

Université de Montréal

**L'étude du rôle d'ARF1 dans la migration et la prolifération
des cellules du cancer du sein**

par

Pierre-Luc Boulay

Département de pharmacologie, Université de Montréal
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de PhD
en Pharmacologie
option moléculaire

Septembre, 2011

© Pierre-Luc Boulay, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

L'étude du rôle d'ARF1 dans la migration et la prolifération
des cellules du cancer du sein

présentée par :
Pierre-Luc Boulay

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Christian Beauséjour, président-rapporteur
Audrey Claing, directeur de recherche
Trang Hoang, membre du jury
Nathalie Lamarche-Vane, examinateur externe
Anne-Marie Mes-Masson, représentant du doyen de la FES

Résumé

Les facteurs d'ADP-ribosylation (ARFs) sont des petites GTPases impliquées dans le transport vésiculaire, la synthèse des lipides membranaires et la réorganisation du cytosquelette d'actine. Les isoformes 1 (ARF1) et 6 (ARF6) sont les plus étudiées. ARF1 est connue pour être distribuée à l'appareil de Golgi, alors qu'ARF6 est confinée principalement à la membrane plasmique. Récemment, il a été démontré qu'ARF6 est hautement exprimée et activée dans plusieurs cellules de cancer du sein invasif et que celle-ci contrôle les processus de migration et d'invasion. Cependant, le rôle d'ARF1 dans ces processus biologiques impliqués dans la formation de métastases du cancer du sein demeure méconnu.

Dans la présente étude, nous avons utilisé comme modèle d'étude pour ARF1 les MDA-MB-231, une lignée de cellules invasives du cancer du sein exprimant de haut niveau de récepteurs au facteur de croissance épidermique (EGFR). Afin d'évaluer le rôle d'ARF1 dans la migration, dans la transition épithéliale mésenchymateuse (EMT) et dans la prolifération cellulaire, nous avons procédé à deux types d'approches expérimentales, soit l'inhibition de l'expression endogène d'ARF1 par l'interférence à l'ARN de même que la surexpression de formes mutantes dominante négative (ARF1T³¹N) et constitutivement active d'ARF1 (ARF1Q⁷¹L), qui miment les formes inactive et active de la GTPase, respectivement. De manière intéressante, la suppression d'ARF1 et la surexpression de la forme inactive d'ARF1 induisent l'arrêt de la migration et de la prolifération des MDA-MB-231 de manière dépendante à l'activation de l'EGFR et ce, en bloquant l'activation de la voie PI3Kinase.

De plus, nous démontrons qu'ARF1, de même que les ARF GEFs Cytohésine-1 et Cytohésine-2, contribuent au phénotype invasif des cellules tumorales de cancer du sein. Dans les mêmes approches expérimentales, nous montrons que l'inactivation d'ARF1 dans les MDA-MB-231 déclenche un arrêt de croissance irréversible associé à l'induction de la sénescence et ce, en régulant la fonction de la protéine du rétinoblastome pRb.

Enfin, cette étude a permis de mettre en évidence le rôle physiologique d'ARF1 dans les processus de migration et de prolifération cellulaire, deux événements biologiques responsables de la progression du cancer du sein.

Mots-clés : ARF1, EGFR, PI3Kinase, Cytohésine-1, Cytohésine-2, pRb, migration, prolifération

Abstract

The ADP-ribosylation factors (ARFs) are small GTPases involved in vesicular transport, lipids synthesis and cytoskeleton remodelling. The isoforms 1 (ARF1) and 6 (ARF6) are the most studied. ARF1 is classically distributed at the Golgi apparatus whereas ARF6 is found at the plasma membrane and onto recycling endosomes. It was recently demonstrated that ARF6 is highly expressed and activated in several breast cancer cell lines and is associated with enhanced migration and invasiveness. However, the role of ARF1, in these biological processes necessary for metastasis formation, remains unclear.

In this study, we used MDA-MB-231 cells, an invasive breast cancer cell line, that expressed high levels of EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) to investigate the role of ARF1 in migration and proliferation. To further establish the role of ARF1 in cell migration, EMT and proliferation, we used two experimental approaches. First, we decreased endogenous ARF1 expression by RNA interference and second we overexpressed the dominant negative (ARF1T³¹N) and constitutively active (ARF1Q⁷¹L) ARF1 mutants, which mimic the inactive and active forms of ARF1, respectively. We demonstrated that depletion of ARF1 as well as overexpression of the inactive form of ARF1 blocked EGFR-mediated cell migration and proliferation by inhibiting the activation of PI3Kinase.

Moreover, we showed, using invasive and non invasive breast cancer cell lines, that ARF1 and both Cytohesin-1 and Cytohesin-2 are required for invasiveness. Using similar approaches, we reported that inactivation of ARF1 in MDA-MB-231 cells promotes cell growth arrest associated to senescence program by regulating the function of the Retinoblastoma protein pRb.

Altogether, these findings demonstrate a physiological role for ARF1 in cell migration and proliferation. These two biological events are necessary for breast cancer progression.

