

Université de Montréal

Étude des voies de signalisation en amont et en aval de la petite GTPase Rac1

par

Ariane PELLETIER SAINT-GERMAIN

Programmes de Biologie Moléculaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Biologie Moléculaire

Septembre 2009

© Ariane PELLETIER SAINT-GERMAIN, 2009

Université de Montréal
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :

Étude des voies de signalisation en amont et en aval de la petite GTPase Rac1

présenté par :

Ariane PELLETIER SAINT-GERMAIN

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. David HIPFNER
Président-rapporteur

Dr. Jean-François CÔTÉ
Directeur de recherche

Dr. Nathalie LAMARCHE
Membre du jury

Résumé

Les évènements moléculaires en amont et en aval de la petite GTPase Rac1 menant à la migration cellulaire sont encore mal compris. La première partie du projet consiste à utiliser une approche protéomique non-biaisée pour tenter d'identifier les partenaires de Rac. Pour ce faire, nous avons développé une méthode de purification efficace et rapide de manière à maintenir les complexes protéiques transitoires intacts. Dans un deuxième temps, nous avons identifié des sites de phosphorylation sur la RacGEF atypique Dock5 en aval des intégrines. Afin de mieux comprendre le rôle de la phosphorylation de cette protéine, nous avons criblé une banque de kinases ce qui nous a permis d'identifier 14 kinases pouvant phosphoryler la région PXXP de Dock5. D'après nos résultats, ceci aurait comme effet de diminuer l'interaction entre Dock5 et ses partenaires contenant des domaines SH3. Ainsi, la phosphorylation de Dock5 régulerait la formation de complexes et le recrutement de Dock5 par des protéines adaptatrices.

Mots-clés : Rac, Dock5, migration cellulaire

Abstract

The molecular events upstream and downstream of Rac leading to cell migration and still to date not fully understood although more than 20 effectors have been identified for this GTPase. The first part of our project is to use a non-biased proteomic approach to try to identify novel binding partners of Rac1. In order to do so, we developed a novel purification strategy that enabled us to purify Rac and its binding partners in a timely manner. The second part of our project is to understand the role of Dock5 phosphorylation downstream of the integrins. We identified phosphorylated residues in the PXXP region of the atypical RacGEF upon fibronectin stimulation and found 14 kinases able to phosphorylate this region. According to our results, Dock5 phosphorylation does not affect its GEF activity but diminishes its interaction with various SH3 domain-containing proteins. Thus, our data suggest that Dock5 phosphorylation would regulate complex formation and recruitment of this protein by adaptor proteins.

Keywords : Rac, Dock5, cell migration

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	x
Remerciements	xii
Introduction	1
1. Cancer et métastase	1
2. Migration cellulaire	3
2.1 Polarisation	3
2.2 Formation de protrusions	5
2.3 Adhésion	5
2.4 Contraction	6
2.5 Désassemblage des sites d'adhésion	6
3. Dynamique de la polymérisation de l'actine	7
4. Les petites GTPases : superfamille d'interrupteurs moléculaires	10
4.1 La famille des Rho GTPases	12
4.2 RhoA, RhoB et RhoC	14
4.3 Cdc42	17
4.4 Rac	24
5. Les protéines Dock : nouvelle famille de GEF atypique	28
5.1 La famille des protéines Dock	29
5.2 Dock180/Dock1	32

5.3 Dock2	33
5.4 Dock5	34
5.5 Dock3/MOCA/PBP	34
5.6 Dock4	35
5.7 Dock6 et Dock8	35
5.8 Dock7	36
5.9 Dock9/Zizimin1	37
5.10 Dock10	37
5.11 Dock11/Zizimin2/ACG	38
6. Dock180, Elmo et CrklI: Partenaires dans le crime	38
Hypothèses et objectifs.....	41
Projet #1 : Étude protéomique des partenaires de la GTPase Rac1	41
Projet #2: Étude de la phosphorylation de Dock5 induite par l'engagement des intégrines	43
Résultats	44
Projet #1 : Étude protéomique des partenaires de la GTPase Rac1 : Rationalisation ...	44
Objectif #1.1: Établissement des lignées cellulaires et optimisation de la purification	46
Objectif #1.2: Précipitation de Rac-BIOTAG et analyse des partenaires par spectrométrie de masse.....	51
Objectif #1.3: Confirmation des partenaires	58
2. Projet #2: Étude de la phosphorylation de Dock5 en aval des intégrines: Rationalisation	63
Objectif #2.1: Identification des résidus phosphorylés	63
Objectif #2.2: Dimérisation de Dock180 et Dock5	66
Objectif #2.3: Anticorps anti-phosphoSer1863	66

Objectif #2.4: Identification des kinases pouvant phosphoryler Dock5.....	71
Objectif #2.5: Activité GEF de Dock5	72
Objectif #2.6: Effet de la phosphorylation sur l'activité GEF de Dock5	76
Objectif #2.7: Effet de la phosphorylation sur l'interaction entre Dock5 et ses partenaires.....	77
Objectif #2.8: Effet de la phosphorylation sur la stabilité et la localisation de Dock5	79
Discussion et conclusions.....	80
Étude protéomique des partenaires de Rac : rappel des objectifs et des résultats..	80
La protéomique pour étudier la signalisation des petites GTPases	80
Candidats identifiés en spectrométrie de masse.....	82
Expériences futures	85
Étude de la phosphorylation de Dock5 induite par l'engagement des intégrines : rappel des objectifs et des résultats	86
Hétérodimérisation entre Dock180 et Dock5	86
Criblage du kinome humain.....	89
Les régions PXXP des protéines Dock	91
Expériences futures	92
Matériel et Méthodes.....	93
Bibliographie.....	101

Liste des tableaux

Tableau I. Résultats de spectrométrie de masse provenant du « pull-down » Streptavidine des NIH 3T3 hBirA Rac-BIOTAG WT et V12.....	53
Tableau II. Résultats de spectrométrie de masse provenant du "pull-down" Streptavidine des NMuMG NeuT hBirA Rac-BIOTAG WT et V12.....	57
Tableau III. Fonction et spécificité des kinases pouvant phosphoryler Dock5 C-Terminale.	70

Liste des figures

Figure 1 La formation de métastases.....	2
Figure 2 Schéma des étapes de migration et structures des différentes protrusions.....	4
Figure 3 Les Rho GTPases	11
Figure 4 Effecteurs des RhoGTPases	13
Figure 5 La famille des protéines Dock	31
Figure 6 Schéma des effecteurs de Rac et la méthode utilisée pour les identifier	42
Figure 7 Schéma expérimental	45
Figure 8 Établissement des lignées stables exprimant hBirA et Rac-BIOTAG WT/V12...	48
Figure 9 Caractérisation des constructions Rac-BIOTAG	49
Figure 10 "Pull-down" Streptavidine de Rac-BIOTAG WT ou V12 dans les NIH 3T3 hBirA	52
Figure 11 "Pull-down" Streptavidine de Rac-BIOTAG WT ou V12 dans les NMuMG NeuT hBirA	60
Figure 12 Validation biochimique de l'interaction entre certains candidats identifiés en spectrométrie de masse et la petite GTPase Rac1	61
Figure 13 Dock180/Dock5 phosphorylation lors d'une stimulation à la fibronectine ...	64
Figure 14 Dimérisation de Dock180 et Dock5	67
Figure 15 Phosphorylation de la sérine 1863	68
Figure 16 Criblage d'une librairie de kinases pour identifier celles pouvant phosphoryler la région C-terminale de Dock5	69
Figure 17 Activité GEF contre Rac1 de Dock5.....	74
Figure 18 Impact de la phosphorylation sur l'activité GEF de Dock5.....	75
Figure 19 Interaction entre Dock5 et des domaines SH3 de différentes protéines.....	78

Liste des abréviations

Abi-1: Abscisic acid insensitive 1	ELMO: Engulfment and cell motility
ACK: Acetate kinase	Eps8: Epidermal Growth Factor Receptor pathway substrate 8
ADF: Actin depolymerizing factor	ErbB2: v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog
APC: Adenomatosis polyposis coli	FAK : Focal Adhesion Kinase
aPKC: atypical protein kinase C	FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer
Arf: ADP-ribosylation factor	GAPs: GTPase Activating Proteins
ARNi: Acide Ribonucléique interférence	GDIs: Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors
Arp2/3: Actin-Related Proteins 2/3	GDP: Guanosine Diphosphate
BAIAP2: Bai1-associated protein 2	GEFs: Guanine Nucleotide Exchange Factors
BORG: Binder of Rho GTPases	GSK-3β: glycogen synthase kinase-3 β
Cdc42: Cell division cycle 42	GTP: Guanosine Triphosphate
Ced: Cell death	HSPC300: hematopoietic stem/progenitor cell protein 300
CLIP170: Cytoplasmic linker protein p170	IMD: IRSp53/MIM-homology domain
CRIB: Cdc42/Rac1-interactive domain	IQGAP: IQ motif-containing GTPase activating protein
Crkl: CT10 Regulator of kinase	IRSp53: Insulin Receptor Substrate p53
Dbi: Diffuse B-cell lymphoma	JNK: c-Jun N-terminal kinase
DH: Dbl-homology domain	
DHR: Dock-homology Region	
Dock: Dedicators of cytokinesis	
Ef-Tu: Elongation Factor Thermo Unstable	
EFC/F-BAR: Extended Fer/CIP4 homology/Bin1/ Fer/CIP4 homology-Amphiphysin/Rvs167	

LIMK: Lim domain kinase 1	PIP5-kinase: Phosphoinositide 5-kinase
MAP Kinase: Mitogen-activated protein kinase	PLC: Phospholipase C
MBC: Myoblast City	PLD: Phospholipase D
mDia: mammalian Diaphanous	POSH: Plenty of SH3s
MENA: mammalian Enabled	PXXP: proline-rich motif
MIM: Missing-in-Metastasis	Rab: Ras genes from rat brain
MLC : Myosin Light Chain	Rac: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
MLCK: Myosin Light Chain Phosphatase	Ran: Ras-related Nuclear Protein
MLK: Mixed-lineage kinase	Ras: Rat sarcoma
MRCK: Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase	Rho: Ras homolog
NADPH-oxydase: nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate oxydase	Rif: Rap-interacting protein
Nap1: Nucleosome Assembly protein	ROCK: Rho-associated coiled-coil containing protein kinase
NF-κB: Nuclear factor kappa B	SH3: Src-homology domain 3
p41-Arc: p41-Arp complex	Sra-1: Steroid receptor RNA activator 1
PAK: P21/Cdc42/Rac1-associated kinase	Src : Sarcoma
Par: Polarity protein	TC10: Teratocarcinoma clone 10
PH: Pleckstrin-homology domain	TCL: TC10-like
PI3-kinase: Phosphatidylinositol 3-kinase	WASP: Wiskott-Aldrich Syndrome protein
PIP2: Phosphatidylinositol 4,5-biphosphates	WAVE: Wasp family Verprolin-homologous protein
PIP3: Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphates	WH2: WASP-homogy domain 2
	Wrch: Wnt-1 responsive Cdc42 homolo

Remerciements

Plusieurs personnes ont joué un rôle essentiel dans l'achèvement des travaux présentés ici et j'aimerais prendre quelques instants pour souligner leur contribution. Tout d'abord, mon directeur de recherche, le Dr. Jean-François Côté, sans qui ces projets n'auraient pas existé. Par sa direction juste, il a su m'encourager et me critiquer aux moments opportuns. Pour ses compétences scientifiques, mais aussi pour sa patience et sa rigueur, je voudrais le remercier.

Chaque membre du laboratoire a contribué à sa façon tant à mon travail qu'au plaisir que j'ai eu à les côtoyer durant ces années. Rosemarie, qui a contribué directement à certains des résultats présentés ici, mais qui est aussi devenue une amie. Mélanie, qui m'a dirigée lors de mes débuts et qui est restée, tout au long de mes études, une source de conseils et de connaissance toujours appréciée. Manishha, par son honnêteté et son authenticité, se démarque des gens qui m'ont été donnés de rencontrer et restera toujours unique pour moi. Nadine, qui m'a aidée à devenir une meilleure scientifique et a su pallier pour mes erreurs.

Je voudrais remercier toutes les personnes qui ont partagé réactifs, protocoles, temps et conseils. De plus, je voudrais souligner le travail de Martine Dupuis, Éric Massicotte, Dominic Fillion, Denis Faubert, Josée Champagne et Odile Neyret.

Finalement, je voudrais remercier ma famille et mes amis pour leur soutien et leur confiance. Merci à Gabriel pour son amour et sa patience. En croyant aussi fort en moi, vous m'amenez à me dépasser et faites de moi une meilleure personne.

Introduction

1. Cancer et métastase

Les dernières données publiées par le gouvernement canadien prédisent qu'environ un Canadien sur quatre mourra du cancer, ce qui porte cette maladie au premier rang des maladies mortelles¹. Parmi ceux-ci, 90 % des décès seront causés par la formation de tumeurs secondaires². Lors de la formation de métastases, les cellules invasives quittent la tumeur et envahissent le stroma et les tissus connectifs voisins (**figure 1, p.2**). Elles peuvent ensuite intravasater à l'intérieur des vaisseaux sanguins ou lymphatiques, transiter à l'intérieur de ceux-ci, extravasater et finalement proliférer et coloniser un nouveau site (**figure 1, p.2**)³. L'invasion et la prolifération au sein d'un tissu étranger par une cellule tumorale sont des processus extrêmement complexes et seulement une sous-population des cellules tumorales peut surmonter ces difficultés, ce qui rend le processus métastatique plutôt inefficace^{4, 5}. En effet, plusieurs transformations additionnelles sont requises pour qu'une cellule tumorale acquière des propriétés invasives, et puisse quitter le site de la tumeur primaire⁶. Ces cellules sont caractérisées par leur capacité à se déplacer avec une haute vitesse, l'absence d'axe de polarité stable et leur morphologie atone⁶. Ainsi, l'étude des mécanismes moléculaires conférant à une cellule tumorale le potentiel de former une métastase pourrait permettre le développement de nouvelles cibles thérapeutiques et améliorer grandement le sort des patients atteints de cancer.

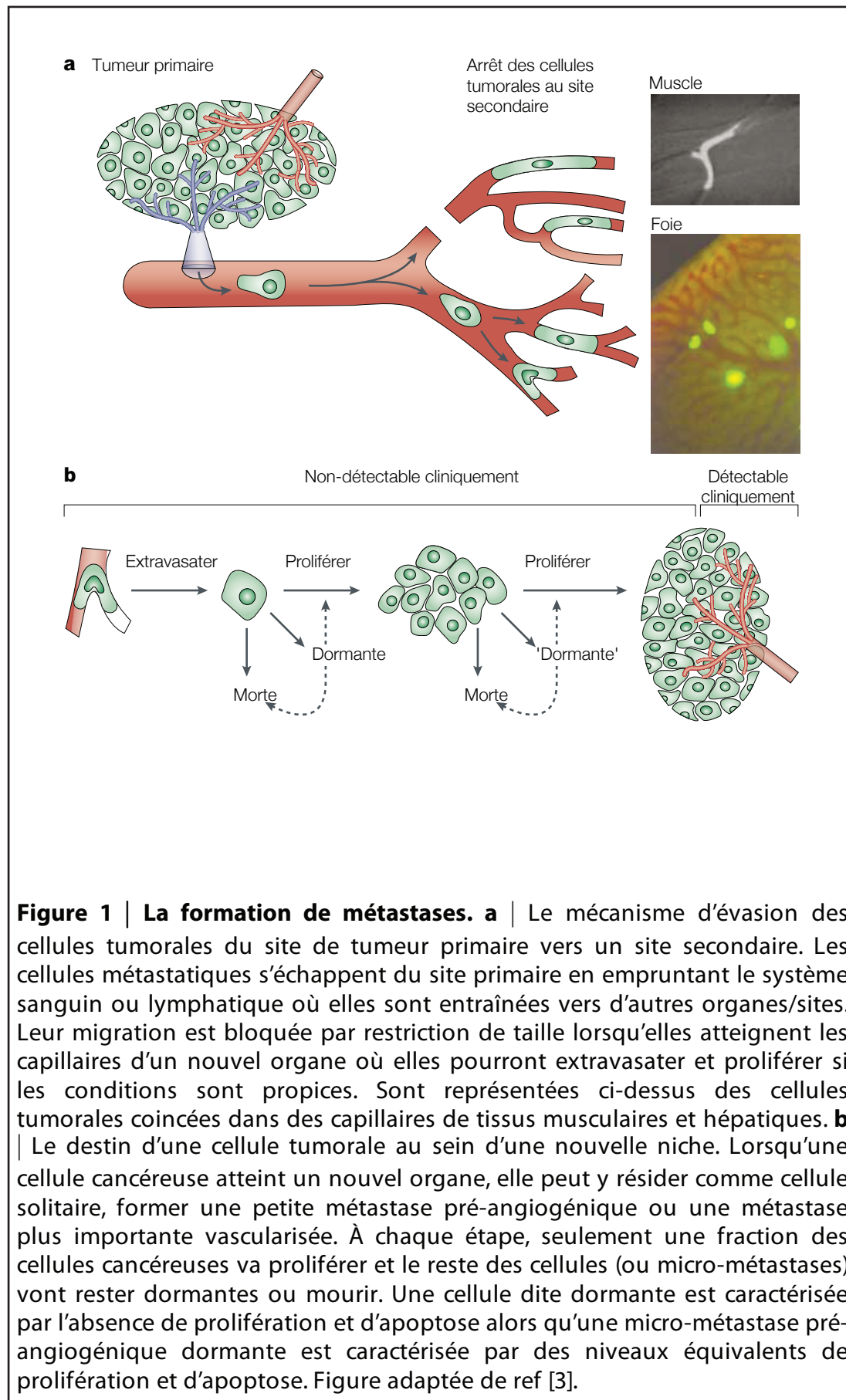


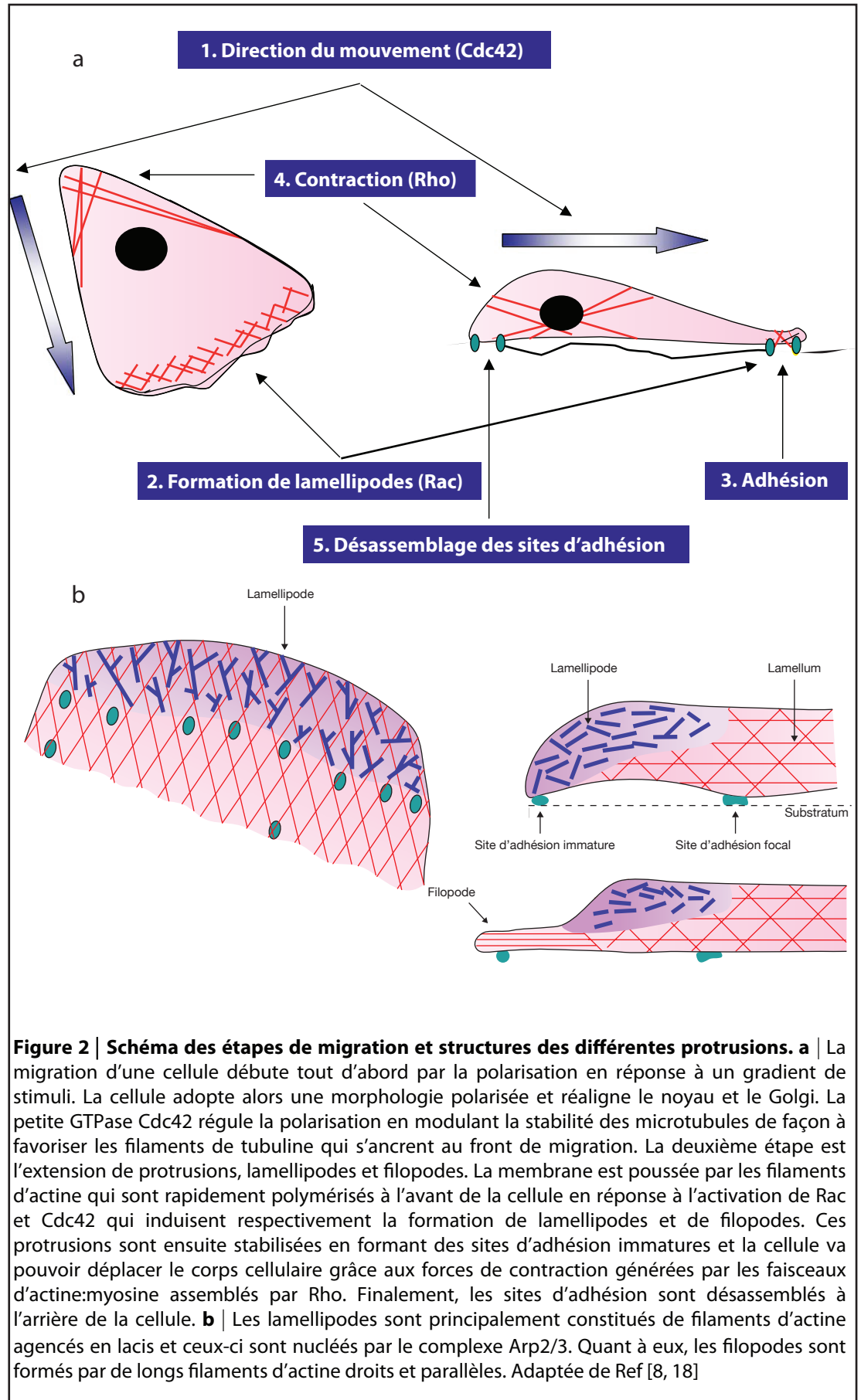
Figure 1 | La formation de métastases. a | Le mécanisme d'évasion des cellules tumorales du site de tumeur primaire vers un site secondaire. Les cellules métastatiques s'échappent du site primaire en empruntant le système sanguin ou lymphatique où elles sont entraînées vers d'autres organes/sites. Leur migration est bloquée par restriction de taille lorsqu'elles atteignent les capillaires d'un nouvel organe où elles pourront extravasater et proliférer si les conditions sont propices. Sont représentées ci-dessus des cellules tumorales coincées dans des capillaires de tissus musculaires et hépatiques. **b** | Le destin d'une cellule tumorale au sein d'une nouvelle niche. Lorsqu'une cellule cancéreuse atteint un nouvel organe, elle peut y résider comme cellule solitaire, former une petite métastase pré-angiogénique ou une métastase plus importante vascularisée. À chaque étape, seulement une fraction des cellules cancéreuses va proliférer et le reste des cellules (ou micro-métastases) vont rester dormantes ou mourir. Une cellule dite dormante est caractérisée par l'absence de prolifération et d'apoptose alors qu'une micro-métastase pré-angiogénique dormante est caractérisée par des niveaux équivalents de prolifération et d'apoptose. Figure adaptée de ref [3].

2. Migration cellulaire

La migration cellulaire joue un rôle central tant dans des processus physiologiques que pathologiques. En effet, elle est essentielle pour le développement embryonnaire, la réponse immunitaire, la réparation de blessures, mais aussi pour la vascularisation des tumeurs et la formation de métastases^{7,8}. Le mécanisme de migration mésenchymale est généralement divisé en cinq étapes majeures : (i) polarisation dans l'axe de migration, (ii) formation de protrusions membranaires au front de migration, (iii) adhésion à la matrice extracellulaire, (iv) contraction du corps cellulaire et finalement (v) désassemblage des sites d'adhésion focale à l'arrière de la cellule pour permettre un mouvement net vers l'avant (**figure 2, p.4**)^{7,9,10}. Nous décrivons plus en détail ci-dessous chaque étape et les mécanismes moléculaires employés par la cellule.

2.1 Polarisation

Afin de permettre un mouvement net dans une direction donnée, la cellule doit, dans un premier temps, se polariser tant au niveau morphologique que moléculaire (**figure 2, p.4**). Ceci se traduit, entre autres, par la formation du front de migration, et par la redistribution asymétrique des récepteurs chémosensoriels, des intégrines et autres récepteurs de la matrice extracellulaire, ainsi que de plusieurs molécules du cytosquelette¹¹⁻¹³. De plus, il y a relocalisation des filaments d'actine du cortex cellulaire vers le front de migration¹⁴.



2.2 Formation de protrusions

Une fois polarisée, la cellule génère la force motrice nécessaire pour projeter la membrane vers l'avant en polymérisant rapidement des filaments d'actine au front de migration¹⁵⁻¹⁷. Ces filaments déforment la membrane et donnent lieu à différentes formes de protrusions dont les plus répandues et les mieux caractérisées sont les lamellipodes et les filopodes (**figure 2, p.4**). Les premières sont des extensions larges et minces de la membrane qui ont l'aspect d'une feuille de papier et sont composées d'un lacs de filaments d'actine alors que les filopodes sont de petites extensions digitiformes composées de filaments d'actine droits et parallèles. Bien que dépourvues d'organelles, ces structures sont enrichies d'actine, et de protéines associées au cytosquelette.

2.3 Adhésion

La formation de sites d'adhésions focale au front de migration est nécessaire pour stabiliser la protrusion et fournir à la cellule la force de traction nécessaire pour déplacer le corps cellulaire^{18,19}. Ainsi, lorsque la membrane s'étend et qu'elle entre en contact avec la matrice extracellulaire, elle se stabilise en formant rapidement de nouveaux sites d'adhésion (**figure 2, p.4**)¹⁹⁻²³. Bien que plusieurs familles de récepteurs soient impliquées dans la migration, les intégrines sont une classe majeure de récepteurs promigratoires et servent de point d'ancrage en reliant la matrice extracellulaire au cytosquelette d'actine¹⁸. L'engagement et l'agrégation des intégrines sont suffisants et nécessaires pour recruter plusieurs composantes des sites d'adhésion focale telle que les protéines Src, FAK, tensine, α -actinine, vinculine, paxiline et taline^{24,25}.

Une fois formés, les sites d'adhésion focale immatures, aussi appelés complexes focaux²⁶, vont en grande majorité être recyclés pour former de nouveaux sites d'adhésion, alors que certains vont perdurer et atteindre maturité à l'arrière du front de migration en réponse aux fibres de stress²⁷. Les sites d'adhésion focale matures peuvent être désassemblés à leur tour dans la région périnucléaire ou être transformés en adhésions fibrillaires²⁸.

2.4 Contraction

Afin de se déplacer, une cellule doit être en mesure de générer une force de contraction qui va lui permettre de déplacer le corps cellulaire vers l'avant. Les sites d'adhésion au front de migration et à l'arrière de la cellule sont ceux qui subissent les plus fortes forces de contraction¹⁹. Ces forces sont générées par l'interaction entre les filaments d'actine attachés aux sites d'adhésion et la myosine II^{29,30}. L'activité de cette enzyme est régulée par la phosphorylation de sa chaîne légère (MLC) qui l'active et stimule la contraction. Brièvement, la MLC peut être phosphorylée par MLC kinase (MLCK) ou par Rho kinase (ROCK) et déphosphorylée par la MLC phosphatase, qui est elle-même phosphorylée et inhibée par ROCK. La MLCK est régulée par les niveaux intracellulaires de calcium alors que ROCK est activée par la petite GTPase Rho³¹.

2.5 Désassemblage des sites d'adhésion

Les sites d'adhésion à l'arrière de la cellule doivent être désassemblés afin de rétracter cette région. Il est à noter que les mécanismes moléculaires régissant le recyclage des sites d'adhésion immature au front de migration et le désassemblage des sites d'adhésions matures à l'arrière divergent l'un de l'autre³². Lors du détachement de l'arrière de la cellule, jusqu'à 85 % de la densité des macroaggrégats

d'intégrines $\beta 1$ reste attachée à la matrice extracellulaire derrière la cellule et forme le *migration track*^{33, 34}. Toutefois, les composantes cytosquelettiques sont tirées par les forces de contraction vers le corps cellulaire et se dispersent³⁴. Le mécanisme de scission entre les intégrines et le cytosquelette est encore mal compris, mais il a été démontré que les forces de contraction ainsi que l'activité tyrosine kinase en général sont nécessaires pour détacher l'arrière d'une cellule³³.

Nous avons résumé ici les étapes clés de la migration mésenchymal et les joueurs moléculaires principaux. Bien que la compréhension des mécanismes moléculaires ait grandement évolué dans les dernières années, les mécanismes de coordination spatio-temporels menant à un travail concerté de chaque protéine impliquée sont encore mal compris. De plus, la migration *in vivo* est un processus plus complexe que ce que les modèles de culture cellulaire en deux dimensions nous laissent appréhender. Ainsi, la culture cellulaire en trois dimensions et l'imagerie *in vivo* dans des modèles animaux seront assurément très instructives dans les prochaines années.

3. Dynamique de la polymérisation de l'actine

La polymérisation des filaments d'actine joue un rôle crucial dans le processus de migration, car elle fournit à la cellule la force mécanique pour projeter sa membrane vers l'avant. Nous allons donc revoir rapidement les principes de base de la dynamique de l'actine. Cette protéine possède une activité ATPase et peut donc hydrolyser une molécule d'ATP en une molécule d'ADP et une molécule de phosphate inorganique. Elle existe sous deux formes : en monomères souvent désignés actine G et en polymères désignés actine F. Ces polymères forment des filaments hélicoïdaux polarisés et la polymérisation a lieu plus rapidement à

l'extrémité positive (aussi appelée extrémité à barbes ou en brosse) qu'à l'extrémité négative (aussi appelée "extrémité pointue"). La polymérisation de l'actine s'accompagne de l'hydrolyse lente de l'ATP et l'on retrouve donc principalement de l'actine F•ADP au centre du filament et de l'actine F•ATP aux extrémités³⁵. L'assemblage des filaments d'actine peut être divisée en trois étapes principales : (i) la nucléation, (ii) l'élongation (iii) et l'état stationnaire dynamique. La nucléation de l'actine est l'étape limitante et est le fruit de l'agrégation lente de monomères d'actine G en oligomères instables. Lorsque l'amas contient trois ou quatre monomères, il peut servir de noyau stable pour l'addition de monomères supplémentaires qui vont donner lieu à une polymérisation rapide du nouveau filament. L'élongation continue jusqu'à ce que la concentration d'actine G diminue. On atteint alors l'état stationnaire dynamique qui correspond à l'état d'équilibre entre la vitesse de polymérisation et de dépolymérisation, la taille du filament ne varie plus durant cette étape.

Plusieurs protéines participent à la régulation de la polymérisation des filaments d'actine. Les facteurs de nucléation en font partie et permettent de catalyser la formation des noyaux stables servant de support pour la formation de nouveaux filaments. Le premier à avoir été identifié est le complexe Arp2/3 formé de sept protéines³⁶. Les protéines Arp2 et Arp3 sont apparentées à l'actine et peuvent s'associer ensemble de façon à imiter un dimère d'actine³⁷. La polymérisation de l'actine peut alors se faire de façon efficace par l'extrémité positive. Ce complexe peut aussi se lier à la surface des filaments préexistants de façon à former des embranchements dans un angle de 70°. La polymérisation de l'actine par le complexe Arp2/3 donne donc lieu à un réseau dendritique de filaments d'actine entremêlés.

Les formines forment une deuxième famille de facteurs de nucléation. Ceux-ci catalysent la nucléation de nouveaux filaments grâce à leurs domaines FH2 pouvant lier les monomères d'actine³⁸. Ils donnent lieu à des filaments droits dépourvus d'embranchement³⁸. Il est à remarquer que le potentiel de nucléation des différentes formines varie beaucoup entre elles et elles peuvent même dans certains cas induire la dépolymérisation de l'actine ou l'assemblage de faisceaux d'actine³⁹. Finalement, la troisième famille de facteurs de nucléation est Spire. À l'instar des formines, elles forment des filaments d'actine droits dépourvus d'embranchement grâce à leurs quatre domaines WH2⁴⁰. Ainsi, les formines et les protéines Spire donnent lieu à un réseau de filaments d'actine droits.

De plus, il existe une large panoplie de protéines pouvant favoriser la polymérisation ou la dépolymérisation de l'actine. Soulignons tout d'abord le rôle de la profiline qui lie l'actine G, permet l'échange de l'ADP pour l'ATP et favorise l'addition de monomères à l'extrémité positive. Il existe aussi plusieurs protéines telles que gelsoline, villine et sévérine, pouvant coiffer une extrémité ou l'autre du filament et bloquer la dépolymérisation à cette extrémité. Finalement, il existe plusieurs protéines pouvant fragmenter les filaments préexistants ce qui permet de contourner l'étape de nucléation et stimuler la polymérisation. De plus, plusieurs protéines ont comme fonction de réticuler les filaments entre eux de façon à former différents réseaux. L'équilibre entre ces différents facteurs permet de donner lieu aux différentes structures cellulaires et permet aussi de modifier la forme de la cellule lorsque nécessaire.

4. Les petites GTPases : superfamille d'interrupteurs moléculaires

La superfamille des petites GTPases Ras comprend plus de 150 membres chez l'humain et l'on retrouve des orthologues conservés au fil de l'évolution dans tout le règne eucaryote^{41, 42}. Ces protéines peuvent être divisées en cinq grandes familles selon leur homologie de séquences et leurs similitudes fonctionnelles : Ras, Rho, Ran, Rab et Arf⁴¹. Chaque famille est spécialisée dans la transduction des signaux différents bien que leurs fonctions s'entrecroisent largement. Ainsi, les Ras contrôlent principalement la prolifération, la différenciation et la survie grâce à la régulation de l'expression génique⁴¹. Comme nous allons le voir plus en détail dans les prochaines sections, les protéines Rho régulent le remodelage du cytosquelette. Les protéines Ran régulent le transport nucléaire et sont très apparentées aux Rab qui elles régulent le transport vésiculaire, fonction qu'elles partagent d'ailleurs avec les Arf⁴¹.

Les deux premiers membres à avoir été découverts et qui ont permis d'élucider le mécanisme enzymatique de cette classe de protéines sont l'oncogène p21RAS impliqué dans la transduction de signaux et la GTPase EF-Tu impliquée dans la traduction des protéines⁴³⁻⁴⁸. Outre quelques exceptions⁴⁹, tous les membres de cette famille partagent un même mécanisme biochimique, c'est-à-dire qu'ils agissent en tant qu'interrupteur moléculaire en hydrolysant le GTP en GDP (**figure 3, p.11**). En effet, ces protéines oscillent entre trois états : la forme inactive liée au GDP, la forme très transitoire dépourvue de nucléotide et la forme active liée au GTP, conformation dans laquelle elles peuvent interagir avec leurs effecteurs et les activer^{43,50}. Toutefois, leur activité intrinsèque d'hydrolyse du GTP est de façon générale très basse et leur constante de dissociation du GDP très faible^{50, 51}. Ainsi, elles dépendent de trois classes de protéines pour moduler leur activité : les facteurs d'échange de nucléotides guanidiques (GEFs), les protéines activatrices de GTPases (GAPs) et les inhibiteurs de

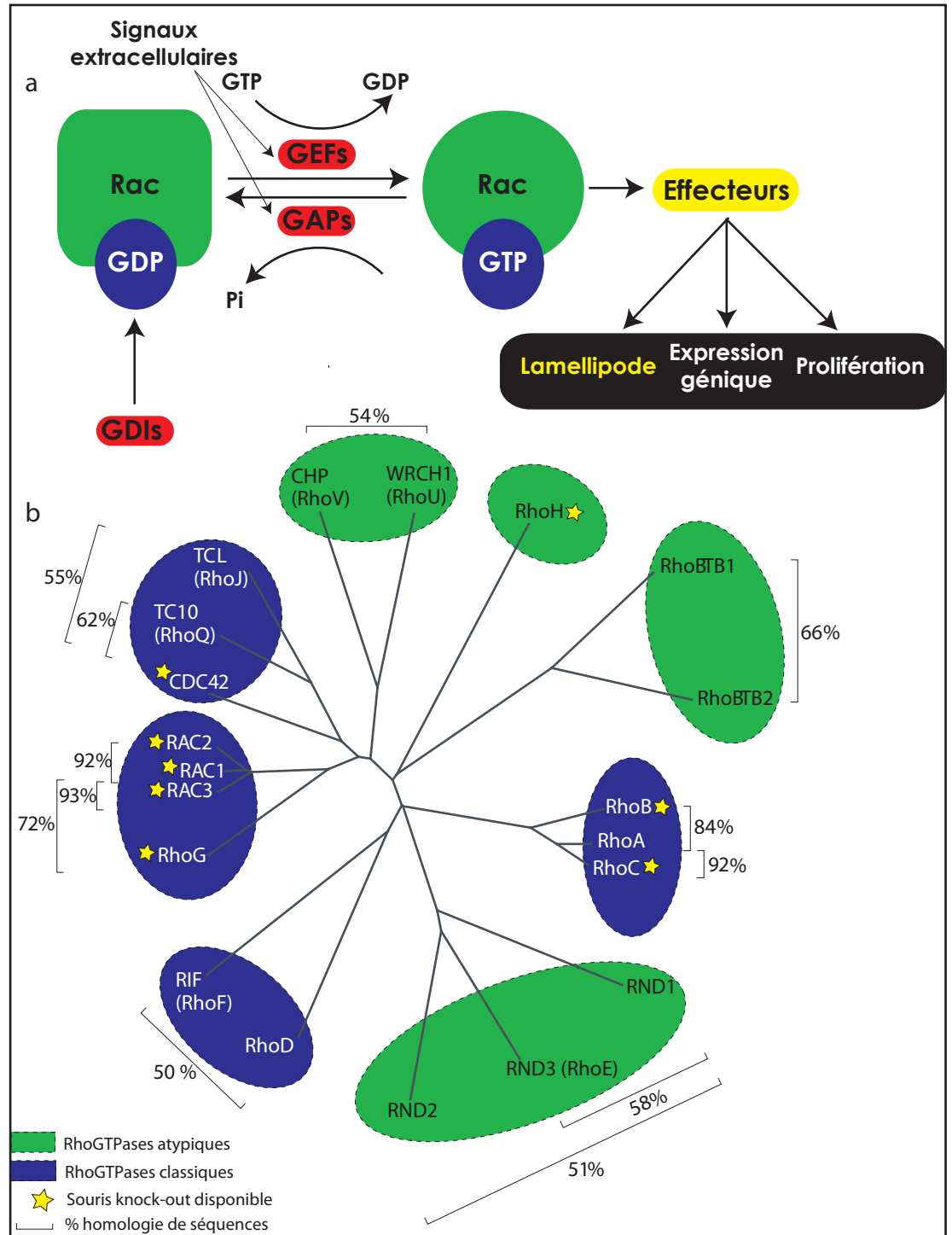


Figure 3 | Les RhoGTPases. a | Les GTPases agissent comme interrupteur moléculaire en oscillant entre leur forme inactive liée au GDP et leur forme active liée au GTP pouvant interagir avec leurs différents effecteurs. Ce cycle est positivement régulé par les GEFs qui favorisent le relâchement du GDP en faveur du GTP. Les GAPs catalysent la réaction d'hydrolyse du GTP alors que les GDIs séquestrent la GTPase et inhibent l'interaction avec les effecteurs. Les protéines régulatrices sont elles-mêmes hautement régulées par des stimuli extracellulaires afin de permettre une activation contrôlée des GTPases. **b** | La famille des RhoGTPases. La sous-famille de Rac comprend Rac1-3 et RhoG et induisent la formation de lamellipodes. Les protéines RhoA, RhoB et RhoC induisent toutes les trois l'assemblage de fibres de stress et favorisent les forces de contraction alors que les membres de la sous-famille de Cdc42, TCL, TC10, Wrch1-2, Rif et RhoD sont reconnus pour induire la formation de filopodes. Figure adaptée de Ref [52].

dissociation des nucléotides guanidiques(GDIs) (**figure 3, p.11**). Les GEFs sont des régulateurs positifs du cycle en ce sens qu'elles catalysent l'échange du GDP pour le GTP et donc activent la GTPase. Les GAPs activent l'activité intrinsèque d'hydrolyse du GTP et donc favorisent l'état inactif. Un troisième niveau de régulation fourni par l'activité des GDIs régule les GTPases Rho et Rab. Les RhoGDIs et les RabGDIs sont divergentes d'un point de vue structurel, mais sont très analogues fonctionnellement⁵³. En effet, elles agissent comme régulateurs négatifs du cycle des GTPases et peuvent utiliser trois mécanismes distincts pour ce faire. Leur rôle le plus connu et d'où elles tirent leur nom est d'empêcher la dissociation du GDP de la GTPase, la bloquant ainsi dans sa conformation inactive⁵⁴. Les GDIs peuvent aussi interagir avec la forme liée au GTP, elles inhibent alors l'activité GTPase intrinsèque et celle catalysée par les GAPs mais bloquent aussi l'interaction avec les effecteurs, empêchant ainsi toute transduction de signaux⁵⁵⁻⁵⁹. Finalement, elles peuvent aussi masquer le site d'ancrage à la membrane et donc séquestrer la GTPase dans le cytosol⁶⁰. Les mécanismes régulant l'association entre la GTPase et la GDI sont encore mal compris. Toutefois, certaines données démontrent que la phosphorylation de RhoGDI1 et RhoGDI2 par les kinases Src et Pak inhibe leur interaction avec Rac⁶¹⁻⁶³.

