

Université de Montréal

**Expression exogène du récepteur du facteur autocrine de  
motilité (AMF-R) dans les cellules COS-7**

Par

Marilyn REGISTRE

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de  
l'obtention du  
grade de

Maîtrise ès sciences (M.Sc.)

En biologie cellulaire

Juillet 2004

© MARILYN REGISTRE, 2004



W

4

U58

2004

V. 125

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Expression exogène du récepteur du facteur autocrine de  
motilité (AMF-R) dans les cellules COS-7**

Présenté par :

Marilyn REGISTRE

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Dr Josette Noël

Directeur de recherche : Dr Ivan Robert Nabi

Membre du jury : Dr Lucian Ghitescu

Mémoire accepté le :

*On ne méprise pas la science sans mépriser la raison; on ne méprise pas la raison sans mépriser l'homme; on ne méprise pas l'homme sans offenser Dieu.*

**Anatole France**

## RÉSUMÉ

Le récepteur du facteur autocrine de motilité (AMF-R) est un récepteur couplé aux protéines G impliqué dans la motilité cellulaire et la formation des métastases. Il est également une ubiquitine ligase (E3) liée à la dégradation des protéines via le protéasome.

Le facteur autocrine de motilité (AMF) est une protéine multifonctionnelle identique à la phosphoglucose isomérase, à la neuroleukine et au facteur de maturation. L'AMF-R est impliqué via son ligand dans divers processus cellulaires tels que l'arthrite rhumatoïde et l'apoptose. L'internalisation du complexe ligand-récepteur via la voie des cavéoles dirige le récepteur au réticulum endoplasmique lisse tandis que la voie des vésicules de clathrine lui permet d'être recyclé vers les fibrilles de fibronectine. Les domaines *Cue* et *RING* régissent l'implication de l'AMF-R dans l'ubiquitination. L'étroite association AMF-R/mitochondries a été démontrée et sa fonction est encore à l'étude.

Afin de mieux caractériser les effets de sa surexpression, le récepteur fut étiqueté avec les épitopes connus FLAG (FLAG-AMF-R) ou GFP (AMF-R-GFP) et exprimé dans plusieurs types cellulaires. En immunofluorescence (IF), un fort marquage des cellules transfectées démontra leur surexpression, quoiqu'une distribution atypique du marquage d'AMF-R fut détectée comparativement aux cellules non-transfectées. La surexpression de l'AMF-R inhibe son association avec les mitochondries.

En immunobuvardage, la protéine FLAG-AMF-R comigre avec l'AMF-R endogène. La monoubiquitination de la protéine FLAG-AMF-R, immunoprécipitée au moyen de l'anticorps anti-FLAG, est démontrée, révélée par un anticorps dirigé contre l'ubiquitine (Ub). D'autres bandes révélées en immunobuvardage par l'anti-Ub pourraient être des substrats de l'AMF-R, co-immunoprécipitant avec celui-ci. Le rôle du protéasome dans la dégradation de l'AMF-R fut confirmé. En effet, un traitement à la lactacystine, inhibiteur du protéasome, prévient la dégradation de l'AMF-R, et en IF, augmente la colocalisation de FLAG-AMF-R avec les structures marquées par l'anticorps anti-AMF-R.

Ce travail ouvre la voie à plusieurs avenues de recherche dont l'identification des substrats d'AMF-R via la protéomique et le mécanisme de la dissociation mitochondries/AMF-R entraînée par la surexpression de ce dernier. L'élucidation de ces voies aura certainement d'importantes implications thérapeutiques vu le rôle important de l'AMF-R dans le cancer.

**Mots-clés :** AMF-R, ubiquitine ligase, monoubiquitination, surexpression, protéasome, lactacystine, mitochondries.

## SUMMARY

Autocrine motility factor receptor (AMF-R) is a G protein coupled receptor (GPCR) involved in cell motility and metastasis. It is also an E3 ubiquitin ligase with an important role in proteasome-mediated protein degradation.

Autocrine motility factor (AMF) is a multifunctional protein identical to phosphoglucose isomerase, neuroleukin and maturation factor. AMF-R is implicated through its ligand in many cellular processes such as rheumatoid arthritis and apoptosis. Internalization of the receptor-ligand complex through the caveolae pathway aims the receptor to smooth endoplasmic reticulum tubules whereas with the clathrin pathway, AMF-R is recycled to fibronectin fibrils. Cue and RING finger are important domains for AMF-R's role in ubiquitination. AMF-R is also closely associated with the mitochondria and the significance of this is still under study.

In order to better study the effects of AMF-R's overexpression, tagged versions of AMF-R with FLAG (FLAG-AMF-R) or GFP (AMF-R-GFP) epitopes were expressed in different cell types. Immunofluorescence (IF) studies show a strong labeling of AMF-R in transfected cells, revealing overexpression of the protein. However, the strong AMF-R labeling shows an atypical distribution when compared with untransfected cells. Overexpression of AMF-R disrupts the AMF-R/mitochondria association.

In western blotting studies, FLAG-AMF-R co-migrates with endogenous AMF-R. The monoubiquitination of the FLAG-immunoprecipitated protein is also demonstrated as revealed by anti-ubiquitin (anti-Ub) antibodies. The anti-Ub blot shows different bands at different molecular weights that could represent potential substrate proteins co-immunoprecipitating with the receptor. Our study confirms the proteasome's role in AMF-R degradation; Treatment with a proteasome inhibitor (lactacystin) prevents AMF-R degradation. Furthermore, IF studies reveal an increase of colocalization of FLAG-AMF-R with structures labeled by anti-AMF-R antibody following cell treatment with lactacystin.

This study paves the way to many research avenues including identification of AMF-R's substrates through proteomics and understanding the mechanism of AMF-R/mitochondria dissociation caused by overexpression of AMF-R. These will certainly have crucial therapeutic implications because of AMF-R's role in cancer.

**Key words:** AMF-R, ubiquitin ligase, monoubiquitination, overexpression, proteasome, lactacystin, mitochondria.

## Liste des abréviations

ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMF	Facteur autocrine de motilité <i>Autocrine motility factor</i>
AMF-R	Récepteur du facteur autocrine de motilité <i>Autocrine motility factor receptor</i>
Apaf-1	Facteur d'activation de protéase apoptotique-1 <i>Apoptotic protease activating factor-1</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
bAMF	AMF biotinylé
ATP	Adénosine triphosphate
BRCA	Proto-oncogène associé au cancer du sein <i>Breast cancer susceptibility gene</i>
COS	Cellules fibroblastiques de singe transformées par le virus SV-40 <i>CV-1 origin defective SV-40</i>
CMV	Corps multivésiculaires
CUE	Couplage de la dégradation associée au réticulum endoplasmique avec la conjugaison à l'ubiquitine. <i>Coupling of ubiquitin conjugation to ER degradation</i>
GFP	Protéine autofluorescente verte <i>Green fluorescent protein</i>
GTP	Guanosine triphosphate
HSP-70	Protéine de choc thermique de 70 kDa <i>Heat shock protein 70</i>
IF	Immunofluorescence
IL-2	Interleukine-2

LAMP	Protéine membranaire associée aux lysosomes <i>Lysosomal associated membrane protein</i>
MF	Facteur de maturation <i>Maturation Factor</i>
NLK	Neuroleukine
PGI	Phosphoglucose isomérase
PKC	Protéine kinase C
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
REI	Réticulum endoplasmique lisse
RING	Motif spécialisé à doigts de zinc associé à l'ubiquitination <i>Really interesting new gene finger domain</i>
Tfr	Transferrine
Ub	Ubiquitine
VEGF	Facteur de croissance endothélial vasculaire <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

## Liste des figures

### Schéma 1

*Relation phylogénétique entre les différentes familles de RCPG dans le  
génomme humain*-----2

### Schéma 2

*Cartographie de FLAG-AMF-R*-----9

## Table des matières

<b>Résumé</b>	<b>i</b>
<b>Summary</b>	<b>iii</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>v</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>vii</b>
<b>Table des matières</b>	<b>viii</b>
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
1- Récepteurs membranaires couplés aux protéines G-----	1
1.1 Les RCPG et l'endocytose-----	2
1.2 Les RCPG et la signalisation-----	3
1.3 Exemples de RCPG-----	5
1.3.1 La rhodopsine-----	5
1.3.2 Le récepteur de la calcitonine-----	6
2- Le récepteur du facteur autocrine de motilité (AMF-R)-----	7
2.1 Définition-----	7
2.2 Génétique et signalisation -----	8
2.3 Localisation de l'AMF-R au niveau du REI-----	9
2.4 AMF-R et la progression tumorale/métastase-----	11
3- Le facteur autocrine de motilité (AMF)-----	12
3.1 Définitions-----	12
3.1.1 Phosphoglucose isomérase (PGI)-----	12
3.1.2 Facteur autocrine de motilité (AMF)-----	13
3.1.3 Neuroleukine (NLK)-----	13
3.1.4 Facteur de maturation (MF)-----	14
3.2 Une protéine multifonctionnelle-----	14
3.3 Implication dans divers processus cellulaires-----	15
3.3.1 Métastase-----	15
3.3.2 Angiogenèse-----	16
3.3.3 Apprentissage et mémoire-----	16
3.3.4 Hypoxie-----	17
3.3.5 Arthrite rhumatoïde-----	17
3.3.6 Anémie hémolytique non sphérolytique-----	17
3.3.7 Développement et régénération osseuse-----	18
3.3.8 Apoptose-----	18
4- Endocytose du complexe AMF/AMF-R-----	19
4.1 Internalisation via la voie des cavéoles-----	20
4.2 Internalisation dépendante de la clathrine-----	21

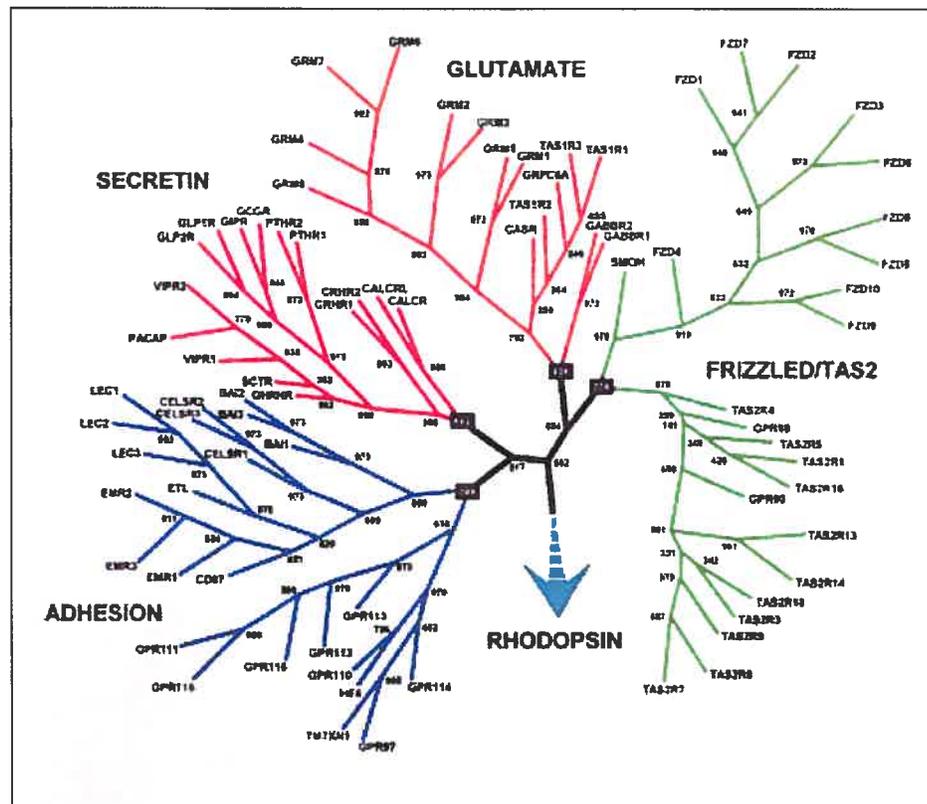
5- Implication de l'AMF-R dans l'ubiquitination-----	22
5.1 Dégradation associée au réticulum endoplasmique (ERAD)-----	22
5.2 Rôle des protéines RING finger-----	23
5.2.1 Exemples de protéines RING finger-----	23
5.2.2 Substrats ubiquitinés via AMF-R-----	24
6- Interaction du RE lisse avec la mitochondrie-----	25
6.1 Association réticulum endoplasmique/mitochondrie-----	25
6.2 Rôle du calcium dans les processus mitochondriaux-----	25
6.3 AMF-R et la mitochondrie-----	26
<b>Objectifs de recherche</b>	<b>27</b>
<b>Article</b>	<b>28</b>
<b>Discussion</b>	<b>56</b>
1-Sommaire des résultats-----	56
2-Distribution de FLAG-AMF-R-----	56
2.1 Dissociation avec la mitochondrie-----	56
2.1.1 Ajout d'épitope-----	57
2.1.2 Lignée cellulaire-----	58
2.1.3 Rôle du domaine cytoplasmique-----	59
2.2 Manque de colocalisation des marquages FLAG et AMF-R-----	60
2.2.1 Épitope FLAG voilé-----	60
2.2.2 Effet de la lactacystine sur la conformation-----	61
2.3 Bande de haut poids moléculaire en immunobuvardage-----	62
3-Implications pour la fonction d'AMF-R-----	64
3.1 Monoubiquitination de l'AMF-R et relation avec l'endocytose---	64
3.2 Surexpression d'AMF-R et implications-----	66
3.2.1 Cancer-----	66
3.2.2 Apoptose-----	67
3.3 Corps multivésiculaires et ubiquitine pour dégradation-----	68
3.4 Perspectives-----	69
<b>Bibliographie</b>	<b>71</b>
<b>Remerciements</b>	<b>91</b>

## INTRODUCTION

### 1-Récepteurs membranaires couplés aux protéines G.

La superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) reconnaît plusieurs types de stimuli extracellulaires. Parmi ceux-ci, on compte les acides aminés, les neurotransmetteurs, les hormones, les chimiokines, les protéinases, les médiateurs d'inflammation, les substances odorantes et la lumière (Gether, 2000; Lombardi et al., 2002; Wong, 2003). Il existe également des RCPG responsables de la transmission de l'information sensorielle reliée au goût qui ont été clônés et caractérisés (Hoon et al., 1999). Le nombre des membres de cette famille de récepteurs membranaires est estimé à 1000 dans le génome humain. (Gether, 2000; Wong, 2003). Le schéma 1 (page suivante) illustre la relation phylogénétique entre les différentes familles de RCPG dans le génome humain.

Les RCPG sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires dont l'extrémité N-terminale se situe du côté extracellulaire, et l'extrémité C-terminale, du côté intracellulaire. L'activation des RCPG est initiée par la liaison du ligand agoniste à la molécule réceptrice. Un changement de conformation s'opère à la suite de cette liaison et induit l'activation de la protéine G associée à la stimulation de diverses voies de signalisation (Gether et al., 2002).



*Schéma 1. Relation phylogénétique entre les différentes familles de RCPG dans le génome humain (Fredriksson et al., 2003). On voit ici les 5 familles principales de RCPG formant le système de classification GRAFS (première lettre de chaque famille). Cette figure illustre la théorie selon laquelle les RCPG de la famille GRAFS auraient un ancêtre commun. Ces familles auraient évolué grâce aux processus de duplication génique et de redistribution des exons.*

### 1.1 Les RCPG et l'endocytose

L'endocytose est intimement couplée aux processus de signalisation à la surface cellulaire via les divers réseaux d'interactions protéiques et les modifications post-traductionnelles (Cavalli et al., 2001). Des études récentes semblent proposer que la signalisation associée aux RCPG est plus spécifique que ce que l'on croyait auparavant et suggère l'existence d'un système d'exécution plus organisé permettant la propagation rapide et spécifique des stimuli extracellulaires aux molécules de signalisation intracellulaires (Hur and Kim,

2002). De plus, les protéines G ne sont pas localisées de manière aléatoire à la surface intracellulaire de la membrane plasmique, mais sont plutôt concentrées dans des micro-domaines spécialisés. Les cavéoles et les radeaux lipidiques sont des micro-domaines de la membrane plasmique contenant des molécules de signalisation dont les RCPG, les protéines G hétérotrimériques et les petites protéines G, l'adénylate cyclase, la PKC et plusieurs autres (Lisanti et al., 1994; Shaul and Anderson, 1998). Une théorie suggère que les cavéoles serviraient d'ancrage pour recruter ces composantes dans la voie de signalisation afin d'augmenter le couplage efficace et rapide des récepteurs à plus d'un système effecteur. L'interaction dans ces micro-domaines aurait donc pour but de compartimenter, moduler et intégrer les processus de signalisation à la surface cellulaire (Anderson, 1998). Une théorie alternative perçoit la structure cavéolaire comme membrane retenant les molécules signalisatrices dans un état inactif jusqu'à ce qu'elles deviennent activées pour transmettre un message ou attirer d'autres composantes signalisatrices pour terminer le signal du récepteur (Schlegel et al., 1998). Des expériences effectuées avec les RCPG soutiennent ces deux théories, et confirment donc un rôle capital des cavéoles à la régulation de la transduction du signal des RCPG.

## **1.2 Les RCPG et la signalisation**

Les RCPG existent sous les formes actives et inactives, la dernière étant la conformation favorisée dans la plupart des cas. La liaison du ligand

extracellulaire entraîne des changements conformationnels et active le récepteur qui par la suite s'associe avec des classes distinctes de protéines G hétérotrimériques composées de 3 sous-unités : la sous-unité alpha ( $\alpha$ ), contenant le site de liaison à la guanine et les sous-unités bêta ( $\beta$ ) et gamma ( $\gamma$ ) formant un dimère (Hur and Kim, 2002). Les protéines G sont divisées en quatre classes : Gs, Gi/o, Gq/11 et G12/13. La sous-famille Gs active l'adénylate cyclase, par opposition à la sous-famille Gi qui l'inhibe. La phospholipase C (PLC) est activée par la sous-famille Gq, et finalement la sous-famille G12 régule les protéines liant les petites GTP (Cabrera-Vera et al., 2003). La diversité des sous-unités de protéines G et de leurs molécules effectrices est responsable de la complexité potentielle des réponses induites suite à la stimulation d'un RCPG donné. La spécificité dépend donc entièrement des hétérotrimères de protéines G reconnus par le récepteur, des molécules effectrices exprimées dans la cellule ou le tissu en question, et des concentrations relatives des divers composants dans la voie de signalisation (Hur and Kim, 2002).

Il serait incomplet de parler de la signalisation des RCPG sans parler de croisement d'interactions (*crossstalk*) à l'intérieur même d'un RCPG donné, et/ou entre différents RCPG (Breitwieser, 2004). L'homo- et l'hétérodimérisation des récepteurs impliqués dans la signalisation et l'activation des RCPG entraîneraient des effets synergiques et complexes. Il a longtemps été assumé que les RCPG étaient des récepteurs monomériques interagissant de manière allostérique avec une protéine G hétérotrimérique. Des études récentes démontrent que la dimérisation ou l'oligomérisation des récepteurs est nécessaire à la transduction

du signal pour plusieurs RCPG tout comme pour les récepteurs tyrosine kinase et la famille des récepteurs de l'hormone de croissance (Hur and Kim, 2002; Lee et al., 2000). En effet, cette dimérisation/oligomérisation serait importante dans plusieurs aspects tels que la biogenèse de ces récepteurs, leur activation et leur fonction (Bouvier, 2001; Hur and Kim, 2002; Lee et al., 2003; Xie et al., 1999).