Keywords : ARF1, EGFR, PI3Kinase, Cytohesin-1, Cytohesin-2, pRb, cell migration, cell proliferation

Table des matières

Chapitre I : Introduction.....	19
I.1 Le cancer du sein	19
I.1.1 Les types de cancer du sein.....	19
I.1.2 Le cancer du sein triple négatif.....	20
I.1.3 Le développement des glandes mammaires.....	21
I.1.4 Les origines de la genèse de tumeurs associées au cancer du sein	22
I.1.4.1 Le modèle stochastique.....	23
I.1.4.2 Le modèle hiérarchique	23
I.2 : Les récepteurs à activité tyrosine kinase	24
I.2.1 Classification des RTKs	25
I.2.2 Les ligands associés au récepteur à l'EGF.....	26
I.2.3 Mutations endogènes de l'EGFR.....	27
I.2.4 Structure et sites de phosphorylation de l'EGFR.....	28
I.2.5 Mécanisme d'activation de l'EGFR	30
I.2.6 Les inhibiteurs de l'EGFR et Her2	31
I.2.7 Les voies de signalisation médiées par l'EGFR	32
I.2.7.1 La voie des MAPKinases.....	33
I.2.7.1.1 ERK1/2	35
I.2.7.1.2 p38/JNK/ERK5.....	37
I.2.7.2 La voie de la phospholipase C- γ (PLC- γ).....	38
I.2.7.3 La voie de PI3Kinase.....	39
I.2.7.3.1 Structure et classification.....	39
I.2.7.3.2 L'axe signalétique PI3Kinase/AKT.....	40
I.2.7.3.3 AKT, une protéine polyvalente.....	42
I.3 : La formation de métastases	45
I.3.1 Tumeur primaire	45

I.3.2	Angiogenèse tumorale	46
I.3.3	Détachement de la tumeur primaire.....	47
I.3.4	Invasion de la tumeur.....	47
I.3.5	Pénétration de la tumeur dans la circulation.....	49
I.3.6	Infiltration/latence/colonisation	52
I.4	: La prolifération cellulaire	53
I.4.1	Les kinases dépendantes des cyclines et les cyclines	54
I.4.2	Les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines	55
I.4.3	Les protéines RB.....	57
I.4.4	Les facteurs de transcription E2Fs.....	62
I.4.5	La chromatine	63
I.4.6	Les modifications épigénétique des histones.....	63
I.4.7	L'activation des voies ATM/ATR	66
I.4.8	La sénescence	67
I.4.8.1	L'implication pathologique de la sénescence	69
I.5	: La transition épithéliale-mésenchymateuse.....	69
I.5.1	La Cadhérine-E.....	71
I.5.2	La Cadhérine-N	73
I.5.4	Les facteurs répresseurs de la transcription de la Cadhérine-E	73
I.6	: La migration	74
I.6.1	Les bases moléculaires de la migration	76
I.6.2	La polarisation	77
I.6.3	L'adhésion	80
I.6.3.1	La formation des points d'adhérence.....	80
1.6.3.1.1	Le rôle des protéines régulatrices de l'activation des GTPases Rho dans l'adhésion	82
1.6.3.1.2	Les points focaux d'adhésion.....	83
I.7	: Les GTPases monomériques	84

I.7.1 La GTPase Rho.....	86
I.7.2 La GTPase Cdc42.....	88
I.7.3 La GTPase Rac1.....	88
I.7.4 Les facteurs de ribosylation de l'ADP (ARFs).....	89
I.7.4.1 ARF1.....	92
1.7.4.1.1 Mécanisme moléculaire d'activation d'ARF1 et mutations.....	93
1.7.4.1.2 La distribution d'ARF1 à l'appareil de Golgi et à la membrane plasmique.....	94
I.7.4.2 ARF6.....	96
1.7.4.2.1 La distribution d'ARF6 à la membrane plasmique.....	97
1.7.4.2.2 ARF6 et l'endocytose.....	97
1.7.4.2.3 ARF6 et le cytosquelette d'actine.....	97
1.7.4.2.4 ARF6 et l'adhésion.....	98
1.7.4.2.5 ARF6 et le cancer.....	99
1.7.4.2.6 Études d'ARF6 <i>in vivo</i>	100
I.7.5 Les protéines régulatrices de l'activité des ARFs.....	100
I.7.5.1 Les ARF-GEFs.....	100
I.7.5.1.1 Les ARF GEFs sensible à la BFA.....	102
I.7.5.1.2 Les ARF GEFs résistante à la BFA : Les Cytohésines.....	104
I.7.5.1.3 Les ARF GEFs résistante à la BFA : EFA6.....	106
I.7.5.1.4 Les ARF GEFs résistante à la BFA : Les BRAGs.....	106
I.7.5.1.5 Les ARF GEFs résistante à la BFA : Fbox8.....	107
I.7.5.2 Les ARF-GAPs.....	108
I.8 Hypothèse de recherche.....	111
Chapitre II.....	113
ARF1 controls the activation of the PI3K pathway to regulates EGF dependent growth and migration of breast cancer cells.....	113
II.1 Summary.....	114
II.2 Introduction.....	114

II.3 Materials and Methods	116
II.4 Results	121
II.5 Discussion	127
II.6 References	130
II.7 Figures	133
Chapitre III :	149
ARF1 controls proliferation of breast cancer cells by regulating the Retinoblastoma protein	149
II.1 Summary	150
III.2 Introduction.....	151
III.3 Materials and Methods.....	154
III.4 Results.....	160
III.5 Discussion.....	167
III.6 References.....	173
III.7 Figures.....	182
Chapitre IV:.....	203
Cytohesin-1 and Cytohesin-2 regulates EGF-mediated ARF1 activation in breast cancer cells	203
IV.1 Summary.....	204
IV.2 Introduction.....	205
IV.3 Materials and Methods.....	209
IV.4 Results.....	212
IV.5 Discussion.....	219
IV.6 References.....	223
IV.7 Figures	227
Chapitre V: Discussion	244
Conclusion	261
Perspectives.....	263

Annexe I.....	267
Les protéines ARF : Interrupteurs moléculaires de la prolifération des tumeurs et de la formation des métastases	267
Annexe II.....	274
Références.....	281

Liste des figures

Figures du corps de la thèse :

