

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

**Étude des voies de signalisation activées par la
prostaglandine F₂ α dans les cellules de cancer colorectal**

Présenté par
Sara RATNI

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Pierre Hadad, président-rapporteur
Dre Audrey Claing, directrice de recherche
Dr Richard Momparler, membre du jury

Université de Montréal

**Étude des voies de signalisation activées par la
prostaglandine F₂ α dans les cellules de cancer colorectal**

par Sara RATNI

Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Science (M.Sc.)
en pharmacologie

Avril, 2016

© Sara RATNI, 2016

Résumé

Le cancer colorectal représente la troisième forme de cancer la plus fréquente au Canada. Malgré les récents développements, aucun traitement curatif n'est disponible pour les patients diagnostiqués à un stade avancé de la maladie. Plusieurs évidences supportent un rôle important des prostaglandines dans cette maladie. En effet, une surexpression des récepteurs de type EP et FP est remarquée. Ces derniers ainsi que les molécules de signalisations intracellulaires qu'ils activent représentent donc de nouvelles cibles pour traiter ce cancer. Nous et d'autres groupes avons démontré que les protéines G monomériques sont des petits interrupteurs moléculaires importants dans la signalisation intracellulaire engagée par les récepteurs dans des cellules saines mais qu'un dérèglement de celles-ci est associé au cancer. L'objectif principal de ce projet de recherche vise donc à identifier les voies de signalisations par lesquelles le récepteur FP contribue aux capacités invasives des cellules tumorales d'origine colorectale. Notre hypothèse est que la protéine ARF6, une des 6 isoformes des ARFs, et la protéine RhoA, agissent pour coordonner l'activation des voies de signalisations associées à la migration et l'invasion cellulaire. Nos résultats ont indiqué que la stimulation des cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur FP (HA-FP) ainsi que les cellules SW480, une lignée invasive de cancer colorectal, par le PGF2 α augmentait les niveaux d'activation d'ARF6 mais également de la protéine RhoA. De plus, d'autres médiateurs et intermédiaires associés à la réorganisation du cytosquelette comme la cofiline et la chaîne légère de la myosine (MLC) ont été hautement phosphorylés suite à la stimulation par la prostaglandine. Ces observations sont associées avec une augmentation des fibres de stress dans les cellules. Nous avons tenté de déterminer si l'inhibition de ces protéines G affectait la capacité du PGF2 α à activer ces intermédiaires de signalisation ainsi que certains effets biologiques. Ainsi, nos expériences contribueront à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement du cancer colorectal.

Mots-clés : Remodelage du cytosquelette d'actine, récepteur couplé aux protéines G, récepteur FP, RhoA, ARF6, MLC, Cofiline.

Abstract

Colorectal cancer is the third most common form of cancer in Canada. Despite recent developments, no curative treatment is available for patients diagnosed at an advanced stage of the disease. Several evidences support an important role of prostaglandins in this disease. Indeed, overexpression of EP-like and FP receptors is noticed. These and intracellular signaling molecules that are activated following receptor stimulation, represent new targets for treating cancer. We and others have demonstrated that monomeric G proteins are important molecular switches coordinating intracellular signaling cascades initiated by receptors in normal cells but that disruption thereof is associated with cancer. The main objective of this research project aims to identify the signaling pathways by which the FP receptor contributes to the invasive capacity of tumor cells of colorectal origin. Our hypothesis is that the proteins ARF6, one of the 6 ARF isoforms, and RhoA protein, act to coordinate the activation of signaling pathways associated with cell migration and invasion. Our results show that stimulation of HEK293 cells that stably express the FP receptor (HA-FP) and SW480 cells, a lineage of invasive colorectal cancer that endogenously express FP receptor, by $\text{PGF2}\alpha$, increased the level of activation of ARF6, but also that of RhoA. In addition, other mediators and intermediates associated with cytoskeleton reorganization such as cofilin and the myosin light chain (MLC) were found highly phosphorylated following stimulation by prostaglandin $\text{PGF2}\alpha$. These observations are associated with an increase of stress fibers in cells. Finally, we have examined whether inhibition of ARF6 and RhoA, affected the ability of $\text{PGF2}\alpha$ to activate these effectors and some biological effects. Thus, our results will contribute to identify new potential therapeutic targets for the treatment of colorectal cancer.

Keywords: Remodeling of the actin cytoskeleton, G protein coupled receptor, FP receptor, RhoA, ARF6, MLC, Cofilin.

Table des matières

Sommaire

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xvi
Introduction.....	1
1. Le cancer colorectal.....	1
1.1. Les facteurs de risque à l'origine du cancer colorectal.....	2
1.2. Modèle multi-séquentiel de la carcinogenèse colique.....	3
2. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).....	7
2.1. Structure générale des RCPG.....	7
2.2. Le mécanisme général de la transduction du signal à travers les RCPG.....	10
3. Les protéines G monomériques.....	12
3.1. Les GTPases Ras.....	12
3.2. Les GTPases Rho.....	15
3.3. Les ARF GTPases (Facteur d'ADP-ribosylation).....	25
4. Les prostaglandines.....	27
4.1. Biosynthèse des prostaglandines.....	28
4.2. Rôle des prostaglandines.....	30
4.3. Prostaglandine PGF2 α	31
4.4. Distribution du récepteur FP de la prostaglandine PGF2 α	32
4.5. Rôle physiopathologique du PGF2 α	33

Projet et hypothèse de recherche.....	35
Matériel et méthodes.....	36
1. Réactifs et anticorps.....	36
2. Culture cellulaire.....	36
3. Immunobuvardage de type Western	37
4. Essais d'activation de RhoA et d'ARF6	37
5. Microscopie à fluorescence.....	38
6. Test de migration en chambre de Boyden.....	38
Résultats.....	40
1. Étude de la réponse du récepteur FP suite à la stimulation au PGF2 α dans le modèle cellulaire HEK293 HA-FP	40
1.1. Le PGF2 α induit l'ondulation membranaire des cellules HEK293 HA-FP.....	40
1.2. Le PGF2 α induit l'expression de la vimentine dans les cellules HEK293 HA-FP...	45
1.3. Étude de la migration des cellules HEK293 HA-FP suite à la stimulation au PGF2 α	46
2. Étude des mécanismes moléculaire impliqués dans la réponse du récepteur FP au PGF2 α dans les cellules HEK293 HA-FP et dans les cellules SW480.....	48
2.1. Activation des GTPases RhoA et ARF6 suite à la stimulation par la PGF2 α	48
2.2. La Rho GTPase RhoA stimule la réorganisation du cytosquelette d'actine ainsi que la contraction cellulaire en activant la myosine II (MLC) et la cofiline en réponse au PGF2 α	50
2.3. Le PGF2 α induit la phosphorylation de l'oncogène c-Src dans la lignée cancéreuse SW480.....	50
2.4. PGF2 α induit la phosphorylation du récepteur de l'EGF (EGFR) dans les HEK293 HA-FP mais pas dans les SW480	52
2.5. Effet du PGF2 α sur les kinases effectrices ERK, JNK et P38 de la voie des MAPK (Mitogen-activated protein kinases)	53
2.6. La GTPase ARF6 régule l'activité de la chaîne légère de myosine II (MLC) ainsi que la formation de fibres de stress dans les cellules SW480 en réponse au PGF2 α	58
Discussion.....	62

Conclusion i
Références..... ii

Liste des tableaux

Tableau 1: Incidence du cancer colorectal au Canada	2
--	---

Liste des figures

Figure 1 : Modèle de cancérogenèse colorectale de filiation adénome-carcinome.....	6
Figure 2 : Structure schématique générale des récepteurs couplés aux protéines G	9
Figure 3: Modèle de transduction du signal par l'activation / inactivation des protéines G hétérotrimériques à travers les RCPG.....	11
Figure 4: Structure cristalline des cinq Ras GTPases	13
Figure 5: Le cycle des GTPases monomériques	14
Figure 6: Ancrage de la protéine Ras par des isoprénoïdes.....	15
Figure 7: Le rôle des différentes GTPases de la famille Rho sur le cytosquelette d'actine	16
Figure 8: Structure des fibres de stress.....	18
Figure 9: Les différents types de fibres de stress	21
Figure 10: Représentation de la structure de la chaîne légère de myosine en ruban	24
Figure 11: Rôle d'ARF1 dans la régulation de l'assemblage de l'actine lors de la formation des vésicules à l'appareil de golgi	26
Figure 12: Rôle d'ARF6 à la périphérie cellulaire et dans l'organisation du cytosquelette d'actine	27
Figure 13: Voie de biosynthèse des prostanoides à partir de l'acide arachidonique	29
Figure 14: Structure du récepteur TxA₂ humain.....	31
Figure 15: Ondulation membranaire des HEK293 HA-FP	41
Figure 16: Formation des fibres de stress dans les cellules HEK293 HA-FP.....	42
Figure 17: L'inhibition de Rho diminue l'ondulation membranaire des cellules HEK-293 HA-FP	43
Figure 18: Adhérence cellulaire et formation des fibres de stress dans les cellules HEK293 HA-FP suite à la stimulation au PGF₂α.....	44
Figure 19: Surexpression de la vimentine dans les cellules HEK293 HA-FP.....	46
Figure 20: Expression de la cadhérine-E, MMP-2 et MMP-9 dans les cellules HEK293 HA- FP	47

Figure 21: Migration cellulaire des cellules HEK293 HA-FP	48
Figure 22: Activation des GTPases RhoA et ARF6 dans les cellules	49
Figure 23: Effet du PGF2α sur la phosphorylation de la MLC et de la cofiline dans les cellules HEK293 HA-FP (A, B) et SW480 (C, D)	51
Figure 24: Phosphorylation de l'oncogène c-Src dans les cellules SW480	52
Figure 25: Phosphorylation du récepteur de l'EGF sur les résidus Y⁸⁴⁵ et Y¹⁰⁸⁶	53
Figure 26: Effet du PGF2α sur la phosphorylation de la kinase ERK	55
Figure 27: Effet du PGF2α sur la phosphorylation de la kinase JNK	56
Figure 28: Effet du PGF2α sur la phosphorylation de la kinase P38	57
Figure 29: Effet du PGF2α sur la phosphorylation de MLC dans les cellules SW480 déplétées d'ARF6	59
Figure 30: Stimulation des cellules SW480 contrôles, par le PGF2α	60
Figure 31: Stimulation des cellules SW480 déplétées d'ARF6 par le PGF2α	61
Figure 32 : Les voies de signalisation activées par le PGF2 α	68

Liste des abréviations

AC : Adénylate Cyclase

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AINS : Médicament Anti-inflammatoire Non-Stéroïdiens

AIP1: *Actin Interacting Protein 1*

AMPC : Adénosine Monophosphate Cyclique

APC: *Adenomatous Polyposis Coli*

ARF : Facteur d'ADP-ribosylation

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

ARNO: *ARF Nucleotide Binding Site Opener*

AT: Arcs transversaux

ATP: Adénosine Triphosphate

BSA : Albumine de Sérum Bovin

CIN: *Chromosomal Instability*

COX1 et 2 : Cyclo-oxygénases 1 et 2

DAG: Diacylglicérol

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DP : récepteur de la prostaglandine D

ECL: Extracellulaire

EGF : Facteur de croissance épidermique (*Epidermal Growth Factor*)

EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*

EP : Récepteur de la prostaglandine E

FAK: *Focal Adhesion Kinase*

FAP : *Familial Adenomatous Polyposis*

FBS: Sérum Bovin Fœtal

FCA: Foyer de Cryptes Aberrantes

FITC : Isothiocyanate de Fluorescéine

FP : Récepteur de la Prostaglandine F
FS : Fibres de Stress
FSD : Fibres de Stress Dorsales
FSV : Fibres de Stress Ventrales
G-actine : Actine Globulaire
GAP : Protéine Activatrice de GTPase
GDP : Guanosine Diphosphate
GED : Domaine Effecteur GTPase
GEF : Facteur d'échange guanylique
GGA3: *Golgi Associated, Gamma Adaptin ear containing, ARF-binding protein 3*
GRK: Kinases spécifiques des récepteurs couplés aux protéines G
GSK3: *Glycogen Synthase Kinase 3*
GST: Glutathion-S-Transférase
GTP: Guanosine Triphosphate
h: Heure
hCG: Gonadotrophine Chorionique humaine
HEK293: *Human Embryonic Kidney cell*
hMLH1: *Human mutL homolog 1*
hmSh2: *Human mutS homolog 2*
HNPCC: *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*
HRP: *Horseradish Peroxidase*
IBD: *Inflammatory Bowel Disease*
ICL: Intracellulaire
IP₃: Inositol Triphosphate
LOH: Loss Of Heterozygoty
LPA: Lipopolyamine
MAPK : Protéine Kinase Activé par des Mitogènes
MBS: *Myosin Binding Subunit*
MEM : Milieu Minimal Essential
MeOH : Méthanol
Min: Minute

MLC : *Myosin Light Chain*
MMP: Métalloprotéinases
MMR: *Mismatch Repair*
MSI : *Microsatellites Instability*
P/S : Pénicilline/ streptomycine
PAC : Protéines cyclases associées
PAK: *p21 Activated Kinase*
PGD2: Prostaglandine D2
PGDS : Prostaglandine synthase D
PGE2 : Prostaglandine E2
PGF2 : Prostaglandine F2
PGF2 α : Prostaglandine F2 α
PGH2 : Prostaglandine Endoperoxydase H2
PGI2 : Prostacycline I2
PI | 3, 4, 5 | P3 : Phosphatidylinositol- | 3, 4, 5 | triphosphate
PIP₂: Phosphatidylinositol | 4, 5 | biphosphate
PKA: Protéine kinase A
PKC : Protéine kinase C
PLA₂ : Phospholipase A2
PLC : Phospholipase C
PLD : Phospholipase D
PMSG : *Pregnant Mare Serum Gonadotropin*
RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G
RGS: *Regulator of G Protein Signaling*
ROCK: *Rho Associated Protein Kinase*
RTK: Récepteur Tyrosine Kinase
Ser: Sérine
Src: Tyrosine Kinase Src (*Rous sarcoma oncogene cellular homolog*)
TEM: Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TGF- β : *Transforming Growth Factor*
Thr: Thréonine

TM: Transmembranaire

TxA2: Thromboxane A2

*Je dédie cet ouvrage à mes parents,
à mes frères et à ma sœur...*

Remerciements

En premier lieu, je souhaiterais exprimer ma gratitude pour ma directrice de recherche Dre Audrey Claing pour m'avoir accueilli dans son laboratoire de recherche afin d'effectuer mon travail de recherche de maîtrise, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'elle a consacré à diriger ce travail. Je la remercie également pour son accueil chaleureux à chaque fois que j'ai sollicité son aide que ce soit pour interpréter mes résultats, ma rédaction de mémoire, ainsi que pour ses multiples encouragements.

Je remercie également les IRSC pour avoir financé mon projet de recherche.

Mes remerciements vont également à Dr René Cardinal pour m'avoir aidé et faciliter toutes les démarches afin d'intégrer le département de pharmacologie de la faculté de médecine de l'université de Montréal.

En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail sans le soutien de son assistante de recherche Shirley Campbell. Merci à tous les autres membres du laboratoire. L'intérêt manifesté à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de « L'apprenti-chercheur », même-ci mon parcours demeure encore loin d'être achevé.

Je souhaiterais aussi adresser ma gratitude aux autres professeurs qui ont accepté de corriger mon mémoire, Dr Pierre Haddad ainsi que Dr Richard Momparler.

Ces remerciements seraient incomplets si je n'en adressais pas à la faculté des études supérieures de l'université de Montréal de m'avoir octroyé la bourse d'exemption des frais de scolarité supplémentaires pour étudiants internationaux.

Ma reconnaissance va à ceux qui ont plus particulièrement assuré le soutien affectif de ce travail, à mes amis, aux personnes qui me sont très chers mes parents, mes frères et ma sœur qui ont toujours été à mes côtés afin de poursuivre mes études seule, à des milliers de kilomètres loin d'eux.

Introduction

1. Le cancer colorectal

Depuis plusieurs décennies, le cancer est un important problème de santé publique dans le monde. En terme d'incidence, outre les cancers traditionnellement liés à des infections (cancers du foie, de l'estomac et du col de l'utérus), sont venus s'ajouter des cancers les plus fréquemment diagnostiqués: du poumon (avec 1,8 million de cas, soit 13,0 % du total), du sein (1,7 million de cas, ou 11,9% du total) et le cancer colorectal (1,4 million de cas, ou 9,7% du total) (Bray, Ren et al. 2013).

Avec 25 100 nouveaux cas par an et le nombre de décès annuels de 9 300, le cancer colorectal arrive au troisième rang des cancers les plus courants au Canada (Société de recherche sur le cancer (www.cancer.ca). Avant 50 ans, les taux d'incidence sont faibles et proches entre les deux sexes puis les taux augmentent avec l'âge, plus rapidement chez l'homme que chez la femme. Ce type de cancer demeure une des causes les plus importantes de mortalité et de morbidité puisqu'il est diagnostiqué à un stade tardif lorsque du sang est décelé dans les selles ou alors de fortes douleurs abdominales se font ressentir. D'où la recherche de sang occulte dans les selles, demeure le seul processus à la fois simple et accessible qui permet de dépister et de réduire le nombre de décès attribuable au cancer colorectal. Enfin, des campagnes de détection ont été mises en place pour essayer de dépister le plus précocement le cancer colorectal.

Bien que l'incidence soit en augmentation croissante dans la plupart des régions du monde, il y a d'énormes inégalités de distribution entre les pays en développement et les pays développés. Les tendances mondiales font état d'écarts statistiquement significatifs dans les pays industrialisés, ce qui conduit à une telle différence de répartition géographique des cancers associés à des facteurs de risque génétiques, alimentaires et hormonaux. Le Canada fait partie des pays où ce cancer est le plus répandu. Cependant, on estime qu'en 2015 : 25 100 Canadiens recevront un diagnostic de cancer colorectal (**Tableau 1**).

Incidence	25100 nouveaux cas*
Mortalité par cancer	9300 décès*
Probabilité d’être atteint	1 homme sur 14*
	1 femme sur 16*
Probabilité d’en mourir	1 homme sur 29*
	1 femme sur 32*

Tableau 1: Incidence du cancer colorectal au Canada

(Société canadienne du cancer (www.cancer.ca), page consultée le 10 janvier 2016).

1.1. Les facteurs de risque à l’origine du cancer colorectal

1.1.1. Les facteurs environnementaux : Des recherches récentes ont montré que les facteurs environnementaux, sont susceptibles d’augmenter le risque de développer un cancer du côlon.

- **Alimentation et sédentarité:** L’alimentation est un facteur de risque important. Des études ont suggéré qu’un changement de diète plus riche en aliments d’origine végétale (légumes, fruits et céréales), pourrait diminuer le risque d’apparition du CRC de 70% (Boyle and Langman 2000). De plus, la sédentarité et le surpoids sont des facteurs de risque additionnels. Par contre, l’activité physique est un facteur protecteur.
- **Le tabagisme et l’alcool :** La consommation de tabac et d’alcool double le risque de développer un CRC (Andersen, Agerstjerne et al. 2009). Toutefois, le risque d’apparition d’un tel cancer chez les alcooliques et les fumeurs est aussi élevé que chez les personnes possédant des antécédents familiaux. Des études ont suggéré que 12% des décès seraient attribuables au tabac (Zisman, Nickolov et al. 2006, Tsong, Koh et al. 2007).
- **Les maladies inflammatoires de l’intestin (IBD) :** De nombreuses études ont montré une corrélation étroite entre les maladies inflammatoires de l’intestin, telles que la colite ulcéreuse chronique, la maladie de Crohn, et le risque accru

de développer un cancer colorectal chez les personnes atteintes (Triantafillidis, Nasioulas et al. 2009).

1.1.2. Les facteurs familiaux et héréditaires : Ce type de cancer est subdivisé en deux grands groupes distincts : héréditaire et sporadique :

- **Le syndrome du cancer colique héréditaire :** C'est une maladie à transmission autosomique dominante avec ou sans polypose:

- **La FAP ou le syndrome de Gardner:** Liée à une mutation du gène APC localisé au niveau du bras long du chromosome 5 avec une perte de l'hétérozygotie ou LOH (Loss of heterozygoty).

- **La HNPCC ou le syndrome de Lynch :** Due a des mutations des gènes Hmsh2 (localisé sur le chromosome 2), Hmlh1 (localisé sur le chromosome 3) et Hpms2 (localisé sur le chromosome 7) codants les enzymes de réparation de l'ADN (Grady and Markowitz 2002), par un phénomène particulier désigné par le terme MSI (pour microsatellites instability) (Kinzler and Vogelstein 1996, Corpet and Pierre 2005).

- **Le cancer colique sporadique :** La plupart des cancers colorectaux sont de type sporadique, résultant de mutations génétiques spontanées successives des gènes tels que : APC, Hmlh1 et Hmsh2 (Suraweera, Robinson et al. 2006).

1.2. Modèle multi-séquentiel de la carcinogenèse colique

Le cancer colorectal est une tumeur maligne qui s'installe au niveau de la muqueuse du colon ou du rectum. Elle émerge à la suite d'une accumulation d'altérations génétiques des gènes supprimeurs de tumeurs et des oncogènes, menant à la dérégulation de plusieurs voies de signalisation cellulaire contrôlant plusieurs processus tels que la prolifération, la survie, la migration ou encore l'invasion cellulaire. Selon ces données d'altération, un modèle de progression tumorale colique a été établi (Kinzler and

Vogelstein 1996). Le développement de ce type de cancer, de l'adénome au carcinome, peut prendre plusieurs décennies.

La carcinogénèse colorectale est un processus multi-séquentiel, qui débute par l'apparition d'une hyper-prolifération de l'épithélium colique. Cette prolifération anormale mène au développement de foyers de cryptes aberrantes (FCA) (Kinzler and Vogelstein 1996). Il existe deux types de foyers de cryptes aberrantes ; sous la forme d'une hyperplasie, qui se traduit par une augmentation de la prolifération cellulaire anormale ou sous la forme d'une dysplasie, c'est-à-dire une désorganisation des cellules conduisant à une architecture anormale des glandes. Les foyers de cryptes aberrantes dysplasiques ont été définis comme étant la première anomalie détectable dans la séquence de la carcinogénèse classique : foyer de cryptes aberrantes / adénomes / adénocarcinomes qui représenterait la voie classique des cancers colorectaux (Pretlow, Barrow et al. 1991). Ces foyers donnent naissance aux adénomes. Les adénomes sont des tumeurs bénignes caractérisées par une dysplasie de gravité croissante. Une partie de ces adénomes va progresser vers le carcinome invasif.

Tel que mentionné, la cancérogenèse colique implique des mutations et/ou des pertes d'hétérozygoties de gènes suppresseurs de tumeurs et des mutations des oncogènes. Deux voies de cancérogenèse coliques sont décrites:

- Des mutations des gènes MMR (Mis Match Repair), responsables de la réparation de l'ADN, entraînent une instabilité de microsatellites et un fort indice de mutation du génome (phénotype Microsatellite Instability, MSI). Ce phénotype ne représente que 15% des cancers colorectaux, avec une fréquence de 85 % des cancers colorectaux héréditaires sans polypose (HNPCC) et 15% de type sporadique (Kinzler and Vogelstein 1996).
- De nombreuses pertes d'hétérozygoties chromosomiques (loss of heterozygosity, LOH) représentant 85% des cancers colorectaux, définissent le phénotype CIN (Chromosomal Instability). Ce phénotype est rencontré aussi bien chez les patients atteints de FAP que ceux atteints de cancer colorectal sporadique avec une incidence de 15 et 85%, respectivement (Kinzler and Vogelstein 1996).

Le modèle de filiation adénome – carcinome (Hill, Morson et al. 1978) est l'hypothèse acceptée aujourd'hui dans le processus de cancérogenèse colorectale. Celui-ci propose que la lésion initiale se développe en adénome qui évoluera ensuite en tumeur maligne. En 1990, Fearon et Vogelstein ont proposé une base moléculaire de la séquence adénome–carcinome, en décrivant un processus multiphasique au cours duquel les cellules épithéliales de l'intestin accumulent des altérations génétiques de multiples gènes (Fearon and Vogelstein 1990) (**Figure 1**).

Au cours de la cancérogenèse colorectale, de nombreuses voies de signalisations sont impliquées par une activation inadéquate ou ininterrompue du signal mitotique, ce qui a pour conséquence une prolifération incontrôlée et donc la transformation maligne. Cinq voies de signalisations sont fréquemment altérées : la voie de signalisation Wnt/APC, la voie de signalisation du TGF- β , la voie de K-Ras, la voie de P53 et la voie Notch.

- **La voie Wnt et le gène APC** : Cette voie de signalisation est impliquée dans le phénotype des cancers colorectaux LOH et MSI avec une fréquence d'activation proche de 80% (Sparks, Morin et al. 1998, Liu, Dong et al. 2000). Le gène APC est un partenaire essentiel du processus de cancérogenèse colorectale, il joue un rôle important dans le maintien de l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire (Kinzler and Vogelstein 1996). Cependant, sa mutation a pour conséquence l'accumulation cytosolique de la β -caténine, qui après sa translocation vers le noyau induit l'expression des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire (Korinek, Barker et al. 1997, van de Wetering, Cavallo et al. 1997, Jeon, Jeong et al. 1998).

Entre autre, la mutation de ce gène a pour conséquence la déstabilisation du complexe multi protéique contenant l'Axine 1, la β -caténine et GSK3 (Martinez, Bhattacharya et al. 2005).

- **La voie de signalisation du TGF- β (Transforming Growth Factor)** : Le TGF- β joue un rôle crucial au cours de la cancérogenèse colorectale tout en stimulant l'invasion et l'angiogenèse, favorisant ainsi l'émergence de métastases (Takayama, Miyanishi et al. 2006).

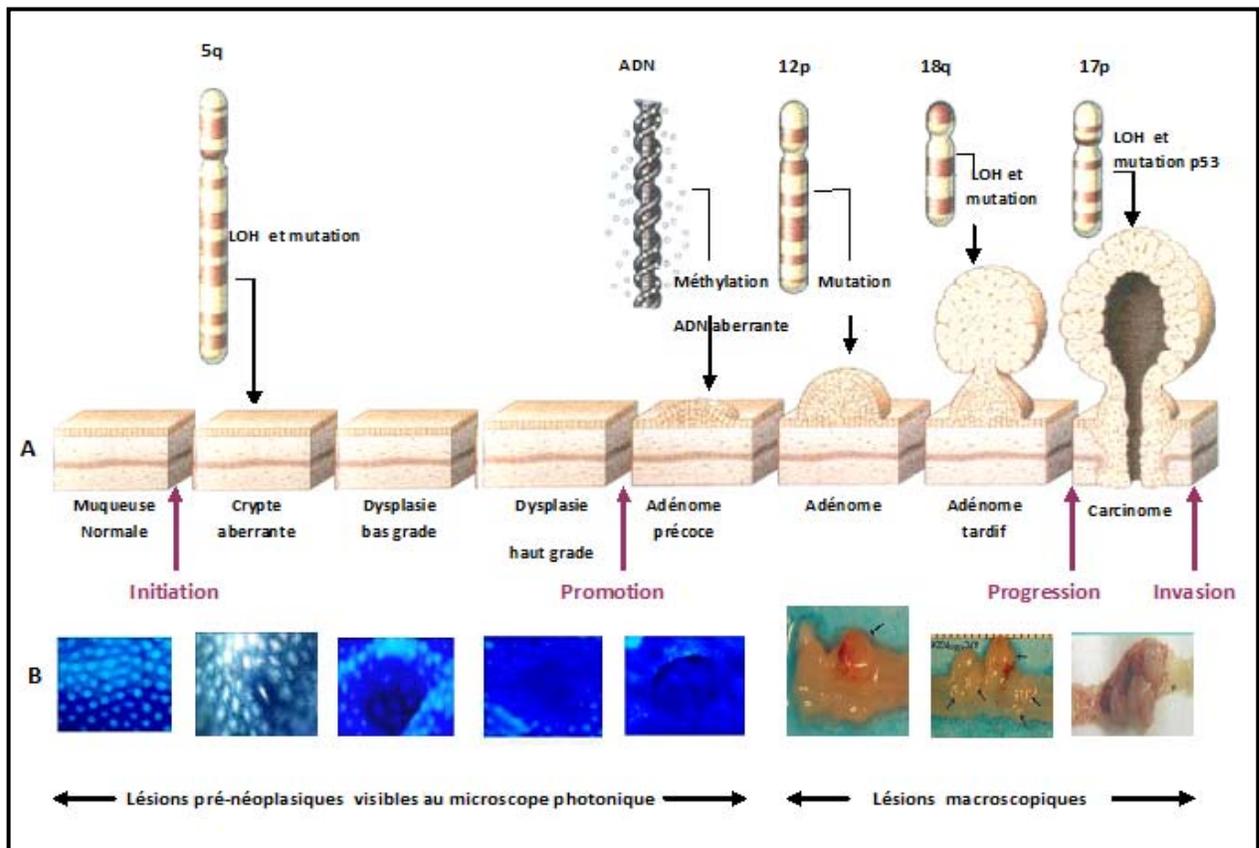


Figure 1 : Modèle de cancérogenèse colorectale de filiation adénome-carcinome.

(A) Les changements génétiques associés au développement du cancer colorectal LOH (Fearon and Vogelstein 1990). Au cours de la première phase dans le groupe qui porte le phénotype LOH, aucune modification phénotypique n'est observée et le premier événement pourrait être une mutation du gène APC (Weinberg 1996). La perte d'allèle au niveau du bras long 5q du gène APC, permet la formation des cryptes aberrantes dysplasiques (FCA) qui évoluent en adénomes précoces (Takayama, Ohi et al. 2001). La mutation du gène K-Ras peut activer un signal de croissance cellulaire permettant l'évolution des adénomes précoces en adénomes intermédiaires. La mutation du gène p53 (gène suppresseur des tumeurs) jouerait un rôle primordial dans l'acquisition du phénotype malin, aboutissant à la tumeur proprement dite ou adénocarcinome (Weinberg 1996). (B) Aspect microscopique de la surface de la muqueuse colique colorée au Bleu de méthylène, observée au microscope photonique. La progression tumorale est caractérisée par l'apparition des foyers de cryptes aberrantes et de micro-adénomes jusqu'à formation d'adénome précoce. L'aspect macroscopique du colon a montré des cryptes aberrantes plus grosses et surélevées ainsi que des rougeurs témoignant de l'installation de l'angiogenèse.