4.1 La famille des Rho GTPases

La famille de petites GTPases Rho comprend 22 membres chez les mammifères qui peuvent réguler un grand nombre de voies de signalisation grâce à leur large panoplie d'effecteurs (**figure 3 et 4, p.11 et 13**)^{8, 49}. Toutefois, la fonction la mieux connue pour la plupart des RhoGTPases est la régulation du cytosquelette d'actine. Les membres les mieux caractérisés sont RhoA, Rac1 et Cdc42 et ils régulent chacun

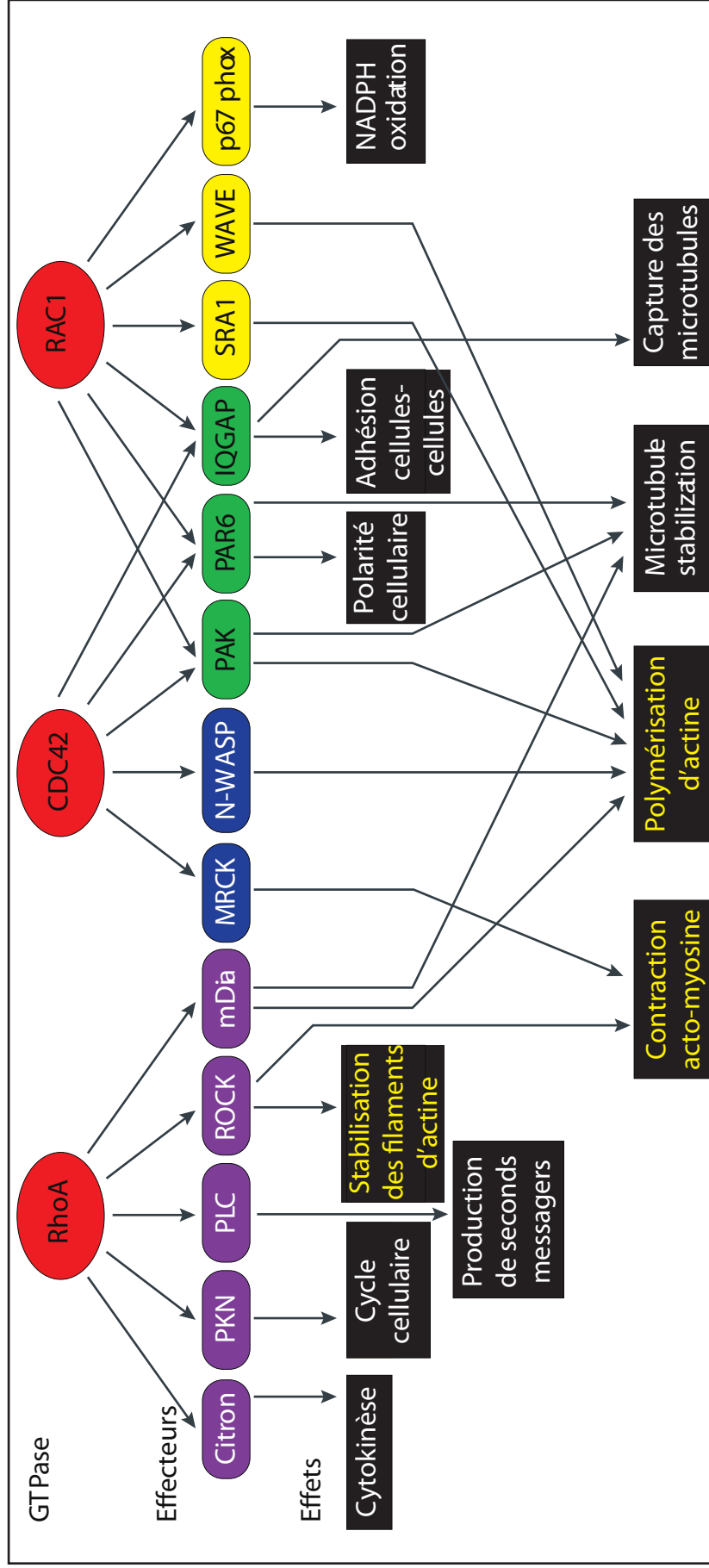


Figure 4 | Effecteurs des RhoGTPases. Sous leur conformation active, les GTPases peuvent interagir avec une panoplie d'effecteurs et médient grâce à eux différents effets cellulaires. RhoA est principalement reconnue pour induire l'assemblage des faisceaux d'acto-myosine participant à la contraction cellulaire. Pour ce faire, elle active la kinase ROCK et la forme mDia. Cdc42 induit la formation de filopodes au front de migration et cet effet est en partie médié par l'activation du complexe N-WASP. Rac induit la formation de lamellipodes principalement grâce au complexe WAVE. Figure adaptée de Ref [64]

un aspect différent du cytosquelette : RhoA induit la formation de faisceaux d'actine qui forment les fibres de stress, Rac1 induit le remodelage de l'actine de façon à former des feuillettes d'actine et des lamellipodes, et finalement Cdc42 induit la formation d'extensions minces et riches en actine que sont les filopodes (**figure 4, p.13**)⁶⁵. Nous allons étudier chacune de ces GTPases plus en détail avec un intérêt tout particulier pour Rac puisqu'elle sera l'objet de mes travaux de maîtrise.

4.2 RhoA, RhoB et RhoC

RhoA a été le premier membre de la famille des Rho GTPases à avoir été découvert en 1985 par Madaule & Axel et ce gène a retenu l'attention par sa haute homologie de séquences avec l'oncogène Ras⁶⁶. Concurremment à cette découverte, plusieurs groupes ont rapporté que la toxine bactérienne botulinum neurotoxin pouvait ADP-ribosyler une protéine de 21kDa, alors prise à tort pour Ras⁶⁷⁻⁷⁰. Par sérendipité, il fut par la suite démontré que la protéine ribosylée est en fait Rho et que l'enzyme catalysant cette réaction est la C3 transférase, un contaminant de la toxine bactérienne^{71,72}. Qu'à cela ne tienne, un intérêt pour Rho est né, et en 1989 fut publié le premier lien entre Rho et le cytosquelette d'actine⁷³. Le paroxysme fut atteint en 1992 lors de la publication de l'article de Anne Ridley dans le journal Cell où il fut démontré que Rho régule l'assemblage des sites d'adhésion focale et des fibres de stress⁷⁴. Puisque les trois isoformes de Rho partagent une très haute homologie, environ 85 %, et qu'elles induisent un phénotype cellulaire analogue lorsque surexprimées, les scientifiques ont longtemps pensé qu'elles avaient des fonctions similaires^{66, 74}. Ainsi, RhoB et RhoC ont reçu très peu d'attention bien qu'elles aient été découvertes en même temps que RhoA. Toutefois, plusieurs évidences suggèrent maintenant que ces trois protéines peuvent jouer des rôles

différents⁷⁵. Nous résumerons ici les principales voies de signalisation régulées par RhoA et ses effecteurs.

4.2.1 Signalisation via RhoA-ROCK

Lors de la migration cellulaire, Rho régule le cytosquelette d'actine de façon à promouvoir l'assemblage des faisceaux d'actine:myosine, favorisant ainsi les forces de contraction, et permet de rétracter l'arrière de la cellule. Ces effets sont médiés principalement grâce à deux de ces effecteurs : p160ROCK et mDia⁸. La Ser/Thr kinase ROCK est activée par Rho-GTP et peut alors phosphoryler et activer la kinase LIMK qui à son tour phosphoryle et inactive cofiline, stabilisant ainsi les filaments d'actine à l'intérieur des faisceaux d'actine:myosine^{76, 77}. La kinase ROCK phosphoryle aussi la MLC phosphatase, la rendant ainsi inactive (**voir 2.4, p.6**)⁷⁸. Ceci déplace l'équilibre de phosphorylation de la myosine, augmente les forces de contraction, favorise le déplacement du corps cellulaire et la rétraction de l'arrière de la cellule (**voir 2.4, p.6**)⁸.

4.2.2 Signalisation via Rho-mDia1

De plus, Rho régule à la fois le cytosquelette d'actine et de microtubules via un deuxième effecteur : mDia1. Cette protéine est l'orthologue chez les mammifères du gène diaphanous chez la drosophile⁷⁹. Elle appartient à la famille des formines qui partagent une activité de nucléation pour les filaments d'actine, formant de longs filaments d'actine dépourvus d'embranchement⁸⁰. À son état basal, mDia1 est autoinhibée et inactive. Lorsqu'elle interagit avec Rho-GTP, elle est activée et peut alors nucléer de nouveaux filaments d'actine⁸⁰⁻⁸². Dans une cellule en migration, mDia1 est localisée à la membrane au front de migration et il a été démontré par

ARNi qu'elle est essentielle pour la migration cellulaire^{83, 84}. En effet, elle semble réguler le recyclage des sites adhésion focale à la périphérie de la cellule en y recrutant Src, sans toutefois affecter l'activité kinase de cette dernière⁸⁴. De plus, il a été démontré que mDia1 est impliquée dans la polarité cellulaire en régulant la stabilité et l'organisation du cytosquelette de microtubules⁸⁴⁻⁸⁶. En effet, mDia peut interagir directement avec les microtubules, promeut le coiffage de leurs extrémités, et en son absence, le centrosome est mal orienté dans une cellule polarisée⁸⁴⁻⁸⁶.

4.2.3 Autres effecteurs de Rho

Nous avons revu ci-dessus les effecteurs les mieux caractérisés de Rho, soit ROCK, MLC phosphatase et mDia1. Toutefois, d'autres effecteurs de cette GTPase ont été identifiés. L'un d'entre eux est la Ser/Thr kinase Citron qui a été identifiée par le groupe de Narumiya en 1995 dans un crible de double hybride chez la levure⁸⁷. Plusieurs études ont rapporté un rôle pour Citron kinase durant la cytokinèse alors qu'elle est recrutée au sillon de clivage^{88, 89}. De plus, dans les neurones elle régule l'organisation de l'appareil de Golgi via le cytosquelette d'actine en recrutant ROCK-II et profiline Ila à cette organelle⁹⁰. Il a aussi été rapporté que Rho peut interagir avec la PIP5 kinase et l'activer^{91, 92}. Rho, Rac1 et Cdc42 peuvent toutes les trois activer les voies MAP Kinase ERK, JNK et p38 mais elles utilisent pour ce faire différentes molécules adaptatrices^{93, 94}. Finalement, Rho peut aussi interagir avec les protéines kinase PKN, PRK2, Rhophilin et Rhotekin mais la signification biologique de ces interactions est que très peu connue⁹⁵⁻⁹⁹.

Il semble exister une dichotomie entre les différentes activités de Rho. En effet, via ROCK elle promeut l'assemblage de faisceaux d'actine:myosine qui sont

responsables de la contraction de la membrane au corps cellulaire et à l'arrière de la cellule. Cette activité est incompatible avec l'extension de la membrane au front de migration. D'autre part, elle active mDia1 qui est localisée à l'avant de la cellule et induit la formation de longs filaments d'actine. Cette dualité est bien représentée par la localisation de Rho-GTP détectée par la technique de FRET. En effet, Rho•GTP est localisée principalement à l'arrière de la cellule à l'exception d'une mince bande au front de migration¹⁰⁰⁻¹⁰². Ceci suggère qu'il existe des mécanismes moléculaires encore mal compris pour localiser adéquatement Rho, mais aussi pour exclure ses différents effecteurs de certains compartiments cellulaires où leur activité serait nuisible pour la cellule.

4.3 Cdc42

La petite GTPase Cdc42 a été identifiée en 1990 dans un criblage chez la levure pour des souches mutantes présentant des défauts de bourgeonnement et de polarité cellulaire¹⁰³. Il fut par la suite démontré que Cdc42 régule le cytosquelette d'actine de façon à former des filopodes et des sites d'adhésion focale^{104, 105}. Les GTPases TCL, TC10, Wrch1, Wrch2, Rif et RhoD font partie de la même sous-famille que Cdc42 et peuvent avoir des fonctions cellulaires similaires¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. En effet, elles peuvent interagir avec une partie des effecteurs de Cdc42, et elles peuvent toutes induire la formation de filopodes à l'exception de TCL qui induit la formation d'ondulations dorsales¹⁰⁹⁻¹¹⁶. L'abolition de l'expression de Cdc42 n'est pas suffisante pour inhiber la formation de filopodes ce qui suggère que d'autres membres de cette sous-famille jouent un rôle redondant *in vivo*¹¹⁷. L'étude plus détaillée de la fonction de chacune de ces protéines individuellement et ensemble sera nécessaire pour déterminer leur spécificité de signalisation.

4.3.1 Formation de filopodes : WASP, mDia2 ou IRSp53?

Le premier indice quant aux mécanismes moléculaires employés par Cdc42 pour induire la formation de filopodes fut découvert vers la fin des années 1990. Il fut alors démontré que Cdc42-GTP peut interagir la protéine N-WASP et l'activer. Cette dernière interagit elle-même avec le complexe de nucléation de filaments d'actine Arp2/3 et l'active¹¹⁸⁻¹²⁶. Toutefois, plusieurs évidences suggèrent que les protéines WASP et Arp2/3 ne sont pas nécessaires pour la formation de filopodes. Ainsi, l'abrogation des complexes WAVE et Arp2/3 ou l'abolition de l'expression de N-WASP bloquent la formation de lamellipodes, mais pas de filopodes^{127,128}. De plus, il fut démonté que Arp2/3 et N-WASP ne sont pas localisés ni un ni l'autre à la pointe des filopodes^{123,129}. Et donc, la question reste entière, comment Cdc42 induit-elle la formation de filopodes? Bien que l'énigme ne soit pas résolue, les évidences pointent vers la formine mDia2/Drf3 comme facteur de nucléation en aval de Cdc42. La première évidence est que Cdc42•GTP lie directement mDia2 et l'active, et cette interaction est nécessaire pour le recrutement de Cdc42 au front de migration et au centrosome¹³⁰. Deuxièmement, l'abolition de l'expression de mDia2 bloque la formation de filopodes an aval de Cdc42¹³⁰⁻¹³². De plus, la formation de filopodes induite par la GTPase Rif est médiée par mDia2¹³³. Finalement, mDia2 est localisée à la pointe des filopodes où la polymérisation de l'actine a lieu^{129,134}.

Outre N-WASP et mDia2, IRSp53 est un médiateur potentiel de Cdc42 lors de la formation de filopodes. IRSp53 fait partie d'une famille de protéines incluant Missing-in-metastasis (MIM), BAI1AP2, IRSp53/BAP2 α et BAP2. Elles contiennent toutes un domaine WH2 liant l'actine monomérique, un domaine CRIB pouvant lier Cdc42•GTP, et un domaine IMD pouvant lier à la fois les filaments d'actine et les membranes riches en PIP2, et elles sont généralement connues pour induire la formation de faisceaux d'actine en reliant les filaments les uns aux autres¹³⁵. La

surexpression de IRSp53 est suffisante pour induire la formation de filopodes et inversement l'abrogation de son expression en inhibe la formation¹³⁶⁻¹³⁸. De plus, l'expression ectopique du domaine IMD est suffisante pour induire la formation massive de filopodes¹³⁵. Il a récemment été démontré que ce domaine IMD régule la formation de protrusions en induisant une courbure dans la membrane. En effet, ce domaine lie à la fois les membranes riches en PIP2 et les filaments d'actine et agit comme support pour replier la membrane et former une structure tubulaire¹³⁵. IRSp53 est localisée à la pointe des filopodes et des lamellipodes à l'interface entre la membrane plasmique et les filaments d'actine¹³⁵. Finalement, plusieurs partenaires d'IRSp53 ont été identifiés pouvant potentialiser ses activités de courbure de la membrane et d'assemblage de faisceaux d'actine. On note entre autres la formine mDia et les protéines Eps8 et MENA, pouvant toutes induire l'assemblage de faisceaux d'actine à l'instar de IRSp53¹³⁸⁻¹⁴⁰. En conclusion, plus de vingt ans après la découverte du rôle de Cdc42 dans la formation de filopodes, les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus ne sont pas complètement élucidés. Il semblerait que cette protéine recrute et active au front de migration plusieurs complexes protéiques pouvant tous induire la formation de filopodes. Conséquemment, il pourrait y avoir différents mécanismes indépendants les uns des autres amenant à la formation de ces structures.

4.3.2 Cdc42 et ses kinases

Les kinases de la famille Pak ont été découvertes en 1994 lors d'un criblage pour des effecteurs des petites GTPases Rac1 et Cdc42¹⁴¹. Ces protéines, qui sont conservées au fil de l'évolution, comptent six membres chez les mammifères : Pak1 à Pak6^{142, 143}. Elles sont généralement divisées en deux groupes, Pak1 à 3 dites conventionnelles forment le groupe 1, alors que les trois autres dites non conventionnelles forment le groupe 2. Cette division est due à leur mécanisme

d'activation différentiel. En effet, les kinases du premier groupe sont inactives à l'état basal et la liaison à Rac1•GTP ou Cdc42•GTP les active, alors que les kinases du groupe deux ne sont pas autoinhibées à l'état basal et la liaison à la GTPase servirait plutôt à les localiser adéquatement et à recruter d'autres protéines¹⁴⁴⁻¹⁴⁸. Plus de 40 substrats ont été rapportés dans la littérature et ce nombre reflète bien la variété de voies de signalisation dans lesquelles ces kinases sont impliquées¹⁴². Elles participent entre autres au remodelage du cytosquelette d'actine et de microtubules et phosphorylent environ une vingtaine de protéines impliquées dans ces processus¹⁴². Elles favorisent la formation de faisceaux d'actine:myosine en phosphorylant et activant LIMK qui elle-même phosphoryle et inactive cofiline^{149, 150}. Elle phosphoryle aussi MLC phosphatase et la myosine directement, inactivant et activant respectivement ces deux protéines^{151, 152}. Ainsi, de façon analogue à Rho-ROCK, elles favorisent la contraction cellulaire en régulant l'activité de trois protéines de cette voie : LIMK, MLC phosphatase et MLC. De plus, Pak1 phosphoryle la sous-unité régulatrice p41-ARC du complexe Arp2/3 et favorise la formation et la stabilité de ce complexe¹⁵³. Finalement, les protéines Pak peuvent réguler l'activité de plusieurs petites GTPases en modulant l'activité et la localisation de plusieurs GEFs, GAPs et GDIs^{62, 154-158}.

Une autre famille de kinases est activée par Cdc42 : les kinases MRCK1 et MRCK2. Elles ont été identifiées en 1998 et présentent une certaine similitude avec les kinases ROCK et PAK¹⁵⁹. Leur mode d'action est d'ailleurs similaire à ces dernières : elles stimulent la formation de faisceaux d'actine:myosine par la phosphorylation de la MLC phosphatase et de la MLC directement^{160, 161}.

4.3.3 Le rôle de Cdc42 dans l'établissement de la polarité et le remodelage du cytosquelette de microtubules

Outre ses fonctions dans le remodelage du cytosquelette d'actine, Cdc42 est aussi essentielle pour l'établissement de la polarité et le remodelage du cytosquelette de microtubules. Lors de la migration, la cellule réoriente le centrosome et l'appareil de Golgi vers le front de migration et un réseau de microtubules polarisés est essentiel pour ce faire. Ce réseau est établi en stabilisant spécifiquement les microtubules attachés au front de migration au détriment des autres¹⁶². Il a été démontré que seule Cdc42, ni RhoA ni Rac1, est essentielle pour orienter le centrosome correctement¹⁶³. Un des effecteurs de Cdc42 possiblement impliqué dans la régulation des microtubules est la kinase Pak1 qui peut phosphoryler et inhiber Stathmin qui elle-même déstabilise les microtubules^{164, 165}. Un autre effecteur de Cdc42 impliqué dans la régulation des microtubules est la protéine Par6. Cette dernière est en complexe avec Par3 et aPKC et régule la polarité. Lorsqu'activée par Cdc42, Par6 inhibe GSK-3 β qui elle-même inhibe APC et stabilise les microtubules¹⁶⁶. Finalement, il existe une troisième voie de signalisation en aval de Cdc42 impliquée dans le remodelage du cytosquelette de microtubules : le complexe IQGAP-CLIP170. IQGAP est localisée au front de migration et une de ses fonctions est de relier les filaments d'actine entre eux de façon à former des lacis¹⁶⁷⁻¹⁷³. CLIP170 capture les extrémités positives des microtubules et stabilise les filaments¹⁷⁴ et son interaction avec IQGAP augmente son affinité pour les microtubules et permettrait de la localiser au front de migration, stabilisant ainsi le réseau de tubuline localement¹⁷⁵.

Préalablement au déplacement du centrosome lors de l'établissement de la polarité, le noyau est lui aussi déplacé et ce mouvement est associé au flot

rétrograde d'actine¹⁷⁶. La petite GTPase Cdc42 participe aussi au déplacement de cette organelle, mais utilise, cette fois, la kinase MRCK1/2 pour y parvenir¹⁷⁶.

Comme décrits précédemment, plusieurs protéines et composantes cellulaires sont distribuées de façon asymétrique dans la cellule de façon à créer une morphologie polarisée, et les lipides membranaires ne font pas exception. En effet, la composition lipidique du front de migration est différente de l'arrière de la cellule et ceci est nécessaire pour la migration directionnelle. Ainsi, Cdc42 régule l'activité de plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides : PI-3-kinase, PLD et PLC. La première phosphoryle les lipides et génère du PIP3 alors que les deux autres sont des phospholipases¹⁷⁷⁻¹⁷⁹.

4.2.4 Autres fonctions de Cdc42

Nous avons revu les principaux effecteurs de Cdc42 impliqués dans le remodelage du cytosquelette. Toutefois, cette GTPase régule aussi d'autres processus biologiques tels que la transcription génique via les MAP kinases à l'instar de Rho (**voir 4.2.3, p.16**). Elle régule aussi le transport vésiculaire et l'endocytose notamment via deux de ses effecteurs : TOCA-1 et ACK. La protéine TOCA-1 peut lier directement N-WASP et l'activer, est nécessaire pour induire la polymérisation d'actine *in vitro* en présence de N-WASP et Arp2/3, et induit la formation de filopodes^{180, 181}. De plus, TOCA-1 contient aussi un domaine EFC/F-BAR capable d'induire des courbures dans la double couche lipidique et est impliquée dans la formation d'endocytose grâce à son interaction avec N-WASP et dynamine^{181, 182}. De façon surprenante, l'inhibition de l'endocytose bloque complètement la formation de filopodes induite par Cdc42¹⁸¹. Outre TOCA-1, Cdc42 peut aussi réguler l'endocytose via la kinase ACK. Cette dernière interagit directement avec la chaîne lourde de la clathrine et est impliquée dans l'internalisation du récepteur à l'EGF^{183, 184}.

Cdc42 est aussi impliquée dans le cycle cellulaire. En effet, l'expression de la forme dominante négative de cette protéine bloque les cellules en phase G1.¹⁸⁵ De plus, si la même protéine mutante est exprimée dans des cellules synchronisées en mitose, les cellules arrêtent en prométaphase et cet arrêt est causé par la perte de l'attachement des microtubules aux kinétochores.¹⁸⁶ Le rôle de cette GTPase lors du cycle cellulaire est encore mal compris et ceci est en partie dû au fait que les autres membres de cette sous-famille peuvent compenser la perte de Cdc42.¹⁸⁷ Lors de la progression de G1 en phase S, Cdc42 semble contribuer principalement via ses fonctions de transcription génique. En effet, Rac et Cdc42 peuvent toutes les deux induire l'expression de la cycline D1^{188,189} et Cdc42 peut aussi induire l'expression de la cycline D5 via p70 S6-kinase.¹⁹⁰ Lors de la mitose et de la cytokinèse, Cdc42 régule plutôt le cytosquelette d'actine et de microtubules via les effecteurs décrits précédemment, notamment mDia3 qui permet l'attachement des microtubules au kinétochore et PAK qui régule les forces de contraction lors de la cytokinèse.¹⁸⁶

Finalement, Cdc42 régule aussi le cytosquelette de septines via la famille des BORGs.^{191, 192} Les septines sont des protéines possédant une activité GTPasique pouvant s'associer en multimère et former des filaments à l'instar de l'actine et la tubuline, et leurs fonctions seraient de former un corset autour du corps cellulaire.¹⁹³ Bien que le rôle physiologique des protéines Borgs soit encore mal compris, elles peuvent réguler l'assemblage du cytosquelette de septines et inhibent l'étalement cellulaire.¹⁹⁴

4.4 Rac

La petite GTPase Rac1 a été la deuxième des Rho GTPases à avoir été découverte après Rho et ses débuts furent tout aussi fortuits que la première, RhoA.

Rac1 a été découverte en 1989 par Didsbury & al. et ils croyaient alors avoir découvert une nouvelle protéine similaire à Ras et substrat de la C3 transférase d'où elle tient son nom: *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*¹⁹⁵. Il s'avéra que la préparation protéique était contaminée avec Rho, et que Rac n'est pas un substrat de cette enzyme. Deux ans plus tard, deux publications rapportaient que Rac1 active l'enzyme NADPH oxidase impliquée dans la défense immunitaire et la prolifération^{196,197}. Ceci était assez surprenant puisque ce fut la première enzyme identifiée dont l'activité est régulée par une GTPase. Le rôle de Rac1 dans le remodelage du cytosquelette et la formation de lamellipodes fut publié l'année suivante par Ridley & al. où ils démontrent que la micro-injection de la forme dominante active de cette protéine induit la formation d'ondulations membranaires dans une mono-couche de fibroblastes¹⁹⁸. Nous savons maintenant que Rac1 fait partie d'une sous-famille comprenant Rac2, Rac3 et RhoG¹⁹⁹. Elles peuvent toutes induire la formation de lamellipodes et d'ondulations membranaires, et partagent toutes un haut niveau d'homologie, RhoG étant la plus divergente avec 72% d'homologie avec Rac1¹⁹⁹. Toutefois, certaines données suggèrent que Rac1 et Rac3 peuvent avoir des fonctions divergentes dans certains systèmes^{200,201}. RhoG est en quelque sorte le mouton noir de cette famille puisqu'elle ne peut pas lier les effecteurs des protéines Rac et son action principale semble être d'activer Rac via le complexe Dock180-Elmo^{202,203}.

4.4.1 Rôles de Rac durant le développement

Rac1 est le membre de cette sous-famille le mieux connu. Elle est exprimée de façon ubiquitaire et la délétion de ce gène est létale chez la souris avant le jour embryonnaire 9.5 et les embryons mutants présentent de sévères défauts de formation des feuillets embryonnaires^{195,204}. La délétion conditionnelle de ce gène a été largement utilisée afin d'étudier la fonction de Rac1 dans différents tissus²⁰⁵. Des défauts de développement de sévérité variable ont été observés chez tous les

mutants étudiés mais la délétion de Rac dans les cellules endothéliales est la seule qui entraîne la mort embryonnaire et celle-ci est due à de graves défauts de vascularisation²⁰⁶. De façon surprenante, la délétion conditionnelle de Rac dans les progéniteurs musculaires n'empêche pas ces cellules de migrer correctement, mais entraîne plutôt des défauts de fusion des myoblastes²⁰⁷. L'expression de Rac2 est restreinte au système hématopoïétique alors que l'expression de Rac3 est la plus intense dans le système neuronal^{195,208-211}. *Ipso facto*, la souris mutante pour Rac2 est viable, mais présente des neutrophiles déficients ayant des défauts de migration et de production de superoxide, alors que la souris mutante pour Rac3 est elle aussi viable, mais présente des défauts comportementaux, notamment une amélioration des fonctions motrices²¹¹⁻²¹³. Quant à RhoG, elle est exprimée dans tous les tissus, mais à des niveaux variables²¹⁴. La souris mutante pour RhoG se développe normalement et le seul défaut remarqué est une légère hyper-sensibilité des lymphocytes B et T aux antigènes, suggérant que RhoG régule négativement le système immunitaire^{214,215}. Une importante observation est que les protéines Rac ne semblent pas être entièrement redondantes puisque la délétion indépendante des différents gènes Rac n'entraîne pas les mêmes phénotypes. Par exemple, la délétion de Rac1 ou de Rac2 dans les cellules hématopoïétiques n'entraîne pas les mêmes défauts d'hématopoïèse ce qui suggère des rôles fonctionnellement divergents^{212,216}.

4.4.2 Formation des lamellipodes

Le premier mécanisme moléculaire permettant à la petite GTPase Rac1 d'induire remodelage du cytosquelette d'actine fut découvert en 1998 alors qu'il fut démontré que la protéine WAVE agit en aval de Rac lors de la formation de lamellipodes¹²⁰. WAVE fait partie de la famille des protéines WASP et celles-ci régulent la polymérisation d'actine en activant le complexe de nucléation Arp2/3^{120, 123}. Ce complexe est le seul facteur de nucléation indispensable pour la formation de

lamellipodes¹²⁷. Toutefois, Rac1 ne lie pas directement WAVE¹²⁰ et deux liens ont été trouvés pouvant relier les deux molécules. Le premier est la protéine IRSp53 introduite ci-dessus (**voir 4.3.1 p.18**). Il a été démontré que IRSp53 peut lier directement Rac•GTP et WAVE et est nécessaire pour l'activation du complexe Arp2/3 *in vitro*²¹⁷. Toutefois, la contribution de cette protéine à la formation de lamellipodes est controversée puisqu'elle semble se lier préférentiellement à Cdc42 *in vivo* et sa surexpression induit la formation de filopodes^{138,218}. Le deuxième lien entre WAVE et Rac est les protéines Sra-1 et Nap1^{219,220}. Contrairement à WASP, la protéine WAVE est active à l'état basal lorsque purifiée et *in vivo* elle forme un complexe avec les protéines PIR121/Sra-1, Nap1, Abi-1 et HSPC300 qui la maintiennent inactives^{221,222}. Il a été démontré que Rac et Nck peuvent induire l'activation de ce complexe en interagissant avec Sra-1 et Nap1^{219-221,223,224}.

Les formines mDia2 et mDia3 peuvent, elles aussi, être activées par Rac•GTP²²⁵. Toutefois, elles ont toutes les deux des fonctions établies dans la signalisation en aval de Cdc42: mDia2 induit la formation de filopodes alors que mDia3 régule l'attachement des kinétochores aux microtubules. Ainsi, leur rôle dans la signalisation de Rac et la formation de lamellipodes est controversé. Toutefois, l'abolition de l'expression de mDia2 par ARNi bloque la formation de lamellipodes et de filopodes¹³¹. De plus, l'expression de la forme dominante active de Rac dans ces cellules ne rétablit pas la formation de lamellipodes suggérant que mDia2 agit en aval de cette GTPase et que le complexe Arp2/3 ne peut pas compenser pour la perte de cette formine. De plus, une interaction entre mDia2 et le complexe formé de WAVE, Abi-1, Nap1 et Sra-1 a été rapportée par deux groupes récemment^{131, 226}. Le premier groupe a trouvé que l'interaction entre la formine et la sous-unité Abi-1 permet de localiser mDia2 au front de migration,¹³¹ alors que le deuxième groupe a plutôt rapporté que mDia2 fait partie d'un complexe multimérique avec WAVE, Abi-1, Nap125, Sra-1 et Arp2/3 et que ceci a pour effet d'inhiber mDia2²²⁶. La divergence

entre ces données n'est pas bien comprise et les différents facteurs de nucléation n'agissent probablement pas indépendamment les uns des autres, mais de façon intégrée.

Outre le complexe de nucléation Arp2/3 et son activateur WAVE, deux autres classes de protéines sont absolument nécessaires pour la formation de lamellipodes tel que démontré par ARNi: ADF/Cofiline et les protéines de coiffage²²⁷⁻²³⁰. Lorsque Rac est active, elle peut activer les kinases de la famille Pak à l'instar de Cdc42 et celles-ci activent LIMK qui à son tour phosphoryle, mais inactive Cofiline^{149, 231}. La cofiline lie l'actine monomérique et les filaments d'actine et favorise la dépolymérisation de ces derniers. Les monomères d'actine liés à l'ADP ainsi relâchés peuvent être activés et réintroduisent dans de nouveaux filaments. Lorsqu'activées par le Ca²⁺, les protéines de coiffage lient l'extrémité positive des filaments d'actine et empêchent leur élongation alors que le relâchement est contrôlé par les phospholipides²³²⁻²³⁴. Gelsolin est le membre le mieux connu de cette famille et il a été démontré que l'activation de Rac promeut le détachement de la gelsoline des filaments d'actine grâce à l'activation de son effecteur PIP 5-kinase²³⁵⁻²³⁸. Il est quelque peu surprenant que l'ADF/cofiline et la gelsoline soient indispensables pour la formation de lamellipodes puisque ces deux classes de protéines inhibent la polymérisation d'actine et l'activité de Rac les inhibent toutes les deux. Ceci peut être expliqué partiellement par la régulation rigoureuse de l'activation des GTPases de façon à activer ou inhiber les protéines adéquates au bon endroit et au bon moment²³⁹.

3.4.3 Autres fonctions de Rac

Tel que mentionné précédemment, les trois GTPases Rac, Cdc42 et RhoA peuvent activer les voies de signalisation JNK et p38 MAP kinase^{93, 94}. Rac utilise la

protéine adaptatrice POSH et les protéines kinase MLK et Pak pour médier cet effet^{189, 240-243}. De plus, Rac régule la survie et la prolifération cellulaire grâce à l'activation de la voie de signalisation de NF- κ B via la production d'espèces réactive de l'oxygène¹⁸⁸ et l'activation de la kinase AKT via l'activation de PI 3-kinase²⁴⁴⁻²⁴⁷. Finalement, Rac et Cdc42 sont toutes les deux impliquées dans l'établissement de la polarité grâce à leur interaction avec le complexe Par6-Par3-aPKC (**voir 4.3.3 p.21**)²⁴⁸⁻²⁵⁰.

