méconnu. Des études réalisées en lignées cellulaires indiquaient toutefois que Dock1 était un important régulateur du cytosquelette lors de la migration cellulaire. Ainsi, l'objectif de cette thèse était d'identifier et de caractériser certaines des fonctions biologiques de Dock1. Nous avons émis comme hypothèse centrale que certaines des fonctions biologiques des orthologues de Dock1 avaient été conservées au cours de l'évolution.

Un important degré de conservation des mécanismes moléculaires de fusion

La génération et la caractérisation d'une souris KO pour le gène *Dock1* nous a permis de déterminer que cette RacGEF est essentielle au développement embryonnaire puisque les souris mutantes meurent à la naissance (46). Plus particulièrement, les souris *Dock1* KO naissent avec une réduction importante de leur masse musculaire bien que les progéniteurs musculaires soient spécifiés correctement. En absence de *Dock1*, un bloc significatif de la fusion des myoblastes primaires est observé et mène à la formation de fibres mononucléées et à la réduction du tissu musculaire. Ce phénotype rappelle les défauts musculaires présents chez les larves mutantes pour *mbc* et indique que la fonction de cette protéine a été conservée au cours de l'évolution (93, 94).

D'une manière significative, cette étude a aussi permis de démontrer pour une première fois qu'une composante individuelle impliquée dans la machinerie de fusion de la drosophile exerce une fonction semblable chez les vertébrés supérieurs. Depuis, les travaux de plusieurs groupes ont montré que les orthologues de plusieurs molécules régulant la fusion chez la drosophile exercent des rôles similaires chez les mammifères. L'ensemble de ces études a contribué à démontrer qu'il existe un

187

impressionnant degré de conservation des mécanismes de fusion entre les espèces. Ces nouvelles études sont brièvement discutées.

Au cours de la fusion des myoblastes chez la drosophile, la fonction principale de mbc semble être l'activation de Rac et les mutants Rac1/Rac2 ont d'importants défauts de fusion (104, 105, 110, 121, 123). L'inactivation de Rac1 dans le compartiment musculaire de la souris a permis de démontrer que ce gène est aussi essentiel à la myogenèse chez les mammifères (47). L'élimination de l'expression de Rac1 n'entraîne pas de défauts au niveau de la spécification des progéniteurs musculaires or comme pour les mutants *Dock1*, les mutants *Rac1* ont d'importants défauts de fusion des myoblastes lors de la formation des fibres primaires (47). Lorsqu'ils sont mis en culture, les myoblastes isolés des souris mutantes adhèrent correctement les uns aux autres et l' α - et la β -catenin sont recrutées au site de contact cellulaire. Toufefois, les recrutements de l'actine, de vinculin et du complexe Arp2/3 à la membrane sont compromis. Il est intéressant de noter que chez la drosophile, l'inactivation de Rac1 et Rac2 est nécessaire afin d'observer des défauts de fusion alors que chez les mammifères, l'inactivation de *Rac1* est suffisante. Enfin, il a aussi été démontré que l'inactivation de la GTPase Cdc42 dans le compartiment musculaire entraîne des défauts de fusion lors de la formation des fibres primaires. Lorsqu'ils sont mis en culture, les myoblastes primaires isolés des souris Cdc42 mutantes ont des défauts de fusion et les recrutements de l'actine et de vinculin au site de contact cellulaire sont compromis (47). Les mutants Cdc42 de drosophile n'ont pas de défauts de fusion. Ces résultats suggèrent que la protéine Cdc42 a acquis cette fonction au cours de l'évolution.

Les nombreuses études réalisées chez la drosophile ont clairement mis en évidence l'étendue de la contribution du cytosquelette d'actine lors de la fusion des myoblastes et cette réorganisation du cytosquelette semble aussi indispensable chez les mammifères. Notamment, plusieurs études ont illustré le rôle du complexe Wasp lors de la fusion chez la drosophile (88, 89, 103, 118, 404). Il a maintenant été démontré que la molécule N-Wasp est aussi requise lors du développement

188

musculaire des mammifères (405). L'inactivation de *N-Wasp* dans le compartiment musculaire de la souris n'affecte pas la spécification des progéniteurs myogéniques. Toutefois, on observe d'importants défauts de fusion lors de la formation des fibres primaires. De plus, des essais de différenciation *in vitro* ont révélé que l'expression de N-Wasp est requise dans les deux partenaires de fusion. En effet, la fusion des myoblastes est compromise lorsque l'expression de N-Wasp est éliminée chez l'un des deux partenaires peu importe qu'il s'agisse d'un myoblaste ou d'un myotube. Chez la drosophile, l'activité du complexe Wasp est requise seulement dans les FCM. Ainsi, ces résultats mettent en évidence qu'il existe néanmoins des différences entre les modèles. Finalement, tout comme l'expression de Kette chez la drosophile, l'expression de son orthologue Nap1 dans les cultures de myoblastes de mammifère est requise pour leur fusion (206). Le rôle de Nap1 dans le développement musculaire de la souris n'a toutefois pas été testé et reste à déterminer. Enfin, le rôle du complexe Arp2/3 et des autres facteurs de nucléation n'a pas été adressé à ce jour chez la souris.

À la recherche de récepteur de la fusion

Ainsi, il est maintenant incontestable qu'un important degré de conservation des mécanismes moléculaires régulant la fusion entre les espèces existe puisque plusieurs des intermédiaires de signalisation semblent jouer un rôle similaire chez la drosophile et chez la souris. Or, les myoblastes des mammifères semblent utiliser un répertoire de récepteur différent pour induire leur fusion. L'orthologue de sns, la molécule transmembranaire Nephrin, est surtout exprimée dans le rein où elle agit comme principale composante de la barrière de filtration formée par les podocytes (406). Des mutations dans le gène *NEPHRIN* sont associées à la formation d'un syndrome néphrotique congénital (407). Les souris *Nephrin* KO meurent quelques jours après leur naissance des suites d'une sévère protéinurie sans toutefois présenter de défauts musculaires (408, 409). Néanmoins, l'expression de Nephrin a été détectée dans le muscle de souris en développement, dans le muscle de modèle de souris de dystrophie musculaire et lors de la fusion des myoblastes en culture

(410). Les myoblastes primaires isolés des souris Nephrin KO ont des défauts de fusion et sont incapables de générer de gros myotubes lorsqu'ils sont en culture. Une diminution de l'expression de nephrin via des morpholinos chez le poisson zèbre entraîne aussi des défauts musculaires (410). Tel que mentionné précédemment, une étude avait démontré que kirrel, l'un des orthologues de duf, est aussi exprimé dans les somites du poisson zèbre et l'expression de morpholinos ciblant kirrel entraîne l'accumulation de myofibres mononuclées (164). Chez les mammifères, il existe trois orthologues de duf soient Neph1, Neph2 et Neph3 (165). Comme pour Nephrin, l'inactivation de Neph1 chez la souris entraîne une protéinurie sévère due à une malformation de la barrière de filtration rénale et des défauts musculaires ne sont pas rapportés pour ces souris mutantes (167). À ce jour, des souris KO pour les gènes Neph2 et Neph3 n'ont pas été générées. Toutefois, le profil d'expression de ces gènes suggère que ces molécules exercent leur fonction dans le rein et dans le système nerveux (411-413). Malgré cela, les niveaux d'expression de Nephrin dans le muscle sont très faibles et l'absence de défauts lors du développement musculaire chez les souris Nephrin et Neph1 KO suggère que ces molécules ne sont pas des récepteurs majeurs médiant la fusion primaire chez les mammifères.