- **La voie de signalisation K-Ras** : Environ 20 % des tumeurs humaines possèdent une mutation de l'une des isoformes de Ras. La mutation du gène K-Ras survient dans les stades précoces de la cancérogenèse colorectale en absence de toute mutation du gène APC (Janssen, el-Marjou et al. 2002).
- **La voie de signalisation P53** : La mutation du gène P53 (gène suppresseur de tumeur) jouerait un rôle primordial dans l'acquisition du phénotype malin (Kinzler and Vogelstein 1996).
- **La voie de signalisation Notch** : Le gène Notch est un acteur clé de la signalisation cellulaire intestinale. Outre la voie Wnt, la voie Notch est aussi impliquée dans le contrôle de la prolifération et de la mort cellulaire ainsi que dans le maintien des cellules progénitrices de l'intestin. L'activation aberrante de cette voie, suite à des altérations de ce gène, entraîne une augmentation spectaculaire de la prolifération cellulaire donnant naissance à des tumeurs dans l'intestin (Crosnier, Stamatakis et al. 2006).

2. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

2.1. Structure générale des RCPG

Tous les membres de la superfamille des RCPG partagent la même architecture de base de 7 segments transmembranaires (TM), dont un domaine extracellulaire amino-terminal (N) et une queue intracellulaire carboxy-terminale (C). Ces récepteurs membranaires peuvent reconnaître une diversité de signaux extracellulaires physiques et chimiques, telles que des peptides, des nucléotides et des amines. Les plus grandes variations structurales sont trouvées dans les terminaisons N et C des séquences des RCPG qui peuvent varier de taille. Les RCPG sont non seulement codés par des gènes eucaryotes, mais aussi par des gènes viraux. Les 7 hélices TM sont reliées par trois boucles intracellulaires et trois extracellulaires. Les boucles extracellulaires des RCPG peuvent être glycosylées et contiennent deux résidus cystéine hautement conservés, qui permettent aux liens disulfure de stabiliser la structure des récepteurs de la grande famille de la rhodopsine. La classe rhodopsine comprend des récepteurs pour une grande variété de petites molécules, des peptides, des neurotransmetteurs,

des hormones, des récepteurs olfactifs, des pigments plastiques, des récepteurs type 2 de goût et cinq récepteurs de phéromones (récepteurs V1).

Les hélices contiennent des domaines extracellulaires N-terminaux (ECL1, ECL2 et ECL3) de taille variable, allant de 154 résidus (récepteurs de la calcitonine) à 36 (résidus du récepteur de la rhodopsine) (**Figure 2**). Ce domaine contient des motifs de N-glycosylation sur les résidus d'asparagine, qui influence le trafic intracellulaire des récepteurs vers la membrane plasmique. De plus, les résidus de cystéine dans les boucles ECL1 et ECL2, peuvent affecter le repliement des protéines essentielles d'un récepteur fonctionnel à la surface de la cellule (Baldwin 1994). L'extrémité N-terminale de certains RCPG est impliquée dans la liaison du ligand, l'activation et la régulation des voies de signalisation. Les 7 hélices TM des RCPG sont agencées pour former un noyau central sous forme d'anneau hydrophobe qui est fortement serré. Comme pour la plupart des protéines transmembranaires, les résidus d'acides aminés hydrophobes sont probablement disposés pour faire face à la bicouche lipidique, alors que les résidus d'acides aminés hydrophiles font face vers le noyau. En outre, l'interaction hélice-hélice contribue à la structure tertiaire fonctionnelle des RCPG nécessaires pour le repliement de la structure 3D, la stabilité du récepteur ainsi que pour la liaison du ligand.

Les boucles ont un domaine intracellulaire carboxy-terminal (ICL1, ICL2 et ICL3), qui sont impliqués dans plusieurs aspects de la signalisation. Ce domaine contient des résidus Sérine et / ou Thréonine qui servent de sites de phosphorylation par les kinases pour médier une activation et/ou une désensibilisation des récepteurs.

Certains RCPG contiennent un résidu cystéine dans le domaine C-terminal, qui peut servir de site pour la palmitoylation. Cela peut ainsi créer une quatrième hélice α antiparallèle à la membrane en raison de la capacité de la cystéine palmitoylée à s'insérer dans la membrane plasmique. De plus, l'extrémité C-terminale peut être impliquée dans les interactions avec d'autres protéines qui médient la signalisation cellulaire, tels que les protéines PDZ et les protéines Homer et Vesl (Baldwin 1994). Les résidus Sérine carboxy-terminaux sont phosphorylés par des kinases des RCPG (GRK). Les GRK sont des Sérine / Thréonine protéines kinases des mammifères. La phosphorylation du récepteur par GRK initie le processus de désensibilisation des récepteurs activés (Pingret, Journet et al. 1998).

Bien que les structures cristallines de rayons X de plusieurs GRK aient été résolues, le mécanisme d'interaction avec les RCPG demeure très mal connu. Récemment, l'équipe de Pao

a proposé un mécanisme par lequel l'extrémité N-terminale de la protéine GRK2 forme une interaction intramoléculaire qui favorise de manière sélective l'activité catalytique de la kinase vers le RCPG (Pao, Barker et al. 2009).

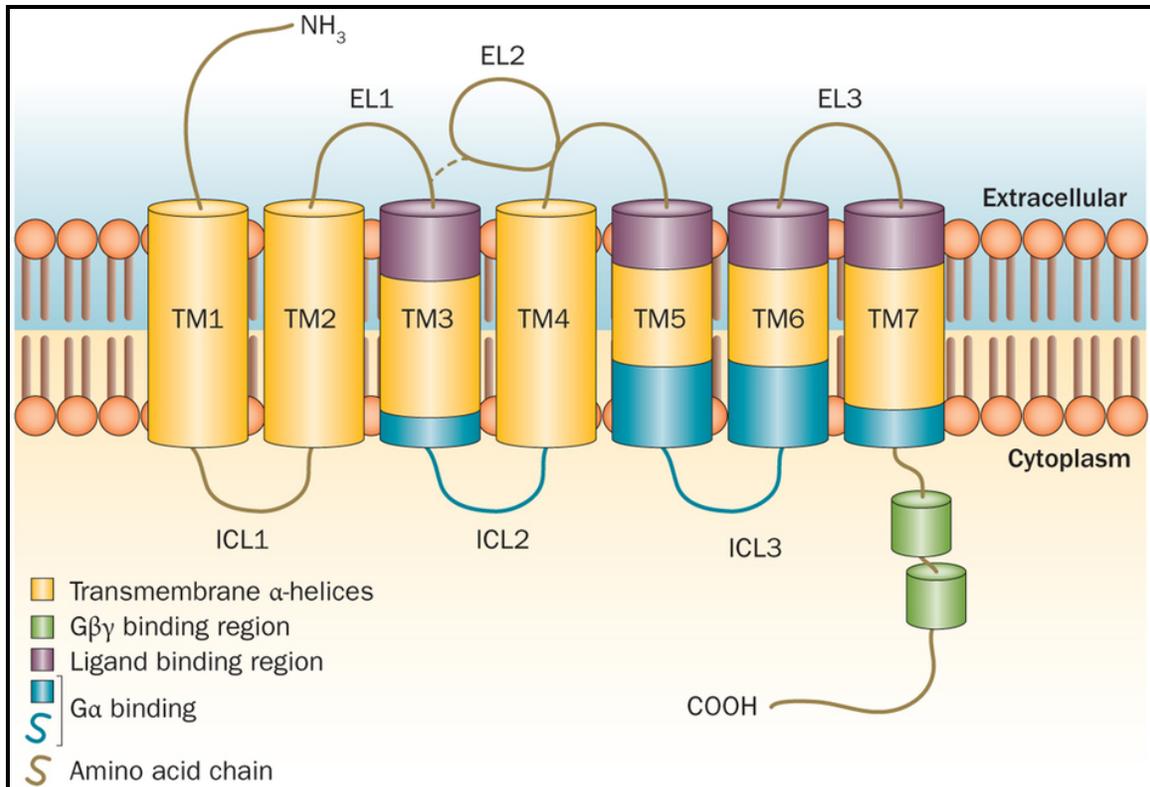


Figure 2 : Structure schématique générale des récepteurs couplés aux protéines G

Représentation schématique d'un RCPG, en deux dimensions (Spiegel 1996). Les sept domaines transmembranaires hydrophobes (TM1 à TM7), sont reliés par trois boucles intracellulaires (ICL1, ICL2, ICL3) et trois extracellulaires (EL1, EL2, EL3). Un pont disulfure relie EL1 à EL2. L'extrémité amino-terminale (NH₂) est extracellulaire, l'extrémité carboxy-terminale (COOH) est intracellulaire. Cette dernière peut présenter un ancrage lipidique dans la membrane, ce qui crée une quatrième boucle, ICL4 (Neumann, Khawaja et al. 2014).

2.2. Le mécanisme général de la transduction du signal à travers les RCPG

Le cycle d'activation/inactivation des protéines G hétérotrimériques, par les RCPG est illustré dans **Figure 3**. Dans l'état inactif, $G\alpha$ est lié auGDP et associé aux sous unités $\beta\gamma$. La liaison d'une molécule agoniste au RCPG conduit à l'activation de la protéine G, tout en catalysant l'échange du GDP par le GTP sur la sous-unité $G\alpha$. Les protéines $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ une fois activées, se lient à divers effecteurs ainsi qu'à des commutateurs afin de générer différents seconds messagers, qui vont à leur tour réguler l'activation de nombreuses molécules effectrices. La protéine $G\alpha$ activée peut interagir avec différentes classes d'effecteurs tels que l'adénylate cyclase et la phospholipase C (Cabrera-Vera TM 2003). L'activité intrinsèque GTPase de certaines $G\alpha$ entre ensuite en jeu, et mène à la conversion du GTP lié en GDP et donc l'inactivation des protéines G. L'activité GTPase des sous-unités $G\alpha$ peut également être régulée par les protéines RGS (Regulator of G-protein signalling) ainsi que d'autres effecteurs tels que des enzymes effectrices (les cyclases). Les protéines RGS sont des régulateurs négatifs de la signalisation des protéines G. Ils jouent le rôle d'analogue aux protéines GAP (GTPase-activating protein) impliquées dans le cycle d'inactivation des petites protéines G monomériques, et ce en accélérant l'activité GTPasique des sous-unités $G\alpha$ (Dohlman and Thorner 1997).

Plusieurs chercheurs ont émis l'hypothèse que le dimère $\beta\gamma$ agit comme régulateur négatif et peut bloquer l'activation de l'adénylate cyclase (Gilman 1984, Gilman 1987). Ensuite d'autres approches sont venues contredire cette hypothèse, élucidant que la sous-unité $\beta\gamma$ pourrait activer le canal muscarinique K^+ et réguler ainsi positivement ses effecteurs (Logothetis, Kurachi et al. 1987, Ford, Skiba et al. 1998).

Enfin, la sous-unité $\beta\gamma$ agit comme un régulateur positif d'un grand nombre d'effecteurs en plus du canal K^+ , y compris l'adénylate cyclase, la phospholipase C- β (β -AP), la phospholipase A_2 (PLA_2), la phosphatidylinositide3-kinase (PI3-kinase), et la kinase des récepteurs couplés aux protéines G, GRK. Aussi, $G\beta\gamma$ peut activer la sous-unité $G\alpha$ (Rondard, Iri et al. 2001). Il est maintenant clair que de nombreux effecteurs sont régis à la fois par des sous-unités α et $\beta\gamma$.

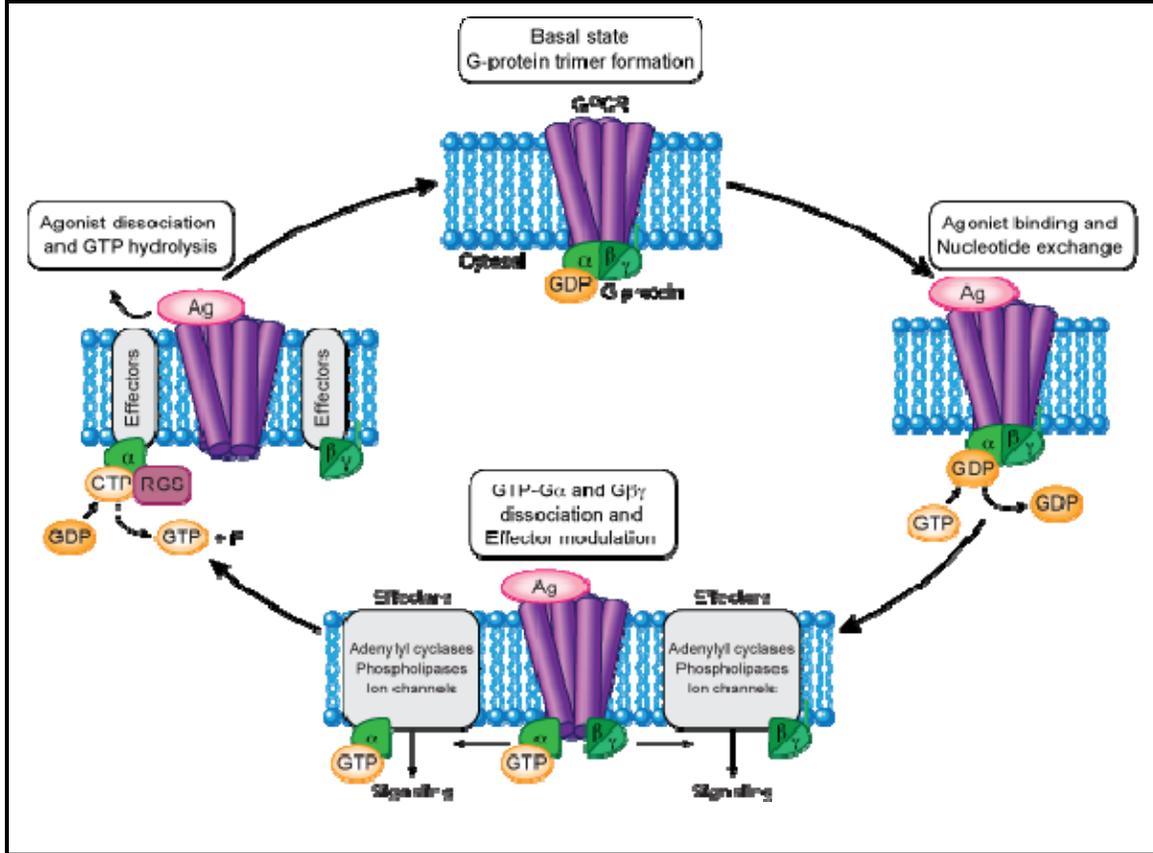


Figure 3: Modèle de transduction du signal par l'activation / inactivation des protéines G hétérotrimériques à travers les RCPG

Les sous-unités des protéines G hétérotrimériques ($G\alpha$ et $G\beta\gamma$) à l'état inactif sont associées les uns aux autres. Dans l'état d'inactivation le GDP est lié à $G\alpha$ ($G\alpha$ GDP). Dans la transduction du signal, le premier effecteur est le RCPG, qui s'active en modifiant sa conformation, une fois le ligand agoniste lié à sa région extracellulaire. Dans l'état actif le GTP est lié à $G\alpha$ ($G\alpha$ -GTP). Désormais, $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ se dissocient et ont leurs propres effecteurs pour transmettre les signaux et initier des réponses de signalisation intracellulaires uniques. Après la transduction du signal, les protéines RGS viennent accélérer l'activité GTPasique $G\alpha$ et hydrolyser ainsi le GTP lié ($G\alpha$ -GTP) en GDP et P_i et inactive le complexe de la protéine G ce qui favorise la réassociation de $G\alpha$ avec $G\beta\gamma$. Dans cet état, le GDP est à nouveau lié à $G\alpha$ ($G\alpha$ -GDP). De cette façon, le cycle d'activation et d'inactivation est terminé (Beutler 2011).

3. Les protéines G monomériques

Ce sont de petites protéines dont la masse moléculaire varie entre 20 et 30 kDa. Elles ont une structure semblable à celle de la sous-unité α des protéines G hétérotrimériques, ancrées à la face cytoplasmique de la membrane plasmique par une modification post-traductionnelle. Elles constituent la superfamille Ras (**Figure 4**), parmi lesquelles on distingue :

Ras : impliquée dans la transduction des signaux qui régulent la prolifération et la différenciation cellulaire.

Rho : impliquée dans la régulation et le remodelage du cytosquelette d'actine.

ARF : impliquée dans la formation vésiculaire et la réorganisation du cytosquelette d'actine.

Rab : impliquée dans le ciblage et la fusion des vésicules.

Ran : impliquée dans le transport nucléaire.

Elles sont considérées comme des interrupteurs moléculaires des voies de signalisation. Toutefois, leur interaction avec d'autres protéines en amont des voies de signalisation mène à un changement conformationnel du site de liaison du GDP. Le GTP prend alors la place du GDP et fait passer la protéine G d'une forme inactive liée au GDP à une active liée au GTP. Cette dernière reste active tant que le GTP n'a pas été hydrolysé par le facteur d'échange de nucléotides GAP (G activating protein) (**Figure 5**).

3.1. Les GTPases Ras

Les protéines Ras sont considérées comme des composants transformant (vu leur pouvoir tumorigénique) isolés à partir de rétrovirus. Elles ont une masse moléculaire de 21 kDa. On distingue, H-Ras isolé du virus du sarcome d'Harvey, K-Ras isolé de celui du sarcome de Kirsten et le troisième membre de la famille, N-Ras, qui a été découvert dans une lignée cellulaire de neuroblastome (Kirsten, Platz et al. 1962, Harvey 1964). Les trois isoformes de Ras ont des séquences d'acides aminés identiques à 85%, et aucune variabilité fonctionnelle n'a été clairement définie. Elles sont synthétisées dans le cytosol, et sous des modifications post-traductionnelles tels que la farnésylation (prénylation), la palmitoylation ou alors la

myristoylation, elles se lient à la membrane plasmique (Hancock 2003). Une chaîne polypeptidique simple de 189 acides aminés les constitue et les relie à la membrane par une queue lipidique constituée par des isoprénoïdes et des acides gras saturés (**Figure 6**).

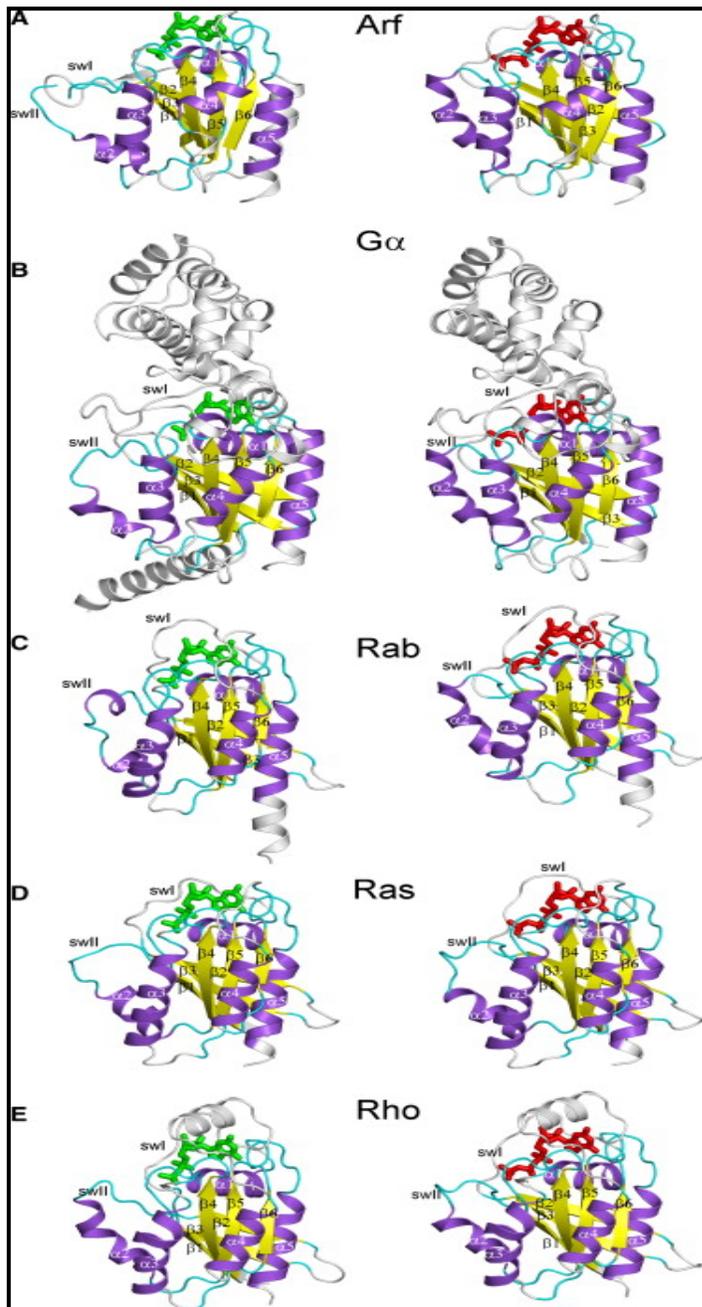


Figure 4: Structure cristalline des cinq Ras GTPases

La liaison du GDP à gauche, et du GTP à droite avec : (A) : ARF, (B) : $G\alpha$, (C) : Rab, (D) : Ras, (E) : Rho. Les couleurs vert et rouge représentent les nucléotides GDP et GTP respectivement (Raimondi, Orozco et al. 2010).

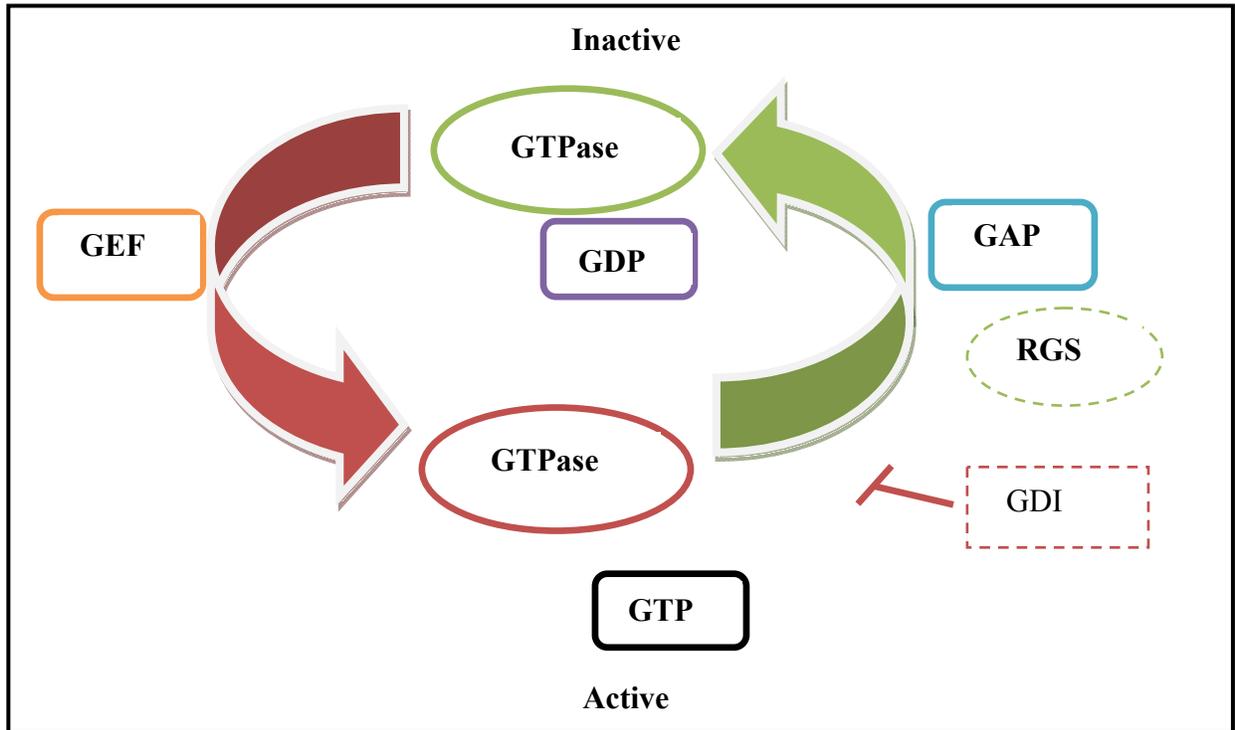


Figure 5: Le cycle des GTPases monomériques

Entre la forme inactive et active : les GTPases commutatrices existent sous deux formes inter-convertibles. Son inactivation nécessite l'hydrolyse du GTP, accélérée par les GAP (Protéines accélérant les GTPases), par les RGS (Régulateurs de la signalisation des protéines G) et inhibée par les GDI (Inhibiteurs de la dissociation des nucléotides guanines). Sa réactivation est favorisée par les GEF (Facteur d'échange des nucléotides guanines) (Lodish 2005).

Les Ras exercent leurs effets grâce à des protéines effectrices, et sont elles-mêmes régulées par les facteurs d'échange de nucléotides GEF/GAP. Elles agissent sur plusieurs voies métaboliques en aval des récepteurs des facteurs de croissance et ce, par activation de kinases (cascade de phosphorylations). Elles sont impliquées dans la régulation de la prolifération, de la différenciation, de la survie cellulaire ainsi que dans l'organisation du cytosquelette. Elles favorisent également l'autophagie, ce qui entraîne la transformation maligne des cellules normales (Guo, Chen et al. 2011, Kim, Woo et al. 2011).

3.2. Les GTPases Rho

Les protéines Rho appartiennent à la superfamille Ras des protéines G, de faible masse moléculaire (entre 20 et 30 kDa). Elles subissent également une étape de prénylation (farnésylation ou géranylgeranylation) ; maturation post-traductionnelle nécessaire à leur localisation subcellulaire ainsi qu'à leur activité biologique (Cuider ALLAL 2002).

Elles comprennent plus d'une dizaine de membres dont principalement Rho, Rac et Cdc42.

Elles jouent le rôle de commutateurs et d'interrupteurs moléculaires de la signalisation intracellulaire comme toute autre GTPase, contrôlant ainsi de nombreux processus biologiques. Les protéines Rho activées stimulent des protéines effectrices dont plusieurs Ser/Thr kinases telles que ROCK ou PKN pour RhoA et PAK pour Rac et Cdc42. Ces dernières activent à leur tour des voies de signalisation cellulaires qui interviennent dans l'organisation du cytosquelette d'actine, la formation de fibres de stress, les mouvements de la membrane cellulaire (Rac et Cdc42) assurant ainsi la motilité et l'adhésion cellulaire (**Figure 7**).

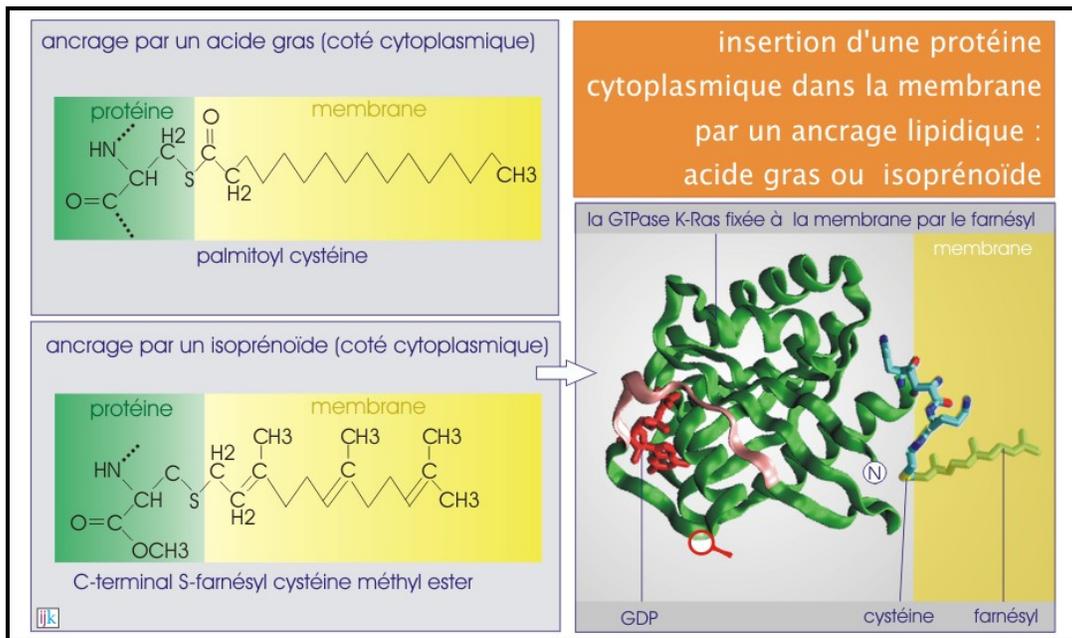


Figure 6:Ancre de la protéine Ras par des isoprénoïdes

Le farnésyl, formé de 15 carbones ou le géranylgeranyl de 20 carbones, se lie aux résidus cystéines localisés dans la région carboxyl-terminale ou dans des motifs structuraux. Ou alors, par des acides gras saturés tels que le myristate formé de 14 carbones qui s'ajoute sur la glycine en position amino-terminale, ou le palmitate (long de 16 carbones) qui est lié à la cystéine en position carboxy-terminale (www.ulyse.u-bordeaux.fr).

3.2.1. Rôle des Rho GTPases

La capacité d'une cellule eucaryote à maintenir ou à modifier sa forme et son degré d'attachement au substrat en réponse à des signaux extracellulaires dépend largement du réarrangement du cytosquelette d'actine. Ceci joue un rôle crucial dans les processus tels que la motilité cellulaire, la cytokinèse et la phagocytose (Narumiya, Ishizaki et al. 1997).

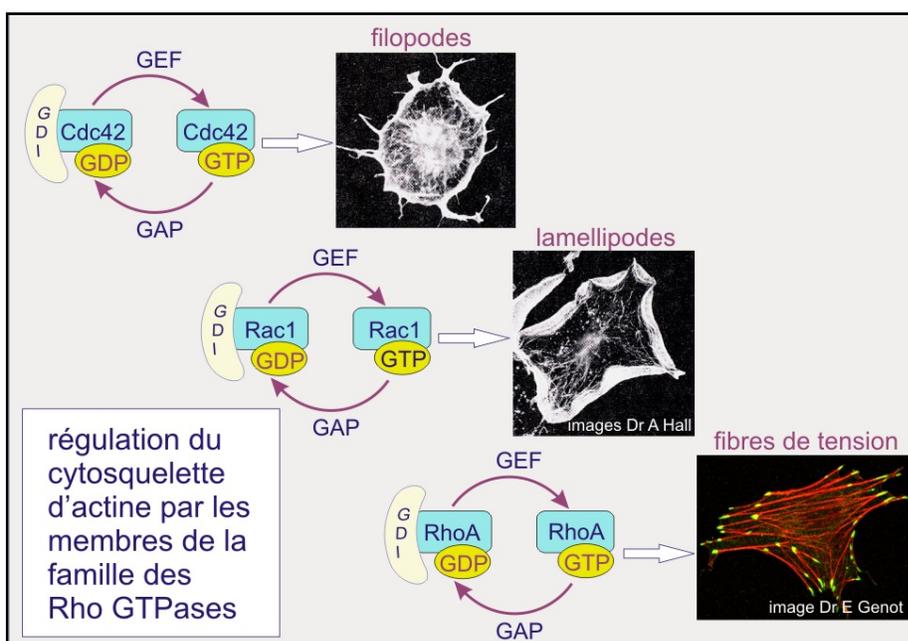


Figure 7: Le rôle des différentes GTPases de la famille Rho sur le cytosquelette d'actine

Le rôle de ces Rho GTPases a été élucidé dans un modèle cellulaire de fibroblastes. Lorsque ces Rho sont sous forme GTP : Cdc42 joue un rôle dans la formation des filopodes, Rac1 dans la formation des lamellipodes, tandis que RhoA intervient essentiellement dans la formation des fibres de stress (www.ulyse.u-bordeaux.fr).