Les RCPG interagissent également avec d'autres voies de signalisation. Par exemple, les canaux calciques et potassiques sont régulés par une voie de signalisation médiée par un second messager, ou alternativement par une voie de signalisation impliquant les protéines G excluant les seconds messagers (Hille, 1994; Wickman and Clapham, 1995). Il existe plusieurs sous-familles de RCPG : Les récepteurs reliés à la rhodopsine et au récepteur  $\beta$ -adrénergique constituent la sous-famille A ; les récepteurs reliés aux récepteurs du glucagon et de la calcitonine constituent la sous-famille B ; et la sous-famille C inclut les récepteurs des neurotransmetteurs métabotropiques (Gether, 2000). Ces sous-familles constituent les principales des RCPG. D'autres sous-familles incluent les familles D, E et F. La section suivante décrit deux prototypes connus de deux de ces familles.

### **1.3 Exemples de RCPG**

#### **1.3.1 La rhodopsine**

La vision est médiée entre autres par les RCPG. Il existe deux types de cellules photoréceptrices à fonctions différentes. Les bâtonnets sont extrêmement

sensibles à de faibles niveaux de lumière, contribuant largement à la sensibilité de l'œil au noir et blanc. Les cônes, quant à eux, sont 100 fois moins sensibles, mais ont pour fonction de permettre la vision des couleurs et des détails (Albert and Yeagle, 2002). La rhodopsine est le prototype de la famille A des RCPG, et est le récepteur responsable pour l'initiation de la transduction du signal visuel (Gether, 2000). Le 11-cis rétinol est le ligand dont la photosensibilité confère au récepteur sa sensibilité à la lumière. La rhodopsine est le mieux étudié de tous les RCPG vu son abondance naturelle dans l'œil et l'élucidation de sa structure tridimensionnelle à haute résolution (Albert and Yeagle, 2002; Filipek et al., 2003; Liang et al., 2003b).

### 1.3.2 Le récepteur de la calcitonine

Le clonage moléculaire a permis l'identification des récepteurs de la calcitonine, de l'hormone parathyroïdienne et de la sécrétine comme membres des récepteurs heptahéliques couplés aux protéines G. Le récepteur de la calcitonine, appartenant à la famille B des RCPG, active les voies de signalisation couplées à l'adénylate cyclase, aux phospholipases C, D, A2 et aux MAP kinases (Fluhmann et al., 1995; Komarova et al., 2003; Mould and Pondel, 2003). Son ligand, la calcitonine, est une hormone de 32 acides aminés sécrétée par la glande thyroïde en réponse à une élévation des niveaux de calcium plasmatiques. L'effet direct de cette hormone sur les ostéoclastes, inhibant leur motilité et leur activité de résorption, lui permet d'être utilisée comme traitement dans les maladies

métaboliques de l'os telles que l'ostéoporose et la maladie de Paget (Komarova et al., 2003). Plusieurs tissus tels que le muscle squelettique, le rein, les ostéoclastes et la spermatozoïde expriment le CTR. On le retrouve également à haut niveau dans les lignées cancéreuses et les tumeurs primaires mammaires (Mould and Pondel, 2003).

## **2. Le récepteur du facteur autocrine de motilité (AMF-R)**

La première indication que l'AMF-R soit un RCPG a été la démonstration que l'augmentation de la motilité des cellules de mélanome B16-F1, induite par l'AMF ou l'anticorps monoclonal anti-gp78, est inhibée par la toxine de pertussis, qui inhibe les protéines G (Nabi et al., 1990). De plus, après avoir cloné les ADNc complets des gènes d'AMF-R de souris et d'humain, une équipe a montré que ces gènes codaient pour un récepteur à 7 domaines transmembranaires, remplissant donc les critères requis pour être identifié comme étant un RCPG (Shimizu et al., 1999).

### **2.1 Définition**

L'AMF-R est une glycoprotéine de 78 kDa exprimé à la surface membranaire et jouant un rôle dans la motilité cellulaire *in vitro* et dans la formation de métastases *in vivo*. Il a été démontré qu'un anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé contre une protéine de 78 kD, nommée gp78, pouvait stimuler la motilité cellulaire, tout comme l'AMF, via une voie de signalisation impliquant les protéines G (Nabi and Raz, 1987; Nabi et al., 1990). De plus, la liaison de

l'anticorps anti-gp78 à son récepteur était inhibée lorsque les cellules étaient pré-incubées dans du milieu contenant de l'AMF, indiquant que anti-gp78 et AMF faisaient compétition pour la liaison au récepteur (Nabi et al., 1990). Une autre expérience a démontré que l'AMF purifié de ces cellules de mélanome B16-F1 se liait directement à son récepteur gp78 (Silletti et al., 1991). Gp78 a alors été désigné AMF-R.

## 2.2 Génétique et signalisation

Le gène codant pour l'AMF-R/gp78 a été cloné à partir de cellules HT-1080, en utilisant une librairie d'ADNc. La séquence déduite codait pour un polypeptide de 323 acides aminés et démontrait une forte homologie avec la protéine suppresseur de tumeur p53 (Watanabe et al., 1991). Il a plus tard été démontré que cette séquence était incomplète, ne représentant qu'une partie 3' du gène. Les ADNc complets des gènes AMF-R d'humain et de souris codent pour une protéine à 7 domaines transmembranaires et ont 94.7% d'homologie entre eux (Shimizu et al., 1999). La séquence de 643 acides aminés code pour une protéine à 7 domaines transmembranaires et contient un motif spécialisé *RING-H2* à doigts de zinc (Shimizu et al., 1999). Une analyse détaillée de cette séquence porte à croire que ce serait plutôt une protéine à 5 domaines transmembranaires (Fang et al., 2001; Ponting, 2000). La possession de 7 domaines transmembranaires n'est plus un critère nécessaire à la fonctionnalité des RCPG comme l'ont démontré certaines études. En effet, ces expériences ont illustré que des récepteurs de la chimiokine à 5 domaines transmembranaires se

comportaient comme des RCPG quant à leur expression, leur signalisation, leur internalisation et leur désensibilisation (Ling et al., 1999). Les activations de la PKC, de la lipoxigénase et une activité tyrosine kinase sont caractéristiques de la voie de signalisation de l'AMF-R, résultant à la migration cellulaire (Timar et al., 1999).

Des analyses d'hybridation *in situ* en fluorescence ont révélé que la localisation du gène codant pour l'AMF-R se retrouvait au niveau du chromosome 16, au locus q21. Les gènes situés sur le long bras du chromosome 16 sont potentiellement intéressants relativement à leur implication dans la leucémie et les tumeurs épithéliales (Silletti and Raz, 1996). Une cartographie que j'ai réalisée à partir de la séquence en acides aminés de l'AMF-R (Schéma 2, page suivante), à partir des banques de données de séquence protéiques *Swissprot* et *Expasy*, illustre les différents domaines d'interactions protéiques de la protéine ainsi que ses multiples sites de phosphorylation.

### **2.3 Localisation de l'AMF-R au niveau du REI**

Le réticulum endoplasmique est un organe dynamique régulant plusieurs processus cellulaires. Une de ses fonctions majeures consiste en la synthèse et l'assemblage des protéines. Le RE joue également un rôle central dans plusieurs processus de signalisation (Berridge, 2002). Morphologiquement, le RE a une structure hétérogène et se divise en 3 parties :

- 1) Le RE rugueux, parsemé de ribosomes, qui est très actif dans la synthèse des protéines.

# FLAG-AMF-R

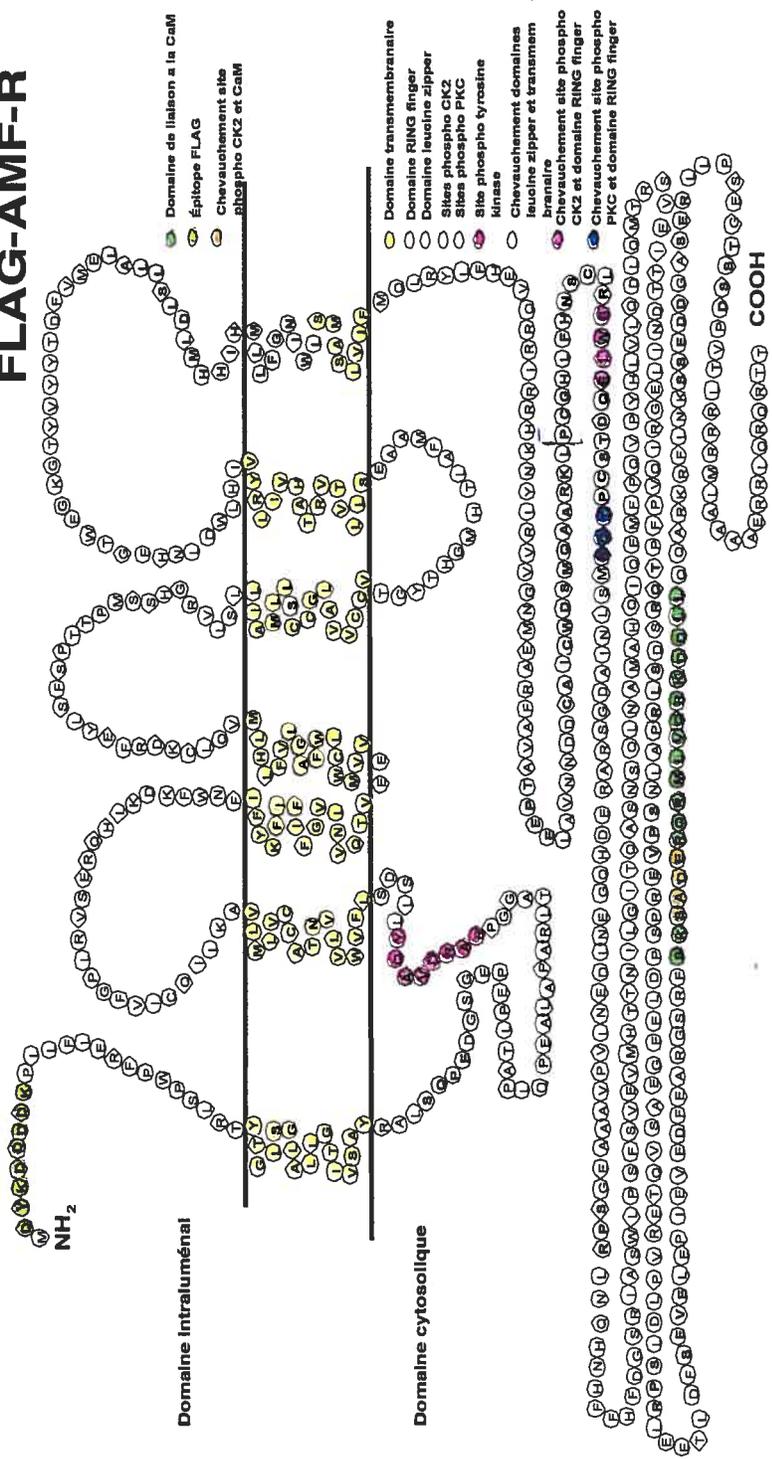


Schéma 2. Cartographie de FLAG-AMF-R

- 2) Le RE lisse, dépourvu de ribosomes, a plusieurs rôles tout dépendant du type cellulaire auquel il est associé. Dans le foie, il est important pour la détoxification des substances hydrophobes. Dans les cellules synthétisant les stéroïdes, le RE lisse est un site requis pour plusieurs des étapes de synthèse d'hormones. Dans le muscle et les neurones, il est principalement responsable pour la signalisation liée au calcium (Voeltz et al., 2002).
- 3) La membrane nucléaire, en continuité avec le réseau de tubules et de citernes du réticulum.

L'AMF-R est exprimé à la surface cellulaire et se retrouve dans un compartiment intracellulaire tubulaire pouvant être extrait au moyen de Triton X-100. En IF, les tubules d'AMF-R se distinguent aisément des endosomes marqués avec le récepteur de la Tfr, des lysosomes marqués avec LAMP-2, et de l'appareil de Golgi marqué avec  $\beta$ -COP. Suite à une centrifugation différentielle des cellules MDCK, il se retrouve dans le culot membranaire à 100 000 g (Benlimame et al., 1995). En microscopie électronique, l'AMF-R est localisé principalement dans des organites membranaires tubulaires lisses, et de façon moindre, à la membrane plasmique et dans le réticulum endoplasmique rugueux (Benlimame et al., 1995). C'est donc un marqueur pour un sous-domaine du réticulum endoplasmique lisse. Ce compartiment a été caractérisé plus en profondeur lorsque sa sensibilité à l'ilimaquinone (IQ) a été démontrée. Cette drogue est un métabolite naturel de l'éponge de mer induisant une vésiculation complète de l'appareil de Golgi (Takizawa et al., 1993). L'effet de l'IQ est similaire, quoique distinct, sur les tubules d'AMF-R. En IF, le marquage AMF-R

punctuel des cellules MDCK traitées à l'IQ rappelle la vésiculation du réseau *trans*-golgien induite par l'IQ. Une étude en microscopie électronique révèle des fenestrations dans les tubules fragmentés d'AMF-R, marquage tout à fait différent des vésicules dérivées du Golgi suite à un traitement par la drogue (Wang et al., 1997).

#### **2.4 AMF-R et la progression tumorale/métastase**

La motilité est établie comme une étape importante à la formation de néoplasmes secondaires par les cellules invasives. En effet, la métastase implique l'invasion, par les cellules cancéreuses, des tissus normaux environnants et leur passage à travers les barrières vasculaires et lymphatiques (Fidler IJ, 1990). Le rôle de l'AMF-R a été directement démontré dans ce processus lorsque des cellules traitées avec un anticorps monoclonal dirigé contre l'AMF-R ont subi une augmentation de leur motilité *in vitro* par rapport à des cellules traitées avec des anticorps contrôles. De plus ces mêmes cellules ont démontré une augmentation de leur motilité *in vivo*, mesurée par leur capacité de colonisation du poumon (Nabi et al., 1990; Watanabe et al., 1991a). Des cellules de choriocarcinome humain répondent à une stimulation d'AMF-R en augmentant leur motilité, suggérant l'importance du récepteur dans la motilité des cellules cancéreuses (Yelian et al., 1996). Une augmentation de l'expression de l'AMF-R est associée à plusieurs types de néoplasmes incluant les cancers de l'estomac (Hirono et al., 1996), de la vessie (Otto et al., 1997), de la peau (Timar et al.,

2002), du poumon (Kara et al., 2001; Takanami et al., 2002) et de l'œsophage (Maruyama et al., 1995). Ces résultats font de l'AMF-R un marqueur excellent pour le pronostic de ces néoplasmes (Takanami et al., 2001; Tamura et al., 2003). Récemment, une association directe AMF-R/cancer a été établie au niveau cellulaire lorsqu'une équipe a démontré que la surexpression d'AMF-R dans les fibroblastes NIH-3T3 induisait la transformation cellulaire (Onishi et al., 2003).

### **3- Le facteur autocrine de motilité (AMF)**

L'AMF, la PGI, la NLK et le facteur de maturation sont identiques et ces diverses appellations sont révélatrices des diverses fonctions glycolytiques, intracellulaires et cytokines exercées par cette molécule (Chaput et al., 1988; Faik et al., 1988; Watanabe et al., 1996; Xu et al., 1996). Les sections suivantes définiront les diverses appellations de la même molécule, et passeront en revue les résultats particuliers associés aux diverses fonctions de celle-ci.

#### **3.1 Définitions**

##### **3.1.1 Phosphoglucose isomérase (PGI)**

La PGI catalyse l'interconversion du fructose-6-phosphate et du glucose-6-phosphate. Une déficience de cette enzyme chez l'homme entraîne une anémie hémolytique congénitale associée à des dysfonctions neurologiques. De plus, les niveaux élevés de PGI dans le sérum sont utilisés comme marqueurs chez les

patients atteints de carcinomes colorectaux, mammaires, pulmonaires, rénaux et gastrointestinaux (Baumann et al., 1988; Baumann et al., 1990; Filella et al., 1991; Patel et al., 1995). Il existe aussi une corrélation entre l'activité de la PGI et le développement des métastases. Récemment, une équipe a montré cette association au niveau cellulaire en transfectant la PGI dans des fibroblastes NIH-3T3 de manière stable (Tsutsumi et al., 2003b). En effet, les cellules transfectées ont acquis un phénotype transformé, sont devenues plus motiles et résistantes à l'induction de l'apoptose.

### 3.1.2 Facteur autocrine de motilité (AMF)

L'AMF est décrite comme une cytokine de 55 kDa sécrétée par diverses cellules tumorales qui stimule leur motilité *in vitro* et leur capacité à coloniser les poumons *in vivo* (Nabi et al., 1990; Nabi et al., 1991). La motilité cellulaire est concrétisée via une transduction de signal (voir section 2.2) suite à la liaison de l'AMF à son récepteur l'AMF-R (Nabi et al., 1992).

### 3.1.3 Neuroleukine (NLK)

La NLK est un facteur de croissance de 56 kDa initialement identifié dans les glandes salivaires de souris (Gurney et al., 1986b) et homologue à l'enzyme musculaire phosphohexose isomérase (PHI) (Chaput et al., 1988; Faik et al., 1988). Ce facteur neurologique est responsable de la survie neuronale et de la

ramification du neurone à la jonction neuromusculaire (Gurney, 1984; Gurney et al., 1984; Gurney et al., 1986b). Une fonction lymphokine est aussi associée à cette molécule qui induit la sécrétion d'immunoglobulines par les cellules sanguines mononucléaires (Gurney et al., 1986a). Dans certains cas, une déficience de la PHI est associée à des dysfonctions neurologiques (Kugler et al., 1998; Leclerc et al., 2000).

#### 3.1.4 Facteur de maturation (MF)

MF médie la différenciation des cellules myéloïdes leucémiques en cellules terminales monocytiques. MF diminue le nombre des cellules en phase S et G2M prolifératives, le récepteur complémentaire acquis de la cellule monocytique mature, la capacité phagocytaire et la morphologie adhérente (Haga et al., 2000; Xu et al., 1996).

### 3.2 Une protéine multifonctionnelle

La double fonction de la PGI en tant qu'enzyme glycolytique et cytokine extracellulaire soulève la question essentielle de la relation entre ces deux fonctions. Les structures cristallographiques des formes de mammifère et bactérienne ont été déterminées et démontrent la conservation totale des résidus composant le site actif entre les espèces (Chou et al., 2000). Néanmoins, notre laboratoire a démontré que la PGI de forme bactérienne n'est pas internalisée par les cellules NIH-3T3 et que les PGI de levure et PGI bactérienne ne font pas

compétition avec la PGI de mammifère pour la liaison au récepteur et l'internalisation (Amraei and Nabi, 2002). Ces résultats démontrent que l'activité cytokine de la PGI est spécifique à la PGI de mammifère et que le site actif est insuffisant pour l'endocytose du récepteur et l'activité cytokine. Ces résultats ont été renforcés lorsqu'une autre équipe a démontré récemment, par mutagenèse spécifique, que l'activité cytokine de la PGI était indépendante de son activité enzymatique (Tsutsumi et al., 2003a). En effet, des formes mutantes à simple et double délétions ont été créées (CXC,CC) à partir du motif CXXC que contient la PGI en utilisant les acides aminés 331 et 332 de la forme humaine. Ce motif s'est avéré essentiel en ce qui concerne l'activité enzymatique de la protéine puisque les protéines mutées ont perdu leur activité d'isomérase, sans toutefois perdre leur activité cytokine, ni leur capacité de lier l'AMF-R. Toutefois, malgré la richesse des connaissances concernant les domaines spécifiques responsables de l'activité enzymatique de la PGI, la voie reste ouverte par rapport à l'étude des régions régulant son activité cytokine et sa liaison à son récepteur.