Ainsi, les mammifères semblent utiliser d'autres récepteurs pour médier leur fusion et certains nouveaux candidats ont été identifiés depuis notre étude. C'est le cas du récepteur couplé aux protéines G et membre de la famille des récepteurs de l'olfaction MOR23 (414, 415). Il a été montré que l'expression de ce récepteur augmente au cours de la différenciation ou suite aux dommages musculaires. Une réduction de l'expression de MOR23 grâce à des siRNA diminue la migration des myoblastes en chambre de Boyden vers le milieu de culture de cellules en différenciation alors que la surexpression de MOR23 augmente la migration des myoblastes (414). Les caractéristiques de migration aléatoire des myoblastes ne sont pas altérées en absence de l'expression de MOR23 et ces résultats suggèrent que ce récepteur est requis pour la migration des cellules musculaires vers un ligand sécrété lors de la différenciation bien que ce ligand demeure à ce jour non identifié. Lors de la fusion, l'expression de MOR23 est plus spécifiquement requise dans les myoblastes

190
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 différentiation 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^{-/-}Dock5^{-/-}* 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^{deltaSH3}* et les souris *Dock1* KO, nos collaborateurs ont identifié un rôle important pour *Dock1* dans le développement cardiovasculaire (29). Chez les souris *Dock1^{deltaSH3}*, 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^{deltaSH3} 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^{deltaSH3} 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 remarqués chez les souris Dock1 mutantes (27, 420). Il a été observé que les cellules endothéliales purifiées des souris Dock1^{deltaSH3} 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 α v β 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+.

Etant 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 α 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 corrèlent 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 β1 (HRGβ1) est réduite lorsque l'expression de CXCR4 est éliminée via des siRNA (384). Il a été observé que le traitement par l'HRG^{β1} 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 PI3Ky via les petites protéines G et induire la formation de PIP₃ 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 Gαi. 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 émergeant 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^{wt/wt}* et *MMTV-NIC-Dock1^{fix/fix}*, nous avons identifié une liste de gènes dont l'expression est significativement différente entre ces populations de tumeurs. Parmis 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 inteférons a été utilisé dans plusieurs types de cancer (439). Ces derniers se sont montrés parfois très efficaces pour inhibier 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- β et par conséquent l'expression des gènes de réponse aux 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 lsg15 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 particulièrment, 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 mileu 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 conditionel 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-3,5pyrazolidinedione (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 à 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-3betamediated 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.

49. Mauldin JP, *et al.* (2013) A link between the cytoplasmic engulfment protein Elmo1 and the Mediator complex subunit Med31. *Curr Biol* 23(2):162-167.

50. Teitelbaum SL & Ross FP (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4(8):638-649.

51. Jurdic P, Saltel F, Chabadel A, & Destaing O (2006) Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *Eur J Cell Biol* 85(3-4):195-202.

52. Vives V, *et al.* (2011) The Rac1 exchange factor Dock5 is essential for bone resorption by osteoclasts. *J Bone Miner Res* 26(5):1099-1110.

53. Elliott MR & Ravichandran KS (2010) Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol* 189(7):1059-1070.

54. Reddien PW & Horvitz HR (2004) The engulfment process of programmed cell death in caenorhabditis elegans. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:193-221.

55. Park D, et al. (2007) BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature* 450(7168):430-434.

56. Elliott MR, *et al.* (2010) Unexpected requirement for ELMO1 in clearance of apoptotic germ cells in vivo. *Nature* 467(7313):333-337.

57. Lu Z, et al. (2011) Phagocytic activity of neuronal progenitors regulates adult neurogenesis. *Nat Cell Biol* 13(9):1076-1083.

58. Shibata S, *et al.* (2008) Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase: implication in proteinuric kidney disease. *Nat Med* 14(12):1370-1376.

59. Wei C, *et al.* (2008) Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. *Nat Med* 14(1):55-63.

60. Friedl P & Wolf K (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3(5):362-374.

61. Whitley CB & Gorlin RJ (1991) Adams-Oliver syndrome revisited. *Am J Med Genet* 40(3):319-326.

62. Shaheen R, *et al.* (2011) Recessive mutations in DOCK6, encoding the guanidine nucleotide exchange factor DOCK6, lead to abnormal actin cytoskeleton organization and Adams-Oliver syndrome. *Am J Hum Genet* 89(2):328-333.

63. Southgate L, *et al.* (2011) Gain-of-function mutations of ARHGAP31, a Cdc42/Rac1 GTPase regulator, cause syndromic cutis aplasia and limb anomalies. *Am J Hum Genet* 88(5):574-585.

64. Croft DR & Olson MF (2008) Regulating the conversion between rounded and elongated modes of cancer cell movement. *Cancer Cell* 14(5):349-351.

65. Gadea G, Sanz-Moreno V, Self A, Godi A, & Marshall CJ (2008) DOCK10mediated Cdc42 activation is necessary for amoeboid invasion of melanoma cells. *Curr Biol* 18(19):1456-1465.

66. Sanz-Moreno V, *et al.* (2008) Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* 135(3):510-523.

67. Yang WH, *et al.* (2012) RAC1 activation mediates Twist1-induced cancer cell migration. *Nat Cell Biol* 14(4):366-374.

68. Duchek P, Somogyi K, Jekely G, Beccari S, & Rorth P (2001) Guidance of cell migration by the Drosophila PDGF/VEGF receptor. *Cell* 107(1):17-26.

69. Van Meir EG, *et al.* (2010) Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* 60(3):166-193.

70. Jarzynka MJ, *et al.* (2007) ELMO1 and Dock180, a bipartite Rac1 guanine nucleotide exchange factor, promote human glioma cell invasion. *Cancer Res* 67(15):7203-7211.

71. Laurin M, *et al.* (2013) Rac-specific guanine nucleotide exchange factor DOCK1 is a critical regulator of HER2-mediated breast cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(18):7434-7439.

72. Slamon DJ, *et al.* (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235(4785):177-182.

73. Ursini-Siegel J, Schade B, Cardiff RD, & Muller WJ (2007) Insights from transgenic mouse models of ERBB2-induced breast cancer. *Nat Rev Cancer* 7(5):389-397.

74. Ursini-Siegel J, *et al.* (2008) ShcA signalling is essential for tumour progression in mouse models of human breast cancer. *EMBO J* 27(6):910-920.

75. Ehler E & Gautel M (2008) The sarcomere and sarcomerogenesis. *Adv Exp Med Biol* 642:1-14.

76. Rochlin K, Yu S, Roy S, & Baylies MK (2010) Myoblast fusion: when it takes more to make one. *Dev Biol* 341(1):66-83.

77. Sambasivan R & Tajbakhsh S (2007) Skeletal muscle stem cell birth and properties. *Semin Cell Dev Biol* 18(6):870-882.