Figure 1: Famille des récepteurs ErbBs et leurs ligands.....	25
Figure 2 : Sites de phosphorylation du récepteur à l'EGF.....	29
Figure 3 : Les voies signalétiques induites par l'EGFR.....	33
Figure 4 : La voie MAPKinase.....	34
Figure 5 : La voie PI3Kinase.....	41
Figure 6 : La phase de transition G1/S.....	59
Figure 7 : Les bases de la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT).....	70
Figure 8 : Représentation schématique du cycle de la migration cellulaire.....	75
Figure 9 : La signalisation des GTPases de type Rho dans la migration.....	79
Figure 10 : Le mécanisme d'activation des petites protéines G monomériques.....	86
Figure 11 : Structure moléculaire des ARFs.....	92
Figure 12 : Organisation des domaines des ARF GEFs.....	101

Figures associées aux articles:

Figure 13: EGF promotes the activation of ARF1 and ARF6.....	133
Figure 14: ARF1 is localized to dynamic plasma membrane ruffles.....	134
Figure 15: EGF stimulation promotes ARF1-dependent migration of MDA-MB-231 cells.....	135

Figure 16: EGF stimulation promotes ARF1-dependent proliferation of MDA-MB-231 cells.....	136
Figure 17: Depletion of ARF1 does not impair the activation of the EGFR by EGF.....	137
Figure 18: ARF1 regulates the activation of the PI3K pathway following EGF stimulation.....	139
Figure 19: Role of ARF1 and the recruitment of PI3K.....	141
Figure 20: Depletion of ARF1 blocks the migration and proliferation of MDA-MB-435 and SKBR3 cells.....	143
Figure 21: Expression levels of ARF1 and ARF6, and effect of siRNA.....	144
Figure 22: Cellular distribution of ARF1.....	146
Figure 23: Regulation of Akt and Erk1/2 phosphorylation by ARF1T31N and depletion of ARF6.....	147
Figure 24: ARF1 controls migration and proliferation of MDA-MB-435 and SKBR3 cells.....	148
Figure 25: ARF1 regulates cell proliferation.....	182
Figure 26: ARF1 depletion leads to cellular senescence.....	184
Figure 27: The association of pRB and E2F1 is regulated by ARF1.....	186
Figure 28: Redistribution of ARF1 in the nucleus in non proliferative conditions.....	188
Figure 29: ARF1 directly interacts with pRB.....	190
Figure 29: ARF1 directly interacts with pRB. Figure 30: ARF1 regulates the recruitment of E2F and pRB to E2F-responsive promoters.....	192
Figure 31: Model illustrating the role of ARF1 in cell proliferation.....	194
Figure 32: Knockdown of ARF1 expression in MCF10A.....	196
Figure 33: p16INK4a locus expression in breast cancer cells and ARF1-dependent senescence of SKBR3 cells.....	197
Figure 34: Expression of an ARF1 dominant negative mutant and senescence of MDA-MB-231 cells.....	198

Figure 35: ARF1 depletion leads to a modulation of pRB expression.....	199
Figure 36: Redistribution of ARF1.....	200
Figure 37: Localization of ARF1T31N in MDA-MB-231 and COS7 cells.....	201
Figure 38: Cytohesin-1, Cytohesin-2 and ARF1 are highly expressed in invasive breast cancer cell lines.....	227
Figure 39: Cytohesin-1 as well as Cytohesin-2 depletion abolishes EGF-regulated ARF1 activation in MDA-MB-231.....	229
Figure 40: Depletion of Cytohesin-1 and Cytohesin-2 as well as the pretreatment with LM11 compound prevent EGF induced migration of MDA-MB-231.....	231
Figure 41: Depletion of Cytohesins as well as LM11 treatment impairs the recruitment of ARF1 and Cytohesin-1 to EGFR in MDA-MB-231 cells and effect of LM11 on the activation of AKT and ERK1/2.....	233
Figure 42: Depletion of ARF1 as well as Cytohesins lead to enhanced Vimentin expression in MDA-MB-231 cells.....	235
Figure 43: Role of Cytohesin-1 and Cytohesin-2 on ARF1 activation as well as migration in MCF7 cells.....	237
Figure 44: Role of ARF1 and Cytohesins in EMT program of MCF7 cells.....	239
Figure 45: Expression levels of Cytohesin-1 and Cytohesin-2 and effect of siRNA.....	241
Figure 46: Effect of LM11 on Golgi assembling in MDA-MB-231 cells.....	242
Figure 47: Effect of LM11 on migration and death of MDA-MB-231.....	243

Figures associées aux Annexes I et II :

Figure 48 : L'activation du récepteur à l'EGF induit la migration des cellules du cancer du sein.....	271
Figure 49 : Rôles cellulaires de ARF1 et ARF6.....	272
Figure 50: The activation of ARF1 is unaffected by PI3Kinase inactivation.....	275
Figure 51: The phosphorylation of Y845 (EGFR) regulates the activation of ARF1.....	276

Figure 52: The activation of Src controls the activation of ARF1.....	277
Figure 53: Role of ARF1 and the recruitment of PI3K.....	278
Figure 54: The expression of Grb2 is essential for the activation of ARF1.....	279
Figure 55: The association of ARF1 and pRB is regulated by GIT1.....	280

Liste des abréviations

ADP : Adénosine diphosphate
ANK : Répétition d'ankyrine
ARD : Protéine à domaine commun aux facteurs de ribosylation de l'ADP
ARF : Facteur de ribosylation de l'ADP
Arl : Protéine ARF-like
ARNO : « ADP-ribosylation factor nucleotide-binding site opener »
β2AR : Récepteur β2-adrénérique
CR : <i>Cystein Rich</i>
CK : Cytokératine
DAG : Diacylglycérol
EGF : Facteur de croissance épidermique
EGFR : Récepteur associé aux facteurs de croissance épidermique
EMT : Transition épithéliale-mésenchymateuse
ER : Récepteur à l'estrogène
ERK: <i>Extracellular-regulated kinase</i>)
FAK: <i>Focal Adhesion Kinase</i>
FGF: Facteur de croissance dérive des fibroblastes
GAP : <i>GTPase activating protein</i>
GDI : Inhibiteur de dissociation du GDP
GDP : Guanosine diphosphate
GEF : Facteur d'échange de guanosine
GH : Hormone de croissance
GIT: <i>G protein-coupled receptor kinase interacting protein</i>
GRK : Kinase des récepteurs couplés aux protéines G
Grb2/7: <i>Growth factor receptor-bound protein-2/7</i>
GTP : Guanosine triphosphate
HAT : Histone acétyltransférase
HB-EGF : Facteur de croissance épidermique liant l'héparine
HDAC : Histone déacétyltransférase
HGF : Facteur de croissance des hépatocytes
HP1 : Protéine associée à l'hétérochromatine