### **3.3 Implication dans divers processus cellulaires**

#### **3.3.1 Métastase**

Comme mentionné précédemment, l'implication de l'AMF dans les processus métastatiques est bien documenté. La motilité des cellules tumorales

régule l'invasion locale et la métastase à distance des lésions tumorales. L'AMF sert de marqueur de la progression tumorale de cancers malins tels que les mélanomes, les cancers rénaux, colorectaux, gastrointestinaux, de l'œsophage et des poumons (Haga et al., 2000). La surexpression de l'AMF dans les cellules NIH-3T3 entraîne un phénotype transformé se caractérisant par une motilité accrue et une résistance à l'apoptose (Tsutsumi et al., 2003b).

### 3.3.2 Angiogenèse

Des études *in vivo* ont démontré qu'une quantité physiologique d'AMF était suffisante pour induire une néovascularisation (Funasaka et al., 2001). L'angiogenèse est un processus cellulaire impliquant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. La croissance des tumeurs solides et la métastase dépendent de ce processus. Il a été démontré que l'AMF, sécrété par les cellules tumorales exerçait une régulation positive sur les récepteurs du VEGF, protéine impliquée de manière importante dans l'angiogenèse tumorale. Ces études confirment donc l'implication de l'AMF dans l'angiogenèse (Funasaka et al., 2002).

### 3.3.3 Apprentissage et mémoire

Les niveaux d'ARNm de la NLK et de son récepteur, la gp78, ont été augmentés de manière significative dans l'hippocampe de rats mâles de type Fischer-344, suite à des exercices d'apprentissage du labyrinthe Stone-T et du

labyrinthe d'eau Morris (Luo et al., 2002). Une augmentation a également été observée au niveau de l'expression protéique. Les niveaux d'ARNm et de protéines sont réduits comparativement aux contrôles (jeunes rats) lorsqu'on effectue les mêmes expériences avec des rats âgés démontrant plus de difficultés lors de l'apprentissage des mêmes tâches (Luo et al., 2002).

#### 3.3.4 Hypoxie

Une étude des gènes activés par l'hypoxie a identifié l'AMF comme étant un produit de l'un de ces gènes dans un modèle de cancer pancréatique humain (Yoon et al., 2001). Les régions tumorales hypoxiques sont généralement résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Cela identifie donc l'AMF comme étant une cible potentielle pour le diagnostic et le traitement du cancer dont celui du pancréas.

#### 3.3.5 Arthrite rhumatoïde

L'arthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire chronique des jointures menant à la destruction de l'architecture de celles-ci. Des études ont démontré que les autoanticorps à la PGI jouent un rôle actif de maintien de l'inflammation chez les patients atteints de cette maladie (Schaller et al., 2001).

#### 3.3.6 Anémie hémolytique non sphérolytique

L'anémie hémolytique non sphérolytique est associée à une déficience de la PGI/AMF/NLK causée par une hétérogénéité de mutations (Beutler et al.,

1997). Cette maladie peut parfois être associée à des problèmes neurologiques lorsque ces mutations causent un repliage incorrect de la protéine, affectant ses activités catalytiques et neurotrophiques (Kugler et al., 1998).

### 3.3.7 Développement et régénération osseuse

La neuroleukine a été isolée en tant que molécule importante exprimée lors de la différenciation des ostéoblastes. Des analyses d'ARNm ont démontré une expression temporelle de la NLK 3.5 fois plus grande relativement au contrôle lors de la formation de la matrice et de la minéralisation. Un haut niveau d'expression est également observé dans les ostéoblastes et les chondrocytes articulaires superficiels des os des souris normales âgées de un, quatre et huit mois. L'inhibition de l'AMF par l'acide 6-phosphogluconique a réduit la minéralisation des cellules MC3T3-E1. Ces résultats démontrent l'expression spécifique de la NLK dans certaines populations osseuses et impliquent un rôle de l'AMF dans le développement et la régénération osseuse (Zhi et al., 2001).

### 3.3.8 Apoptose

Récemment, une étude a démontré l'implication de l'AMF dans l'apoptose. En effet, l'AMF régulerait l'expression des gènes d'Apaf-1 et caspase-9, contribuant ainsi, de manière indirecte à la formation de l'apoptosome (Haga et al., 2003). Des études antérieures ont prédit cette fonction de l'AMF en montrant que des fibroblastes NIH-3T3 surexprimant AMF avaient acquis un

phénotype transformé et étaient devenues résistantes à l'apoptose (Tsutsumi et al., 2003b).

#### **4- Endocytose du complexe AMF/AMF-R**

L'internalisation des récepteurs et autres composantes de la surface cellulaire via la voie médiée par les vésicules de clathrine est bien connue. Les récepteurs internalisés sont acheminés aux endosomes précoces où ils sont triés soit pour être recyclés à la membrane plasmique, soit pour être ciblés aux endosomes tardifs et lysosomes pour fin de dégradation (Cavalli et al., 2001). Il y a de plus en plus de démonstrations que l'internalisation des récepteurs peut se faire via des voies indépendantes des clathrines. Des radeaux lipidiques formant des invaginations associées à la cavéoline, les cavéoles, médient l'endocytose de plusieurs sphingolipides et toxines liant les sphingolipides, de protéines ancrées au glycosylphosphatidylinositol, de l'AMF, de l'endothéline, de l'hormone de croissance, des récepteurs de l'IL-2, des virus et des bactéries (Nabi and Le, 2003). Il existe également une voie indépendante de la clathrine qui est la voie pinocytotique constitutive. Cette voie, contrairement à la voie des cavéoles, ne dépend pas de l'intégrité de la dynamine (Sabharanjak et al., 2002).

L'AMF-R lié à son ligand est internalisé via 2 voies différentes : celle des cavéoles et celle des vésicules de clathrine.

#### 4.1 Internalisation via la voie des cavéoles

La localisation de l'AMF-R au niveau des vésicules plasmalemmales, communément appelées cavéoles, a été démontrée dans les fibroblastes NIH-3T3 et dans les cellules Hela. En microscopie confocale, une colocalisation partielle est observée suite à un double marquage de l'AMF-R en surface à 4°C et de la cavéoline (Benlimame et al., 1998). Suite à une acidification du cytoplasme, qui inhibe la voie d'internalisation dépendante de la clathrine, bAMF internalisé se retrouve dans les structures tubulaires du REI marqués par l'AMF-R. De plus, la voie d'endocytose de l'AMF-R vers les tubules via les cavéoles est inhibée par la méthyl  $\beta$ -cyclodextrine (m $\beta$ CD), une drogue qui extrait le cholestérol et défait les cavéoles ou structures cavéolaires (Le et al., 2000; Rodal et al., 1999). Un marqueur reconnu des cavéoles pour les fibroblastes est la cavéoline-1 (Mundy et al., 2002). Toutefois, notre laboratoire a démontré que malgré les niveaux réduits ou pratiquement nuls de cavéoline, les cavéoles sont rapidement invaginées à la surface pour former des vésicules cavéolaires internalisant l'AMF-R destiné au réticulum endoplasmique lisse (Le et al., 2002). De plus, la fonction de la cavéoline-1 est de stabiliser les cavéoles à la surface, ralentissant de ce fait l'internalisation des vésicules cavéolaires contenant l'AMF-R. D'autres études ont démontré que des voies distinctes médiées par les cavéoles ciblent l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (Le and Nabi, 2003). En effet, l'endocytose de la choléra toxine (CTX) est inhibée par plusieurs traitements,

notamment la bréfeldine A, le nocodazole et une incubation à 20°C, sans toutefois que ces mêmes traitements affectent l'internalisation de l'AMF au réticulum endoplasmique. L'effet de l'inhibiteur de l'activité tyrosine kinase, la génistéine, sur les 2 voies confirment leur nature cavéolaire, étant donné que l'internalisation via les cavéoles est associée à l'activation de la tyrosine kinase.

#### **4.2 Internalisation dépendante de la clathrine**

L'acidification cytoplasmique à pH 5.5, mentionnée précédemment, n'a aucun effet sur l'internalisation de bAMF vers les tubules lisses d'AMF-R. Toutefois, l'endocytose de bAMF vers des structures ponctuelles périnucléaires est inhibée. Inversement, un traitement des cellules NIH-3T3 à la m $\beta$ CD, inhibe l'internalisation de bAMF vers les tubules lisses d'AMF-R sans affecter le marquage des structures ponctuelles périnucléaires. Ces expériences établissent une seconde voie d'endocytose médiée par les clathrines pour le complexe AMF/AMF-R (Le et al., 2000). Les structures ponctuelles dans lesquelles se retrouvent bAMF ne sont pas marquées par Tfr, un marqueur des endosomes précoces, ni par LAMP-1, un marqueur des endosomes tardifs et des lysosomes. Ces structures ont subséquemment été identifiées comme étant des CMV, un intermédiaire entre les endosomes précoces et tardifs. Le complexe est ensuite recyclé vers des structures fibrillaires à la surface cellulaire colocalisant avec la fibronectine. Ce recyclage vers les fibrilles de fibronectine pourrait être impliqué

dans la formation *de novo* des contacts focaux et le remodelage de la matrice extracellulaire nécessaires à la motilité.

## **5- Implication de l'AMF-R dans l'ubiquitination**

### **5.1 Dégradation associée au réticulum endoplasmique (ERAD)**

Le contrôle de qualité des protéines résultant à l'élimination des protéines mal repliées ou des sous-unités protéiques mal assemblées est un processus vital à la fonction cellulaire (Taxis et al., 2002). L'ubiquitination est caractérisée comme étant un joueur clé dans la dégradation protéosomale (Fang et al., 2003). Il est de plus en plus démontré que l'ubiquitination des protéines régule d'autres processus cellulaires, tels que : l'endocytose et le ciblage lysosomal, l'exportation nucléaire, la réparation de l'ADN, le remodelage de l'histone, l'activation de kinases et de facteurs de transcription, et les divers stages de la progression du cycle cellulaire et de la prolifération cellulaire (Pray et al., 2002). L'action séquentielle des enzymes activant (E1), conjuguant l'Ub (E2) et des ligases d'Ub (E3) assure le bon déroulement de ce processus cellulaire. Il existe 2 sous-classes protéiques de ligases E3 : les protéines contenant un motif particulier en forme de doigt appelés *RING finger*, et les protéines à domaine *HECT* (*homologous to E6-AP carboxy terminus*) (Pickart, 2001).

## 5.2 Rôle des protéines *RING finger*

Une astuce a été utilisée afin d'identifier les protéines E3 et de mieux caractériser leur rôle. La protéine E2 UbcH5B a été utilisée dans un test de dépistage hybride de la levure, afin d'identifier les protéines E3 qui pourraient potentiellement s'y lier. Une nouvelle protéine à fonction inconnue, AO7, fut identifiée. Elle contenait une séquence *RING finger* constituée de huit cystéines et histidines conservées responsables de la coordination de deux ions Zn. AO7 lie E2 *in vitro* et médie également sa propre ubiquitination. Si la séquence *RING finger* est mutée, cette fonction est perdue. Suite à cette expérience, plusieurs protéines contenant un motif *RING finger* ont été testées pour leur rôle dans l'ubiquitination. Le motif *RING finger* définit donc une famille de protéines médiant l'ubiquitination (Freemont, 2000).

### 5.2.1 Exemples de protéines *RING finger*

La banque de données protéiques indique plus de 300 protéines à motif *RING finger* (Fang et al., 2003). La protéine Cbl est reconnue pour jouer un rôle important dans la régulation par ubiquitination du récepteur de l'EGF (*epidermal growth factor*) (Haglund et al., 2002), du PDGF (*platelet derived growth factor*) (Miyake et al., 1999) et du CSF (*colony stimulating factor*) (Lee et al., 1999). Elle contient un domaine *RING finger* qui, lorsque muté ou délété, rend la protéine

oncogénique. Cbl fonctionne donc en médiant la polyubiquitination des récepteurs à activité tyrosine kinase.

L'extrémité N-terminale de la protéine suppresseur de tumeur BRCA1 contient un domaine *RING finger*. Les mutations dans ce domaine sont associées au cancer du sein et révèlent l'importance de l'activité E3 de cette protéine. Cette protéine forme un dimère avec BARD1, le complexe ubiquitinant d'autres substrats dont l'histone H2A(X) (Fang et al., 2003). CHIP (*carboxyl terminus of the Hsc70-interacting protein*) et Parkin sont deux exemples de ligases E3 cytoplasmiques jouant un rôle dans la dégradation des protéines non-membranaires. Ils sont responsables du ciblage des protéines spécifiques au ERAD (Fang et al., 2001). L'AMF-R est le seul exemple connu de ligase E3 présente dans le réticulum endoplasmique de mammifère.

### 5.2.2 Substrats ubiquitinés via AMF-R

L'AMF-R est une ligase E3 ayant pour substrat CD3- $\delta$ , la sous-unité du récepteur des cellules T qui est un substrat de la dégradation associée au RE bien caractérisé *in vitro* (Fang et al., 2001). L'AMF-R est aussi responsable de sa propre ubiquitination. De plus, des études récentes ont démontré que la surexpression d'AMF-R dans les cellules HepG2 entraînait une augmentation de l'ubiquitination ainsi qu'une diminution de la sécrétion de l'apolipoprotéine B100 (Liang et al., 2003a).

## **6- Interaction du RE lisse avec la mitochondrie**

### **6.1 Association réticulum endoplasmique/mitochondrie**

L'association du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie a été observée dans plusieurs types cellulaires, notamment en microscopie électronique et en fractionnement cellulaire où une fraction contenant les deux organites a été identifiée (Franke and Kartenbeck, 1971; Montisano et al., 1982; Morre et al., 1971). De plus, des fractions nommées *MAM* (membranes associées aux mitochondries) dérivant du RE sont impliquées dans le transfert des lipides entre les deux organites (Vance, 1990). Ces contacts étroits ont également été observés *in vivo* en fluorescence dans les cellules Hela (Rizzuto et al., 1998).

### **6.2 Rôle du calcium dans les processus mitochondriaux.**

L'interaction du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie s'avère nécessaire par rapport à la régulation et la séquestration du calcium cytosolique (Berridge, 2002). L'activation des récepteurs de l'IP3 relâche le calcium qui par la suite se concentre aux sites de contact RE/mitochondrie, ce qui par conséquent augmente le niveau de calcium mitochondrial. La mitochondrie peut ensuite procéder à ses diverses fonctions telles que le contrôle de l'énergie métabolique via la synthèse d'ATP, l'apoptose et la formation des signaux calciques (Pacher et al., 2000). Par exemple, des études ont démontré que la surexpression de Bcl-2, une protéine mitochondriale oncogénique anti-apoptotique, réduit la

concentration du calcium du RE (Pinton et al., 2001). D'autres études ont révélé que BAX et BAK, des protéines mitochondriales pro-apoptotiques, exercent leur mécanisme d'action via la régulation du niveau de calcium dans le RE (Scorrano et al., 2003). Ces résultats soulignent la relation étroite du calcium dans les rapports entre RE et mitochondrie.

### **6.3 AMF-R et la mitochondrie**

Il a été démontré en IF que les tubules lisses d'AMF-R et la mitochondrie sont étroitement associés. De plus, cette association est régulée par le niveau de calcium cytosolique, un haut niveau facilitant l'association des deux organites et subséquemment l'emmagasinage de calcium dans la mitochondrie (Wang et al., 2000). Des études récentes ont établi une régulation de protéines mitochondriales impliquées dans l'apoptose, Apaf-1 et caspase-9, par l'AMF et suggèrent une fonction nouvelle à l'association AMF-R/mitochondrie (Haga et al., 2003).

## OBJECTIFS DE RECHERCHE

L'AMF-R et son ligand étant surexprimés dans plusieurs types de cancer, le but premier de cette étude était de mimer les conditions de surexpression dans la cellule et de caractériser ses effets. Pour ce, nous avons ajouté un épitope FLAG dans un plasmide contenant un promoteur CMV pour assurer la surexpression. De plus, étant capable de le différencier de la protéine endogène, ce FLAG-AMF-R allait s'avérer être un outil important pour d'autres études telles que la biosynthèse du récepteur, sa glycosylation etc.

La distribution cellulaire de l'AMF-R exogène différant de l'AMF-R endogène nous a menés à entamer une étude plus poussée afin de caractériser l'association AMF-R/mitochondries (cette association étant maintenue dans les cellules non-transfectées) et sa localisation intracellulaire ainsi qu'à la membrane plasmique.

Nous avons également voulu vérifier l'état d'ubiquitination de la protéine, sachant que l'AMF-R est exprimé aux niveaux de la membrane plasmique et du réticulum endoplasmique. De plus, nous avons voulu vérifier le rôle du protéasome dans la distribution cellulaire et l'expression de la protéine transfectée, grâce à des traitements utilisant la lactacystine, un inhibiteur du protéasome.

Divers témoins ont été utilisés, notamment l'usage de diverses lignées cellulaires afin d'assurer la fiabilité des résultats.

## Article

Cet article intitulé :

**Expression and ubiquitination of autocrine motility factor receptor and its impact on integrity of the smooth endoplasmic reticulum**

sera soumis pour publication au journal *FEBS letters*.

**Expression and ubiquitination of autocrine motility factor receptor and its impact on integrity of the smooth endoplasmic reticulum**

Marilyn REGISTRE<sup>1</sup>, Hao PANG<sup>1</sup>, Michel BOUVIER<sup>2</sup> and Ivan R. NABI<sup>1</sup>

Département de pathologie et biologie cellulaire<sup>1</sup>, Department of Biochemistry and Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome<sup>2</sup>, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada H3C 3J7

Corresponding author :

Dr. Ivan R. Nabi

Département de pathologie et biologie cellulaire

Université de Montréal

C. P. 6128, succursale A

Montréal, Québec

Canada H3C 3J7

Tel. : (514) 343-6291

Fax : (514) 343-2459

E-mail : [ivan.robert.nabi@umontreal.ca](mailto:ivan.robert.nabi@umontreal.ca)

## **Abstract**

AMF-R (autocrine motility factor receptor) is a 78 kD heterotrimeric, seven-transmembrane domain G-protein coupled receptor for the autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase cytokine that has been identified as a ubiquitin E3 ligase. Immunofluorescence labeling of Cos-7 cells transiently transfected with FLAG-AMF-R shows increased labeling with anti-AMF-R antibodies and partial colocalization of the anti-FLAG and anti-AMF-R labels to a calnexin-negative compartment apparently equivalent to the smooth endoplasmic reticulum (ER). FLAG-AMF-R is also localized to the calnexin-positive AMF-R-negative rough ER, reflecting perhaps the expression of a misfolded form of the protein retained in the rough ER. FLAG-tagged AMF-R is expressed as a 78 kD protein that comigrates with endogenous AMF-R and is recognized by anti-AMF-R antibody. A high molecular weight 250 kD protein is also detected with anti-FLAG antibody at longer transfection times but is not labeled with anti-AMF-R antibody. FLAG-AMF-R is labeled for ubiquitin as a smear of proteins corresponding either to polyubiquitinated forms of AMF-R or co-immunoprecipitated ubiquitinated AMF-R substrates. Cell treatment with lactacystin, a proteasome inhibitor, resulted in increased expression of the 78 kD band of FLAG-AMF-R and prevented FLAG-AMF-R degradation in the presence of the protein synthesis inhibitor cycloheximide. Lactacystin treatment also resulted in the increased colocalization of anti-FLAG and anti-AMF-R labels to smooth ER tubules. These results therefore demonstrate the important role of ubiquitination and proteasome-mediated degradation in expression of AMF-R.