78. Braun T & Gautel M (2011) Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(6):349-361.

79. Bate M (1990) The embryonic development of larval muscles in Drosophila. *Development* 110(3):791-804.

80. Baylies MK, Bate M, & Ruiz Gomez M (1998) Myogenesis: a view from Drosophila. *Cell* 93(6):921-927.

81. Bate M & Rushton E (1993) Myogenesis and muscle patterning in Drosophila. *C R Acad Sci III* 316(9):1047-1061.

82. Carmena A, Bate M, & Jimenez F (1995) Lethal of scute, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during Drosophila embryogenesis. *Genes Dev* 9(19):2373-2383.

83. Baker R & Schubiger G (1996) Autonomous and nonautonomous Notch functions for embryonic muscle and epidermis development in Drosophila. *Development* 122(2):617-626.

84. Chen EH & Olson EN (2004) Towards a molecular pathway for myoblast fusion in Drosophila. *Trends Cell Biol* 14(8):452-460.

85. Duan H, Skeath JB, & Nguyen HT (2001) Drosophila Lame duck, a novel member of the Gli superfamily, acts as a key regulator of myogenesis by controlling fusion-competent myoblast development. *Development* 128(22):4489-4500.

86. Frasch M (1999) Controls in patterning and diversification of somatic muscles during Drosophila embryogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 9(5):522-529.

87. Doberstein SK, Fetter RD, Mehta AY, & Goodman CS (1997) Genetic analysis of myoblast fusion: blown fuse is required for progression beyond the prefusion complex. *J Cell Biol* 136(6):1249-1261.

88. Kim S, *et al.* (2007) A critical function for the actin cytoskeleton in targeted exocytosis of prefusion vesicles during myoblast fusion. *Dev Cell* 12(4):571-586.

89. Sens KL, *et al.* (2010) An invasive podosome-like structure promotes fusion pore formation during myoblast fusion. *J Cell Biol* 191(5):1013-1027.

90. Linder S (2007) The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol* 17(3):107-117.

91. Metzger T, *et al.* (2012) MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function. *Nature* 484(7392):120-124.

92. Richardson B, Beckett K, & Baylies M (2008) Visualizing new dimensions in Drosophila myoblast fusion. *Bioessays* 30(5):423-431.

93. Rushton E, Drysdale R, Abmayr SM, Michelson AM, & Bate M (1995) Mutations in a novel gene, myoblast city, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for Drosophila muscle development. *Development* 121(7):1979-1988.

94. Erickson MR, Galletta BJ, & Abmayr SM (1997) Drosophila myoblast city encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure, and cytoskeletal organization. *J Cell Biol* 138(3):589-603.

95. Richardson BE, Beckett K, Nowak SJ, & Baylies MK (2007) SCAR/WAVE and Arp2/3 are crucial for cytoskeletal remodeling at the site of myoblast fusion. *Development* 134(24):4357-4367.

96. Ruiz-Gomez M, Coutts N, Price A, Taylor MV, & Bate M (2000) Drosophila dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion. *Cell* 102(2):189-198.

97. Strunkelnberg M, *et al.* (2001) rst and its paralogue kirre act redundantly during embryonic muscle development in Drosophila. *Development* 128(21):4229-4239.

98. Bour BA, Chakravarti M, West JM, & Abmayr SM (2000) Drosophila SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *Genes Dev* 14(12):1498-1511.

99. Artero RD, Castanon I, & Baylies MK (2001) The immunoglobulin-like protein Hibris functions as a dose-dependent regulator of myoblast fusion and is differentially controlled by Ras and Notch signaling. *Development* 128(21):4251-4264.

100. Dworak HA, Charles MA, Pellerano LB, & Sink H (2001) Characterization of Drosophila hibris, a gene related to human nephrin. *Development* 128(21):4265-4276. 101. Shelton C, Kocherlakota KS, Zhuang S, & Abmayr SM (2009) The immunoglobulin superfamily member Hbs functions redundantly with Sns in

interactions between founder and fusion-competent myoblasts. *Development* 136(7):1159-1168.

102. Chen EH & Olson EN (2001) Antisocial, an intracellular adaptor protein, is required for myoblast fusion in Drosophila. *Dev Cell* 1(5):705-715.

103. Gildor B, Massarwa R, Shilo BZ, & Schejter ED (2009) The SCAR and WASp nucleation-promoting factors act sequentially to mediate Drosophila myoblast fusion. *EMBO Rep* 10(9):1043-1050.

104. Hakeda-Suzuki S, *et al.* (2002) Rac function and regulation during Drosophila development. *Nature* 416(6879):438-442.

105. Luo L, Liao YJ, Jan LY, & Jan YN (1994) Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: Drosophila Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev* 8(15):1787-1802.

106. Kesper DA, *et al.* (2007) Myoblast fusion in Drosophila melanogaster is mediated through a fusion-restricted myogenic-adhesive structure (FuRMAS). *Dev Dyn* 236(2):404-415.

107. Onel SF & Renkawitz-Pohl R (2009) FuRMAS: triggering myoblast fusion in Drosophila. *Dev Dyn* 238(6):1513-1525.

108. Menon SD & Chia W (2001) Drosophila rolling pebbles: a multidomain protein required for myoblast fusion that recruits D-Titin in response to the myoblast attractant Dumbfounded. *Dev Cell* 1(5):691-703.

109. Rau A, *et al.* (2001) rolling pebbles (rols) is required in Drosophila muscle precursors for recruitment of myoblasts for fusion. *Development* 128(24):5061-5073.

110. Haralalka S, *et al.* (2011) Asymmetric Mbc, active Rac1 and F-actin foci in the fusion-competent myoblasts during myoblast fusion in Drosophila. *Development* 138(8):1551-1562.

111. Chen EH, Pryce BA, Tzeng JA, Gonzalez GA, & Olson EN (2003) Control of myoblast fusion by a guanine nucleotide exchange factor, loner, and its effector ARF6. *Cell* 114(6):751-762.

112. Dyer N, *et al.* (2007) Spermatocyte cytokinesis requires rapid membrane addition mediated by ARF6 on central spindle recycling endosomes. *Development* 134(24):4437-4447.

113. Pollard TD (2007) Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 36:451-477.

114. Machesky LM & Insall RH (1998) Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol* 8(25):1347-1356.

115. Padrick SB, Doolittle LK, Brautigam CA, King DS, & Rosen MK (2011) Arp2/3 complex is bound and activated by two WASP proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(33):E472-479.

116. Schroter RH, *et al.* (2004) kette and blown fuse interact genetically during the second fusion step of myogenesis in Drosophila. *Development* 131(18):4501-4509.

117. Berger S, *et al.* (2008) WASP and SCAR have distinct roles in activating the Arp2/3 complex during myoblast fusion. *J Cell Sci* 121(Pt 8):1303-1313.

118. Massarwa R, Carmon S, Shilo BZ, & Schejter ED (2007) WIP/WASp-based actin-polymerization machinery is essential for myoblast fusion in Drosophila. *Dev Cell* 12(4):557-569.

119. Jin P, *et al.* (2011) Competition between Blown fuse and WASP for WIP binding regulates the dynamics of WASP-dependent actin polymerization in vivo. *Dev Cell* 20(5):623-638.