JNK : *c-Jun N-terminal Kinase*
IP3 : Inositol triphosphate
LH : Hormone lutéinisante
LPA : Acide lysophatidique du sérum
MAP : *Mitogen-activated protein*
MDCK : *Madin-Darby kidney cells*
MEK: *MAP ERK kinase*
MET: Transition mésenchymateuse-épithéliale
MLC : Chaîne légère de la myosine
MMP : Metalloprotéase de la matrice
NFAT : Facteur nucléaire associé aux lymphocytes T
NFκB : Facteur nucléaire κB
NSCLC : Carcinome du poumon pas à petites cellules
N-terminale : extrémité amino-terminale
PAK : Kinase activée par p21
PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDGFR : Récepteur associé au facteur de croissance dérivé des plaquettes
PH : Domaine homologue de la plekstrine
PKB : Protéine kinase B
PKC : Protéine kinase C
PLC : Phospholipase C
PI3K : Phosphatidyl Inositol-3 Kinase
PIX : Facteur d'échange interagissant avec PAK
PKC : Protéine kinase C
PLD : Phospholipase D
PR : Récepteur à la progestérone
p130Cas: Protéine de 130 kDa associée à Crk
RCPG : Récepteur couplé aux protéines G
ROK, ROCK : Kinase de Rho
ROS : Espèce réactive de l'oxygène
RTK : Récepteur tyrosine kinase
SAHF : Foci d'hétérochromatine associé à la sénescence
SASP : Phénotype de sécrétion associé à la sénescence
SDF-1 : Facteur des cellules stromales de type 1
SH2/3 : *Src Homology 2/3*
VEGF : Facteur de croissance endothéliale vasculaire
VEGFR : Récepteur du facteur de croissance endothéliale
VIH: Virus de l'immunodéficience humaine
ZO-1 : Zonula Occludens

Aux trois amours de ma vie :
Caroline, Éliott et Noah

Remerciements

J'aimerais remercier mes parents Pierette et Claude de m'avoir encouragé tout au long de mon cheminement scolaire. Vous avez cru en moi jusqu'au bout et c'est grâce à votre soutien que je termine mes études académiques. Je vous en serai reconnaissant jusqu'à la fin de mes jours.

Je remercie ma femme Caroline de m'avoir supporté tout au long de mon parcours et surtout lors de mes moments de stress. Je te remercie simplement d'être dans ma vie.

Je remercie mes enfants Éliott et Noah de me faire vivre des moments inoubliables à chaque jour et de m'avoir donné, en tant que papa et étudiant-chercheur, le sens de l'organisation.

Je tiens à remercier ma directrice de recherche Audrey Claing de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, sans quoi je n'en serais pas là aujourd'hui. Audrey a un mentor exemplaire rempli d'humanisme et d'optimisme, mais également une amie qui a su m'épauler durant mes moments de labeur. J'espère que tu as apprécié mon passage comme j'ai savouré mes 7 années passées à ton laboratoire. La manière que tu as de façonner de nouveaux projets de recherche restera à jamais pour moi un modèle à suivre pour ma carrière scientifique.

Je remercie Tanguy Houndolo et Marie-Eve Poupart de m'avoir fourni les outils nécessaires pour accomplir mon projet de recherche. Un merci spécial à Mathieu Cotton de m'avoir fait découvrir que la musique des groupes *Interpol* et *Deerhoof* permet de créer une atmosphère propice aux expériences en laboratoire. Je remercie Zeinab Daher d'avoir été là lors de mes moments difficiles et également de m'avoir chéri avec ses petits mets libanais. Je remercie tous les autres membres du laboratoire que j'ai côtoyés durant mon passage, soit Dario Bivona, Derek Roberston, Maryse Gariépy, Marie-Ève Parent, Ricardo Charles, Danaë Tassy, Sabrina Schlienger, Eric Haines, Sébastien Lewis Saravalli et Claudia Benjamin avec qui j'ai partagé d'agréables moments. Je tiens à mentionner l'aide

et le soutien de mes deux amies et collègues de classe, Julie Desroches et Julie-Émilie Huot-Marchand, avec qui j'ai passé des moments inoubliables et rigolos. Un merci spécial à ma « belle-mère » d'avoir pris la relève à la maison durant ma rédaction de thèse.

Enfin, je remercie les membres du jury ainsi que Trina Mainville d'avoir accepté de lire et de corriger cette thèse.

Chapitre I : Introduction

I.1 Le cancer du sein

Le cancer du sein constitue la forme de cancer la plus rencontrée chez la femme. Chaque année, plus de 1 million de femmes dans le monde entier succombent à cette maladie. Au Canada, 1 femme sur 9 en sera atteinte, dont 1 sur 28 en mourra (www.cancer.ca). Le développement de tumeurs au sein de la glande mammaire est causé par un éventail de gènes, incluant ceux impliqués dans les cancers héréditaires et sporadiques. L'élucidation des mécanismes moléculaires impliqués dans la genèse et la propagation des tumeurs dans l'organisme constitue un point déterminant dans la compréhension de cette pathologie complexe. De plus, l'identification et la caractérisation de nouvelles cibles moléculaires permettent d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-cancer dans le but d'améliorer le sort des patients souffrant de cette maladie mortelle.