## **Introduction**

The specific degradation via ubiquitination of regulatory proteins is crucial to many processes, including receptor down-regulation, signal transduction and cell-cycle progression (Hershko and Ciechanover, 1998). Ubiquitination occurs through the actions of 3 categories of proteins: Ub activating enzymes (E1); Ub conjugating enzymes (E2), and Ub protein ligases (E3) (Fang et al., 2003; Pray et al., 2002). It is generally accepted that ubiquitination of cytosolic proteins and endoplasmic reticulum membrane proteins serves as a recognition tag for degradation by the proteasome, as opposed to a targeting role in the endocytic pathway when it is done at the plasma membrane (Shih et al., 2000). Several cell surface proteins in mammalian cells have been shown to depend on ubiquitin for their internalization. Many growth factor receptors require the Cbl protooncogene, a ubiquitin ligase in order to properly carry their ubiquitination and subsequent internalization. Many growth factor receptors require the Cbl protooncogene, a ubiquitin ligase in order to properly carry their ubiquitination and subsequent internalization. The function of mono-ubiquitination in the cell is not totally understood but studies have shown it to play roles in endocytosis and trafficking, particularly in the transfer of proteins to internal vesicles of the multivesicular body from which they are targeted for lysosomal degradation (Polo et al., 2002; Sachse et al., 2001; Shih et al., 2000).

The cytoplasmic domain of autocrine motility factor receptor, AMF-R, contains Cue and RING-finger domains (Biederer et al., 1997; Ponting, 2000) and AMF-R has been identified as an E3 ubiquitin protein ligase (Fang et al., 2001;

Fang et al., 2003). The E3 function of AMF-R has been shown to regulate expression of the T cell receptor and apolipoprotein B (Fang et al., 2001). Expression of AMF-R is associated with acquisition of metastatic and motile attributes in tumor cells of various origins (Hirono et al., 1996; Kara et al., 2001; Maruyama et al., 1995; Nabi et al., 1992; Otto et al., 1997; Silletti and Raz, 1996; Tamura et al., 2003; Timar et al., 2002). Overexpression of AMF-R in NIH-3T3 cells has been shown to induce cellular transformation and tumorigenicity (Onishi et al., 2003). Curiously, AMF-R is expressed at the cell surface but also within a mitochondria-associated smooth subdomain of the endoplasmic reticulum (Benlimame et al., 1995; Wang et al., 1997; Wang et al., 2000). AMF-R is localized to cell surface caveolae and upon AMF activation, a caveolae/raft-dependent pathway internalizes the AMF/AMF-R complex directly to the ER (Benlimame et al., 1998; Le et al., 2002; Le and Nabi, 2003). Clathrin-mediated endocytosis of AMF targets it to multivesicular bodies and recycling to fibronectin fibrils, a process that might be involved in remodeling of the extracellular matrix during cell motility (Le et al., 2000; Silletti et al., 1998).

In order to better study the complex cell biology of AMF-R, we expressed a FLAG-tagged version of the protein. We show here that the full-length AMF-R is monoubiquitinated and that its overexpression disrupts the mitochondrial association of the smooth ER. These results support a role for ubiquitination and the E3 ligase function of AMF-R in regulating the expression of this receptor and its function in tumorigenesis.

## **Materials and Methods**

### Antibodies and reagents

A rat monoclonal antibody anti-AMF-R antibody was used in the form of concentrated hybridoma supernatant (Nabi et al., 1990). Mouse anti-FLAG and rabbit anti-calnexin antibodies were purchased from Sigma (Oakville, ON). Other antibodies: anti-hsp70 mitochondrial antibody (Affinity Bioreagents Inc), anti-caveolin (Sigma), anti-gfp (Clontech), anti-tubuline (Sigma). Alexa-488- and 647-conjugated secondary antibodies were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR) and rhodamine-red-X anti-rat IgM secondary antibody from Jackson Immunoresearch Laboratories (West Grove, PA). Lactacystin was purchased from Sigma (Oakville, ON). Tris and glycine reagents were purchased from ICN Biomedicals (Aurora, OH). Complete-Mini protease inhibitor tablets were purchased from Roche Diagnostics, Airvol from Air Products and Chemicals (Allentown, PA) and Prestained Kaleidoscope molecular weight markers from BioRad.

### Constructions

The 1.9-kb open reading frame of mouse AMFR, kindly provided by Avraham Raz (Karmanos Cancer Institute, Detroit), was inserted into pcDNA 3.1 via the vector's EcoR1 restriction site. To generate N-terminal FLAG-tagged AMFR, oligonucleotides, containing the FLAG sequence (gac tac aag gac gac gat gac aag) and the first amino acids of the AMFR coding sequence, were inserted into the plasmid using BamH1 (upstream of the start codon of AMFR) and

Eco47III (downstream of start codon of AMFR) restriction sites to generate an N-terminally FLAG-tagged AMFR sequence. The AMF-R sequence, inserted into a C-terminal GFP plasmid (Clontech) was kindly provided by Hao Pang. Constructs were confirmed by sequencing.

#### Cell culture and transfection

Cos-7, MDCK and HT-1080 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, vitamins, non-essential amino acids, glutamine and penicillin-streptomycin antibiotics (Canadian Life Technologies) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. NIH-3T3 cells were grown in same conditions except for the replacement of 10% fetal bovine serum with 10% calf serum. 2 and 10 µg of FLAG-AMF-R were transfected respectively into Cos-7 cells using 7 and 28 ul of Perfectin Reagent (Interscience) for 35 mm dishes (immunofluorescence, IF) and 100 mm dishes (Western blot, WB and immunoprecipitation, IP). Same conditions were used for other cell lines. 50 000 cells were plated for 24 hours on coverslips in 35 mm dishes. Cells were then transfected, and 24 hours later, new media containing 10 µM lactacystin and/or 100 µg/ml cycloheximide, was added to the cells. For WB, 250 000 cells were plated with duration of treatments with lactacystin and/or cycloheximide indicated. For IP, 250 000 cells were plated as well.

### Immunofluorescence labeling

Following treatment, cells were fixed and permeabilized with precooled (-80°C) methanol/acetone (MeOH/Ac) for 15 minutes at -20°C. The cells were then labeled for AMF-R, calnexin, and the FLAG tag with appropriate primary antibodies and Alexa-488, rhodamine red-X or Alexa-647-conjugated secondary antibodies, as indicated. Other labelings with other antibodies were performed under the same conditions. All washings and incubations with both primary and secondary antibodies were done with PBS/CM/BSA. After labeling the coverslips were mounted in Airvol. Fluorescently labeled cells were visualized with a Leica TCS-SP1 confocal microscope using 63× or 100× planapochromat objectives.

### Cell lysates and Western Blots

For preparation of cell lysates, cell monolayers were washed three times with ice-cold PBS/CM and harvested by scraping. Cell pellets were resuspended in 200  $\mu$ l of lysis buffer consisting of PBS containing 1% SDS, 1mM EDTA and Complete-Mini protease inhibitor tablets. Cells were lysed for 20 min on ice and DNA was then broken by sonication. The cell lysates were then centrifuged at 15,000 rpm for 5 minutes and the recovered supernatant assayed for protein concentration using the BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL). 30  $\mu$ g of protein were analyzed by SDS-PAGE.

Samples were separated on 9% SDS-PAGE gels and blotted to nitrocellulose membranes using a Mini-Protean apparatus (BioRad Labs, Mississauga, ON). The blots were blocked with 5% skim milk in PBS, incubated

with the appropriate primary antibodies and secondary antibodies, conjugated to horseradish peroxidase. The labeled bands were revealed by chemiluminescence using preflashed Kodak X-Omat film.

#### FLAG immunoprecipitation

Cos-7 cells were washed with ice-cold PBS buffer, sonicated in 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2mM EDTA, Complete-Mini tablets and centrifuged for 30 min at 20K at 4°C. Pellets were washed twice ( 20 min, 20K), solubilized in 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2mM EDTA, Complete-Mini tablets, 0.5% DDM, 140 mM NaCl using a syringe and 26G needle for resuspension, and put on a rotating platform for 60 min at 4°C. Samples were then cleared by centrifugation for 60 min at 40 K and supernatants added to the anti-FLAG resin (Sigma) that was pre-washed in 0.1 M glycine pH 3.5 and 0.25 M Tris pH 7.4. After overnight incubation at 4°C on a mixer, the beads were washed two times in solubilization buffer, four times in same buffer containing 0.1% DDM and once without detergent. Immunocomplexes were removed from beads by adding Laemmli sample buffer at room temperature. Samples were then heated at 95°C for 3 min prior to separation on a 9% SDS-PAGE

## Results

### Expression and ubiquitination of FLAG-AMF-R

Transient transfection of Cos-7 cells with FLAG-AMF-R resulted in an increase of labeling with anti-AMF-R antibody 24 hours post-transfection when compared to adjacent untransfected cells (Fig.1). The anti-AMF-R is a conformational specific antibody capable of stimulating cell motility and competing with AMF for receptor binding (Nabi et al., 1990). Increased recognition of transfected cells with the anti-AMF-R monoclonal therefore indicates that AMF-R-FLAG expression is associated with increased expression of AMF-R.

Immunoprecipitation of the FLAG-AMF-R protein from transfected Cos-7 cells also revealed that FLAG-AMF-R is recognized by the anti-AMF-R antibody, and that it co-migrates with the endogenous protein at the appropriate molecular weight of ~78 kD (Fig.2). The bands are specific as they are not seen in untransfected cells where the minimal exposure due to the high expression levels of transfected AMF-R limits detection of the endogenous protein. The FLAG-IP and AMF-R probed blots also shows a specific band that migrates slightly slower than the characteristic ~78 kD band and that might correspond to a phosphorylated form of AMF-R (Watanabe et al., 1991). Higher molecular weight bands (~200 kD) recognized by anti-FLAG immunoblotting are not recognized by the AMF-R antibodies and might represent misfolded complexes of AMF-R. When probed with antibodies to ubiquitin, the 78 kD band is

distinctly labeled suggestive of monoubiquitination of the protein. Multiple higher and lower MW bands that are not labeled with anti-FLAG or anti-AMF-R are also labeled with anti-ubiquitin antibodies and might represent substrates of the AMF-R E3 ligase that co-immunoprecipitate with FLAG-AMF-R.

Treatment of the FLAG-AMF-R transfected cells with cycloheximide, a protein synthesis inhibitor, at different time points, resulted in the reduced amount of the 78 kD FLAG-AMF-R protein over a period of 8 hours (Fig. 3). Expression levels measured from multiple experiments show that FLAG-AMF-R expression was reduced by approximately 50% after 8 hours of cycloheximide treatment suggesting that half-life of AMF-R is in the order of 6-8 hours. Treatment of cells with the proteasome inhibitor, lactacystin alone, had no significant effect on the degradation of the protein (protein synthesis accountable for the increase). However, incubation of the cells with both cycloheximide and lactacystin prevented the degradation of FLAG-AMF-R indicating that inhibition of the proteasome impacts on AMF-R expression levels. In the untreated conditions, we observe a steady-state level for the amount of protein of FLAG-AMF-R because of its more rapid degradation compensating for the increased protein synthesis with time.  $\beta$ -actin increases because protein synthesis is not inhibited. When treating the transfected cells with cycloheximide, a protein synthesis inhibitor, both proteins show decreased amount with increasing times, as one would expect. When the cells are treated with lactacystin, a proteasome inhibitor, AMF-R degradation is stopped, therefore allowing to see the increase of the amount of protein with time as protein synthesis goes along. Finally, when

treating the cells with both a protein synthesis inhibitor and a proteasome inhibitor, AMF-R comes back to a steady-state level because of the competing effects of protein synthesis inhibition and degradation inhibition.

### **Overexpression of AMF-R disrupts the integrity of the smooth ER**

Further analysis of FLAG-AMF-R distribution by immunofluorescence showed that the intense perinuclear labeling labeled detected by anti-FLAG antibodies but not anti-AMF-R antibodies is also labeled with antibodies to the rough ER marker calnexin and likely corresponds to incompletely folded protein stuck in the ER. Furthermore, even though the AMF-R labeling was definitely more intense in transfected cells than in adjacent non-transfected cells, it no longer presented the typical mitochondria-associated tubular distribution and only partially colocalized with anti-FLAG labeling. However, the pattern of FLAG labeling changed when transfected cells are treated with 10  $\mu$ M lactacystin for 10 hours (Fig. 4). The extent of colocalization of FLAG and AMF-R labels increases and presents a tubular pattern that more closely resembles the smooth ER AMF-R distribution in untransfected cells (see Figure 1). Inhibition of proteasome degradation therefore appears to affect the distribution of the FLAG-AMF-R in the smooth ER and accessibility of the protein to labeling with anti-FLAG antibodies.

To better study the influence of the expression of FLAG-AMF-R and its distribution to the smooth ER, untransfected and transfected cells were labeled for AMF-R and mitochondrial Hsp70. As seen in Figure 5A, the extensive overlap of the AMF-R label with mitochondria observed in untransfected cells is completely

disrupted in transfected cells. The same result is also seen with AMF-R-GFP (Fig.5B, bottom). AMF-R is normally localized to cell surface caveolae, (Benlimame et al., 1998) but the redistributed FLAG-AMF-R label does not colocalize with caveolin (Fig. 5B). It does however align with microtubules labeled with antibodies to tubulin indicating that the altered AMF-R distribution is cytoplasmic (Fig.5B). Overexpression of AMF-R therefore disrupts the association of AMF-R-labeled smooth ER with mitochondria and facilitates its extension along microtubules.

In order to ensure that the effect was specific and not due to the COS-7 expression system or the FLAG epitope or the position of the epitope (N-terminal vs C-terminal), we transfected NIH-3T3, MDCK and HT-1080 cells with AMF-R-GFP. In all cases, the transfected cells presented a dispersal of the smooth ER that no longer presented the mitochondria-associated tubular distribution seen in untransfected cells (Fig. 6). The altered distribution of AMF-R in transfected cells is therefore specific and due to overexpression of AMF-R.

## Discussion

This study suggests the monoubiquitination of AMF-R as well as a role for the proteasome in expression and distribution of the protein. Antibodies to AMF-R recognize primarily a single band of 78 kD (gp78) and the demonstration here that this band is recognized by antibodies to ubiquitin argues that it corresponds to a monoubiquitinated form of the protein. The 78 kD band corresponds to the major form of endogenous AMF-R and of exogenous FLAG-tagged AMF-R arguing strongly that AMF-R may be constitutively ubiquitinated and likely monoubiquitinated. Monoubiquitination usually increases the MW of a protein by 8.6 kD (Klapisz et al., 2002), which is not what we observe with the data. Monoubiquitination was therefore assessed based only upon the labeling with anti-ubiquitin of the 80 kD band. To consolidate this result, we could perform experiments with transfected cells where immunoprecipitation is done with anti-ubiquitin and then blots would be revealed with anti-AMF-R and anti-FLAG antibodies. Immunoprecipitating with anti-AMF-R is not possible for the moment because of the lack of a polyclonal antibody. Also, another experiment could be done where co-transfection of tagged ubiquitin (with a different epitope) and FLAG-AMF-R would more easily allow for detection of mono and polyubiquitinated forms of AMF-R that are easily degraded. AMF-R cytoplasmic domain contains both RING finger and Cue domains and expresses ubiquitin E3 ligase activity that may be responsible for its self-ubiquitination (Fang et al., 2001).

FLAG-AMF-R is expressed and folds as native AMF-R based on the ability of the anti-AMF-R antibody (Nabi et al., 1990) to recognize immunoprecipitated FLAG-AMF-R and on the increased AMF-R labeling observed in transfected cells. Higher molecular weight forms of transfected FLAG-AMF-R were detected with anti-FLAG antibodies, as previously reported (Fang et al., 2001), but not with anti-AMF-R antibodies. Furthermore, extensive FLAG labeling colocalized with calnexin in the rough ER that was not recognized by anti-AMF-R. This labeling may represent the high molecular weight forms of AMF-R recognized by anti-FLAG antibodies, particularly in cells cultured for 48 hours, and that correspond to misfolded oligomers unable to exit the ER following overexpression due to transfection. Similarly, overexpression of AMF-R following tumorigenesis may also result in the accumulation of large amounts of misfolded AMF-R in the rough ER. It is however important to note that the anti-AMF-R antibody, used extensively for the study of AMF-R expression and as a marker for tumor malignancy (Hirono et al., 1996; Otto et al., 1997), selectively recognizes correctly folded forms of AMF-R. The increased expression of AMF-R detected with this antibody that correlates with malignancy of various tumors corresponds specifically to the expression of correctly folded, and presumably active forms of the receptor.

Fang and al. (2001) reported that the distribution of transfected AMF-R was localized to the endoplasmic reticulum because of its extensive colocalization with 2 different E2s, MmUBC6 and MmUBC7, that associate with the ER membrane and were unable to detect a smooth ER distribution of the protein.

Considering the inability shown here of anti-AMF-R antibody to recognize rough ER localized FLAG-AMF-R and the extensive rough ER distribution of FLAG-AMF-R, transfected AMF-R constructs will necessarily exhibit a predominantly rough ER distribution. Only correctly folded forms of the receptor appear to be localized to the smooth ER. The extensive previous studies that have used the anti-AMF-R antibody to characterize the mitochondria-associated smooth ER (Benlimame et al., 1998; Benlimame et al., 1995; Wang et al., 1997) are therefore detecting only correctly folded and, potentially, active forms of the receptor. Interaction of the AMF-R labeled smooth ER and mitochondria is regulated by calcium and may play a role in cellular calcium homeostasis (Wang et al., 2000). The demonstration here that overexpression of AMF-R disrupts this interaction argues that increased expression of AMF-R during tumor progression may impact on the ability of the cell to regulate its cytosolic calcium and contribute to tumor progression by deregulating calcium based intracellular signaling.