120. Estrada B, *et al.* (2007) The MARVEL domain protein, Singles Bar, is required for progression past the pre-fusion complex stage of myoblast fusion. *Dev Biol* 307(2):328-339.

121. Ng J, *et al.* (2002) Rac GTPases control axon growth, guidance and branching. *Nature* 416(6879):442-447.

122. Geisbrecht ER, *et al.* (2008) Drosophila ELMO/CED-12 interacts with Myoblast city to direct myoblast fusion and ommatidial organization. *Dev Biol* 314(1):137-149.

123. Balagopalan L, Chen MH, Geisbrecht ER, & Abmayr SM (2006) The CDM superfamily protein MBC directs myoblast fusion through a mechanism that requires phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate binding but is independent of direct interaction with DCrk. *Mol Cell Biol* 26(24):9442-9455.

124. Duan R, *et al.* (2012) Group I PAKs function downstream of Rac to promote podosome invasion during myoblast fusion in vivo. *J Cell Biol* 199(1):169-185.

125. Gossler A & Hrabe de Angelis M (1998) Somitogenesis. *Curr Top Dev Biol* 38:225-287.

126. Kalcheim C & Ben-Yair R (2005) Cell rearrangements during development of the somite and its derivatives. *Curr Opin Genet Dev* 15(4):371-380.

127. Gros J, Scaal M, & Marcelle C (2004) A two-step mechanism for myotome formation in chick. *Dev Cell* 6(6):875-882.

128. Gros J, Serralbo O, & Marcelle C (2009) WNT11 acts as a directional cue to organize the elongation of early muscle fibres. *Nature* 457(7229):589-593.

129. Gros J, Manceau M, Thome V, & Marcelle C (2005) A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature* 435(7044):954-958.

130. Ben-Yair R & Kalcheim C (2005) Lineage analysis of the avian dermomyotome sheet reveals the existence of single cells with both dermal and muscle progenitor fates. *Development* 132(4):689-701.

131. Kassar-Duchossoy L, *et al.* (2005) Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev* 19(12):1426-1431.

132. Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, & Buckingham M (2005) A Pax3/Pax7dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 435(7044):948-953.

133. Buckingham M, *et al.* (2003) The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat* 202(1):59-68.

134. Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, & Buckingham M (2004) Divergent functions of murine Pax3 and Pax7 in limb muscle development. *Genes Dev* 18(9):1088-1105.

135. Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, & Birchmeier C (1995) Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376(6543):768-771.

136. Dietrich S, *et al.* (1999) The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle. *Development* 126(8):1621-1629.

137. Brohmann H, Jagla K, & Birchmeier C (2000) The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells. *Development* 127(2):437-445.

138. Gross MK, *et al.* (2000) Lbx1 is required for muscle precursor migration along a lateral pathway into the limb. *Development* 127(2):413-424.

139. Schafer K & Braun T (1999) Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene Lbx1h. *Nat Genet* 23(2):213-216.

140. Vasyutina E, *et al.* (2005) CXCR4 and Gab1 cooperate to control the development of migrating muscle progenitor cells. *Genes Dev* 19(18):2187-2198.

141. Rudnicki MA, *et al.* (1993) MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75(7):1351-1359.

142. Hammond CL, *et al.* (2007) Signals and myogenic regulatory factors restrict pax3 and pax7 expression to dermomyotome-like tissue in zebrafish. *Dev Biol* 302(2):504-521.

143. Hollway GE, *et al.* (2007) Whole-somite rotation generates muscle progenitor cell compartments in the developing zebrafish embryo. *Dev Cell* 12(2):207-219.

144. Stellabotte F & Devoto SH (2007) The teleost dermomyotome. *Dev Dyn* 236(9):2432-2443.

145. Devoto SH, *et al.* (2006) Generality of vertebrate developmental patterns: evidence for a dermomyotome in fish. *Evol Dev* 8(1):101-110.

146. Roy S, Wolff C, & Ingham PW (2001) The u-boot mutation identifies a Hedgehog-regulated myogenic switch for fiber-type diversification in the zebrafish embryo. *Genes Dev* 15(12):1563-1576.

147. Wigmore PM & Dunglison GF (1998) The generation of fiber diversity during myogenesis. *Int J Dev Biol* 42(2):117-125.

148. Evans D, Baillie H, Caswell A, & Wigmore P (1994) During fetal muscle development, clones of cells contribute to both primary and secondary fibers. *Dev Biol* 162(2):348-353.

149. Horsley V & Pavlath GK (2004) Forming a multinucleated cell: molecules that regulate myoblast fusion. *Cells Tissues Organs* 176(1-3):67-78.

150. Robertson TA, Grounds MD, Mitchell CA, & Papadimitriou JM (1990) Fusion between myogenic cells in vivo: an ultrastructural study in regenerating murine skeletal muscle. *J Struct Biol* 105(1-3):170-182.

151. Engel LC, Egar MW, & Przybylski RJ (1986) Morphological characterization of actively fusing L6 myoblasts. *Eur J Cell Biol* 39(2):360-365.

152. Powell JA (1973) Development of normal and genetically dystrophic mouse muscle in tissue culture. I. Prefusion and fusion activities of muscle cells: phase contrast and time lapse study. *Exp Cell Res* 80(2):251-264.

153. Krauss RS, *et al.* (2005) Close encounters: regulation of vertebrate skeletal myogenesis by cell-cell contact. *J Cell Sci* 118(Pt 11):2355-2362.

154. Griffin CA, Apponi LH, Long KK, & Pavlath GK (2010) Chemokine expression and control of muscle cell migration during myogenesis. *J Cell Sci* 123(Pt 18):3052-3060.

155. Bae GU, *et al.* (2008) Regulation of myoblast motility and fusion by the CXCR4-associated sialomucin, CD164. *J Biol Chem* 283(13):8301-8309.

156. Lee YN, Kang JS, & Krauss RS (2001) Identification of a role for the sialomucin CD164 in myogenic differentiation by signal sequence trapping in yeast. *Mol Cell Biol* 21(22):7696-7706.

157. Horsley V, Jansen KM, Mills ST, & Pavlath GK (2003) IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell* 113(4):483-494.

158. Lafreniere JF, Mills P, Bouchentouf M, & Tremblay JP (2006) Interleukin-4 improves the migration of human myogenic precursor cells in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 312(7):1127-1141.

159. Horsley V, *et al.* (2001) Regulation of the growth of multinucleated muscle cells by an NFATC2-dependent pathway. *J Cell Biol* 153(2):329-338.

160. Jansen KM & Pavlath GK (2006) Mannose receptor regulates myoblast motility and muscle growth. *J Cell Biol* 174(3):403-413.

161. Stein M, Keshav S, Harris N, & Gordon S (1992) Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 176(1):287-292.

162. Pontow SE, Kery V, & Stahl PD (1992) Mannose receptor. Int Rev Cytol 137B:221-244.

163. Bondesen BA, Jones KA, Glasgow WC, & Pavlath GK (2007) Inhibition of myoblast migration by prostacyclin is associated with enhanced cell fusion. *FASEB J* 21(12):3338-3345.

164. Srinivas BP, Woo J, Leong WY, & Roy S (2007) A conserved molecular pathway mediates myoblast fusion in insects and vertebrates. *Nat Genet* 39(6):781-786.