I.1.1 Les types de cancer du sein

Pour mieux comprendre cette maladie, il est important de traiter de la nomenclature des différents types de cancers du sein. D'un point de vue général, nous pouvons classer le cancer du sein en deux types distincts, soit les types ductal et lobulaire. Ces types sont déterminés selon le site initial de formation du foyer primaire au niveau des conduits lactifères (ductal) ou à l'intérieur du conduit lactifère (lobulaire). Cependant, nous pouvons classer ces types de cancer du sein en 5 sous-types selon leur statut d'expression des récepteurs à l'estrogène (ER), à la progestérone et au récepteur associé aux facteurs de croissance Her2. La classification de Sorlie et ses collaborateurs suggère 6 sous types : 1) type basal, 2) luminal de type A, 3) luminal de type B, 4) luminal de type C, 5) Her2⁺/ER⁻, 6) type normal [1]. Le type basal est principalement caractérisé par l'expression des Cytokératines 5 et/ou 6 et 14 et du récepteur à l'EGF. Par contre ce type démontre une absence d'expression pour les récepteurs ER, PR et Her2 [2]. Le type basal représente la

majorité des carcinomes ductal et démontre un faible taux de survie chez les patients atteints. Nous incluons dans ce sous-type les tumeurs dites triple négative (ER⁻, PR⁻ et Her2⁻) qui sont détectées dans environ 20% de la totalité des cancers du sein. Le type luminal A est caractérisé par l'expression des récepteurs ER et PR et l'absence d'expression du récepteur Her2 [2]. Le type luminal A est associé aux carcinomes ductal et lobulaire et a un bon pronostic. Le type luminal B diffère du type luminal A par l'expression du récepteur Her2 et notamment par l'expression des marqueurs Ki67 [3]. Les tumeurs issues du type luminal B sont de petites tailles par rapport aux 4 autres types de cancer du sein. Toutefois, ce genre de tumeurs est annonciateur d'un mauvais pronostic et d'un faible taux de survie. Les cancers du sein de type Her2⁺ représentent plus de 60% de la totalité des patients atteints d'un cancer du sein, exprimant des hauts niveaux de récepteurs Her2 et des bas niveaux des récepteurs ER et PR. Ce sous-type est présent dans la majorité des carcinomes ductal et entraîne des risques élevés de récurrences. Le type normal est appelé ainsi pour caractériser les autres types de tumeurs détectées. Cette classification des types de cancer du sein est relative évidemment aux cellules cancéreuses se développant au sein du tissu épithélial mammaire.

I.1.2 Le cancer du sein triple négatif

Le cancer du sein triple négatif est négatif pour les récepteurs ER, PR et Her2. Il démontre un potentiel pro-métastatique élevé et est associé à un faible pronostic, expliquant l'absence de développement de thérapies anti-cancer spécifiques contre ce sous-type. Les tumeurs triple négative démontrent un phénotype basal, et se développent en carcinome ductal *in situ* et évolue en carcinome ductal invasif *in situ*. Le profil génomique de ces tumeurs est très hétérogène en comparaison avec les sous-types laminal A et B, Her2⁺, normal et basal. Malgré le grand intérêt scientifique pour les tumeurs de cancer du sein de type basal et triple négative, aucun consensus n'a été désigné pour la définition précise de ces tumeurs. Les tumeurs présentant une forme mutée de BRCA1 sont fréquemment triples négatives, contrairement aux tumeurs présentant une mutation de BRCA2 qui ne démontrent aucune altération d'expression pour les récepteurs ER, PR et Her2 [4]. Étant

donné l'hétérogénéité de ce type de cancer, la stratégie en termes de thérapie reposerait sur un modèle réunissant une multitude d'agents thérapeutiques. Par exemple, les tumeurs triples négatives sont positives pour l'EGFR, c-KIT, TOPO2A, c-Myc, PARP et VEGF/VEGFR [4, 5], où il existe à ce jour des composés inhibiteurs de chacun de ces marqueurs.

À l'origine, ces cellules épithéliales mammaires présentent un statut non cancéreux, soit un état normal. Afin de faciliter la compréhension de la transformation de la cellule épithéliale normale en cellule cancéreuse, les thèmes du développement normal des glandes mammaires et de la genèse des cellules tumorales associées au cancer du sein seront abordés au cours de la présente section.

I.1.3 Le développement des glandes mammaires

La glande mammaire est un organe sécréteur du lait maternel. Ce tissu est composé principalement d'un épithélium et d'un stroma. L'épithélium mammaire est composé de trois types cellulaires, soit ductal, alvéolo-luminal et myoépithélial. Cet organe subit deux principales modifications postnatales, soit au cours de la période de la puberté et de la grossesse [5].

Dans les premières semaines de vie, une structure archaïque définit le futur conduit lactifère. Ce dernier prend maturité et une arborisation se forme en réponse aux estrogènes ovariens et à l'hormone de croissance GH. À la puberté, l'élongation des diverses bifurcation de l'arbre mammaire se poursuit et des terminaisons bulbaires prennent naissance sous la coordination de la progestérone ovarienne. Ces terminaisons sont entourées d'un stroma riche en cellules souches mammaires. À l'âge adulte, ces cellules souches mammaires sont généralement en état quiescent. Cet arrêt de croissance est conséquent à l'occupation maximale du volume et de la surface disponible pour l'arborisation mammaire. En effet, dans des conditions normales, les cellules épithéliales sont liées l'une à l'autre via des jonctions adhérentes et lorsque les cellules prolifèrent davantage pour atteindre un état de confluence, ces dernières entrent en arrêt de croissance.