3.2.1.1. Formation des fibres de stress

Les fibres de stress sont des structures élevées du cytosquelette d'ordre composées de faisceaux d'actine filamenteuse réticulés, et dans de nombreux cas, des protéines motrices de la myosine, qui couvrent une longueur de 1-2 micromètres (Cramer, Siebert et al. 1997). Au moins 4 types de fibres de stress ont été identifiés dans des cellules de mammifères

(Tojkander, Gateva et al. 2012). Ces dernières sont nommées: fibres de stress dorsales, ventrales, arcs transversaux, et capuchon de l'actine périnucléaire. Ces fibres récemment identifiées, sont des médiateurs importants dans la mécano-transduction nucléaire. Chaque type de fibre de stress est défini par son emplacement dans la cellule, sa morphologie et sa fonction aux points d'adhésion focaux (Naumanen, Lappalainen et al. 2008). La présence de protéines motrices dans les fibres de stress permet leur contractilité. Dans les cellules de mammifères, les fibres de stress subissent un assemblage et un désassemblage. Cela leur permet de maintenir la tension cellulaire et, ce, sous plusieurs modifications en réponse à différentes forces (par exemple, la contrainte mécanique (Kaunas, Nguyen et al. 2005, Hirata, Tatsumi et al. 2007).

L'assemblage des fibres de stress peut être décrit comme une série d'étapes définies. Environ 10 à 30 filaments d'actine sont regroupés en parallèle par l'intermédiaire de protéines de réticulation. L' α -actinine, par exemple, forme des bandes le long des fibres de stress (Lazarides 1975) contrairement à la filamine (Wang, Ash et al. 1975), qui se lie de manière uniforme le long des fibres (Pavalko, Otey et al. 1989). Dans les fibres de stress ventrales et des arcs transversaux, les bandes de α -actinine semblent s'alterner avec les faisceaux de myosines non-musculaires (par exemple la myosine II) à une périodicité de 1 à 2 μm (Weber and Groeschel-Stewart 1974, Pavalko, Otey et al. 1989) (**Figure 8**).

Outre la myosine et α -actinine, les fibres de stress contiennent également de nombreuses autres protéines telles que la fascine (Adams 1995), la tropomyosine, la caldesmone (Lazarides 1975), et des protéines régulatrices telles que la chaîne légère de la myosine kinase (Peterson, Rajfur et al. 2004). Les fonctions exactes de la majorité de ces protéines dans l'activité de fibres de stress et l'assemblage sont encore largement incertaines.

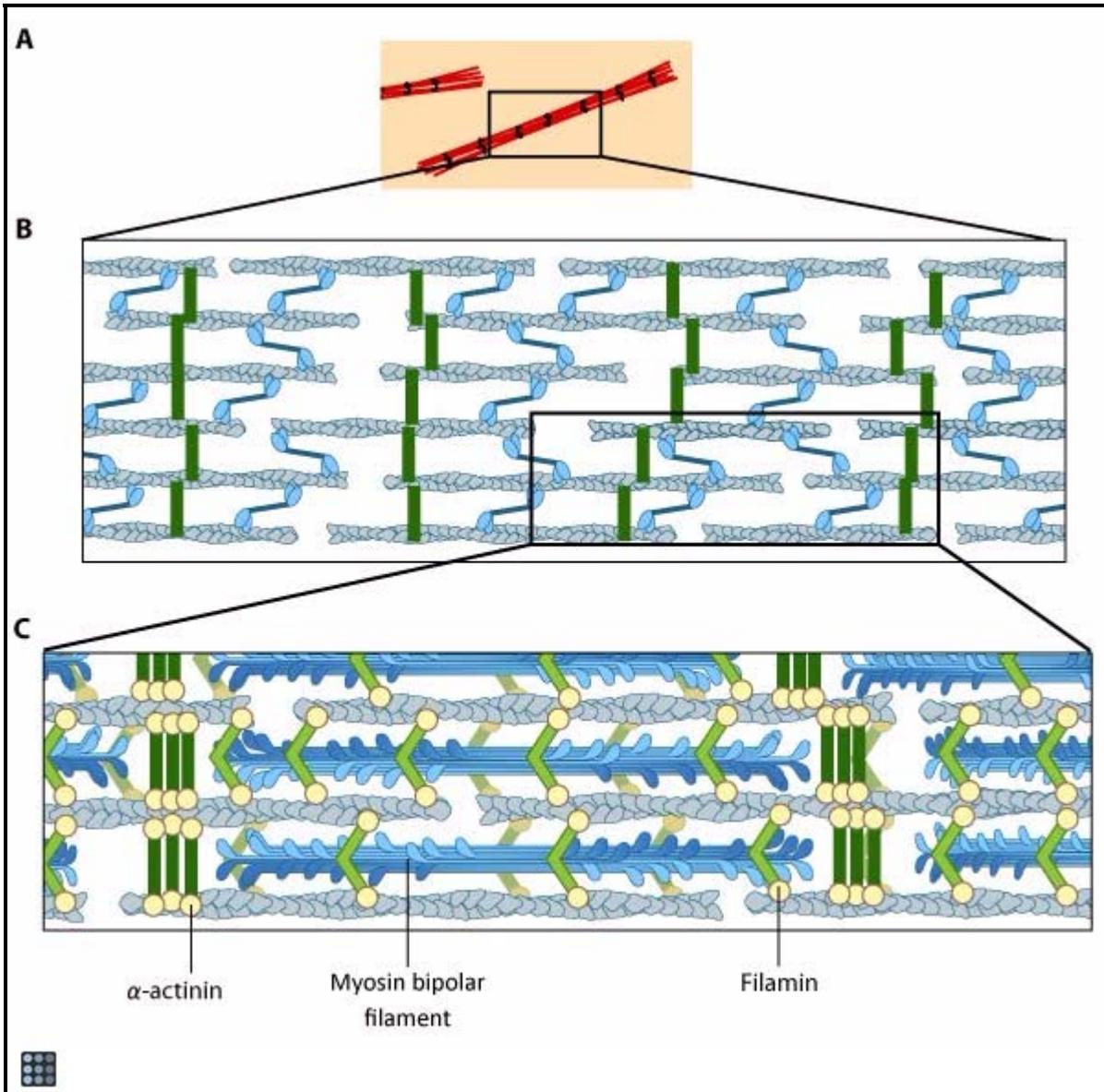


Figure 8: Structure des fibres de stress

(A). fibres de stress isolées ; ont un aspect en bandes, avec des faisceaux de filaments d'actine entrecoupées avec les régions denses aux électrons. (B). Les régions denses aux électrons sont riches en protéines de polymérisation d'actine, à savoir α -actinine. (C). Une vue de haute résolution des têtes de filaments de myosine bipolaires, entremêlés entre les régions riches en α - actinine. Relativement à l' α -actinine, la protéine de polymérisation la plus souple est la filamine ((www.mechanobio.info) stress fiber structure. 2011)

3.2.1.2. Les type de fibres de stress

- **Les fibres de stress dorsales (FSD)** sont les principaux émetteurs de forces contractiles. Ils s'attachent aux points d'adhésion focaux à la base de la cellule, puis remontent vers la surface dorsale pour former une matrice lâche de filaments d'actine (Heath and Dunn 1978). Une FSD se termine souvent par un AT à son extrémité proximale. Il est important de noter que les FSD semblent servir de précurseurs de fibres de viscosité et ne présentent pas de distribution périodique de l' α -actinine et de myosine.
- **Les fibres de stress ventrales (FSV)** sont des faisceaux de filaments situés à la surface ventrale de la cellule, qui sont attachés aux points d'adhésion focaux à l'extrémité de chaque faisceau ; ces fibres de stress s'étendent à partir des points d'adhésion focaux, à proximité de la bordure de la cellule (par exemple des lamellipodes) pour une adhérence derrière ou près du noyau (Small, Rottner et al. 1998). La présence de FSV au niveau de la queue rétractable, est indispensable pour les changements de la forme de la cellule au cours de la migration cellulaire (Chen 1981) et pour structurer les cellules contre la pression de la membrane vers l'intérieur (Thery, Pepin et al. 2006).
- **Les arcs transversaux (AT)** ne se trouvent que dans les cellules qui sont activement prostrutives. Les AT apparaissent comme des faisceaux courbés d'actine et de filaments de myosine derrière la lamelle. Contrairement aux fibres ventrales, les AT n'interagissent pas directement avec les points d'adhésion focaux.

Les fibres de stress sont contractiles, tout en exerçant et maintenant une tension sur le substrat sous-jacent, ils constituent l'élément clé de l'appareil de la mécanotransduction qui relie l'intérieur et l'extérieur de la cellule (**Figure 9**).

L'organisation des fibres de stress ressemble à l'alternance des filaments d'actine et de bandes Z dans les myofibrilles musculaires. Cependant, l'actine et la myosine dans les fibres de stress est moins régulière par rapport aux myofibrilles (Cramer, Siebert et al. 1997) et ne se contractent pas de manière uniforme sur leurs longueurs (Peterson, Rajfur et al. 2004). Comme pour les cellules musculaires, les protéines motrices de

myosine hydrolysent l'ATP et coordonnent leur déplacement le long de l'ensemble des filaments d'actine. Ceci permet aux filaments de glisser les uns sur les autres, ce qui se traduit par un raccourcissement ou la contraction de la fibre de 20% (Katoh, Kano et al. 1998).

La tension cellulaire générée permet aux fibres de stress de stabiliser la structure de la cellule, de produire une force, et d'effectuer la transduction des informations mécaniques sur la composition de l'extérieur de la cellule. Ceci conduit à des changements dans la forme de la cellule, à la migration et au remodelage de la matrice extracellulaire (Luo, Xu et al. 2008).

Cette force de contraction est médiée par une classe de protéines motrices de myosine dépendantes de l'ATP. L'hydrolyse de l'ATP permet à la protéine de myosine de subir un changement de conformation qui se traduit par le déplacement du filament d'actine relativement à la myosine dans le but de générer une force. Chaque hydrolyse d'ATP permet un déplacement de 5 à 25 nm (Luo, Xu et al. 2008). Cependant, il est important de souligner que les fibres de stress ont besoin d'ancrage pour exercer cette force. Les forces de traction et de tension qui sont produites par la contraction des fibres de stress, sont fondamentales pour la génération de force et sont essentielles pour la régulation de la forme des cellules, de l'adhérence et de la motilité cellulaire (Kumar, Maxwell et al. 2006). *in vivo*: par exemple, la fermeture de feuillets embryonnaires au cours de l'embryogenèse, la contraction des cellules myoépithéliales autour de plusieurs conduits épithéliaux, et dans la contrainte de cisaillement endothéliale, exercée par le flux sanguin sur la paroi des vaisseaux (Pellegrin and Mellor 2007). En outre, les myofibrilles des cellules musculaires se forment à partir de fibres de stress sous forme de précurseurs au cours de la myofibrillogenèse (Sanger, Kang et al. 2005).

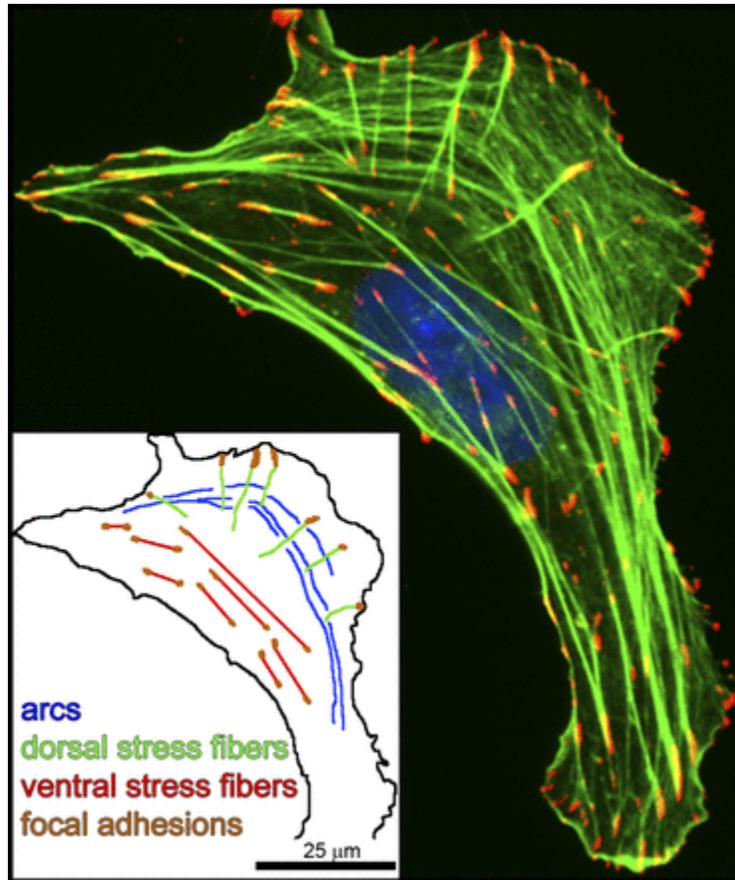


Figure 9: Les différents types de fibres de stress

Les cellules d'ostéosarcome U2OS humaines ont été étalées sur 10 $\mu\text{g/ml}$ des lamelles revêtues de fibronectine et adhérentes pendant 4 h avant la fixation (Hotulainen and Lappalainen 2006). Dans l'image d'immunofluorescence, la phosphotyrosine a été utilisée comme marqueur pour les points adhésions focaux (rouge), la phalloïdine a été utilisée pour la F-actine (vert) et le noyau (bleu) a été détectée par le DAPI. Cette cellule unique présente les trois principaux types de FS d'actine : Arcs (transversaux), fibres dorsales et ventrales (Burrige and Wittchen 2013).

3.2.1.3. Les protéines de la voie Rho impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine

Le complexe (cofiline, intégrine, taline), la protéine apparentée à l'actine, le complexe (ARP2/3), les formines, la profiline, la protéine de coiffage et la myosine, sont des protéines de liaison à l'actine. Elles sont fortement impliquées dans les différentes étapes de la motilité

cellulaire (Nurnberg, Kitzing et al. 2011, Ridley 2011, Daubon, Rochelle et al. 2012, Rotty, Wu et al. 2013). Les fonctions de la cofiline résident dans la première étape pour initier la polymérisation de l'actine asymétrique et dans les étapes ultérieures, à des fins de recyclage de ces filaments. L'implication de la cofiline dans le contrôle de l'étendue temporelle et spatiale de la dynamique de l'actine se voit dans les processus aussi divers que la métastase tumorale dans des études effectuées *in vitro* (Roussos, Condeelis et al. 2011), la cytocinèse chez les levures et les mouches (Chen and Pollard 2011, Zhang, Luo et al. 2011) dans la morphogénèse, la plasticité neuronale chez le rat (Gu, Lee et al. 2010) ainsi que lors du processus inflammatoire (Bamburg and Wiggan 2002). La famille des protéines cofiline ADF se compose d'ADF (actine facteur dépolymérisation), Cofiline 1 et Cofiline 2. Cofiline 1 (dénommé cofiline) est le membre le plus abondant et omniprésent de la famille dans les tissus non musculaires vertébrés et le seul requis pour la viabilité (Bernstein and Bamburg 2010).

➤ **La cofiline et la polymérisation de l'actine F**

La cofiline est une petite protéine de 15 à 20 kDa, qui diffuse librement à l'intérieur des cellules et qui peut être trouvée dans de nombreux compartiments cellulaires, y compris le cytoplasme et le nucléoplasme. La cofiline peut se lier à la fois aux monomères et aux filaments d'actine.

Plusieurs études ont montré, à la fois *in vitro* et *in vivo*, que la concentration relative de la G-actine est un facteur déterminant. En fait, la dissociation des deux ADP lié à la G-actine et de l'ATP liée à G-actine à l'extrémité pointue est lente, et le taux de l'association pour l'ATP liée à la G-actine à l'extrémité barbue est de 15 à 40 fois plus élevé. Ainsi la polymérisation se produit net sur les sites de filaments d'actine (Kuhn and Pollard 2005). Les protéines cyclase-associées (PAC) peuvent accélérer l'échange de la cofiline associée à l'ADP lié à G-actine avec de l'ATP liée à la G-actine pour aider à assurer la polymérisation de la G-actine et de soutenir ainsi la polymérisation cofiline-actine (Moriyama and Yahara 2002). Cependant, une étude effectuée *in vivo*, démontre que les concentrations d'ATP liée à la G-actine dans des cellules qui migrent sont supposées être principalement maintenues par la profiline, qui catalyse l'échange de nucleotides de G-actine et soutient l'ATP libre de la G-actine à une concentration d'environ 1 μ M (Jockusch, Murk et al. 2007).

Dans des conditions de concentrations infimes de G-actine (comme, pourrait se produire dans les cellules qui subissent une migration cellulaire prolongée et continue), la fragmentation par la cofiline causerait la dépolymérisation de l'actine. En outre, La cofiline augmente la concentration de G-actine en induisant la dépolymérisation de l'actine et contribue ainsi au maintien du niveau physiologique de la G-actine (Hotulainen, Paunola et al. 2005, Kiuchi, Ohashi et al. 2007).

➤ **Régulation de l'activation de la cofiline**

Trois mécanismes importants régulent l'activation de la cofiline : **(1) La déphosphorylation du résidu Ser³** (Nagaoka, Minami et al. 1996, Arber, Barbayannis et al. 1998). La cofiline non phosphorylée, mais pas la cofiline phosphorylée au Ser³, peut se lier à l'actine et promouvoir sa polymérisation et sa dépolymérisation (Moriyama, Iida et al. 1996). **(2) La libération de PtdIns | 4,5 | P₂** : Cofiline est connue pour être inactivée par son interaction avec PtdIns | 4,5 | P₂ à la membrane plasmique (Yonezawa, Nishida et al. 1990, Gorbatyuk, Nosworthy et al. 2006). Dans les cellules en migration, la transformation de PtdIns | 4,5 | P₂ par la phospholipase C (PLC) pour former l'inositol | 1,4,5 | P₃ (IP3) et le diacylglycérol (DAG) peut libérer la cofiline de son interaction avec le lipide inhibiteur, favorisant ainsi l'activation des filaments d'actine et l'invasion cellulaire (van de Wetering, Cavallo et al. 1997). **(3) La liaison à la cortactine** : Elle régule négativement l'activité de la cofiline, et ce mécanisme semble être spécifique aux protrusions invasives telle que dans la formation des invadopodes (Weaver 2006, Buccione, Caldieri et al. 2009, Linder, Wiesner et al. 2011, Murphy and Courtneidge 2011).

➤ **La phosphatase de la Chaîne légère de la Myosine (MLC)**

Appelée aussi phosphatase myosine, c'est une enzyme qui déphosphoryle la chaîne légère régulatrice de la myosine II. Cette réaction de déphosphorylation se produit dans le tissu musculaire lisse et initie le processus de relaxation des cellules musculaires. L'holoenzyme de la myosine phosphatase est constituée de trois sous-unités: une grande sous-unité de 130 kD, dotée de la capacité à se lier à la myosine, appelé MBS (myosin-binding subunit), une sous-unité catalytique de 38 kD (PP1cδ), et une petite sous-unité de 20 kD de fonction inconnue (Alessi, MacDougall et al. 1992, Shimizu, Ito et al. 1994, Shirazi, Iizuka et al. 1994). La MBS est une sous-unité qui peut se lier à la fois à la myosine et à la sous-unité catalytique, ciblant

ainsi le substrat, la myosine, à la phosphatase. Sans MBS, la sous-unité catalytique, PP1c δ , présente une faible activité phosphatase envers la myosine phosphorylée (Alessi, MacDougall et al. 1992, Hirano, Phan et al. 1997, Johnson, Cohen et al. 1997) (**Figure 10**).

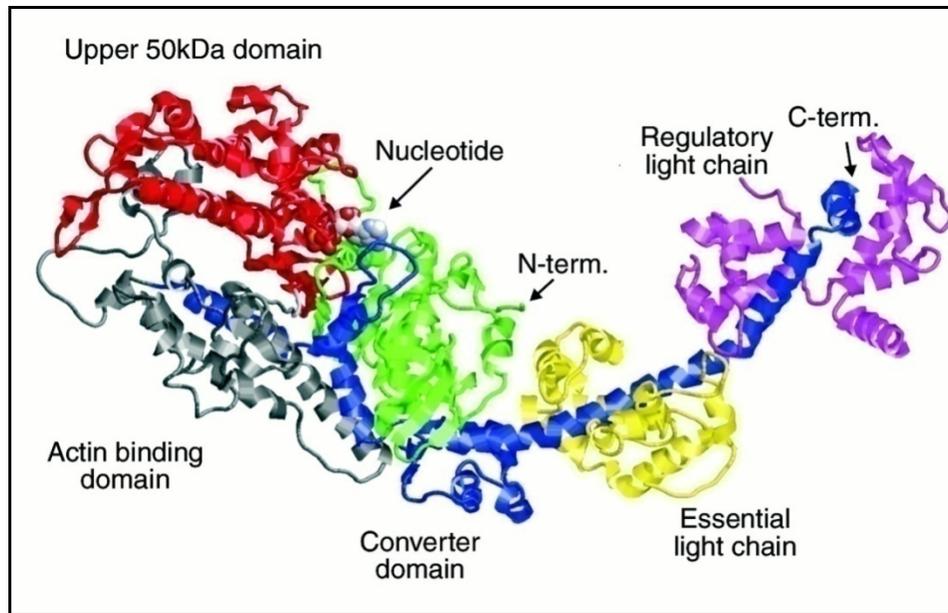


Figure 10: Représentation de la structure de la chaîne légère de myosine en ruban

Les segments colorés en vert, en rouge et en bleu, représentent les segments de la grande sous-unité de la chaîne légère de myosine. Les éléments en jaune et mauve correspondent aux sous unités régulatrice de la chaîne légère (Ruegg, Veigel et al. 2002).

L'activité de la sous-unité MBS est régulée par la phosphorylation induite par diverses kinases dont la protéine kinase A, ROCK (la Rho-kinase) et des kinases non identifiés (Feng, Ito et al. 1999, Totsukawa, Yamakita et al. 1999). Par exemple, ROCK est indispensable à la phosphorylation de MBS dans la région carboxy-terminale, notamment sur les sites Thr⁶⁹⁷ et Ser⁸⁵⁴ (Amano, Ito et al. 1996, Feng, Ito et al. 1999, Kawano, Fukata et al. 1999), qui entraîne l'inhibition de l'activité de la phosphatase. Cette inhibition est responsable du processus de sensibilisation par le calcium Ca²⁺, médié par la protéine RhoA dans le muscle lisse (Somlyo and Somlyo 1994, Hartshorne, Ito et al. 1998).

Plusieurs approches suggèrent que les voies conduisant à la polymérisation de l'actine et la formation de fibres de stress et des points d'adhésion focaux sont médiées par des effecteurs de la voie RhoA distincts. Une deuxième contribution à l'élucidation de la fonction de la Rho-

kinase, démontre que la sous-unité MBS de la chaîne légère de la myosine phosphatase était un substrat pour la Rho kinase *in vitro* (Kimura, Ito et al. 1996).

Il a ensuite été montré que la phosphorylation de la sous-unité MBS conduit à une diminution de l'activité de la phosphatase MLC, menant à une accumulation de la forme phosphorylée de MLC (Kimura, Ito et al. 1996). La phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC) induit un changement conformationnel dans la myosine, ce qui augmente sa liaison aux filaments d'actine et par la suite la formation de fibres de stress (Burrige and Chrzanowska-Wodnicka 1996). Plus récemment, il a été rapporté que la Rho kinase phosphoryle la protéine MLC sur le même site qui est phosphorylé par MLC kinase (Amano, Ito et al. 1996).

3.2.2. Autres rôles physiologiques de la Rho GTPase

Bien que Rho ait d'abord été caractérisée pour son rôle dans le remodelage du cytosquelette, il est maintenant connu que les Rho GTPases sont impliquées dans plusieurs autres processus cellulaires tels que dans le trafic membranaire, dans la régulation de la signalisation nucléaire, dans le développement cellulaire ainsi que dans le contrôle de la croissance cellulaire.

3.3. Les ARF GTPases (Facteur d'ADP-ribosylation)

Les ARF GTPases sont des membres de la superfamille des Ras GTPases, de faible poids moléculaire (~ 20 kDa) et sont présentes dans toutes les cellules eucaryotes. Elles subissent souvent des modifications post-traductionnelles de type myristoylation sur leurs extrémités N-terminales, qui leur permettent de s'associer à la membrane plasmique. Elles comportent deux régions principales appelées Switch I et Switch II, leur permettant ainsi d'interagir avec les régulateurs et les effecteurs. Les deux sites sont reliées par une boucle appelée région inter-Switch (Pasqualato, Menetrey et al. 2001).

On distingue six isoformes d'ARF chez les mammifères (allant d'ARF1 à ARF6). Les ARF GTPases sont regroupés en trois catégories en fonction de leur taille et de leur localisation: classe I (ARF1, ARF2, ARF3), classe II (ARF4 et ARF5), et de classe III (ARF6) (Tsuchiya, Price et al. 1991). ARF2 ne se trouve pas chez l'homme, tandis qu'ARF1 et ARF6 sont au centre de la plupart des efforts de recherche.

3.3.1. Rôle d'ARF1 et d'ARF6

ARF1 et ARF6 présentent d'environ 70% d'homologie de séquence. ARF1 joue un rôle essentiel dans le développement, dans la maturation des vésicules revêtues qui transportent les protéines de la membrane du Golgi à la membrane plasmique (Dong, Zhang et al. 2010) (voir **Figure 11**) ainsi que dans la phagocytose (Beemiller, Hoppe et al. 2006). ARF6 est localisée au niveau de la membrane plasmique ainsi qu'au niveau du compartiment endocytaire, où la protéine joue un rôle important dans le trafic membranaire (l'endocytose) (voir **Figure 12**) (D'Souza-Schorey and Chavrier 2006).

Le cycle ARF GTPase entre inactif lié au GDP et actif au GTP, est modulé par l'activité de plusieurs facteurs nucléotidiques tels que les GEF et les GAP. Plusieurs GEF ont été identifiées pour les petites protéines G ARF, et chaque GEF contient un domaine Sec7 de 200 acides aminés, connu pour son activité catalytique (Jackson and Casanova 2000, Cox, Mason-Gamer et al. 2004).

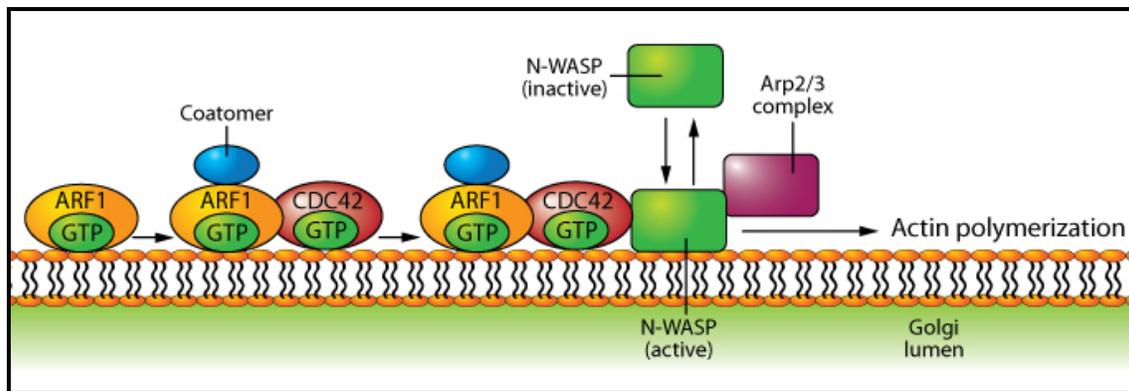


Figure 11: Rôle d'ARF1 dans la régulation de l'assemblage de l'actine lors de la formation des vésicules à l'appareil de golgi

La GTPase ARF1 activée, recrute le Cdc42 au complexe COP I où il active la N-WASP, conduisant à l'activation du complexe Arp2/3 impliqué dans la polymérisation de l'actine (D'Souza-Schorey and Chavrier 2006).

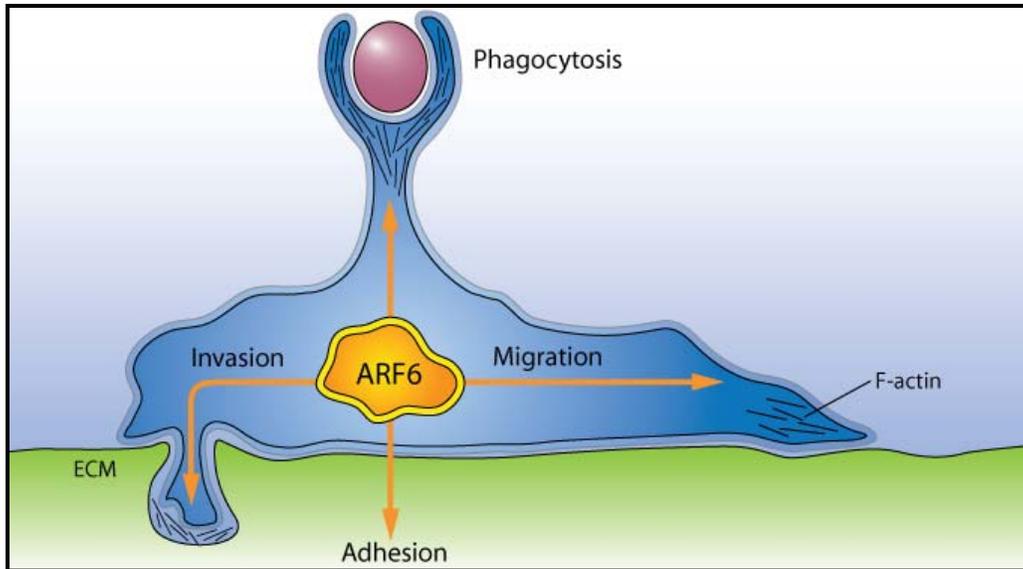


Figure 12: Rôle d'ARF6 à la périphérie cellulaire et dans l'organisation du cytosquelette d'actine

Au niveau de la membrane plasmique, ARF6 active Rac pour remodeler le cytosquelette d'actine afin d'assurer différents processus biologiques tels que la phagocytose, l'endocytose, l'adhésion, la migration et l'invasion cellulaire (D'Souza-Schorey and Chavrier 2006).