5. Les protéines Dock : nouvelle famille de GEF atypique

Comme décrit plus haut, les GTPases oscillent entre deux conformations selon le nucléotide auquel elles sont liées. Ainsi, dans leur conformation active, elles sont liées au GTP et peuvent interagir avec leurs effecteurs. Une fois la molécule de GTP hydrolysée, la GTPase reste liée à une molécule de GDP et relâche un phosphate inorganique. Elle peut alors libérer le nucléotide et se lier de nouveau à une molécule de GTP puisque les concentrations intracellulaires de ce nucléotide sont supérieures à celles du GDP. Les GEFs régulent positivement ce cycle en favorisant le relâchement de GDP et en stabilisant la conformation dépourvue de nucléotides. La première GEF à avoir été identifiée est Dbl et elle a tout d'abord attiré l'attention par son implication dans la formation de lymphomes²⁵¹. Le même groupe a démontré quelques années plus tard que cette protéine agit comme facteur d'échange pour la GTPase Cdc42²⁵². Depuis, environ 69 protéines appartenant à la famille de Dbl ont été identifiées²⁵³. Elles partagent toutes deux domaines : le *Dbl-homology domain* (DH) et un *Pleckstrin-homology domain* (PH). Le premier est le domaine catalytique qui est responsable de l'interaction avec la GTPase et favorise le relâchement du nucléotide et du Mg^{2+} ,²⁵⁴⁻²⁵⁶ alors que le deuxième interagit généralement avec les phospholipides et est alors nécessaire pour localiser la GEF à la membrane, mais peut dans certains cas participer à la catalyse²⁵⁷⁻²⁵⁹.

5.1 La famille des protéines Dock

Outre la très grande famille Dbl, il existe une autre famille de RhoGEFs: les protéines Dock²⁵³. Le premier membre et le mieux caractérisé est Dock180 et a tout d'abord été identifié comme protéine pouvant lier le domaine SH3 de CrkII grâce à son domaine PXXP C-terminal²⁶⁰. Il a ensuite été démontré que Dock180 interagit avec Rac et l'active²⁶¹. Ces données ont été corroborées dans des études génétiques chez *Cærnorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster* qui ont démontré que Ced-5 et Myoblast city, les orthologues de Dock180 chez ces organismes, sont situés en amont de la GTPase Rac et sont impliqués dans plusieurs processus biologiques tels que la phagocytose, la migration des cellules de bordure, et la fusion des myoblastes. La famille des protéines Dock comprend 11 membres chez les mammifères nommés Dock1/Dock180 à Dock11 et peut être subdivisée en 4 sous-familles selon leur homologie de séquences^{253,262}. La sous-famille A, Dock180, Dock2 et Dock5, et la sous-famille B, Dock3 et Dock4 sont des RacGEFs (**figure 5, p.30**)²⁶²⁻²⁶⁶. La sous-famille C, Dock6, Dock7 et Dock8, sont moins bien connues et elles semblent avoir la double spécificité pour Rac1 et Cdc42, bien que aucune activité catalytique n'ait pu être détectée pour Dock8 dans les conditions utilisées (**figure 5, p. 30**)^{267, 268}. Finalement, Dock9/Zizimin1, Dock10/Zizimin3 et Dock11/Zizimin2 sont des GEFs pour Cdc42 (**figure 5, p.30**)^{262,269-271}.

Elles partagent entre elles deux domaines conservés : le *Dock-Homology Region* 1 et 2 (DHR1 et DHR2)²⁶². Le DHR2 est le domaine catalytique et est nécessaire et suffisant pour l'activation de Rac alors que le DHR1 peut lier les phospholipides et permet de localiser les protéines Dock à la membrane^{262, 263, 269, 272, 273}. Nous allons revoir ici les connaissances actuelles sur chaque membre des Dock avec une emphase particulière pour Dock180 et Dock5 qui font partie de mes travaux de maîtrise.

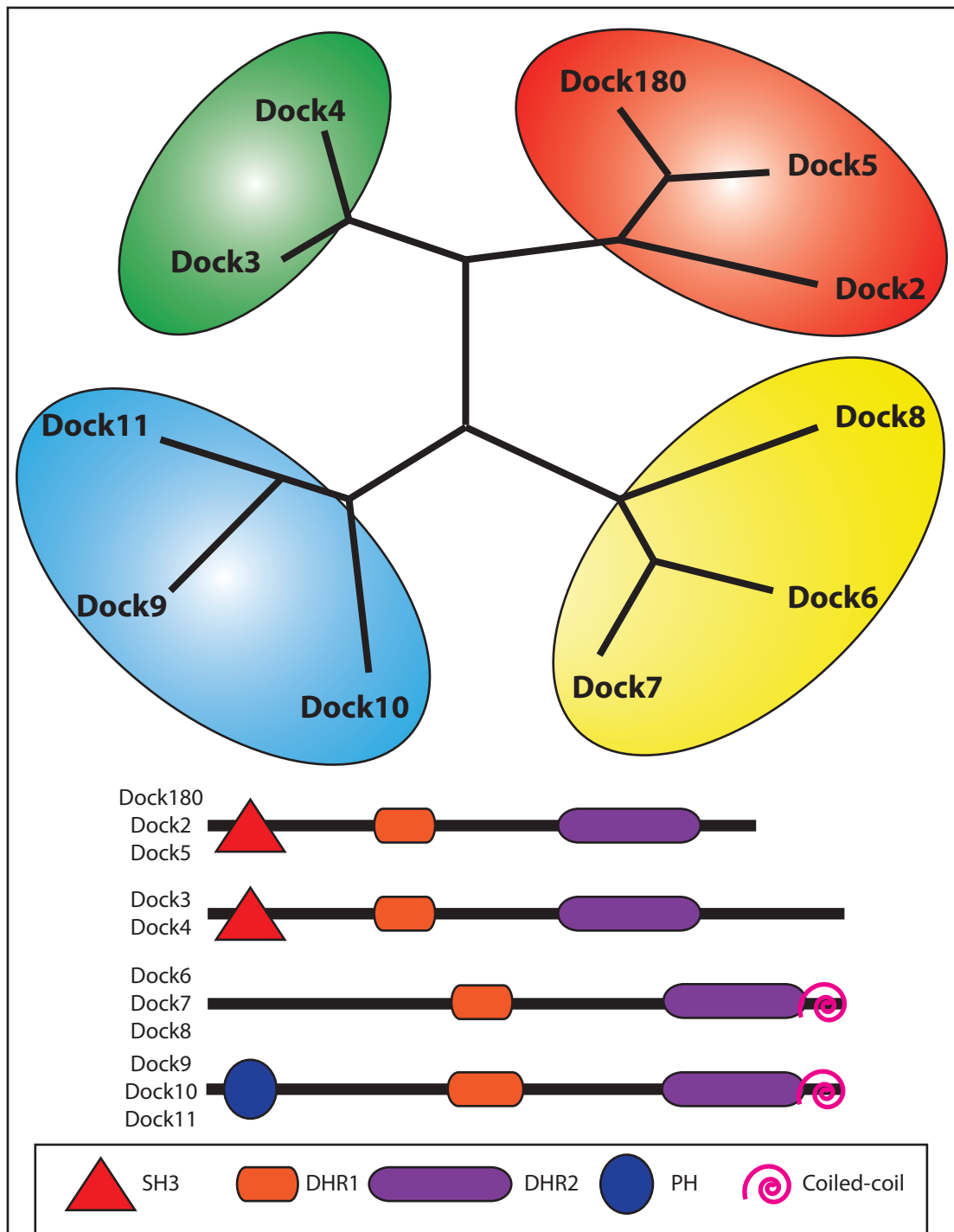


Figure 5 | La famille des protéines Dock. La famille des protéines Dock comprend 11 membres chez les mammifères qui peuvent être divisées en 4 sous-familles selon leur homologie de séquences. Le Dock-Homology Region 1 (DHR1) peut lier les phospholipides et sert à localiser la GEF à la membrane plasmique. Le Dock-Homology Region 2 (DHR2) est le domaine catalytique responsable de l'interaction la GTPase. Les cinq premiers membres de cette famille ainsi que Dock7 sont des GEFs pour Rac alors que Dock9, 10 et 11 activent Cdc42. Dock6 possède la double spécificité et peut activer Rac et Cdc42 . Dock8 est le seul membre pour lequel aucune activité GEF n'a été rapportée.

5.2 Dock180/Dock1

Comme son nom l'indique, l'orthologue chez la Drosophile de Dock180, Myoblast city (MBC), a tout d'abord été trouvé lors d'un criblage pour des gènes impliqués dans la fusion des myoblastes^{274,275}. Les myoblastes mutants pour ce gène s'alignent correctement et forment des adhésions entre eux, mais ne fusionnent pas et les myofibres résultantes restent mononuclées^{274, 275}. La mutation de dElmo entraîne des défauts similaires et place ces deux protéines dans la même voie de signalisation. De plus, il a été démontré que MBC est nécessaire pour au moins trois types de migration cellulaire : migration des cellules de bordure vers l'oocyte, la fermeture dorsale par les cellules épithéliales et la fermeture du thorax par les cellules des disques imaginaires de l'aile qui migrent les unes vers les autres pour former le *notum* à la ligne médiane. Durant le développement embryonnaire de la mouche, l'oocyte sécrète de grandes quantités des *Platelet-derived growth factor-vascular endothelial growth factor* 1-3 (PVF) et ceci attire les cellules de bordure et l'activité de Rac est nécessaire pour ceci²⁷⁶. La mutation de *Myoblast city* empêche la migration collective de ce groupe de cellules, plus particulièrement pendant la première phase où la polarisation en réponse aux stimuli est essentielle^{276,277}. Lors du processus de fermeture dorsale, les cellules épithéliales migrent collectivement et sont guidées par les cellules du front de migration (à ne pas confondre avec le front de migration d'une cellule)²⁷⁵. La mutation du gène de *Myoblast city* altère le cytosquelette de ces cellules et entraîne des défauts de migration et ceci phénotype les défauts entraînés par la mutation de dRac1, suggérant que ces deux protéines se situent dans la même voie de signalisation²⁷⁵. Finalement, la mutation de *Myoblast*

city empêche la fermeture du thorax lors de la métamorphose et elle semble signaler en amont de dRac1 et JNK²⁷⁸.

Ced-5, l'orthologue chez *C. elegans* de Dock180, est impliqué dans la phagocytose des cellules apoptotiques avec Ced-2, Ced-12 et Ced-10, les orthologues de CrkII, Elmo et Rac respectivement^{279, 280}. Ced-5-Ced-12 peuvent lier directement le récepteur au PdtSer et servent de module d'activation pour cette voie de signalisation²⁸¹. Outre les défauts de phagocytose, la mutation de Ced-5 entraîne aussi des défauts d'élongation chez les neurones moteurs de type D et des défauts de migration chez les cellules de la pointe distale et chez les cellules P durant le développement cérébral^{282, 283}. Néanmoins, les mécanismes moléculaires en aval de Ced-5/Ced-12/Ced-10 dans ces processus sont peu connus.

Le rôle de Dock180 chez les mammifères est moins connu que chez les autres organismes décrits précédemment. Lorsque surexprimée dans des cellules en culture avec Elmo, Dock180 induit la formation de lamellipodes, augmente l'étalement et la migration cellulaire, et la phagocytose^{263, 272, 284-286}. La souris *knock-out* pour Dock180 meurt à la naissance probablement d'asphyxie et elle présente de graves défauts de développement musculaire attribuable à un bloc de fusion des myoblastes qui ne sont pas sans rappeler les défauts de myogénèse de la souris mutante pour Rac1²⁸⁷.

5.3 Dock2

L'expression de Dock2 est limitée aux cellules hématopoïétiques^{266, 288}. La délétion de ce gène chez la souris a permis de démontrer que Dock2 est indispensable pour la migration des lymphocytes B et T et des neutrophiles^{288, 289}. Plus particulièrement, les lymphocytes démontrent des défauts de migration *in vitro*

en réponse à un gradient de cytokines et *in vivo*, ils n'atteignent pas leurs niches naturelles que sont les ganglions lymphatiques et la rate²⁸⁸. Il a récemment été démontré que, dans les neutrophiles, le recrutement de Dock2 au front de migration se fait en réponse à la synthèse de PIP3 par la PI3-kinase, et dans un deuxième temps la synthèse d'acide phosphatidique par la phospholipase D est nécessaire pour y stabiliser Dock2^{273,289}.

5.4 Dock5

La protéine Dock5 est la moins bien connue de cette sous-famille. Son haut niveau d'homologie avec Dock180 suggère qu'elle est elle aussi une GEF pour Rac toutefois et ceci a été démontré une fois dans la littérature par FRET²⁹⁰. La souris mutante pour Dock5 ne présente aucun défaut de développement évident²⁸⁷. Toutefois, le croisement de la souris hétérozygote Dock5 avec la souris *knock-out* pour Dock180 aggrave le phénotype musculaire observé chez la souris Dock180^{-/-}, suggérant que les deux protéines jouent un rôle redondant dans le développement musculaire²⁸⁷. De plus, la déplétion de Dock5 ou de Dock180 par ARNi inhibe l'étalement et la migration cellulaire²⁸⁵. Ainsi, plusieurs données expérimentales tendent de démontrer que Dock5 et Dock180 ont des fonctions redondantes. Finalement, le niveau d'ARNm de Dock5 est augmenté, mais pas celui de Dock180, lorsque la différenciation en ostéoclastes des cellules RAW264.7 est induite par RANKL, et la déplétion par ARNi de Dock5 est létale pour ces cellules²⁹¹.

5.5 Dock3/MOCA/PBP

Dock3 est exprimée spécifiquement dans le système nerveux central et a tout d'abord été identifié comme protéine pouvant interagir avec Preseniline, gène muté

dans plus de 50% des cas familiaux d'Alzheimer²⁹². Son activité est associée au développement de plusieurs maladies neurodégénératives et la souris mutante pour ce gène présente plusieurs défauts neuronaux^{264, 292-295}. Toutefois, les mécanismes moléculaires grâce auxquels Dock3 régule le développement et la survie neuronale ne sont pas compris. Dans des cellules en culture, Dock3 active Rac, augmente l'étalement et la migration cellulaire^{296,297}. De plus, il a été démontré qu'en activation Rac elle induit la migration de type mésenchymale et inhibe la migration amœboïde²⁹³.

5.6 Dock4

Dock4 fut tout d'abord rapportée comme gène muté dans différents types de cancer. Selon les données présentées dans cette publication, la protéine native Dock4 est une GEF pour la GTPase Rap1 alors que la protéine mutante retrouvée dans leurs échantillons de cellules tumorales est une GEF pour Rac²⁹⁸. Toutefois, d'autres groupes ont par la suite rapporté que la forme sauvage de Dock4 interagit avec Rac et l'active^{265, 299}. Une analyse détaillée de l'activité GEF de Dock4 contre Rap1 est toujours manquante. De plus, Dock4, RhoG et Elmo agissent de concert pour promouvoir la migration cellulaire²⁶⁵. Finalement, Dock4 est fortement exprimée dans le cerveau et sa surexpression avec Elmo dans des neurones de l'hippocampe augmente le nombre de dendrites et d'embranchement alors que la déplétion de Dock4 par ARNi diminue ces nombres²⁹⁹.

5.7 Dock6 et Dock8

Les protéines Dock6 et Dock8 font toutes les deux parties de la sous-famille C et très peu d'informations sur leurs fonctions biologiques ont été publiées. Dock6 est une GEF pour Rac1 et Cdc42 et sa surexpression dans une lignée de cellules de neuroblastomes induit l'activation de ces deux GTPases et la croissance de neurite alors que sa déplétion par ARNi inhibe ceci²⁶⁷.

Dock8 semble pouvoir lier Rac et Cdc42 toutefois aucune activité catalytique n'a été détectée²⁶⁸. De plus, des délétions de ce gène ont été associées aux cancers du poumon et à des individus souffrant de retards mentaux^{300,301}.

5.8 Dock7

Dock7 est fortement exprimée dans le cerveau en développement³⁰². Dans des neurones de l'hippocampe en culture de stade 1, Dock7 est localisée dans le corps cellulaire et plus fortement au cortex basal où la cellule est en contact avec la matrice extracellulaire³⁰². Étonnamment, dans ces cellules, Dock7 n'est pas localisée dans les lamellipodes³⁰². Au stade 2 et 3, elle est localisée dans l'axone en croissance et l'inhibition de son expression par ARNi bloque la formation d'axones alors que sa surexpression induit la formation de plusieurs axones³⁰². Ce groupe a démontré que Dock7 active Rac *in vitro* et *in vivo* et qu'elle régule la croissance axonale en induisant la phosphorylation de Stathmin, ce qui l'inactive et stabilise les microtubules localement³⁰². Il a aussi été démontré que dans les cellules de Schwann, le récepteur ErbB2 lie directement et phosphoryle Dock7³⁰³. Ainsi, une stimulation à la

Neureguline1 active ErbB2 qui phosphoryle et augmente l'activité GEF de Dock7 et cette dernière est nécessaire pour la migration de ces cellules³⁰³. Chez la souris, une mutation donnant lieu à la délétion de toute la région située en C terminal du DHR-1 incluant le domaine catalytique entraîne des défauts de distribution des mélanocytes folliculaires et de leurs fonctions³⁰⁴. Toutefois, aucun défaut neuronal n'a été observé chez cette souris et la souris *knock-out* classique sera nécessaire pour élucider le rôle de cette protéine dans le développement neuronal³⁰⁴.

5.9 Dock9/Zizimin1

Dock9 est le membre le mieux caractérisé de la quatrième sous-famille des protéines Dock. Elle active la GTPase Cdc42 et dimérise via son domaine catalytique^{269,305}. Il a été démontré que le domaine DHR1 et le domaine PH de Dock9 sont nécessaires pour la localiser correctement à la membrane³⁰⁶. Le domaine DHR1 semble aussi en partie pouvoir interagir avec le DHR2 et inhibe l'interaction avec Cdc42³⁰⁷. Toutefois, le mécanisme d'activation de cette GEF n'est pas connu. Dock9 est fortement exprimée dans le cerveau lors du développement et la surexpression ou l'abolition de son expression induisent respectivement la croissance ou la régression des neurites dans des neurones en culture³⁰⁸.

5.10 Dock10

Dock10 est une GEF pour Cdc42 et semble impliquée dans la transition mésenchymale-amoeboïde³⁰⁷. En effet, la surexpression de Dock10 dans une lignée cellulaire présentant normalement une morphologie allongée induit l'arrondissement des cellules et une morphologie associée aux cellules amoeboïdes. Inversement, l'abolition de son expression par ARNi induit une transition amoeboïde-

mésenchymale dans des cellules ayant normalement une morphologie très arrondie²⁷⁰. Ceci est attribuable à l'activation par Dock10 de Cdc42 qui active alors deux de ces effecteurs, N-WASP et Pak²⁷⁰. Finalement, l'expression de Dock10 est induite lorsqu'on traite des lymphocytes B avec de l'interleukine 4 ce qui suggère un rôle pour cette protéine dans la réponse immunitaire²⁷⁰.

5.11 Dock11/Zizimin2/ACG

Dock11 est elle aussi exprimée dans les lymphocyte et son domaine DHR2 est nécessaire et suffisant pour activer Cdc42^{271,309}. Toutefois, la protéine pleine longueur active plus fortement la GTPase et les auteurs de cette publication ont démontré que la région N-terminale de la protéine interagit avec la forme active de Cdc42³¹⁰. Ceci fournit possiblement un mécanisme de rétroaction positive en augmentant l'activité GEF de Dock11 et en protégeant la GTPase activée des GAPs³¹⁰.

6. Dock180, Elmo et CrkII: Partenaires dans le crime

Les études génétiques chez *C. elegans* ont démontré que Ced-5/Dock180 fait partie de la même voie de signalisation que Ced-12/Elmo et Ced-2/Crk. On retrouve trois protéines Elmo chez les mammifères, Elmo1 à 3, et une interaction directe entre Elmo1/Elmo2 et Dock1 à 4 a été rapportée^{286, 310}. Dock180 et Elmo sont nécessaires pour la phagocytose et la migration cellulaire tant chez le vers que chez les mammifères²⁶⁵. De plus, chez la drosophile dElmo est indispensable pour le développement musculaire à l'instar de MBC alors que dCrk n'est pas essentielle²⁸². Ainsi, la surexpression de MBC et dElmo ou de Rac actif donne lieu au même phénotype suggérant que MBC et dElmo coopèrent génétiquement pour activer Rac³¹¹. La protéine Elmo semble dépourvue d'activité catalytique et servirait plutôt de

molécule d'échafaudage pour localiser adéquatement les protéines Dock et favoriser la formation de complexes multimériques. Ainsi, plusieurs partenaires lui ont été rapportés tels que les récepteurs de phagocytose PSR1³¹¹ et Bai1²⁸¹, les protéines ERM²⁸⁴ et la GTPase RhoG³¹².

Dock180 interagit avec Elmo grâce à une interaction pour le moins atypique entre une hélice amphipatique du domaine PH d'Elmo et la région hélicale annexe au domaine SH3 de Dock180²⁰³. De plus, l'interaction entre le domaine SH3 d'Elmo et la région PXXP de Dock180 est dispensable pour la liaison entre les deux protéines, mais offre un effet de stabilisation³¹³. Il y a longtemps eu un dilemme quant à savoir si Dock180 est une GEF à part entière ou si Elmo est essentielle pour cette activité^{262, 313}. On sait maintenant que Dock180 seule est suffisante pour activer Rac et la présence de Elmo n'affecte pas le niveau d'activation de Rac²⁶³. Toutefois, des études fonctionnelles ont démontré que l'expression de Dock180 seule n'induit pas de remodelage du cytosquelette et la co-expression d'Elmo est nécessaire^{286,313}. Ainsi, ces résultats soulignent qu'il existe une dichotomie entre l'état d'activation de Rac et son couplage avec ses effecteurs.

L'autre partenaire principal de Dock180 est la protéine CrkII. Elle semble aussi dépourvue d'activité catalytique et remplit le rôle de relais moléculaire entre Dock180 et différents récepteurs de la matrice extracellulaire^{261, 313, 314}. Les intégrines forment une large famille de récepteurs de la matrice extracellulaire. Chaque intégrine est composée de deux sous-unités: α et β , et ces dernières s'associent entre elles pour former jusqu'à 24 intégrines différentes³¹⁵. Chaque intégrine est en mesure de lier un ou plusieurs ligands de la matrice extracellulaire et ont des spécificités différentes bien qu'elles se chevauchent³¹⁶. Bien qu'ils existent des différences entre les voies de

signalisation qu'elles activent, elles partagent toutes le même rôle cellulaire principal. C'est-à-dire qu'elles attachent la cellule à la matrice extracellulaire, promeuvent la survie cellulaire et assurent un contrôle positionnel à l'action des récepteurs tyrosine kinase³¹⁶. Grâce à différentes molécules adaptatrices comme Grb2 et Cas, elles activent plusieurs voies de signalisation telles que les voies MAP kinases et AKT^{316,317}. La plupart des intégrines activent la kinase FAK, qui à son tour active Src qui phosphoryle p130Cas et favorise l'interaction entre cette dernière et CrkII³¹⁶⁻³¹⁸. Il a été démontré que cette voie de signalisation favorise le recrutement de Dock180 à la membrane et permet d'activer Rac localement^{316,319,320}. En effet, il a été démontré que l'engagement des intégrines favorise l'interaction entre CrkII et Dock180 et induit la phosphorylation de cette dernière³¹⁴. De plus, outre la stimulation des intégrines par la fibronectine, la surexpression des formes oncogénique de Crk et de Src induit aussi la phosphorylation de Dock180³¹⁴. Ainsi, CrkII semble lier la régulation des protéines Dock à l'engagement des intégrines de façon à activer Rac adéquatement dans la cellule.

Hypothèses et objectifs

Projet #1 : Étude protéomique des partenaires de la GTPase Rac1

Vu l'importance des RhoGTPases dans le remodelage du cytosquelette d'actine, leur découverte au début des années 1990 fut suivie par une période d'intenses recherches pour découvrir les effecteurs en aval de ces protéines médiant leurs effets sur le cytosquelette. Ainsi, une large panoplie d'effecteurs ont été découverts pour Rac et ce grâce à des techniques telles que les cribles double hybride chez la levure, les *GST pull-downs* et la purification biochimique (**figure 6, p.41**). Ces systèmes artificiels se sont avérés très efficaces pour identifier les partenaires principaux des différentes GTPases. Toutefois, ces systèmes dépendent largement de l'activation artificielle de Rac et ne permettent pas d'évaluer la signalisation de Rac lorsqu'elle est activée par une GEF. Ainsi, une question majeure dans la biologie des GTPases est de comprendre comment une GTPase sélectionne ses effecteurs suite à son activation par une GEF donnée. De plus, ces méthodes sont limitantes quant à leur limite de détection et ne permettent pas de détecter des interactions de plus faible affinité ou plus transitoires. **Nous émettons donc l'hypothèse que certains partenaires de Rac (effecteurs, régulateurs, molécules d'échafaudage) n'ont pas été découverts et nous désirons mettre à profit la protéomique pour les identifier. Ainsi, nous désirons mettre au point une méthode de purification rapide afin de maintenir les complexes protéiques transitoires intacts, et qui nous permettra de purifier Rac à partir de cellules. Les protéines ainsi purifiées seront ensuite identifiées par spectrométrie de masse pour identifier de nouveaux partenaires de cette GTPase. Finalement, les candidats seront confirmés biochimiquement et leur implication dans la signalisation de Rac sera étudiée grâce à des essais fonctionnels tels que les essais d'étalement et de migration. Une étude protéomique non-biaisée des partenaires de Rac n'a jamais été rapportée dans la littérature à notre connaissance et nous croyons que cette approche nous permettra de mieux comprendre les événements moléculaires menant aux effets biologiques médiés par Rac.**

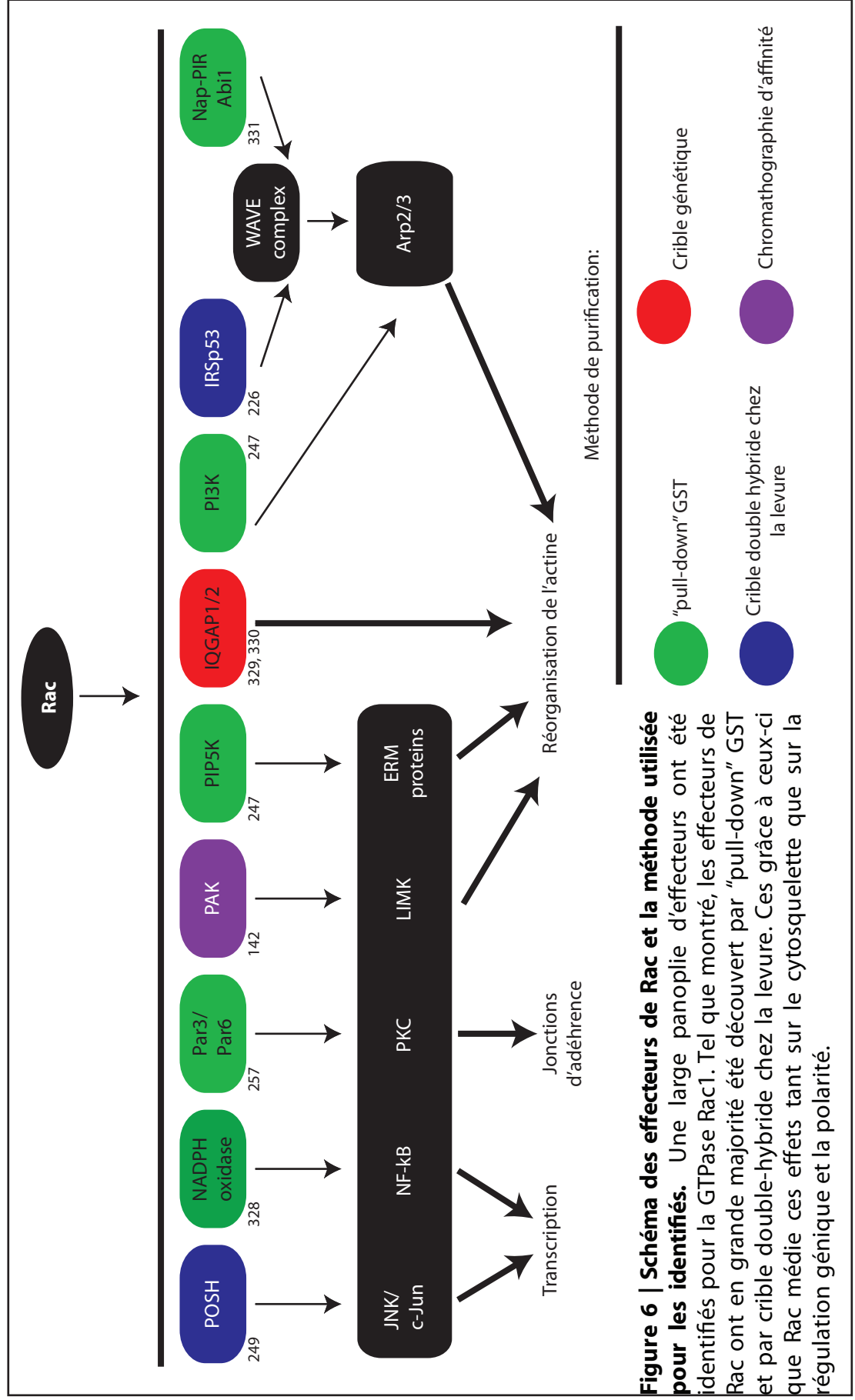


Figure 6 | Schéma des effecteurs de Rac et la méthode utilisée pour les identifiés. Une large panoplie d'effecteurs ont été identifiés pour la GTPase Rac1. Tel que montré, les effecteurs de Rac ont en grande majorité été découverts par "pull-down" GST et par crible double-hybride chez la levure. Ces grâce à ceux-ci que Rac médie ces effets tant sur le cytosquelette que sur la régulation génique et la polarité.

Projet #2: Étude de la phosphorylation de Dock5 induite par l'engagement des intégrines

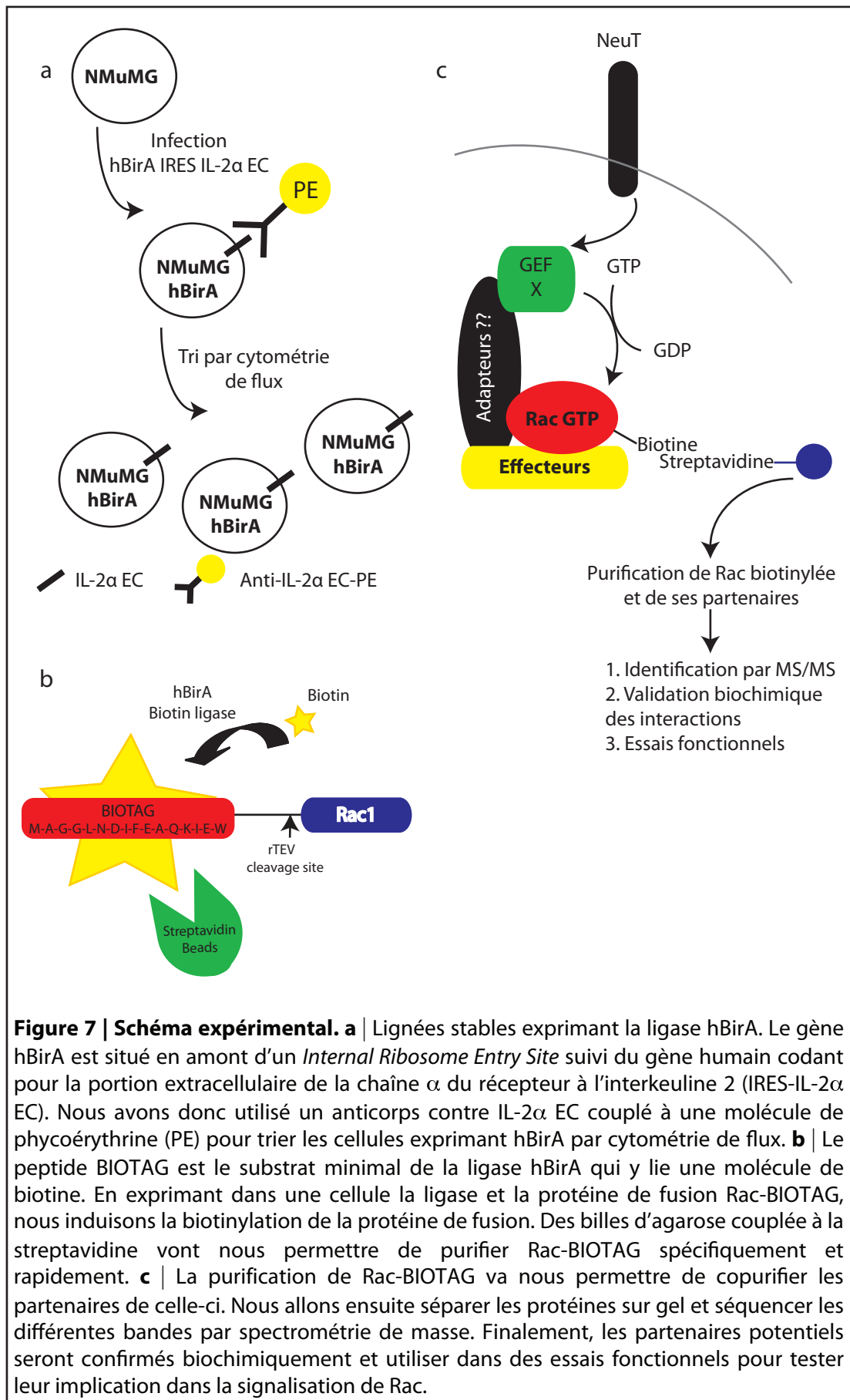
Bien que la fonction biologique des petites GTPases soit de mieux en mieux connue, les mécanismes de régulation permettant de moduler l'activité de la multitude de GEFs, GAPs et GDIs sont encore mal compris. La famille des protéines Dock ne fait pas exception et il existe seulement quelques évidences quant à leurs mécanismes de régulation. En effet, il a été rapporté que la phosphorylation de Dock7 par le récepteur ErbB2 sur la tyrosine 1118 augmente son activité GEF pour Rac1 et Cdc42 et ceci est nécessaire pour la migration des cellules de Schwann³²⁴. De plus, il fut rapporté en 1998 par le laboratoire du Dr. Matsuda que Dock180 est phosphorylée suite à une stimulation à la fibronectine ou à l'expression des formes oncogénique de CrkII ou Src³⁰³. À ce moment, le rôle de Dock80 n'était pas connu et l'effet de cet évènement sur son activité n'a pas été étudié. **Ainsi, nous croyons que la phosphorylation de Dock180 en aval des intégrines peut moduler son activité et donc réguler la migration cellulaire. Nous proposons donc d'étudier cet évènement de façon à comprendre les processus de migration cellulaire et d'invasion. Dans un premier temps, nous désirons identifier les résidus phosphorylés suite à une stimulation à la fibronectine par spectrométrie de masse. Nous allons ensuite criblé une banque de kinases en collaboration avec le laboratoire du Dr. Sreaton pour trouver des kinases candidates étant responsables de la phosphorylation de Dock180 en aval des intégrines. Puis, nous voulons étudier l'impact fonctionnel de la phosphorylation sur l'activité GEF de Dock180, son interaction avec différents partenaires, sa stabilité et sa localisation.**

Résultats

Projet #1 : Étude protéomique des partenaires de la GTPase

Rac1 : Rationalisation

Considérant la nature transitoire des complexes formés entre une GTPase activée et ses effecteurs, les méthodes couramment employées pour purifier des protéines pour la spectrométrie de masse telles que le tap-tag ne peuvent pas être employées. En effet, les niveaux de Rac•GTP diminuent rapidement une fois les cellules lysées et un protocole sur plusieurs heures voire quelques jours n'est pas adapté à la biologie de ces protéines. Ainsi, nous avons décidé de mettre au point une méthode de purification qui se base sur la très haute affinité entre la biotine et la streptavidine. Pour ce faire, nous allons utiliser un peptide développé par le groupe de Peter Schatz. Ce peptide, nommé BIOTAG, comprend 14 acides aminés et est le substrat minimal de la biotine ligase bactérienne BirA³¹⁴. Ainsi, la coexpression de BirA et d'une protéine fusionnée au BIOTAG induit la biotinylation de cette protéine dans les cellules³²⁵. Nous allons dans un premier temps construire des protéines de fusion Rac1 WT, V12—BIOTAG. Puis, nous allons établir des lignées stables exprimant chacune de ces protéines avec le gène humanisé de la ligase bactérienne BirA³²⁶. Finalement, nous allons utiliser des billes d'agarose opsonisées de molécules de streptavidine pour purifier Rac-BIOTAG et ses partenaires des cellules (**figure 7b, p.44**).



Objectif #1.1: Établissement des lignées cellulaires et optimisation de la purification

Afin de purifier Rac, nous allons utiliser deux lignées cellulaires : les cellules NMuMG NeuT qui sont des cellules épithéliales mammaires normales de souris exprimant la forme constitutivement active du récepteur ErbB2, Neu-T, qui ont été établies dans le laboratoire du Dr. Peter Siegel³²⁷, et la lignée de fibroblastes murins NIH 3T3. Le Canada prévoit en 2009 environ 22 000 nouveaux cas de cancer du sein chez la femme, ce qui porte ce type de cancer au premier rang des maladies néoplasiques chez la femme³²⁸. Parmi les gènes impliqués dans cette maladie, le récepteur ErbB2 (aussi connu sous EGFR2, Her2 ou Neu) est amplifié ou muté dans environ 30% des cancers du sein¹. De plus, la surexpression de ce gène dans les cellules épithéliales mammaires de souris induit la formation de tumeurs et de métastases³²⁹. Ce récepteur fait partie d'une famille de récepteurs tyrosine kinase comprenant quatre membres: EGFR1-4. Ils peuvent homodimériser ou hétérodimériser et leur transphosphorylation active leur activité kinase et permet de recruter différentes protéines adaptatrices possédant des domaines SH2. L'activation des EGFR induit l'activation de Rac et la formation de lamellipodes et cet effet sur le cytosquelette est inhibé lorsque la forme dominante négative de Rac (Rac N17) est exprimée^{198, 330}. De plus, l'inhibition de Rac ou l'expression de Rac N17 bloque l'invasion, la migration et l'effet mitogénique de ErbB2³³¹⁻³³³. Nous allons donc utiliser la lignée NMuMG Neu-T pour tenter de mieux comprendre les événements moléculaires menant à l'activation de Rac en aval de ce récepteur et les effecteurs de Rac impliqués dans l'invasion et la migration induite par l'activation de ErbB2. Nous allons utiliser les NIH 3T3 pour étudier les partenaires de Rac dans un contexte plus physiologique.