Les cellules souches mammaires distribuées au sein du microenvironnement ont la capacité de s'auto-renouveler et de produire d'autres types de cellules fonctionnelles constituant le sein, telles que les cellules progénitrices des alvéoles luminales dans le cas d'une grossesse et les des cellules progénitrices ductales dans le cas d'une puberté. De plus, les cellules souches pourront également se différencier en cellules myoépithéliales contractiles au cours de ces deux situations biologiques. Ainsi les cellules souches mammaires participent activement au développement des glandes mammaires. À la différence de la puberté, lors de la grossesse, les unités alvéolaires formées suite à l'involution des terminaisons bulbaires sont soumises à la prolactine et à la progestérone. Ces deux hormones contrôleront la morphogenèse de ces structures [5]. La sécrétion de ces hormones entraînera une augmentation de la prolifération alvéolaire. Par la suite, l'induction d'une différenciation alvéolaire permettra la lactogenèse. Celle-ci se déroule sous le contrôle principal de la sécrétion de la prolactine qui permet l'activation du récepteur à la prolactine (PRLR) [5, 6], un récepteur aux cytokines de classe I, qui suivant une liaison avec son ligand, induit l'association avec JAK2 et ainsi promeut l'activation de l'axe de signalisation médié par Stat5 [6]. L'habileté des cellules épithéliales mammaires à se différencier contribue à leur protection contre des stimuli exogènes oncogéniques. Cependant, la majorité des cancers du sein sont déclenchés de manière sporadique au cours des divisions cellulaires massives des terminaisons bulbaires où surviennent des lésions hyperplasiques, propices au caractère malin des cellules bénignes (hyperprolifératives).

I.1.4 Les origines de la genèse de tumeurs associées au cancer du sein

La carcinogenèse de l'épithélium mammaire est un processus qui demeure à ce jour obscur et non défini. Cependant, deux théories appuient le passage d'une cellule normale vers un état cancéreux, soit la sélection clonale et la fonction des cellules souches mammaires.

I.1.4.1 Le modèle stochastique

La sélection clonale dans le cancer du sein s'explique par le fait que des mutations stochastiques, provenant par exemple de l'environnement de l'homme, tendent à cibler une cellule épithéliale normale. Les conséquences de cette exposition mutagène résultent principalement en l'induction de modifications génétiques et épigénétiques. Les cancers du sein dérivant d'une modification génétique démontrent en général une instabilité dans le génome. Par exemple, les gènes *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN* et *TP53* démontrent une altération de leur fonction suivant une mutation. La mutation de type perte de fonction a été attribuée aux gènes impliqués dans le processus de réparation de l'ADN comme *BRCA1* et *BRCA2*. Les personnes porteuses de ces gènes déficients ont des risques élevés de développer un cancer du sein [7].

Fondamentalement, la genèse de tumeur survient suite à une accumulation de mutations issues de l'altération de la fonction de plusieurs gènes. Ces mutations peuvent provenir d'un désordre au niveau épigénétique, au niveau du nombre de copie génique de même qu'au niveau de la formation de polymorphismes causés par des mutations ponctuelles de type SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). De manière générale, ces oncogènes auront la propriété de réguler positivement ou négativement divers processus biologiques de la cellule tels que la prolifération, l'angiogenèse, la stabilité du génome, la migration, l'apoptose, etc.

I.1.4.2 Le modèle hiérarchique

La seconde théorie suggère, comme le compartiment hématopoïétique, une structure hiérarchique composée de plusieurs clones progéniteurs de cellules souches mammaires incluant une cellule souche dite originelle. En effet, cette hypothèse soutient que la cellule souche cancéreuse originelle a la capacité d'induire la formation de cellules progénitrices ayant la propriété de se différencier en cellules luminales et/ou myoépithéliales pour ultimement former les 5 sous-types de cancers du sein. À la différence des cellules souches multipotentes normales de l'épithélium mammaire qui expriment des hauts niveaux des

marqueurs de surface cellulaire CD29 et CD49F, les cellules souches cancéreuses mammaires expriment les Cytokératines CK5, CK14 et CK17 [2]. Au fur et à mesure que les cellules souches normales multipotentes se différencient, les niveaux des marqueurs CD29 et CD49F diminuent progressivement, alors que l'expression des marqueurs ER et EPCAM augmente progressivement [2]. Dès qu'elles se sont différenciées, soit en type de cellules myoépithéliale et/ou luminale, d'autres protéines de surface sont exprimées, telles que CK5, CK14 (type myoépithélial), MUC1, CK8 et CK18 (type luminal) [2]. Plus l'état de différenciation des cellules souches cancéreuses mammaires évolue, plus les niveaux des récepteurs nucléaires ER et PR augmentent. Ces analyses de marqueurs des cellules souches cancéreuses mammaires permettent de caractériser le grade du cancer du sein. Par exemple, le grade I est associé aux marqueurs relatifs à une différenciation cellulaire avancée, où le risque d'instabilité génétique est à son plus bas. À l'inverse, le grade III est détecté par l'expression des marqueurs des cellules primitives multipotentes, où les risques d'instabilité sont élevés. Ainsi, le cancer basal (CK5⁺, CK14⁺ et CK17⁺) est directement associé au grade III, démontrant un faible pronostic [2]. À l'opposé, le sous-type luminal de type A (ER⁺, PR⁺ et Her2⁻), par exemple, démontre un meilleur pronostic, puisqu'il est représentatif du grade I qui est caractérisé par son profil peu invasif [2].

I.2 : Les récepteurs à activité tyrosine kinase

Les réponses biologiques des cellules normales et cancéreuses sont principalement modulées depuis la surface, spécifiquement à la membrane plasmique. Les médiateurs de la transduction du signal sont les récepteurs transmembranaires tels que les RTKs (Récepteurs à activité tyrosine kinase) et les RCPGs (Récepteurs couplés aux protéines G). Les RTKs sont hautement exprimés et activés dans les cancers. La liaison des ligands sur la portion extracellulaire des RTKs constitue l'événement initiateur dans la régulation des réponses biologiques.