4. Les prostaglandines

Plusieurs études ont montré le rôle que jouent les RCPG dans la régulation de plusieurs réponses biologiques, et qu'un dérèglement d'un de leurs effecteurs pourrait contribuer à l'apparition de cancer. Des progrès remarquables ont été accomplis ces dernières années dans la compréhension de l'importance de certains RCPG dans la progression tumorale. Il a été donc mis au clair suite à des travaux fait *in vivo* et *in vitro* que, le récepteur EP de la prostaglandine PGE2, était fortement impliqué dans l'activation des voies de signalisation affectant ainsi de nombreux processus oncogénique au niveau du colon tel que la prolifération, la motilité cellulaire, la surveillance immunitaire et l'apoptose (Goodwin and Ceuppens 1983, Stolina, Sharma et al. 2000). Le colon est la partie du gros intestin, la plus sujette aux inflammations chroniques et aiguës et donc exposée à l'action de plusieurs médiateurs tels que

les prostaglandines. Afin d'étudier de manière approfondie la signalisation des RCPG ainsi que l'activité des GTPases monomériques dans des conditions pathologiques, nous nous sommes intéressés dans ce travail de recherche à l'étude d'un autre récepteur de prostaglandine, le récepteur FP de la prostaglandine F2 α , dans un modèle cellulaire de cancer du côlon. Les récepteurs des prostaglandines font partie de la grande famille rhodopsine des RCPG. Chaque prostanoloïde est synthétisé dans un compartiment spécifique dans le corps via l'action de synthèses spécifiques. Quatre types de récepteurs membranaires de prostaglandines ont été identifiés : le récepteur EP de la PGE2, le récepteur FP de PGF2 α , le récepteur DP de PGD2, le récepteur IP de PGI2 et le récepteur TP de TxA2 (**Figure 13**) (Coleman 1990).

4.1. Biosynthèse des prostaglandines

Les prostaglandines et le thromboxane A₂ (TxA₂), sont des médiateurs lipidiques, synthétisées à partir de l'acide arachidonique (AA) (acide gras insaturé de 20 carbones). Elles sont produites suite à l'action de la phospholipase A (PLA) sur les phospholipides membranaires. L'AA est ensuite métabolisé par l'action des prostaglandines G/H synthases, ou des cyclo-oxygénase (COX). Le système enzymatique nécessaire à cette biosynthèse se retrouve dans la fraction des microsomes. Les prostaglandines sont de plus métabolisées rapidement par le foie, les poumons et le tractus digestif. Il y a quatre principales prostaglandines bioactives générées *in vivo*: la prostaglandine (PG) E₂ (PGE₂), la prostacycline (PGI₂), la prostaglandine D₂ (PGD₂) et la Prostaglandine F₂ α (PGF₂ α). Elles sont produites de façon ubiquitaire. En général, chaque type de cellule génère une ou deux dominants de ces produits, qui agissent comme médiateurs lipidiques, de façon paracrine et/ou autocrine afin de maintenir l'homéostasie locale dans le corps. Lors d'une réaction inflammatoire, à la fois le niveau et le profil de production des prostaglandines changent de façon spectaculaire (Dubois, Abramson et al. 1998, Smith, DeWitt et al. 2000, Smyth, Grosser et al. 2009).

La production de prostaglandine est généralement très faible dans les tissus non enflammés, mais augmente immédiatement lors d'une inflammation aiguë avant même le recrutement des leucocytes et l'infiltration de cellules immunitaires. La production de prostaglandines dépend de l'activité de la Prostaglandine G/H synthase appelés cyclo-oxygénase (COX), des enzymes bi-fonctionnelles contenant à la fois l'activité de la cyclo-oxygénase et de la peroxydase. Elles

existent sous deux isoformes distinctes dénommées COX-1 et COX-2. COX1 fait partie de la famille d'enzymes constitutives, qui se trouvent dans la plupart des cellules de l'organisme, et qui est impliquée dans de nombreux mécanismes liée à la production des thromboxanes tels que dans la cytoprotection épithéliale gastrique et dans l'homéostasie. La COX-2, induite par les stimuli inflammatoires, les hormones et les facteurs de croissance, est la source la plus importante de la formation de prostanoides et de l'inflammation dans les maladies prolifératives telles que le cancer. Cependant, les deux enzymes contribuent à la production de prostanoides d'autorégulation et homéostatiques, et les deux peuvent contribuer à la libération de prostanoides au cours de l'inflammation (Dubois, Abramson et al. 1998).

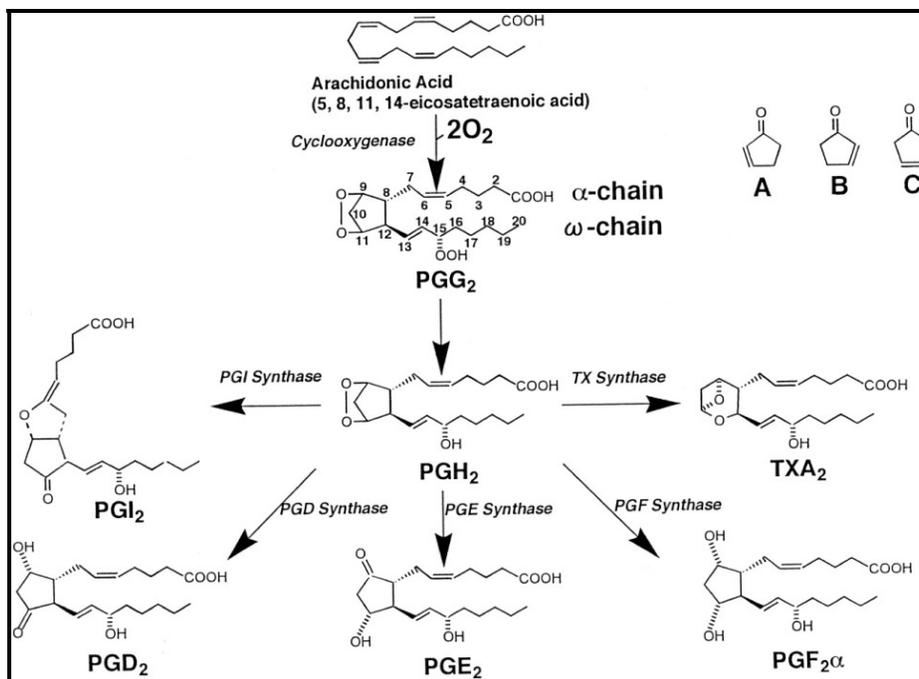


Figure 13: Voie de biosynthèse des prostanoides à partir de l'acide arachidonique

Les structures d'anneau A, B, et C de chaque type de prostaglandine sont représentées séparément (Narumiya, Sugimoto et al. 1999).

4.2. Rôle des prostaglandines

Lors d'une réponse inflammatoire, un ensemble de mécanismes réactionnels de défense est mis en place par l'organisme, afin de reconnaître, de détruire et d'éliminer la substance étrangère. Un nombre important de médiateurs interviennent dans les différentes étapes de l'inflammation. Ces médiateurs peuvent être décrits sous la forme, d'une part, de systèmes d'activation plasmatique et, d'autre part, de médiateurs cellulaires. A titre d'exemple, la PGE2 facilite l'action des médiateurs de la douleur, inhibe l'activité des lymphocytes T suppresseurs, augmente la production d'immunoglobulines et diminue la production d'IL-2 par les lymphocytes (Chouaib, Chatenoud et al. 1984).

Les prostaglandines agissent également sur les fibres musculaires lisses de la paroi des vaisseaux afin de maintenir le tonus vasculaire et la vasomotricité. Elles favorisent soit la vasoconstriction telle que la TxA₂ soit la vasodilatation telle que la PGI₂ (voir structure du récepteur **Figure 14**). La production de ces molécules vasoactives est elle-même soumise à l'action de différents médiateurs de l'inflammation (Gryglewski, Dembinska-Kiec et al. 1978).

Certaines prostaglandines telles que la PGF₂ α et la PGE₂ sont impliquées dans différentes fonctions de la reproduction aussi bien chez la femme que chez l'homme (Lefebvre 1975). Au niveau du tractus gastro-intestinal, les prostaglandines assurent la cytoprotection gastrique en inhibant la synthèse d'acide et en augmentant de la sécrétion de mucus protecteur (Goldin and Rachmilewitz 1983). Dans les reins, les prostaglandines augmentent le flux sanguin (Hao and Breyer 2008).

Les prostaglandines sont connues pour réguler les interactions cellulaires avec la matrice extracellulaire et l'angiogenèse. Ces événements sont impliqués dans la progression du cancer (Bing, Miyataka et al. 2001).

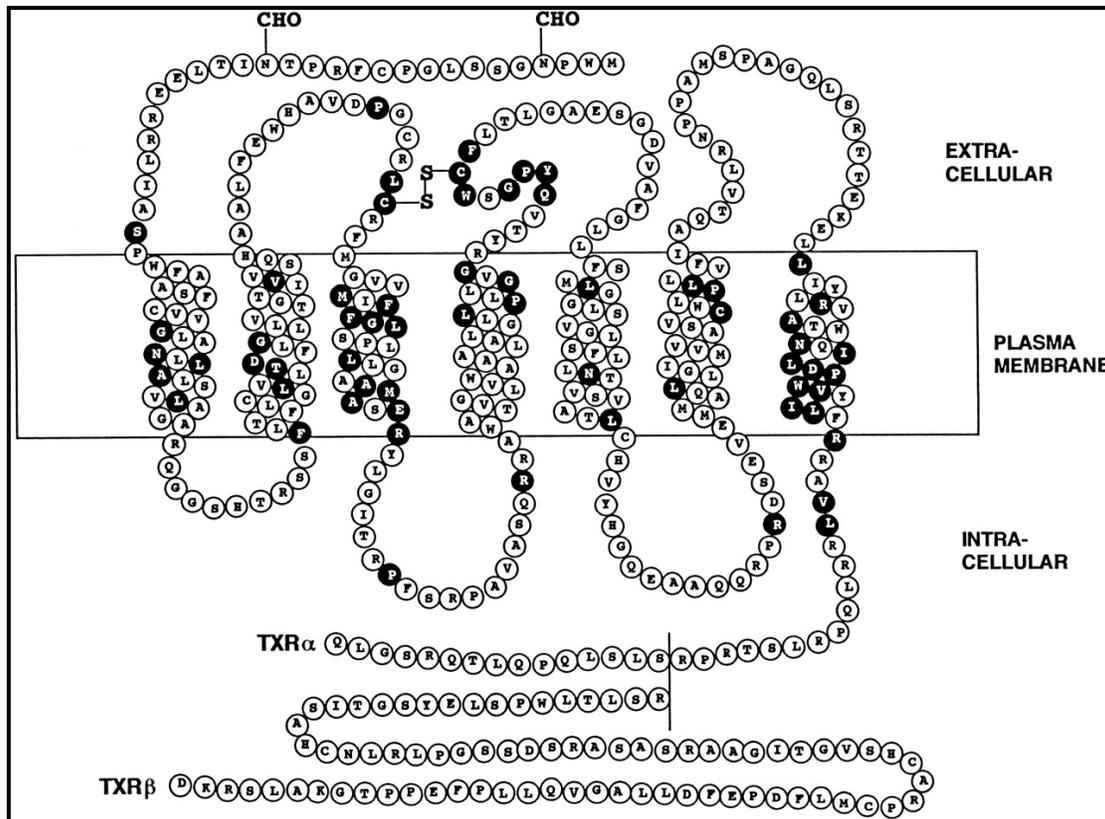


Figure 14: Structure du récepteur TxA₂ humain

Représentation d'un modèle topologique de 2 isoformes de récepteur de la TxA₂ humain. Les résidus d'acides aminés sont indiqués par code à une lettre. Les deux isoformes diffèrent au niveau de la queue carboxy-terminale. Les résidus d'acides aminés conservés et communs pour la plupart des récepteurs de prostanoides sont représentés par des cercles noirs avec des lettres blanches. La N-glycosylation sur les résidus Asn¹⁶ et Asn⁴ est indiquée par un groupement (CHO) (Narumiya, Sugimoto et al. 1999).

4.3. Prostaglandine PGF₂ α

Le PGF₂ α est un métabolite naturel synthétisé à partir de la PGH₂ par action de la PGF synthase comme décrit dans la **Figure 13**. Elle agit par l'intermédiaire du récepteur FP, qui couple aux protéines G telle que la G_q, et qui a pour conséquence directe l'augmentation de la concentration du calcium libre au niveau intracellulaire. Deux variantes épissées de manière différentielle du récepteur FP ont été rapportées: FP_A et FP_B, qui diffèrent les unes des autres par la longueur de leur queue C-terminale (Pierce, Bailey et al. 1997).

4.4. Distribution du récepteur FP de la prostaglandine PGF2 α

Comme le suggère des études antérieures, l'organe qui exprime le plus abondamment l'ARNm du récepteur FP est le corps jaune. Le profil d'expression de l'ARNm du récepteur FP dans les cellules lutéales a été examiné chez des souris pseudo-gonadotrophine (Hasumoto, Sugimoto et al. 1997). Aucune expression de l'ARNm du récepteur FP n'a été trouvée dans les ovaires des souris femelles immatures traitées par PMSG pendant 48 h. Cependant, une fois que l'ovulation a été induite par traitement par hCG (gonadotrophine humaine), les cellules folliculaires granuleuses expriment l'ARNm du récepteur FP. Ce niveau d'expression augmente jusqu'à ce que les cellules aient subi une apoptose lutéale. Ainsi l'expression de l'ARNm du récepteur FP dans le corps jaune est variable pendant le cycle œstral, indiquant une relation étroite entre l'expression du gène du récepteur FP et la lutéolyse. L'ARNm du récepteur FP est également exprimé dans le rein, le cœur, les poumons et l'estomac, mais l'expression dans ces tissus ne varie pas au cours du cycle œstral.

Le PGF2 α est un inducteur physiologique de la lutéolyse comme décrit précédemment. Les mécanismes d'expression lutéale sous-jacente de l'ARNm du récepteur FP sont des facteurs clés importants. Hasumoto et ses collaborateurs ont mis l'accent sur cette question; ils ont généré des souris transgéniques avec la région promotrice du gène du récepteur FP (jusqu'à 7,3 kb en amont de l'ATG) reliée à un gène rapporteur lacZ (Hasumoto, Sugimoto et al. 1997). Leurs résultats suggèrent qu'il existe un mécanisme de commande distinct pour le contrôle de l'expression du récepteur FP dans l'ovaire en comparaison à d'autres tissus. Cette étude a également montré que l'ARNm du récepteur FP est exprimé de façon unique dans les tubules corticaux du rein et dans les glandes gastriques. Le récepteur FP a été identifié dans des lignées de cellules fibroblastiques murines telles que NIH 3T3. Chez ces cellules, le récepteur FP active la voie des MAPK via la voie Gq-PLC (Watanabe, Nakao et al. 1994). En effet, d'autres recherches confirment avoir trouvé des niveaux significatifs de l'ARNm de FP dans les fibroblastes de souris NIH 3T3 (Arakawa, Laneuville et al. 1996).

4.5. Rôle physiopathologique du PGF2 α

Au niveau du système reproducteur féminin, le PGF2 α joue un rôle important dans l'ovulation, la contraction du muscle lisse de l'utérus et de l'initiation de la parturition (Hasumoto, Sugimoto et al. 1997, Saito, Guan et al. 2003). Des études ont montré que PGF2 α joue également un rôle important dans la fonction rénale (Breyer and Breyer 2001), la contraction des artères (Nakahata, Kinoshita et al. 2006), la dysfonction myocardique (Takayama, Yuhki et al. 2005, Jovanovic, Pavlovic et al. 2006), la lésion cérébrale (Saleem, Ahmad et al. 2009) et la douleur (Kunori, Matsumura et al. 2009). Les analogues de PGF2 α ont déjà été mis au point pour induire et synchroniser l'œstrus, provoquer l'avortement chez les animaux domestiques (Schultz and Copeland 1981, Seguin 1981) et pour influencer la fonction de reproduction humaine (Karim 1970).

Les agonistes des récepteurs FP sont utilisés dans le monde entier depuis plusieurs années pour réduire la pression intraoculaire dans le traitement du glaucome (Alexander, Miller et al. 2002).

Les facteurs de risque cardio-vasculaire tels que le diabète, l'obésité, le tabagisme, et l'épaississement de la paroi carotidienne ont pas mal été attribués à des élévations du métabolite PGF2 α dans de nombreuses études, ainsi qu'à la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 dans les fluides corporels (Helmersson, Vessby et al. 2004, Helmersson, Larsson et al. 2005). Par ailleurs, le knockdown du récepteur FP réduit la pression artérielle et retarde l'athérosclérose dans des modèles murins présentant une hyperlipidémie (Yu, Lucitt et al. 2009).

Dans des modèles d'inflammation aiguë, la biosynthèse de PGF2 α peut enclencher le processus de la peroxydation lipidique via la génération d'espèces oxygénées activées tel que le radical de F-isoprostane (Basu 1999, Basu, Whiteman et al. 2001). La suppression du récepteur FP atténue de manière spectaculaire la fibrose pulmonaire sans un changement dans l'inflammation alvéolaire après l'invasion microbienne (Oga, Matsuoka et al. 2009). La biosynthèse de PGF2 α a été également décelée chez des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde, de rhumatisme psoriasique, d'arthrite réactive et d'arthrose (Basu, Whiteman et al. 2001).

Le rôle fondamental que joue le $\text{PGF2}\alpha$ dans l'inflammation aiguë et chronique représente une excellente opportunité pour la conception de nouveaux médicaments anti-inflammatoires.

Il est important de noter que la prise de cette classe médicamenteuse (plus précisément les anti-inflammatoires non-stéroïdiens « AINS ») pourrait être considérée comme de la chimiothérapie préventive étant donné qu'elle réduit jusqu'à 45% le risque de cancer colorectal. Des résultats préliminaires dans le laboratoire ont montré que l'utilisation de ligand allostérique qu'il soit agoniste ou antagoniste, entraînant un changement de conformation du récepteur FP ayant pour conséquence soit une potentialisation ou une inhibition des voies de signalisation. Ceci a suscité de l'intérêt pour aller approfondir davantage dans ce projet de recherche et étudier les différentes voies de signalisation, médiées par la prostaglandine $\text{PGF2}\alpha$ suite à sa liaison au récepteur FP, dans un modèle de cancer colorectal. Nos résultats contribueront à développer de petites molécules allostériques de nature péptido-mimétiques qui pourraient moduler ces différentes voies de signalisation.

Projet et hypothèse de recherche

Les prostaglandines sont impliquées dans plusieurs processus physiologiques et physiopathologiques, comme la modulation des réactions inflammatoires, la cytoprotection, l'ulcération gastro-intestinale, l'homéostasie, la thrombose, l'hémodynamique rénale, la progression des maladies rénales, l'angiogenèse et la cancérogenèse.

Plusieurs travaux ont été réalisés dans le contexte de la cancérogenèse colique afin de mieux cerner l'implication directe de chaque prostaglandine. Quasiment toutes les études menées, ont montré l'effet pro-tumoral de la COX-2 par l'intermédiaire de PGE₂, bien que, le PGF₂ α soit également synthétisé de manière exacerbée lors des maladies inflammatoire de l'intestin (IBD). Cependant, les voies de signalisation intracellulaire menant à des réponses biologiques activées suite à la liaison du PGF₂ α restent encore mal connues.

Des expériences effectuées dans un modèle cellulaire de HEK293 exprimant de façon stable le récepteur FP (HA-FP), ont permis de mettre en évidence certains mécanismes d'activation de petites protéines G suite à la stimulation au PGF₂ α . Ainsi, leur activation menait à des processus morphologiques d'ondulation membranaire et au remodelage du cytosquelette d'actine.

L'hypothèse de notre projet de recherche est que ces changements morphologiques cellulaires sont impliqués dans la dissémination métastatique et la progression tumorale du cancer colorectal.

L'objectif principal vise à identifier et mieux comprendre les voies de signalisation qui contrôlent des réponses directes du cytosquelette d'actine suite à la stimulation au PGF₂ α , chez différentes lignées cellulaires humaines normales et cancéreuses (HEK293 HA-FP) et (SW480), respectivement. Nous identifierons également les différents effecteurs impliqués dans la mise en place de la machinerie moléculaire de l'activité des différentes GTPases activées, qui coordonnent le trafic membranaire.

Finalement, nous déterminerons si l'inhibition de ces protéines G affecte la capacité du PGF₂ α à activer certains intermédiaires de signalisation ainsi que certains effets biologiques.

Matériel et méthodes

1. Réactifs et anticorps

Les milieux MEM (Minimum Essential Medium) et DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium), utilisés en culture cellulaire, et le sérum bovin fœtal (FBS) ont été achetés chez Sigma (Oakville, ON, Canada). Tous les autres produits de culture proviennent d'Invitrogen Gibco (Burlington, Ontario, Canada). Les anticorps anti-ARF6, anti-ERK total, anti-MMP-2, anti-MMP-9, et anti-RhoA ont été achetés chez Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Les anticorps anti-Actine, anti-P44-42-ERK, anti-P38 total, anti-P-P38, anti-JNK total, anti-P-JNK, anti-MLC, anti-P-MLC, anti-P-Src, anti-vimentine, anti-EGFR total, anti-EGFR Y⁸⁴⁵ et l'anti-EGFR Y¹⁰⁸⁶ ont été achetés de la compagnie Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Les anticorps anti-Cofiline, anti-P-Cofiline proviennent de AbCam (Toronto, ON, Canada). L'anticorps anti-Src total a été acheté chez Millipore (Mississauga, ON, Canada). Les anticorps secondaires conjugués au FITC et à la HRP ont été achetés chez la compagnie R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Les billes de Glutathion-SépharoseTM 4B ont été achetées chez Amersham Biosciences (Baie D'Urfé, QC, Canada). L'Alexa-Fluor 568-couplé à la phalloïdine a été acheté chez Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Le PGF2 α a été acheté chez Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Le C3 Exoenzyme (*Clostridium botulinum*) a été achetée de la compagnie Cytoskeleton, Inc (Denver, CO, USA).

L'ARF6 ShARN, Clone ID: NM_001663.3-926s21c1, séquence:ACCGGAGCTGCACCGCATTATCAATGCTCGAGCATTGATAATGCGGTGCAGCTTTTT TTG a été acheté chez Sigma (Oakville, ON, Canada).

2. Culture cellulaire

Les cellules utilisées sont des cellules cancéreuses humaines de colon SW480 de la compagnie ATCC (Manassas, VA, USA). Elles ont été cultivées dans des boîtes de Pétri de 10 cm contenant 10 ml de milieu de culture, dans un incubateur à 37°C, sous atmosphère à 5% de CO₂. Le milieu de culture était composé de DMEM, de 10% de FBS (Fœtal bovine serum) et de 1% de P/S (Pénicilline/Streptomycine) (Wisent, QC, Canada).

Des cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur FP (HA-FP) ont été également utilisées. Elles ont étéensemencées dans des pétris de 10 cm et maintenues à 37°C, 5% CO₂,

dans du MEM contenant 1% de P/S et enrichi avec du FBS (10%). Les cellules HEK293 HA-FP ont été maintenues sous sélection avec de la puromycine à une concentration de 0.7 µg/ml. Dans les expériences de déplétion d'ARF6, nous avons infecté des cellules SW480, maintenues dans du milieu contenant 10% de FBS à très faible confluence, avec des lentivirus dont un Sh ARN non spécifique comme contrôle (ShScramble) et spécifique (ShARF6). Après 24 h, les cellules ont été mises sous sélection de Puromycine (1 µg/ml), dans du milieu frais contenant 10% de FBS. Après 72 h d'infection, l'expression de la protéine ARF6 était diminuée d'environ 90%. Avant chaque expérience, les cellules ont été mises dans du milieu contenant 0.2% de FBS pendant 48 h.

3. Immunobuvardage de type Western

Les cellules SW480 et HEK 293 HA-FP ont été lysées dans 200 µl de tampon de lyse E (pH7.4, 50 mM de Tris HCl, 1% de NP-40, 137 mM de NaCl, 10% de glycerol, 5 mM de MgCl₂, 20 mM NaF, 1 mM NaPPi, 1 mM Na₃VO₄, avec des inhibiteurs de protéase (100 µM phénylméthylsulfonyl fluoride, 5 µg/ml aprotinine, 10 µg/ml leupeptine, 1 µg/ml pepstatine A, 1 mM benzamine). Les échantillons ont été centrifugés pendant 10 min à 10 000 g et à 4°C. Les protéines ont ensuite été migrées sur gel de polyacrylamide et transférées sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes ont été marquées à l'aide d'anticorps primaires spécifiques pour chaque protéine (comme décrit pour chaque expérience). Les anticorps secondaires conjugués au FITC et à la HRP révèlent l'expression des protéines, qui sont détectés en utilisant un scanner Typhoon 9410 (GE Healthcare, Mississauga, ON, Canada) ou avec un réactif de détection de chimioluminescence ECL (ECLTM Prime, GE Healthcare, Mississauga, ON, Canada). La quantification du convertisseur numérique des images obtenues a été réalisée en utilisant Image J.

4. Essais d'activation de RhoA et d'ARF6

Les essais d'activation ont été faits par précipitation avec des protéines de fusion Glutathione S-transferase Rhotékin pour mesurer les niveaux de Rho-GTP et GGA3 pour mesurer les niveaux d'ARF6-GTP, couplées à des billes de glutathion-sépharose 4B. Les niveaux d'ARF6-GTP et de Rho-GTP ont été détectés par immunobuvardage de type Western.

5. Microscopie à fluorescence

Les cellules SW480 ont étéensemencées à densité moyenne (150 000 cellules/puit d'une plaque à 6 puits) sur des lamelles, dans du milieu DMEM contenant 10% de FBS. Après 48 h, le milieu des cellules a été changé par du milieu contenant seulement 0.2% de FBS et incubées pendant 48 h (afin de ne pas stresser les cellules, on effectue le changement de milieu chaque 24 h). Les cellules HEK293 HA-FP, ont étéensemencées à densité faible (70 000 cellules/puit d'une plaque à 6 puits) sur des lamelles, dans du milieu MEM contenant 10% de FBS et de puromycine comme mentionné ci-haut. Vingt-quatre heures après, le milieu des cellules a été changé par du milieu privé de FBS et incubées pendant 4 h.

Les deux lignées cellulaires ont été, par la suite, stimulées avec le PGF2 α pendant 15 min ou 24 h, selon l'expérience. Ensuite, les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde (4%) pendant 20 min. Elles ont ensuite été perméabilisées, bloquées avec du milieu de culture contenant de la saponine 0.05% et de la BSA 1%. Par la suite, elles ont été lavées 3 fois au PBS. Les cellules ont été marquées à l'Alexa-Fluoro568 couplée à la phalloïdine pendant 45 min à l'abri de la lumière, afin de mieux visualiser la distribution de l'actine.

Enfin, les cellules marquées ont été examinées par microscopie à fluorescence (Zeiss, Germany).

6. Test de migration en chambre de Boyden

Les membranes des inserts des chambres de Boyden ont été incubées avec du collagène de type I à une concentration de 6 $\mu\text{g/ml}$, à 37°C toute la nuit. Le lendemain, il a été versé bien au centre de la chambre supérieure sans toucher la paroi, 100 μl de la suspension cellulaire de SW480 et/ou des cellules HEK293 HA-FP (selon l'étude effectuée) à raison de 250 000 cellules/100 μl . Après 24 h et 30 min (temps nécessaire à l'adhésion des cellules SW480 et HEK293 HA-FP, respectivement), les cellules ont été entièrement privées de sérum pendant 1h pour les HEK293 HA-FP et 24 h pour les SW480. Elles ont été ensuite prétraitées ou pas avec le C3 Exoenzyme (0.2 $\mu\text{g/ml}$) pendant 6 h et stimulées avec le PGF2 α (1 μM). Après 4 h d'incubation, les milieux ont été aspirés avec une pipette pasteur, les cellules fixées et colorées avec du cristal violet (MeOH 20%, cristal violet 0.1%) toute la nuit à température pièce. Le lendemain, les cellules ont été rincées 3 fois avec de l'eau distillée (dH₂O). La surface supérieure de la membrane a été grattée à l'aide d'un coton tige et les cellules n'ayant pas

migré ont été ainsi éliminées. Des photographies ont été prises au hasard au grossissement 10X, sur quatre champs différents pour ensuite effectuer le décompte des cellules qui sont passées à travers les pores de la membrane en utilisant le logiciel Image J.

7. Statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant une analyse de variance de type ANOVA (One-way) suivie de tests de comparaison multiple de Bonferroni ou de Dunnett par GraphPadPrism (version 5, San Diego, CA, USA).

Résultats

1. Étude de la réponse du récepteur FP suite à la stimulation au PGF2 α dans le modèle cellulaire HEK293 HA-FP

1.1. Le PGF2 α induit l'ondulation membranaire des cellules HEK293 HA-FP

Il a déjà été démontré, dans une étude antérieure faite dans le laboratoire, que la liaison du ligand PGF2 α , à son récepteur FP, induit l'activation du récepteur ainsi que le remodelage du cytosquelette d'actine (Goupil, Tassy et al. 2010). Nous avons donc tenté de confirmer, dans un premier temps, si la stimulation des cellules HEK293 HA-FP, au PGF2 α (1 μ M) pendant 15 min induisait l'ondulation membranaire.

Comme illustré dans la **figure 15**, l'ajout du ligand induit très rapidement l'ondulation membranaire d'environ 84% des cellules HEK293 HA-FP. En examinant attentivement la distribution de l'actine, nous avons observé que la stimulation au PGF2 α induit également la formation de fibres de stress (**Figure 16**). Des cellules HEK293 HA-FP stimulées avec le DMSO (véhicule), ont été utilisées comme contrôle. Dans cette condition nous n'avons observé aucune ondulation de membrane.

De nombreuses études faites au préalable, ont mis en évidence que l'activation de la GTPase Rho serait à l'origine de certains de ces changements morphologiques cellulaires. Pour vérifier le rôle de Rho dans notre système, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de cette GTPase, le C3 Exoenzyme. Les cellules ont été prétraitées avec l'inhibiteur (0.2 μ g/ml) pendant 6 heures et stimulées ensuite avec le PGF2 α (1 μ M) pendant 15 min.

Les résultats présentés dans la **figure 17** montrent que l'inhibition de Rho diminue l'ondulation membranaire ainsi que la formation des fibres de stress.