Interestingly, although transfection of FLAG-AMF-R resulted in increased labeling with the anti-AMF-R antibody and disruption of the distribution of the endogenous AMF-R labeled smooth ER, antibodies to the N-terminal FLAG were unable to detect part of the redistributed FLAG-AMF-R. The lack of colocalization between the FLAG and AMF-R suggests that the AMF-R that is associated with the smooth ER undergoes conformational changes that limits accessibility of its N-terminal extracellular domain. The lack of colocalization of the FLAG and AMF-R labels could be rectified by treatment

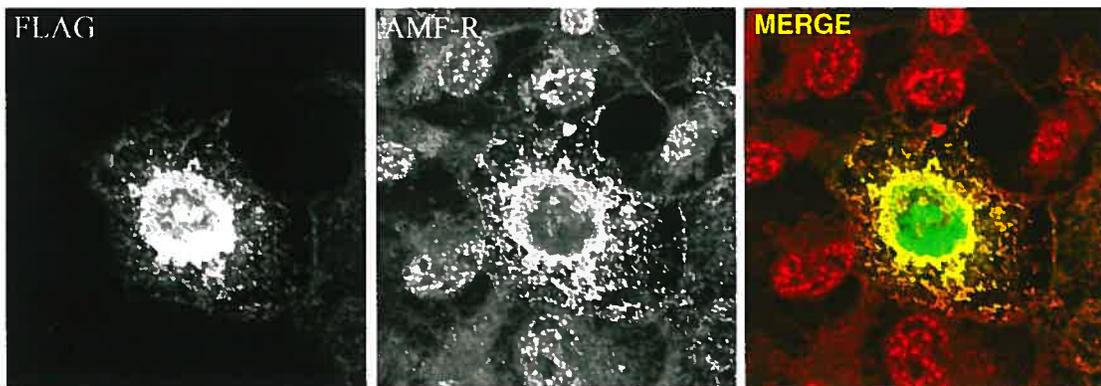
with lactacystin implicating proteasome mediated degradation in the regulation of AMF-R expression.

The ability shown here of lactacystin to prevent AMF-R degradation confirms previous results with MG132 (Fang et al., 2001) and argues that AMF-R delivery to the smooth ER may function to target the protein for degradation via ERAD. It will be interesting to investigate in the future whether monoubiquitination of AMF-R occurs at the plasma membrane, and if so, determine its role in determining the endocytic pathway followed by AMF-R and potentially its fate upon arrival to the multivesicular body. Fig.2 also shows a smear of ubiquitinated proteins that might represent coimmunoprecipitating AMF-R substrates. Future directions will certainly involve identifying these various interacting molecules, through proteomics as they might be potential E2 targets for anticancer therapy (Pray et al., 2002). These data demonstrate that AMF-R is ubiquitinated and regulated by the proteasome and future perspectives will include better understanding of how its ubiquitination affects its behavior with regards to metastasis and its trafficking in the cell.

### **Acknowledgements**

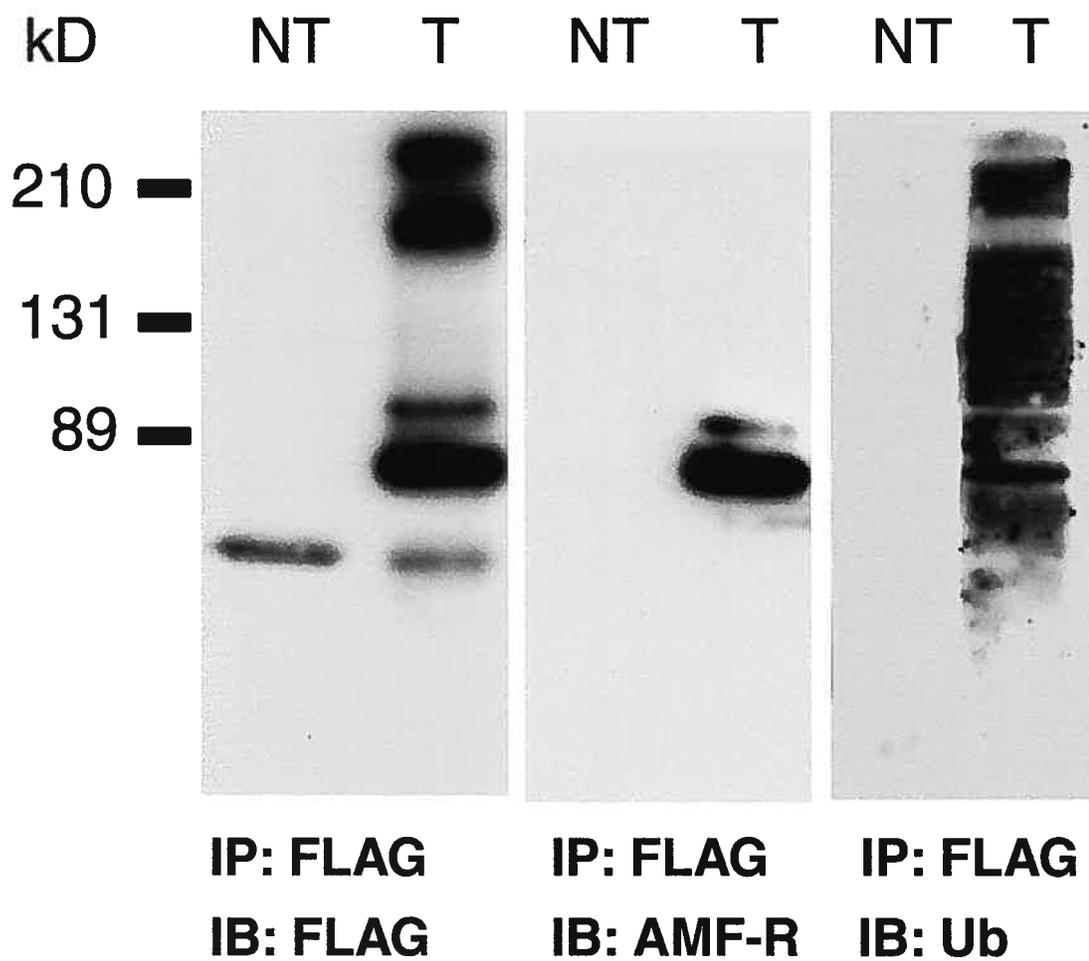
Special thanks are given to Dr Monique Lagacé (Dr Bouvier's lab) for her technical advices in realizing the constructs.

**Figure 1: The FLAG-AMF-R transfected cell is more strongly labeled with anti-AMF-R antibody than the untransfected cells surrounding it.** Cos-7 cells were transfected with 2 $\mu$ g FLAG-AMF-R plasmid per dish. Cells were MeOH/Acetone fixed 24 hours post-transfection and were labeled with mouse anti-FLAG and rat 3F3A (anti-AMF-R) antibodies, and Alexa488-conjugated anti-mouse and Alexa594 anti-rat IgM antibodies. AMF-R distribution and FLAG labeling were visualized by confocal microscopy.



**Figure 1**

**Figure 2: FLAG-AMF-R co-migrates with endogenous AMF-R and the full-length protein is ubiquitinated.** FLAG-AMF-R was immunoprecipitated from 36 hours transfected and untransfected cells, using an antibody against the FLAG epitope. Cells were lysed and Western blots were labeled with anti-FLAG, anti-AMF-R and anti-Ubiquitin antibodies.

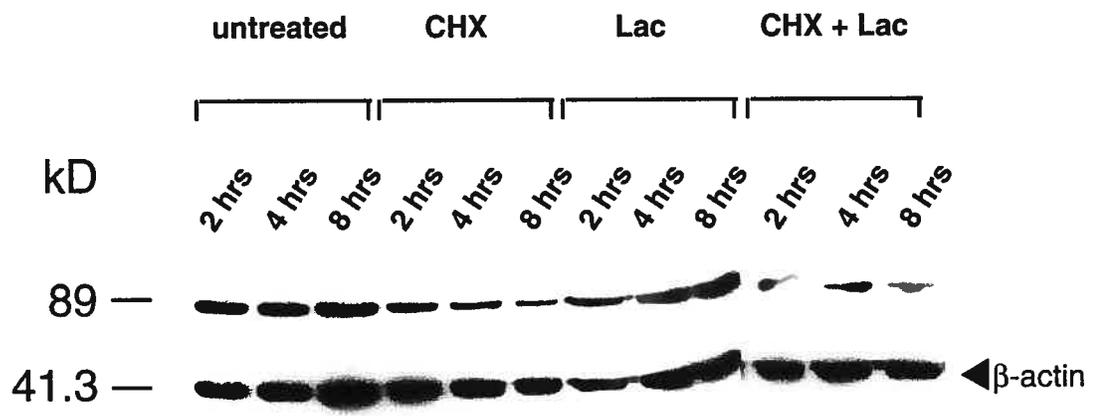


NT: untransfected  
T: transfected

**Figure 2**

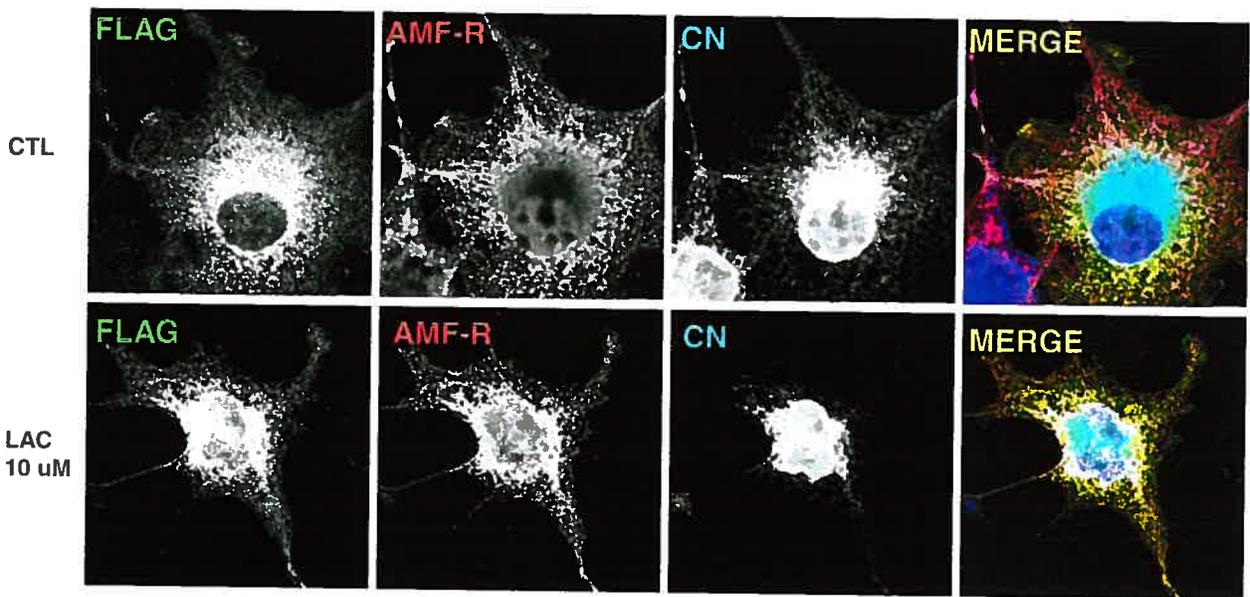
**Figure 3: Lactacystin, a proteasome inhibitor, prevents AMF-R degradation.**

Cells were transfected with FLAG-AMF-R for 30 hours, condition in which the high MW band expression is minimal. They were then treated with either 100  $\mu$ g/ml of CHX or 10  $\mu$ M of lactacystin alone or with a combination of both drugs for the indicated times. Total cell lysates were run on SDS-PAGE and blots were probed with anti-FLAG antibody.  $\beta$ -actin was used as a control.



**Figure 3**

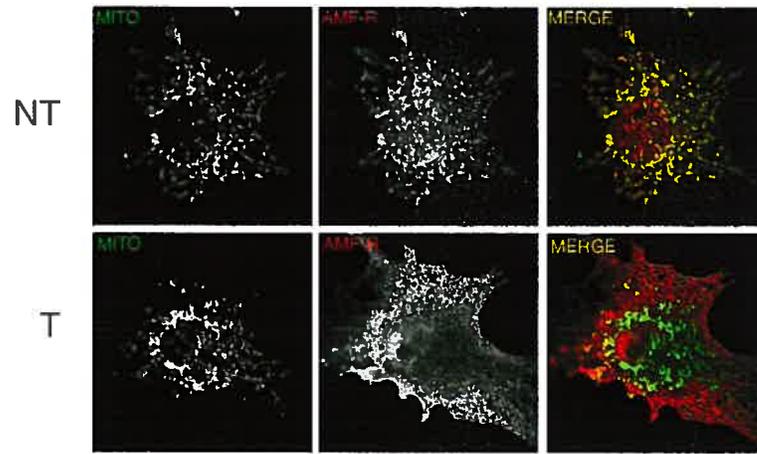
**Figure 4: Lactacystin treatment increases colocalisation of FLAG-AMF-R with structures labeled by anti-AMF-R antibody, confirming proteasomal involvement in AMF-R degradation.** Transfected cells were untreated, or treated with lactacystin 10  $\mu$ M for 10 hours, fixed and triple-labeled for FLAG or GFP, AMF-R and calnexin. Control cells show partial colocalisation (yellow merge) of the tag (FLAG or GFP) in green with AMF-R in red.



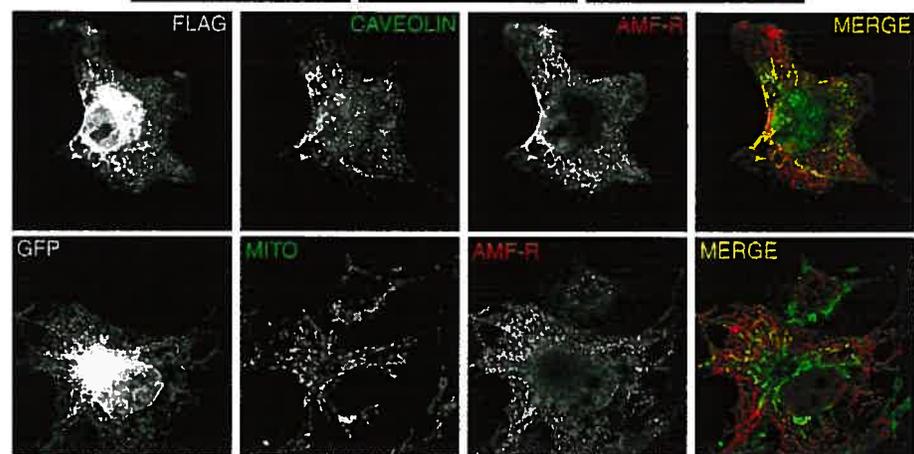
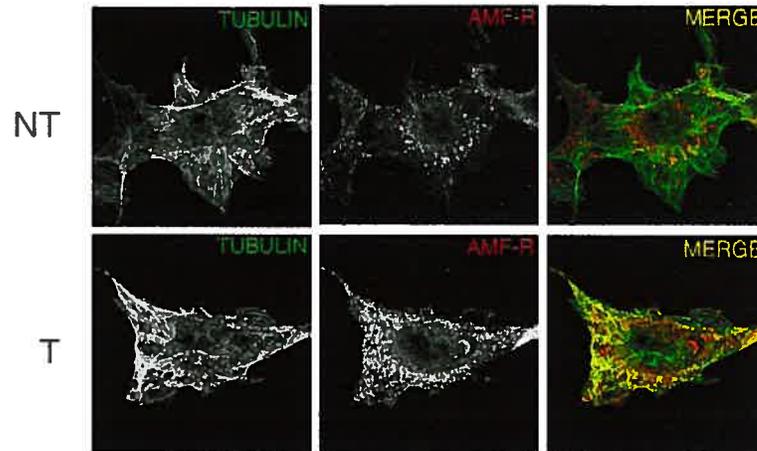
**Figure 4**

**Figure 5: Overexpression of intracellular AMF-R disrupts the mitochondria-smooth ER association.** A. Cos-7 cells untransfected, or transfected were fixed and double-labeled for mitochondrial hsp-70 (mito) and AMF-R. Control cells show complete colocalization (yellow merge) of mitochondria in green with AMF-R in red whereas lack of colocalization is observed in transfected cells. B. Untransfected and FLAG-AMF-R transfected cells were fixed and double-labeled for tubulin and AMF-R. Control cells show no colocalization whereas transfected cells exhibit partial colocalization of the two labels suggesting an intracellular labeling. FLAG-AMF-R transfected cells were fixed and triple-labeled for FLAG, caveolin and AMF-R. Lack of colocalization of AMF-R with caveolin confirms results obtained with tubulin. Bottom series of images show similar results for a GFP tag compared to a FLAG tag with respect to mitochondria-smooth ER association. A dissociation is observed.

**A.**

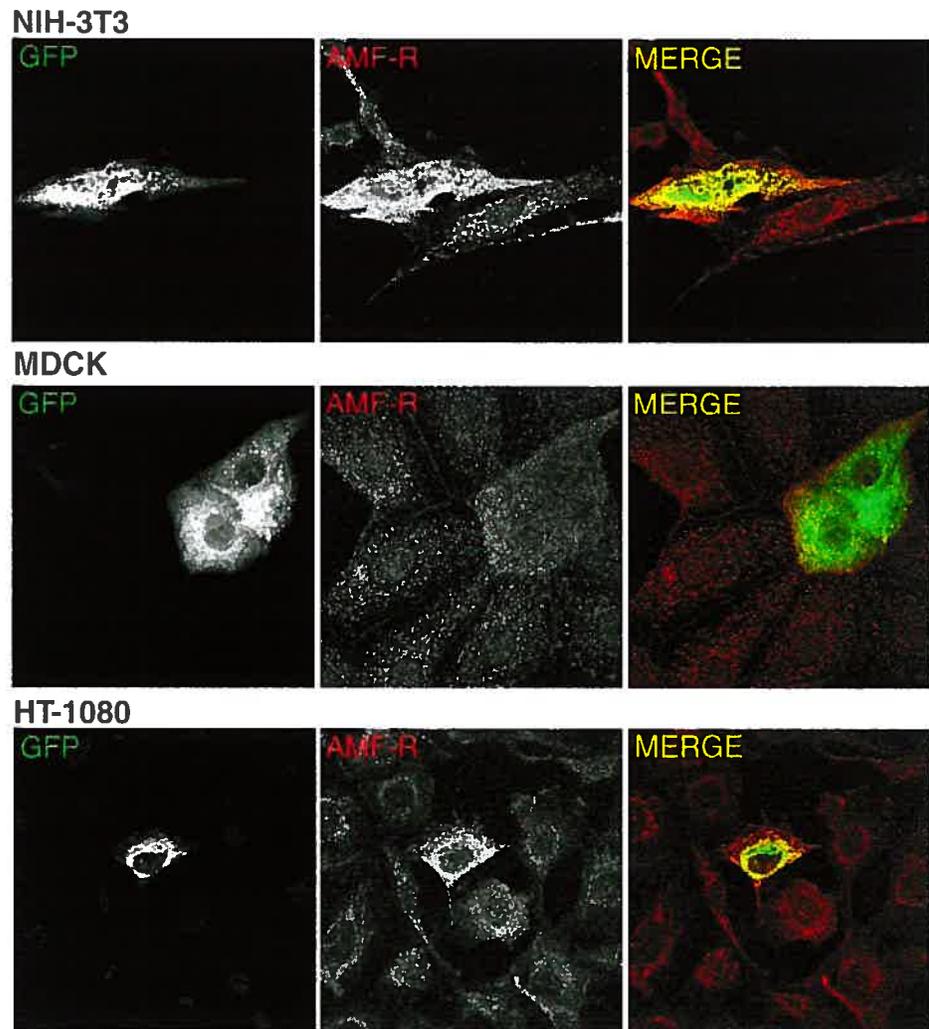


**B.**



**Figure 5**

**Figure 6: Overexpression of AMF-R disrupts the smooth ER distribution in other cell lines.** A. NIH-3T3, MDCK and HT-1080 untransfected, or AMF-R-GFP transfected cells were fixed and double-labeled for GFP and AMF-R. Control cells display a tubular distribution typical of what is seen in AMF-R labeled cells whereas transfected cells show an atypical distribution. The yellow merge shows partial or absent colocalization of the GFP and AMF-R labels similarly to previous results obtained with the FLAG tag.