La première étape consiste donc à établir des lignées cellulaires stables exprimant hBirA. Dans le plasmide rétroviral utilisé, le gène hBirA est situé en amont d'un *internal ribosomal entry site* (IRES) suivi du gène humain de la portion extracellulaire de la chaîne α du récepteur à l'interleukine 2 (hIL-2R α EC). Nous avons donc utilisé le hIL-2R α EC comme marqueur pour trier les cellules par cytométrie de flux en utilisant un anticorps reconnaissant le domaine extracellulaire de ce récepteur couplé au fluorochrome phycoéritrine (PE) (**figure 7a, p.44**). Nous avons procédé à un premier tri en cytométrie quelques jours après l'infection pour obtenir une population de cellules enrichies pour celles ayant incorporé le rétrovirus (**figure 8a, p.47**).

Ensuite, nous avons transfecté dans ces cellules le plasmide contenant les gènes Rac-BIOTAG WT, V12 et une cassette de résistance à la Zéocine. Nous avons testé plus d'une centaine de clones pour chacune de ces lignées et avons choisi le clone pour chaque lignée dont l'expression de la protéine de fusion était la plus intense (**figure 8b, p.47**). Comme le montre la **figure 8b p.47**, les niveaux d'expression des protéines ectopiques sont beaucoup moins intenses que ceux de Rac endogène. Puisque nous désirons étudier la signalisation de Rac dans un contexte aussi physiologique que possible et considérant les effets cytotoxiques du mutant dominant actif de Rac (V12), nous avons jugé ces niveaux suffisants. Suite au processus de sélection et d'amplification, nous avons retrié les cellules par cytométrie pour nous assurer de maintenir une population presque pure de cellules exprimant la biotine ligase bactérienne (**figure 8a, p.47**). Lors du deuxième tri, les cellules étaient positives pour hIL-2R α EC à plus de 97% pour les deux lignées cellulaires utilisées alors que les cellules contrôle n'expriment pas ce récepteur et étaient négatives à plus de 98%. Nous avons aussi confirmé l'expression de hBirA par immunobuvardage de type Western (**figure 9a-panneau du bas, p.48**).

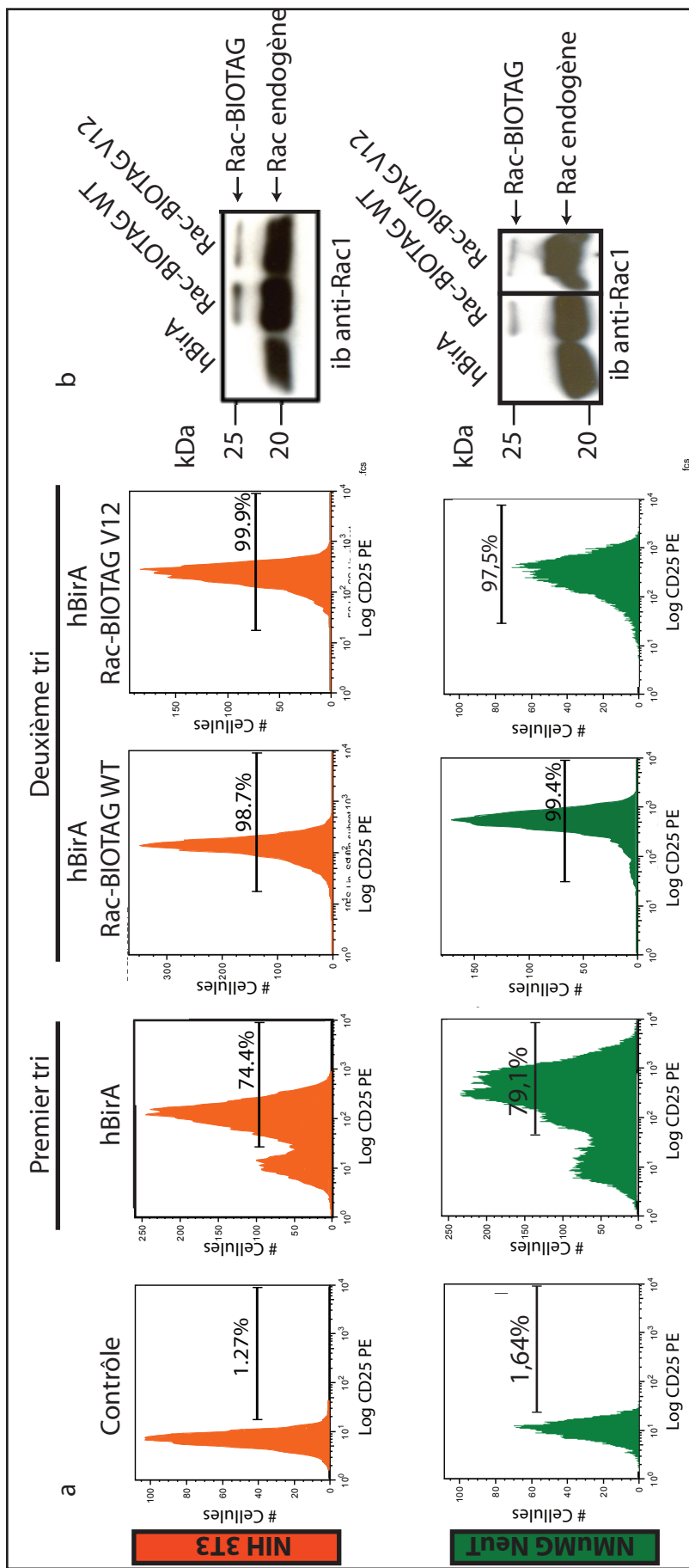


Figure 8 | Établissement des lignées stables exprimant hBirA et Rac-BIOTAG WT/V12. a Résultats des analyses en cytométrie de flux. Les cellules infectées avec le rétrovirus pOZ hBirA IRES hIL-2R α ont été triées par cytométrie de flux pour l'expression de hIL-2R α à l'aide d'un anticorps contre ce récepteur couplé à la phycoérythrine (PE). Les deux cycles de tris nous ont permis d'obtenir des populations pures à plus de 97 %. **b** Immunobuvardage de type Western des clones positifs exprimant les protéines de fusion Rac-BIOTAG WT/V12. Suite à la transfection, les cellules ont été sélectionnées pour leur résistance à la Zéocine puis séparées en clones. Les clones représentés sont ceux qui ont maintenu la plus haute expression de la protéine de fusion et seront ceux utilisés dans les expériences ultérieures.

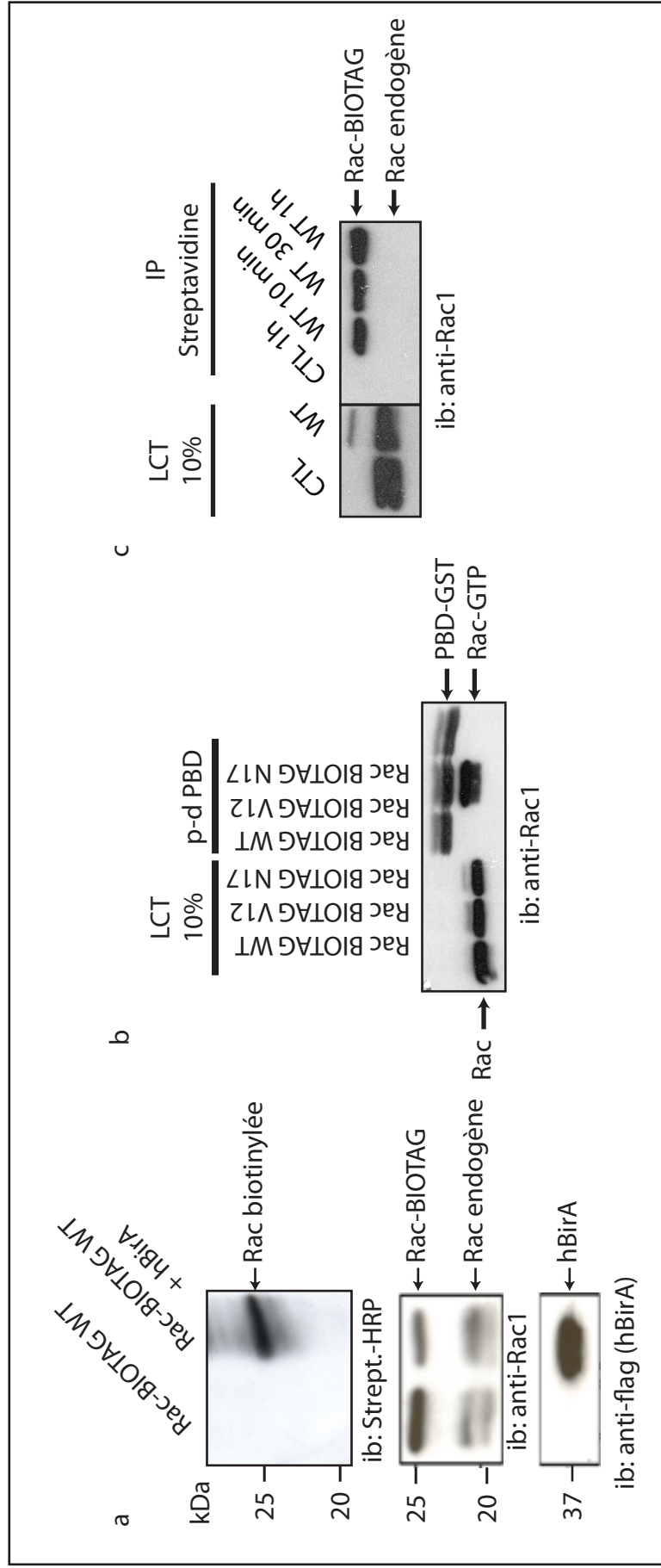


Figure 9 | Caractérisation des constructions Rac-BIOTAG a | Preuve de principe que la coexpression de Rac-BIOTAG avec la ligase hBirA conduit bien à la biotinylation du BIOTAG dans les cellules. **b** | Pak PBD *pull-down* (p-d PBD) pour tester l'activité des différentes constructions Rac-BIOTAG. Tel qu'attendu, la forme V12 interagit fortement avec le domaine PBD de Pak alors que les formes N17 et WT interagissent peu ou pas avec le PBD en l'absence de stimulation. **c** | Purification test pour optimiser l'efficacité de purification de Rac-BIOTAG à l'aide de billes streptavidine à différents temps d'incubation. Une incubation de 10 minutes nous donne le meilleur rendement quantité de protéines: temps d'incubation et sera utilisé dans les expériences ultérieures. LCT est l'abréviation de lysat cellulaire total, IB est l'abréviation d'immunobuvardage et IP est l'abréviation d'immunoprécipitation.

Afin de vérifier que la protéine de fusion Rac-BIOTAG est bien biotinylée dans nos cellules, nous avons testé avec un anticorps Streptavidine-HRP des lysats cellulaires de cellules exprimant Rac-BIOTAG avec et sans la ligase (**figure 9a, p.48**). Tel que le montre la **figure 9a p.48**, le BIOTAG est efficacement biotinylé dans notre système. Afin de nous assurer que le BIOTAG n'interfère pas avec l'activité normale de Rac, nous avons exprimé la forme sauvage (WT), dominante active (V12) et dominante négative (N17) dans des 293T et nous avons utilisé le domaine PBD de Pak pour précipité la population de Rac•GTP des lysats cellulaires (**figure 9b, p.48**). Le domaine PBD reconnaît exclusivement la forme active de Rac et de Cdc42 et permet de quantifier rapidement l'activation de ces protéines à partir de lysats cellulaires. Tel qu'attendu, le mutant Rac V12 lie fortement le domaine PBD et a bien été précipité avec celui-ci alors que les formes WT et N17 n'ont pas été précipitées. Puisqu'environ 80% des molécules de Rac sont inactives en cellules en l'absence de stimuli, il est normal qu'on détecte peu ou pas de Rac WT lié au GTP. Nous avons optimisé le temps d'incubation des lysats cellulaires avec les billes de streptavidine de façon à purifier un maximum de matériel en l'espace du moins de temps possible et ainsi préserver les complexes protéiques intacts. Comme le montre la **figure 9c p.48**, une incubation de 10 minutes est suffisante pour purifier une grande quantité de matériel. Nous allons donc utiliser ces conditions dans nos prochaines expériences. En conclusion, nous avons réussi à établir des lignées stables exprimant hBirA et les différents mutants de Rac-BIOTAG. De plus, la ligase biotinyle bien le peptide BIOTAG dans ces cellules et une purification de 10 minutes suffit pour purifier Rac.

Objectif #1.2: Précipitation de Rac-BIOTAG et analyse des partenaires par spectrométrie de masse

La deuxième étape consiste à purifier de très grande quantité de Rac afin d'identifier les protéines endogènes auxquelles elle est liée (**figure 7c, p.44**). Pour ce faire, nous avons utilisé 20 plaques de 15cm confluentes pour chaque condition que nous avons lysées dans la chambre froide. Nous avons précipité Rac-BIOTAG à l'aide de billes de Streptavidine à haute capacité, incubé le tout 10 minutes, lavé et chargé sur gel SDS-PAGE. Finalement, les gels ont été colorés au nitrate d'argent pour visualiser les protéines et chaque puits a été découpé en 15 à 21 morceaux dans la chambre blanche (**figure 10b, p.51**). Le service de spectrométrie de masse de l'IRCM s'est ensuite chargé de digérer les protéines à la trypsine. L'analyse des peptides a été faite en partie au plateau de protéomique de l'IRCM et en partie par le laboratoire du Dr. Thibault à l'IRIC dû à des problèmes techniques à l'IRCM. Comme le montrent les **figures 10a et 10b p.51**, l'élution des billes contient énormément de Rac-BIOTAG et la purification s'est bien déroulée dans les deux lignées cellulaires. Afin d'analyser les résultats de spectrométrie de masse (**tableau I et II, p.52 et 56**), nous avons tout d'abord soustrait les protéines présentes dans les échantillons contrôle. Afin de maximiser nos chances d'obtenir des candidats pouvant interagir avec Rac, nous avons exclu toutes les protéines présentant un pointage MASCOT inférieur à 30, seuil sous lequel nous avons jugé que l'attribution des peptides à une protéine n'est plus suffisamment significative pour en tenir compte.

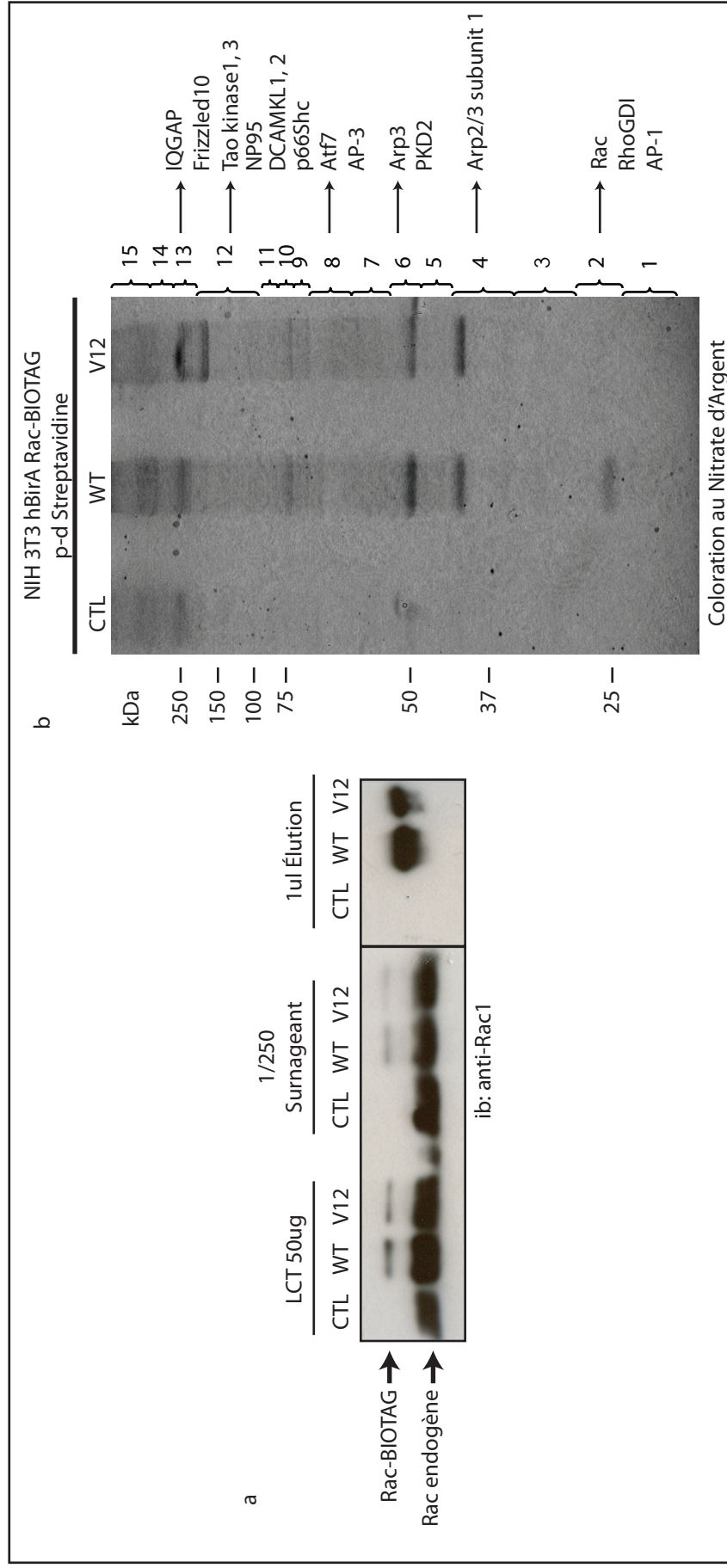


Figure 10 | Pull-down Streptavidine de Rac-BIOTAG WT ou V12 dans les NIH 3T3 hBirA a | Immunobuvardage des échantillons contrôlés prélevés durant l'expérience. Les protéines Rac-BIOTAG WT et V12 sont bien exprimées au départ et l'éluion finale est hautement enrichie. **b** | La totalité des protéines purifiées par pull-down streptavidine a été chargée sur un gel SDS-PAGE puis colorée au nitrate d'Argent. À droite sont représentées les bandes coupées pour la spectrométrie de masse et les protéines spécifiques majeures détectées dans les bandes correspondantes. La présence de Rac et certains de ses effecteurs connus tels que RhoGDI et IQGAP confirme que nous avons copurifié avec succès Rac en complexe avec ses partenaires. CTL est l'abréviation de contrôle, WT et V12 désignent respectivement la forme sauvage et constitutivement active de Rac.

Tableau I. Résultats de spectrométrie de masse provenant du *pull-down* Streptavidine des NIH 3T3 hBirA Rac-BIOTAG WT et V12.

Les résultats sont présentés selon le contenu de chaque bande après la soustraction des protéines présentes dans les échantillons contrôles. Pour chaque bande, les peptides sont en ordre décroissant d'abondance. Les protéines sous-lignées en vert sont celles représentant les partenaires potentiels de Rac les plus intéressants selon les résultats obtenus et la littérature. Ces dernières ont été sélectionnées selon la concordance de leur poids moléculaire avec l'endroit dans le gel où la bande a été coupée, leur pointage MASCOT, le nombre de peptides identifiés, leur localisation cellulaire et l'absence d'interaction connue avec Rac. Les protéines sous-lignées en jaune sont celles dont l'interaction avec Rac est déjà connue ou Rac elle-même. Les lettres et numéros en bleus sont les numéros d'accèsion des protéines correspondantes.

Nom : Nom de la protéine; Point. : Pointage MASCOT; Masse : Poids moléculaire théorique de la protéine identifiée; Peptides : Nombre de peptides appartenant à la protéine identifié dans la bande correspondante.

Nom	Point.	Masse	Peptides
Bande V12-2			
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	224	23.3	3
Rho, GDP dissociation inhibitor 2	202	22.8	7
Rac3	76	21.4	2
unnamed protein product gil74137611	61		4
high mobility group AT-hook 2	45	11.8	1
CXXC finger 4/Idax	44	21.0	3
chromatin nonhistone high mobility group protein	44	10.6	1
lft80 protein	44	68.2	2
adaptor protein complex AP-1, beta 1 subunit, isoform CRA_a	39	97.5	2
LRR1Q1	32	37.9	2

Bande V12-4			
poly(rC) binding protein 1	80	37.4	3
guanine nucleotide binding protein, alpha 12/Galpha12	67	44.1	1
ELAV-like protein 1 (Hu-antigen R)	64	36.0	1
Arp2/3 subunit 1	58	41.0	1
Psip1/ledgf/p52/p75	29	20.7	2
fos-related antigen-1	29	29.8	2
Bande V12-5			
CREB	60	33.7	1
CKII	53	45.1	1
Adrm1 (Arm1)	50	42.0	1
Smarcal1	39	100.8	1
Adck1	30	59.7	1
potassium channel tetramerisation domain containing 3	29	88.8	2
Bande V12-6			
Arp3	94	47.3	2
NfiC1B	61	47.7	2
Rnf169	54	59.5	1
down-regulated by Ctnnb1	42	41.7	1
centrosomal protein 55, isoform CRA_b	31	58.2	3
unnamed protein product gij 26347405	29	57.8	2
Bande V12-8			
CP2/LSF/UBP	164	57.0	3
CP2a	64	56.1	2
Atf7	55	50.4	1
AP-3 subunit beta	44	119.1	1
Chmp5	41	24.6	1
KIAA1009 protein gij 147905039	38	160.8	3
recA/RAD51	34	31.4	1
CIP29	34	22.0	2
Gemin5	33	166.5	1
Ccdc65	31	58.1	3
Fnip2	30	132.0	3

Bande V12-10			
Rac GAP1	56	70	2
Moesin	41	66	2
Bande V12-12			
Tao1	203	116.0	4
NP95	184	88.3	5
Tao3	178	105.3	2
DNA ligase 3	176	112.9	8
Nf-KB2	53	96.8	1
Tnpo1 protein	39	70.2	1
Ubap2/Nice-4	33	112.4	1
Nebulin	30	771.9	3
Zfp518b	30	107.8	2
DCAMKL1	46	84.1	1
Bande V12-13			
IQGAP1	7649	189	624
IQAGP3	2477	185	110
IQGAP2	318	166	52
Frizzled10	34	65	9
Péricentrine	34	331	8
SMC1	31	143	18
BAIAP2	30	57	10
Bande WT-2			
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	565	23.3	3
Rho GDP-dissociation inhibitor 2	230	22.7	4
Makorin-3	37	59.4	1
Bande WT-4			
DCAMKL1	40	84.1	1
Makorin-3	38	59.4	1
Bande WT-5			
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	44	23.3	5
Smarcal1	43	100.8	1
Bande WT-6			

MBT-1	40	99.1	1
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	40	23.3	2
Polycystin-2	40	109.0	1
Bande WT-8			
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	49	23.3	1
Serum deprivation-response protein	41	46.6	1
Bande WT-10			
Septin-9	48	65.5	2
cAMP-dependent protein kinase inhibitor alpha	40	7.8	1
RANGAP 4	38	78.2	1
DCAMKL1	84.1	37	1
Bande WT-12			
TAO1	303	116.0	2
TAO3	202	105.3	1
P66 SHC1	59	62.6	1
NP95	52	88.2	2
DCAMKL1	49	84.1	2
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	42	23.2	1
Rab3 GAP	39	154.6	1
Bande WT-13			
DNA topoisomérase 2-alpha	101	172.8	2
Rho GDP-dissociation inhibitor1	42	23.3	1
P66 Shc1	42	62.6	1

Tableau II. Résultats de spectrométrie de masse provenant du *pull-down* Streptavidine des NMuMG NeuT hBirA Rac-BIOTAG WT et V12.

Les résultats sont présentés selon le contenu de chaque bande après la soustraction des protéines présentes dans les échantillons contrôles. Pour chaque bande, les peptides sont en ordre décroissant d'abondance. Les protéines sous-lignées en vert sont celles représentant les partenaires potentiels de Rac les plus intéressants selon les résultats obtenus et la littérature. Ces dernières ont été sélectionnées selon la concordance de leur poids moléculaire avec l'endroit dans le gel où la bande a été coupée, leur pointage MASCOT, le nombre de peptides identifiés, leur localisation cellulaire et l'absence d'interaction connue avec Rac.

Nom : Nom de la protéine; Point. : Pointage MASCOT; Masse : Poids moléculaire théorique de la protéine identifiée; Peptides : Nombre de peptides appartenant à la protéine identifié dans la bande correspondante.

Nom	Point.	Masse	Peptides
Bande WT-7			
LIM and SH3 protein 1	134	30	4
MCF2-transforming factor	33	107	3
Neurobeachin like-1	29	308	13
Sac domain-containing inositol phosphatase 3	28	103	1
Bande V12-13			
T complex protein 1	67	57	2
Ulip-2	39	621	1
AKAP6	34	25	19
Bande V12-20			
Aucun peptide spécifique			

Tout d'abord, plusieurs partenaires contenus de Rac1 ont été identifiés dans les échantillons des NIH 3T3, ce qui confirme que nous avons précipité avec succès certains partenaires de Rac1. Ainsi, nous avons identifié deux isoformes de RhoGDI, deux sous-unités du complexe Arp2/3, RacGAP1 ainsi que deux effecteurs : IQGAP et BAIAP2 (**tableau I, p. 52**). De façon surprenante, près de 50% des protéines identifiées sont des protéines nucléaires telles que la DNA topoisomérase 2 α et les facteurs de transcription Idax et NfiC1B. Afin de simplifier la compréhension des résultats, nous avons représenté dans les **figures 10b et 11b p.51 et 58**, les protéines principales pouvant être attribuées à chaque bande séquencée. Celles-ci ont été sélectionnées selon la concordance de leur poids moléculaire avec l'emplacement de la bande dans le gel, leur pointage MASCOT et leur localisation cellulaire.

Objectif #1.3: Confirmation des partenaires

Afin de confirmer les résultats obtenus en spectrométrie de masse, nous avons exprimé dans des cellules ou traduit *in vitro* différents partenaires potentiels de Rac et nous avons testé leur interaction par *pull-down* en utilisant Rac1-GST déplétée de nucléotides (Libre) ou chargée *in vitro* des nucléotides GDP ou GTP γ S, un analogue du GTP non-hydrolysable (**Figure 12a et b, p.59**). Parmi les partenaires testés (Lasp1, Fzd10, Tao1, Tao3 et PKD2), Lasp1 est le seul qui semble lier robustement Rac et son affinité semble être plus forte pour les formes GDP et GTP γ S. Afin de confirmer l'interaction entre Rac1 et Lasp1, nous avons exprimé les deux protéines dans des cellules 293T et les avons toutes les deux immunoprécipitées. Malheureusement, ni Rac ni Lasp1 ne coprécipite avec l'autre et ce peu importe la forme de Rac exprimées. Comme contrôle positif, nous avons utilisé la protéine Pak qui lie avec une haute

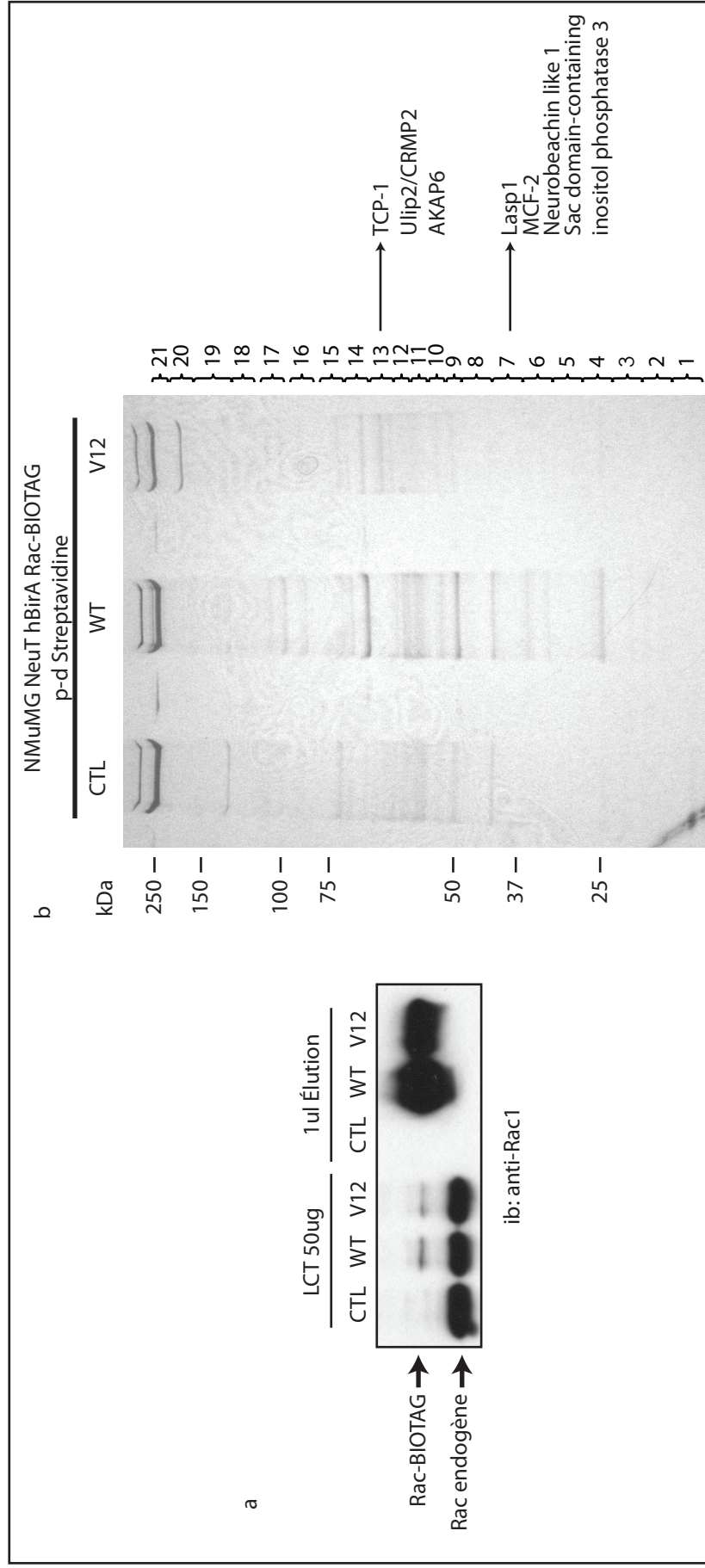
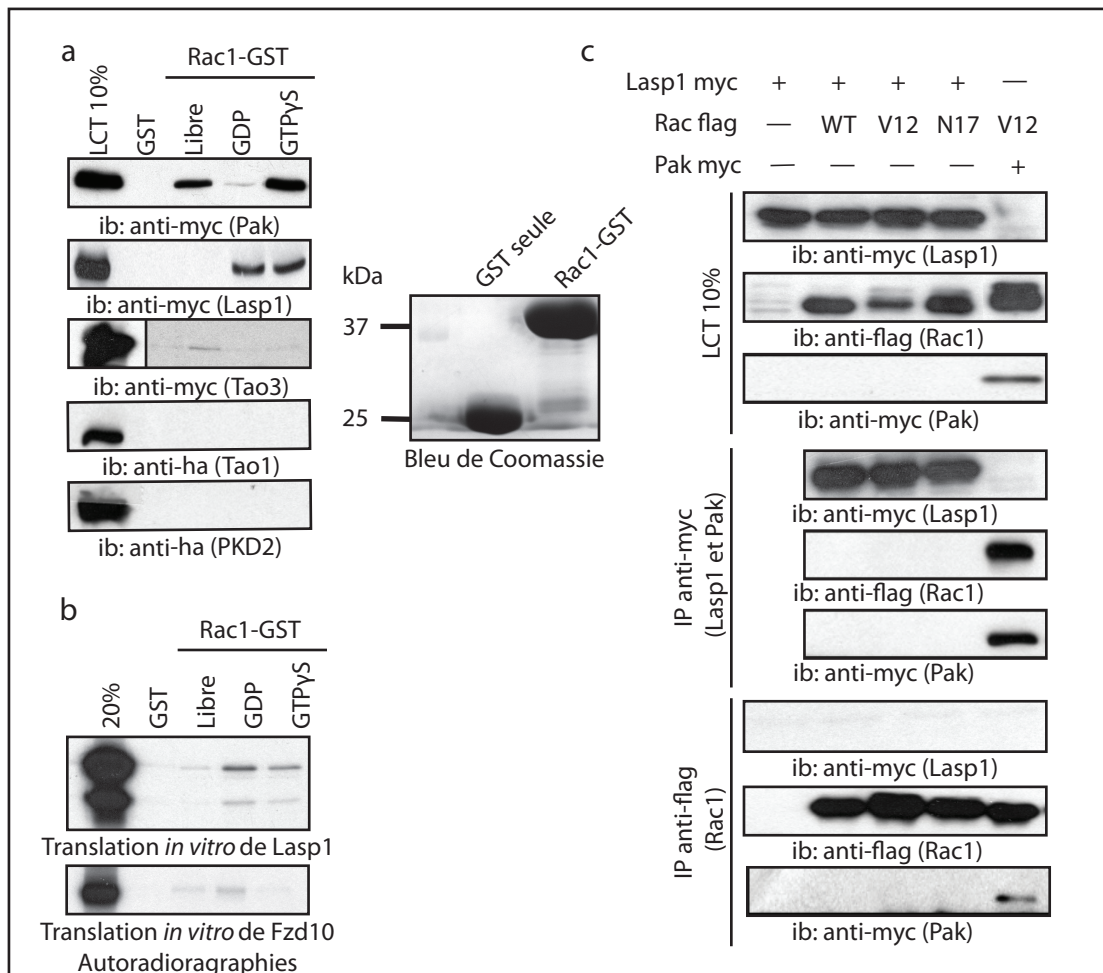


Figure 11 | Pull-down Streptavidine de Rac-BIOTAG WT ou V12 dans les NMuMG NeuT hBirA a | Immunobuvardage des échantillons contrôlés prélevés durant l'expérience. Les protéines Rac-BIOTAG WT et V12 sont bien exprimées au départ et l'éluion finale est hautement enrichie. b | La totalité des protéines purifiées par pull-down streptavidine a été chargée sur un gel SDS-PAGE puis colorée au nitrate d'Argent. À droite sont représentées les bandes coupées pour la spectrométrie de masse et les protéines spécifiques majeures détectées dans les bandes correspondantes. La présence de Rac et certains de ses effecteurs connus tels que Dbl confirme que nous avons copurifié avec succès Rac en complexe avec ses partenaires.



affinité Rac V12. Nous avons testé plusieurs conditions d'immunoprécipitation afin de confirmer l'interaction entre ces deux protéines, mais rien n'y a fait. Nous en avons donc conclu que, malgré qu'elles peuvent interagir directement en *pull-down*, ces deux protéines ne forment pas de complexe détectable dans les conditions utilisées.

Afin de répéter l'expérience en utilisant plus de protéines et identifier de nouveaux candidats, nous avons décongelé les lignées stables exprimant les différentes constructions de Rac1. Malheureusement, l'expression de Rac a diminué radicalement au fil des passages ce qui nous a poussés à nous tourner vers une nouvelle méthode pour établir de nouveau les lignées. Nous avons alors décidé d'utiliser un plasmide rétroviral contenant le gène de la GFP suivi d'un IRES puis du gène de Rac1 WT ou V12. L'avantage d'une telle construction est que les cellules infectées peuvent alors être triées par cytométrie plutôt que par sélection avec un antibiotique. Le rétrovirus s'est toutefois avéré très décevant puisque, malgré une expression massive de GFP, les cellules triées par cytométrie n'exprimaient pas de façon détectable les différentes constructions de Rac et ce, dans les deux lignées cellulaires utilisées. Différentes avenues peuvent être utilisées pour réaliser cette expérience de nouveau telle que l'utilisation d'un promoteur inductible pour contrôler l'expression de Rac et ainsi contourner le problème de la cytotoxicité.