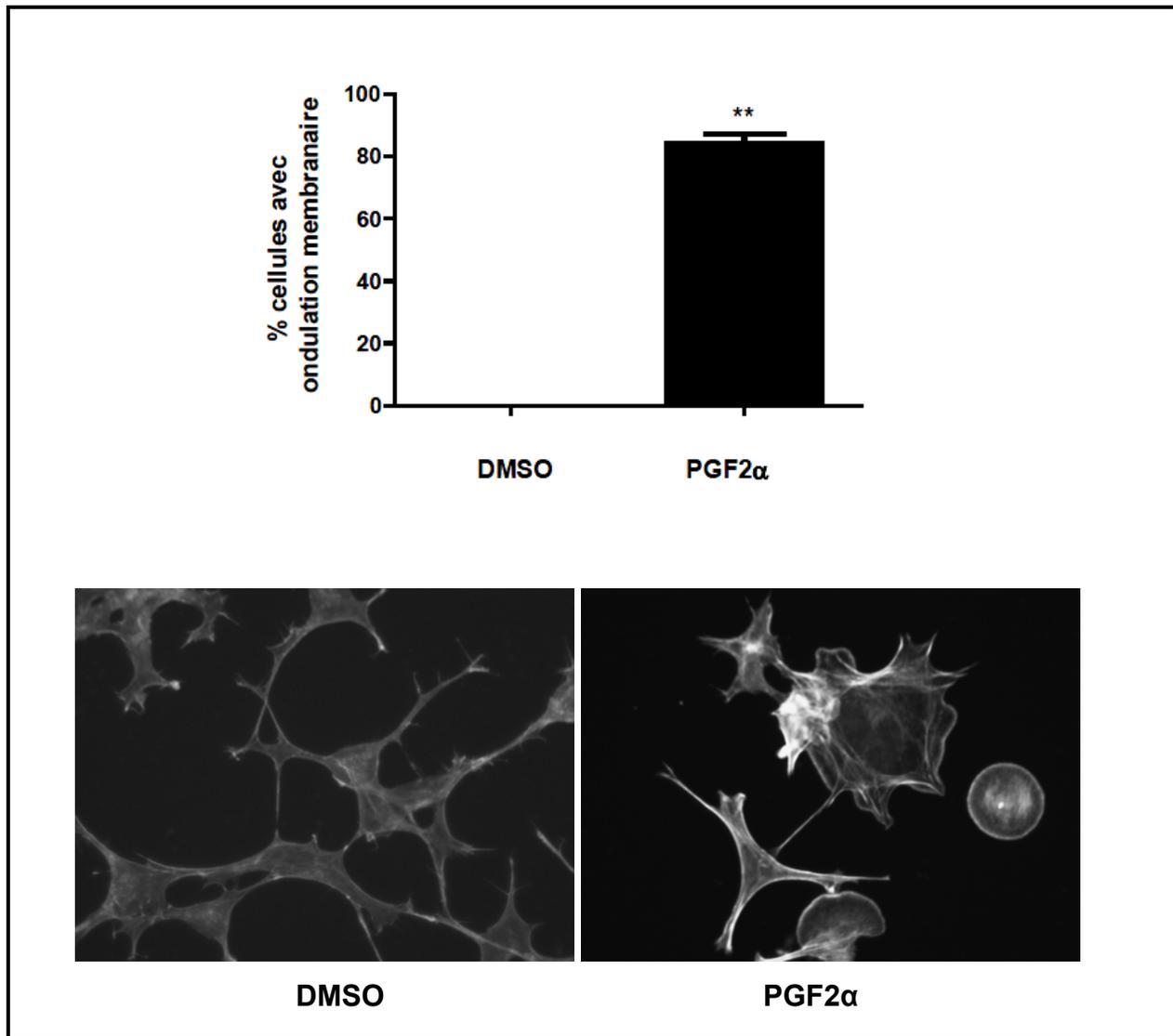


Figure 15: Ondulation membranaire des HEK293 HA-FP

Les cellules ont été stimulées ou non avec le PGF2 α (1 μ M) pendant 15 min, fixées et marquées avec l'Alexa-Fluoro 568 couplée à la phalloïdine. L'expérience a été effectuée 3 fois (n=3, **P < 0.01) et analysée au microscope à fluorescence au grossissement 40 x.

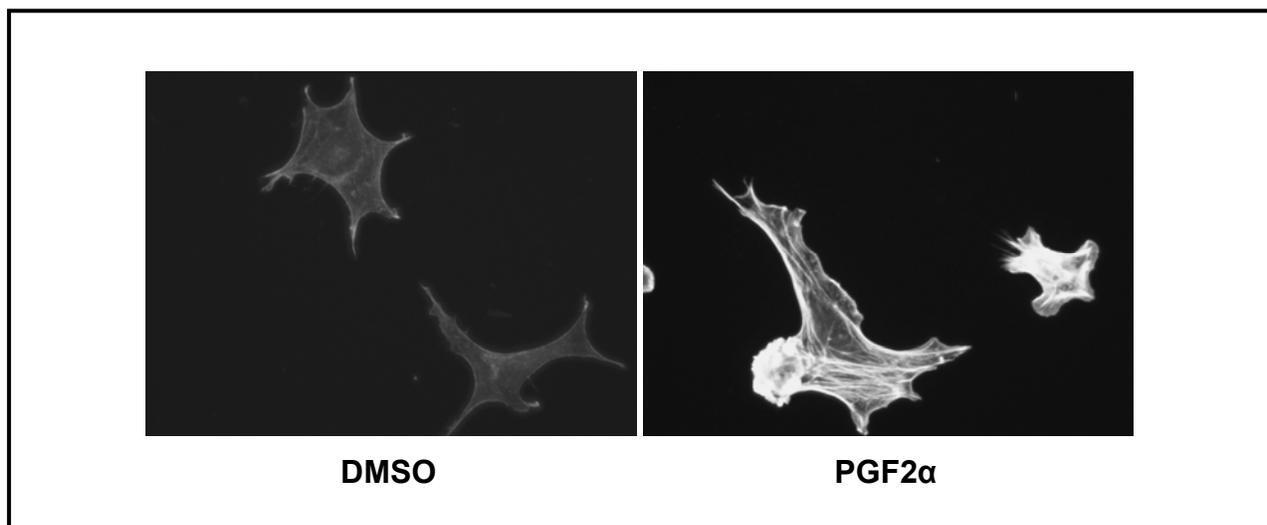


Figure 16: Formation des fibres de stress dans les cellules HEK293 HA-FP

Les cellules ont été stimulées ou non avec le PGF2 α (1 μ M) pendant 15 minutes, fixées et marquées avec l'Alexa-Fluoro 568 couplée à la phalloïdine. L'expérience a été effectuée 3 fois (n=3) et analysée au microscope à fluorescence au grossissement 40 x.

Dans une 2^e série d'expérience, nous avons examiné l'effet de l'inhibiteur de Rho sur de longues périodes de stimulation des cellules au PGF2 α . Les résultats présentés dans la **figure 18** montrent que la stimulation des cellules HEK293 HA-FP au PGF2 α (1 μ M), pendant 24 h, induit une intense activité du cytosquelette d'actine qui se traduit par la formation de fibres de stress ainsi qu'une diminution des espaces entre les cellules; on parle alors d'adhérence cellulaire. Elle correspond à l'ensemble des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en œuvre, qui permettent aux cellules d'adhérer étroitement et spécifiquement avec les autres cellules de même type ainsi qu'à la matrice extracellulaire (Alberts B 2002). Les cellules prétraitées avec le C3 Exo-enzyme (0.2 μ g/ml pendant 6 h) et stimulées ensuite avec le PGF2 α (1 μ M) pendant 24 h, présentaient moins de fibres de stress et moins d'attachement entre les cellules. Cette réponse est donc contrôlée par la Rho GTPase via la modification du cytosquelette d'actine.

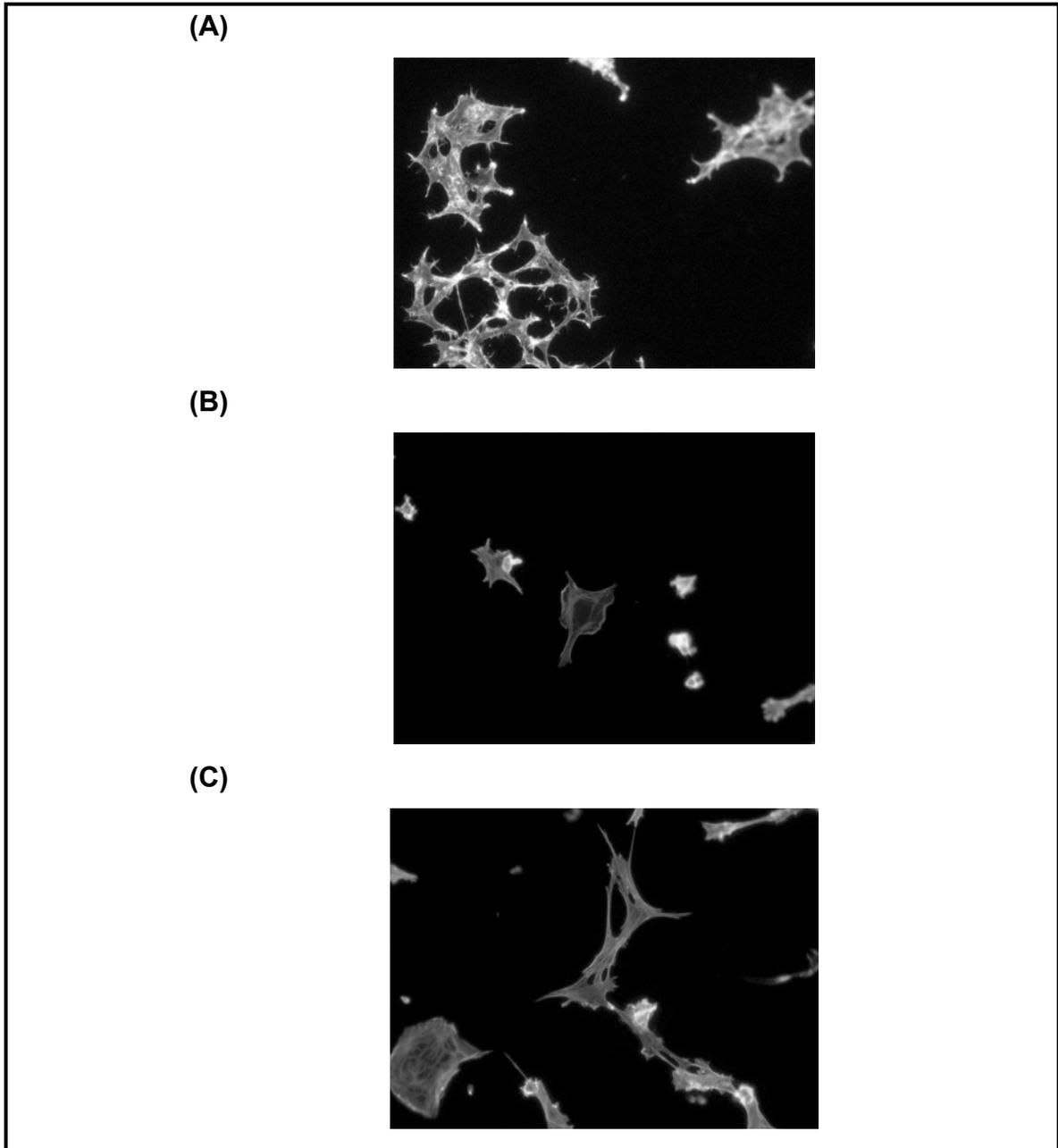


Figure 17: L'inhibition de Rho diminue l'ondulation membranaire des cellules HEK-293 HA-FP

Les cellules ont été prétraitées, stimulées, fixées et marquées avec l'Alexa-Fluoro 568 couplée à la phalloïdine. **(A)**. Cellules contrôles (DMSO). **(B)**. Cellules stimulées avec le PGF2 α (1 μ M) pendant 15 min. **(C)**. Cellules prétraitées avec le C3 Exo-enzymes (0.2 μ g/ml pendant 6 h) et stimulées avec le PGF2 α (1 μ M) pendant 15 min. L'expérience a été effectuée une fois (n=1) et analysé au microscope à fluorescence au grossissement 20 x (à répéter 2 autres fois).

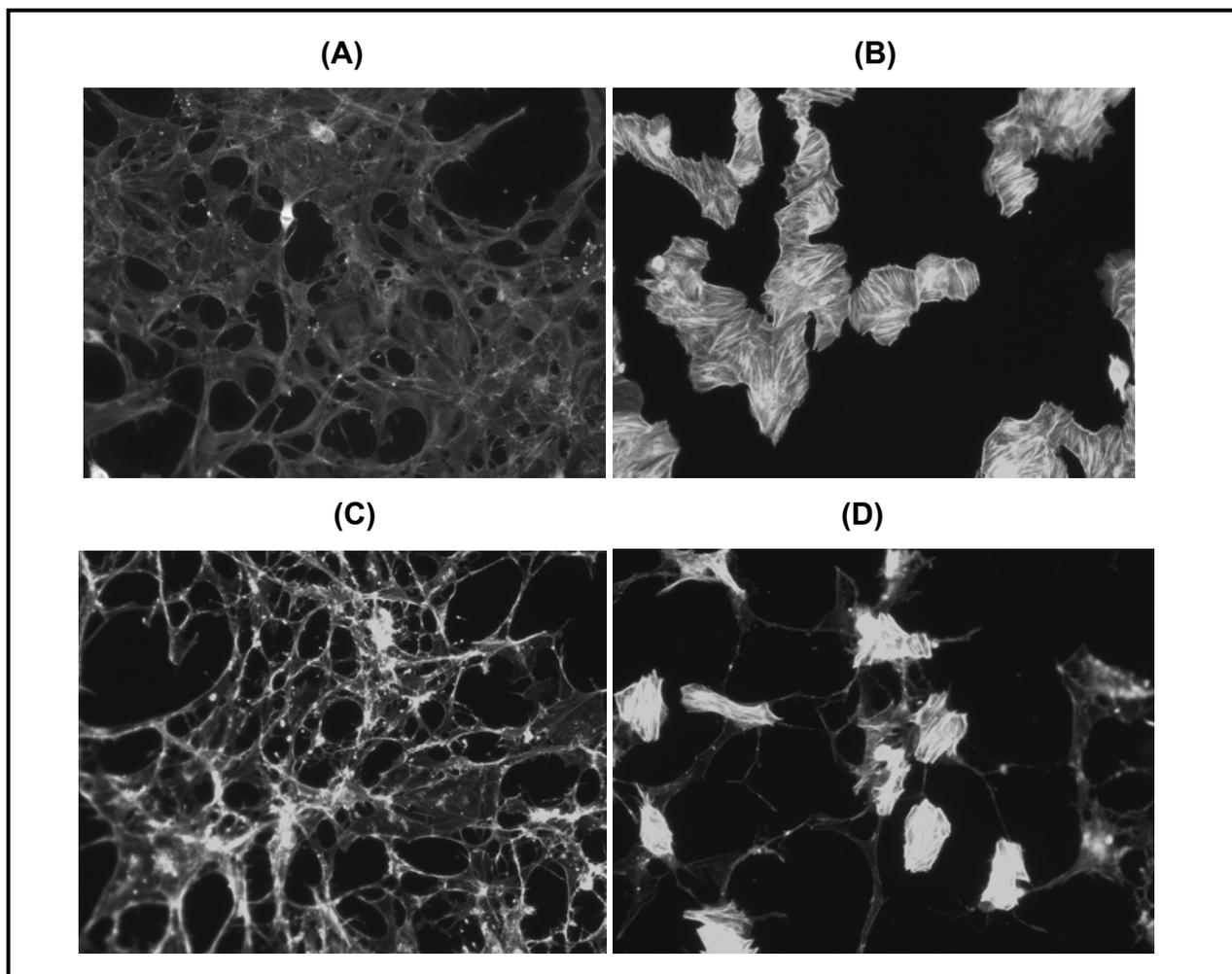


Figure 18: Adhérence cellulaire et formation des fibres de stress dans les cellules HEK293 HA-FP suite à la stimulation au PGF2 α

Les cellules ont été prétraitées, stimulées, fixées et marquées avec l'Alexa-Fluoro568 couplée à la phalloïdine. **(A)**. Cellules contrôles (DMSO). **(B)**. Cellules stimulées avec le PGF2 α (1 μ M) pendant 24 h. **(C)**. Cellules prétraitées avec le C3 Exo-enzymes (0.2 μ g/ml pendant 6 h) et stimulées avec du DMSO. **(D)**. Cellules prétraitées avec le C3 Exo-enzymes (0.2 μ g/ml pendant 6 h) et stimulées avec le PGF2 α (1 μ M) pendant 24 h. L'expérience a été effectuée 3 fois (n=3) et analysée au microscope à fluorescence au grossissement 20 x.

1.2. Le PGF2 α induit l'expression de la vimentine dans les cellules HEK293 HA-FP

Nous avons observé, suite à la stimulation des cellules HEK293 HA-FP au PGF2 α , une intense activité de la réorganisation des filaments d'actine. Ce phénomène nous a incité à étudier l'expression de l'une des protéines des filaments intermédiaires du cytosquelette, la vimentine. Cette protéine de ~ 57 kDa, interagit avec les autres composantes du cytosquelette et joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité et de l'organisation cellulaire (Katsumoto, Mitsushima et al. 1990).

Comme il a été démontré dans une étude antérieure, l'expression des filaments intermédiaires pourrait être modifiée au cours de la migration cellulaire (Ivaska, Pallari et al. 2007).

Les cellules HEK293 HA-FP ont été privées de sérum pendant 1 h et ensuite mises sous trois conditions : stimulées avec le DMSO (véhicule) comme contrôles négatifs, avec le FBS (1%) comme contrôles positifs, avec le PGF2 α (1 μ M) et avec le PGF2 α (2 μ M), pendant 24 h.

Comme le montre la **figure 19**, le PGF2 α induit une surexpression remarquable de la vimentine. Nous avons voulu vérifier si ces changements phénotypiques n'étaient pas associés au phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Nous avons donc examiné le profil d'expression de certaines protéines telles que : la cadhérine-E et les métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9 chez la même lignée cellulaire. La figure 20 montre que la stimulation des cellules HEK293 HA-FP au PGF2 α n'induit pas la surexpression des métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9 et ne diminue pas non plus l'expression de la cadhérine-E, marqueur clé de la TEM (**Figure 20**).

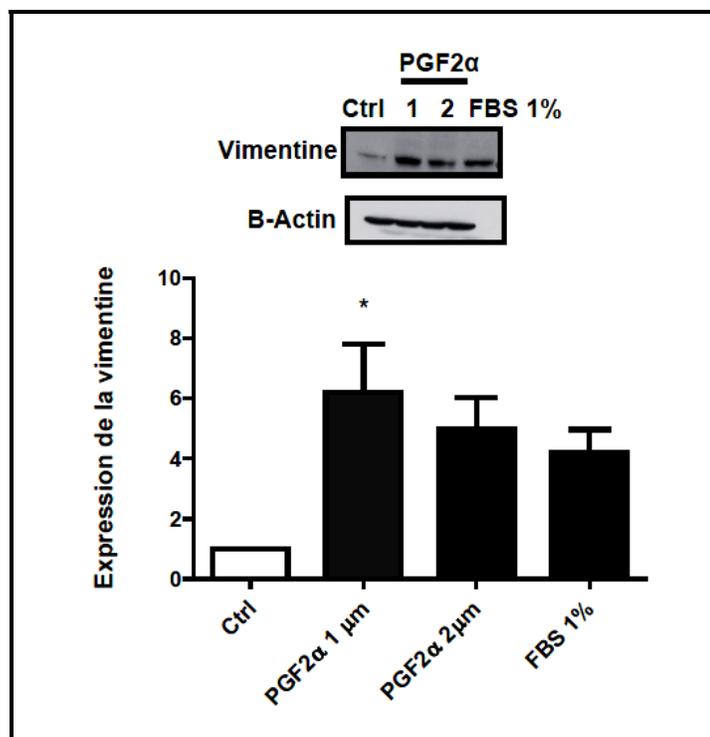


Figure 19: Surexpression de la vimentine dans les cellules HEK293 HA-FP

Les cellules ont été stimulées 24 h avec : DMSO, le ligand PGF2α (1 μM, 2 μM) et FBS 1%. Le PGF2α augmente les niveaux d'expression de la vimentine de ~ 3 fois comparé au niveau d'expression des cellules stimulées avec le DMSO (n=3, *P <0.05).

1.3. Étude de la migration des cellules HEK293 HA-FP suite à la stimulation au PGF2α

Nous avons ensuite analysé le phénotype migratoire de cette lignée cellulaire. Nous avons observé (**Figure 21**) que les cellules HEK293 HA-FP dans des conditions privées de sérum et stimulées avec du DMSO (véhicule), présentaient déjà un phénotype migratoire de base. La stimulation par le PGF2α (1 μM) pendant 4 h (temps nécessaire à la migration cellulaire), entraînait une diminution de la migration cellulaire.

Nous avons pu visualiser de façon nette le remodelage du cytosquelette d'actine dans ces cellules suite à leur stimulation par le PGF2α (1 μM), et en déduire que cette dynamique était dû à l'implication de la GTPase Rho dans ce processus.

Dans le but d'étudier le rôle de cette GTPase dans le contexte de la migration cellulaire, nous avons prétraité les cellules HEK293 HA-FP avec l'inhibiteur spécifique de Rho (0.5 μg/ml)

pendant 2 h et nous les avons ensuite stimulé avec le $\text{PGF2}\alpha$ ($1 \mu\text{M}$) pendant 4 h. Comme le montre les résultats de la **figure 21**, l'inhibition de Rho n'a pas d'effet sur la migration cellulaire de base de ces cellules suite à leur stimulation au $\text{PGF2}\alpha$.

L'ensemble des résultats trouvés dans ces séries d'expériences faites dans les cellules HEK293 HA-FP, nous a permis de montrer que le $\text{PGF2}\alpha$ induisait l'ondulation membranaire mais également la formation de fibres de stress. Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette réponse biologique incluent l'activation de la GTPase Rho. Nous avons également observé que la surexpression de la vimentine serait à l'origine du réarrangement des filaments d'actine menant à l'attachement des cellules voisines entre elles.



Figure 20: Expression de la cadhérine-E, MMP-2 et MMP-9 dans les cellules HEK293 HA- FP

Les cellules ont été stimulées 24 h avec : DMSO, le ligand $\text{PGF2}\alpha$ ($1 \mu\text{M}$, $2 \mu\text{M}$) et le FBS 1% ($n=1$). Le $\text{PGF2}\alpha$ n'a aucun effet sur l'expression des protéines clés de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).

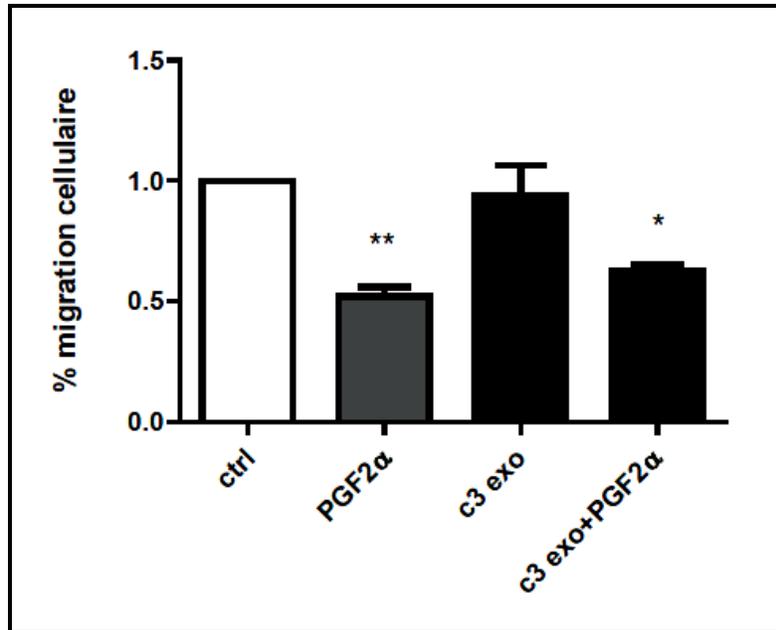


Figure 21: Migration cellulaire des cellules HEK293 HA-FP

Les cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur FP ont été prétraitées ou non avec l'inhibiteur de Rho C3 Exo-enzyme (0.5 μ g/ml pendant 2 h) et stimulées ensuite avec du PGF2 α (1 μ M) pendant 4h. L'expérience a été effectuée 3 fois (n=3, *P < 0.05, **P < 0.01).

2. Étude des mécanismes moléculaire impliqués dans la réponse du récepteur FP au PGF2 α dans les cellules HEK293 HA-FP et dans les cellules SW480

2.1. Activation des GTPases RhoA et ARF6 suite à la stimulation par la PGF2 α

De nombreuses études ont montré que les GTPases RhoA et ARF6 agissent pour coordonner le remodelage du cytosquelette. Suite aux résultats obtenus dans les premières séries d'expériences, montrant l'implication de Rho dans ces réponses biologiques. Nous sommes donc allés vérifier les niveaux d'activation des GTPases RhoA et ARF6 en réponse au PGF2 α dans différentes lignées cellulaires.

Et comme présenté dans la **figure 22**, la stimulation des cellules HEK293 HA-FP et de la lignée SW480 avec le PGF2 α (1 μ M) pendant 2, 5 et 30 min, induit une activation rapide (à 2 min de stimulation) et transitoire des GTPase RhoA et ARF6 (moins de protéines liant le GTP à 30 min de stimulation).

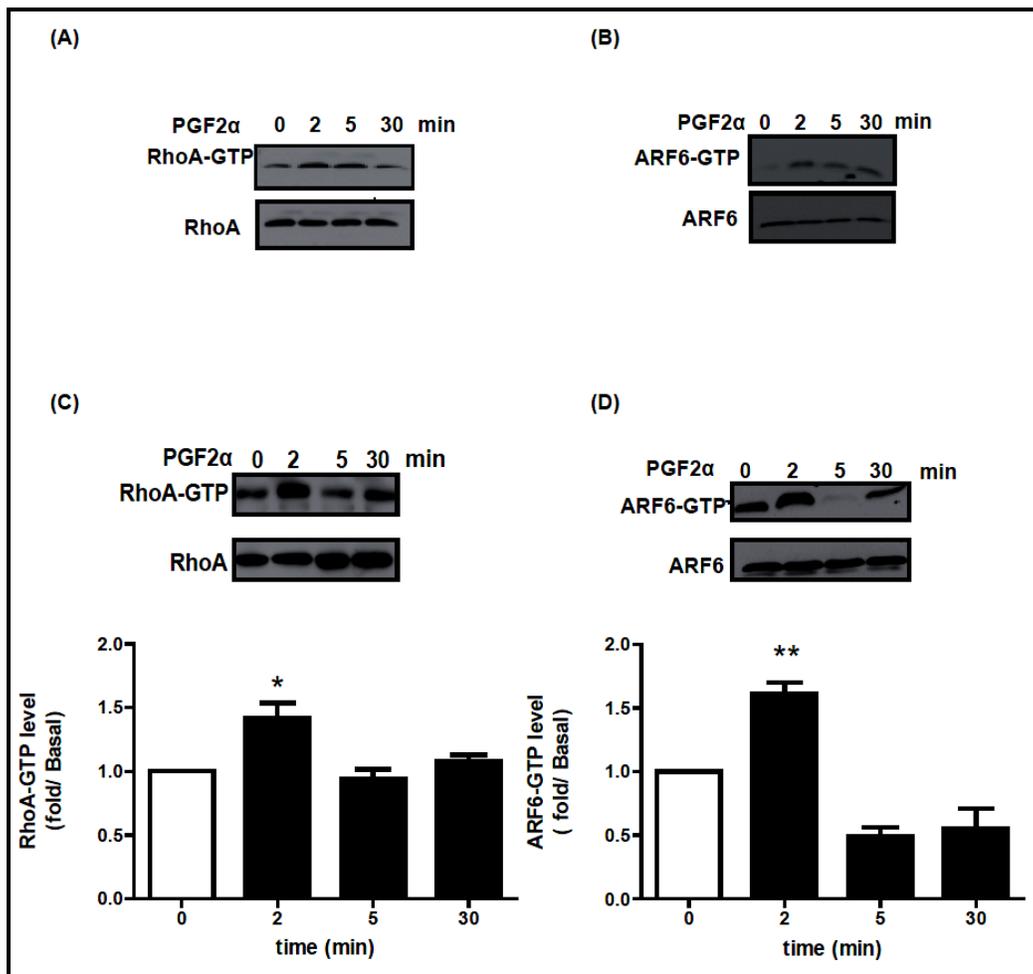


Figure 22: Activation des GTPases RhoA et ARF6 dans les cellules HEK293 HA-FP (A, B) et SW480 (C, D)

(A) Activation de RhoA dans les cellules HEK293 HA-FP. (B) Activation d'ARF6 dans les cellules HEK293 HA-FP. (C) Activation de RhoA dans les cellules SW480. (D) Activation d'ARF6 dans les cellules SW480. Les cellules ont été stimulées avec du PGF2 α (1 μ M, pendant 2, 5 et 30 min). L'expérience a été effectuée 1 à 2 fois dans les cellules HEK293 HA-FP (à répéter 2 autres fois) et 3 fois dans les cellules SW480 (*P < 0.05, **P < 0.01).

2.2. La Rho GTPase RhoA stimule la réorganisation du cytosquelette d'actine ainsi que la contraction cellulaire en activant la myosine II (MLC) et la cofiline en réponse au PGF2 α

RhoA et ARF6 ne sont pas les seules Rho GTPases à réguler le réarrangement du réseau d'actine. Afin de déterminer si cette réponse biologique au ligand PGF2 α était bien contrôlée par la voie RhoA, nous avons analysé les niveaux de phosphorylation des protéines effectrices bien en amont de RhoA telles que la chaîne légère de Myosine II (MLC) et la cofiline. Comme le montre la **figure 23**, la stimulation des cellules HEK293 HA-FP ou des SW480 avec le PGF2 α (1 μ M) pendant 2, 5 et 30 min, augmente de façon remarquable et rapide les niveaux de phosphorylation de la protéine MLC et de la cofiline.

2.3. Le PGF2 α induit la phosphorylation de l'oncogène c-Src dans la lignée cancéreuse SW480

Plusieurs études ont montré l'importance de la protéine tyrosine kinase c-Src, dans la progression tumorale permettant à la tumeur de proliférer, de résister à la mort cellulaire et d'acquérir des capacités accrues de migration et d'angiogenèse (Donaldson 2003, Caviston, Cohen et al. 2014) . Il s'est avéré que la protéine Src est activée dans plus de 80% des adénocarcinomes coliques (Cam, Masaki et al. 2001).

Des données ont également montré que les GTPase ARF1 et ARF6 induisait la formation de fibres de stress de type ventrales suite à l'activation de c-Src par la protéine kinase C (Caviston, Cohen et al. 2014). Ces résultats nous ont incité à aller vérifier si la stimulation des cellules du cancer colorectal, au PGF2 α , augmentait le niveau de phosphorylation de la protéine c-Src étant donné que ce même ligand induit l'activation de la GTPase ARF6 dans la même lignée.

Pour ce faire, nous avons stimulé les cellules SW480 qui étaient dans du milieu contenant du FBS (0.2%) pendant 48 h tel qu'indiqué dans la partie matériels et méthodes, avec le PGF2 α (1 μ M) pendant 2, 5 et 30 min. Tel qu'illustré dans la **figure 24**, le PGF2 α a induit la phosphorylation de la protéine c-Src dans cette lignée maligne.