165. Sellin L, *et al.* (2003) NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *FASEB J* 17(1):115-117.

166. Gubler MC (2003) Podocyte differentiation and hereditary proteinuria/nephrotic syndromes. *J Am Soc Nephrol* 14 Suppl 1:S22-26.

167. Donoviel DB, *et al.* (2001) Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol* 21(14):4829-4836.

168. Dickson G, Peck D, Moore SE, Barton CH, & Walsh FS (1990) Enhanced myogenesis in NCAM-transfected mouse myoblasts. *Nature* 344(6264):348-351.

169. Knudsen KA, Myers L, & McElwee SA (1990) A role for the Ca2(+)-dependent adhesion molecule, N-cadherin, in myoblast interaction during myogenesis. *Exp Cell Res* 188(2):175-184.

170. Mege RM, *et al.* (1992) N-cadherin and N-CAM in myoblast fusion: compared localisation and effect of blockade by peptides and antibodies. *J Cell Sci* 103 (Pt 4):897-906.

171. Rosen GD, *et al.* (1992) Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis. *Cell* 69(7):1107-1119.

172. Zeschnigk M, Kozian D, Kuch C, Schmoll M, & Starzinski-Powitz A (1995) Involvement of M-cadherin in terminal differentiation of skeletal muscle cells. *J Cell Sci* 108 (Pt 9):2973-2981.

173. Donalies M, Cramer M, Ringwald M, & Starzinski-Powitz A (1991) Expression of M-cadherin, a member of the cadherin multigene family, correlates with differentiation of skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(18):8024-8028.

174. Rose O, *et al.* (1994) Expression of M-cadherin protein in myogenic cells during prenatal mouse development and differentiation of embryonic stem cells in culture. *Dev Dyn* 201(3):245-259.

175. Duband JL, *et al.* (1987) Adhesion molecules during somitogenesis in the avian embryo. *J Cell Biol* 104(5):1361-1374.

176. Hatta K, Takagi S, Fujisawa H, & Takeichi M (1987) Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Dev Biol* 120(1):215-227.

177. Charrasse S, *et al.* (2006) RhoA GTPase regulates M-cadherin activity and myoblast fusion. *Mol Biol Cell* 17(2):749-759.

178. Rosenberg P, *et al.* (1997) A potential role of R-cadherin in striated muscle formation. *Dev Biol* 187(1):55-70.

179. Hollnagel A, Grund C, Franke WW, & Arnold HH (2002) The cell adhesion molecule M-cadherin is not essential for muscle development and regeneration. *Mol Cell Biol* 22(13):4760-4770.

180. Radice GL, *et al.* (1997) Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev Biol* 181(1):64-78.

181. Dahl U, et al. (2002) Genetic dissection of cadherin function during nephrogenesis. *Mol Cell Biol* 22(5):1474-1487.

182. Kang JS, Feinleib JL, Knox S, Ketteringham MA, & Krauss RS (2003) Promyogenic members of the Ig and cadherin families associate to positively regulate differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7):3989-3994.

183. Kang JS, Mulieri PJ, Hu Y, Taliana L, & Krauss RS (2002) BOC, an Ig superfamily member, associates with CDO to positively regulate myogenic differentiation. *EMBO J* 21(1-2):114-124.

184. Kang JS, *et al.* (1997) CDO: an oncogene-, serum-, and anchorage-regulated member of the Ig/fibronectin type III repeat family. *J Cell Biol* 138(1):203-213.

185. Kang JS, Mulieri PJ, Miller C, Sassoon DA, & Krauss RS (1998) CDO, a roborelated cell surface protein that mediates myogenic differentiation. *J Cell Biol* 143(2):403-413.

186. Cole F, Zhang W, Geyra A, Kang JS, & Krauss RS (2004) Positive regulation of myogenic bHLH factors and skeletal muscle development by the cell surface receptor CDO. *Dev Cell* 7(6):843-854.

187. Lu M & Krauss RS (2010) N-cadherin ligation, but not Sonic hedgehog binding, initiates Cdo-dependent p38alpha/beta MAPK signaling in skeletal myoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(9):4212-4217.

188. Kang JS, *et al.* (2008) A Cdo-Bnip-2-Cdc42 signaling pathway regulates p38alpha/beta MAPK activity and myogenic differentiation. *J Cell Biol* 182(3):497-507. 189. Takaesu G, *et al.* (2006) Activation of p38alpha/beta MAPK in myogenesis via binding of the scaffold protein JLP to the cell surface protein Cdo. *J Cell Biol* 175(3):383-388.

190. Bae GU, *et al.* (2009) Neogenin regulates skeletal myofiber size and focal adhesion kinase and extracellular signal-regulated kinase activities in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* 20(23):4920-4931.

191. Kang JS, *et al.* (2004) Netrins and neogenin promote myotube formation. *J Cell Biol* 167(3):493-504.

192. Gad JM, Keeling SL, Wilks AF, Tan SS, & Cooper HM (1997) The expression patterns of guidance receptors, DCC and Neogenin, are spatially and temporally distinct throughout mouse embryogenesis. *Dev Biol* 192(2):258-273.

193. Wang H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, & Tessier-Lavigne M (1999) Netrin-3, a mouse homolog of human NTN2L, is highly expressed in sensory ganglia and shows differential binding to netrin receptors. *J Neurosci* 19(12):4938-4947.

194. Quach NL, Biressi S, Reichardt LF, Keller C, & Rando TA (2009) Focal adhesion kinase signaling regulates the expression of caveolin 3 and beta1 integrin, genes essential for normal myoblast fusion. *Mol Biol Cell* 20(14):3422-3435.

195. Gullberg D, Velling T, Lohikangas L, & Tiger CF (1998) Integrins during muscle development and in muscular dystrophies. *Front Biosci* 3:D1039-1050.

196. Brzoska E, Bello V, Darribere T, & Moraczewski J (2006) Integrin alpha3 subunit participates in myoblast adhesion and fusion in vitro. *Differentiation* 74(2-3):105-118.

197. Lafuste P, *et al.* (2005) ADAM12 and alpha9beta1 integrin are instrumental in human myogenic cell differentiation. *Mol Biol Cell* 16(2):861-870.

198. Huovila AP, Almeida EA, & White JM (1996) ADAMs and cell fusion. *Curr Opin Cell Biol* 8(5):692-699.

199. Schwander M, *et al.* (2003) Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev Cell* 4(5):673-685.

200. Martin SJ, *et al.* (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182(5):1545-1556. 201. Verhoven B, Schlegel RA, & Williamson P (1995) Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T

lymphocytes. J Exp Med 182(5):1597-1601.

202. van den Eijnde SM, *et al.* (2001) Transient expression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation. *J Cell Sci* 114(Pt 20):3631-3642.

203. Van den Eijnde SM, Boshart L, Reutelingsperger CP, De Zeeuw CI, & Vermeij-Keers C (1997) Phosphatidylserine plasma membrane asymmetry in vivo: a pancellular phenomenon which alters during apoptosis. *Cell Death Differ* 4(4):311-316.

204. Sessions A & Horwitz AF (1981) Myoblast aminophospholipid asymmetry differs from that of fibroblasts. *FEBS Lett* 134(1):75-78.