En conclusion, la méthode de purification mise au point fonctionne bien et nous permet de purifier de Rac et ses partenaires en quelques minutes. Toutefois, l'analyse des protéines coprécipitées avec Rac par spectrométrie de masse ne nous a pas permis d'identifier des partenaires dont l'interaction avec Rac a pu être confirmée. Finalement, l'expression des protéines de fusion a rapidement diminué au fil des

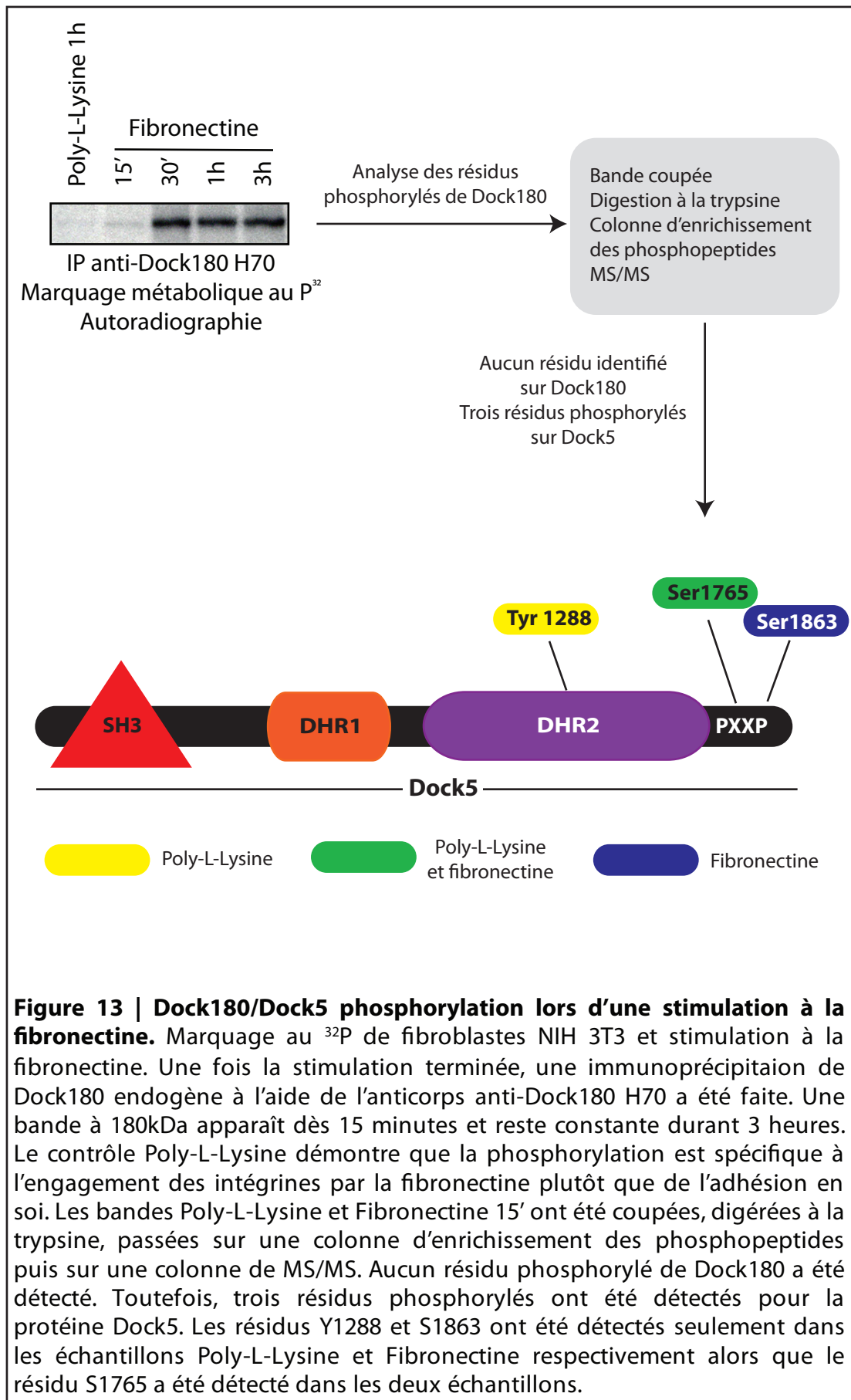
passages et ceci est probablement dû à la cytotoxicité entraînée par l'expression de Rac. Ainsi, la stratégie afin d'exprimer Rac de façon ectopique devra être revue pour contourner ce problème.

2. Projet #2: Étude de la phosphorylation de Dock5 en aval des intégrines: Rationalisation

Tel que mentionné précédemment, il a été rapporté que Dock180 est phosphorylée suite à une stimulation des intégrines ou lors de la surexpression des formes oncogéniques de CrkII et Src³³⁴. Ainsi, nous désirons étudier l'impact fonctionnel de la phosphorylation de Dock180 lors de l'engagement des intégrines. Plus spécifiquement, nous croyons que cet événement peut moduler son activité et serait donc impliqué dans la régulation de la migration cellulaire. Nous allons donc dans un premier temps répéter les résultats publiés puis tenter de déterminer les résidus qui sont phosphorylés en réponse aux intégrines. Finalement, nous allons criblé une banque de kinases avec l'objectif de trouver celle(s) responsable(s) de la phosphorylation de Dock180 en aval des intégrines et nous allons étudier l'impact sur l'interaction entre Dock180 et différents partenaires, sur son activité GEF, sa stabilité et sa localisation.

Objectif #2.1: Identification des résidus phosphorylés

La première étape de ce projet consiste à répéter les résultats publiés par le groupe de Matsuda. Ainsi, nous avons marqué métaboliquement des NIH 3T3 au ³²P et les avons stimulé à la fibronectine ou à la poly-L-lysine pendant différents temps (**figure 13, p.62**). Finalement, nous avons immunoprécipité Dock180 à partir des



lysats cellulaires. La poly-L-lysine est utilisée comme contrôle négatif, puisque ce substrat n'engage pas les intégrines et les cellules y adhèrent par interaction électrostatique plutôt que moléculaire. Comme le montre la **figure 13 p.62**, Dock180 est marqué au ^{32}P dès 30 minutes et le signal est maintenu jusqu'à 3 heures. Ceci confirme en partie les données publiées précédemment démontrant la phosphorylation de Dock180 suite à l'engagement des intégrines par la fibronectine.

Ainsi, nous avons décidé d'identifier les résidus phosphorylés sur Dock180 par spectrométrie de masse. Pour ce faire, nous avons répété cette expérience sans marquer les cellules au ^{32}P et nous avons coloré les protéines au Bleu de Coomassie. Nous avons ensuite coupé la bande correspondant à Dock180 et l'avons envoyée en spectrométrie de masse afin d'identifier les résidus phosphorylés. Les peptides ont tout d'abord été passés sur une colonne d'enrichissement en phosphopeptides (colonne de TiO_2) puis analysés par MS/MS. À notre grande surprise, nous n'avons trouvé aucun résidu phosphorylé sur Dock180. Toutefois, nous avons identifié trois peptides phosphorylés appartenant à Dock5 (**figure 13, p.62**). La tyrosine 1288 et la sérine 1863 ont été détectées dans les échantillons stimulés à la poly-L-lysine et à la fibronectine respectivement alors que la sérine 1765 a été détectée phosphorylée dans les deux échantillons. Plusieurs criblages cherchant à identifier les peptides phosphorylés du protéome ont rapporté la phosphorylation de Dock5 dans la région C-terminale ce qui semble indiquer que cette région est une zone hautement phosphorylée³¹⁴.

Objectif #2.2: Dimérisation de Dock180 et Dock5

Dock180 et Dock5 appartiennent à la même sous-famille, partagent une très haute homologie de séquence et ont le même poids moléculaire (**figure 2, p.4**). Ainsi, la présence de Dock5 dans un immunoprécipitat de Dock180 pourrait être expliquée de deux façons : l'anticorps utilisé reconnaît les deux protéines ou les deux protéines dimérisent. Nous avons tout d'abord testé l'anticorps anti-Dock180 utilisé (H70) et nous n'avons pas détecté de signal lorsque testé sur un lysat de cellules surexprimant Dock5 (résultats non-présentés). Nous avons donc testé si les deux protéines peuvent former un complexe. Comme le montre la **figure 14 p.65**, Dock180 est coimmunoprécipitée avec Dock5 et vice-versa. Ceci démontre que, au moins en surexpression, les deux protéines peuvent former un hétérodimère.

Objectif #2.3: Anticorps anti-phosphoSer1863

Afin de confirmer que la sérine 1863 de Dock5 est bien phosphorylée suite à une stimulation à la fibronectine, nous avons fait produire un anticorps phosphospécifique reconnaissant spécifiquement ce résidu phosphorylé (**figure 15a, p.66**). Ainsi, nous avons stimulé à la fibronectine pendant 1 heure des cellules Hela ayant un niveau d'expression endogène de Dock5 assez intense. Nous avons ensuite immunoprécipité Dock5 des lysats cellulaires et les avons analysés par immunobuvardage de type Western. Tel que montré à la **figure 15b p.66**, le signal de pSer1863 augmente de 50% lorsque les cellules sont stimulées en comparaison au contrôle en suspension. Ainsi, la sérine que nous avons identifiée en spectrométrie de masse semble en effet être phosphorylée en réponse à l'adhésion.

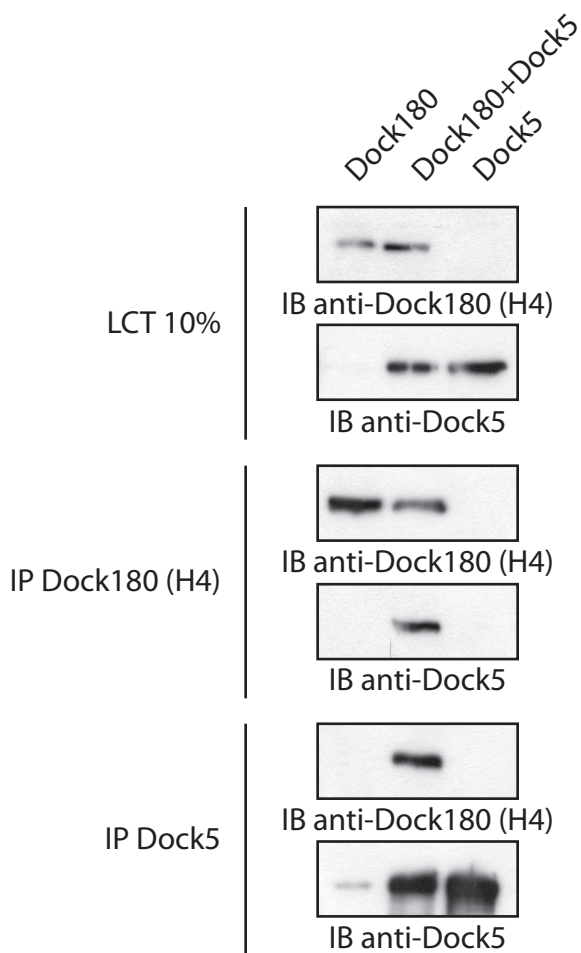
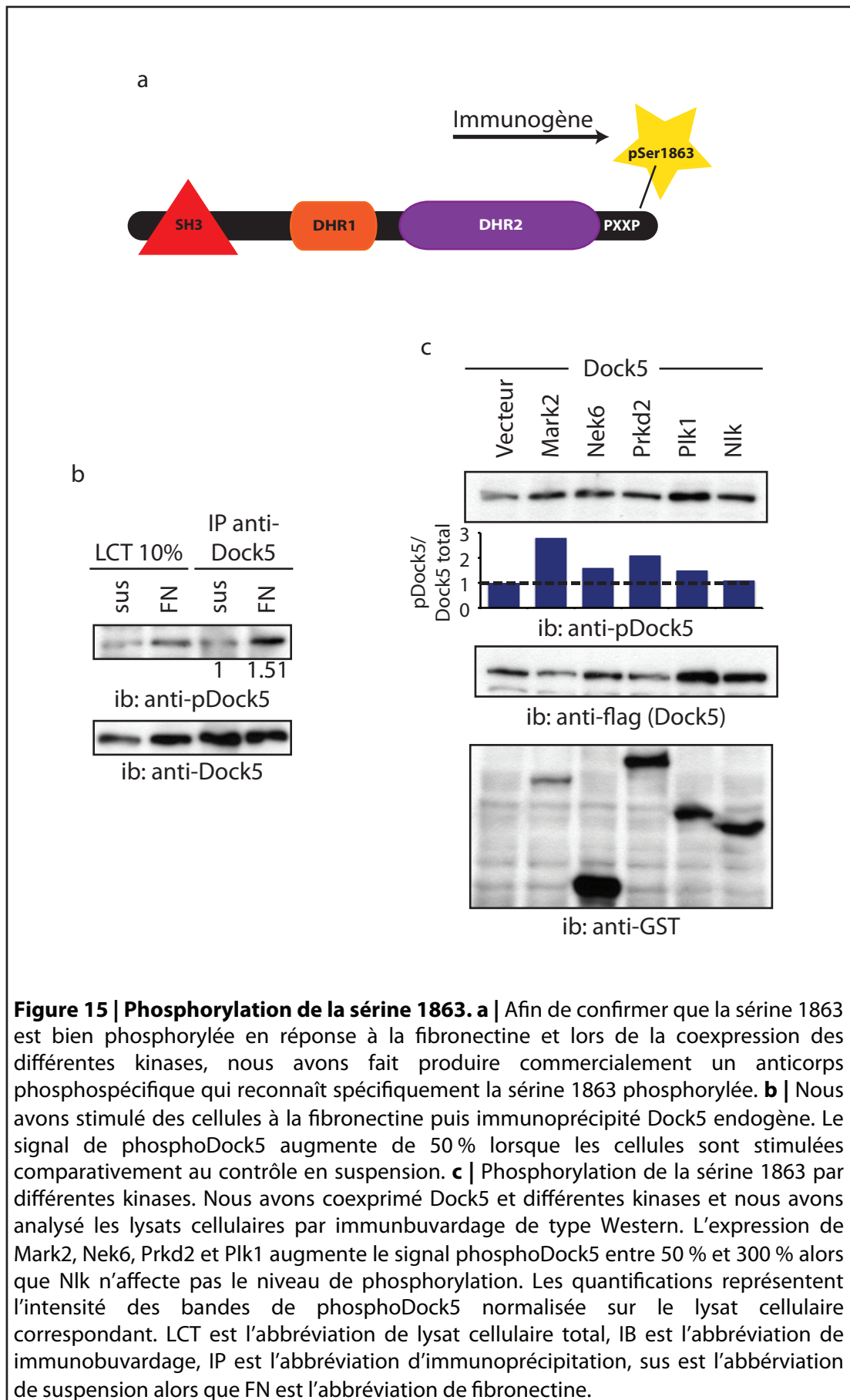


Figure 14 | Dimérisation de Dock180 et Dock5. Pour expliquer la présence de Dock5 dans un immunoprécipitat de Dock180, nous avons testé par coimmunoprécipitation si les deux protéines interagissent entre elles. Les deux protéines sont présentes dans l'immunoprécipitat de l'autre suggérant qu'elles peuvent former des dimères en surexpression. Les deux anticorps utilisés sont spécifiques à chaque protéine tel que le démontrent les immunobuvardages des lysats cellulaires totaux. LCT est l'abréviation de lysat cellulaire total, IB est l'abréviation de immunobuvardage et IP est l'abréviation d'immunoprécipitation.



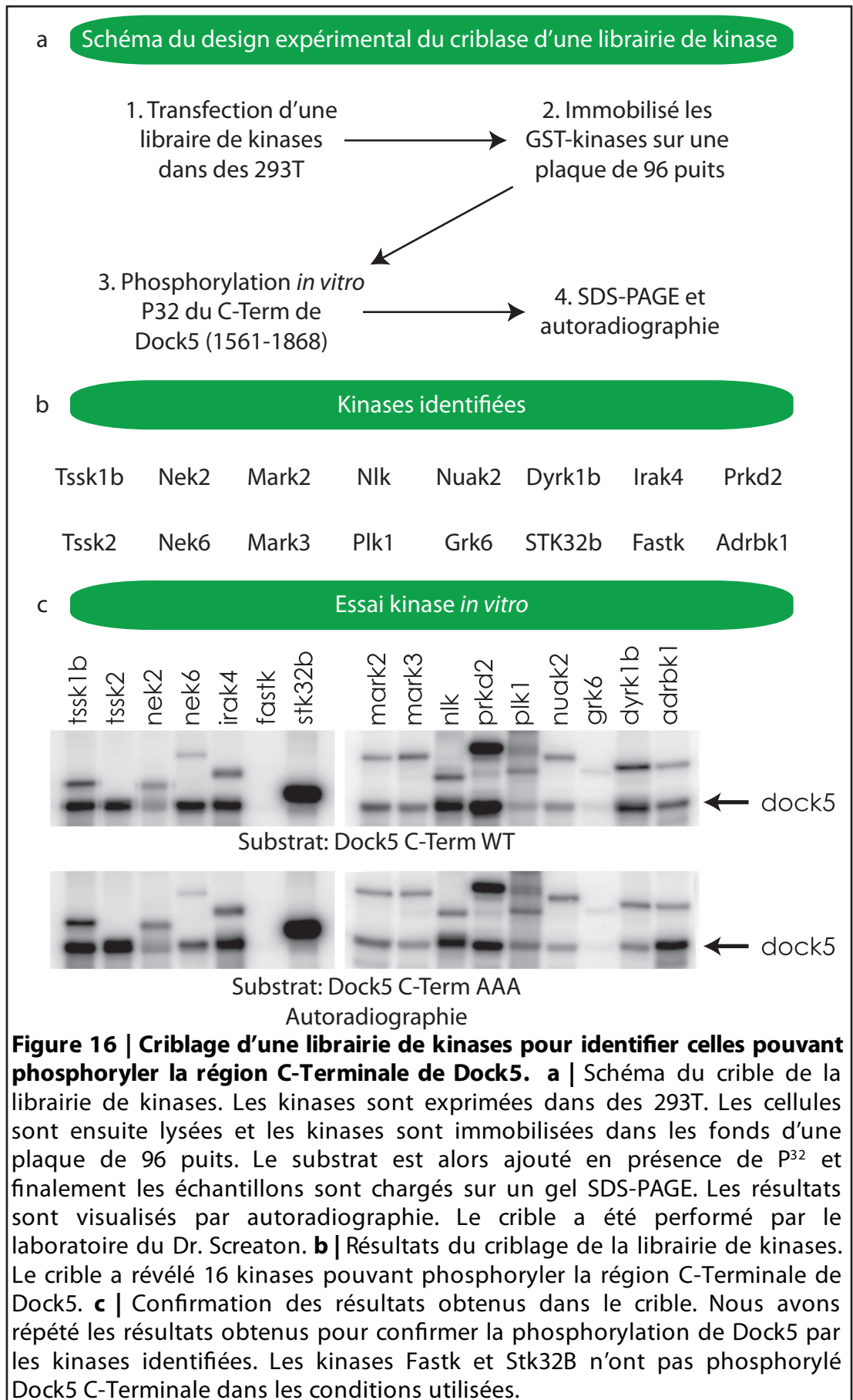


Tableau III. Fonction et spécificité des kinases pouvant phosphoryler Dock5 C-Terminale.

Les fonctions des 16 kinases ayant été identifiées dans le criblage du kinome humain sont résumées ici ainsi que leur spécificité.

Nom	Fonction	Spécificité
Tssk1b	Exprimées fortement dans les testicules et impliquées dans le	Ser/Thr
Tssk2	développement testiculaire et la maturation des spermatozoïdes ³³⁵	Ser/Thr
Nek2	Impliquée dans l'organisation du centrosome ³³⁶	Ser/Thr
Nek6	Impliquée dans l'assemblage du pôle mitotique et la cytokinèse ³³⁷	Ser/Thr
Ira4	Transduction de signal en aval des récepteurs TLRs et IL-1Rs; réponse immunitaire et inflammation ³³⁸	Ser/Thr
Fastk	Impliquée dans l'apoptose médiée par Fas ³³⁹	Ser/Thr
Stk32b	Délétion associée au syndrome de Ellis-van Creveld ³⁴⁰	Ser/Thr
Mark2/ Par1b/ EMK	Impliquée dans l'établissement de la polarité cellulaire ³⁴¹	Ser/Thr
Mark3/ Par1b/ C-TAK1		Ser/Thr
Nlk	Transduction de signal en aval de Wnt/Fzd ³⁴²	Ser/Thr
Prkd2/ PKD2	Impliquée dans la régulation de l'expression génique, la prolifération, la migration cellulaire et l'angiogénèse ³⁴³	Ser/Thr
Plk1	Impliquée dans la régulation du cycle cellulaire ³⁴⁴	Ser/Thr
Nuak2/ SNARK Grk6	Impliquée dans la survie cellulaire, la migration cellulaire et l'invasion ³⁴⁵	Ser/Thr
Adrbk1/ Grk2	Internalisation des récepteurs couplés aux protéines G ³⁴⁶	Ser/Thr
Dyrk1b/ Myrk	Impliquée dans la transduction de signaux; régule entre autres la croissance cellulaire et la différenciation ³⁴⁷	Ser/Thr et Tyr

Objectif #2.4: Identification des kinases pouvant phosphoryler Dock5

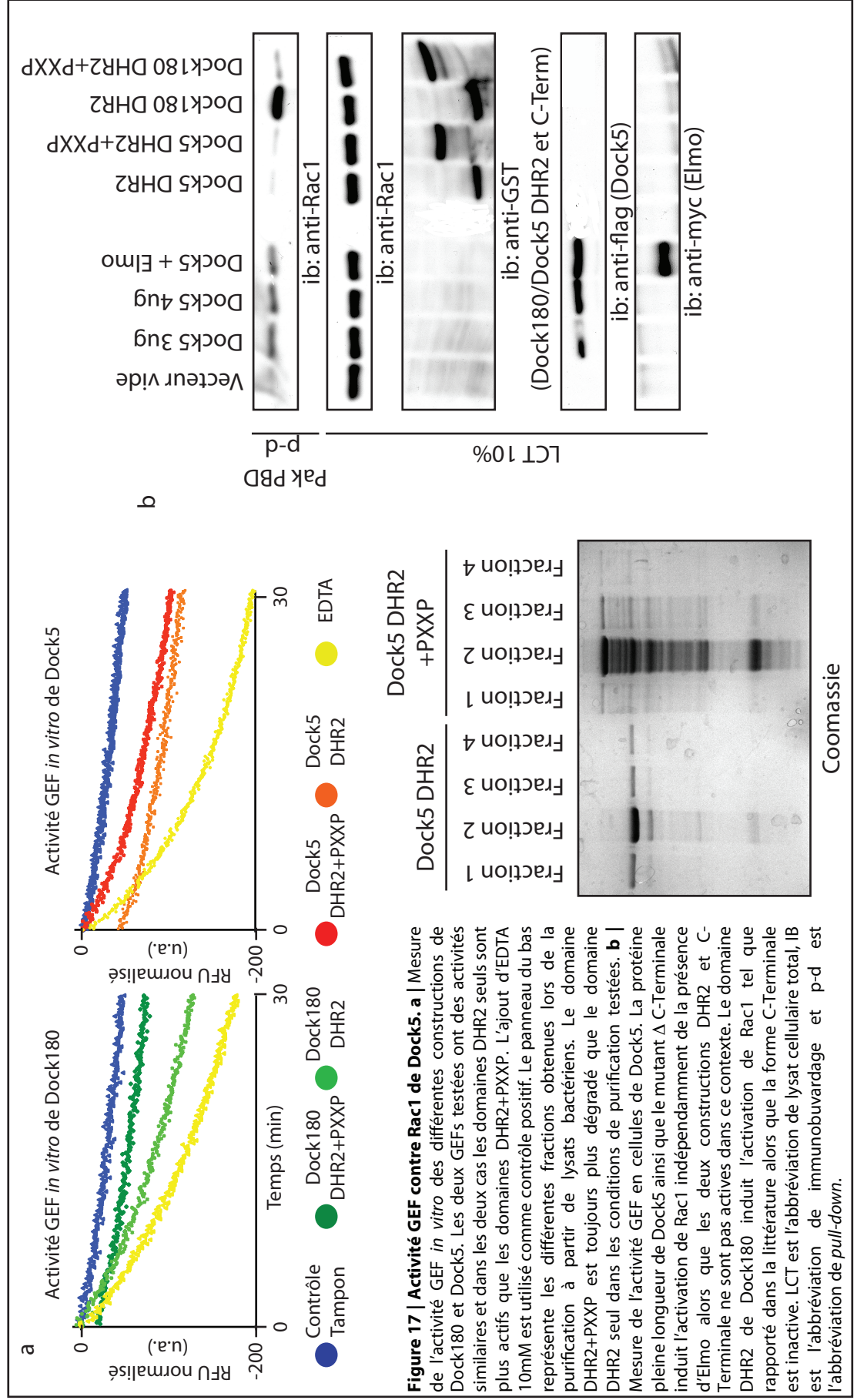
Puisque nous savons maintenant que la région PXXP de Dock5 est phosphorylée en aval des intégrines, nous avons cherché à identifier les kinases pouvant phosphoryler ce domaine protéique et idéalement trouver celle(s) responsable(s) de la phosphorylation de Dock5 en aval des intégrines. Pour ce faire, nous avons collaboré avec le laboratoire du Dr. Robert Sreaton qui a développé un crible afin d'identifier les kinases pouvant phosphoryler un substrat donné³⁴⁸. Pour ce faire, ils transfectent dans des 293T une librairie de kinases comportant au moins un membre de chaque famille de kinases du kinome humain pour un total de 180 kinases (**figure 16a, p.67**). Ils lysent ensuite les cellules et immobilisent les kinases au fond d'une plaque de 96 puits. Finalement, ils ajoutent le substrat désiré, dans notre cas la région PXXP de Dock5, et incubent le tout en présence de ³²P de façon à phosphoryler *in vitro* le substrat (**figure 16a, p.67**). Les résultats peuvent ensuite être analysés par autoradiographie. Ce criblage a révélé 16 kinases positives dont les fonctions sont résumées dans le **tableau III p.68**. Nous avons répété l'essai kinase *in vitro* nous-mêmes de façon à confirmer les résultats obtenus. Ainsi, 14 kinases ont phosphorylé la région PXXP de Dock5 dans nos mains alors que les kinases Fastk et Stk32b semblent être des faux positifs (**figure 16c, p.67**). Afin de déterminer si une de ces kinases est responsable de la phosphorylation des résidus sérine 1765 et 1863 détectés en spectrométrie de masse, nous avons muté en alanine ces deux résidus ainsi que la sérine 1862. Cette dernière a été mutée par précaution, puisqu'il est possible dans certains cas que la phosphorylation d'un résidu soit détectée sur le résidu adjacent. Ainsi, nous avons utilisé cette construction mutée désignée Dock5 C-terminal AAA dans un essai kinase *in vitro* avec les 16 kinases trouvées dans le criblage (**figure 16c, p.67**). Toutefois, aucune différence significative et reproductible

n'a été détectée dans les niveaux de phosphorylation entre la construction WT et AAA. Ce résultat signifie qu'il doit y avoir d'autres résidus phosphorylés par ces kinases dans cette région. Cependant, une approche de mutagenèse n'est pas adéquate pour identifier ces résidus, puisque la région PXXP de Dock5 est extrêmement riche en résidus sérine et thréonine. Aucun lien évident n'a pu être fait entre les informations publiées sur chaque kinase et la signalisation en aval des intégrines. Nous avons tout de même testé par stimulation à la fibronectine si l'activité de une des kinases identifiées est régulée par l'adhésion (résultats non-présentés). Malheureusement, l'activité d'aucunes des 14 kinases trouvées semblent être régulée par l'engagement des intégrines et il semblerait donc que nous n'ayons pas identifié la kinase responsable de la phosphorylation de Dock5 en aval des intégrines. Toutefois, nous avons coexprimé en cellules Dock5 et les différentes kinases et nous avons analysé les lysats cellulaires avec l'anticorps anti-pSer1863 (**figure 15c, p.66**). Ainsi, les kinases Mark2, Nek6, Prkd2 et Plk1 augmentent le signal de phosphorylation de 50% à 300% (Mark2). Ceci suggère que, bien que l'activité des kinases ne semble pas régulée par l'adhésion et que la mutation de la sérine 1863 pour une alanine ne diminue pas de façon détectable les niveaux de phosphorylation de la région PXXP de Dock5, ces kinases phosphorylent tout de même le résidu identifié.

Objectif #2.5: Activité GEF de Dock5

Nous avons trouvé dans la littérature très peu d'informations quant aux fonctions de Dock5 (**voir 5.4 p.33**). Plus particulièrement, l'activité GEF de Dock5 a été rapportée une seule fois. En effet, le groupe de Omi & al. ont démontré par FRET que Dock5 peut activer Rac1 mais moins efficacement que Dock180³⁴⁹. De plus, une interaction entre Dock5 et les protéines adaptatrices CrkII et CrkL a été rapportée²⁹⁰.

Afin de pouvoir étudier l'effet de la phosphorylation de Dock5 sur son activité, nous avons décidé de caractériser cette activité plus en détail. Dans un premier temps, nous avons mesuré l'activité GEF des domaines DHR2 et DHR2+PXXP de Dock180 et de Dock5 par essai GEF *in vitro* (**figure 17a, p.72**). Cet essai est basé sur la fluorescence de la molécule *Mant* qui est liée à une molécule de GDP. Lorsque liée à la GTPase, la molécule mant est capable d'émettre de la fluorescence. Toutefois, lorsque le nucléotide est déchargé de la GTPase, la molécule de mant en solution est *quenchée* et ne peut plus émettre de lumière. Ainsi, en présence d'une activité GEF, nous devrions observer une diminution de la fluorescence suite au déchargement du mant-GDP. Lors de cette expérience, l'EDTA, un chélateur d'ions bivalents, est utilisé comme contrôle positif, car en absence de Mg^{2+} , la GTPase n'est pas en mesure de lier les nucléotides avec une haute affinité. La première étape de cet essai consiste à charger *in vitro* Rac1 avec le nucléotide mant-GDP. Les différents domaines sont ensuite purifiés à partir de bactéries. Finalement, les protéines purifiées sont incubées avec Rac1•mant-GDP et du GTP et la fluorescence émise par les molécules de mant est mesurée. Les domaines DHR2 de Dock180 et de Dock5 ont une activité similaire bien que Dock180 soit légèrement plus efficace (**figure 17a, p.72**). De plus, les domaines DHR2+PXXP des deux protéines ont eux aussi des activités semblables et dans les deux cas, ces domaines ont moins d'activité que les domaines DHR2 (**figure 17a, p.72**). Ceci peut être dû à un mécanisme de régulation où le domaine PXXP diminue l'activité du domaine catalytique. Toutefois, la région PXXP est prédite d'être non-repliée (David Barford, communication personnelle) ce qui la rend instable. Ainsi, lorsque nous purifions le domaine DHR2+PXXP, il est toujours plus dégradé que le domaine DHR2 seul et ceci pourrait expliquer l'activité diminuée (**figure 17a-panneau du bas, p.72**).



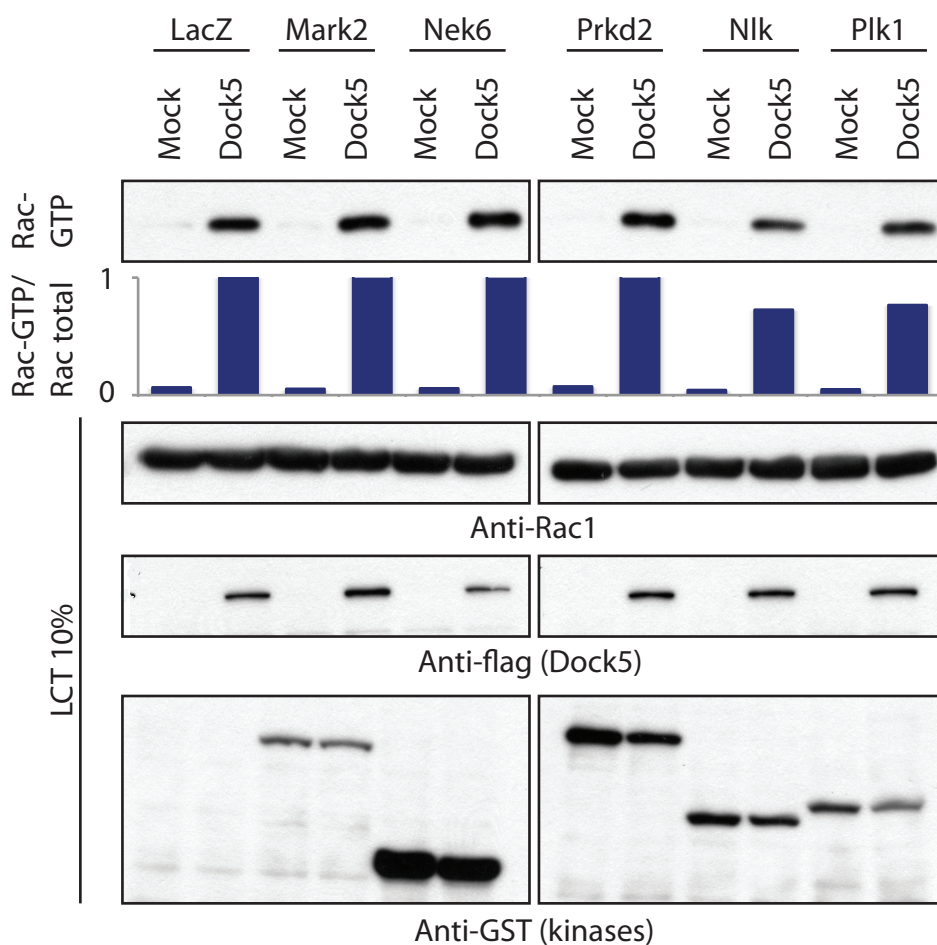


Figure 18 | Impact de la phosphorylation sur l'activité GEF de Dock5. Mesure de l'activité GEF de Dock5 sur Rac1 par Pak *pull-down* en coexprimant les différentes kinases. La phosphorylation de Dock5 par Mark2, Nek6 et Prkd2 n'affecte pas du tout les niveaux d'activation de Rac alors que l'expression de Nlk et Plk1 diminue de 27% et 23% respectivement les niveaux de Rac-GTP. Ainsi, la phosphorylation de Dock5 semble avoir peu ou pas d'effet sur son activité GEF.

Nous avons aussi mesuré l'activité des différentes constructions de Dock5 par PBD *pull-down* (**figure 17b, p.72**). Ainsi, Dock5 pleine longueur est capable d'activer Rac1 et l'ajout de Elmo n'augmente pas cette activité, supportant les données publiées suggérant que les protéines Dock sont des GEFs à part entière et ne nécessitent pas la présence d'Elmo pour médier leur activité^{262,285}. Tel qu'observé en essai GEF *in vitro*, le domaine DHR2 de Dock180 active Rac1. À notre grande surprise, les domaines DHR2 et DHR2+PXXP de Dock5, et DHR2+PXXP de Dock180 n'ont pas d'activité GEF en cellules.

Nous savons maintenant que la région C-terminale de Dock5 est phosphorylée et nous connaissons 14 kinases pouvant phosphoryler cette région. Nous avons donc décidé d'étudier l'impact de cette modification sur (i) son activité GEF, (ii) son interaction avec ses partenaires, (iii) sa stabilité et (iv) sa localisation.

Objectif #2.6: Effet de la phosphorylation sur l'activité GEF de Dock5

Pour mesurer l'effet de la phosphorylation sur l'activité GEF de Dock5, nous avons utilisé le PBD *pull-down* (**figure 18, p.73**). Ainsi, la surexpression des différentes kinases avec Dock5 pleine longueur varie peu ou pas son activité GEF envers Rac1 (**figure 18, p.73**). En effet, les niveaux d'activation de Rac sont les mêmes lorsque les kinases Mark2, Nek6 et Prkd2 sont exprimées et diminuent d'environ 20% lorsque Plk1 et Nlk sont exprimées (**figure 18, p.73**). Nous avons aussi testé cette hypothèse en essai GEF *in vitro*. Pour ce faire, nous avons purifié Dock5 C-terminal et nous avons procédé à un essai kinase *in vitro* avant l'essai GEF. Malheureusement, l'essai kinase *in*

in vitro a complètement inhibé l'activité GEF de Dock5 même dans la condition contrôle sans kinase. L'essai GEF *in vitro* est une expérience assez sensible lors de laquelle les concentrations des différents ions et tampons doivent être rigoureusement contrôlées. Ainsi, les tampons utilisés pour l'essai kinase semblent nuire à l'étape suivante et nous ne pouvons donc pas utiliser cette méthode pour mesurer l'activité GEF du domaine DHR2+PXXP phosphorylé. Nous pouvons toutefois conclure qu'en cellules, l'expression des différentes kinases ne semble pas affecter l'activité de Dock5.

Objectif #2.7: Effet de la phosphorylation sur l'interaction entre Dock5 et ses partenaires

Les sites de phosphorylation que nous avons détectés par spectrométrie de masse lors de la stimulation à la fibronectine sont situés dans la région PXXP de Dock5. Puisque ces régions sont généralement responsables des interactions avec les protéines contenant des domaines SH3, nous croyons que la phosphorylation pourrait réguler l'interaction entre Dock5 et différentes protéines contenant des domaines SH3. Nous avons tout d'abord testé l'interaction entre Dock5 et les domaines SH3 de différentes protéines en utilisant ces domaines purifiés de bactéries pour coprécipiter la GEF (**figure 19a, p.76**). Dock5 est en mesure d'interagir avec le domaine SH3 de Grb2, Abl, Src, PI3 kinase. À notre grande surprise, nous n'avons détecté aucune interaction entre Dock5 et le domaine SH3 de Crkl, ce qui va à l'encontre de certaines données publiées³¹³. Nous avons testé cette interaction entre les protéines pleine longueur en immunoprécipitation et n'avons toujours pas détecté d'interaction (données non montrées).

Pour déterminer l'effet de la phosphorylation sur ces interactions, nous avons répété la même expérience, mais cette fois en exprimant avec Dock5 les différentes kinases (**figure 19b, p.76**). Ainsi, de façon générale, la phosphorylation de Dock5 par les kinases diminue l'interaction avec les domaines SH3 testés et cet effet est plus prononcé avec Grb2. Ceci est la première évidence d'un impact physiologique de la phosphorylation de Dock5. Ainsi, Dock5 phosphorylé serait moins en mesure d'interagir avec ces différents partenaires. L'inhibition de la formation de complexes protéiques par la phosphorylation aurait possiblement un effet modulateur sur la signalisation de Dock5-Rac1.