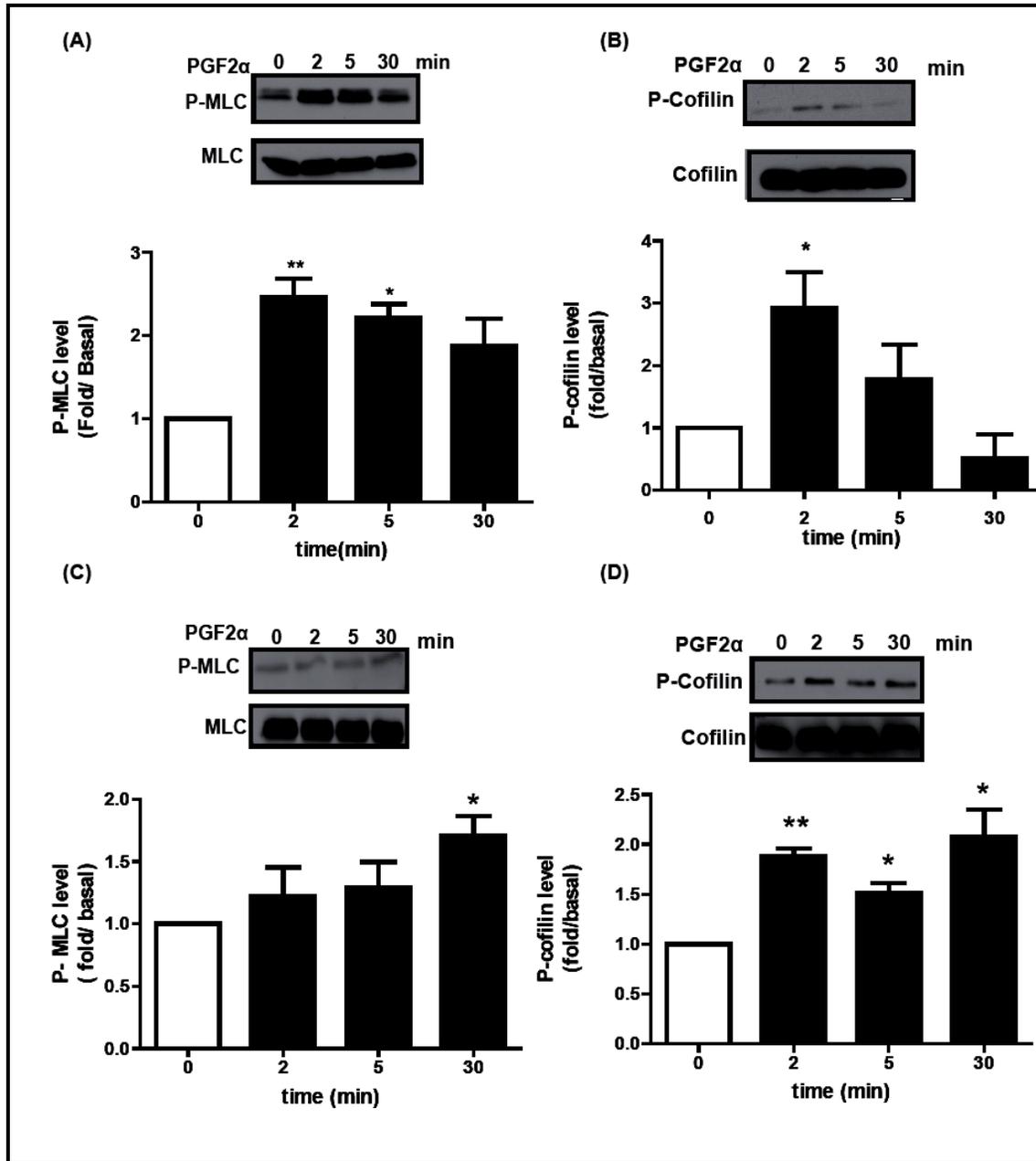


Figure 23: Effet du PGF2 α sur la phosphorylation de la MLC et de la cofiline dans les cellules HEK293 HA-FP (A, B) et SW480 (C, D)

(A). Phosphorylation de la MLC dans les cellules HEK293 HA-FP. (B). Phosphorylation de la cofiline dans les cellules HEK293 HA-FP. (C). Phosphorylation de la MLC dans les cellules SW480 (D) Phosphorylation de la cofiline dans les cellules SW480. Les cellules ont été stimulées avec du PGF2 α (1 μ M, pendant 2, 5 et 30 min). L'expérience a été effectuée 3 fois (n=3, *P < 0.05, **P < 0.01).

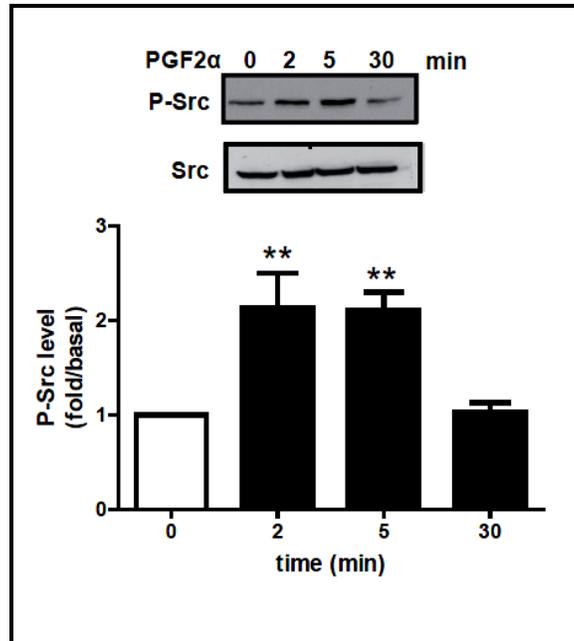


Figure 24: Phosphorylation de l'oncogène c-Src dans les cellules SW480

Les cellules SW480 ont été stimulées avec du PGF2 α (1 μ M, pendant 2, 5 et 30 min). L'expérience a été effectuée 3 fois (n=3, **P < 0.01).

2.4. PGF2 α induit la phosphorylation du récepteur de l'EGF (EGFR) dans les HEK293 HA-FP mais pas dans les SW480

Il a été montré que la phosphorylation du récepteur de l'EGR (EGFR) sur le site Tyr⁸⁴⁵ par la tyrosine kinase soluble c-Src, était impliquée dans la régulation de l'activité du récepteur aussi bien dans les conditions normales que pathologiques notamment dans la progression tumorale (Biscardi, Maa et al. 1999).

De nombreuses études ont montré que les GPCR, pouvaient activer la voie des MAPK impliquée dans la transactivation des RTK tel que le récepteur de l'EGF (EGFR) (Pierce, Luttrell et al. 2001). Plus récemment, il a été démontré que le récepteur FP transactivait l'EGFR via la voie des MAPK en réponse au PGF2 α (Goupil, Wisheart et al. 2012).

Les résultats obtenus de la phosphorylation de l'oncogène c-Src, dans la lignée cancéreuse SW480, nous ont amené à vérifier la phosphorylation du récepteur de l'EGFR sur différents résidus (Tyr⁸⁴⁵ et Tyr¹⁰⁸⁶).

Nous avons donc stimulé les cellules HEK293 HA-FP et les cellules SW480 avec le PGF2 α (1 μ M) pendant 2, 5 et 30 minutes.

En effet, comme le montre la **figure 25**, le PGF2 α a augmenté les niveaux de phosphorylation du récepteur de l'EGF sur les sites Tyr⁸⁴⁵ et Tyr¹⁰⁸⁶ dans les cellules HEK293 HA-FP. Par contre, dans les cellules SW480, aucune augmentation des niveaux de phosphorylation sur ces deux tyrosines n'a été observée.

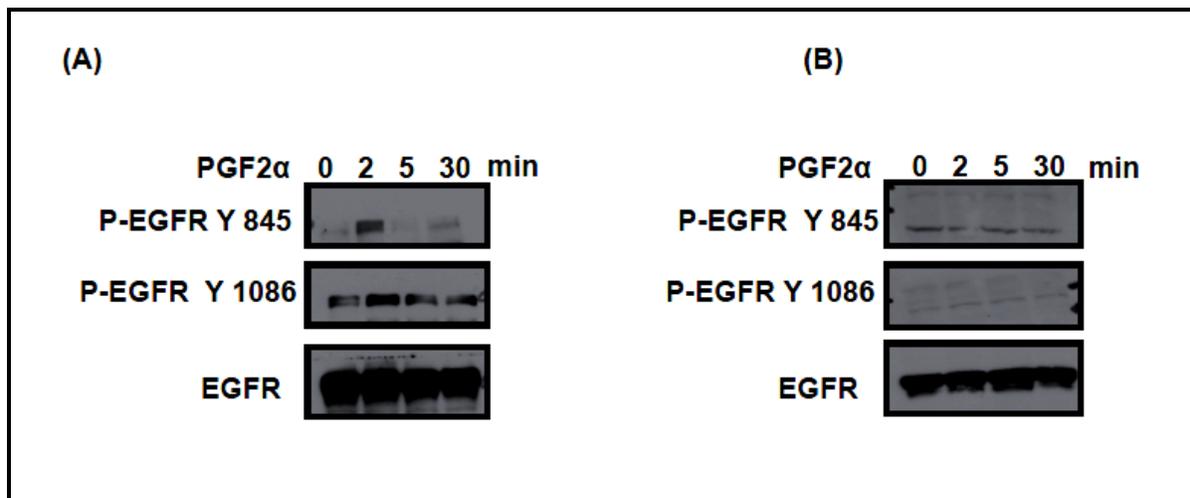


Figure 25: Phosphorylation du récepteur de l'EGF sur les résidus Y⁸⁴⁵ et Y¹⁰⁸⁶

(A). Les cellules HEK293 HA-FP ont été stimulées avec du PGF2 α (1 μ M, pendant 2, 5 et 30 min). L'expérience a été effectuée 2 fois (n=2) (à répéter une autre fois). **(B).** Les cellules SW480 ont été stimulées avec du PGF2 α (1 μ M, pendant 2, 5 et 30 min). L'expérience a été effectuée une seule fois (n=1) (à répéter 2 autres fois).

2.5. Effet du PGF2 α sur les kinases effectrices ERK, JNK et P38 de la voie des MAPK (Mitogen-activated protein kinases)

Depuis plusieurs années la voie des MAPK est connue comme un sentier de régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de la migration cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse dans de nombreux cancers dont le cancer colorectal. Sachant que ces voies sont activées par les récepteurs membranaires dont les récepteurs couplés aux protéines G et les

RTK, nous avons voulu déterminer si la liaison du $\text{PGF2}\alpha$ à son récepteur activait une ou plusieurs de ces voies.

Des études antérieures ont montré que les MAPK : ERK, JNK et P38 modulaient la réorganisation du cytosquelette d'actine dans différents modèles cellulaires (Wang and Doerschuk 2001, Gelderblom, Eminel et al. 2004, Choi and Helfman 2014)

Nous nous sommes donc intéressés à ces trois protéines kinases. Pour ce faire, des expériences ont été effectuées dans les deux lignées cellulaires, stimulées aux temps indiqués 2, 5 et 30 min.

Nous avons tout d'abord analysé l'activation de la protéine kinase ERK dans les cellules HEK293 HA-FP suite à la stimulation au $\text{PGF2}\alpha$ (1 μM). Les résultats de la **figure 26** illustre que la stimulation avec le ligand augmentait de façon soutenue, jusqu'à 30 min de stimulation, le niveau de phosphorylation de la kinase ERK. Par contre, aucun effet du ligand n'a été observé dans les cellules SW480. Il est à noter que celles-ci présentaient déjà un taux de base p-ERK élevé.

Nous avons ensuite examiné le niveau de phosphorylation de la protéine JNK. Tel qu'illustré en **figure 27**, le $\text{PGF2}\alpha$ a induit la phosphorylation de JNK dans les deux modèles cellulaires. Par contre, l'effet de ce ligand n'a pas été observé sur l'activation de la protéine P38 (**Figure 28**).

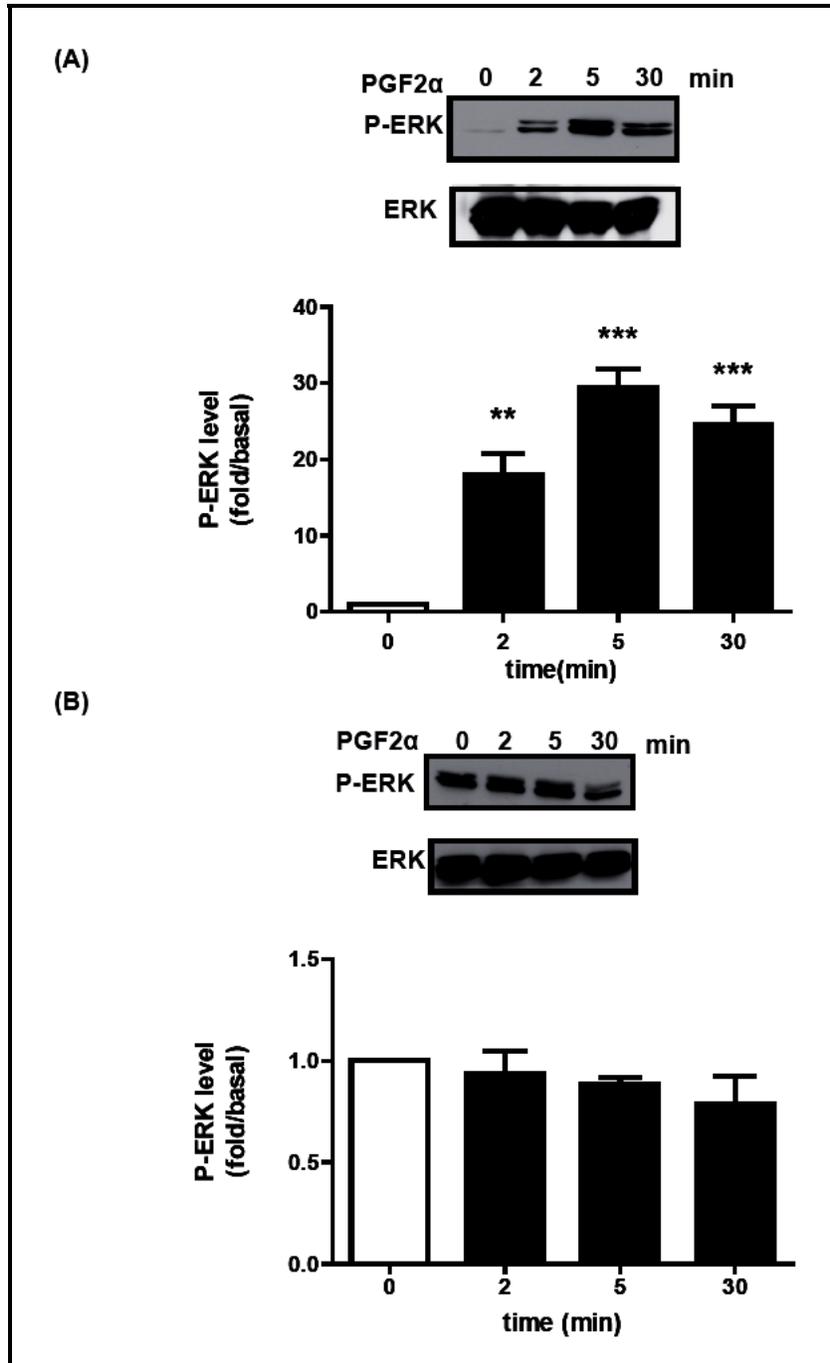


Figure 26: Effet du PGF2 α sur la phosphorylation de la kinase ERK

(A). Les cellules HEK293 HA-FP. (B). Les cellules SW480. Les cellules ont été stimulées avec le PGF2 α (1 μ M) pendant 2, 5 et 30 min. Les expériences ont été effectuées 3 fois (n=3, **P < 0.01, ***P < 0.001).

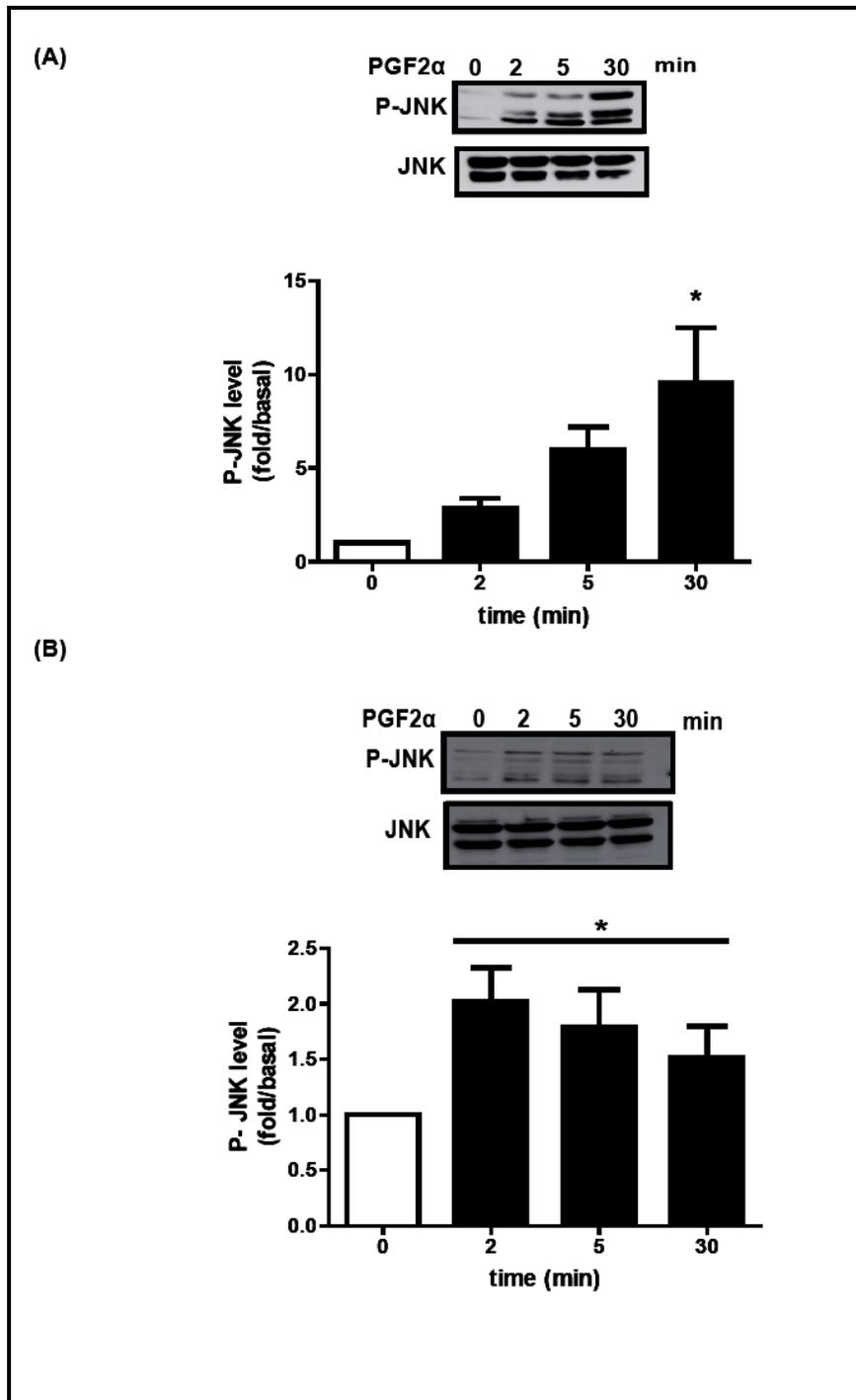


Figure 27: Effet du PGF2 α sur la phosphorylation de la kinase JNK

(A). Les cellules HEK293 HA-FP. **(B).** Les cellules SW480. Les cellules ont été stimulées avec 1 μ M de PGF2 α pendant 2, 5 et 30 min. Les expériences ont été effectuées 3 fois (n=3,*P <0.05)

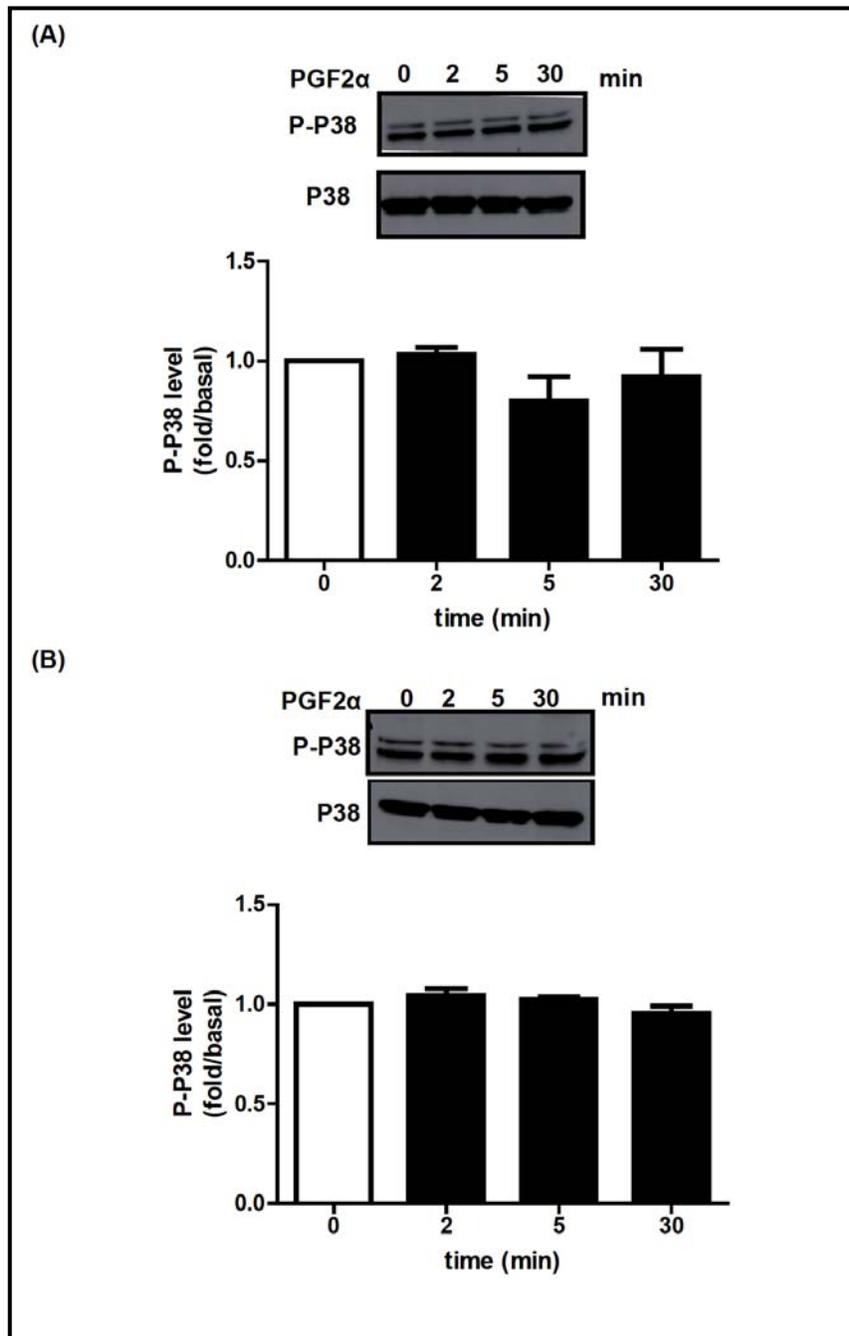


Figure 28: Effet du PGF2 α sur la phosphorylation de la kinase P38

(A). Les cellules HEK293 HA-FP. (B). Les cellules SW480. Les cellules ont été stimulées avec 1 μ M de PGF2 α pendant 2, 5 et 30 min. Les expériences ont été effectuées 3 fois (n=3).

2.6. La GTPase ARF6 régule l'activité de la chaîne légère de myosine II (MLC) ainsi que la formation de fibres de stress dans les cellules SW480 en réponse au PGF2 α

Dans les séries d'expériences précédentes, les résultats obtenus nous ont permis de confirmer que l'activation de la GTPase RhoA était impliquée dans les réponses au PGF2 α . Des études ont montré que, l'activation d'ARF6 régulaient le trafic membranaire ainsi que la réorganisation de l'actine (Schafer, D'Souza-Schorey et al. 2000). Nos résultats ont également montré que la stimulation des cellules avec le PGF2 α , induisait une augmentation du niveau d'activation de la GTPase ARF6. Afin d'élucider le mécanisme par lequel la GTPase ARF6 régule l'assemblage de l'actine, nous avons procédé à la déplétion de cette GTPase dans les cellules SW480 par des lentivirus ShARF6. Nous avons ensuite stimulé les cellules par le PGF2 α (1 μ M) aux temps 2, 5 et 30 min. Comme le montrent les résultats de la **figure 29**, la stimulation par le PGF2 α a augmenté de façon soutenue les niveaux de phosphorylation de la chaîne légère de myosine II (MLC), d'environ 2 fois, comparés aux niveaux de phosphorylation dans les cellules contrôles infectées par des lentivirus ShScramble.

Nous avons ensuite analysé, la formation des fibres de stress dans les cellules SW480 contrôles (ShScramble) et déplétées d'ARF6 (ShARF6) par immunofluorescence. Les résultats obtenus dans **les figures 30 et 31**, ont montré que la stimulation des cellules SW480 contrôles (ShScramble) par le PGF2 α (1 μ M), pendant 15 min, induisait la formation de fibres de stress. Les cellules déplétées d'ARF6 stimulées avec le DMSO (véhicule) présentaient plus de fibres de stress comparées aux cellules contrôles (ShScramble) stimulées avec le même véhicule. La stimulation de ces cellules par le PGF2 α n'a eu aucun effet.

Les expériences ont été effectuées dans les cellules SW480 car les essais d'activation des GTPases RhoA et ARF6 ont été faits 3 fois dans cette lignée. Il faudrait donc refaire les essais d'activation dans les cellules HEK293 HA-FP 1 à 2 fois et par la suite déléter ARF6 et faire l'étude.

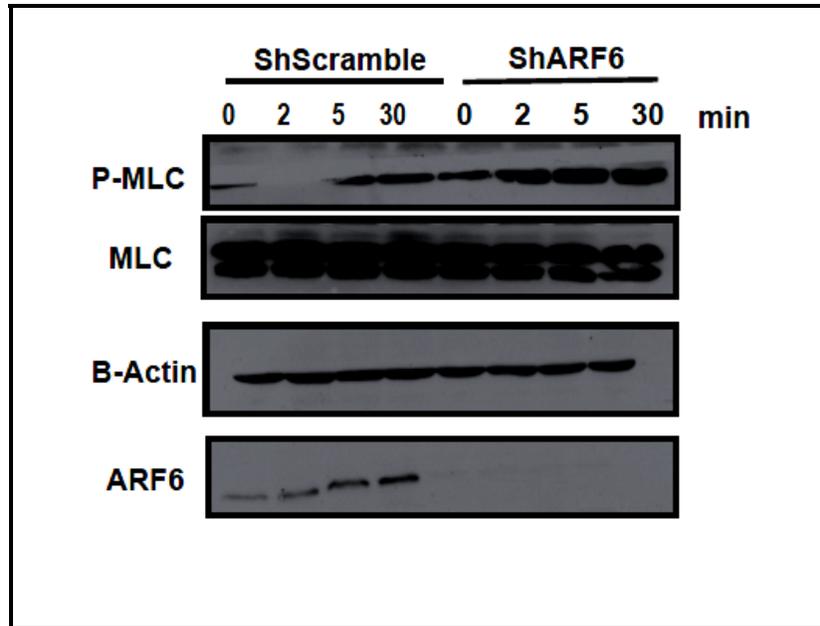
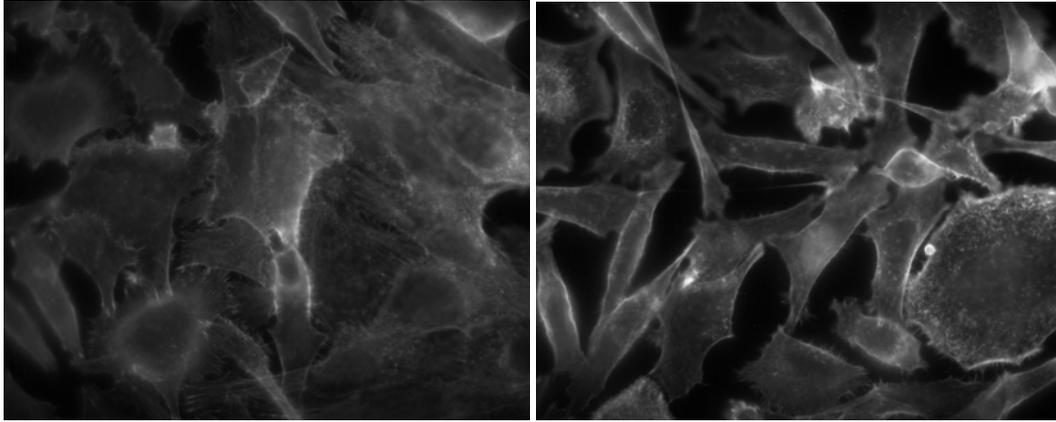


Figure 29: Effet du PGF2 α sur la phosphorylation de MLC dans les cellules SW480 déplétées d'ARF6

Les cellules ont été infectées par les lentivirus spécifiques ShARN (ShARF6). Après 72 h d'infection, les cellules ont été maintenues dans du milieu contenant du FBS (0.2%), ensuite stimulées avec du PGF2 α , (1 μ M) pendant 2, 5 et 30 min. L'expérience a été effectuée une fois (n=1) (à répéter 2 autres fois).