I.2.1 Classification des RTKs

La superfamille des RTKs se compose de 60 membres et d'environ 19 sous-familles. La structure archaïque d'une RTK est constituée d'un domaine extracellulaire de liaison au ligand, d'un domaine transmembranire et d'un domaine cytoplasmique qui inclut le domaine catalytique du récepteur. L'un des groupes de RTKs qui constitue une cible pharmacologique de choix dans les cancers est les ErbBs. Ayant été isolés et identifiés dans les cellules cancéreuses, les quatre membres des ErbBs sont : EGFR, ErbB2, ErbB3 et ErbB4. Parmi ces récepteurs, seul l'EGFR, l'ErbB3 et l'ErbB4 sont activés suite à une

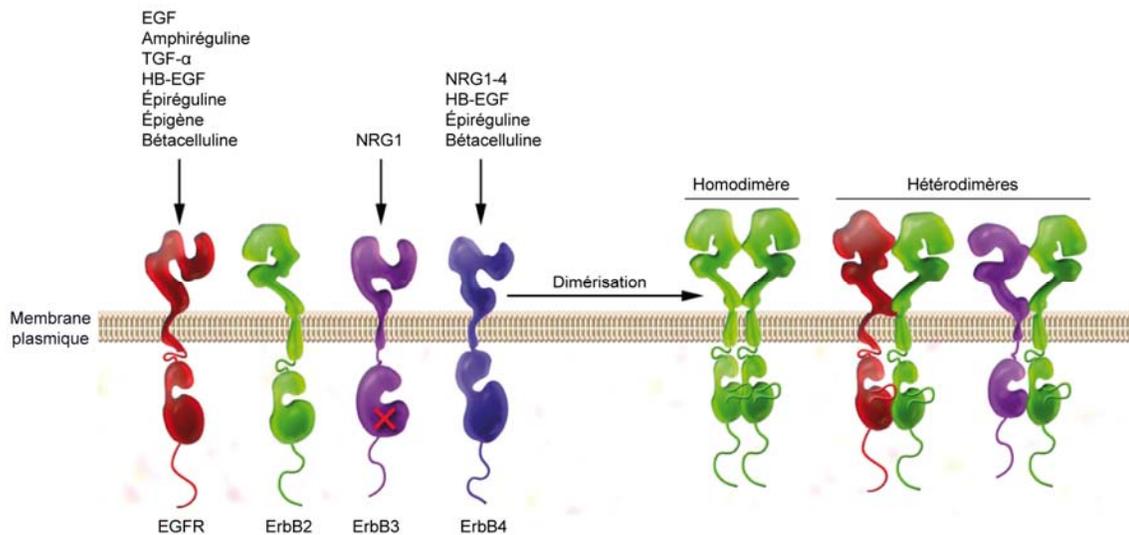


Figure 1: Famille des récepteurs ErbBs et leurs ligands.

La famille des récepteurs ErbBs comprend 4 membres, dont l'EGFR, ErbB2, ErbB3 et ErbB4, où ErbB3 ne possède pas d'activité catalytique (indiqué par un « X » rouge). Les ligands indiqués, soit EGF, TGF- α , HB-EGF, épiréguline, épigène, bétacelluline, de même que les neurégulines (NRGs) 1 à 4, peuvent associer ou non ces récepteurs afin de permettre l'activation de ces derniers. Dès qu'ils sont activés, ces récepteurs peuvent dimériser sous la forme d'un homodimère ou d'hétérodimères. (*Inspirée de Zhang et al., 2007*)[8]

liaison au ligand, tandis qu'ErbB2 n'interagissant pas avec un ligand connu, s'associe avec d'autres membres lorsque ces derniers sont activés suivant une liaison avec leur ligand (Figure 1). Un seul des membres de la famille ErbBs, soit ErbB3, ne possède pas d'activité catalytique (Figure 1). Or, ErbB3 s'associera à l'EGFR, ErbB2 ou ErbB4 pour assurer l'activation de ceux-ci. De plus, ErbB4 a la particularité d'agir comme son propre ligand. Suite à un clivage enzymatique de l'ErbB4 par des protéases membranaires, la portion du domaine kinase actif du récepteur s'engage à l'intérieur de la cellule et agit comme protéine signalétique.

1.2.2 Les ligands associés au récepteur à l'EGF

Les ligands des RTKs, tels que l'EGFR, constituent une famille de protéines exerçant la fonction d'activer ces derniers. Ces ligands sont issus d'une transcription de la cellule même via principalement l'activation endogène du récepteur. Une fois produit, le ligand est sécrété à l'extérieur de la cellule et déclenche l'activation du récepteur par une association ligand-récepteur. Il existe onze facteurs de croissance servant de ligand pour les membres de la famille des ErbBs. Dès qu'ils sont produits, ces ligands sont acheminés à la membrane plasmique, où ces derniers subissent leur maturation, soit passant d'une forme immature ou pré-curseur vers une forme mature. La maturation de ces ligands s'effectue par l'intermédiaire de métalloprotéases de zinc (Zn^{2+}) de la famille ADAMs qui effectuent le clivage de la portion extracellulaire du ligand et la relâche de ce dernier [9]. Les ligands des récepteurs ErbBs sont classés en trois groupes. Le groupe 1 comprend l'EGF, le TGF- α , l'amphiréguline, l'épiréguline et l'épigène, où tous ont la propriété de lier l'EGFR. Dans le groupe 2, nous retrouvons la bétacelluline, le HB-EGF et l'épiréguline qui peuvent activer à la fois l'EGFR et l'ErbB4 (Figure 1). Enfin, dans le troisième groupe, on retrouve les neurégulines (NRGs) comprenant différents variants de transcrits d'ARN messager soit NRG-1 et NRG-2. Ces derniers associent ErbB3 et ErbB4 et les variants NRG-3 et NRG-4 qui lient préférentiellement ErbB4 (Figure 1) [9]. Les ligands de la famille de l'EGFR exercent plusieurs fonctions biologiques. La génération d'une souris transgénique