Objectif #2.8: Effet de la phosphorylation sur la stabilité et la localisation de Dock5

Lors de nos expériences, nous avons remarqué que deux kinases en particulier semblaient faire varier les niveaux d'expression de Dock5: Plk1 et Dyrk1b (résultats non-présentés). Nous avons donc décidé de tester leur impact sur la stabilité de Dock5 grâce à un essai de marquage en présence de méthionine et de cystéine ³⁵S puis différents temps de chasse en présence de ces acides aminés non marqués (résultats non-présentés). Ainsi, nous n'avons observé aucune différence significative et reproductible des niveaux de Dock5 en présence de ces kinases. De plus, nous avons testé notre anticorps anti-pSer1863 en immunohistochimie mais malheureusement nous n'avons pas réussi à obtenir de signal spécifique. Nous n'avons donc pas pu tester si la phosphorylation de Dock5 affecte sa localisation.

Discussion et conclusions

Étude protéomique des partenaires de Rac: rappel des objectifs et des résultats

Notre premier objectif était de mettre au point une technique nous permettant de purifier Rac en complexe avec ses partenaires et utiliser la spectrométrie de masse pour identifier ceux-ci. Nous avons réussi à établir une méthode de purification hautement efficace basée sur la haute affinité entre la streptavidine et la biotine. Ainsi, en coexprimant en cellules Rac fusionnée au BIOTAG et la ligase bactérienne hBirA, nous avons réussi à obtenir une protéine de fusion Rac-BIOTAG biotinylée sans affecter son activité. Une incubation de 10 minutes s'est avérée suffisante pour purifier des quantités significatives de Rac à l'aide de billes streptavidine. Bien que nous ayons identifié en spectrométrie de masse plusieurs partenaires connus de Rac ainsi que plusieurs candidats, nous n'avons pas été en mesure de confirmer l'interaction entre Rac et les candidats testés. Malheureusement, l'expression des protéines de fusion a rapidement diminué au fil des passages et nous n'avons pas été en mesure de répéter l'expérience avec plus de matériel.

La protéomique pour étudier la signalisation des petites GTPases

À notre connaissance, la protéomique n'a jamais été utilisée pour identifier les partenaires des RhoGTPases. Une des raisons est que la majorité des effecteurs de ces protéines ont été identifiés dans les années 1990 alors que la spectrométrie de masse n'était qu'à ses débuts. De plus, les méthodes généralement utilisées pour purifier des complexes protéiques servant à la spectrométrie de masse ne sont pas adéquates pour les complexes transitoires. En effet, les méthodes telles que le tap-tag nécessitant plusieurs heures ne sont pas adaptées à la biologie des Rho GTPases. Toutefois, la protéomique a été utilisée avec succès pour étudier les effecteurs des

différentes formes de Ras.^{285,350,351} En effet, la protéomique a permis à ce groupe de développer une banque de partenaires potentiels de ces GTPases.

Un des avantages d'utiliser la protéomique pour identifier les partenaires de Rac est de pouvoir activer la GTPase en cellules. La purification de protéines exprimées dans des cellules de mammifères plutôt que dans des bactéries ou des levures permet d'activer la GTPase physiologiquement sans avoir recours à des formes mutantes de la protéine. En effet, bien qu'un grand nombre d'effecteurs et de régulateurs de Rac aient été identifiés, plusieurs questions restent sans réponse. Ainsi, une de celles-ci est de comprendre comment une GTPase sélectionne parmi ces effecteurs selon la GEF impliquée. En effet, plusieurs stimuli activent Rac et induisent des réponses cellulaires différentes, et ce, grâce à différentes GEFs. Toutefois, le lien moléculaire entre la GEF et l'effecteur n'est pas connu et il est concevable que des molécules adaptatrices servent à dicter la spécificité de signalisation. Quelques exemples d'un tel lien moléculaire existent dans la littérature telle que l'interaction entre Tiam1 et les protéines adaptatrices JIP/IB2 et sinophiline^{352, 353}. Sinophiline interagit directement avec Tiam1 et l'effecteur de Rac p70 S6 kinase et favorise donc l'activation de cette dernière³⁵⁴, alors que JIB/IB2 est une molécule adaptatrice de la voie MAPK p38³⁵⁴. Elle favorise donc l'activation de cette voie par Rac mais inhibe aussi l'activation de Pak par Rac. Ainsi, l'utilisation de formes constitutivement actives de Rac contourne la nécessité de l'interaction entre la GEF et la GTPase pour qu'il y ait activation de la GTPase et ne permet donc pas de mettre à jour des complexes protéiques comme ceux-ci.

De plus, de récentes évidences suggèrent que le niveau d'activation de Rac ne concorde pas nécessairement avec son habileté à signaler³⁵³. Ainsi, notre modèle de signalisation des GTPases où le chargement d'une molécule de GTP sur la GTPase est toujours suivi par l'activation de ses effecteurs est probablement une vision

simplifiée de la biologie des GTPases. Dans un tel cas, les avantages d'utiliser un système intégré pour étudier la formation des complexes formés par les GTPases nous permettront de mieux comprendre la signalisation en aval des celles-ci.

Un autre avantage de mettre à profit la protéomique est la très faible limite de détection. En effet, la spectrométrie de masse est de nos jours une méthode extrêmement sensible. Ainsi, nous croyons que, conjuguée à la méthode de purification très rapide que nous avons mise au point, elle pourrait permettre d'identifier des interactions plus transitoires ou de plus faible affinité qui ne pourraient pas être découvertes en utilisant les méthodes plus traditionnelles telles que le double hybride chez la levure. Les GTPases agissant comme interrupteur moléculaire, elles sont désactivées relativement rapidement et il est donc probable que certaines de leurs interactions soient labiles. De plus, la protéomique va permettre d'identifier des composantes des complexes protéiques qui n'interagissent pas directement avec la GTPase. En effet, il est possible que d'autres molécules adaptatrices impliquées dans la spécificité de signalisation en reliant la GEF et l'effecteur, telles que celles décrites précédemment pour Tiam1, existent. Toutefois, il n'est pas essentiel qu'une telle molécule interagisse avec la GTPase pour réguler la transduction de signaux. Ainsi, la protéomique, grâce à sa très faible limite de détection, devrait permettre d'identifier les composantes des complexes protéiques que les autres méthodes n'ont pas permis de découvrir.

Candidats identifiés en spectrométrie de masse

Malgré les avantages décrits ci-dessus, nous n'avons pas été en mesure de confirmer d'interaction entre Rac et les candidats identifiés. Il est d'ailleurs surprenant que nous n'ayons pas détecté d'interaction en immunoprécipitation entre Rac et Lasp1 puisque Lasp1 a été identifiée à partir d'une immunoprécipitation de Rac et le

pointage MASCOT obtenu (134) est relativement élevé. Dans ce cas, l'utilisation d'un agent de réticulation aurait pu s'avérer utile. En effet, si l'interaction *in vivo* entre Rac et Lasp1 est faible il est possible que nous ne puissions la détecter par immunoprécipitation. Lasp1 a été identifié en 1995 comme gène codant pour une protéine comportant un domaine LIM et un domaine SH3 d'où elle tire son nom : LIM and SH3 domain protein 1³¹³. Elle fait partie de la même famille de protéines que Lasp2/Nébulette. Lasp1 est surexprimée dans environ 8% des carcinomes de sein humain et est surexprimée dans 55,4% des carcinomes invasives³⁵⁵. Lasp1 contient aussi un domaine de liaison à l'actine et interagit avec zyxin grâce à son domaine SH3^{356, 357}. Elle est localisée aux sites d'extensions membranaires et aux sites d'adhésion focale et est nécessaire pour la migration cellulaire et la prolifération^{357, 358}. Le rôle principal de Lasp1 semble être de recruter zyxin aux sites d'adhésion immatures. Toutefois, la déplétion de zyxin par ARNi ne bloque pas la migration cellulaire alors que la déplétion de Lasp1 l'inhibe³⁵⁹. Ainsi, les mécanismes employés par Lasp1 pour réguler la migration ne sont pas connus. Lasp1 est donc un bon candidat comme partenaire de Rac. En effet, elle est localisée adéquatement aux sites d'activation de Rac et pourrait par exemple servir à localiser Rac adéquatement.

Un autre candidat intéressant identifié est le récepteur Fzd10. Bien que nous ayons détecté une interaction faible en *pull-down* en traduisant *in vitro* ce gène, nous n'avons pas réussi à l'exprimer en cellules et nous n'avons donc pas pu pousser la caractérisation de cette interaction plus à fond. Ce récepteur fait partie de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires Fzd pouvant lier les protéines Wnt. Plus tôt cette année, il a été démontré que Fzd10 peut activer la voie non-canonique Dvl-Rac1-JNK et induit la formation de lamellipodes lorsque surexprimées[Fukukawa, 2009 #439]. Bien qu'il est connu que Rac est activée lors de l'activation de la voie non-canonique des Wnt, une interaction directe entre Rac et un récepteur Fzd n'a jamais été rapporté. Il est donc possible qu'il y ait formation d'un

complexe entre Fzd10 et Rac et il serait intéressant d'étudier plus en détail l'interaction détectée.

Il est aussi surprenant que plus de la moitié des protéines identifiées soient des protéines nucléaires. Quelques publications rapportent la translocation de Rac au noyau toutefois, la fonction biologique de Rac dans cette organelle n'est pas connue^{356,360}. Il semblerait toutefois que la translocation de Rac soit régulée par son activation et favoriserait sa dégradation par le protéasome^{360,361}. Cependant, à notre connaissance, aucune interaction directe n'a été rapportée entre Rac et des protéines exclusivement nucléaires telles que la *DNA topoisomérase 2 α* . Récemment, l'actine et les protéines Arp ont été associées à plusieurs fonctions nucléaires. En effet, les protéines Arp4 à Arp9 sont localisées principalement au noyau et possèdent des extensions internes ou en *N-/C-terminale* caractéristiques de cette sous-famille leur conférant des propriétés particulières telles qu'une affinité pour les histones^{361,362}. De plus, l'actine est nécessaire pour la transcription par l'ARN polymérase I, II et III³⁶³, et est impliquée dans la maturation des ARNm, le remodelage de la chromatine et l'association entre la chromatine et la matrice nucléaire^{364,365}. Le complexe Arp2/3 a aussi été impliqué dans la régulation de la transcription et il a été démontré que N-WASP peut promouvoir la polymérisation de l'actine nucléaire et ceci est important pour la régulation de la transcription^{366,367}. Ainsi, l'étude de l'implication de Rac dans la régulation des fonctions nucléaires pourrait ouvrir de nouvelles avenues intéressantes, mais il faudrait dans un premier temps s'assurer que la biotinylation de Rac n'affecte pas sa localisation cellulaire.

Expériences futures

Une des solutions pour contourner le problème de la cytotoxicité de Rac serait d'avoir recours à un système d'expression inductible qui permettrait possiblement d'obtenir des niveaux d'expression des protéines de fusion plus élevées. Différents systèmes inductibles ont été utilisés avec succès pour induire l'expression de Rac WT, V12 ou N17³⁶⁸⁻³⁷⁰. De plus, certains systèmes inductibles ont été utilisés avec succès chez des souris transgéniques pour contrôler l'expression de la protéine ectopique³⁷¹. Ainsi, la purification de cellules primaires d'une telle souris nous permettrait d'étudier les différents complexes dans lesquels Rac est impliquée selon le type cellulaire. De plus, l'expression inductible de Rac ou d'un RNAi contre Rac nous permettrait d'étudier l'implication de Rac durant le développement et lors de la formation de tumeurs. Des constructions des différentes formes de Rac en aval des éléments de réponse de l'opéron de résistance à la tétracycline de *E. Coli* (tetO) sont présentement en cours. Celles-ci vont permettre de contrôler l'expression de Rac grâce au système Tet ON/OFF. Ce système inductible repose sur la liaison entre le répresseur de la tétracycline de *E. Coli* (tTA) et les éléments de réponse de tetO³⁷². Ainsi, en absence de doxycycline, tTA peut lier tetO et induit la transcription des gènes situés en aval de celui-ci, dans notre cas Rac. Lorsque la doxycycline est ajoutée, elle se lie à tTA et la dissocie du promoteur, bloquant alors la transcription des gènes cibles³⁷³. Ce système a été utilisé avec succès pour contrôler l'expression de Rac et permet non seulement de contrôler l'expression du gène cible dans le temps, mais aussi permet un effet de dosage³⁷³.

Étude de la phosphorylation de Dock5 induite par l'engagement des intégrines : rappel des objectifs et des résultats

Il existe très peu d'informations dans la littérature concernant les mécanismes de régulation des différentes protéines Dock. Notre laboratoire s'intéresse plus particulièrement à la signalisation par Dock180 et nous avons donc décidé de faire suite à un papier publié il y a plus de 10 ans qui fait mention de la phosphorylation de ce qu'ils croyaient être Dock180 en aval des intégrines ou lors de l'expression de différents oncogènes³⁷¹. Ainsi, nous avons dans un premier temps répété leurs résultats et nous avons utilisé la spectrométrie de masse afin d'identifier les résidus phosphorylés sur Dock180. À notre surprise, nous n'avons identifié aucun peptide phosphorylé appartenant à Dock180, mais trois résidus phosphorylés appartenant à sa proche cousine, Dock5. Parmi ces trois résidus, un seul a été identifié seulement dans l'échantillon stimulé à la fibronectine : la sérine 1863 et nous avons confirmé sa phosphorylation lors de l'engagement des intégrines à l'aide d'un anticorps phosphospécifique. Nous savons maintenant que les deux protéines peuvent former un dimère. Le criblage du kinome humain nous a permis d'identifier 14 kinases pouvant phosphoryler *in vitro* la région PXXP de Dock5. À l'aide de l'anticorps anti-pSer1863, nous avons démontré que cette sérine est bien phosphorylée par les kinases Mark2, Nek6, Prkd2 et Plk1. Nos données suggèrent que la phosphorylation de cette région affecterait la liaison entre des protéines contenant des domaines SH3 et Dock5, mais aurait peu ou pas d'impact sur l'activité GEF de Dock5.

Hétérodimérisation entre Dock180 et Dock5

La présence de Dock5 dans l'immunoprécipitat de Dock180 est, d'après nos résultats, due à une interaction entre les deux protéines et cette interaction semble

assez robuste. L'anticorps que nous avons utilisé pour immunoprécipiter Dock180 lors de la préparation des échantillons pour la spectrométrie de masse cible l'extrémité C-terminale de Dock180 qui diffère relativement beaucoup de Dock5. Toutefois, l'anticorps utilisé par le groupe de Kiyokawa & al. a été produit dans leur laboratoire et ils ne font pas mention de l'immunogène utilisé.

Nous ne connaissons pas la fonction biologique de la dimérisation entre Dock180 et Dock5. C'est à notre connaissance les premières données suggérant une hétérodimérisation entre les protéines Dock. Toutefois, le laboratoire du Dr. Schwartz a déjà rapporté que la protéine Dock9/Zizimin1 peut former des homodimères via son domaine DHR2³¹⁴. De plus, ils mentionnent aussi dans cette publication que Dock180 peut former des homodimères mais ils ne testent pas si cette dimérisation se fait via le même domaine. Dans le cas de Dock9, la dimérisation semble avoir un effet de coopérativité positive et ceci suggère que l'homo- et l'hétérodimérisation entre les différentes protéines Dock pourrait jouer un rôle dans la régulation de leur activité catalytique. Le cristal de Dock9 en complexe avec Cdc42 a récemment été publié³⁰⁵. Dans cette publication, ils rapportent qu'une mutation de l'interface de dimérisation formée par deux hélices α bloquant partiellement la dimérisation inhibe aussi l'activité catalytique de Dock9 et cet effet est probablement due à la déstabilisation d'une troisième hélice impliquée dans la réaction de catalyse. Ainsi, ne serait-ce que par la proximité entre l'interface de dimérisation et le domaine catalytique, il est possible que la dimérisation soit impliquée dans la réaction de catalyse. Outre l'activité GEF, il est envisageable que la dimérisation des protéines Dock permette d'amplifier les signaux en activant plus de GTPases aux sites d'activation et en permettant de favoriser la formation de complexe via différentes molécules adaptatrices telles que Elmo et CrkII.

Phosphorylation de Dock5

Tel que mentionné ci-dessus (**voir 5.8 p.35**), la régulation d'une protéine Dock par phosphorylation a été rapportée dans une seule publication et celle-ci démontrait que Dock7 est directement phosphorylée en tyrosine par le récepteur ErbB2 et ceci augmente son activité GEF pour les GTPases Rac1 et Cdc42³⁷⁴. Ainsi, nous avons tout d'abord testé si la phosphorylation de Dock5 affectait son activité GEF pour Rac1. D'après nos résultats, l'activation de Rac n'est pas significativement affectée par l'expression de différentes kinases et de Dock5. De plus, la stabilité de Dock5 ne semble pas non plus être affectée par la surexpression des kinases testées et nous n'avons pas été en mesure de tester la localisation de Dock5 lorsque phosphorylée. Nos données suggèrent plutôt que la phosphorylation de Dock5 aurait un effet inhibiteur en l'empêchant d'interagir avec certains de ses partenaires. Ceci est toutefois difficile à réconcilier avec la fonction promigratoire de Dock5 en aval des intégrines. En effet, Dock5 est nécessaire pour l'étalement et la migration cellulaire en réponse au collagène IV³⁰³. La phosphorylation de Dock5 est, d'après nos résultats, maximale après 60 minutes et est maintenue jusqu'à 3 heures. Ainsi, une explication serait que la phosphorylation de Dock5 est un mécanisme de rétroaction négative pour inhiber l'activation de Rac après une stimulation prolongée des intégrines. On ne peut toutefois pas exclure que la phosphorylation de Dock5 ait des effets différents selon le résidu phosphorylé, le contexte cellulaire et la kinase impliquée.

D'après la littérature, la région C-terminale de Dock5 est hautement phosphorylée en Ser/Thr tout particulièrement lors de la mitose²⁸⁵. De plus, parmi les kinases identifiées, au moins 3 sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire : Nek2, Nek6, Plk1. Ceci suggère que l'activité de Dock5 et son interaction avec certains

de ses partenaires sont hautement régulées lors de la progression du cycle cellulaire. Lors de la mitose, les cellules changent complètement de morphologie et adoptent une forme très ronde. Ceci est régulé entre autres par la GTPase Rho qui induit la contraction des faisceaux d'actine : myosine. Ainsi, il est concevable que la signalisation en aval de Dock5 soit inhibée pour éviter l'activation de Rac durant cette période.

Nous ne pouvons pas exclure que Dock180 soit elle aussi phosphorylée et que les peptides phosphorylés n'aient pas été détectés en spectrométrie de masse. De plus, la publication de Kiyokawa & al fait rapport d'une augmentation de la liaison entre CrkII et Dock180 lorsque cette dernière est phosphorylée ³⁷⁵. D'après nos résultats, Dock5 n'interagit pas avec CrkII. Ainsi, la dimérisation entre Dock180 et Dock5 ne réconcilie pas complètement ces données.

De la même façon, il est possible que d'autres résidus soient phosphorylés sur Dock5 et que nous ne les ayons pas détectés. En effet, la mutation des résidus identifiés en alanine n'a pas diminué les niveaux de phosphorylation de Dock5 en essai kinase *in vitro* ce qui suggère que d'autres sites sont phosphorylés par les kinases que nous avons identifiées. Pour cette raison, nous n'avons pas testés le mutant Dock5 AAA en essais fonctionnels. Toutefois, l'obtention d'un mutant non-phosphorylable de Dock5 permettrait d'étudier l'effet de cet événement sur son activité GEF, sa localisation et sa stabilité et serait un outil fort utile pour la poursuite de ce projet.

Criblage du kinome humain

Le criblage du kinome humain nous a fourni 14 Ser/Thr kinases pouvant phosphoryler la région PXXP de Dock5. Ces kinases ayant été identifiées et

confirmées *in vitro*, nous ne pouvons mettre de côté qu'elles ont une activité kinase non-spécifique. De plus, la présence d'un tag GST sur les kinases et sur le substrat peut causer certains problèmes. En effet, il est possible que le tag ait modifié la conformation des kinases de façon à les activer ou les inhiber, ou encore modifier leur activité pour leur substrat. Le tag GST sur le substrat pourrait quant à lui induire une affinité artificielle avec la kinase. Ainsi, dans un criblage comme celui-ci, on ne peut pas mettre de côté que la phosphorylation détectée *in vitro* soit due à une activité non-spécifique. Cependant, la confirmation de la phosphorylation de la sérine 1863 à l'aide de l'anticorps phosphospécifique par au moins 4 des kinases suggère que celles-ci sont réellement des kinases pour Dock5.

Notre objectif initial était d'identifier la kinase responsable de la phosphorylation de Dock5 en aval des intégrines. Ainsi, lorsque les résultats du criblage nous sont parvenus, nous avons aussitôt fait une revue de la littérature pour chacune d'elles en espérant en trouver une dont l'activité semble être liée à la signalisation des intégrines. Malheureusement, aucun lien entre la signalisation par les intégrines et les 16 kinases identifiées n'a été trouvé dans la littérature. Nous avons ensuite répété l'expérience d'essai kinase *in vitro*, mais cette fois-ci en stimulant les cellules à la fibronectine avant la précipitation des kinases pour tester si l'activité d'une d'entre elles est régulée par l'adhésion (résultats non-présentés). À notre grande déception, l'activité d'aucunes des kinases n'a varié significativement entre les cellules stimulées à la fibronectine et celles gardées en suspension. Ainsi, nos données suggèrent que nous n'avons pas trouvé la kinase responsable de la phosphorylation de Dock5 en aval des intégrines et d'autres approches telles que l'ARNi pourront être utilisées dans le futur pour tenter de la trouver.

Les cascades de signalisation en aval des intégrines impliquent majoritairement des événements de phosphorylation/déphosphorylation sur des

résidus Tyrosine. Toutefois, l'activité de certaines Ser/Thr kinases est régulée par l'adhésion. Ainsi les voies MAP kinases ERK, JNK et p38 sont activées lors de l'engagement des intégrines. De plus, les kinases AKT/PKB, PAK et Ilk sont elles aussi régulées par l'adhésion^{314, 316}, bien que l'activité kinase cette dernière soit controversée³⁷⁶. Il est déjà connu que l'engagement des intégrines mène au recrutement de Dock180 via l'activation des kinases FAK, Src et des molécules adaptatrices p130Cas et CrkII^{319, 320, 376}. Ainsi, la découverte d'une nouvelle kinase régulant les protéines Dock ajouterait un nouveau mécanisme de régulation à cette voie de signalisation.

Les régions PXXP des protéines Dock

L'absence d'activité catalytique *in vivo* du domaine DHR2 de Dock5 est fort intrigant puisque le même domaine avec le même tag exprimé dans des bactéries a une activité catalytique similaire au domaine DHR2 de Dock180. Ceci suggère qu'il existe un mécanisme de régulation que nous ne comprenons pas encore. De plus, l'absence d'activité catalytique *in vivo* des domaines DHR2+PXXP de Dock180 et de Dock5 suggère aussi un mécanisme de régulation impliquant la région PXXP. Les régions PXXP sont les régions les plus divergentes entre les protéines Dock180, Dock5 et Dock2 et pourraient leur fournir différentes spécificités de signalisation. Ces régions sont impliquées dans les interactions protéine-protéine et peuvent interagir avec les domaines SH3. Ainsi, Kiyokawa & al ont démontré que la phosphorylation de Dock180/Dock5 suite à une stimulation à la fibronectine ou à la surexpression des formes oncogéniques de CrkII et Src est associée à une augmentation de la formation de complexes entre p130Cas/CrkII/Dock180. Ainsi, la phosphorylation de protéines Dock dans cette région peut possiblement réguler l'interaction entre celles-ci et certaines protéines contenant des domaines SH3. Nous avons donc testé l'interaction entre Dock5 et différentes protéines contenant ce domaine. À notre

grande surprise, Dock5 n'interagit pas avec le domaine SH3 de CrkII et ce résultat a été confirmé en immunoprécipitation. Ceci va à l'encontre de données publiées précédemment et nous ne pouvons réconcilier le tout³¹⁴. Nous avons été en mesure de démontrer que la phosphorylation inhibe l'interaction entre Dock5 et les protéines contenant des domaines SH3. Il est aussi possible que la phosphorylation de Dock5 affecte en plus sa dimérisation avec Dock180 ou encore son interaction avec Rac1.

Expériences futures

Bien que nous ayons quelques indices quant à l'effet de la phosphorylation de Dock5, beaucoup de travail reste à faire pour comprendre l'impact physiologique de cet événement sur la signalisation en aval de Rac. Une des expériences futures serait d'étudier la localisation de Dock5 coexprimée avec les différentes kinases dans des cellules stimulées à la fibronectine pour tester si la phosphorylation affecte sa localisation. De plus, un mutant Δ PXXP pourrait être utilisé dans des essais fonctionnels avec un RNAi contre Dock5 endogène pour tester si cette protéine tronquée peut compenser pour la perte de Dock5 ou si au contraire elle est nécessaire pour l'activité de Dock5

Jusqu'à présent, les données publiées suggèrent fortement que Dock5 et Dock180 jouent des rôles redondants^{285, 287}. Il serait donc intéressant d'étudier la fonction biologique de la dimérisation entre ces deux protéines. Il est concevable que les deux protéines coopèrent ensemble pour recruter aux sites d'activation de Rac les effecteurs nécessaires pour transduire le signal. De plus, il serait intéressant de tester l'interaction entre Dock5 et Dock2 ainsi que d'autres protéines Dock appartenant à des sous-familles différentes pour tester si la dimérisation est possible à travers toutes les protéines Dock ou plutôt restreinte au sein d'une sous-famille.

Matériel et Méthodes

Anticorps

Les anticorps suivants ont été obtenus commercialement : anti-Dock180 (H70 et H4), anti-ha (F-7) et anti-myc (9E10) de Santa Cruz Biotechnologies, anti-Rac (23A8) de Millipore et anti-flag (M2) et anti-tubuline (T5168) de Sigma, Streptavidine-HRP (554066) et anti-hCD25-PE (555749) de BD Biosciences. Des anticorps polyclonaux ont été générés pour Dock5 et pour pSer1863 de Dock5 en utilisant les peptides du gène de Dock5 murin 1819-1838 et 1852-1865 respectivement comme immunogène chez Genscript. L'anticorps pSer1863 coréagit avec la forme humaine de Dock5 alors que celui contre Dock5 ne coréagit pas à des niveaux détectables.

Culture cellulaire et transfections

Les HEK293T, Pho3 et les NIH 3T3 ont été cultivées dans du DMEM 10% sérum fœtal de bovin (FBS), 1% pénicilline/streptomycine (Invitrogen). Les cellules NMuMG ont été cultivées dans du DMEM 10% sérum fœtal de bovin, 1% pénicilline/streptomycine, 2mM L-glutamine, 20mM HEPES pH 7.4, 1ug/ml puromycine, 10ug/ml insuline. Les HEK293T et les Pho3 ont été transfectées par calcium phosphate selon les procédures standards ou par Lipofectamine 2000 (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. Les NIH 3T3 et les NMuMG ont été transfectées uniquement par Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Généralement, 10ug d'ADN ont été utilisés pour transfecter des puits de 10cm (calcium phosphate) alors que 4ug d'ADN ont été utilisés pour transfecter des puits d'une plaque de 6 puits (Lipofectamine 2000). Les analyses biochimiques ont été faites de 24 à 48 heures suivant la transfection.

Stimulation à la fibronectine

Les cellules ont été incubées toute la nuit dans DMEM 0,5% FBS, détachées dans 1X HBSS, 0,01% Trypsine, 25mM HEPES pH 7,4, 5mM EDTA pH 8,0, resuspendues dans FMB (Cambrex Biosciences) 0,5% BSA puis incubées 30 minutes en suspension. Ensuite, la moitié des cellules ont été déposée sur une plaque de culture cellulaire opsonisée avec de la fibronectine pendant 1 heure. L'autre moitié a été maintenue en suspension pendant la même période. Pour opsonier les plaques de culture cellulaire, elles ont été recouvertes avec 1X PBS 10ug/ml fibronectine (Corning) et gardées à 4°C toute la nuit avec une légère rotation. Juste avant l'expérience, les plaques ont été lavées extensivement trois fois avec du PBS.

Plasmides et constructions

Le vecteur pTRE BIOTEV a été obtenu du Dr. Strouboulis. Les gènes hRac1 WT, V12 et N17 ont été clonés dans ce vecteur en premier lieu puis sous-cloné avec le BIOTAG dans le vecteur pCDNA Zéo à l'aide de Kpn1 et BamH1. Le plasmide rétroviral pOZ hBirA a été obtenu tel quel du Dr. Ogryzko, Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, France. hRac1-flag a été cloné dans pCDNA flag à l'aide Not1-Xho1. hLasp-1 a été acheté commercialement du Open Biosystems puis sous-cloné dans pCDNA myc à l'aide de BamH1 et EcoR1. Fzd10 a été acheté commercialement de Origene et clonée dans pCDNA myc à l'aide de BamH1 et Not1. Les plasmides de Tao1 et Tao3 ont été obtenus du Dr. Mélanie Cobb, Université du Texas, États-Unis. PKD2 a été obtenu du Dr. Tsiokas et Dock5-flag du Dr. Matsuda, Université de Kyoto, Japon. Toutes les kinases portant un tag GST ont été obtenues du laboratoire du Dr. Sreaton, Children's Hospital of Eastern Ontario Research Institute, Canada. Les domaines SH3 fusionnés au GST ont été obtenus du Dr. Vuori, Burnham Institute for Medical

Institute, États-Unis. La construction Dock5 C-terminale (1561-1868) fusionnée au GST a été cloné dans pGEX 4T1. Les domaines DHR2 (1228-1618) et DHR2+PXXP (1228-1865) de Dock180 ont été cloné dans pGEX 4T1 et dans pEBG à l'aide de BamH1-Not1. Les domaines DHR2 (1258-1643) et DHR2+PXXP (1258-1868) de Dock5 ont été cloné dans pGEX 4T1 à l'aide de EcoR1-Xho1 et dans pEBG à l'aide de Not1-Not1.

Infection virale et établissement des lignées stables

Les virus ont été produits dans les cellules Pho3 dans lesquelles le plasmide rétroviral pOZ hBira a été transfecté par calcium phosphate. Le surnageant a été récolté 48 heures après la transfection, centrifugés et filtrés sur un filtre de 0.45um. La soupe virale ainsi obtenue a été déposée sur les cellules d'intérêt (NMuMG et NIH 3T3) à 30-40% confluente avec 4ug/ml de polybrène (Sigma L107689). Les analyses biochimiques ont été faites de 24 à 48 heures après l'infection. Les cellules sélectionnées selon leur résistance à un antibiotique ont été divisées 1 : 15 24 heures après la transfection puis sélectionnées à la Zéocine (Invitrogen R25001) 24 heures plus tard. Elles ont été maintenues en sélection jusqu'à ce que les clones puissent être piqués (environ 14 jours) puis maintenues en sélection jusqu'à ce qu'elles soient analysées pour l'expression de la protéine d'intérêt. Finalement, les clones conservés ont été maintenus dans un milieu complet contenant de la zéocine.

Cytométrie de flux

Afin de conserver seulement les cellules ayant incorporées le plasmide rétroviral, elles ont été triées par cytométrie de flux selon l'expression de la région extracellulaire du hIL-2R α . Les cellules triées en cytométrie ont été lavées une fois dans le tampon A (1x PBS, 1% FBS, 0,09% azide de sodium), détachées dans une solution non-enzymatique (1X PBS 0,4M EDTA), récupérées dans le tampon A, centrifugées et resuspendues à

1×10^7 cellules/ml. $1-2 \times 10^6$ cellules ont été incubées avec 20 μ l d'anticorps anti-CD25-PE pendant 20 minutes, lavées deux fois dans du tampon A puis resuspendues dans 500 μ l. La cytométrie a été faite par Martine Dupuis et Éric Massicotte de la plateforme de cytométrie de l'IRCM sur le trieur MoFlo.

Immunoprécipitation, GST pull-down, PBD pull-down et purification à la Streptavidine

Pour les immunoprécipitations et les GST *pull-down*, les cellules ont été lysées 10 minutes dans 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 1% NP-40 (Roche) et 1X *Complete Protease Inhibitors* (Roche). Lorsque nécessaires, 5mM NaF et/ou 5mM EDTA/10mM $MgCl_2$ ont été ajoutés au tampon de lyse pour inhiber les phosphatases ou stabiliser Rac dans sa conformation déchargée ou chargée respectivement. Pour les immunoprécipitations, 500 μ g de lysats clarifiés ont été incubés avec l'anticorps adéquat et des billes de sépharose opsonisées de protéine A (Invitrogen) pendant 45 minutes. Pour les GST *pull-down*, les protéines fusionnées à la GST ont été produites dans des bactéries BL21 en stimulant 2-3 heures avec 100 μ M IPTG. Les bactéries ont été centrifugées, resuspendues dans 1X PBS 1% Triton 1X *Complete Protease Inhibitors* (Roche) puis soniquées 3 fois 20 secondes avec des intervalles de 1 minute. Les lysats bactériens clarifiés ont été incubés sur des billes de sépharose (Amersham) selon les procédures standards. Des quantités égales de chaque protéine de fusion ont ensuite été incubées avec 500 μ g de lysats cellulaires clarifiés pendant 1 heure. Pour les deux types de précipitation, les billes ont été lavées trois fois dans le tampon de lyse, et les protéines chargées sur gel SDS-PAGE et analysées par immunobuvardage de type Western. Les PBD *pull-down* ont été faits en suivant une procédure similaire, mais les cellules ont été lysées dans le tampon de lyse MLB (25mM Hepes pH 7,5, 150mM NaCl, 1% NP-40, 10mM $MgCl_2$, 1mM EDTA, 10% glycérol) et incubés avec le domaine PBD pendant 30 minutes.

Lors de la purification des complexes protéiques à la Streptavidine pour la spectrométrie de masse, 20 plaques de 20 cm confluentes ont été lysées dans le tampon de lyse MLB 1X *Complete Protease Inhibitors* dans la chambre froide. Les lysats ont été clarifiés, filtrés sur un filtre 0,45µm puis environ 20mg et 60 mg (NIH 3T3 et NMuMG respectivement) ont été incubés 10 minutes avec des billes d'agarose de haute capacité opsonisées avec de la streptavidine (Thermo scientific 20357).

Spectrométrie de masse : préparation des échantillons et analyses

Les protéines purifiées à la streptavidine ont été chargées sur un gel SDS-page pré-coulé à gradient 4%-15% (Invitrogen) et colorées au Nitrate d'Argent. Chaque puit a ensuite été coupé en 15-21 bandes dans la chambre blanche et les bandes ont été gardées à -80°C. Pour l'analyse des peptides phosphorylés de Dock180/Dock5, des fibroblastes NIH 3T3 ont été incubés toute la nuit dans du DMEM 0,5% FBS, puis stimulés à la fibronectine ou gardé en suspension pendant 1 heure dans du FBM 0,5% BSA (Cambrex Biosciences) (voir précédemment), lysés dans du 50mM Tris-HCl, pH 7,5, 150mM NaCl, 1% NP-40 (Roche), 5mM NaF, 200µM NaVO₄ et 1X *Complete Protease Inhibitors* (Roche). À partir d'environ 4mg de lysat cellulaires clarifié, Dock180 a été immunoprécipité avec 60µl de l'anticorps anti-Dock180 H70 (Santa Cruz). Les protéines ont été chargées sur un gel SDS-page pré-coulé (Invitrogen NP0335BOX), et colorées au Bleu de Coomassie (Bio-Rad, 161-0786). La bande correspondant à Dock180 a été coupée en chambre blanche et gardée à -80°C. Les analyses de spectrométrie de masse ont été faites en partie par la plateforme de protéomique de l'IRCM (identification des partenaires de Rac) et par le laboratoire du Dr. Gaétan Thibault à l'IRIC (identification des partenaires de Rac et analyse des phosphopeptides). Pour l'analyse des peptides phosphorylés, il y a eu une étape d'enrichissement des phosphopeptides sur une colonne de TiO₂.

Transcription/translation *in vitro*

Le système T7 TnT (Promega) et de la méthionine S35 ont été utilisés selon les directives du fabricant. Les protéines ainsi obtenues ont été utilisées dans un GST *pull-down* tel que décrit ci-dessus et les résultats ont été visualisés par autoradiographie amplifiée par *Amplify Reagent* (Amersham).

Purification de protéines, chargement *in vitro* de Rac et essai GEF *in vitro*

Les protéines de fusion ont été exprimées dans des bactéries BL21 toute la nuit à 16°C après induction avec 100µM IPTG à une densité optique de $OD_{600}=0,6-0,8$. Les bactéries ont été lysées par sonication à 4°C dans 1X PBS 1X *Complete Protease Inhibitors* (Roche), centrifugées, filtrées sur un filtre 0,45µm et les protéines ont été purifiées sur un ÄKTA PRIME PLUS à l'aide d'une colonne GST Trap HP 1ml. Rac a été purifiée de cette façon en présence de 5mM EDTA pH8,0, incubée 15 minutes à température pièce dans 10mM Hepes pH 7,4, 100mM NaCl, 2mM EDTA pH 8,0, 0,2 mM DTT, 100µM GTP γ S/GDP/mant-GDP (Sigm G8634/G7127/Molecular Probe M12414) puis stabilisée avec 10mM MgCl₂. Rac ainsi chargée a été utilisée dans les 4 heures suivantes ou congelée à -80°C. Pour les essais GEF *in vitro*, Rac1•mant-GDP a été incubée avec 10mM Hepes pH 7,4, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 0,2mM DTT, 0,5 mg/ml BSA et les lectures ont été prises à température pièce (environ 24°C) à l'aide d'un (Spectra Max Gemini EM) toutes les 5 secondes pendant 30 minutes. La longueur d'onde d'excitation est 366nm et la longueur d'onde d'émission est 450nm.