(1). ShScramble

(A) DMSO



(B) PGF2 α

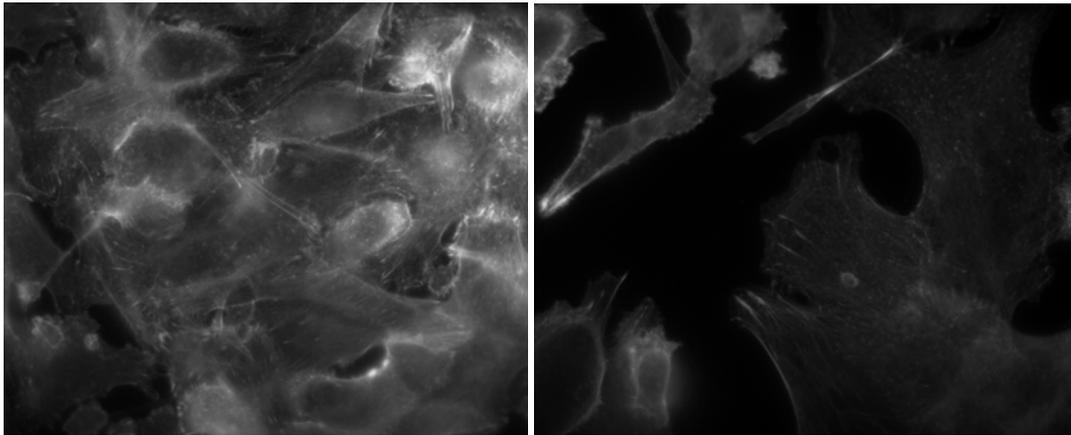
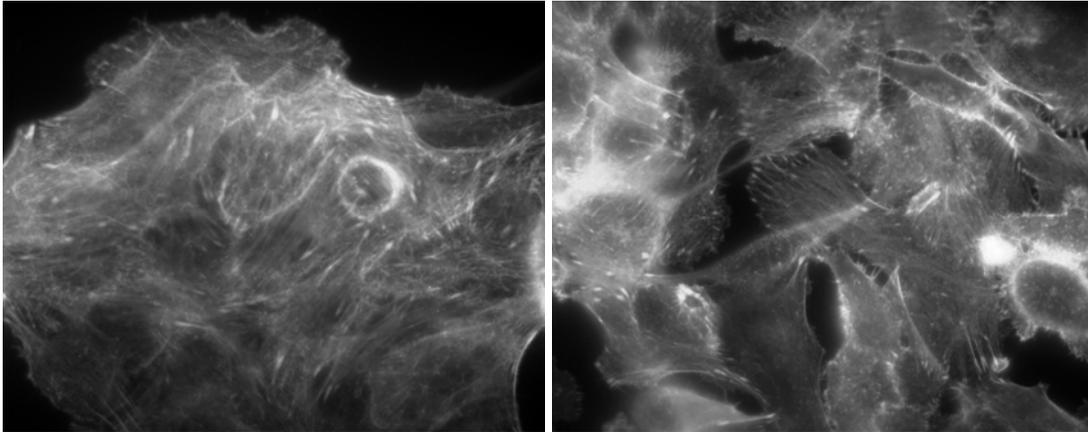


Figure 30: Stimulation des cellules SW480 contrôles, par le PGF2 α

Les cellules ont été infectées avec des lentivirus ShScramble comme montré dans **(A)**, stimulées avec le PGF2 α (1 μ M, 15 min) **(B)**, fixées et marquées avec l'Alexa-Fluoro 568 couplée à la phalloïdine. L'expérience a été effectuée une fois (n=1) (à répéter 2 autres fois) et analysée au microscope à fluorescence au grossissement 40 x (panneaux de gauche et de droite : deux différentes photos prises pour chaque condition).

(2). ShARF6

(A) DMSO



(B) PGF2 α

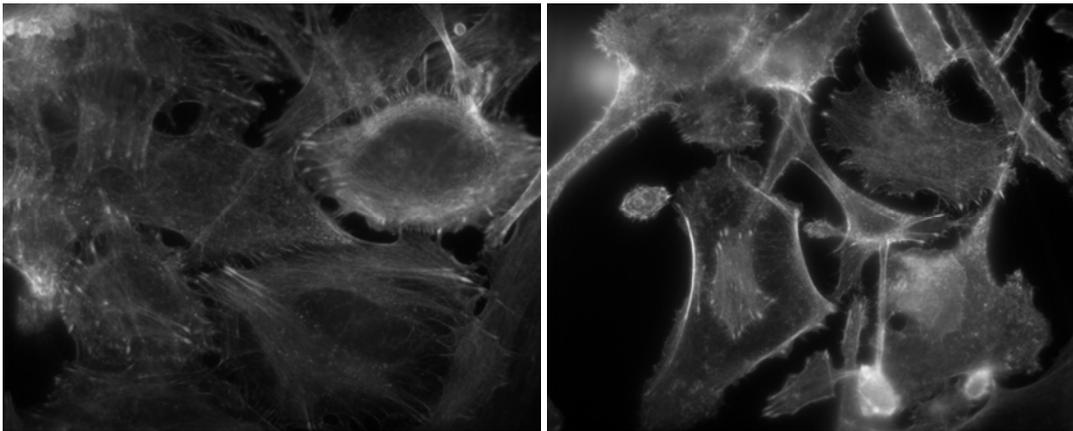


Figure 31: Stimulation des cellules SW480 déplétées d'ARF6 par le PGF2 α

Les cellules ont été infectées avec des lentivirus ShARF6 (A), stimulées avec le PGF2 α (1 μ M, 15 min) (B), fixées et marquées avec l'Alexa-Fluoro 568 couplée à la phalloïdine. L'expérience a été effectuée une fois (n=1) (à répéter 2 autres fois) et analysée au microscope à fluorescence au grossissement 40 x (panneaux de gauche et de droite : deux différentes photos prises pour chaque condition).

Discussion

L'ensemble de nos résultats de travaux de recherche effectués dans différents modèles cellulaires nous a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels le $\text{PGF2}\alpha$ induit la réorganisation dynamique du cytosquelette d'actine. Cependant, toutes les expériences faites dans les cellules SW480 et non pas dans les cellules HEK293 HA-FP, devraient être refaites dans les HEK293 HA-FP et vice versa, car ce modèle cellulaire de transfection par le récepteur FP, ne représente pas un bon modèle pour l'étude des voies de signalisation activées par le $\text{PGF2}\alpha$ dans le cancer du colon.

Dans un premier temps nous avons pu observer, par microscopie à fluorescence, que la stimulation des cellules HEK293, exprimant de façon stable le récepteur FP, au $\text{PGF2}\alpha$, avait un effet en un laps de temps court (15 min), sur l'ondulation membranaire ainsi que sur la contraction des fibres de stress.

Plusieurs études faites dans le contexte du mouvement cellulaire au cours de l'embryogenèse, dans un modèle de fibroblastes 3T3, ont montré que la famille des Rho GTPases : Rho, Rac, Cdc42 et Ras régulaient l'organisation des filaments d'actine. Cette régulation guide en permanence les processus d'adhésion, de polarité et de mouvement cellulaire (Ridley 1996, Van Aelst and D'Souza-Schorey 1997, Hall 1998).

Dans le but de confirmer que la Rho GTPase était impliquée dans le remodelage de l'actine stimulé par le $\text{PGF2}\alpha$, nous avons procédé à l'inhibition de cette GTPase dans les cellules HEK293 HA-FP. Nos résultats ont montré que l'inhibition de la Rho GTPase diminuait l'ondulation membranaire ainsi que la contraction fibres de stress.

Nous avons pu observer, dans une autre expérience que, la stimulation des cellules HEK293 HA-FP par le $\text{PGF2}\alpha$ pendant 24 h, menait à une réorganisation du cytosquelette d'actine très perceptible. L'inhibition de Rho, s'est avéré une stratégie efficace pour diminuer cet effet. Ces observations suggèrent que, des mécanismes moléculaires précis de mise en place de remodelage du cytosquelette d'actine, peuvent contribuer au mouvement cellulaire.

La dynamique du squelette intracellulaire repose sur l'assemblage ainsi que sur le remaniement des réseaux d'actine et de microtubules. D'autres protéines filamenteuses constituant le cytosquelette d'actine dites filaments intermédiaires, jouent un rôle fondamental

dans le maintien de l'intégrité de la cellule. Il a été démontré dans une étude *in vitro* que la vimentine, protéine des filaments intermédiaires, était associée à des changements dans la forme, la motilité et l'adhésion cellulaire durant la transition épithélio-mésenchymateuse (Mendez, Kojima et al. 2010). Nous avons donc analysé le profil d'expression de cette protéine filamenteuse afin de vérifier si elle était impliquée dans ce réarrangement cytosquelettique. En effet, nos résultats ont montré qu'en réponse au $\text{PGF2}\alpha$, les cellules HEK293 HA-FP expriment doublement la vimentine lors du processus d'adhérence intercellulaire observé en microscopie.

La surexpression de la vimentine, a suscité l'intérêt d'étudier le profil d'expression d'autres protéines qui pourraient expliquer l'adhérence des cellules entre elles, telles que l'expression de la cadhérine-E et des métalloprotéinases (MMP-2 et MMP-9).

Nous nous sommes donc intéressés à ces protéines dans le but de confirmer que ces changements morphologiques n'étaient pas dus aux premières étapes clés de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Les résultats de cette analyse, n'ont montré aucune variation du profil d'expression de ces protéines, ce qui est resté encore très mal compris. D'autres travaux, ont élucidé l'implication des GTPases Rho et Rac dans l'adhésion cellulaire médiée par l'accumulation de la cadhérine-E (Braga, Machesky et al. 1997, Takaishi, Sasaki et al. 1997, Zhong, Kinch et al. 1997). Il est important donc de savoir que les résultats obtenus ne sont que préliminaires, et contribueront grandement à la compréhension des mécanismes moléculaires impliquées dans ces changements phénotypiques, qui pourraient être attribués à la perte d'adhésion cellulaire. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet du $\text{PGF2}\alpha$ dans une lignée cancéreuse de colon où les conditions expérimentales se rapprochent plus ou moins des conditions physiopathologiques, afin de pouvoir en tirer des conclusions.

Les expériences effectuées dans le contexte de la migration cellulaire, nous ont permis de déduire que notre ligand naturel $\text{PGF2}\alpha$, avait un effet anti-migratoire en un laps de temps court dans les cellules HEK293 HA-FP, et que l'inhibition de la GTPase Rho, ne restaurait pas la migration de base de ces cellules. Le $\text{PGF2}\alpha$ a bel et bien induit la réorganisation du cytosquelette d'actine, l'ondulation membranaire mais pas la migration cellulaire. Selon Ridley et ses collaborateurs, l'activation de Rac contrôle la dynamique de la membrane plasmique via le cytosquelette d'actine et mène à la formation des extensions membranaires appelées

lamellipodes (Ridley, Paterson et al. 1992). La formation de lamellipodes est donc nécessaire à l'établissement de la polarité ainsi qu'à la migration cellulaire.

Van Leeuwen et ses collaborateurs ont suggéré que l'activation de RhoA et de Rac1 contrôlaient l'activité du complexe d'actomyosine (association de la myosine II et des filaments d'actine) menant ainsi à une augmentation ou à une diminution de la contraction cellulaire (van Leeuwen, van Delft et al. 1999). Dans cette expérience les cellules avaient adopté une forme ronde suite au réarrangement de leurs cytosquelettes d'actines mais ça se pourrait que le fait que la GTPase Rac1 ne soit pas activée, puisse expliquer l'absence de formation de filopodes et lamellipodes, qui explique l'absence de migration cellulaire suite à la stimulation au PGF2 α . Il est donc intéressant de noter que, l'essai d'activation de la GTPase Rac1, pourrait contribuer à une meilleure compréhension de ceci. Les expériences devraient également être faites à des temps plus longs afin de s'assurer des résultats (si c'était bien Rac1 qui n'était pas activée ou alors le ligand induisait la migration cellulaire à des temps plus longs).

La capacité des cellules à se mouvoir, que ce soit pour effectuer des processus physiologiques ou pathologiques, repose sur la dynamique du cytosquelette d'actine et des structures d'adhérence. Dans ce travail de recherche, nous n'avons malheureusement pas étudié la phosphorylation de la protéine FAK (Focal Adhesion Kinase), qui comme le suggèrent plusieurs études, intervient dans les premiers événements tel que l'adhérence à la matrice extracellulaire, conduisant au développement tumoral tels que la migration, la prolifération, la progression et la survie cellulaire (Parsons 2003). Il serait donc indispensable d'étudier sa phosphorylation afin de mieux comprendre ces réponses biologiques.

La formation des fibres de stress induite par le PGF2 α dans les différents modèles cellulaires utilisés dans ce travail de recherche, a démontré une inhibition de la migration des cellules, mais en réalité cette inhibition constitue l'une des premières étapes qui permettent aux cellules de se mouvoir. Ce phénomène pourrait expliquer la réponse d'étalement et d'adhésion cellulaire. L'assemblage des réseaux d'actine et de microtubules constitue une étape précoce afin de permettre aux cellules d'établir un certain équilibre de forces en lien avec leur environnement pour initier leur motilité. Des essais effectués sur des fibroblastes 3T3 ont également montré que, la protéine Rho était impliquée dans l'adhérence des cellules à leur substrat ou à leur matrice extracellulaire et que les fibres de stress ainsi que les points

d'adhésion focaux conduisaient à une inhibition du mouvement cellulaire (Nobes and Hall 1999).

Dans un second temps, nous avons étudié les voies de signalisation impliquées dans la contraction des fibres de stress et dans l'ondulation membranaire. Pour ce faire nous avons essayé d'élucider le mécanisme moléculaire qui contrôle ce changement phénotypique dans les mêmes modèles d'étude. Nous nous sommes donc intéressés aux isoformes RhoA et ARF6 des GTPases Rho et ARF respectivement. Effectivement, nous avons pu observer une augmentation des niveaux d'activation de RhoA et d'ARF6 suite à la stimulation des cellules au PGF2 α . Ces résultats valident le rôle que jouent ces GTPases dans le remodelage des filaments d'actine.

Nous avons par la suite voulu étudier l'implication de certains partenaires de ces cascades signalétiques tels que l'activation de la chaîne légère de myosine II (MLC), de la cofiline et de l'oncogène c-Src dans ces réponses.

Comme illustré dans la section résultats, le PGF2 α augmentait les niveaux de phosphorylation de la chaîne légère de myosine II (MLC) ainsi que de la cofiline. Des résultats similaires obtenus dans une étude faite dans un modèle cellulaire de muscle lisse vasculaire, ont élucidé le rôle de la GTPase RhoA dans la régulation de la myosine phosphatase via l'activation des kinases ROCK (Surks, Richards et al. 2003).

Des expériences effectuées au laboratoire ont montré le rôle crucial que joue la GTPase ARF6 dans la régulation des voies de signalisation menant au remodelage de l'actine. Nous avons pu observer dans ce travail de recherche que le PGF2 α augmentait la phosphorylation de l'oncogène c-Src dans les cellules SW480. Les résultats obtenus n'excluent pas la possibilité que la GTPase ARF6 soit activée suite à la phosphorylation de c-Src comme il a été démontré dans une étude menée par Caviston et ses collaborateurs, montrant que les GTPases ARF1 et ARF6 promouvaient la formation des structures d'actine de type ventrales suite à l'activation de la protéine kinase C et Src (Caviston, Cohen et al. 2014).

L'activation du récepteur de l'EGF (EGFR) suite à la fixation de son ligand ou par d'autres récepteurs tels que les RCPG, jouent un rôle important dans la régulation des réponses cellulaires. Cependant, une activation constitutive de ce récepteur pourrait activer de façon anormale des kinases, pouvant être à l'origine du phénotype malin.

Tel qu'indiqué dans la partie résultats, il a été démontré que l'EGFR interagit avec la kinase intra-cytoplasmique qui est la c-Src pour son activation. Nous avons donc étudié la phosphorylation de l'EGFR sur les résidus Tyr⁸⁴⁵ et Tyr¹⁰⁸⁶ dans les deux modèles d'études. En effet, nos résultats rapportent que le récepteur de l'EGF (EGFR) se phosphoryle à la suite de la stimulation du récepteur FP par son ligand PGF2 α dans les cellules HEK293 HA-FP mais pas dans les cellules cancéreuses SW480. L'absence de phosphorylation de l'EGFR sur les résidus Tyr⁸⁴⁵ et Tyr¹⁰⁸⁶ dans les cellules SW480, suggérerait que le PGF2 α ait bel et bien phosphorylé la kinase c-Src mais n'ait pas pu transactiver l'EGFR dans cette lignée, ou alors la phosphorylation s'est faite sur d'autres sites du récepteur.

Des chercheurs ont montré que la stimulation des cellules HEK293 HA-FP par le PGF2 α activait la voie des MAPK suite à la transactivation de l'EGFR (Goupil, Wisheart et al. 2012). Nous nous sommes par la suite intéressés à divers acteurs des MAPK impliqués dans l'assemblage, le recyclage et la contraction du cytosquelette d'actine au sein d'une cellule. Nous avons véritablement pu observer une activation de : ERK, JNK contrairement à la P38 qui n'est pas sollicitée dans ces processus. Ces résultats suggèrent que l'activation de la voie des MAPK, se fait directement par activation du récepteur FP par l'intermédiaire de la protéine Ras, faisant intervenir d'autres voies de signalisation intracellulaire comme la voie de la phospholipase C (PLC γ). Comme elle peut être activée indirectement par transactivation du récepteur à activité tyrosine-kinase EGFR, faisant intervenir le complexe Grb2/Shc/Sos, qui à son tour active la voie de signalisation Ras/MAPK (**Figure 32**).

Il existe un lien entre l'activation de la GTPase Ras et la voie des MAPK lors du mouvement cellulaire (Nobes and Hall 1999). Or, nos résultats de migration cellulaire, montraient la capacité du PGF2 α à induire l'activation de RhoA et de ses effecteurs, d'ARF6 et des MAPK, mais pas la migration cellulaire.

Dans une autre expérience, des résultats nous ont montré que la déplétion de la GTPase ARF6, dans les cellules SW480, induisait une intense activité du cytosquelette d'actine avant même que les cellules ne soient traitées par le ligand. La stimulation de ces cellules au PGF2 α n'a eu aucun effet. Par ailleurs, à l'échelle moléculaire, les niveaux de phosphorylation de la chaîne légère de myosine II (MLC) étaient nettement augmentés comparés à ceux des cellules exprimant ARF6 (les expériences devraient être refaites 2 à 3 autres fois dans la même lignée cellulaire ainsi que dans les cellules HEK293 HA-FP afin de pouvoir en tirer des conclusions).

A la lumière de ces résultats, il serait intéressant d'étudier l'activation de la GTPase RhoA ainsi que d'autres partenaires moléculaires conduisant à la réorganisation des filaments d'actine. Une étude s'est penchée sur le rôle potentiel des GTPases ARF6, Rac1 et RhoA dans la régulation coordonnée du remodelage du cytosquelette où il a été établi que l'activation d'ARF6 régulait négativement la signalisation de RhoA impliquée dans la formation de fibres de stress en réponse à des stimuli extracellulaires tels que LPA et la bombésine (Boshans, Szanto et al. 2000).

Bien que les traitements traditionnels du cancer; la chirurgie, l'irradiation et la chimiothérapie, aient peu d'effets sur les métastases. Il a été mis en évidence que les prostaglandines régulaient les interactions cellulaires et l'adhésion avec la matrice extracellulaire dans de nombreux phénomènes tumoraux.

Des études ont démontré l'effet bénéfique de l'utilisation des inhibiteurs de la COX-2, des inhibiteurs de la phosphorylation de FAK, des inhibiteurs des intégrines ou alors des antagonistes des récepteurs des prostaglandines, sur différents cancers (Menter and Dubois 2012). L'originalité de ces résultats ouvre sur l'implication clinique potentielle visant à inhiber les molécules favorisant les premières étapes du processus métastatique voir les changements morphologiques, l'adhésion et la migration cellulaire.

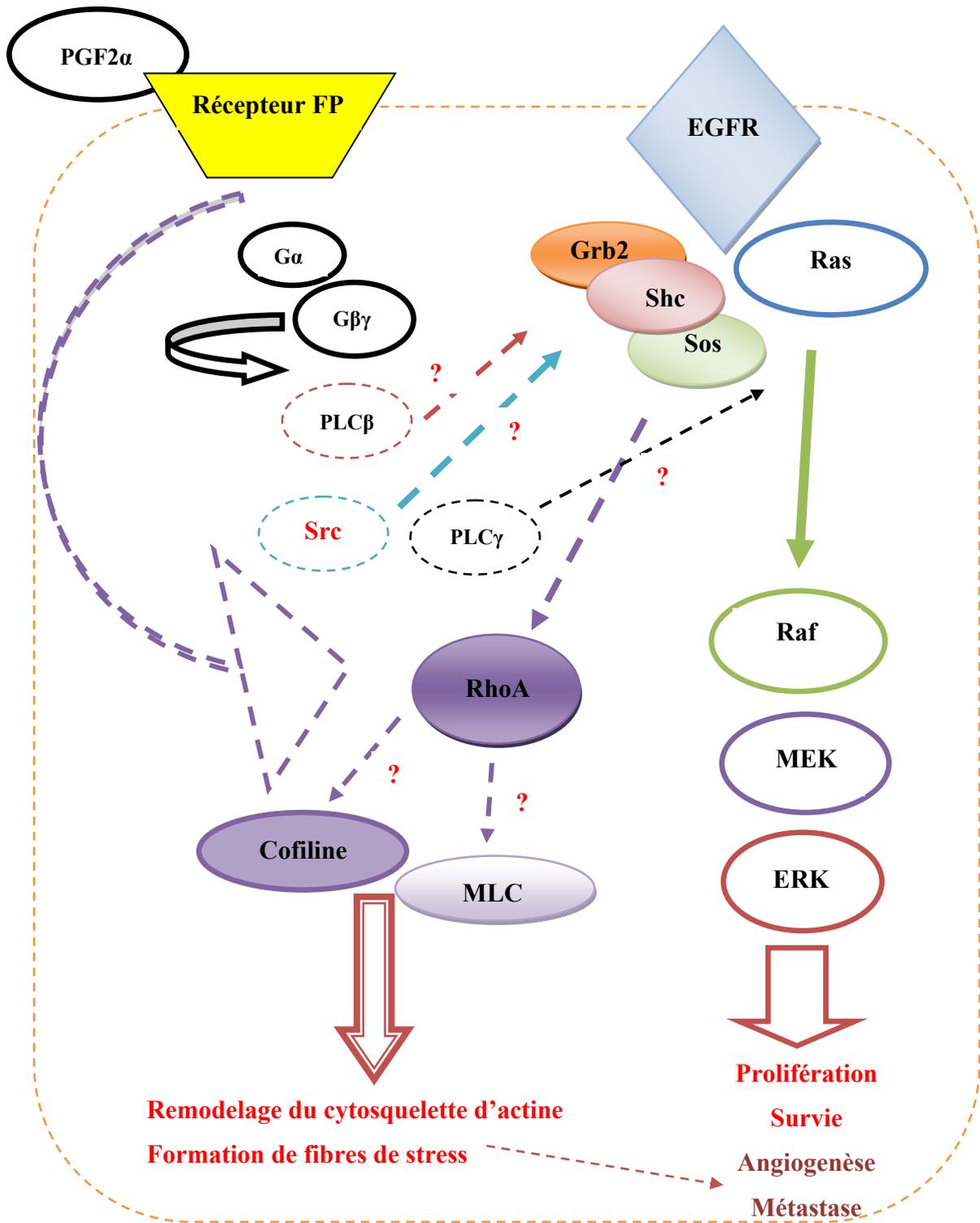


Figure 32 : Les voies de signalisation activées par le PGF2 α .

La fixation du ligand $\text{PGF}_2\alpha$ sur son récepteur FP active la voie des MAPK par l'intermédiaire de la protéine Ras, faisant intervenir d'autres voies de signalisation intracellulaire comme la voie de la phospholipase C ($\text{PLC}\gamma$). Elle peut aussi être activée indirectement par transactivation du récepteur à activité tyrosine-kinase EGFR, faisant intervenir la $\text{PLC}\beta$, l'oncogène Src et le complexe Grb2/Shc/Sos, qui à son tour active la voie de signalisation Ras/MAPK. La voie de la GTPase RhoA est ainsi activée soit directement par le récepteur FP ou via l'EGFR, qui à son tour active ses partenaires de signalisation la MLC et la cofiline pour remodeler le cytosquelette d'actine et former ainsi les fibres de stress. Enfin, cette réponse biologique serait impliquée dans la progression tumorale.

Conclusion

L'ensemble des résultats trouvés lors de ce travail de recherche sur l'étude de la réponse du récepteur FP, suite à la stimulation au $\text{PGF2}\alpha$ dans différents modèles cellulaires, nous ont permis de mieux cerner les voies de signalisation ainsi que les différents senseurs moléculaires qui contrôlent la réorganisation du cytosquelette d'actine au sein d'une cellule. Les explications proposées à la suite de ces travaux ainsi que des résultats antérieurs d'une étude réalisée dans le laboratoire, portant sur la modulation allostérique du récepteur FP dans la même lignée cellulaire, aideront donc à élargir l'horizon de recherche sur ce récepteur nous permettant ainsi de mieux appréhender son implication prépondérante dans la progression tumorale en plus du récepteur EP.

A priori, le travail demeure parcellaire même si nous avons pu obtenir des résultats prospectifs. Empiriquement, il reste encore une série de mécanismes à identifier comme par exemple comprendre l'inhibition du potentiel migratoire des cellules stimulées par le $\text{PGF2}\alpha$ à savoir l'activation de Rac1 et de la protéine cytoplasmique dite cortactine, dont son recrutement à la membrane, est dépendant de la GTPase Rac1 (Weed, Du et al. 1998, Vidal, Geny et al. 2002).

Il serait aussi intéressant de réaliser ces mêmes expériences sur d'autres lignées cellulaires de cancer de colon, que ce soit murines ou humaines voir même des études *in vivo*, pour s'assurer de la manière dont la prostaglandine ($\text{PGF2}\alpha$), contribue à la progression du cancer colorectal. Finalement, si nous arrivions à élucider tous ces mécanismes moléculaires, et en collaborations avec des chimistes, cette approche pourrait donner des pistes thérapeutiques potentielles, pour la conception d'une nouvelle classe d'agents thérapeutiques ayant des propriétés allostériques. Ces molécules devraient agir de façon ciblée et efficace, qu'elles soient agonistes ou antagonistes. Elles devraient interférer avec l'assemblage ou la conformation du récepteur afin de moduler les différentes voies de signalisation impliquées dans les différentes étapes de la progression tumorale telles que l'adhésion, la migration, la prolifération et la croissance cellulaire.

Références

- Adams, J. C. (1995). "Formation of stable microspikes containing actin and the 55 kDa actin bundling protein, fascin, is a consequence of cell adhesion to thrombospondin-1: implications for the anti-adhesive activities of thrombospondin-1." J Cell Sci **108 (Pt 5)**: 1977-1990.
- Alberts B, J. A., Lewis J, et al. (2002). Molecular biology of the cell. New York, Garland science.
- Alessi, D., L. K. MacDougall, M. M. Sola, M. Ikebe and P. Cohen (1992). "The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1." Eur J Biochem **210(3)**: 1023-1035.
- Alexander, C. L., S. J. Miller and S. R. Abel (2002). "Prostaglandin analog treatment of glaucoma and ocular hypertension." Ann Pharmacother **36(3)**: 504-511.
- Amano, M., M. Ito, K. Kimura, Y. Fukata, K. Chihara, T. Nakano, Y. Matsuura and K. Kaibuchi (1996). "Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)." J Biol Chem **271(34)**: 20246-20249.
- Andersen, V., L. Agerstjerne, D. Jensen, M. Ostergaard, M. Saebo, J. Hamfjord, E. Kure and U. Vogel (2009). "The multidrug resistance 1 (MDR1) gene polymorphism G-rs3789243-A is not associated with disease susceptibility in Norwegian patients with colorectal adenoma and colorectal cancer; a case control study." BMC Med Genet **10**: 18.
- Arakawa, T., O. Laneuville, C. A. Miller, K. M. Lakkides, B. A. Wingerd, D. L. DeWitt and W. L. Smith (1996). "Prostanoid receptors of murine NIH 3T3 and RAW 264.7 cells. Structure and expression of the murine prostaglandin EP4 receptor gene." J Biol Chem **271(47)**: 29569-29575.
- Arber, S., F. A. Barbayannis, H. Hanser, C. Schneider, C. A. Stanyon, O. Bernard and P. Caroni (1998). "Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase." Nature **393(6687)**: 805-809.
- Baldwin, J. M. (1994). "Structure and function of receptors coupled to G proteins." Curr Opin Cell Biol **6(2)**: 180-190.
- Bamburg, J. R. and O. P. Wiggan (2002). "ADF/cofilin and actin dynamics in disease." Trends Cell Biol **12(12)**: 598-605.
- Basu, S. (1999). "Oxidative injury induced cyclooxygenase activation in experimental hepatotoxicity." Biochem Biophys Res Commun **254(3)**: 764-767.
- Basu, S., M. Whiteman, D. L. Matthey and B. Halliwell (2001). "Raised levels of F(2)-isoprostanes and prostaglandin F(2alpha) in different rheumatic diseases." Ann Rheum Dis **60(6)**: 627-631.
- Beemiller, P., A. D. Hoppe and J. A. Swanson (2006). "A phosphatidylinositol-3-kinase-dependent signal transition regulates ARF1 and ARF6 during Fcgamma receptor-mediated phagocytosis." PLoS Biol **4(6)**: e162.
- Bernstein, B. W. and J. R. Bamburg (2010). "ADF/cofilin: a functional node in cell biology." Trends Cell Biol **20(4)**: 187-195.
- Beutler, A. L. B. a. B. (2011). "phenotypic mutation deer." mutagenetix utsouthwestern

- Bing, R. J., M. Miyataka, K. A. Rich, N. Hanson, X. Wang, H. D. Slosser and S. R. Shi (2001). "Nitric oxide, prostanoids, cyclooxygenase, and angiogenesis in colon and breast cancer." Clin Cancer Res **7**(11): 3385-3392.
- Biscardi, J. S., M. C. Maa, D. A. Tice, M. E. Cox, T. H. Leu and S. J. Parsons (1999). "c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function." J Biol Chem **274**(12): 8335-8343.
- Boshans, R. L., S. Szanto, L. van Aelst and C. D'Souza-Schorey (2000). "ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA." Mol Cell Biol **20**(10): 3685-3694.
- Boyle, P. and J. S. Langman (2000). "ABC of colorectal cancer: Epidemiology." BMJ **321**(7264): 805-808.
- Braga, V. M., L. M. Machesky, A. Hall and N. A. Hotchin (1997). "The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts." J Cell Biol **137**(6): 1421-1431.
- Bray, F., J. S. Ren, E. Masuyer and J. Ferlay (2013). "Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008." Int J Cancer **132**(5): 1133-1145.
- Breyer, M. D. and R. M. Breyer (2001). "G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney." Annu Rev Physiol **63**: 579-605.
- Buccione, R., G. Caldieri and I. Ayala (2009). "Invadopodia: specialized tumor cell structures for the focal degradation of the extracellular matrix." Cancer Metastasis Rev **28**(1-2): 137-149.
- Burridge, K. and M. Chrzanowska-Wodnicka (1996). "Focal adhesions, contractility, and signaling." Annu Rev Cell Dev Biol **12**: 463-518.
- Burridge, K. and E. S. Wittchen (2013). "The tension mounts: stress fibers as force-generating mechanotransducers." J Cell Biol **200**(1): 9-19.
- Cabrera-Vera TM, V. J., Thomas TO (2003). "Insights into G protein structure, function, and regulation." endocr.
- Cam, W. R., T. Masaki, Y. Shiratori, N. Kato, T. Ikenoue, M. Okamoto, K. Igarashi, T. Sano and M. Omata (2001). "Reduced C-terminal Src kinase activity is correlated inversely with pp60(c-src) activity in colorectal carcinoma." Cancer **92**(1): 61-70.
- Caviston, J. P., L. A. Cohen and J. G. Donaldson (2014). "Arf1 and Arf6 promote ventral actin structures formed by acute activation of protein kinase C and Src." Cytoskeleton (Hoboken) **71**(6): 380-394.
- Chen, Q. and T. D. Pollard (2011). "Actin filament severing by cofilin is more important for assembly than constriction of the cytokinetic contractile ring." J Cell Biol **195**(3): 485-498.
- Chen, W. T. (1981). "Mechanism of retraction of the trailing edge during fibroblast movement." J Cell Biol **90**(1): 187-200.
- Choi, C. and D. M. Helfman (2014). "The Ras-ERK pathway modulates cytoskeleton organization, cell motility and lung metastasis signature genes in MDA-MB-231 LM2." Oncogene **33**(28): 3668-3676.
- Chouaib, S., L. Chatenoud, D. Klatzmann and D. Fradelizi (1984). "The mechanisms of inhibition of human IL 2 production. II. PGE2 induction of suppressor T lymphocytes." J Immunol **132**(4): 1851-1857.