205. Duan R & Gallagher PJ (2009) Dependence of myoblast fusion on a cortical actin wall and nonmuscle myosin IIA. *Dev Biol* 325(2):374-385.

206. Nowak SJ, Nahirney PC, Hadjantonakis AK, & Baylies MK (2009) Nap1mediated actin remodeling is essential for mammalian myoblast fusion. *J Cell Sci* 122(Pt 18):3282-3293.

207. Charrasse S, *et al.* (2007) M-cadherin activates Rac1 GTPase through the Rho-GEF trio during myoblast fusion. *Mol Biol Cell* 18(5):1734-1743.

208. Pajcini KV, Pomerantz JH, Alkan O, Doyonnas R, & Blau HM (2008) Myoblasts and macrophages share molecular components that contribute to cell-cell fusion. *J Cell Biol* 180(5):1005-1019.

209. Moore CA, Parkin CA, Bidet Y, & Ingham PW (2007) A role for the Myoblast city homologues Dock1 and Dock5 and the adaptor proteins Crk and Crk-like in zebrafish myoblast fusion. *Development* 134(17):3145-3153.

210. O'Brien SP, et al. (2000) Skeletal muscle deformity and neuronal disorder in Trio exchange factor-deficient mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(22):12074-12078.

211. Awasaki T, *et al.* (2000) The Drosophila trio plays an essential role in patterning of axons by regulating their directional extension. *Neuron* 26(1):119-131.

212. Newsome TP, *et al.* (2000) Trio combines with dock to regulate Pak activity during photoreceptor axon pathfinding in Drosophila. *Cell* 101(3):283-294.

213. Liebl EC, *et al.* (2000) Dosage-sensitive, reciprocal genetic interactions between the Abl tyrosine kinase and the putative GEF trio reveal trio's role in axon pathfinding. *Neuron* 26(1):107-118.

214. Bateman J, Shu H, & Van Vactor D (2000) The guanine nucleotide exchange factor trio mediates axonal development in the Drosophila embryo. *Neuron* 26(1):93-106.

215. Ali S & Coombes RC (2002) Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer* 2(2):101-112.

216. Robinson GW (2007) Cooperation of signalling pathways in embryonic mammary gland development. *Nat Rev Genet* 8(12):963-972.

217. Veltmaat JM, Mailleux AA, Thiery JP, & Bellusci S (2003) Mouse embryonic mammogenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation. *Differentiation* 71(1):1-17.

218. Gjorevski N & Nelson CM (2011) Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(9):581-593.

219. Hinck L & Silberstein GB (2005) Key stages in mammary gland development: the mammary end bud as a motile organ. *Breast Cancer Res* 7(6):245-251.

220. Sternlicht MD, Kouros-Mehr H, Lu P, & Werb Z (2006) Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation* 74(7):365-381.

221. Brisken C, *et al.* (1999) Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. *Dev Biol* 210(1):96-106.

222. Oakes SR, Rogers RL, Naylor MJ, & Ormandy CJ (2008) Prolactin regulation of mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13(1):13-28.

223. Watson CJ (2006) Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast Cancer Res* 8(2):203.

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.
261. Slamon DJ, *et al.* (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344(11):783-792.

262. Marty M, *et al.* (2005) Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol* 23(19):4265-4274.

263. Cho HS, *et al.* (2003) Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 421(6924):756-760.

264. Izumi Y, Xu L, di Tomaso E, Fukumura D, & Jain RK (2002) Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature* 416(6878):279-280.

265. Lane HA, *et al.* (2000) ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip1)-Cdk2 complex formation: receptor overexpression does not determine growth dependency. *Mol Cell Biol* 20(9):3210-3223.

266. Le XF, *et al.* (2003) The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in anti-HER2 antibody-induced G1 cell cycle arrest and tumor growth inhibition. *J Biol Chem* 278(26):23441-23450.

267. Longva KE, Pedersen NM, Haslekas C, Stang E, & Madshus IH (2005) Herceptin-induced inhibition of ErbB2 signaling involves reduced phosphorylation of Akt but not endocytic down-regulation of ErbB2. *Int J Cancer* 116(3):359-367.

268. Nagata Y, *et al.* (2004) PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 6(2):117-127.

269. Molina MA, *et al.* (2001) Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res* 61(12):4744-4749.

270. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, & Ravetch JV (2000) Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6(4):443-446.

271. Musolino A, *et al.* (2008) Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 26(11):1789-1796.

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 tumorderived 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.

306. Lammermann T & Sixt M (2009) Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 21(5):636-644.

307. Sahai E & Marshall CJ (2003) Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* 5(8):711-719.

308. Verschueren H, De Baetselier P, & Bereiter-Hahn J (1991) Dynamic morphology of metastatic mouse T-lymphoma cells invading through monolayers of 10T1/2 cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 20(3):203-214.

309. Stephens L, Ellson C, & Hawkins P (2002) Roles of PI3Ks in leukocyte chemotaxis and phagocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 14(2):203-213.

310. Raftopoulou M & Hall A (2004) Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265(1):23-32.

311. Ibarra N, Pollitt A, & Insall RH (2005) Regulation of actin assembly by SCAR/WAVE proteins. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 6):1243-1246.

312. Zamir E & Geiger B (2001) Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 114(Pt 20):3583-3590.

313. McLean GW, *et al.* (2005) The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer* 5(7):505-515.

314. Sternlicht MD & Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516.

315. Narumiya S, Tanji M, & Ishizaki T (2009) Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 28(1-2):65-76.

316. Zeng L, *et al.* (2003) PTP alpha regulates integrin-stimulated FAK autophosphorylation and cytoskeletal rearrangement in cell spreading and migration. *J Cell Biol* 160(1):137-146.

317. Bretscher MS (1996) Getting membrane flow and the cytoskeleton to cooperate in moving cells. *Cell* 87(4):601-606.

318. Hegerfeldt Y, Tusch M, Brocker EB, & Friedl P (2002) Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res* 62(7):2125-2130. 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 D1dependent 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. Hulit 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 factorbeta 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.

341. Frangioni JV, Beahm PH, Shifrin V, Jost CA, & Neel BG (1992) The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence. *Cell* 68(3):545-560.

342. Yip SC, Saha S, & Chernoff J (2010) PTP1B: a double agent in metabolism and oncogenesis. *Trends Biochem Sci* 35(8):442-449.

343. Chernoff J (1999) Protein tyrosine phosphatases as negative regulators of mitogenic signaling. *J Cell Physiol* 180(2):173-181.

344. Bjorge JD, Pang A, & Fujita DJ (2000) Identification of protein-tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines. *J Biol Chem* 275(52):41439-41446.

345. Wiener JR, *et al.* (1994) Overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in human breast cancer: association with p185c-erbB-2 protein expression. *J Natl Cancer Inst* 86(5):372-378.

346. Zhai YF, *et al.* (1993) Increased expression of specific protein tyrosine phosphatases in human breast epithelial cells neoplastically transformed by the neu oncogene. *Cancer Res* 53(10 Suppl):2272-2278.