Marquage métabolique au ^{35}S

Les cellules ont été incubées 1 heure dans du milieu complet contenant 10mM MG-132 ou un volume équivalent de DMSO, lavées deux fois puis incubées 15 minutes dans du DMEM sans L-méthionine, L-cystéine, L-glutamine et sodium pyruvate, 2mM L-glutamine, 1mM sodium pyruvate (Invitrogen), 10mM MG-132 ou DMSO. Puis incubée 30 minutes dans le même tampon contenant 0.2mCi/ml de L-méthionine et L-cystéine marquées au ^{35}S (EXPRE $^{35}\text{S}^{35}\text{S}$ Protein Labeling Mix, Perkin Elmer NEG772002MC). Les cellules sont ensuite incubées dans du milieu complet pour les temps indiqués. Ces cellules ont ensuite été lysées et utilisées en immunoprécipitation tel que décrit ci-dessus. Les gels ont ensuite été séchés et incubés 30 minutes dans du *Amplify Reagent* (Amersham). Les résultats ont été visualisés par autoradiographie.

Marquage métabolique au ^{32}P

Les cellules NIH 3T3 ont été amenées à confluence puis incubées toute la nuit dans du DMEM 0,5% FBS. Elles ont ensuite été lavées avec du DMEM sans phosphate (DMEM-PF) puis incubées 4 heures dans du DMEM-PF 0,5% FBS 100uCi/ml ^{32}P i. Les cellules ont été lavées de nouveau avec du DMEM-PF, trypsinisées, lavées une fois au DMEM-PF 0,5% BSA puis finalement resuspendues dans du DMEM-PF 0,5%BSA 100uCi/ml ^{32}P i et incubées ainsi pendant 10 minutes. Finalement, les cellules ont été déposées sur une plaque de culture cellulaire opsonisées de fibronectine ou gardées en suspension (Corning) et incubées pour les temps indiquées. Ensuite, les cellules ont lysées tel que décrit précédemment et Dock180 a été immunoprécipité à l'aide de l'anticorps H70. Les protéines ont été chargées sur gel SDS-PAGE et les résultats ont été analysés par autoradiographie.

Criblage des kinases

Pour le criblage du kinome, la région C-terminale de Dock5 en fusion avec un GST a été purifiée à partir de bactéries tel que décrit précédemment. Les protéines ont ensuite été envoyées dans le laboratoire du Dr. Sreaton où le criblage a été fait. Brièvement, les kinases ont été transfectées dans des 293T puis les cellules ont été lysées et les kinases-GST ont été immobilisées dans le fond d'un puit d'une plaque de 96 puits (une kinase/puit). Finalement, le substrat ainsi que de l'ATP $\gamma^{32}\text{P}$ ont été incubés de façon à phosphoryler *in vitro* le substrat. Les protéines ont été chargées sur un gel SDS-PAGE et les résultats visualisés par autoradiographie.

Essai kinase *in vitro*

Les kinases ont été immunoprécipitées tel que décrit précédemment puis les billes ont été lavées deux fois au 50mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 6mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 50uM ATP, 200uM NaVO₄, 1mM NaF. Les billes ont été resuspendues dans le même tampon contenant 2mM DTT, 5-10uCi ATP $\gamma^{32}\text{P}$ (Perkin Elmer NEG502A) et 2ug de substrat, et incubé 30-60 minutes à 30°C puis les protéines ont été chargées sur gel SDS-page. Les résultats ont été visualisés par autoradiographie.

Bibliographie

1. (eds. cancer, S.c.d., Canada, S., territoires, R.d.c.d.p.e.d. & Canada, A.l.s.p.d.) (2009).
2. Mehlen, P. & Puisieux, A. Metastasis: a question of life or death. *Nature Reviews Cancer* 6, 449-458 (2006).
3. Chambers, A.F., Groom, A.C. & MacDonald, I.C. Dissemination and Growth of Cancer Cells in Metastatic Sites. *Nature Reviews Cancer* 2, 563-572 (2002).
4. Weiss, L. Metastatic inefficiency. *Advance Cancer Research* 54, 159-211 (1990).
5. Wong, C.W. et al. Apoptosis: An Early Event in Metastatic Inefficiency. *Cancer Research* 61, 333-338 (2001).
6. Sahai, E. Illuminating the metastatic process. *Nature Reviews Cancer* 7, 737-749 (2007).
7. Lauffenburger, D.A. & Horwitz, A.F. Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. *Cell* 84, 359-369 (1996).
8. Raftopoulou, M. & Hall, A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Developmental biology* 265, 23-32 (2004).
9. Lee, J., Ishimira, A., Theriot, J.A. & Jacobson, K. Principles of locomotion for simple-shaped cells. *Nature* 362, 167-171 (1993).
10. Sheetz, M.P. Cell migration by graded attachment to substrates and contraction. *Seminar in cell biology* 5, 149-155 (1994).
11. Sullivan, S.J., Daukas, G. & Zigmond, S.H. Asymmetric Distribution of the Chemotactic Peptide Receptor on Polymorphonuclear Leukocytes. *Journal of Cell Biology* 99, 1461-1467 (1984).
12. Lawson, M.A. & Maxfield, F.R. Ca^{2+} - and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature* 377, 75-79 (1995).

13. Schmidt, C.E., Horwitz, A.F., Lauffenburger, D.A. & Sheetz, M.P. Integrin-Cytoskeletal Interactions in Migrating Fibroblasts are Dynamic, Asymmetric, and Regulated. *Journal of Cell Biology* 123, 977-991 (1993).
14. Coates, T.D., Watts, R.G., Hartman, R. & Howard, T.H. Relationship of F-actin Distribution to Development of Polar Shape in Human Polymorphonuclear Neutrophils. *Journal of Cell Biology* 117, 765-774 (1992).
15. Wang, Y.-L. Exchange of Actin Subunits at the Leading Edge of Living Fibroblasts: Possible Role of Treadmilling. *Journal of Cell Biology* 101, 597-602 (1985).
16. Borisy, G. & Svitkina, T.M. Actin machinery: pushing the envelope. *Current Opinion in Cell Biology* 12, 104-112 (2000).
17. Carson, M., Weber, A. & Zigmond, S.H. An Actin-nucleating Activity in Polymorphonuclear Leukocytes Is Modulated by Chemotactic Peptides. *Journal of Cell Biology* 103, 2707-2714 (1986).
18. Palecek, S.P., Loftus, J.C., Ginsberg, M.H., Lauffenburger, D.A. & Horwitz, A.F. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* 385, 537-540 (1997).
19. Beningo, K.A., Dembo, M., Kaverina, I., Small, J.V. & Wang, Y.-L. Nascent Focal Adhesions Are Responsible for the Generation of Strong Propulsive Forces in Migrating Fibroblasts. *Journal of Cell Biology* 153, 881-887 (2001).
20. Galbraith, C.G. & Sheetz, M.P. A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 9114-9118 (1997).
21. Lee, J., Leonard, M., Oliver, T., Ishimira, A. & Jacobson, K. Traction Forces Generated by Locomoting Keratocytes. *Journal of Cell Biology* 127, 1957-1964 (1994).
22. Palecek, S.P., Huttenlocher, A., Horwitz, A.F. & Lauffenburger, D.A. Physical and biochemical regulation of integrin release during rear detachment of migrating cells. *Journal of Cell Science* 111, 929-940 (1998).

23. Oliver, T., Dembo, M. & Jacobson, K. Separation of Propulsive and Adhesive Traction Stresses in Locomoting Keratocytes. *Journal of Cell Biology* 145, 589-604 (1999).
24. Miyamoto, S. et al. Integrin Function: Molecular Hierarchies of Cytoskeletal and Signaling Molecules. *Journal of Cell Biology* 131, 791-805 (1995).
25. Miyamoto, S., Akiyama, S.K. & Yamada, K.M. Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *science* 267, 883-887 (1995).
26. Broussard, J.A., Webb, D.J. & Kaverina, I. Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells. *Current Opinion in Cell Biology* 20, 85-90 (2008).
27. Bershadsky, A.D., Balaban, N.Q. & Geiger, B. Adhesion-Dependent Cell Mechanosensitivity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19, 677-695 (2003).
28. Rid, R., Schiefermeier, N., Grigoriev, I., Small, J.V. & Kaverina, I. The Last but not the Least: The Origin and Significance of Trailing Adhesions in Fibroblastic Cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 61, 161-171 (2005).
29. Jay, P.Y., Pham, P.A., Wong, S.A. & Elson, E.L. A mechanical function of myosin II in cell motility. *Journal of Cell Science* 108, 387-393 (1995).
30. Cai, Y. et al. Nonmuscle Myosin IIA-Dependent Force Inhibits Cell Spreading and Drives F-Actin Flow. *Biophysical Journal* 91, 3907-3920 (2006).
31. Ridley, aJ. et al. Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science* 302, 1704-1709 (2003).
32. Webb, D.J., Parsons, J.T. & Horwitz, A.F. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells - over and over and over again. *Nature Cell Biology* 4, E97-E100 (2002).
33. Crowley, E. & Horwitz, A.F. Tyrosine Phosphorylation and Cytoskeletal Tension Regulate the Release of Fibroblast Adhesions. *Journal of Cell Biology* 131, 525-537 (1995).
34. Regen, C.M. & Horwitz, A.F. Dynamics of β_1 Integrin-mediated Adhesive Contacts in Motile Fibroblasts. *Journal of Cell Biology* 119, 1347-1359 (1992).

35. Korn, E.D., Carlier, M.-F. & Pantaloni, D. Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science* 238, 638-644 (1987).
36. Welch, M.D., Iwamatsu, A. & Mitchison, T.J. Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *nature* 385, 265-270 (1997).
37. Robinson, R.C. et al. Crystal Structure of Arp2/3 Complex. *Science* 294, 1679--1684 (2001).
38. Ahuja, R. et al. Cordon-Bleu Is an Actin Nucleation Factor and Controls Neuronal Morphology. *cell* 131, 337-350 (2007).
39. Chhabra, E.S. & Higgs, H.N. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nature Cell Biology* 9, 1110-1121 (2007).
40. Quinlan, M.E., Heuser, J.E., Kerkhoff, E. & Mullins, R.D. *Drosophila* Spire is an actin nucleation factor. *nature* 433, 382-388 (2005).
41. Wennerberg, K., Rossman, K.L. & Der, C.J. The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science* 118, 843-846 (2005).
42. Colicelli, J. Human RAS Superfamily Proteins and Related GTPases. *Science's Signal Transduction knowledge environment* 250, RE13 (2004).
43. Bourne, H.R., Sanders, D.A. & McCormick, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117-127 (1991).
44. Bourne, H.R., Sanders, D.A. & McCormick, F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348, 125-132 (1990).
45. Pai, E.F. et al. Refined crystal structure of the triphosphate conformation for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO Journal* 9, 2351-2359 (1990).
46. Romero, G., Chau, V. & Biltonen, R.L. Kinetics and Thermodynamics of the Interaction of Elongation Factor Tu with Elongation Factor Ts, Guanine Nucleotides, and Aminoacyl-tRNA. *Journal of Biological Chemistry* 10, 6167-6174 (1985).
47. Powers, S., O'Neill, K. & Wigler, M. Dominant Yeast and Mammalian RAS Mutants That Interfere with the CDC25-Dependent Activation of Wild-Type RAS in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 9, 390-395 (1989).

48. Hwang, Y.-W., Sanchez, A. & Miller, D.L. Mutagenesis of Bacterial Elongation Factor Tu at Lysine 136. *Journal of Biological Chemistry* 264, 8304-8309 (1989).
49. Jaffe, A.B. & Hall, A. Rho GTPases: Biochemistry and Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21, 247-269 (2005).
50. Neal, S.E., Eccleston, J.F., Hall, A. & Webb, M.R. Kinetic Analysis of the Hydrolysis of GTP by p21^{N-ras}. *Journal of Biological Chemistry* 263, 19718-19722 (1988).
51. John, J., Frech, M. & Wittinghofer, A. Biochemical Properties of Ha-ras Encoded p21 Mutants and Mechanism of the Autophosphorylation Reaction. *Journal of Biological Chemistry* 263, 11792-11799 (1988).
52. Heasman, S.J. & Ridley, a.J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from *in vivo* studies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 690-701 (2008).
53. DerMardirossian, C. & Bokoch, G.M. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends in Cell Biology* 15, 356-363 (2005).
54. Ueda, T., Kikuchi, A., Ohga, N., Yamamoto, J. & Takai, Y. Purification and Characterization from Bovine Brain Cytosol of a Novel Regulatory Protein Inhibiting the Dissociation of GDP from and the Subsequent Binding of GTP to *rhoB* p20, a *ras* p21-like GTP-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* 265, 9373-9380 (1989).
55. Chuang, T.-H., Xu, X., Knaust, U.G., Hart, M.J. & Bokoch, G.M. GDP Dissociation Inhibitor Prevents Intrinsic and GTPase Activating Protein-stimulated GTP Hydrolysis by the Rac GTP-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* 268, 775-778 (1993).
56. Hoffman, G.R., Nassar, N. & Cerione, R.A. Structure of the Rho Family GTP-Binding Protein Cdc42 in Complex with the Multifunctional Regulator RhoGDI. *Cell* 100, 345-356 (2000).
57. Longenecker, K. et al. How RhoGDI binds Rho. *Acta Crystallographica D55*, 1503-1515 (1999).
58. Scheffzek, K., Stephan, I., Jensen, O.N., Illenberger, D. & Gierschik, P. The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI. *Nature Structural Biology* 7, 122-126 (2000).

59. Grizot, S. et al. Crystal structure of the Rac1-RhoGDI complex involved in nadph oxidase activation. *biochemistry* 40, 10007-10013 (2001).
60. Chuang, T.-H., Bohl, B.P. & Bokoch, G.M. Biologically Active Lipids Are Regulators of Rac-GDI Complexation. *Journal of Biological Chemistry* 268, 26206-26211 (1993).
61. Wu, Y. et al. Src phosphorylation of RhoGDI2 regulates its metastasis suppressor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 5807-5812 (2009).
62. DerMardirossian, C., Schnelzer, A. & Bokoch, G.M. Phosphorylation of RhoGDI by Pak1 Mediates Dissociation of Rac GTPase. *molecular cell* 15, 117-127 (2004).
63. DerMardirossian, C., Rocklin, G., Seo, J.-Y. & Bokoch, G.M. Phosphorylation of RhoGDI by Src Regulates Rho GTPase Binding and Cytosol-Membrane Cycling. *Molecular Biology of the Cell* 17, 4760-4768 (2006).
64. Iden, S. & Collard, J.G. Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 846-859 (2008).
65. Wherlock, M. & Mellor, H. The Rho GTPase family: a Racs to Wrchs story. *Journal of Cell Science* 115, 239-240 (2002).
66. Madaule, P. & Axel, R. A novel *ras*-related gene family. *cell* 41, 31-40 (1985).
67. Ohashi, Y., Kamiya, T., Fujiwara, M. & Narumiya, S. ADP-ribosylation by type C1 and D botulinum neurotoxins: Stimulation by guanine nucleotides and inhibition by guanidino-containing compounds. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 142, 1032-1038 (1987).
68. Ohashi, Y. & Narumiya, S. ADP-ribosylation of a *M_r* 21,000 Membrane Protein by Type D Botulinum Toxin. *Journal of Biological Chemistry* 262, 1430-1433 (1987).
69. Matsuoka, I., Syoto, B., Kurihara, K. & Kubo, S. ADP-ribosylation of specific membrane proteins in pheochromocytoma and primary-cultures brain cells by botulinum neurotoxins type C and D. *FEBS Letters* 216, 295-299 (1987).
70. Aktories, K. & Frevert, J. ADP-ribosylation of a 21-24 kDa eukaryotic protein(s) by C3, a novel botulinum ADP-ribosyltransferase, is regulated by guanine nucleotide. *Biochemical Journal* 247, 363-368 (1987).

71. Kikuchi, A., Yamamoto, K., Fujita, T. & Takai, Y. ADP-ribosylation of the Bovine Brain *rho* Protein by Botulinum Toxin Type C1. *Journal of Biological Chemistry* 263, 16303-16308 (1988).
72. Aktories, K., Braun, U., Röserner, S., Just, I. & Hall, A. The rho gene product expressed in E. Coli is a substrate of botulinum ADP-ribosyltransferase C3. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 158, 209-213 (1989).
73. Chardin, P. et al. The mammalian G protein *rhoC* is ADP-ribosylated by *Clostridium botulinum* exoenzyme C3 and affects actin microfilament in Vero cells. *EMBO Journal* 8, 1087-1092 (1989).
74. Ridley, A.J. & Hall, A. The Small GTP-Binding Protein rho Regulates the Assembly of Focal Adhesions and Actin Stress Fibers in Response to Growth Factors. *Cell* 70, 389-399 (1992).
75. Wheeler, A.P. & Ridley, a.J. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Experimental Cell Research* 301, 43-49 (2004).
76. Maekawa, M. et al. Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton Through Protein Kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 295, 895-898 (1999).
77. Sumi, T., Matsumoto, K. & Nakamura, T. Specific Activation of LIM kinase 2 via Phosphorylation of Threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 276, 67-676 (2001).
78. Kawano, Y. et al. Phosphorylation of Myosin-binding Subunit (MBS) of Myosin Phosphatase by Rho-Kinase In Vivo. *Journal of Cell Biology* 147, 1023-1037 (1999).
79. Narumiya, S., Tanji, M. & Ishizaki, T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Review* 28, 65-76 (2009).
80. Li, F. & Higgs, H.N. The Mouse Formin mDia1 Is a Potent Actin Nucleation Factor Regulated by Autoinhibition. *Current Biology* 13, 1335-1340 (2003).
81. Lammers, M., Rose, R., Scrima, A. & Wittinghofer, A. The regulation of mDia1 by autoinhibition and its release by Rho•GTP. *EMBO Journal* 24 (2005).
82. Rose, R. et al. Structural and Mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia. *Nature* 435, 513-518 (2005).

83. Goulimari, P. et al. $G\alpha_{12/13}$ Is Essential for Directed Cell Migration and Localized Rho-Dia1 Function. *Journal of Biological Chemistry* 280, 42242-42251 (2005).
84. Yamana, N. et al. The Rho-mDia1 Pathway Regulates Cell Polarity and Focal Adhesion Turnover in Migrating Cells through Mobilizing Apc and c-Src. *Molecular and Cellular Biology* 26, 6844-6858 (2006).
85. Ishizaki, T. et al. Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nature Cell Biology* 3, 8-14 (2001).
86. Palazzo, A.F., Cook, T.A., Alberts, A.S. & Gundersen, G.G. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nature Cell Biology* 3, 723-729 (2001).
87. Madaule, P. et al. A novel partner for the GTP-bound forms of *rho* and *rac*. *FEBS Letters* 377, 243-248 (1995).
88. Eda, M. et al. Rho-dependent transfer of Citron-kinase to the cleavage furrow of dividing cells. *Journal of Cell Science* 114, 3273-3284 (2001).
89. Madaule, P. et al. Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis. *nature* 394, 491-494 (1998).
90. Camera, P. et al. Citron-N is a neuronal Rho-associated protein involved in Golgi organization through actin cytoskeleton regulation. *Nature Cell Biology* 5, 1071-1078 (2003).
91. Chong, L.D., Traynor-Kaplan, A., Bokoch, G.M. & Schwartz, M.A. The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *cell* 79, 507-513 (1994).
92. Ren, X.D. et al. Physical association of the small GTPase Rho with a 68-kDa phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in Swiss 3T3 cells. *Molecular Biology of the Cell* 7, 435-442 (1996).
93. Coso, O.A. et al. The Small GTP-Binding Proteins Rac1 and Cdc42 Regulate the Activity of the JNK/SAPK Signaling Pathway. *cell* 81, 1137-1146 (1995).
94. Minden, A., Lin, A., Claret, F.-X., Abo, A. & Karin, M. Selective Activation of the JNK Signaling Cascade and c-Jun Transcriptional Activity by the Small GTPases Rac and Cdc42Hs. *cell* 81, 1147-1157 (1995).

95. Amano, M. et al. Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein kinase N. *Science* 271, 648-650 (1996).
96. Reid, T. et al. Rhotekin, a New Putative Target for Rho Bearing Homology to a Serine/Threonine Kinase, PKN, and Rhophilin in the Rho-binding Domain. *Journal of Biological Chemistry* 271, 13556-13560 (1996).
97. Watanabe, G. et al. Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein rhophilin as targets of small GTPase Rho. *Science* 271, 645-648 (1996).
98. Quilliam, L.A. et al. Isolation of a NCK-associated Kinase, PRK2, an SH3-binding Protein and Potential Effector of Rho Protein Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 271, 28772-28776 (1996).
99. Vincent, S. & Settleman, J. The PRK2 Kinase Is a Potential Effector Target of both Rho and Rac GTPases and Regulates Actin Cytoskeletal Organization. *Molecular and Cellular Biology* 17, 2247-2256 (1997).
100. Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R.L. & Hahn, K.M. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *nature* 440, 1069-1072 (2006).
101. El-Sibai, M. et al. RhoA/ROCK-mediated switching between Cdc42- and Rac1-dependent protrusion in MTLn3 carcinoma cells. *Experimental Cell Research* 314, 1540-1552 (2008).
102. Wong, K., Pertz, O. & Bourne, H.R. Neutrophil polarization: Spatiotemporal dynamics of RhoA activity support a self-organizing mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 3639-3644 (2006).
103. Adams, A.E., Johnson, D.I., Longnecker, R.M., Sloat, B.F. & Pringle, J.R. *CDC42* and *CDC43*, Two additional Genes Involved in Budding and the Establishment of Cell Polarity in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* 111, 131-142 (1990).
104. Nobes, C.D. & Hall, A. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases Regulate the Assembly of Multimolecular Focal Complexes Associated with Actin Stress Fibers, Lamellipodia, and Filopodia. *cell* 81, 53-62 (1995).
105. Kozma, R., Ahmed, S., Best, A. & Lim, L. The Ras-Related Protein Cdc42Hs and Bradykinin Promote Formation of Peripheral Actin Microspikes and Filopodia in Swiss 3T3 Fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology* 15, 1942-1952 (1995).

106. Ridley, aJ. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in Cell Biology* 16, 522-529 (2006).
107. Burridge, K. & Wennerberg, K. Rho and Rac Take Center Stage. *cell* 116, 167-179 (2004).
108. Faix, J. & Rottner, K. The making of filopodia. *Current Opinion in Cell Biology* 18, 18-25 (2006).
109. Hemsath, I., Dvorsky, R., Fiegen, D., Carlier, M.-F. & Ahmadian, M.R. An Electrostatic Steering Mechanism of Cdc42 Recognition by Wiskott-Aldrich Syndrome Proteins. *Molecular Cell* 20, 313-324 (2005).
110. Ellis, S. & Mellor, H. The novel Rho-family GTPase Rif regulates coordinated actin-based membrane rearrangements. *Current Biology* 10, 1387-1390 (2000).
111. Murphy, G.A. et al. Cellular functions of TC10, a Rho family GTPase: regulation of morphology, signal transduction and cell growth. *Oncogene* 18, 3831-3845 (1999).
112. Aspenström, P., Fransson, A. & Saras, J. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochemical Journal* 377, 327-337 (2004).
113. Tao, W., Pennica, D., Xu, L., Kalejta, R.F. & Levine, A.J. *Wrch-1*, a novel member of the Rho gene family that is regulated by Wnt-1. *Genes and Development* 15, 1796-1807 (2001).
114. Aronheim, A. et al. Chp, a homologue of the GTPase Cdc42Hs, activates the JNK pathway and is implicated in reorganizing the actin cytoskeleton. *Current Biology* 8, 1125-1128 (1998).
115. Vignal, E. et al. Characterization of TCL, a New GTPase of the Rho Family related to TC10 and Cdc42. *Journal of Biological Chemistry* 275, 36457-36464 (2000).
116. De Toledo, M. et al. The GTP/GDP Cycling of Rho GTPase TCL Is an Essential Regulator of the Early Endocytic Pathway. *Molecular Biology of the Cell* 14, 4846-4856 (2003).

117. Czuchra, A. et al. Cdc42 Is Not Essential for Filopodium Formation, Directed Migration, Cell Polarization, and Mitosis in Fibroblastoid Cells. *Molecular Biology of the Cell* 16, 4473-4484 (2005).
118. Aspenström, P., Lindberg, U. & Hall, A. Two GTPases, Cdc42 and Rac, bind directly to a protein implicated in the immunodeficient disorder Wiskott-Aldrich syndrome. *Current Biology* 6, 70-75 (1996).
119. Symons, M. et al. Wiskott-Aldrich Syndrome Protein, a Novel Effector for the GTPase CDC42Hs, Is Implicated in Actin Polymerization. *cell* 84, 723-734 (1996).
120. Miki, H., Suetsugu, S. & Takenawa, T. WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO Journal* 17, 6932-6941 (1998).
121. Castellano, F. et al. Inducible recruitment of Cdc42 or WASP to a cell-surface receptor triggers actin polymerization and filopodium formation. *Current Biology* 9, 351-360 (1999).
122. Suetsugu, S., Miki, H. & Takenawa, T. Identification of Two Human WAVE/SCAR Homologues as General Actin Regulatory Molecules Which Associate with the Arp2/3 Complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 260, 296-302 (1999).
123. Machesky, L. & Insall, R.H. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Current Biology* 8, 1347-1356 (1998).
124. Yarar, D., To, W., Abo, A. & Welch, M.D. The Wiskott-Aldrich syndrome protein directs actin-based motility by stimulating actin nucleation with the Arp2/3 complex. *Current Biology* 9, 555-558 (1999).
125. Rohatgi, R. et al. The Interaction between N-WASP and the Arp2/3 Complex Links Cdc42-Dependent Signals to Actin Assembly. *cell* 97, 221-231 (1999).
126. Blanchoin, L. et al. Direct observation of dendritic actin filaments networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *nature* 404, 1007-1011 (2000).
127. Steffen, A. et al. Filopodia Formation in the Absence of Functional WAVE- and Arp2/3-Complexes. *Molecular Biology of the Cell* 17, 2581-2591 (2006).

128. Lommel, S. et al. Actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* and intracellular motility of *Shigella flexneri* are abolished in N-WASP-defective cells. *EMBO Reports* 2, 850-857 (2001).
129. Ladwein, M. & Rottner, K. On the Rho'd: The regulation of membrane protrusions by Rho-GTPases. *FEBS Letters* 582, 2066-2074 (2008).
130. Peng, J., Wallar, B.J., Flanders, A., Swiatek, P.J. & Alberts, A.S. Disruption of the Diaphanous-Related Formin *Drf1* Gene Encoding mDia1 Reveals a Role for Drf3 as an Effector for Cdc42. *Current Biology* 13, 534-545 (2003).
131. Yang, C. et al. Novel Roles of Formin mDia2 in Lamellipodia and Filopodia Formation in Motile Cells. *PLoS Biology* 5, 2624-2645 (2007).
132. Schirenbeck, A., Bretschneider, T., Arasada, R., Schleicher, M. & Faix, J. The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nature Cell Biology* 7, 619-625 (2005).
133. Pellegrin, S. & Mellor, H. The Rho Family GTPase Rif Induces Filopodia through mDia2. *Current Biology* 15, 129-133 (2005).
134. Mallavarapu, A. & Mitchison, T. Regulated Actin Cytoskeleton Assembly at Filopodium Tips Controls Their Extension and Retraction. *Journal of Cell Biology* 126, 1097-1106 (1999).
135. Mattila, P.K. et al. Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P₂-rich membranes by an inverse BAR domain-like mechanism. *Journal of Cell Biology* 176, 953-964 (2007).
136. Yamagishi, A., Masuda, M., Ohki, T., Onishi, H. & Mochizuki, N. A Novel Actin Bundling/Filopodium-forming Domain Conserved in Insulin Receptor Tyrosine Kinase Substrate p53 and Missing in Metastasis Protein. *Journal of Biological Chemistry* 279, 14929-14936 (2004).
137. Choi, J. et al. Regulation of Dendritic Spine Morphogenesis by Insulin Receptor Substrate 53, a Downstream Effector of Rac1 and Cdc42 Small GTPases. *Journal of Neuroscience* 25, 869-879 (2005).
138. Krugmann, S. et al. Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Current Biology* 11, 1645-1655 (2001).

139. Fujiwara, T., Mammoto, A., Kim, Y. & Takai, Y. Rho Small G-Protein-Dependent Binding of mDia to an Src Homology 3 Domain-Containing IRSp53/BAIAP2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271, 626-629 (2000).
140. Disanza, A. et al. Regulation of cell shape by Cdc42 is mediated by the synergic actin-bundling activity of the Eps-IRSp53 complex. *Nature Cell Biology* 8, 1337-1347 (2006).
141. Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z.-s. & Lim, L. A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *nature* 367, 40-47 (1994).
142. Dummler, B., Ohshiro, K., Kumar, R. & Field, J. Pak protein kinases and their role in cancer. *Cancer Metastasis Review* 28, 51-63 (2009).
143. Zhao, Z.-s. & Manser, E. PAK and other Rho-associated kinases - effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochemical Journal* 386, 201-214 (2005).
144. Zhao, Z.-s. et al. A Conserved Negative Regulatory Region in α PAK: Inhibition of PAK Kinases Reveals Their Morphologic Roles Downstream of Cdc42 and Rac1. *Molecular and Cellular Biology* 18, 2153-2163 (1998).
145. Lei, M. et al. Structure of PAK1 in an Autoinhibited Conformation Reveals a Multistage Activation Switch. *cell* 102, 387-397 (2000).
146. Gatti, A., Huang, Z., Tuazon, P.T. & Traugh, J.A. Multisite Autophosphorylation of p21-activated Protein Kinase γ -PAK as a Function of Activation. *Journal of Biological Chemistry* 274, 8022-8028 (1999).
147. Chong, C., Tan, L., Lim, L. & Manser, E. The Mechanism of PAK activation. *Journal of Biological Chemistry* 276, 17347-17353 (2001).
148. Abo, A. et al. PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *EMBO Journal* 17, 6527-6540 (1998).
149. Edwards, D.C., Sanders, L.C., Bokoch, G.M. & Gill, G.N. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nature Cell Biology* 1, 253-259 (1999).

150. Dan, C., Kelly, A., Bernard, O. & Minden, A. Cytoskeletal Changes Regulated by the PAK4 Serine/Threonine Kinase Are Mediated by LIM Kinase 1 and Cofilin. *Journal of Biological Chemistry* 276, 32115-32121 (2001).
151. Takizawa, N., Koga, Y. & Ikebe, M. Phosphorylation of CPI17 and myosin binding subunit of type 1 protein phosphatase by p21-activated kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 297, 773-778 (2002).
152. Chew, T.-L., Masaracchia, R.A., Goeckeler, Z.M. & Wysolmersky, R.B. Phosphorylation of non-muscle myosin II regulatory light chain by p21-activated kinase (γ -PAK). *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 19, 839-854 (1998).
153. Vadlamudi, R.K., Li, F., Barnes, C.J., Bagheri-Yarmand, R. & Kumar, R. p41-Arc subunit of human Arp2/3 complex is a p21-activated kinase-1-interacting substrate. *EMBO Reports* 5, 154-160 (2004).
154. Rennefahrt, U.E.E. et al. Specificity Profiling of Pak Kinases Allows Identification of Novel Phosphorylation Sites. *Journal of Biological Chemistry* 282, 15667-15678 (2007).
155. Shin, E.-Y. et al. Phosphorylation of p85 β PIX, a Rac/Cdc42-specific Guanine Nucleotide Exchange Factor, via the Ras/ERK/PAK2 Pathway Is Required for Basic Fibroblast Growth Factor-induced Neurite Outgrowth. *Journal of Biological Chemistry* 277, 44417-44430 (2002).
156. Zenke, F.T. et al. p21-activated Kinase 1 Phosphorylates and Regulates 14-3-3 Binding to GEF-H1, a Microtubule-localized Rho Exchange Factor. *Journal of Biological Chemistry* 279, 18392-18400 (2004).
157. Zhao, Z.-s., Lim, J.P., Ng, Y.-W., Lim, L. & Manser, E. The GIT-Associated Kinase PAK Targets to the Centrosome and Regulates Aurora-A. *molecular cell* 20, 237-249 (2005).
158. Alberts, A.S., Qin, H., Carr, H.S. & Frost, J.A. PAK1 Negatively Regulates the Activity of the Rho Exchange Factor NET1. *Journal of Biological Chemistry* 280, 12152-12161 (2005).
159. Leung, T., Chen, X.-Q., Tan, I., Manser, E. & Lim, L. Myotonic Dystrophy Kinase-Related Cdc42-Binding Kinase Acts as a Cdc42 Effector in Promoting Cytoskeletal Reorganization. *molecular and cellular biology* 18, 130-140 (1998).

160. Tan, I., Yong, J., Dong, J.M., Lim, L. & Leung, T. A Tripartite Complex Containing MRCK Modulates Lamellar Actomyosin Retrograde Flow. *cell* 135, 123-136 (2008).
161. Wilkinson, S., Paterson, H.F. & Marshall, C.J. Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nature Cell Biology* 7, 255-261 (2005).
162. Gundersen, G.G. & Bulinski, J.C. Selective stabilization of microtubules oriented toward the direction of cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 5946-5950 (1988).
163. Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Integrin-Mediated Activation of Cdc42 Controls Cell Polarity in Migrating Astrocytes through PKC ζ . *cell* 106, 489-498 (2001).
164. Daub, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Sobel, A. & Hall, A. Rac/Cdc42 and p65PAK Regulate the Microtubule-destabilizing Protein Stathmin through Phosphorylation at Serine 16. *Journal of Biological Chemistry* 276, 1677-1680 (2001).
165. Melander Gradin, H., Marklund, U., Larsson, N., Chatila, T.A. & Gullberg, M. Regulation of Microtubule Dynamics by Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Kinase IV/Gr-Dependent Phosphorylation of Oncoprotein 18. *Molecular and Cellular Biology* 17, 3459-3467 (1997).
166. Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Cdc42 regulates GSK-3 β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *nature* 421, 753-756 (2003).
167. Hart, M.J., Callow, M.G., Souza, B. & Polakis, P. IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for cdc42Hs. *EMBO Journal* 15, 2997-3005 (1996).
168. Kuroda, S. et al. Identification of IQGAP as a Putative Target for the Small GTPases, Cdc42 and Rac1. *Journal of Biological Chemistry* 271, 23363-23367 (1996).
169. Mataraza, J.M., Briggs, M.W., Li, Z., Frank, R. & Sacks, D.B. Identification and characterization of the Cdc42-binding site of IQGAP1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305, 315-321 (2003).

170. Swart-Mataraza, J.M., Li, Z. & Sacks, D.B. IQGAP1 Is a Component of Cdc42 Signaling to the Cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry* 277, 24753-24763 (2002).
171. Bashour, A.-M., Fullerton, A.T., Hart, M.J. & Bloom, G.S. IQGAP1, a Rac- and Cdc42-binding Protein, Directly Binds and Cross-links Microfilaments. *Journal of Cell Biology* 137, 1555-1566 (1997).
172. Fukata, M. et al. Regulation of Cross-linking of Actin Filament by IQGAP1, a Target for Cdc42. *Journal of Biological Chemistry* 272, 29579-29583 (1997).
173. Erickson, J.W., Cerione, R.A. & Hart, M.J. Identification of an Actin Cytoskeletal Complex That Includes IQGAP and the Cdc42 GTPase. *Journal of Biological Chemistry* 272, 24443-24447 (1997).
174. Perez, F., Diamantopoulos, G.S., Stalder, R. & Kreis, T.E. CLIP-170 Highlights Growing Microtubule Ends In Vivo. *Cell* 96, 517-527 (1999).
175. Fukata, M. et al. Rac1 and Cdc42 Capture Microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *cell* 109, 873-885 (2002).
176. Gomes, E.R., Jani, S. & Gundersen, G.G. Nuclear Movement Regulated by Cdc42, MRCK, Myosin, and Actin Flow Establishes MTOC Polarization in Migrating Cells. *cell* 121, 451-463 (2005).
177. Zheng, Y., Bagrodia, S. & Cerione, R.A. Activation of Phosphoinositide 3-Kinase Activity by Cdc42Hs Binding to p85. *Journal of Biological Chemistry* 269, 18727-18730 (1994).
178. Hess, J.A., Ross, A.H., Qiu, R.-G., Symons, M. & Exton, J.H. Role of Rho Family Proteins in Phospholipase D Activation by Growth Factors. *Journal of Biological Chemistry* 272, 1615-1620 (1997).
179. Illenberger, D. et al. Stimulation of phospholipase C- β_2 by the Rho GTPases Cdc42Hs and Rac1. *EMBO Journal* 17, 6241-6249 (1998).
180. Ho, H.-Y.H. et al. Toca-1 Mediates Cdc42-Dependent Actin Nucleation by Activating the N-WASP-WIP Complex. *cell* 118, 203-216 (2004).
181. Bu, W., Chou, A.M., Lim, K.B., Sudhakaran, T. & Ahmed, S. The Toca-1-N-WASP Complex Links Filopodial Formation to Endocytosis. *Journal of Biological Chemistry* 284, 11622-11636 (2009).