**Figure 6**

## References

- Benlimame, N., P.U. Le, and I.R. Nabi. 1998. Localization of autocrine motility factor receptor to caveolae and clathrin-independent internalization of its ligand to smooth endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of the Cell*. 9:1773-1786.
- Benlimame, N., D. Simard, and I.R. Nabi. 1995. Autocrine motility factor receptor is a marker for a distinct tubular membrane organelle. *Journal of Cell Biology*. 129:459-471.
- Biederer, T., C. Volkwein, and T. Sommer. 1997. Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science*. 278:1806-9.
- Fang, S., M. Ferrone, C. Yang, J.P. Jensen, S. Tiwari, and A.M. Weissman. 2001. The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:14422-7.
- Fang, S., K.L. Lorick, J.P. Jensen, and A.M. Weissman. 2003. RING finger ubiquitin protein ligases: implications for tumorigenesis, metastasis and for molecular targets in cancer. *Semin Cancer Biol*. 13:5-14.

Hershko, A., and A. Ciechanover. 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 67:425-79.

Hirono, Y., S. Fushida, Y. Yonemura, H. Yamamoto, H. Watanabe, and A. Raz. 1996. Expression of autocrine motility factor receptor correlates with disease progression in human gastric cancer. *British Journal of Cancer.* 74:2003-2007.

Kara, M., Y. Ohta, Y. Tanaka, M. Oda, and Y. Watanabe. 2001. Autocrine motility factor receptor expression in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 71:944-8.

Le, P.U., N. Benlimame, A. Lagana, A. Raz, and I.R. Nabi. 2000. Clathrin-mediated endocytosis and recycling of autocrine motility factor receptor to fibronectin fibrils is a limiting factor for NIH-3T3 cell motility. *Journal of Cell Science.* 113:3227-3240.

Le, P.U., G. Guay, Y. Altschuler, and I.R. Nabi. 2002. Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry.* 277:3371-3379.

- Le, P.U., and I.R. Nabi. 2003. Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* 116:1059-1071.
- Maruyama, K., H. Watanabe, H. Shiozaki, T. Takayama, J. Gofuku, H. Yano, M. Inoue, S. Tamura, A. Raz, and M. Monden. 1995. Expression of autocrine motility factor receptor in human esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 64:316-21.
- Nabi, I.R., H. Watanabe, and A. Raz. 1990. Identification of B16-F1 melanoma autocrine motility-like factor receptor. *Cancer Research.* 50:409-414.
- Nabi, I.R., H. Watanabe, and A. Raz. 1992. Autocrine motility factor and its receptor: role in cell locomotion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 11:5-20.
- Onishi, Y., K. Tsukada, J. Yokota, and A. Raz. 2003. Overexpression of autocrine motility factor receptor (AMFR) in NIH3T3 fibroblasts induces cell transformation. *Clin Exp Metastasis.* 20:51-8.
- Otto, T., A. Bex, U. Schmidt, A. Raz, and H. Rubben. 1997. Improved prognosis assessment for patients with bladder carcinoma. *Am J Pathol.* 150:1919-23.

Polo, S., S. Sigismund, M. Faretta, M. Guidi, M.R. Capua, G. Bossi, H. Chen, P. De Camilli, and P.P. Di Fiore. 2002. A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature*. 416:451-5.

Ponting, C.P. 2000. Proteins of the endoplasmic-reticulum-associated degradation pathway: domain detection and function prediction. *Biochem J*. 351 Pt 2:527-35.

Pray, T.R., F. Parlati, J. Huang, B.R. Wong, D.G. Payan, M.K. Bennett, S.D. Issakani, S. Molineaux, and S.D. Demo. 2002. Cell cycle regulatory E3 ubiquitin ligases as anticancer targets. *Drug Resist Updat*. 5:249-58.

Sachse, M., P. van Kerkhof, G.J. Strous, and J. Klumperman. 2001. The ubiquitin-dependent endocytosis motif is required for efficient incorporation of growth hormone receptor in clathrin-coated pits, but not clathrin-coated lattices. *J Cell Sci*. 114:3943-52.

Shih, S.C., K.E. Sloper-Mould, and L. Hicke. 2000. Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors. *Embo J*. 19:187-98.

Silletti, S., S. Paku, and A. Raz. 1998. Autocrine motility factor and the extracellular matrix. I. Coordinate regulation of melanoma cell adhesion,

spreading and migration involves focal contact reorganization.  
*International Journal of Cancer*. 76:120-128.

Silletti, S., and A. Raz. 1996. Regulation of autocrine motility factor receptor expression in tumor cell locomotion and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 213 ( Pt 2):137-69.

Tamura, M., Y. Ohta, M. Oda, and G. Watanabe. 2003. Peripherally located occult lung cancer with AMFR expression. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 9:184-7.

Timar, J., E. Raso, B. Dome, A. Ladanyi, T. Banfalvi, K. Gilde, and A. Raz. 2002. Expression and function of the AMF receptor by human melanoma in experimental and clinical systems. *Clin Exp Metastasis*. 19:225-32.

Wang, H.-J., N. Benlimame, and I.R. Nabi. 1997. The AMF-R tubule is a smooth ilimaquinone-sensitive subdomain of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science*. 110:3043-3053.

Wang, H.-J., G. Guay, L. Pogan, R. Sauve, and I.R. Nabi. 2000. Calcium regulates the association between mitochondria and a smooth subdomain of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol*. 150:1489-1498.

Watanabe, H., P. Carmi, V. Hogan, T. Raz, S. Silletti, I.R. Nabi, and A. Raz.  
1991. Purification of human tumor cell autocrine motility factor and  
molecular cloning of its receptor. *Journal of Biological Chemistry*.  
266:13442-13448.

## **Discussion**

### **1. Sommaire des résultats**

Nous avons montré que FLAG-AMF-R colocalisait partiellement en immunofluorescence avec le marquage AMF-R. De plus, la protéine semble être mono-ubiquitinée tel qu'illustré en immunobuvardage, et nous avons confirmé que le protéasome jouait un rôle dans la dégradation de la protéine. Nous avons également démontré que la surexpression d'AMF-R entraînait une dissociation de l'AMF-R des mitochondries. La section suivante s'attardera à analyser la véracité de ce résultat.

### **2. Distribution de FLAG-AMF-R**

#### **2.1 Dissociation avec la mitochondrie**

Nos résultats illustrent clairement la dissociation de la mitochondrie d'avec l'AMF-R, causée par une surexpression de cette dernière. En effet, les cellules non-transfectées démontrent une association de l'AMF-R avec la mitochondrie. Ceci s'illustre en immunofluorescence par la colocalisation complète des marquages AMF-R et hsp-70 (protéine mitochondriale), et concorde avec les résultats antérieurs obtenus selon d'autres études (Wang et al., 2000). La dissociation drastique obtenue suite à la transfection de FLAG-AMF-R amène à poser 2 questions essentielles. L'épitope FLAG, en tant que tel, serait-il la cause de cette dissociation? La lignée cellulaire y serait-elle pour quelque chose? Ces

deux sujets seront abordés dans les prochains paragraphes afin de s'assurer de la véracité de nos conclusions.

### 2.1.1 Ajout d'épitope

L'ajout d'épitopes aux protéines est un moyen génétique standard rapide et efficace pour la caractérisation, la purification et la localisation *in vivo* des produits protéiques de gènes clonés (Jarvik and Telmer, 1998). L'ajout de l'épitope FLAG au côté N-terminal de la protéine soulève des questions intéressantes, entre autres, l'effet potentiel de cet épitope sur la fonction de la protéine en général, et plus particulièrement sur l'association de l'AMF-R endogène avec la mitochondrie. En effet, l'association des tubules d'AMF-R avec les mitochondries a été largement étudié et caractérisé (Wang et al., 2000). Plusieurs observations portent à croire que l'épitope en tant que tel n'altère en rien la fonction de l'AMF-R, et que ce serait plutôt la surexpression de la protéine qui entraînerait une dissociation avec la mitochondrie. Notons tout d'abord que l'épitope FLAG ne se compose que de 8 acides aminés (DYKDDDDK) comparativement aux 643 acides aminés de l'AMF-R et que certaines études utilisant une version minimale de cet épitope composé de 7 acides aminés ont démontré que l'épitope n'altérerait pas les fonctions des protéines étudiées (Jarvik and Telmer, 1998; Johnson et al., 2002). D'autres chercheurs sont même allés jusqu'à marquer leur protéine de manière multiple utilisant plus d'un épitope afin d'augmenter la capacité de détection de la protéine exprimée. (Atkin et al., 1995; Hernan et al., 2000; Srivastava and Jones, 1998). De plus, cet épitope a été

largement utilisé dans des études impliquant diverses protéines sans pour autant compromettre leurs fonctions (Jawhari et al., 2002; Kim et al., 2003; Wolfrain et al., 2002). Troisièmement, l'utilisation de l'épitope GFP (*green fluorescent protein*) au côté C-terminal de l'AMF-R a abouti à des résultats similaires notamment par rapport à la dissociation d'avec les mitochondries. En effet, des cellules Cos-7 transfectées avec AMF-R-GFP ont démontré une dissociation de l'AMF-R avec les mitochondries, tels qu'illustrés par les marquages en immunofluorescence montrant un manque de colocalisation d'AMF-R et de hsp-70 (voir Fig.5 de la section Article). Donc, l'ajout d'un épitope, indépendamment de sa position N-terminale ou C-terminale, n'a, dans ce cas-ci, en rien influencé les résultats obtenus. Il est à noter que la GFP possède une masse de 30 kDa, et de ce fait, serait un candidat beaucoup plus potent à altérer la fonction d'une protéine donnée, et du même coup, altérer sa distribution cellulaire tel qu'on pourrait le voir en immunofluorescence.

### 2.1.2 Lignée cellulaire

La lignée cellulaire COS-7 est reconnue pour son efficacité dans les techniques d'expression génique, de clonage, de production de petites quantités de protéines recombinantes et de test d'efficacité des constructions (Edwards and Aruffo, 1993). Elle a été principalement utilisée dans ces études pour son haut taux de transfection et d'expression protéique transitoire. Tout au long de nos travaux, les distributions de FLAG-AMF-R et d'AMF-R-GFP ont été similaires,

et la question à savoir si la lignée cellulaire en est responsable se pose forcément. Pour vérifier cette hypothèse, les expériences ont été reproduites avec d'autres lignées cellulaires, à savoir les cellules NIH-3T3, les cellules MDCK et les cellules HT-1080, en utilisant AMF-R-GFP. Les résultats obtenus sont similaires et présentent une distribution atypique de l'AMF-R dans les cellules transfectées, ne semblant pas colocaliser avec la mitochondrie (voir Fig.6 section Article). Les raisons pour le choix des deux premières lignées portent principalement sur leurs utilisations antérieures relativement aux études effectuées sur l'AMF-R. En effet, les tubules d'AMF-R dans les NIH-3T3 sont très bien caractérisés et ces cellules ont permis l'identification de deux voies d'endocytose du complexe AMF/AMF-R (Benlimame et al., 1998; Le et al., 2000). Quant aux cellules MDCK, elles présentent de très beaux tubules d'AMF-R et elles ont permis l'avancement dans les études relatives à l'association de l'AMF-R avec la mitochondrie et l'implication du calcium dans ce processus (Wang et al., 2000). Les résultats avec les différentes lignées cellulaires, utilisant les épitopes FLAG ou GFP se confirment entre eux, et n'attribuent pas la distribution particulière de l'AMF-R exogène à la lignée cellulaire.

### 2.1.3 Rôle du domaine cytoplasmique

Le domaine cytoplasmique de l'AMF-R comporte des motifs importants dont les domaines *RING finger*, *CUE* et plusieurs sites de phosphorylation propres aux protéines dont la signalisation est capitale à leur fonction. Tout porte

à croire que la surexpression est responsable de la distribution caractéristique de l'AMF-R et de sa dissociation des mitochondries. La surexpression couplée à la multiplicité des domaines de l'AMF-R pourrait de manière synergique favoriser l'oligomérisation du récepteur. En effet, des études ont démontré que les récepteurs couplés aux protéines G peuvent exister en tant que complexes oligomériques (Milligan, 2001). La surexpression de l'AMF-R pourrait causer une perturbation dans la fonction de cette oligomérisation déjà existante, causant une espèce de « sur-oligomérisation » se reflétant par la distribution caractéristique de FLAG-AMF-R et sa dissociation des mitochondries.

## **2.2 Manque de colocalisation des marquages FLAG et AMF-R**

Nos études ont démontré que les marquages FLAG et AMF-R ne colocalisaient que partiellement et que la distribution d'AMF-R était différente de celle attribuable à l'AMF-R endogène. En effet, lors de transfections transitoires utilisant des lignées cellulaires telles que les Cos-7, l'on s'attend à obtenir une colocalisation complète entre la protéine endogène et la protéine exogène marquée par un épitope. Les paragraphes suivants s'attarderont à expliciter les raisons possibles pour lesquelles cela n'a pas été le cas dans nos expériences.

### **2.2.1 Épitope FLAG voilé**

Les protéines sont reconnues pour prendre diverses conformations dépendamment de plusieurs facteurs. Dans le cas présent, l'ajout de l'épitope

FLAG ou GFP aurait possiblement altéré la conformation du récepteur de sorte que l'épitope ne soit pas accessible aux anticorps. Cela serait une explication possible au manque de colocalisation des marquages FLAG et AMF-R.

### 2.2.2 Effet de la lactacystine sur la conformation

La lactacystine est un inhibiteur du protéasome aux effets cellulaires connus. Toutefois, l'on pourrait spéculer sur ses effets sur la conformation de l'AMF-R. En effet, les résultats démontrent une augmentation de la colocalisation des marquages FLAG et AMF-R suite à un traitement prolongé à la lactacystine (voir Fig.4 section Article). Il y a deux interprétations aux résultats de cette expérience. La première étant que les sites où l'on observe une augmentation de la colocalisation des marquages anti-FLAG et anti-AMF-R, suite au traitement à la lactacystine, sont des sites responsables de l'ubiquitination de l'AMF-R. Le protéasome étant inactif, le FLAG-AMF-R normalement destiné à la dégradation devient visible en immunofluorescence. Une seconde explication impliquerait un effet possible de la lactacystine sur la conformation de l'AMF-R. Cela signifierait que le traitement à la lactacystine favoriserait une conformation où l'épitope ne serait plus caché à l'anticorps anti-FLAG. Toutefois, cette supposition reste à être vérifiée, notamment par l'utilisation de d'autres inhibiteurs du protéasome tels que le MG132.

### 2.3 Bande de haut poids moléculaire en immunobuvardage

Le marquage en immunobuvardage révèle une bande à un haut poids moléculaire révélée par l'anticorps dirigé contre l'épitope FLAG sans pour autant être reconnue par l'anticorps monoclonal dirigé contre l'AMF-R. Ceci soulève une question intéressante relativement aux diverses causes de l'absence de reconnaissance de cette forme « lourde » par l'anticorps anti-AMF-R. L'AMF-R est un récepteur couplé aux protéines G, quoiqu'il soit atypique. Il n'en est pas moins sujet à l'oligomérisation de cette sorte de récepteurs. En effet, des études de co-immunoprécipitation démontrent de plus en plus l'existence des RCPGs sous formes d'homo ou d'hétérodimères, ou tout simplement d'oligomères (Milligan, 2001). La formation de ces oligomères stables pourrait masquer le site de reconnaissance de l'anticorps anti-AMF-R. Il serait évidemment intéressant d'avoir accès à des anticorps anti-AMF-R autres que celui dont nous disposons pour le moment, notamment des anticorps polyclonaux pouvant détecter ces oligomères. Il est à noter qu'une équipe a utilisé un anticorps polyclonal dirigé contre l'AMF-R et n'a pu détecter l'AMF-R dans le RE lisse en immunofluorescence (Fang et al., 2001). Leur marquage d'AMF-R reflétait un marquage typique du réticulum sans voir de structures tubulaires lisses. Ces résultats renforcent la théorie selon laquelle l'anticorps monoclonal reconnaît les formes correctement repliées et fonctionnelles de l'AMF-R. Pour pouvoir confirmer que ces bandes de haut poids moléculaire sont bien des oligomères, il serait intéressant de tenter de les dissocier avec des conditions de SDS (détergent) plus élevées.

Une autre explication, serait la migration ralentie de formes mal repliées du récepteur FLAG-AMF-R. La forme incorrectement repliée masquerait également le site de reconnaissance de l'anticorps contre l'AMF-R, et expliquerait l'absence de bande de haut poids moléculaire dans l'immunobuvardage contre l'AMF-R. L'anticorps monoclonal dirigé contre l'AMF-R reconnaît non seulement les formes correctement repliées du récepteur mais également les formes fonctionnelles (Nabi et al., 1990). Les études démontrent que dans les cellules de mélanome B16-F1, l'ajout de l'anticorps monoclonal aux cellules avait pour effet d'induire la motilité de celles-ci, de manière similaire au facteur autocrine de motilité (AMF) lui-même (Nabi et al., 1990). Cette augmentation de motilité est inhibée par la toxine de pertussis indiquant que cette motilité induite par l'anticorps se fait également via la voie des protéines G sensible à la toxine de pertussis. De plus cette motilité est inhibée lorsqu'on pré-incube les cellules avec du milieu contenant de l'AMF, démontrant ainsi la compétition entre le ligand et l'anticorps. Nous avons donc des raisons de croire que l'anticorps reconnaît une forme fonctionnelle, motile, correctement repliée de l'AMF-R, et que le FLAG-AMF-R reconnu par cet anticorps a de fortes chances d'être également fonctionnel. L'absence de reconnaissance de la bande à haut poids moléculaire par l'anticorps anti-AMF-R pourrait donc signifier la non-fonctionnalité des agglomérats de récepteurs ou des récepteurs incorrectement repliés.

Un autre critère de fonctionnalité des récepteurs est leur déploiement à la membrane plasmique. En ce qui a trait à ceci, nous avons essayé de faire un marquage à 4°C sans pour autant y parvenir. Une des raisons de cet échec

pourrait être qu'il y a une endocytose rapide, laissant donc peu de récepteurs FLAG-AMF-R détectables en surface. Pour mieux approfondir cette voie, nous avons effectué une endocytose de 30 minutes, et après un marquage avec l'anticorps anti-FLAG, l'on pouvait voir en effet une endocytose du récepteur. Des études plus approfondies, notamment par FACS (*fluorescence-activated cell sorter*), méritent d'être effectuées afin d'élucider la question du déploiement de FLAG-AMF-R à la membrane plasmique.

### **3. Implications pour la fonction d'AMF-R**

#### **3.1 Monoubiquitination de l'AMF-R et relation avec l'endocytose**

La monoubiquitination est un processus cellulaire de plus en plus étudié, et est impliqué dans l'endocytose de protéines membranaires, le tri des protéines dans les corps multivésiculaires, le bourgeonnement des rétrovirus, la réparation de l'ADN, l'activité des histones et la régulation de la transcription (Haglund et al., 2003a). Ces fonctions font contraste avec la polyubiquitination via la lysine 48 qui a un rôle bien caractérisé; celui-ci étant le ciblage des protéines au protéasome 26S pour leur dégradation. Il est rapporté dans la littérature que la polyubiquitination peut servir à d'autres fins que la dégradation lorsqu'elle s'effectue via la lysine 29 ou la lysine 63 (Haglund et al., 2003a). Ces rôles incluent la réparation de l'ADN et l'endocytose.