347. Julien SG, *et al.* (2007) Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis. *Nat Genet* 39(3):338-346.

348. Bentires-Alj M & Neel BG (2007) Protein-tyrosine phosphatase 1B is required for HER2/Neu-induced breast cancer. *Cancer Res* 67(6):2420-2424.

349. Hynes RO (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110(6):673-687.

350. Miranti CK & Brugge JS (2002) Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* 4(4):E83-90.

351. Huck L, Pontier SM, Zuo DM, & Muller WJ (2010) beta1-integrin is dispensable for the induction of ErbB2 mammary tumors but plays a critical role in the metastatic phase of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(35):15559-15564.

352. Guo W, et al. (2006) Beta 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis. *Cell* 126(3):489-502.

353. Hsieh FC, Cheng G, & Lin J (2005) Evaluation of potential Stat3-regulated genes in human breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 335(2):292-299.

354. Yeh YT, *et al.* (2006) STAT3 ser727 phosphorylation and its association with negative estrogen receptor status in breast infiltrating ductal carcinoma. *Int J Cancer* 118(12):2943-2947.

355. Yu H & Jove R (2004) The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 4(2):97-105.

356. Yang SF, *et al.* (2007) Altered p-STAT3 (tyr705) expression is associated with histological grading and intratumour microvessel density in hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol* 60(6):642-648.

357. Ma XT, *et al.* (2004) Constitutive activation of Stat3 signaling pathway in human colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 10(11):1569-1573.

358. Ranger JJ, Levy DE, Shahalizadeh S, Hallett M, & Muller WJ (2009) Identification of a Stat3-dependent transcription regulatory network involved in metastatic progression. *Cancer Res* 69(17):6823-6830.

359. Barbieri I, *et al.* (2010) Constitutively active Stat3 enhances neu-mediated migration and metastasis in mammary tumors via upregulation of Cten. *Cancer Res* 70(6):2558-2567.

360. Montell DJ (2003) Border-cell migration: the race is on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(1):13-24.

361. Rasmuson B, Montell I, Rasmuson A, Svahlin H, & Westerberg BM (1980) Genetic instability in Drosophila melanogaster: evidence for regulation, excision and transposition at the white locus. *Mol Gen Genet* 177(4):567-570.

362. Duchek P & Rorth P (2001) Guidance of cell migration by EGF receptor signaling during Drosophila oogenesis. *Science* 291(5501):131-133.

363. Bianco A, *et al.* (2007) Two distinct modes of guidance signalling during collective migration of border cells. *Nature* 448(7151):362-365.

364. Allen DL, Roy RR, & Edgerton VR (1999) Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve* 22(10):1350-1360.

365. Chen EH, Grote E, Mohler W, & Vignery A (2007) Cell-cell fusion. *FEBS Lett* 581(11):2181-2193.

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)P3-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-/- myogenic cells derived from adult skeletal muscle. *J Cell Biol* 144(4):631-643.

377. Tajbakhsh S & Buckingham M (2000) The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. *Current topics in developmental biology* 48:225-268.

378. Maekawa T, *et al.* (1999) Mouse ATF-2 null mutants display features of a severe type of meconium aspiration syndrome. *J Biol Chem* 274(25):17813-17819.

379. Chotteau-Lelievre A, Dolle P, & Gofflot F (2006) Expression analysis of murine genes using in situ hybridization with radioactive and nonradioactively labeled RNA probes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J* 326:61-87.

380. Sassoon D, *et al.* (1989) Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. *Nature* 341(6240):303-307.

381. Eckhardt BL, Francis PA, Parker BS, & Anderson RL (2012) Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer. *Nat Rev Drug Discov* 11(6):479-497.

382. Hynes NE & MacDonald G (2009) ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol* 21(2):177-184.

383. Steeg PS (2006) Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* 12(8):895-904.

384. Sosa MS, *et al.* (2010) Identification of the Rac-GEF P-Rex1 as an essential mediator of ErbB signaling in breast cancer. *Mol Cell* 40(6):877-892.

385. Smith HW, Marra P, & Marshall CJ (2008) uPAR promotes formation of the p130Cas-Crk complex to activate Rac through DOCK180. *J Cell Biol* 182(4):777-790.

386. Haibe-Kains B, *et al.* (2012) A three-gene model to robustly identify breast cancer molecular subtypes. *J Natl Cancer Inst* 104(4):311-325.

387. Nishikimi A, *et al.* (2012) Blockade of inflammatory responses by a small-molecule inhibitor of the Rac activator DOCK2. *Chem Biol* 19(4):488-497.

388. Kiyokawa E, *et al.* (1998) Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev* 12(21):3331-3336.

389. Northey JJ, *et al.* (2008) Signaling through ShcA is required for transforming growth factor beta- and Neu/ErbB-2-induced breast cancer cell motility and invasion. *Mol Cell Biol* 28(10):3162-3176.

390. Khodarev NN, *et al.* (2004) STAT1 is overexpressed in tumors selected for radioresistance and confers protection from radiation in transduced sensitive cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(6):1714-1719.

391. Bektas N, *et al.* (2008) The ubiquitin-like molecule interferon-stimulated gene 15 (ISG15) is a potential prognostic marker in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 10(4):R58.

392. Tsai YC, *et al.* (2011) Interferon-beta signaling contributes to Ras transformation. *PLoS One* 6(8):e24291.

393. Desai SD, *et al.* (2012) ISG15 disrupts cytoskeletal architecture and promotes motility in human breast cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 237(1):38-49.

394. Strumane K, Rygiel T, van der Valk M, & Collard JG (2009) Tiam1-deficiency impairs mammary tumor formation in MMTV-c-neu but not in MMTV-c-myc mice. *J Cancer Res Clin Oncol* 135(1):69-80.

395. Diaz N, *et al.* (2006) Activation of stat3 in primary tumors from high-risk breast cancer patients is associated with elevated levels of activated SRC and survivin expression. *Clin Cancer Res* 12(1):20-28.

396. Raven JF, *et al.* (2011) Stat1 is a suppressor of ErbB2/Neu-mediated cellular transformation and mouse mammary gland tumor formation. *Cell Cycle* 10(5):794-804.

397. Saito H, Kubota M, Roberts RW, Chi Q, & Matsunami H (2004) RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors. *Cell* 119(5):679-691.

398. Ursini-Siegel J, *et al.* (2012) The ShcA SH2 domain engages a 14-3-3/PI3'K signaling complex and promotes breast cancer cell survival. *Oncogene*.

399. Brantley-Sieders DM, *et al.* (2008) The receptor tyrosine kinase EphA2 promotes mammary adenocarcinoma tumorigenesis and metastatic progression in mice by amplifying ErbB2 signaling. *J Clin Invest* 118(1):64-78.

400. Trapnell C, Pachter L, & Salzberg SL (2009) TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25(9):1105-1111.

401. Trapnell C, *et al.* (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* 7(3):562-578.

402. Anders S & Huber W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11(10):R106.

403. Huang da W, Sherman BT, & Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4(1):44-57.

404. Schafer G, *et al.* (2007) The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) is essential for myoblast fusion in Drosophila. *Dev Biol* 304(2):664-674.

405. Gruenbaum-Cohen Y, *et al.* (2012) The actin regulator N-WASp is required for muscle-cell fusion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(28):11211-11216.