182. Takano, K., Toyooka, K. & Suetsugu, S. EFC/F-BAR proteins and the N-WASP-WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization. *EMBO Journal* 27, 2817-2828 (2008).
183. Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Tan, L. & Lim, L. A non-receptor tyrosine kinase that inhibits the GTPase activity of p21^{cdc42}. *nature* 363, 364-367 (1993).
184. Shen, F., Lin, Q., Gu, Y., Childress, C. & Yang, W. Activated Cdc42-associated Kinase 1 Is a Component of EGF Receptor Signaling Complex and Regulates EGF Receptor Degradation. *Molecular Biology of the Cell* 18, 732-742 (2007).
185. Olson, M.F., Ashworth, A. & Hall, A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *science* 269, 1270-1272 (1995).
186. Yasuda, S. et al. Cdc42 and mDia3 regulate microtubule attachment to kinetochores. *nature* 428, 767-771 (2004).
187. Narumiya, S. & Yasuda, S. Rho GTPases in animal cell mitosis. *Current Opinion in Cell Biology* 18, 199-205 (2006).
188. Joyce, D. et al. Integration of Rac-dependent Regulation of Cyclin D1 Transcription through a Nuclear Factor- κ B-dependent Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 274, 25245-25249 (1999).
189. Westwick, J.K. et al. Rac Regulation of Transformation, Gene Expression, and Actin Organization by Multiple, PAK-Independent Pathways. *Molecular and Cellular Biology* 17, 1324-1335 (1997).
190. Chou, M.M. & Blenis, J. The 70 kDa S6 Kinase Complexes with and Is Activated by the Rho Family G Proteins Cdc42 and Rac1. *cell* 85, 573-583 (1996).
191. Joberty, G., Perlungher, R.R. & Macara, I.G. The Borgs, a New Family of Cdc42 and TC10 GTPase-Interacting Proteins. *Molecular and Cellular Biology* 19, 6585-6597 (1999).
192. Joberty, G. et al. Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. *Nature Cell Biology* 3, 861-866 (2001).
193. Tooley, A.J. et al. Amoeboid T lymphocytes require the septin cytoskeleton for cortical integrity and persistent motility. *Nature Cell Biology* 11, 17-26 (2009).

194. Sheffield, P.J. et al. Borg/Septin Interactions and the Assembly of Mammalian Septin Heterodimers, Trimers, and Filaments. *Journal of Biological Chemistry* 278, 3483-3488 (2003).
195. Didsbury, J., Weber, R.F., Bokoch, G.M., Evans, T. & Snyderman, R. *rac*, a Novel *ras*-related Family of Proteins That Are Botulinum Toxin Substrates. *Journal of Biological Chemistry* 264, 16378-16382 (1989).
196. Abo, A. et al. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21^{rac1}. *nature* 353, 668-670 (1991).
197. Knaus, U.G., Heyworth, P.G., Evans, T., Curnutte, J.T. & Bokoch, G.M. Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science* 254, 1512-1515 (1991).
198. Ridley, aJ., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D. & Hall, A. The Small GTP-Binding Protein *rac* Regulates Growth Factor-Induced Membrane Ruffling. *cell* 70, 401-410 (1992).
199. Wennerberg, K. & Der, C.J. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *Journal of Cell Science* 117, 1301-1312 (2004).
200. Hajdo-Milašinović, A., Ellenbroek, S.I.J., van Es, S., van der Vaart, B. & Collard, J.G. Rac1 and Rac3 have opposing functions in cell adhesion and differentiation of neuronal cells. *Journal of Cell Science* 120, 555-566 (2007).
201. Chan, A.Y. et al. Roles of the Rac1 and Rac3 GTPases in human tumor cell invasion *Oncogene* 24, 7821-7829 (2005).
202. Meller, J., Vidali, L. & Schwartz, M.A. Endogenous RhoG is dispensable for integrin-mediated cell spreading but contributes to Rac-independent migration. *Journal of Cell Science* 121, 1981-1989 (2008).
203. Katoh, H. & Negishi, M. RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo. *nature* 424, 461-464 (2003).
204. Sugihara, K. et al. Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* 17, 3427-3433 (1998).
205. Glogauer, M. et al. Rac1 Deletion in Mouse Neutrophils Has Selective Effects on Neutrophil Functions. *Journal of Immunology* 170, 5652-5657 (2003).

206. Tan, W. et al. An essential role for Rac1 in endothelial cell function and vascular development. *FASEB Journal* 22, 1829-1838 (2008).
207. Vasyutina, E., Martarelli, B., Brakebusch, C., Wende, H. & Birchmeier, C. The small G-proteins Rac1 and Cdc42 are essential for myoblast fusion in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 8935-8940 (2009).
208. Shirsat, N.V., Pignolo, R.J., Kreider, B.L. & Rovera, G. A member of the ras gene superfamily is expressed specifically in T, B and myeloid hematopoietic cells. *Oncogene* 5, 769-772 (1990).
209. Haataja, L., Groffen, J. & Heisterkamp, N. Characterization of RAC3, a Novel Member of the Rho Family. *Journal of Biological Chemistry* 272, 20384-20388 (1997).
210. Bolis, A., Corbetta, S., Cioce, A. & de Curtis, I. Differential distribution of Rac1 and Rac3 GTPases in the developing mouse brain: implications for a role of Rac3 in Purkinje cell differentiation. *European Journal of Neuroscience* 18, 2417-2424 (2003).
211. Corbetta, S. et al. Generation and Characterization of Rac3 Knockout Mice. *Molecular and Cellular Biology* 25, 5763-5776 (2005).
212. Roberts, A.W. et al. Deficiency of the Hematopoietic Cell-Specific Rho Family GTPase Rac2 Is Characterized by Abnormalities in Neutrophil Function and Host Defense. *immunity* 10, 183-196 (1999).
213. Cho, Y.J. et al. Generation of *rac3* Null Mutant Mice: Role of Rac3 in Bcr/Abl-Caused Lymphoblastic Leukemia. *Molecular and Cellular Biology* 25, 5777-5785 (2005).
214. Vincent, S., Jeanteur, P. & Fort, P. Growth-Regulated Expression of *rhoG*, a New Member of the *ras* Homolog Gene Family. *Molecular and Cellular Biology* 12, 3138-3148 (1992).
215. Vigorito, E. et al. Immunological Function in Mice Lacking the Rac-Related GTPase RhoG. *Molecular and Cellular Biology* 24, 719-729 (2004).
216. Gu, Y. et al. Hematopoietic Cell Regulation by Rac1 and Rac2 Guanosine Triphosphatases. *science* 302, 445-449 (2003).

217. Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S. & Takenawa, T. IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *nature* 408, 732-735 (2000).
218. Govind, S., Kozma, R., Monfries, C., Lim, L. & Ahmed, S. Cdc42Hs Facilitates Cytoskeletal Reorganization and Neurite Outgrowth by Localizing the 58-kD Insulin Receptor Substrate to Filamentous Actin. *Journal of Cell Biology* 152, 579-594 (2001).
219. Steffen, A. et al. Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO Journal* 23, 749-759 (2004).
220. Kobayashi, K. et al. p140Sra-1 (Specifically Rac1-associated Protein) Is a Novel Specific Target for Rac1 Small GTPase. *Journal of Biological Chemistry* 273, 291-295 (1998).
221. Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A.V., Mann, M. & Kirschner, M.W. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *nature* 418, 790-793 (2002).
222. Gautreau, A. et al. Purification and architecture of the ubiquitous Wave complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 4379-4383 (2004).
223. Innocenti, M. et al. Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nature Cell Biology* 6, 319-327 (2004).
224. Ismail, A.M., Padrick, S.B., Chen, B., Umetani, J. & Rosen, M.K. The WAVE regulatory complex is inhibited. *nature structural and molecular biology* 16, 561-563 (2009).
225. Lammers, M., Meyer, S., Kühlmann, D. & Wittinghofer, A. Specificity of Interactions between mDia Isoform and Rho Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 283, 35236-35246 (2008).
226. Beli, P., Mascheroni, D., Xu, D. & Innocenti, M. WAVE and Arp2/3 jointly inhibit filopodium formation by entering into a complex with mDia2. *Nature Cell Biology* 10, 849-857 (2008).
227. Hotulainen, P., Paunola, E., Vartiainen, M.K. & Lappalainen, P. Actin-depolymerizing Factor and Cofilin-1 Play Overlapping Roles in Promoting

- Rapid F-Actin Depolymerization in Mammalian Nonmuscle Cells. *Molecular Biology of the Cell* 16, 649-664 (2005).
228. Kiuchi, T., Ohashi, K., Kurita, S. & Mizuno, K. Cofilin promotes stimulus-induced lamellipodium formation by generating an abundant supply of actin monomers. *Journal of Cell Biology* 177, 465-476 (2007).
229. Rogers, S.L., Wiedemann, U., Stuurman, N. & Vale, R.D. Molecular requirements for actin-based lamella formation in *Drosophila* S2 cells. *Journal of Cell Biology* 162, 1079-1088 (2003).
230. Mejillano, M.R. et al. Lamellipodial Versus Filopodial Mode of the Actin Nanomachinery: Pivotal Role of the Filament Barbed End. *Cell* 118, 363-373 (2004).
231. Yang, N. et al. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *nature* 393, 809-812 (1998).
232. Hartwig, J.H. et al. Thrombin Receptor Ligation and Activated Rac Uncap Actin Filament Barbed Ends through Phosphoinositide Synthesis in Permeabilized Human Platelets. *cell* 82, 643-653 (1995).
233. Tolia, K.F. et al. Type 1 α phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly. *Current Biology* 10, 153-156 (1999).
234. Meerschaert, K., De Corte, V., De Ville, Y., Vandekerckhove, J. & Gettemans, J. Gelsolin and functionally similar actin-binding proteins are regulated by lysophosphatidic acid. *EMBO Journal* 17, 5923-5932 (1998).
235. De Corte, V. et al. Gelsolin-induced epithelial cell invasion is dependent on Ras-Rac signaling. *EMBO Journal* 21, 6781-6790 (2002).
236. Arcaro, A. The Small GTP-binding Protein Rac Promotes the Dissociation of Gelsolin from Actin Filaments in Neutrophils. *Journal of Biological Chemistry* 273, 805-813 (1998).
237. Azuma, T., Witke, W., Stossel, T.P., Hartwig, J.H. & Kwiatkowski, D.J. Gelsolin is a downstream effector of rac for fibroblast motility. *EMBO Journal* 17, 1362-1370 (1998).
238. Tolia, K.F., Cantley, L.C. & Carpenter, C.L. Rho Family GTPases Bind to Phosphoinositide Kinases. *Journal of Biological Chemistry* 270, 17656-17659 (1995).

239. Delorme, V. et al. Cofilin Activity Downstream of Pak1 Regulates Cell Protrusion Efficiency by Organizing Lamellipodium and Lamella Actin Networks. *developmental cell* 13, 646-662 (2007).
240. Burbelo, P.D., Dreschsel, D. & Hall, A. A Conserved Binding Motif Defines Numerous Candidate Target Proteins for Both Cdc42 and Rac GTPases. *Journal of Biological Chemistry* 270, 29071-29074 (1995).
241. Teramoto, H. et al. Signaling from the Small GTP-Binding Proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal Kinase/Stress-activated Protein Kinase Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 271, 27225-27228 (1996).
242. Tapon, N., Nagata, K.-i., Lamarche, N. & Hall, A. A new Rac target POSH is an SH3-containing scaffold protein involved in the JNK and NF- κ B signalling pathways. *EMBO Journal* 17, 1395-1404 (1998).
243. Nagata, K.-i. et al. The MAP kinase kinase kinase MLK2 co-localizes with activated JNK along microtubules and associates with kinesin superfamily motor KIF3. *EMBO Journal* 17, 149-158 (1998).
244. Keely, P.J., Westwick, J.K., Whitehead, I.P., Der, C.J. & Parise, L.V. Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *nature* 390 (1997).
245. Coniglio, S.J., Jou, T.-S. & Symons, M. Rac1 Protects Epithelial Cells against Anoikis. *Journal of Biological Chemistry* 276, 28113-28120 (2001).
246. Rul, W. et al. Activation of ERK, Controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt, Is Required for Anoikis. *Annals New York Academy of Sciences* 973, 145-148 (2002).
247. Wennerberg, K. et al. RhoG Signals in Parallel with Rac1 and Cdc42. *Journal of Biological Chemistry* 277, 47810-47817 (2002).
248. Joberty, G., Peterson, C., Gao, L. & Macara, I.G. The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nature Cell Biology* 2, 531-539 (2000).
249. Lin, D. et al. A mammalian PAR-3—PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nature Cell Biology* 2, 540-547 (2000).

250. Qiu, R.-G., Abo, A. & Martin, G.S. A human homolog of the *C. elegans* polarity determinant Par-6 links Rac and Cdc42 to PKC ζ signaling and cell transformation. *Current Biology* 10, 697-707 (2000).
251. Eva, A., Vecchio, G., Rao, C.D., Tronick, S.R. & Aaronson, S.A. The predicted *DBL* oncogene product defines a distinct class of transforming proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 2061-2065 (1988).
252. Hart, M.J., Eva, A., Evans, T., Aaronson, S.A. & Cerione, R.A. Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the *dbl* oncogene product. *nature* 354, 311-314 (1991).
253. Rossman, K.L., Der, C.J. & Sondek, J. GEF MEANS GO: TURNING ON RHO GTPases WITH GUANINE NUCLEOTIDE-EXCHANGE FACTORS. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (2005).
254. Ron, D. et al. A region of proto-dbl essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, CDC24, and the human breakpoint cluster gene, bcr. *New Biologist* 3, 372-379 (1991).
255. Cen, H., Papageorge, A.G., Zippel, R., Lowy, D.R. & Zhang, K. Isolation of multiple mouse cDNAs with coding homology to *Saccharomyces cerevisiae* CDC25: identification of a region related to Bcr, Vav, Dbl and CDC24. *EMBO Journal* 11, 4007-4015 (1992).
256. Hart, M.J. et al. Cellular Transformation and Guanine Nucleotide Exchange Activity Are Catalyzed by a Common Domain on the *dbl* Oncogene Product. *Journal of Biological Chemistry* 269, 62-65 (1994).
257. Musacchio, A., Gibson, T., Rice, P., Thompson, J. & Saraste, M. The PH domain; a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 18, 343-349 (1993).
258. Harlan, J.E., Hajduk, P.J., Yoon, H.S. & Fesik, S.W. Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-biphosphate. *nature* 371, 168-170 (1994).
259. Worthylake, D.K., Rossman, K.L. & Sondek, J. Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1. *Nature* 408, 682-688 (2000).

260. Hasegawa, H. et al. DOCK180, a Major CRK-Binding Protein, Alters Cell Morphology upon Translocation to the Cell Membrane. *Molecular and Cellular Biology* 16, 1770-1776 (1996).
261. Kiyokawa, E. et al. Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes and Development* 12, 3331-3336 (1998).
262. Côté, J.-F. & Vuori, K. Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *Journal of Cell Science* 115, 4901-4913 (2002).
263. Brugnera, E. et al. Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nature Cell Biology* 4, 574-582 (2002).
264. Namekata, K., Nishimura, N. & Kimura, H. Presenilin-binding protein forms aggresomes in monkey kidney COS-7 cells. *Journal of Neurochemistry* 82, 819-827 (2002).
265. Hiramoto, K., Negishi, M. & Katoh, H. Dock4 is regulated by RhoG promotes Rac-dependent cell migration. *Experimental Cell Research* 312, 4205-4216 (2006).
266. Nishihara, H. et al. Non-adherent cell-specific expression of DOCK2, a member of the human CDM-family proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1452, 179-187 (1999).
267. Miyamoto, Y., Yamauchi, J., Sanbe, A. & Tanoue, A. Dock6, a Dock-C subfamily guanine nucleotide exchanger, has the dual specificity for Rac1 and Cdc42 and regulates neurite outgrowth. *Experimental Cell Research* 313, 791-804 (2007).
268. Ruusala, A. & Aspenström, P. Isolation and characterisation of DOCK8, a member of the DOCK180-related regulators of cell morphology. *FEBS Letters* 572, 159-166 (2004).
269. Meller, N., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W.B., Del Pozo, M.A. & Schwartz, M.A. Zizimin1, a novel Cdc42 activator, reveals a new GEF domain for Rho proteins. *Nature Cell Biology* 4, 639-647 (2002).
270. Gadea, G., Sanz-Moreno, V., Self, A., Godi, A. & Marshall, C.J. DOCK10-Mediated Cdc42 Activation Is Necessary for Amoeboid Invasion of Melanoma Cells. *Current Biology* 18, 1456-1465 (2008).

271. Nishimiki, A. et al. Zizimin2: a novel, DOCK180-related Cdc42 guanine nucleotide exchange factor expressed predominantly in lymphocytes. *FEBS Letters* 579, 1039-1046 (2005).
272. Côté, J.-F., Motoyama, A.B., Bush, J.A. & Vuori, K. A novel and evolutionarily conserved PtdIns(3,4,5)P₃-binding domain is necessary for DOCK180 signalling. *Nature Cell Biology* 7, 797-807 (2005).
273. Nishikimi, A. et al. Sequential Regulation of DOCK2 Dynamics by Two Phospholipids During Neutrophil Chemotaxis. *Science* 324, 384-387 (2009).
274. Rushton, E., Drysdale, R., Abmayr, S.M., Michelson, A.M. & Bate, M. Mutations in a novel gene, *myoblast city*, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for *Drosophila* muscle development. *Development* 121, 1979-1988 (1995).
275. Erickson, M.R.S., Galletta, B.J. & Abmayr, S.M. *Drosophila myoblast city* Encodes a Conserved Protein That Is Essential for Myoblast Fusion, Dorsal Closure, and Cytoskeletal Organization. *Journal of Cell Biology* 138, 589-603 (1997).
276. Duchek, P., Somogyi, K., Jékely, G., Beccari, S. & Rørth, P. Guidance of Cell Migration by the *Drosophila* PDGF/VEGF Receptor. *cell* 107, 17-26 (2001).
277. Bianco, A. et al. Two distinct modes of guidance signalling during collective migration of border cells. *nature* 448, 362-366 (2007).
278. Ishimaru, S., Ueda, R., Hinohara, Y., Ohtani, M. & Hanafusa, H. PVR plays a critical role via JNK activation in thorax closure during *Drosophila* metamorphosis. *EMBO Journal* 23, 3984-3994 (2004).
279. Ellis, R.E., Jacobson, D.M. & Horvitz, H.R. Genes Required for the Engulfment of Cell Corpses During Programmed Cell Death in *Caenorhabditis elegans*. *genetics* 129, 79-94 (1991).
280. Hedgecock, E.M., Sulston, J.E. & Thomson, J.N. Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 220, 1277-1279 (1983).
281. Wang, X. et al. Cell Corpse Engulfment Mediated by *C. elegans* Phosphatidylserine Receptor Through CED-5 and CED-12. *Science* 302, 1563-1566 (2003).

282. Gumienny, T.L. et al. CED-12/ELMO, a Novel Member of the CrkII/Dock180/Rac Pathway, Is Required for Phagocytosis and Cell Migration. *cell* 107, 27-41 (2001).
283. Wu, Y.-C., Cheng, T.-W., Lee, M.-C. & Weng, N.-Y. Distinct Rac Activation Pathways Control *Carnorhabditis elegans* Cell Migration and Axon Outgrowth. *Developmental Biology* 250, 145-155 (2002).
284. Park, D. et al. BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *nature* 450, 430-435 (2007).
285. Sanders, M.A., Ampasala, D. & Basson, M.D. DOCK5 and DOCK1 Regulate Caco-2 Intestinal Epithelial Cell Spreading and Migration on Collagen IV. *Journal of Biological Chemistry* 284, 27-35 (2009).
286. Grimsley, C.M. et al. Dock180 and ELMO1 Proteins Cooperate to Promote Evolutionarily Conserved Rac-dependent Cell Migration. *Journal of Biological Chemistry* 279, 6087-6097 (2004).
287. Laurin, M. et al. The atypical Rac activator Dock180 (Dock1) regulates myoblast fusion *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 15446-15451 (2008).
288. Fukui, Y. et al. Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration. *nature* 412, 826-831 (2001).
289. Kunisaki, Y. et al. DOCK2 is a Rac activator that regulates motility and polarity during neutrophil chemotaxis. *Journal of Cell Biology* 174, 647-652 (2006).
290. Omi, N. et al. Mutation of Dock5, a member of the guanine exchange factor Dock180 superfamily, in the rupture of lens cataract mouse. *Experimental Eye Research* 86, 828-834 (2008).
291. Brazier, H. et al. Expression Profile of RhoGTPases and RhoGEFs During RANKL-Stimulated Osteoclastogenesis: Identification of Essential Genes in Osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Research* 21, 1387-1398 (2006).
292. Kashiwa, A. et al. Isolation and Characterization of a Novel Presenilin Binding Protein. *Journal of Neurochemistry* 75, 109-116 (2000).
293. de Silva, M.G. et al. Disruption of a novel member of a sodium/hydrogen exchanger family and DOCK3 is associated with an attention deficit

- hyperactivity disorder-like phenotype. *Journal of Medical Genetics* 40, 733-740 (2003).
294. Chen, Q., Kimura, H. & Schubert, D. A novel mechanism for the regulation of amyloid precursor protein metabolism. *Journal of Cell Biology* 158, 79-89 (2002).
295. Chen, Q. et al. Loss of Modifier of Cell Adhesion Reveals a Pathway Leading to Axonal Degeneration. *Journal of Neuroscience* 29, 118-130 (2009).
296. Namekata, K., Enokido, Y., Iwasawa, K. & Kimura, H. MOCA Induces Membrane Spreading by Activating Rac1. *Journal of Biological Chemistry* 279, 14331-14337 (2004).
297. Sanz-Moreno, V. et al. Rac Activation and Inactivation Control Plasticity of Tumor Cell Movement. *cell* 135, 510-523 (2008).
298. Yajnik, V. et al. *DOCK4*, a GTPase Activator, Is Disrupted during Tumorigenesis. *Cell* 112, 673-684 (2003).
299. Ueda, S., Fujimoto, S., Hiramoto, K., Negishi, M. & Katoh, H. Dock4 Regulates Dendritic Development in Hippocampal Neurons. *Journal of Neuroscience Research* 86, 3052-3061 (2008).
300. Takahashi, K. et al. Homozygous deletion and reduced expression of the *DOCK8* gene in human lung cancer. *International Journal of Oncology* 28, 321-328 (2006).
301. Griggs, B.L., Ladd, S., Saul, R.A., DuPont, B.R. & Srivastava, A.K. Deducator of cytokinesis 8 is disrupted in two patients with mental retardation and developmental disabilities. *Genomics* 91, 195-202 (2008).
302. Watabe-Uchida, M., John, K.A., Janas, J.A., Newey, S.E. & Van Aelst, L. The Rac Activator *DOCK7* Regulates Neuronal Polarity through Local Phosphorylation of Stathmin/Op18. *neuron* 51, 727-739 (2006).
303. Yamauchi, J., Miyamoto, Y., Chan, J.R. & Tanoue, A. ErbB2 directly activates the exchange factor Dock7 to promote Schwann cell migration. *Journal of Cell Biology* 181, 351-365 (2008).
304. Blasius, A.L. et al. Mice with mutations of *Dock7* have generalized hypopigmentation and white-spotting but show normal neurological function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 2706-2711 (2009).

305. Meller, N., Irani-Tehrani, M., Ratnikov, B.I., Paschal, B.M. & Schwartz, M.A. The Novel Cdc42 Guanine Nucleotide Exchange Factor, Zizimin1, Dimerizes via the Cdc42-binding CZH2 Domains. *Journal of Biological Chemistry* 279, 37470-37476 (2004).
306. .
307. Kuramoto, K., Negishi, M. & Katoh, H. Regulation of Dendrite Growth by the Cdc42 Activator Zizimin1/Dock9 in Hippocampal Neurons. *Journal of Neuroscience* 87, 1794-1805 (2009).
308. Meller, N., Westbrook, M.J., Shannon, J.D., Guda, C. & Schwartz, M.A. Function of the N-terminus of zizimin1: autoinhibition and membrane targeting. *Biochemical Journal* 409, 525-533 (2008).
309. Yelo, E. et al. Dock10, a novel CZH protein selectively induced by interleukin-4 in human B lymphocytes. *Molecular Immunology* 45 (2008).
310. Lin, Q., Yang, W., Baird, D., Feng, Q. & Cerione, R.A. Identification of a DOCK180-related Guanine Nucleotide Exchange Factor That Is Capable of Mediating a Positive Feedback Activation of Cdc42. *Journal of Biological Chemistry* 281, 35253-35262 (2006).
311. Geisbrecht, E.R. et al. *Drosophila* ELMO/CED-12 interacts with Myoblast city to direct myoblast fusion and ommatidial organization. *Developmental Biology* 314, 137-149 (2008).
312. Grimsley, C.M., Lu, M., Haney, L.B., Kinchen, J.M. & Ravichandran, K.S. Characterization of a Novel Interaction between ELMO1 and ERM Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 281, 5928-5937 (2006).
313. Komander, D. et al. An α -Helical Extension of the ELMO1 Pleckstrin Homology Domain Mediates Direct Interaction to DOCK180 and Is Critical in Rac Signaling. *Molecular Biology of the Cell* 19, 4837-4851 (2008).
314. Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kurata, T., Sugimura, H. & Matsuda, M. Evidence That DOCK180 Up-regulates Signals from the CrkII-p130^{Cas} Complex. *Journal of Biological Chemistry* 273, 24479-24484 (1998).
315. Smith, H.W., Marra, P. & Marshall, C.J. uPAR promotes formation of the p130Cas-Crk complex to activate Rac through DOCK180. *Journal of Cell Biology* 182, 777-790 (2008).

316. Guo, W. & Giancotti, F.G. Integrin signalling during tumour progression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 816-826 (2004).
317. Stupack, D.G. & Cheresch, D.A. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *Journal of Cell Science* 115, 3729-3738 (2002).
318. Schwartz, M.A. & Shattil, S.J. Signaling networks linking integrins and rho family GTPases. *Trends in Biochemical Sciences* 25, 388-391 (2000).
319. Chodniewicz, D. & Klemke, R.L. Regulation of integrin-mediated cellular responses through assembly of a CAS/Crk scaffold. *Biochimica et Biophysica Acta* 1692, 63-76 (2004).
320. Klemke, R.L. et al. CAS/Crk Coupling Serves as a "Molecular Switc" for Induction of Cell Migration. *Journal of Cell Biology* 140, 961-972 (1998).
321. Diekmann, D., Abo, A., Johnston, C.L., Segal, A.W. & Hall, A. interaction of Rac with p67phox and Regulation of Phagocytic NADPH Oxidase Activity. *Science* 265, 531-532 (1994).
322. Weissbach, L. et al. Identification of a Human RasGAP-related Protein Containing Calmodulin-binding Motifs. *Journal of Biological Chemistry* 269, 20517-20521 (1994).
323. Brill, S. et al. The Ras GTPase-Activating-Protein-Related Human Protein IQGAP2 Harbors a Potential Actin Bindng Domain and Interacts with Calmodulin and Rho Family GTPases. *Molecular and Cellular Biology* 16, 4869-4878 (1996).
324. Kitamura, Y. et al. Interaction of Nck-associated protein 1 with activated GTP-binding protein Rac. *Biochemical Journal* 322 (1997).
325. Beckett, D., Kovaleva, E. & Schatz, P.J. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Science* 8, 921-929 (1999).
326. de Boer, E. et al. Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 7480-7485 (2003).
327. Mechold, U., Gilbert, C. & Ogrzyzko, V. Codon optimization of the BirA enzyme gene leads to higher expression and an improved efficiency of biotinylation

- of target proteins in mammalian cells. *Journal of Biotechnology* 116, 245-249 (2005).
328. Northey, J.J. et al. Signaling through ShcA Is Required for Transforming Growth Factor β - and Neu/ErbB2-Induced Breast Cancer Cell Motility and Invasion. *Molecular and Cellular Biology* 28, 3162-3176 (2008).
329. Slamon, D.J. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *science* 235, 177-182 (1987).
330. Guy, C.T. et al. Expression of the *neu* protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10578-10582 (1992).
331. Marcoux, N. & Vuori, K. EGF receptor mediates adhesion-dependent activation of the Rac GTPase: a role for phosphatidylinositol 3-kinase and Vav2. *Oncogene* 22, 6100-6106 (2003).
332. Woods Ignatoski, K., M., Grewal, N.K., Markwart, S., Livant, D.L. & Ethier, S.P. P38MAPK Induces Cell Surface α 4 Integrin Downregulation to Facilitate erbB-2—Mediated Invasion. *neoplasia* 5, 128-134 (2003).
333. Yang, C., Liu, Y., Lemmon, M.A. & Kazanietz, M.G. Essential Role for Rac in Heregulin β 1 Mitogenic Signaling: a Mechanism That Involves Epidermal Growth Factor Receptor and Is Independent of ErbB4. *Molecular and Cellular Biology* 26, 831-842 (2006).
334. Dise, R.S., Frey, M.R., Whitehead, R.P. & Polk, D.B. Epidermal growth factor stimulates Rac activation through Src and phosphatidylinositol 3-kinase to promote colonic epithelial cell migration. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 294, G276-G285 (2008).
335. Daub, H. et al. Kinase-Selective Enrichment Enables Quantitative Phosphoproteomics of the Kinome across the Cell Cycle. *molecular cell* 31, 438-448 (2008).
336. Xu, B. et al. Targeted deletion of *Tsk1* and 2 causes male infertility due to haploinsufficiency. *Developmental Biology* 319, 211-222 (2008).
337. O'Connell, M.J., Krien, M.J.E. & Hunter, T. Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends in Cell Biology* 13, 221-228 (2003).

338. O'Regan, L. & Fry, A.M. The Nek6 and Nek7 Protein Kinases Are Required for Robust Mitotic Spindle Formation and Cytokinesis. *Molecular and Cellular Biology* 29, 3975-3990 (2009).
339. Bustamante, J. et al. Novel primary immunodeficiencies revealed by the investigation of paediatric infectious diseases. *Current Opinion in Immunology* 20, 39-48 (2008).
340. Izquierdo, J.M. & Valcárcel, J. Fas-activated Serine/Threonine Kinase (FAST K) Synergizes with TIA-1/TIAR Proteins to Regulate Fas Alternative Splicing. *Journal of Biological Chemistry* 282, 1539-1543 (2007).
341. Temtamy, S.A. et al. Long Interspersed Nuclear Element-1 (LINE1)-Mediated Deletion of *EVC*, *C4orf6*, and *STK32B* in Ellis-van Creveld Syndrome With Borderline Intelligence. *Human Mutation* 29, 931-938 (2008).
342. Hurov, J. & Piwnicka-Worms, H. The Par-1/MARK Family of Protein Kinases. *Cell cycle* 6, 1966-1969 (2007).
343. Kanei-Ishii, C. et al. Fbxw7 Acts as an E3 Ubiquitin Ligase That Targets c-Myb for Nemo-like Kinase (NLK)-induced Degradation. *Journal of Biological Chemistry* 283, 30540-30548 (2008).
344. Hao, Q., Wang, L., Zhao, Z.J. & Tang, H. Identification of Protein Kinase D2 as a Pivotal Regulator of Endothelial Cell Proliferation, Migration, and Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 284, 799-806 (2009).
345. Petronczki, M., Lénárt, P. & Peters, J.-M. Polo on the Rise—from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1. *developmental cell* 14, 646-659 (2008).
346. Bright, N.J., Thornton, C. & Carling, D. The regulation and function of mammalian AMPK-related kinases. *acta physiologica* 196, 15-26 (2009).
347. Ribas, C. et al. The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: Role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768, 913-922 (2007).
348. Mercer, S.E. & Friedman, E. A Multifunctional Dual-Specificity Kinase Involved in Growth Arrest, Differentiation, and Cell Survival. *Cell Biochemistry and Biophysics* 45, 303-315 (2006).

349. Fu, A. & Sreaton, R.A. Using kinomics to delineate signaling pathways. *Cell cycle* 7, 3823-3828 (2009).
350. Goldfinger, L.E. et al. RLIP76 (RalBP1) is an R-Ras effector that mediates adhesion-dependent Rac activation and cell migration. *Journal of Cell Biology* 174, 877-888 (2006).
351. Goldfinger, L.E. et al. An Experimentally Derived Database of Candidates Ras-Interacting Proteins. *Journal of Proteome Research* 6, 1806-1811 (2007).
352. Goldfinger, L.E. Choose your own path: specificity in Ras GTPase signaling. *Molecular Biosystems* 4, 293-299 (2008).
353. Buchsbaum, R.J., Connolly, B.A. & Feig, L.A. Interaction of Rac Exchange Factors Tiam1 and Ras-GRF1 with a Scaffold for the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade. *Molecular and Cellular Biology* 22, 4073-4085 (2002).
354. Buchsbaum, R.J., Connolly, B.A. & Feig, L.A. Regulation of p70 S6 Kinase by Complex Formation between the Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor (Rac-GEF) Tiam1 and the Scaffold Spinophilin. *Journal of Biological Chemistry* 278, 18833-18841 (2003).
355. Tomasetto, C. et al. Lasp-1 (MLN 50) defines a new LIM protein subfamily characterized by the association of LIM and SH3 domains. *FEBS Letters* 373, 245-249 (1995).
356. Grunewald, T.G.P. et al. Nuclear localization and cytosolic overexpression of LASP-1 correlates with tumor size and nodal-positivity of human breast carcinoma. *BMC Cancer* 7 (2007).
357. Schreiber, V. et al. Lasp-1, a Novel Type of Actin-Binding Protein Accumulating in Cell Membrane Extensions. *Molecular Medicine* 4, 675-687 (1998).
358. Li, B., Zhuang, L. & Trueb, B. Zyxin Interacts with the SH3 Domains of the Cytoskeletal Proteins LIM-nebulette and Lasp-1. *Journal of Biological Chemistry* 279, 20401-20410 (2004).
359. Lin, Y.H. et al. Regulation of cell migration and survival by focal adhesion targeting of Lasp-1. *Journal of Cell Biology* 165, 421-432 (2004).

360. Lanning, C.C., Ruiz-Velasco, R. & Williams, C.L. Novel Mechanisms of the Co-regulation of Nuclear Transport of SmgGDS and Rac1. *Journal of Biological Chemistry* 278, 12495-12506 (2003).
361. Lanning, C.C., Daddona, J.L., Ruiz-Velasco, R., Shager, S.H. & Williams, C.L. The Rac1 C-terminal Polybasic Region Regulates the Nuclear Localization and Protein Degradation of Rac1. *Journal of Biological Chemistry* 279, 44197-44210 (2004).
362. Harata, M. et al. Multiple Actin-Related Proteins of *Saccharomyces cerevisiae* Are Present in the Nucleus. *Journal of Biochemistry* 128, 665-671 (2000).
363. Muller, J. et al. Sequence and Comparative Genomic Analysis of Actin-related Proteins. *Molecular Biology of the Cell* 16 (2005).
364. Philimonenko, V.V. et al. Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nature Cell Biology* 6, 1165-1172 (2004).
365. Chen, M. & Shen, X. Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin dynamics. *Current Opinion in Cell Biology* 19, 326-330 (2007).
366. Bohnsack, M.T., Stüven, T., Kuhn, C., Cordes, V.C. & Görlich, D. A selective block of nuclear actin export stabilizes the giant nuclei of *Xenopus* oocytes. *Nature Cell Biology* 8, 257-263 (2006).
367. Yoo, Y., Wu, X. & Guan, J.-L. A Novel Role of the Actin-Nucleating Arp2/3 Complex in the Regulation of RNA Polymerase II-dependent Transcription. *Journal of Biological Chemistry* 282, 7616-7623 (2007).
368. Wu, X. et al. Regulation of RNA-polymerase-II-dependent transcription by N-WASP and its nuclear-binding partners. *Nature Cell Biology* 8, 756-763 (2006).
369. Welch, H., Eguinoa, A., Stephens, L.R. & Hawkins, P.T. Protein Kinase B and Rac Are Activated in Parallel within a Phosphatidylinositol 3OH-kinase-controlled Signaling Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 273, 11248-11256 (1998).
370. Jeong, H.-G. et al. Rac1 prevents cisplatin-induced apoptosis through down-regulation of p38 activation in NIH3T3 cells. *FEBS Letters* 518, 129-134 (2002).
371. Lai, J.-F. et al. An ecdysone and tetracycline dual regulatory expression system for studies on Rac1 small GTPase-mediated signaling. *American journal of physiology. Cell physiology* 285, C711-C719 (2003).

372. No, D., Yao, T.-P. & Evans, R.M. Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 3346-3351 (1996).
373. Zhu, Z., Zheng, T., Lee, C.G., Homer, R.J. & Elias, J.A. Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling. *cell and developmental biology* 13, 121-128 (2002).
374. Yang, J., Zhang, Z., Roe, S.M., Marshall, C.J. & Barford, D. Activation of Rho GTPases by DOCK Exchange Factors Is Mediated by a Nucleotide Sensor. *Science* 325, 1398-1402 (2009).
375. Beausoleil, S.A., Villén, J., Gerber, S.A., Rush, J. & Gygi, S.P. A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and sites localization. *Nature Biotechnology* 24, 1285-1292 (2006).
376. Legate, K.R., Montañez, E., Kudlacek, O. & Fässler, R. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (2006).

Annexe A : Contributions et collaborations

Certaines des expériences présentées ici ont été faites par d'autres étudiants que moi dans notre laboratoire ou encore en collaboration avec d'autres laboratoires et nous souhaitons ici reconnaître leur travail et les en remercier. Ainsi, les expériences de marquage métabolique au ^{32}P , la purification de Dock180 et la préparation des échantillons pour l'analyse des phosphopeptides en spectrométrie de masse ainsi que l'analyse des données obtenues ont été faites par **Rosemarie Gauthier**. De plus, elle et **Karine Campanelli** se sont chargées de purifier le domaine C-terminal de Dock5 pour le criblage du kinome et ont analysées les résultats obtenus. Le criblage a été fait par le laboratoire du **Dr. Screatton**. De plus, l'analyse des phosphopeptides ainsi qu'une partie des échantillons pour les partenaires de Rac a été faite par le laboratoire du **Dr. Thibault** à l'IRIC. Finalement, les lignées stables NMuMG Neu-T ont été établies par **Jason Northey** du laboratoire du **Dr. Siegel**. Merci!