L'AMF-R est une E3 ubiquitine ligase qui pourrait médier autant sa polyubiquitination que sa monoubiquitination dépendamment du contexte cellulaire (localisation cellulaire et effecteurs protéiques) dans lequel il se trouve. Un exemple classique de ceci est la protéine ubiquitine ligase Cbl. En effet, Cbl médie la polyubiquitination et la dégradation subséquente de plusieurs protéines cytoplasmiques dont *Sprouty* et les tyrosines kinases *src* et *abl* (Rubin et al., 2003; Soubeyran et al., 2003; Yokouchi et al., 2001). D'un autre côté, cette même protéine est responsable de la monoubiquitination de plusieurs récepteurs à activité tyrosine kinase et de la protéine adaptatrice CIN85 dans la voie endocytotique (Haglund et al., 2002; Haglund et al., 2003b). Nos résultats confirment ceux de Fang et al. (Fang et al., 2001), c'est-à-dire une sensibilité de la dégradation de l'AMF-R à la lactacystine, ce qui semble démontrer une régulation de l'AMF-R par le protéasome via sa polyubiquitination pour sa dégradation (Fang et al., 2001). Par ailleurs, nous avons détecté par immunobuvardage, une forme de l'AMF-R reconnue par l'anticorps dirigé contre l'ubiquitine, qui semble être une forme mono-ubiquitinée de l'AMF-R (voir Fig.2, Article). L'ubiquitine pourrait ainsi s'avérer être un commutateur (*switch*) moléculaire intéressant régulant les diverses fonctions de l'AMF-R. Il est connu que l'AMF-R emprunte diverses voies d'endocytose dans la cellule. L'état d'ubiquitination de l'AMF-R pourrait potentiellement déterminer la voie d'endocytose empruntée par la protéine et cela reste une voie d'étude à explorer.

## 3.2 Surexpression d'AMF-R et implications

### 3.2.1 Cancer

Le rôle de l'AMF-R dans la motilité et la formation des métastases étant bien établi, il importe de se pencher sur les mécanismes par lesquels la protéine accomplit ces fonctions. Les études récentes ayant identifié l'AMF-R comme étant une ubiquitine ligase (Fang et al., 2001) soulève des questions par rapport à l'implication de cette fonction relativement à la métastase. L'adhésion intercellulaire, dans un modèle métastatique, est affectée et les molécules qui la médient, telles que l'E-cadhérine, se trouvent à être diminuées. La cadhérine E est un suppresseur de tumeur empêchant l'invasion des cellules tumorales à partir de la tumeur primaire (Guilford, 1999; Semb and Christofori, 1998). Des études ont montré qu'une diminution de l'expression de la cadhérine E corrélait à une augmentation du niveau d'AMF-R et une augmentation de la motilité (Otto et al., 1994; Simard and Nabi, 1996). La possibilité que l'AMF-R régule cette protéine via son activité d'ubiquitine ligase demeure et reste une avenue à explorer. De plus, l'auto-ubiquitination de l'AMF-R pourrait être un des mécanismes affectés dans des conditions métastatiques.

Une autre protéine associée à l'AMF-R est la cavéoline-1. Notre équipe a démontré que le taux d'endocytose de l'AMF-R au réticulum endoplasmique lisse est augmenté dans les cellules transformées par les oncogènes *ras* et *abl* et que ces cellules exprimaient des niveaux réduits de cavéoline, et peu de cavéoles (Le et al., 2002). La cavéoline est également un gène suppresseur de tumeur, et

pourrait être régulée par l'AMF-R via sa fonction d'ubiquitine ligase, directement ou indirectement au niveau de la membrane plasmique.

### 3.2.2 Apoptose

L'apoptose, ou mort programmée, est un processus cellulaire essentiel à l'embryogenèse, la morphogenèse des organes et l'homéostasie des tissus (Steller 1995; Jacobson et al., 1997). Un des mécanismes de l'apoptose mitochondriale peut se resumer ainsi : pour que la pro-caspase 9 soit activée, les cofacteurs cytochrome c et dATP doivent interagir avec Apaf-1 pour qu'ensuite la caspase-9 initiateur puisse activer la caspase-3 effectrice qui tuera la cellule par protéolyse (Haga et al., 2003; Perkins et al., 2000). La dérégulation de plusieurs facteurs associés à la mitochondrie, tels que Bcl-2, cytochrome c, Bax, Bik, Mn SOD, Apaf-1 et caspase-9 est observée dans les cellules cancéreuses. La relâche de la protéine mitochondriale cytochrome c chez les mammifères entraîne donc l'assemblage de ce que l'on appelle l'apoptosome, un complexe protéique impliquant les protéines Apaf-1 et caspase-9, crucial au processus d'apoptose (Joza et al., 2001). Des études récentes ont démontré une fonction anti-apoptotique du complexe AMF/AMF-R dans des cellules humaines de fibrosarcome HT-1080 surexprimant l'AMF (Haga et al., 2003). En effet, les cellules transfectées n'exprimaient pas les protéines Apaf-1 et caspase-9 de l'apoptosome et étaient résistantes au traitement à la mitomycine C, drogue induisant l'apoptose et anti-cancéreuse, comparativement aux cellules témoins

(Haga et al., 2003). Ces études ont donc mis en évidence une régulation de l'expression des gènes Apaf-1 et caspase-9 par l'AMF via une voie de signalisation complexe et donc, une régulation indirecte de la formation de l'apoptosome par AMF/AMF-R.

On voit donc que la surexpression de l'AMF-R cause une perturbation au niveau de la signalisation, influençant directement la régulation de molécules apoptotiques telles que caspase-9 et Apaf-1. Notre étude illustre une perturbation au niveau cellulaire représentée par la dissociation AMF-R/mitochondrie causée par la surexpression d'AMF-R et incite dans de perspectives futures, à mieux comprendre la nature de cette dissociation au niveau moléculaire et sa contribution aux phénomènes métastatiques et apoptotiques.

Par ailleurs, l'identification des substrats d'AMF-R (Fig.2) par la protéomique (immunoprécipitation, séquençage, spectroscopie de masse, etc..) apportera certainement de nouvelles lumières, en permettant de découvrir si des molécules apoptotiques se font dégrader par l'AMF-R à laquelle est conférée une fonction d'ubiquitine ligase.

### **3.3 Corps multivésiculaires et ubiquitine pour dégradation**

L'AMF-R en empruntant la voie dépendante de la clathrine, se retrouve dans les corps multivésiculaires avant d'être recyclé vers les fibrilles de fibronectine (Le et al., 2000). L'ubiquitine pourrait potentiellement jouer un rôle dans ce ciblage. Le sort des récepteurs de l'EGF est régulé par l'ubiquitination, qui empêche leur recyclage à la surface et permet leur dégradation par les

lysosomes (Levkowitz et al., 1998). De la même manière, le transport des récepteurs de l'IL-2 des endosomes précoces aux endosomes tardifs est dépendant de l'ubiquitine (Rocca et al., 2001). De plus, l'ubiquitine est responsable du ciblage de la perméase du tryptophane et d'autres acides aminés du réseau trans-golgien aux endosomes (Beck et al., 1999; Helliwell et al., 2001). Quoique le ciblage des protéines dans les corps multivésiculaires se fait autant de manière dépendante de l'ubiquitine qu'indépendante (Reggiori and Pelham, 2001), il existe une possibilité que l'ubiquitination pourrait être tenue responsable du ciblage de l'AMF-R dans les corps multivésiculaires et cette hypothèse reste à être vérifiée.

### **3.4 Perspectives**

Ces études démontrent clairement que l'ubiquitination a un rôle de pivot dans la régulation de l'AMF-R. Il sera intéressant de déterminer jusqu'à quel point ce processus est impliqué dans la fonction de la protéine. Il semble difficile de croire que la monoubiquitination de l'AMF-R se fasse au niveau du réticulum endoplasmique, car tel n'est pas le cas pour plusieurs autres protéines dont l'EGF-R (Haglund et al., 2003a). La monoubiquitination au niveau de la membrane plasmique pourrait déterminer laquelle des deux voies d'endocytose empruntera l'AMF-R. Ces avenues restent à être explorées. Des études effectuées avec des protéines mutantes pour les domaines importants pour l'ubiquitination (*RING* et *Cue*) pourraient s'avérer utiles à cet effet. En effet, des études avec des délétions de ces domaines ont été effectuées à des fins d'analyse du potentiel de

dégradation avec le protéasome, mais pas dans un contexte d'endocytose (Fang et al., 2001). De plus, l'identification par la protéomique de tous les effecteurs contribuant à l'ubiquitination de l'AMF-R reste également une avenue à explorer. L'AMF-R contient plusieurs domaines d'associations protéiques ; l'identification de ces protéines par des études de co-immunoprécipitation pourrait éclaircir les diverses fonctions de cette protéine et mieux cerner la nature de son implication dans la formation des métastases.

En ce qui concerne l'association mitochondriale de l'AMF-R, des études plus poussées permettront de mieux cerner la nature de cette association dans des systèmes où cette association est perturbée. Notre étude démontrant la dissociation de ces deux organites causée par la surexpression de l'AMF-R ne fait qu'entamer cette avenue de recherche. Des études similaires effectuées avec des lignées cellulaires transfectées de manière stable, ainsi qu'avec diverses lignées métastatiques apporteront d'autres lumières sur le sujet. De plus, des études permettant de contrôler le niveau calcique de ces cellules permettra également de mieux comprendre la fonction du calcium dans la régulation de l'association AMF-R/mitochondrie. Il va de soi que les travaux futurs se doivent de ne pas négliger l'implication de tout ceci relativement à la motilité.

## Bibliographie

- Albert, A.D., and P.L. Yeagle. 2002. Structural studies on rhodopsin. *Biochim Biophys Acta*. 1565:183-95.
- Amraei, M., and I.R. Nabi. 2002. Species specificity of the cytokine function of phosphoglucose isomerase. *FEBS Lett*. 525:151-5.
- Anderson, R.G. 1998. The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem*. 67:199-225.
- Atkin, A.L., N. Altamura, P. Leeds, and M.R. Culbertson. 1995. The majority of yeast UPF1 co-localizes with polyribosomes in the cytoplasm. *Mol Biol Cell*. 6:611-25.
- Baumann, M., K. Brand, J. Giedl, P. Hermanck, S. Ruf, J. Scheele, S. Hoferichter, and F.P. Gall. 1988. Significance of serum phosphohexose isomerase in gastrointestinal cancer at different stages. *Oncology*. 45:153-158.
- Baumann, M., A. Kappel, K. Brand, W. Siegfeld, and E. Paterok. 1990. The diagnostic validity of the serum tumor marker phosphohexose isomerase (PHI) in patients with gastrointestinal, kidney, and breast cancer. *Cancer Investigation*. 8:3510356.
- Beck, T., A. Schmidt, and M.N. Hall. 1999. Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *J Cell Biol*. 146:1227-38.

- Benlimame, N., P.U. Le, and I.R. Nabi. 1998. Localization of autocrine motility factor receptor to caveolae and clathrin-independent internalization of its ligand to smooth endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of the Cell*. 9:1773-1786.
- Benlimame, N., D. Simard, and I.R. Nabi. 1995. Autocrine motility factor receptor is a marker for a distinct tubular membrane organelle. *Journal of Cell Biology*. 129:459-471.
- Berridge, M.J. 2002. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium*. 32:235-49.
- Beutler, E., C. West, H.A. Britton, J. Harris, and L. Forman. 1997. Glucosephosphate isomerase (GPI) deficiency mutations associated with hereditary nonspherocytic hemolytic anemia (HNSHA). *Blood, Cells, Molecules, and Diseases*. 23:402-409.
- Bouvier, M. 2001. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci*. 2:274-86.
- Breitwieser, G.E. 2004. G protein-coupled receptor oligomerization: implications for G protein activation and cell signaling. *Circ Res*. 94:17-27.
- Cabrera-Vera, T.M., J. Vanhauwe, T.O. Thomas, M. Medkova, A. Preininger, M.R. Mazzoni, and H.E. Hamm. 2003. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev*. 24:765-81.
- Cavalli, V., M. Corti, and J. Gruenberg. 2001. Endocytosis and signaling cascades: a close encounter. *FEBS Lett*. 498:190-6.

- Chaput, M., V. Claes, D. Portetelle, I. Cludts, A. Cravador, A. Burny, H. Gras, and A. Tartar. 1988. The neurotrophic factor neuroleukin is 90% homologous with phosphohexose isomerase. *Nature*. 332:454-457.
- Chou, C.-C., Y.-J. Sun, M. Meng, and C.-D. Hsiao. 2000. The Crystal Structure of Phosphoglucose Isomerase/Autocrine Motility Factor/Neuroleukin Complexed with Its Carbohydrate Phosphate Inhibitors Suggests Its Substrate/Receptor Recognition. *J. Biol. Chem.* 275:23154-23160.
- Edwards, C.P., and A. Aruffo. 1993. Current applications of COS cell based transient expression systems. *Curr Opin Biotechnol.* 4:558-63.
- Faik, P., J.I.H. Walker, A.A.M. Redmill, and M.J. Morgan. 1988. Mouse glucose-6-phosphate isomerase and neuroleukin have identical 3' sequences. *Nature*. 332:455-457.
- Fang, S., M. Ferrone, C. Yang, J.P. Jensen, S. Tiwari, and A.M. Weissman. 2001. The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:14422-7.
- Fang, S., K.L. Lorick, J.P. Jensen, and A.M. Weissman. 2003. RING finger ubiquitin protein ligases: implications for tumorigenesis, metastasis and for molecular targets in cancer. *Seminars in Cancer Biology.* 13:5-14.
- Fidler, IJ. 1990. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res.* 50(19):6130-8.

- Filella, X., R. Molina, J. Jo, E. Mas, and A.M. Ballesta. 1991. Serum phosphohexose isomerase activities in patients with colorectal cancer. *Tumor Biology*. 12:360-367.
- Filipek, S., D.C. Teller, K. Palczewski, and R. Stenkamp. 2003. The crystallographic model of rhodopsin and its use in studies of other G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 32:375-97.
- Fluhmann, B., R. Muff, W. Hunziker, J.A. Fischer, and W. Born. 1995. A human orphan calcitonin receptor-like structure. *Biochem Biophys Res Commun*. 206:341-7.
- Franke, W.W., and J. Kartenbeck. 1971. Outer mitochondrial membrane continuous with endoplasmic reticulum. *Protoplasma*. 73:35-41.
- Fredriksson, R., M.C. Lagerstrom, L.G. Lundin, and H.B. Schioth. 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*. 63:1256-72.
- Freemont, P.S. 2000. RING for destruction? *Curr Biol*. 10:R84-7.
- Funasaka, T., A. Haga, A. Raz, and H. Nagase. 2001. Tumor Autocrine Motility Factor Is an Angiogenic Factor That Stimulates Endothelial Cell Motility. *Biochem Biophys Res Commun*. 285:118-28.
- Funasaka, T., A. Haga, A. Raz, and H. Nagase. 2002. Autocrine motility factor secreted by tumor cells upregulates vascular endothelial growth factor receptor (Flt-1) expression in endothelial cells. *Int J Cancer*. 101:217-23.

- Gether, U. 2000. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev.* 21:90-113.
- Gether, U., F. Asmar, A.K. Meinild, and S.G. Rasmussen. 2002. Structural basis for activation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Toxicol.* 91:304-12.
- Guilford, P. 1999. E-cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire? *Mol Med Today.* 5:172-7.
- Gurney, M.E. 1984. Suppression of sprouting at the neuromuscular junction by immune sera. *Nature.* 307:546-548.
- Gurney, M.E., B.R. Apatoff, G.T. Spear, M.J. Baumel, J.P. Antel, M. Brown Bania, and A.T. Reder. 1986a. Neuroleukin: A lymphokine product of lectin-stimulated T cells. *Science.* 234:574-581.
- Gurney, M.E., A.C. Belton, N. Cashman, and J.P. Antel. 1984. Inhibition of terminal axonal sprouting by serum from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *New England Journal of Medicine.* 311:933-939.
- Gurney, M.E., S.P. Heinrich, M.R. Lee, and H.-s. Yin. 1986b. Molecular cloning and expression of neuroleukin, a neurotropic factor for spinal and sensory neurons. *Science.* 234:566-574.
- Haga, A., T. Funasaka, Y. Niinaka, A. Raz, and H. Nagase. 2003. Autocrine motility factor signaling induces tumor apoptotic resistance by regulations Apaf-1 and Caspase-9 apoptosome expression. *Int J Cancer.* 107:707-14.

- Haga, A., Y. Niinaka, and A. Raz. 2000. Phosphohexose isomerase/autocrine motility factor/neuroleukin/maturation factor is a multifunctional phosphoprotein. *Biochimica Biophysica Acta*. 36155:1-10.
- Haglund, K., P.P. Di Fiore, and I. Dikic. 2003a. Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci*. 28:598-603.
- Haglund, K., N. Shimokawa, I. Szymkiewicz, and I. Dikic. 2002. Cbl-directed monoubiquitination of CIN85 is involved in regulation of ligand-induced degradation of EGF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:12191-6.
- Haglund, K., S. Sigismund, S. Polo, I. Szymkiewicz, P.P. Di Fiore, and I. Dikic. 2003b. Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol*. 5:461-6.
- Helliwell, S.B., S. Losko, and C.A. Kaiser. 2001. Components of a ubiquitin ligase complex specify polyubiquitination and intracellular trafficking of the general amino acid permease. *J Cell Biol*. 153:649-62.
- Hernan, R., K. Heuermann, and B. Brizzard. 2000. Multiple epitope tagging of expressed proteins for enhanced detection. *Biotechniques*. 28:789-93.
- Hille, B. 1994. Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci*. 17:531-6.
- Hirono, Y., S. Fushida, Y. Yonemura, H. Yamamoto, H. Watanabe, and A. Raz. 1996. Expression of autocrine motility factor receptor correlates with disease progression in human gastric cancer. *British Journal of Cancer*. 74:2003-2007.

- Hoon, M.A., E. Adler, J. Lindemeier, J.F. Battey, N.J. Ryba, and C.S. Zuker. 1999. Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell*. 96:541-51.
- Hur, E.M., and K.T. Kim. 2002. G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity. *Cell Signal*. 14:397-405.
- Jacobson, M.D., M. Weil and M.C. Raff. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell*. 88(3):347-54.
- Jarvik, J.W., and C.A. Telmer. 1998. Epitope tagging. *Annu Rev Genet*. 32:601-18.
- Jawhari, A., M. Uhring, C. Crucifix, S. Fribourg, P. Schultz, A. Poterszman, J.M. Egly, and D. Moras. 2002. Expression of FLAG fusion proteins in insect cells: application to the multi-subunit transcription/DNA repair factor TFIIH. *Protein Expr Purif*. 24:513-23.
- Johnson, K.Y., L. Liu, and T.S. Vincent. 2002. Minimal FLAG sequence useful in the functional epitope tagging of H-Ras. *Biotechniques*. 32:1270, 1272-6, 1278, 1280.
- Joza, N., S.A. Susin, E. Daugas, W.L. Stanford, S.K. Cho, C.Y. Li, T. Sasaki, A.J. Elia, H.Y. Cheng, L. Ravagnan, K.F. Ferri, N. Zamzami, A. Wakeham, R. Hakem, H. Yoshida, Y.Y. Kong, T.W. Mak, J.C. Zuniga-Pflucker, G. Kroemer, and J.M. Penninger. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 410:549-54.