- Coleman, R. A., Kennedy, I., Humphrey, P.P.A., Bunce, K. & Lumley, P. (1990). Prostanoids and their receptors. Comprehensive Medicinal Chemistry, Membrane and receptors.
- Corpet, D. E. and F. Pierre (2005). "How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men." Eur J Cancer **41**(13): 1911-1922.
- Cox, R., R. J. Mason-Gamer, C. L. Jackson and N. Segev (2004). "Phylogenetic analysis of Sec7-domain-containing Arf nucleotide exchangers." Mol Biol Cell **15**(4): 1487-1505.
- Cramer, L. P., M. Siebert and T. J. Mitchison (1997). "Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force." J Cell Biol **136**(6): 1287-1305.
- Crosnier, C., D. Stamatakis and J. Lewis (2006). "Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control." Nat Rev Genet **7**(5): 349-359.
- Cuider ALLAL, I. L.-M., Gilles FAVRE, Anne PRADINES (2002). "Les petites protéines G de la famille Rho." Hépatogastro & Oncologie Digestive.
- D'Souza-Schorey, C. and P. Chavrier (2006). "ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(5): 347-358.
- Daubon, T., T. Rochelle, N. Bourmeyster and E. Genot (2012). "Invadopodia and rolling-type motility are specific features of highly invasive p190(bcr-abl) leukemic cells." Eur J Cell Biol **91**(11-12): 978-987.
- Dohlman, H. G. and J. Thorner (1997). "RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins." J Biol Chem **272**(7): 3871-3874.
- Donaldson, J. G. (2003). "Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane." J Biol Chem **278**(43): 41573-41576.
- Dong, C., X. Zhang, F. Zhou, H. Dou, M. T. Duvernay, P. Zhang and G. Wu (2010). "ADP-ribosylation factors modulate the cell surface transport of G protein-coupled receptors." J Pharmacol Exp Ther **333**(1): 174-183.
- Dubois, R. N., S. B. Abramson, L. Crofford, R. A. Gupta, L. S. Simon, L. B. Van De Putte and P. E. Lipsky (1998). "Cyclooxygenase in biology and disease." FASEB J **12**(12): 1063-1073.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-767.
- Feng, J., M. Ito, Y. Kureishi, K. Ichikawa, M. Amano, N. Isaka, K. Okawa, A. Iwamatsu, K. Kaibuchi, D. J. Hartshorne and T. Nakano (1999). "Rho-associated kinase of chicken gizzard smooth muscle." J Biol Chem **274**(6): 3744-3752.
- Ford, C. E., N. P. Skiba, H. Bae, Y. Daaka, E. Reuveny, L. R. Shekter, R. Rosal, G. Weng, C. S. Yang, R. Iyengar, R. J. Miller, L. Y. Jan, R. J. Lefkowitz and H. E. Hamm (1998). "Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors." Science **280**(5367): 1271-1274.
- Gelderblom, M., S. Eminel, T. Herdegen and V. Waetzig (2004). "c-Jun N-terminal kinases (JNKs) and the cytoskeleton--functions beyond neurodegeneration." Int J Dev Neurosci **22**(7): 559-564.
- Gilman, A. G. (1984). "G proteins and dual control of adenylate cyclase." Cell **36**(3): 577-579.
- Gilman, A. G. (1987). "G proteins: transducers of receptor-generated signals." Annu Rev Biochem **56**: 615-649.

- Goldin, E. and D. Rachmilewitz (1983). "Prostanoids cytoprotection for maintaining remission in ulcerative colitis. Failure of 15(R), 15-methylprostaglandin E2." Dig Dis Sci **28**(9): 807-811.
- Goodwin, J. S. and J. Ceuppens (1983). "Regulation of the immune response by prostaglandins." J Clin Immunol **3**(4): 295-315.
- Gorbatyuk, V. Y., N. J. Nosworthy, S. A. Robson, N. P. Bains, M. W. Maciejewski, C. G. Dos Remedios and G. F. King (2006). "Mapping the phosphoinositide-binding site on chick cofilin explains how PIP2 regulates the cofilin-actin interaction." Mol Cell **24**(4): 511-522.
- Goupil, E., D. Tassy, C. Bourguet, C. Quiniou, V. Wisheart, D. Petrin, C. Le Gouill, D. Devost, H. H. Zingg, M. Bouvier, H. U. Saragovi, S. Chemtob, W. D. Lubell, A. Claing, T. E. Hebert and S. A. Laporte (2010). "A novel biased allosteric compound inhibitor of parturition selectively impedes the prostaglandin F2alpha-mediated Rho/ROCK signaling pathway." J Biol Chem **285**(33): 25624-25636.
- Goupil, E., V. Wisheart, E. Khoury, B. Zimmerman, S. Jaffal, T. E. Hebert and S. A. Laporte (2012). "Biasing the prostaglandin F2alpha receptor responses toward EGFR-dependent transactivation of MAPK." Mol Endocrinol **26**(7): 1189-1202.
- Grady, W. M. and S. D. Markowitz (2002). "Genetic and epigenetic alterations in colon cancer." Annu Rev Genomics Hum Genet **3**: 101-128.
- Gryglewski, R. J., A. Dembinska-Kiec and R. Korbut (1978). "A possible role of thromboxane A2 (TXA2) and prostacyclin (PGI2) in circulation." Acta Biol Med Ger **37**(5-6): 715-723.
- Gu, J., C. W. Lee, Y. Fan, D. Komlos, X. Tang, C. Sun, K. Yu, H. C. Hartzell, G. Chen, J. R. Bamburg and J. Q. Zheng (2010). "ADF/cofilin-mediated actin dynamics regulate AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity." Nat Neurosci **13**(10): 1208-1215.
- Guo, J. Y., H. Y. Chen, R. Mathew, J. Fan, A. M. Strohecker, G. Karsli-Uzunbas, J. J. Kamphorst, G. Chen, J. M. Lemons, V. Karantza, H. A. Coller, R. S. Dipaola, C. Gelinis, J. D. Rabinowitz and E. White (2011). "Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis." Genes Dev **25**(5): 460-470.
- Hall, A. (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." Science **279**(5350): 509-514.
- Hancock, J. F. (2003). "Ras proteins: different signals from different locations." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(5): 373-384.
- Hao, C. M. and M. D. Breyer (2008). "Physiological regulation of prostaglandins in the kidney." Annu Rev Physiol **70**: 357-377.
- Hartshorne, D. J., M. Ito and F. Erdodi (1998). "Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation." J Muscle Res Cell Motil **19**(4): 325-341.
- Harvey, J. J. (1964). "An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice." Nature **204**: 1104-1105.
- Hasumoto, K., Y. Sugimoto, M. Gotoh, E. Segi, A. Yamasaki, M. Yamaguchi, H. Honda, H. Hirai, M. Negishi, A. Kakizuka and A. Ichikawa (1997). "Characterization of the mouse prostaglandin F receptor gene: a transgenic mouse study of a regulatory region that controls its expression in the stomach and kidney but not in the ovary." Genes Cells **2**(9): 571-580.
- Hasumoto, K., Y. Sugimoto, A. Yamasaki, K. Morimoto, A. Kakizuka, M. Negishi and A. Ichikawa (1997). "Association of expression of mRNA encoding the PGF2 alpha

- receptor with luteal cell apoptosis in ovaries of pseudopregnant mice." J Reprod Fertil **109**(1): 45-51.
- Heath, J. P. and G. A. Dunn (1978). "Cell to substratum contacts of chick fibroblasts and their relation to the microfilament system. A correlated interference-reflexion and high-voltage electron-microscope study." J Cell Sci **29**: 197-212.
- Helmersson, J., A. Larsson, B. Vessby and S. Basu (2005). "Active smoking and a history of smoking are associated with enhanced prostaglandin F(2alpha), interleukin-6 and F2-isoprostane formation in elderly men." Atherosclerosis **181**(1): 201-207.
- Helmersson, J., B. Vessby, A. Larsson and S. Basu (2004). "Association of type 2 diabetes with cyclooxygenase-mediated inflammation and oxidative stress in an elderly population." Circulation **109**(14): 1729-1734.
- Hill, M. J., B. C. Morson and H. J. Bussey (1978). "Aetiology of adenoma-carcinoma sequence in large bowel." Lancet **1**(8058): 245-247.
- Hirano, K., B. C. Phan and D. J. Hartshorne (1997). "Interactions of the subunits of smooth muscle myosin phosphatase." J Biol Chem **272**(6): 3683-3688.
- Hirata, H., H. Tatsumi and M. Sokabe (2007). "Dynamics of actin filaments during tension-dependent formation of actin bundles." Biochim Biophys Acta **1770**(8): 1115-1127.
- Hotulainen, P. and P. Lappalainen (2006). "Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells." J Cell Biol **173**(3): 383-394.
- Hotulainen, P., E. Paunola, M. K. Vartiainen and P. Lappalainen (2005). "Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells." Mol Biol Cell **16**(2): 649-664.
- Ivaska, J., H. M. Pallari, J. Nevo and J. E. Eriksson (2007). "Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling." Exp Cell Res **313**(10): 2050-2062.
- Jackson, C. L. and J. E. Casanova (2000). "Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors." Trends Cell Biol **10**(2): 60-67.
- Janssen, K. P., F. el-Marjou, D. Pinto, X. Sastre, D. Rouillard, C. Fouquet, T. Soussi, D. Louvard and S. Robine (2002). "Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice." Gastroenterology **123**(2): 492-504.
- Jeon, S. H., S. Jeong, C. Lee, J. K. Kim, Y. S. Kim, H. Y. Chung, S. D. Park and R. H. Seong (1998). "Expression of Tcf-1 mRNA and surface TCR-CD3 complexes are reduced during apoptosis of T cells." Int Immunol **10**(10): 1519-1527.
- Jockusch, B. M., K. Murk and M. Rothkegel (2007). "The profile of profilins." Rev Physiol Biochem Pharmacol **159**: 131-149.
- Johnson, D., P. Cohen, M. X. Chen, Y. H. Chen and P. T. Cohen (1997). "Identification of the regions on the M110 subunit of protein phosphatase 1M that interact with the M21 subunit and with myosin." Eur J Biochem **244**(3): 931-939.
- Jovanovic, N., M. Pavlovic, V. Mircevski, Q. Du and A. Jovanovic (2006). "An unexpected negative inotropic effect of prostaglandin F2alpha in the rat heart." Prostaglandins Other Lipid Mediat **80**(1-2): 110-119.
- Karim, S. M. (1970). "Prostaglandins in fertility control." Lancet **2**(7673): 610.
- Kato, K., Y. Kano, M. Masuda, H. Onishi and K. Fujiwara (1998). "Isolation and contraction of the stress fiber." Mol Biol Cell **9**(7): 1919-1938.

- Katsumoto, T., A. Mitsushima and T. Kurimura (1990). "The role of the vimentin intermediate filaments in rat 3Y1 cells elucidated by immunoelectron microscopy and computer-graphic reconstruction." Biol Cell **68**(2): 139-146.
- Kaunas, R., P. Nguyen, S. Usami and S. Chien (2005). "Cooperative effects of Rho and mechanical stretch on stress fiber organization." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(44): 15895-15900.
- Kawano, Y., Y. Fukata, N. Oshiro, M. Amano, T. Nakamura, M. Ito, F. Matsumura, M. Inagaki and K. Kaibuchi (1999). "Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo." J Cell Biol **147**(5): 1023-1038.
- Kim, M. J., S. J. Woo, C. H. Yoon, J. S. Lee, S. An, Y. H. Choi, S. G. Hwang, G. Yoon and S. J. Lee (2011). "Involvement of autophagy in oncogenic K-Ras-induced malignant cell transformation." J Biol Chem **286**(15): 12924-12932.
- Kimura, K., M. Ito, M. Amano, K. Chihara, Y. Fukata, M. Nakafuku, B. Yamamori, J. Feng, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu and K. Kaibuchi (1996). "Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)." Science **273**(5272): 245-248.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell **87**(2): 159-170.
- Kirsten, W. H., C. E. Platz and J. S. Flocks (1962). "Transmission of lymphoid leukaemia in new-born rats." Nature **193**: 791-792.
- Kiuchi, T., K. Ohashi, S. Kurita and K. Mizuno (2007). "Cofilin promotes stimulus-induced lamellipodium formation by generating an abundant supply of actin monomers." J Cell Biol **177**(3): 465-476.
- Korinek, V., N. Barker, P. J. Morin, D. van Wichen, R. de Weger, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and H. Clevers (1997). "Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma." Science **275**(5307): 1784-1787.
- Kuhn, J. R. and T. D. Pollard (2005). "Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy." Biophys J **88**(2): 1387-1402.
- Kumar, S., I. Z. Maxwell, A. Heisterkamp, T. R. Polte, T. P. Lele, M. Salanga, E. Mazur and D. E. Ingber (2006). "Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization, and extracellular matrix mechanics." Biophys J **90**(10): 3762-3773.
- Kunori, S., S. Matsumura, T. Mabuchi, S. Tatsumi, Y. Sugimoto, T. Minami and S. Ito (2009). "Involvement of prostaglandin F₂ alpha receptor in ATP-induced mechanical allodynia." Neuroscience **163**(1): 362-371.
- Lazarides, E. (1975). "Immunofluorescence studies on the structure of actin filaments in tissue culture cells." J Histochem Cytochem **23**(7): 507-528.
- Lefebvre, Y. (1975). "Les prostaglandines." Canadian family physician.
- Linder, S., C. Wiesner and M. Himmel (2011). "Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion." Annu Rev Cell Dev Biol **27**: 185-211.
- Liu, W., X. Dong, M. Mai, R. S. Seelan, K. Taniguchi, K. K. Krishnadath, K. C. Halling, J. M. Cunningham, L. A. Boardman, C. Qian, E. Christensen, S. S. Schmidt, P. C. Roche, D. I. Smith and S. N. Thibodeau (2000). "Mutations in AXIN2 cause

- colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling." *Nat Genet* **26**(2): 146-147.
- Lodish, J. D. H. (2005). *Biologie moléculaire de la cellule*.
- Logothetis, D. E., Y. Kurachi, J. Galper, E. J. Neer and D. E. Clapham (1987). "The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart." *Nature* **325**(6102): 321-326.
- Luo, Y., X. Xu, T. Lele, S. Kumar and D. E. Ingber (2008). "A multi-modular tensegrity model of an actin stress fiber." *J Biomech* **41**(11): 2379-2387.
- Martinez, C., S. Bhattacharya, T. Freeman, M. Churchman and M. Ilyas (2005). "Expression profiling of murine intestinal adenomas reveals early deregulation of multiple matrix metalloproteinase (Mmp) genes." *J Pathol* **206**(1): 100-110.
- Mendez, M. G., S. Kojima and R. D. Goldman (2010). "Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition." *FASEB J* **24**(6): 1838-1851.
- Menter, D. G. and R. N. Dubois (2012). "Prostaglandins in cancer cell adhesion, migration, and invasion." *Int J Cell Biol* **2012**: 723419.
- Moriyama, K., K. Iida and I. Yahara (1996). "Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin." *Genes Cells* **1**(1): 73-86.
- Moriyama, K. and I. Yahara (2002). "Human CAP1 is a key factor in the recycling of cofilin and actin for rapid actin turnover." *J Cell Sci* **115**(Pt 8): 1591-1601.
- Murphy, D. A. and S. A. Courtneidge (2011). "The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function." *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(7): 413-426.
- Nagaoka, R., N. Minami, K. Hayakawa, H. Abe and T. Obinata (1996). "Quantitative analysis of low molecular weight G-actin-binding proteins, cofilin, ADF and profilin, expressed in developing and degenerating chicken skeletal muscles." *J Muscle Res Cell Motil* **17**(4): 463-473.
- Nakahata, K., H. Kinoshita, Y. Tokinaga, Y. Ishida, Y. Kimoto, M. Dojo, K. Mizumoto, K. Ogawa and Y. Hatano (2006). "Vasodilation mediated by inward rectifier K⁺ channels in cerebral microvessels of hypertensive and normotensive rats." *Anesth Analg* **102**(2): 571-576.
- Narumiya, S., T. Ishizaki and N. Watanabe (1997). "Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton." *FEBS Lett* **410**(1): 68-72.
- Narumiya, S., Y. Sugimoto and F. Ushikubi (1999). "Prostanoid receptors: structures, properties, and functions." *Physiol Rev* **79**(4): 1193-1226.
- Naumanen, P., P. Lappalainen and P. Hotulainen (2008). "Mechanisms of actin stress fibre assembly." *J Microsc* **231**(3): 446-454.
- Neumann, E., K. Khawaja and U. Muller-Ladner (2014). "G protein-coupled receptors in rheumatology." *Nat Rev Rheumatol* **10**(7): 429-436.
- Nobes, C. D. and A. Hall (1999). "Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement." *J Cell Biol* **144**(6): 1235-1244.
- Nurnberg, A., T. Kitzing and R. Grosse (2011). "Nucleating actin for invasion." *Nat Rev Cancer* **11**(3): 177-187.
- Oga, T., T. Matsuoka, C. Yao, K. Nonomura, S. Kitaoka, D. Sakata, Y. Kita, K. Tanizawa, Y. Taguchi, K. Chin, M. Mishima, T. Shimizu and S. Narumiya (2009). "Prostaglandin F(2alpha) receptor signaling facilitates bleomycin-induced

- pulmonary fibrosis independently of transforming growth factor-beta." Nat Med **15**(12): 1426-1430.
- Pao, C. S., B. L. Barker and J. L. Benovic (2009). "Role of the amino terminus of G protein-coupled receptor kinase 2 in receptor phosphorylation." Biochemistry **48**(30): 7325-7333.
- Parsons, J. T. (2003). "Focal adhesion kinase: the first ten years." J Cell Sci **116**(Pt 8): 1409-1416.
- Pasqualato, S., J. Menetrey, M. Franco and J. Cherfils (2001). "The structural GDP/GTP cycle of human Arf6." EMBO Rep **2**(3): 234-238.
- Pavalko, F. M., C. A. Otey and K. Burridge (1989). "Identification of a filamin isoform enriched at the ends of stress fibers in chicken embryo fibroblasts." J Cell Sci **94** (Pt 1): 109-118.
- Pellegrin, S. and H. Mellor (2007). "Actin stress fibres." J Cell Sci **120**(Pt 20): 3491-3499.
- Peterson, L. J., Z. Rajfur, A. S. Maddox, C. D. Freel, Y. Chen, M. Edlund, C. Otey and K. Burridge (2004). "Simultaneous stretching and contraction of stress fibers in vivo." Mol Biol Cell **15**(7): 3497-3508.
- Pierce, K. L., T. J. Bailey, P. B. Hoyer, D. W. Gil, D. F. Woodward and J. W. Regan (1997). "Cloning of a carboxyl-terminal isoform of the prostanoid FP receptor." J Biol Chem **272**(2): 883-887.
- Pierce, K. L., L. M. Luttrell and R. J. Lefkowitz (2001). "New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades." Oncogene **20**(13): 1532-1539.
- Pingret, J. L., E. P. Journet and D. G. Barker (1998). "Rhizobium nod factor signaling. Evidence for a g protein-mediated transduction mechanism." Plant Cell **10**(5): 659-672.
- Pretlow, T. P., B. J. Barrow, W. S. Ashton, M. A. O'Riordan, T. G. Pretlow, J. A. Jurcisek and T. A. Stellato (1991). "Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa." Cancer Res **51**(5): 1564-1567.
- Raimondi, F., M. Orozco and F. Fanelli (2010). "Deciphering the deformation modes associated with function retention and specialization in members of the Ras superfamily." Structure **18**(3): 402-414.
- Ridley, A. J. (1996). "Rho: theme and variations." Curr Biol **6**(10): 1256-1264.
- Ridley, A. J. (2011). "Life at the leading edge." Cell **145**(7): 1012-1022.
- Ridley, A. J., H. F. Paterson, C. L. Johnston, D. Diekmann and A. Hall (1992). "The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling." Cell **70**(3): 401-410.
- Rondard, P., T. Iiri, S. Srinivasan, E. Meng, T. Fujita and H. R. Bourne (2001). "Mutant G protein alpha subunit activated by Gbeta gamma: a model for receptor activation?" Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6150-6155.
- Rotty, J. D., C. Wu and J. E. Bear (2013). "New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(1): 7-12.
- Roussos, E. T., J. S. Condeelis and A. Patsialou (2011). "Chemotaxis in cancer." Nat Rev Cancer **11**(8): 573-587.
- Ruegg, C., C. Veigel, J. E. Molloy, S. Schmitz, J. C. Sparrow and R. H. Fink (2002). "Molecular motors: force and movement generated by single myosin II molecules." News Physiol Sci **17**: 213-218.

- Saito, O., Y. Guan, Z. Qi, L. S. Davis, M. Komhoff, Y. Sugimoto, S. Narumiya, R. M. Breyer and M. D. Breyer (2003). "Expression of the prostaglandin F receptor (FP) gene along the mouse genitourinary tract." Am J Physiol Renal Physiol **284**(6): F1164-1170.
- Saleem, S., A. S. Ahmad, T. Maruyama, S. Narumiya and S. Dore (2009). "PGF(2alpha) FP receptor contributes to brain damage following transient focal brain ischemia." Neurotox Res **15**(1): 62-70.
- Sanger, J. W., S. Kang, C. C. Siebrands, N. Freeman, A. Du, J. Wang, A. L. Stout and J. M. Sanger (2005). "How to build a myofibril." J Muscle Res Cell Motil **26**(6-8): 343-354.
- Schafer, D. A., C. D'Souza-Schorey and J. A. Cooper (2000). "Actin assembly at membranes controlled by ARF6." Traffic **1**(11): 892-903.
- Schultz, R. H. and D. D. Copeland (1981). "Induction of abortion using prostaglandins." Acta Vet Scand Suppl **77**: 353-361.
- Seguin, B. E. (1981). "Use of prostaglandin in cows with unobserved oestrus." Acta Vet Scand Suppl **77**: 343-352.
- Shimizu, H., M. Ito, M. Miyahara, K. Ichikawa, S. Okubo, T. Konishi, M. Naka, T. Tanaka, K. Hirano, D. J. Hartshorne and et al. (1994). "Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase." J Biol Chem **269**(48): 30407-30411.
- Shirazi, A., K. Iizuka, P. Fadden, C. Mosse, A. P. Somlyo, A. V. Somlyo and T. A. Haystead (1994). "Purification and characterization of the mammalian myosin light chain phosphatase holoenzyme. The differential effects of the holoenzyme and its subunits on smooth muscle." J Biol Chem **269**(50): 31598-31606.
- Small, J. V., K. Rottner, I. Kaverina and K. I. Anderson (1998). "Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement." Biochim Biophys Acta **1404**(3): 271-281.
- Smith, W. L., D. L. DeWitt and R. M. Garavito (2000). "Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology." Annu Rev Biochem **69**: 145-182.
- Smyth, E. M., T. Grosser, M. Wang, Y. Yu and G. A. FitzGerald (2009). "Prostanoids in health and disease." J Lipid Res **50** Suppl: S423-428.
- Somlyo, A. P. and A. V. Somlyo (1994). "Signal transduction and regulation in smooth muscle." Nature **372**(6503): 231-236.
- Sparks, A. B., P. J. Morin, B. Vogelstein and K. W. Kinzler (1998). "Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer." Cancer Res **58**(6): 1130-1134.
- Spiegel, A. M. (1996). Defects in G Protein-Coupled Signal Transduction in Human Disease.
- Stolina, M., S. Sharma, Y. Lin, M. Dohadwala, B. Gardner, J. Luo, L. Zhu, M. Kronenberg, P. W. Miller, J. Portanova, J. C. Lee and S. M. Dubinett (2000). "Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis." J Immunol **164**(1): 361-370.
- Suraweera, N., J. Robinson, E. Volikos, T. Guenther, I. Talbot, I. Tomlinson and A. Silver (2006). "Mutations within Wnt pathway genes in sporadic colorectal cancers and cell lines." Int J Cancer **119**(8): 1837-1842.

- Surks, H. K., C. T. Richards and M. E. Mendelsohn (2003). "Myosin phosphatase-Rho interacting protein. A new member of the myosin phosphatase complex that directly binds RhoA." J Biol Chem **278**(51): 51484-51493.
- Takaishi, K., T. Sasaki, H. Kotani, H. Nishioka and Y. Takai (1997). "Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells." J Cell Biol **139**(4): 1047-1059.
- Takayama, K., K. Yuhki, K. Ono, T. Fujino, A. Hara, T. Yamada, S. Kuriyama, H. Karibe, Y. Okada, O. Takahata, T. Taniguchi, T. Iijima, H. Iwasaki, S. Narumiya and F. Ushikubi (2005). "Thromboxane A2 and prostaglandin F2alpha mediate inflammatory tachycardia." Nat Med **11**(5): 562-566.
- Takayama, T., K. Miyanishi, T. Hayashi, Y. Sato and Y. Niitsu (2006). "Colorectal cancer: genetics of development and metastasis." J Gastroenterol **41**(3): 185-192.
- Takayama, T., M. Ohi, T. Hayashi, K. Miyanishi, A. Nobuoka, T. Nakajima, T. Satoh, R. Takimoto, J. Kato, S. Sakamaki and Y. Niitsu (2001). "Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis." Gastroenterology **121**(3): 599-611.
- They, M., A. Pepin, E. Dressaire, Y. Chen and M. Bornens (2006). "Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment." Cell Motil Cytoskeleton **63**(6): 341-355.
- Tojkander, S., G. Gateva and P. Lappalainen (2012). "Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles." J Cell Sci **125**(Pt 8): 1855-1864.
- Totsukawa, G., Y. Yamakita, S. Yamashiro, H. Hosoya, D. J. Hartshorne and F. Matsumura (1999). "Activation of myosin phosphatase targeting subunit by mitosis-specific phosphorylation." J Cell Biol **144**(4): 735-744.
- Triantafyllidis, J. K., G. Nasioulas and P. A. Kosmidis (2009). "Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies." Anticancer Res **29**(7): 2727-2737.
- Tsong, W. H., W. P. Koh, J. M. Yuan, R. Wang, C. L. Sun and M. C. Yu (2007). "Cigarettes and alcohol in relation to colorectal cancer: the Singapore Chinese Health Study." Br J Cancer **96**(5): 821-827.
- Tsuchiya, M., S. R. Price, S. C. Tsai, J. Moss and M. Vaughan (1991). "Molecular identification of ADP-ribosylation factor mRNAs and their expression in mammalian cells." J Biol Chem **266**(5): 2772-2777.
- Van Aelst, L. and C. D'Souza-Schorey (1997). "Rho GTPases and signaling networks." Genes Dev **11**(18): 2295-2322.
- van de Wetering, M., R. Cavallo, D. Dooijes, M. van Beest, J. van Es, J. Loureiro, A. Ypma, D. Hursh, T. Jones, A. Bejsovec, M. Peifer, M. Mortin and H. Clevers (1997). "Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF." Cell **88**(6): 789-799.
- van Leeuwen, F. N., S. van Delft, H. E. Kain, R. A. van der Kammen and J. G. Collard (1999). "Rac regulates phosphorylation of the myosin-II heavy chain, actinomyosin disassembly and cell spreading." Nat Cell Biol **1**(4): 242-248.
- Vidal, C., B. Geny, J. Melle, M. Jandrot-Perrus and M. Fontenay-Roupie (2002). "Cdc42/Rac1-dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin." Blood **100**(13): 4462-4469.

- Wang, K., J. F. Ash and S. J. Singer (1975). "Filamin, a new high-molecular-weight protein found in smooth muscle and non-muscle cells." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(11): 4483-4486.
- Wang, Q. and C. M. Doerschuk (2001). "The p38 mitogen-activated protein kinase mediates cytoskeletal remodeling in pulmonary microvascular endothelial cells upon intracellular adhesion molecule-1 ligation." J Immunol **166**(11): 6877-6884.
- Watanabe, T., A. Nakao, D. Emerling, Y. Hashimoto, K. Tsukamoto, Y. Horie, M. Kinoshita and K. Kurokawa (1994). "Prostaglandin F₂ alpha enhances tyrosine phosphorylation and DNA synthesis through phospholipase C-coupled receptor via Ca(2+)-dependent intracellular pathway in NIH-3T3 cells." J Biol Chem **269**(26): 17619-17625.
- Weaver, A. M. (2006). "Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion." Clin Exp Metastasis **23**(2): 97-105.
- Weber, K. and U. Groeschel-Stewart (1974). "Antibody to myosin: the specific visualization of myosin-containing filaments in nonmuscle cells." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(11): 4561-4564.
- Weed, S. A., Y. Du and J. T. Parsons (1998). "Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1." J Cell Sci **111** (Pt 16): 2433-2443.
- Weinberg, R. A. (1996). "How cancer arises." Sci Am **275**(3): 62-70.
- Yonezawa, N., E. Nishida, K. Iida, I. Yahara and H. Sakai (1990). "Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and deoxyribonuclease I with actin by phosphoinositides." J Biol Chem **265**(15): 8382-8386.
- Yu, Y., M. B. Lucitt, J. Stubbe, Y. Cheng, U. G. Friis, P. B. Hansen, B. L. Jensen, E. M. Smyth and G. A. FitzGerald (2009). "Prostaglandin F₂alpha elevates blood pressure and promotes atherosclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(19): 7985-7990.
- Zhang, L., J. Luo, P. Wan, J. Wu, F. Laski and J. Chen (2011). "Regulation of cofilin phosphorylation and asymmetry in collective cell migration during morphogenesis." Development **138**(3): 455-464.
- Zhong, C., M. S. Kinch and K. Burridge (1997). "Rho-stimulated contractility contributes to the fibroblastic phenotype of Ras-transformed epithelial cells." Mol Biol Cell **8**(11): 2329-2344.
- Zisman, A. L., A. Nickolov, R. E. Brand, A. Gorchow and H. K. Roy (2006). "Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: implications for screening." Arch Intern Med **166**(6): 629-634.