406. Tryggvason K (2001) Nephrin: role in normal kidney and in disease. *Adv Nephrol Necker Hosp* 31:221-234.

407. Kestila M, *et al.* (1998) Positionally cloned gene for a novel glomerular protein-nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1(4):575-582.

408. Putaala H, Soininen R, Kilpelainen P, Wartiovaara J, & Tryggvason K (2001) The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet* 10(1):1-8.

409. Rantanen M, *et al.* (2002) Nephrin TRAP mice lack slit diaphragms and show fibrotic glomeruli and cystic tubular lesions. *J Am Soc Nephrol* 13(6):1586-1594.

410. Sohn RL, *et al.* (2009) A role for nephrin, a renal protein, in vertebrate skeletal muscle cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(23):9274-9279.

411. Gerke P, *et al.* (2005) NEPH2 is located at the glomerular slit diaphragm, interacts with nephrin and is cleaved from podocytes by metalloproteinases. *J Am Soc Nephrol* 16(6):1693-1702.

412. Gerke P, *et al.* (2006) Neuronal expression and interaction with the synaptic protein CASK suggest a role for Neph1 and Neph2 in synaptogenesis. *J Comp Neurol* 498(4):466-475.

413. Ristola M, *et al.* (2009) Regulation of Neph3 gene in podocytes--key roles of transcription factors NF-kappaB and Sp1. *BMC Mol Biol* 10:83.

414. Griffin CA, Kafadar KA, & Pavlath GK (2009) MOR23 promotes muscle regeneration and regulates cell adhesion and migration. *Dev Cell* 17(5):649-661.

415. Young JM & Trask BJ (2002) The sense of smell: genomics of vertebrate odorant receptors. *Hum Mol Genet* 11(10):1153-1160.

416. Millay DP, *et al.* (2013) Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature* 499(7458):301-305.

417. Park D & Ravichandran KS (2010) Emerging roles of brain-specific angiogenesis inhibitor 1. *Adv Exp Med Biol* 706:167-178.

418. Yan J, *et al.* (2012) A Gbetagamma effector, ElmoE, transduces GPCR signaling to the actin network during chemotaxis. *Dev Cell* 22(1):92-103.

419. Fritsch R, *et al.* (2013) RAS and RHO Families of GTPases Directly Regulate Distinct Phosphoinositide 3-Kinase Isoforms. *Cell* 153(5):1050-1063.

420. Nagasawa T, *et al.* (1996) Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382(6592):635-638.

421. Luxenburg C, *et al.* (2007) The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. *PLoS One* 2(1):e179.

422. Brazier H, *et al.* (2006) Expression profile of RhoGTPases and RhoGEFs during RANKL-stimulated osteoclastogenesis: identification of essential genes in osteoclasts. *J Bone Miner Res* 21(9):1387-1398.

423. Sorlie T, *et al.* (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(19):10869-10874.

424. McCarthy A, *et al.* (2007) A mouse model of basal-like breast carcinoma with metaplastic elements. *J Pathol* 211(4):389-398.

425. Ghoussoub RA, *et al.* (1998) Expression of c-met is a strong independent prognostic factor in breast carcinoma. *Cancer* 82(8):1513-1520.

426. Camp RL, Rimm EB, & Rimm DL (1999) Met expression is associated with poor outcome in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* 86(11):2259-2265.

427. Kang JY, et al. (2003) Tissue microarray analysis of hepatocyte growth factor/Met pathway components reveals a role for Met, matriptase, and hepatocyte

growth factor activator inhibitor 1 in the progression of node-negative breast cancer. *Cancer Res* 63(5):1101-1105.

428. Lengyel E, *et al.* (2005) C-Met overexpression in node-positive breast cancer identifies patients with poor clinical outcome independent of Her2/neu. *Int J Cancer* 113(4):678-682.

429. Ponzo MG, *et al.* (2009) Met induces mammary tumors with diverse histologies and is associated with poor outcome and human basal breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(31):12903-12908.

430. Graveel CR, *et al.* (2009) Met induces diverse mammary carcinomas in mice and is associated with human basal breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(31):12909-12914.

431. Knight JF, *et al.* (2013) Met synergizes with p53 loss to induce mammary tumors that possess features of claudin-low breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(14):E1301-1310.

432. Muller A, *et al.* (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410(6824):50-56.

433. Cotton M & Claing A (2009) G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration. *Cell Signal* 21(7):1045-1053.

434. Luttrell LM, *et al.* (1995) G beta gamma subunits mediate mitogen-activated protein kinase activation by the tyrosine kinase insulin-like growth factor 1 receptor. *J Biol Chem* 270(28):16495-16498.

435. Johnson RM, *et al.* (1986) Pertussis toxin or phorbol 12-myristate 13-acetate can distinguish between epidermal growth factor- and angiotensin-stimulated signals in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(7):2032-2036.

436. Li YM, *et al.* (2004) Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell* 6(5):459-469.

437. Trinchieri G (2010) Type I interferon: friend or foe? *J Exp Med* 207(10):2053-2063.

438. Borden EC, *et al.* (2007) Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 6(12):975-990.

439. Sgorbissa A & Brancolini C (2012) IFNs, ISGylation and cancer: Cui prodest? *Cytokine Growth Factor Rev* 23(6):307-314.

440. Kiladjian JJ, Mesa RA, & Hoffman R (2011) The renaissance of interferon therapy for the treatment of myeloid malignancies. *Blood* 117(18):4706-4715.

441. Gongora C, *et al.* (2008) Altered expression of cell proliferation-related and interferon-stimulated genes in colon cancer cells resistant to SN38. *Cancer Biol Ther* 7(6):822-832.

442. Zhang D & Zhang DE (2011) Interferon-stimulated gene 15 and the protein ISGylation system. *J Interferon Cytokine Res* 31(1):119-130.

443. Andersen JB, *et al.* (2006) Stage-associated overexpression of the ubiquitinlike protein, ISG15, in bladder cancer. *Br J Cancer* 94(10):1465-1471.

444. Satake H, *et al.* (2010) The ubiquitin-like molecule interferon-stimulated gene 15 is overexpressed in human prostate cancer. *Oncol Rep* 23(1):11-16.

445. Kiessling A, *et al.* (2009) Expression, regulation and function of the ISGylation system in prostate cancer. *Oncogene* 28(28):2606-2620.

446. Weichselbaum RR, *et al.* (2008) An interferon-related gene signature for DNA damage resistance is a predictive marker for chemotherapy and radiation for breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(47):18490-18495.

447. Burks J, Reed RE, & Desai SD (2013) ISGylation governs the oncogenic function of Ki-Ras in breast cancer. *Oncogene*.

448. D'Cunha J, *et al.* (1996) In vitro and in vivo secretion of human ISG15, an IFNinduced immunomodulatory cytokine. *J Immunol* 157(9):4100-4108.

449. Wu CC, *et al.* (2010) Candidate serological biomarkers for cancer identified from the secretomes of 23 cancer cell lines and the human protein atlas. *Mol Cell Proteomics* 9(6):1100-1117.

450. Decaillot FM, Rozenfeld R, Gupta A, & Devi LA (2008) Cell surface targeting of mu-delta opioid receptor heterodimers by RTP4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(41):16045-16050.