- Kara, M., Y. Ohta, Y. Tanaka, M. Oda, and Y. Watanabe. 2001. Autocrine motility factor receptor expression in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 71:944-8.
- Kim, J., S. Ahn, R. Guo, and Y. Daaka. 2003. Regulation of epidermal growth factor receptor internalization by G protein-coupled receptors. *Biochemistry.* 42:2887-94.
- Klapisz, E., I. Sorokina, S. Lemeer, M. Pijnenburg, A.J. Verkleij and P.M. van Bergen en Henegouwen. 2002. A ubiquitin-interacting motif (UIM) is essential for Eps15 and Eps15R ubiquitination. *J Biol Chem.* 277(34):30746-53.
- Komarova, S.V., J.B. Shum, L.A. Paige, S.M. Sims, and S.J. Dixon. 2003. Regulation of Osteoclasts by Calcitonin and Amphiphilic Calcitonin Conjugates: Role of Cytosolic Calcium. *Calcif Tissue Int.*
- Kugler, W., K. Breme, P. Laspe, H. Muirhead, C. Davies, H. Winkler, W. Schroter, and M. Lakomek. 1998. Molecular basis of neurological dysfunction coupled with haemolytic anaemia in human glucose-6-phosphate isomerase (GPI) deficiency. *Hum Genet.* 103:450-454.
- Le, P.U., N. Benlimame, A. Lagana, A. Raz, and I.R. Nabi. 2000. Clathrin-mediated endocytosis and recycling of autocrine motility factor receptor to fibronectin fibrils is a limiting factor for NIH-3T3 cell motility. *Journal of Cell Science.* 113:3227-3240.

- Le, P.U., G. Guay, Y. Altschuler, and I.R. Nabi. 2002. Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*. 277:3371-3379.
- Le, P.U., and I.R. Nabi. 2003. Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*. 116:1059-1071.
- Leclerc, N., A. Vallée, and I.R. Nabi. 2000. Expression of the AMF/neuroleukin receptor in developing and adult rat cerebellum. *Journal of Neuroscience Research*. 60:602-612.
- Lee, P.S., Y. Wang, M.G. Dominguez, Y.G. Yeung, M.A. Murphy, D.D. Bowtell, and E.R. Stanley. 1999. The Cbl protooncprotein stimulates CSF-1 receptor multiubiquitination and endocytosis, and attenuates macrophage proliferation. *Embo J*. 18:3616-28.
- Lee, S.P., B.F. O'Dowd, and S.R. George. 2003. Homo- and hetero-oligomerization of G protein-coupled receptors. *Life Sci*. 74:173-80.
- Lee, S.P., B.F. O'Dowd, G.Y. Ng, G. Varghese, H. Akil, A. Mansour, T. Nguyen, and S.R. George. 2000. Inhibition of cell surface expression by mutant receptors demonstrates that D2 dopamine receptors exist as oligomers in the cell. *Mol Pharmacol*. 58:120-8.
- Levkowitz, G., H. Waterman, E. Zamir, Z. Kam, S. Oved, W.Y. Langdon, L. Beguinot, B. Geiger, and Y. Yarden. 1998. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev*. 12:3663-74.

- Liang, J.-s., T. Kim, S. Fang, J. Yamaguchi, A.M. Weissman, E.A. Fisher, and H.N. Ginsberg. 2003a. Overexpression of the Tumor Autocrine Motility Factor Receptor Gp78, a Ubiquitin Protein Ligase, Results in Increased Ubiquitinylation and Decreased Secretion of Apolipoprotein B100 in HepG2 Cells. *J. Biol. Chem.* 278:23984-23988.
- Liang, Y., D. Fotiadis, S. Filipek, D.A. Saperstein, K. Palczewski, and A. Engel. 2003b. Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. *J Biol Chem.* 278:21655-62.
- Ling, K., P. Wang, J. Zhao, Y.L. Wu, Z.J. Cheng, G.X. Wu, W. Hu, L. Ma, and G. Pei. 1999. Five-transmembrane domains appear sufficient for a G protein-coupled receptor: functional five-transmembrane domain chemokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:7922-7.
- Lisanti, M.P., P.E. Scherer, Z. Tang, and M. Sargiacomo. 1994. Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends in Cell Biology.* 4:231-235.
- Lombardi, M.S., A. Kavelaars, and C.J. Heijnen. 2002. Role and modulation of G protein-coupled receptor signaling in inflammatory processes. *Crit Rev Immunol.* 22:141-63.
- Luo, Y., J.M. Long, C. Lu, S.L. Chan, E.L. Spangler, P. Mascarucci, A. Raz, D.L. Longo, M.P. Mattson, D.K. Ingram, and N.P. Weng. 2002. A link between maze learning and hippocampal expression of neuroleukin and its receptor gp78. *J Neurochem.* 80:354-61.

- Maruyama, K., H. Watanabe, S. Hitoshi, T. Takayama, J. Gofuku, H. Yano, M. Inoue, S. Tamura, A. Raz, and M. Monden. 1995. Expression of autocrine motility factor receptor in human esophageal squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*. 64:316-321.
- Milligan, G. 2001. Oligomerisation of G-protein-coupled receptors. *J Cell Sci*. 114:1265-71.
- Miyake, S., K.P. Mullane-Robinson, N.L. Lill, P. Douillard, and H. Band. 1999. Cbl-mediated negative regulation of platelet-derived growth factor receptor-dependent cell proliferation. A critical role for Cbl tyrosine kinase-binding domain. *J Biol Chem*. 274:16619-28.
- Montisano, D.F., J. Cascarano, C.B. Pickett, and T.W. James. 1982. Association between mitochondria and rough endoplasmic reticulum in rat liver. *Anatomical Record*. 203:441-50.
- Morre, D.J., W.D. Merritt, and C.A. Lembi. 1971. Connections between mitochondria and endoplasmic reticulum in rat liver and onion stem. *Protoplasma*. 73:43-9.
- Mould, R., and M.D. Pondel. 2003. Calcitonin receptor gene expression in K562 chronic myelogenous leukemic cells. *Cancer Cell Int*. 3:6.
- Mundy, D.I., T. Machleidt, Y.-s. Ying, R.G.W. Anderson, and G.S. Bloom. 2002. Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*. 115:4327-4339.
- Nabi, I.R., and P.U. Le. 2003. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol*. 161:673-7.

- Nabi, I.R., and A. Raz. 1987. Cell shape modulation alters glycosylation of a metastatic melanoma cell surface antigen. *International Journal of Cancer*. 40:396-401.
- Nabi, I.R., H. Watanabe, and A. Raz. 1990. Identification of B16-F1 melanoma autocrine motility-like factor receptor. *Cancer Research*. 50:409-414.
- Nabi, I.R., H. Watanabe, and A. Raz. 1992. Autocrine motility factor and its receptor: Role in cell locomotion and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*. 11:5-20.
- Nabi, I.R., H. Watanabe, S. Silletti, and A. Raz. 1991. Tumor cell autocrine motility factor receptor. In *Cell Motility Factors*. I.D. Goldberg, editor. Birkäuser Verlag, Basel. 163-177.
- Onishi, Y., K. Tsukada, J. Yokota, and A. Raz. 2003. Overexpression of autocrine motility factor receptor (AMFR) in NIH3T3 fibroblasts induces cell transformation. *Clin Exp Metastasis*. 20:51-8.
- Otto, T., A. Bex, U. Schmidt, A. Raz, and H. Rubben. 1997. Improved prognosis assessment for patients with bladder carcinoma. *Am J Pathol*. 150:1919-23.
- Otto, T., W. Birchmeier, U. Schmidt, A. Hinke, J. Schipper, H. Rübber, and A. Raz. 1994. Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor expression as a prognostic factor in patients with bladder carcinomas. *Cancer Research*. 54:3120-3123.

- Pacher, P., P. Csordas, T. Schneider, and G. Hajnoczky. 2000. Quantification of calcium signal transmission from sarco-endoplasmic reticulum to the mitochondria. *J Physiol.* 529 Pt 3:553-64.
- Patel, P.S., G.N. Rawal, R.M. Rawal, G.H. Patel, D.B. Balar, P.M. Shah, and D.C. Patel. 1995. Comparison between serum levels of carcinoembryonic antigen, sialic acid, and phosphohexose isomeras in lung cancer. *Neoplasia.* 42:271-274.
- Perkins, C.L., G. Fang, C.N. Kim, and K.N. Bhalla. 2000. The role of Apaf-1, caspase-9, and bid proteins in etoposide- or paclitaxel-induced mitochondrial events during apoptosis. *Cancer Res.* 60:1645-53.
- Pickart, C.M. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem.* 70:503-33.
- Pinton, P., D. Ferrari, E. Rapizzi, F.D. Virgilio, T. Pozzan, and R. Rizzuto. 2001. The  $Ca^{2+}$  concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *EMBO J.* 20:2690-2701.
- Ponting, C.P. 2000. Proteins of the endoplasmic-reticulum-associated degradation pathway: domain detection and function prediction. *Biochem J.* 351 Pt 2:527-35.
- Pray, T.R., F. Parlati, J. Huang, B.R. Wong, D.G. Payan, M.K. Bennett, S.D. Issakani, S. Molineaux, and S.D. Demo. 2002. Cell cycle regulatory E3 ubiquitin ligases as anticancer targets. *Drug Resist Updat.* 5:249-58.

- Reggiori, F., and H.R.B. Pelham. 2001. Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *EMBO J.* 20:5176-5186.
- Rizzuto, R., P. Pinton, W. Carrington, F.S. Fay, K.E. Fogarty, L.M. Lifshitz, R.A. Tuft, and T. Pozzan. 1998. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses. *Science.* 280:1763-6.
- Rocca, A., C. Lamaze, A. Subtil, and A. Dautry-Varsat. 2001. Involvement of the ubiquitin/proteasome system in sorting of the interleukin 2 receptor beta chain to late endocytic compartments. *Mol Biol Cell.* 12:1293-301.
- Rodal, S.K., G. Skretting, Ø. Garred, F. Vilhardt, B. van Deurs, and K. Sandvig. 1999. Extraction of cholesterol with methyl-β-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Molecular Biology of the Cell.* 10:961-974.
- Rubin, C., V. Litvak, H. Medvedovsky, Y. Zwang, S. Lev, and Y. Yarden. 2003. Sprouty fine-tunes EGF signaling through interlinked positive and negative feedback loops. *Curr Biol.* 13:297-307.
- Sabharanjak, S., P. Sharma, R.G. Parton, and S. Mayor. 2002. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev Cell.* 2:411-23.
- Schaller, M., D.R. Burton, and H.J. Ditzel. 2001. Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease. *Nat Immunol.* 2:746-53.

- Schlegel, A., D. Volonte, J.A. Engelman, F. Galbiati, P. Mehta, X.L. Zhang, P.E. Scherer, and M.P. Lisanti. 1998. Crowded little caves: structure and function of caveolae. *Cell Signal*. 10:457-63.
- Scorrano, L., S.A. Oakes, J.T. Opferman, E.H. Cheng, M.D. Sorcinelli, T. Pozzan, and S.J. Korsmeyer. 2003. BAX and BAK Regulation of Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>: A Control Point for Apoptosis. *Science*. 300:135-139.
- Semb, H., and G. Christofori. 1998. The tumor-suppressor function of E-cadherin. *Am J Hum Genet*. 63:1588-93.
- Shaul, P.W., and R.G. Anderson. 1998. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol*. 275:L843-51.
- Shimizu, K., M. Tani, H. Watanabe, Y. Nagamachi, Y. Niinaka, T. Shiroishi, S. Ohwada, A. Raz, and J. Yokota. 1999. The autocrine motility factor receptor gene encodes a novel type of seven transmembrane protein. *FEBS Letters*. 456:295-300.
- Silletti, S., and A. Raz. 1996. Regulation of autocrine motility factor receptor expression in tumor cell locomotion and metastasis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 213/II:137-169.
- Silletti, S., H. Watanabe, V. Hogan, I.R. Nabi, and A. Raz. 1991. Purification of B16-F1 melanoma autocrine motility factor and its receptor. *Cancer Research*. 51:3301-3311.
- Simard, D., and I.R. Nabi. 1996. Inverse relation of autocrine motility factor receptor and E-cadherin expression following transformation of epithelial

- MDCK cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 219:122-127.
- Soubeyran, P., A. Barac, I. Szymkiewicz, and I. Dikic. 2003. Cbl-ArgBP2 complex mediates ubiquitination and degradation of c-Abl. *Biochem J*. 370:29-34.
- Srivastava, A., and E.W. Jones. 1998. Pth1/Vam3p is the syntaxin homolog at the vacuolar membrane of *Saccharomyces cerevisiae* required for the delivery of vacuolar hydrolases. *Genetics*. 148:85-98.
- Steller, H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*. 267(5203):1445-9.
- Takanami, I., K. Takeuchi, H. Watanabe, T. Yanagawa, and K. Takagishi. 2002. Autocrine motility factor receptor gene expression and cell motility in lung cancer cell lines. *Oncol Rep*. 9:125-8.
- Takanami, I., K. Takeuchi, H. Watanabe, T. Yanagawa, K. Takagishi, and A. Raz. 2001. Significance of autocrine motility factor receptor gene expression as a prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer*. 95:384-7.
- Takizawa, P.A., J.K. Yucei, B. Veit, D.J. Faulkner, T. Deerinck, G. Soto, M. Ellisman, and V. Malhotra. 1993. Complete vesiculation of Golgi membranes and inhibition of protein transport by a novel sea sponge metabolite, ilimaquinone. *Cell*. 73:1079-1090.

- Tamura, M., Y. Ohta, M. Oda, and G. Watanabe. 2003. Peripherally located occult lung cancer with AMFR expression. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 9:184-7.
- Taxis, C., F. Vogel, and D.H. Wolf. 2002. ER-Golgi Traffic Is a Prerequisite for Efficient ER Degradation. *Mol. Biol. Cell.* 13:1806-1818.
- Timar, J., E. Raso, B. Dome, A. Ladanyi, T. Banfalvi, K. Gilde, and A. Raz. 2002. Expression and function of the AMF receptor by human melanoma in experimental and clinical systems. *Clin Exp Metastasis.* 19:225-32.
- Timar, J., S. Toth, J. Tovari, S. Paku, and A. Raz. 1999. Autocrine motility factor (neuroleukin, phosphohexose isomerase) induces cell movement through 12-lipoxygenase-dependent tyrosine phosphorylation and serine dephosphorylation events. *Clin Exp Metastasis.* 17:809-16.
- Tsutsumi, S., S.K. Gupta, V. Hogan, N. Tanaka, K.T. Nakamura, I.R. Nabi, and A. Raz. 2003a. The enzymatic activity of phosphoglucose isomerase is not required for its cytokine function. *FEBS Lett.* 534:49-53.
- Tsutsumi, S., V. Hogan, I.R. Nabi, and A. Raz. 2003b. Overexpression of the autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase induces transformation and survival of NIH-3T3 fibroblasts. *Cancer Res.* 63:242-9.
- Vance, J.E. 1990. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *Journal of Biological Chemistry.* 265:7248-7256.
- Voeltz, G.K., M.M. Rolls, and T.A. Rapoport. 2002. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* 3(10):944-50

- Wang, H.-J., N. Benlimame, and I.R. Nabi. 1997. The AMF-R tubule is a smooth ilimaquinone-sensitive subdomain of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science*. 110:3043-3053.
- Wang, H.-J., G. Guay, L. Pogan, R. Sauve, and I.R. Nabi. 2000. Calcium regulates the association between mitochondria and a smooth subdomain of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 150:1489-1498.
- Watanabe, H., P. Carmi, V. Hogan, T. Raz, S. Silletti, I.R. Nabi, and A. Raz. 1991. Purification of human tumor cell autocrine motility factor and molecular cloning of its receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 266:13442-13448.
- Watanabe, H., I.R. Nabi, and A. Raz. 1991a. The relationship between motility factor receptor internalization and the lung colonizing capacity of murine melanoma cells. *Cancer Research*. 51:2699-2705.
- Watanabe, H., K. Takehana, M. Date, T. Shinozaki, and A. Raz. 1996. Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide. *Cancer Research*. 56:2960-2963.
- Wickman, K., and D.E. Clapham. 1995. Ion channel regulation by G proteins. *Physiol Rev*. 75:865-85.
- Wolfrain, L.A., G.M. Alkemade, B. Alex, S. Sharpe, W.T. Parks, and J.J. Letterio. 2002. Development and application of fully functional epitope-tagged forms of transforming growth factor-beta. *J Immunol Methods*. 266:7-18.

- Wong, S.K. 2003. G protein selectivity is regulated by multiple intracellular regions of GPCRs. *Neurosignals*. 12:1-12.
- Xie, Z., S.P. Lee, B.F. O'Dowd, and S.R. George. 1999. Serotonin 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptors form homodimers when expressed alone and heterodimers when co-expressed. *FEBS Lett*. 456:63-7.
- Xu, W., K. Seiter, E. Feldman, T. Ahmed, and J.W. Chiao. 1996. The differentiation and maturation mediator for human myeloid leukemia cells shares homology with neuroleukin or phosphoglucose isomerase. *Blood*. 87:4502-4506.
- Yelian, F.D., A. Liu, J.C. Todt, J. Lei, F. Qureshi, S.M. Jacques, G. Deppe, and A. Raz. 1996. Expression and function of autocrine motility factor receptor in human choriocarcinoma. *Gynecol Oncol*. 62:159-165.
- Yokouchi, M., T. Kondo, A. Sanjay, A. Houghton, A. Yoshimura, S. Komiya, H. Zhang, and R. Baron. 2001. Src-catalyzed phosphorylation of c-Cbl leads to the interdependent ubiquitination of both proteins. *J Biol Chem*. 276:35185-93.
- Yoon, D.Y., P. Buchler, S.T. Saarikoski, O.J. Hines, H.A. Reber, and O. Hankinson. 2001. Identification of genes differentially induced by hypoxia in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 288:882-6.
- Zhi, J., D.W. Sommerfeldt, C.T. Rubin, and M. Hadjiargyrou. 2001. Differential expression of neuroleukin in osseous tissues and its involvement in

mineralization during osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res.* 16:1994-2004.

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu, le Créateur de l'univers pour cette merveilleuse science qu'Il a mise à notre portée.

Je remercie également ma famille, pour le coussin de confort qu'est le foyer familial et pour leur humour à tout épreuve. Merci à tous mes amis qui s'intéressaient à ce que je faisais et m'encourageaient sans répit.

Ce travail n'aurait évidemment pas pu être possible sans les encouragements constants de mon directeur de recherche, Dr Ivan Robert Nabi. Il a été une source de suggestions intarissable et a très largement contribué à la réalisation de mon projet. Son excellence en tant que directeur de recherche est due au fait qu'il est à la fois homme de science et homme de coeur.

Un merci spécial à Dr Michel Bouvier et son équipe, à Monique Lagacé pour leur aide dans le volet biologie moléculaire de ce projet.

Un gros merci à toute l'équipe du laboratoire, à savoir Hao, Hélène, Anaick, Mohammad, Phuong, Ginette, Zongjian, Patrick, Thao, Nathalie et Pascal pour leur soutien technique, leurs suggestions et leur bonne humeur, ainsi qu'au département de Pathologie et Biologie cellulaire pour m'avoir accueillie en son sein.