humanisée (substitution du gène *Egfr* murin pour le gène *EGFR* humain) promeut la différenciation accélérée des ostéoblastes [10]. De plus lorsque le HB-EGF est absent lors du développement chez les mammifères, il en résulte une mort *post-partum*, conséquence d'une malformation des valves cardiaques, d'une hypertrophie des cardiomyocytes et d'une hypoplasie pulmonaire [11, 12]. Les ligands de la famille de l'EGFR contrôlent également la maturation des follicules ovariens. L'hormone lutéinisante (LH) permet d'induire l'expression de l'amphiréguline, de la bétacelluline et de l'épiréguline dans les cellules granulosas. Ces ligands activent les EGFRs présentés sur la couche murale ovarienne tandis que les ligands sont relâchés à la surface pour s'associer aux EGFRs des cellules cumulus. L'activation des EGFRs sur les cellules cumulus déclenche l'expansion de celles-ci, assure le développement d'un oocyte et finalement, l'ovulation [13].

I.2.3 Mutations endogènes de l'EGFR

Le produit du gène de l'*EGFR* est souvent amplifié dans divers cancers, comme le glioblastome, le cancer du sein, le cancer ovarien et le cancer du poumon de type NSCLC. Il en résulte souvent une amplification de la fonction du récepteur. Par exemple, la mutation ponctuelle L858R de l'EGFR au niveau du domaine kinase est présent dans le cancer du poumon de type NSCLC [14]. Le modèle *in vivo* de souris transgénique EGFR^{L858R} démontre une latence dans la tumorigénèse et une sensibilité au traitement d'inhibiteur de l'EGFR comme l'Erlotinib [15]. La caractéristique principale des mutants EGFR^{L858R}, EGFR^{G719S} ou des mutants d'EGFR portant de courtes séquences délétées dans l'exon 19, réside dans l'activation du récepteur via la liaison avec leur ligand. En effet, à la différence de la forme sauvage, les formes mutées de l'EGFR sont constitutivement actives indépendamment de la liaison du ligand. Cette activation constitutive du récepteur implique une amplification des voies de signalisation activées par l'EGFR, soit PI3Kinase, MAPKinase et Stat3. Cependant, une sorte d'homéostasie subsiste, car il y aura également une augmentation de la dégradation de cette population mutante du récepteur de manière dépendante à l'ubiquitine. Néanmoins, un volet thérapeutique est hautement associé à la détection des différentes formes mutantes de l'EGFR. Parmi les divers mutants, l'exemple

le mieux caractérisé est le variant VIII de l'EGFR, soit un récepteur constitutivement actif dont l'altération résulte du produit de la délétion de la séquence codante d'une partie de la région extracellulaire du récepteur [16]. Cette mutation a pour conséquence de supprimer les acides aminés de 6 à 273, incluant une insertion d'un résidu glycine en position 6. L'effet majeur de ce type de mutation est davantage d'accélérer la formation de tumeurs et la propagation de métastases. Or, ce type de mutation semble lié à la résistance à la chimiothérapie et aux inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR, notamment dans les glioblastomes, le cancer de l'ovaire, du poumon et du sein. L'expression de l'EGFRvIII protège la cellule cancéreuse contre l'apoptose. Cet effet anti-apoptotique est la résultante de la régulation à la baisse de la protéine pro-apoptotique PUMA qui, en s'associant avec l'EGFRvIII, se retrouve séquestrée dans le cytoplasme perdant ainsi sa fonction d'inducteur d'apoptose [17]. De plus, l'EGFRvIII interagit avec Stat3 dans le noyau des cellules gliales, où Stat3 agit principalement comme facteur transcriptionnel de plusieurs gènes. C'est le cas notamment de *Twist* qui est impliqué dans la transition épithéliale-mésenchymateuse, un pivot important dans la progression tumorale.

I.2.4 Structure et sites de phosphorylation de l'EGFR

La structure commune du domaine extracellulaire des membres ErbBs est pourvue d'une hélice-béta et de domaines de liaison aux ligands (domaines L1 et L2), suivi d'une portion riche en cystéines CR1 et CR2. Il faut mentionner d'ailleurs que le CR1 est impliqué dans la dimérisation des monomères de récepteurs. Les ErbBs sont fortement glycosylés facilitant leur ancrage membranaire. En effet, l'EGFR subit des modifications cotraductionnelles, comme la N-glycosylation sur 12 résidus situés entre le 32^e et le 599^e acide aminés. De plus, l'EGFR devient pourvu de sites de phosphorylation et d'ubiquitination au cours de leur maturation post-traductionnelle. Bien que l'EGFR soit phosphorylé sur les résidus Ser/Thr, il n'apparaît pas moins que la phosphorylation des résidus tyrosines soit la plus étudiée pour la transmission signalétique. Les résidus tyrosines phosphorylés lors de l'autophosphorylation de l'EGFR sont les Tyr-992, 1045, 1068, 1086, 1148 et 1173 (Figure 2). Dès qu'il fut phosphorylé, le résidu Tyr-992 permettra le

recrutement des protéines adaptatrices PTB-1B, PTB-2C, SHP-2 et PLC- γ . L'activation du résidu Tyr-1045 recrutera CBL, tandis que le Tyr-1068 interagira avec Grb2 et SHC [9]. Le résidu Tyr-1086 phosphorylé s'associera avec Grb2, Shc, DOK-R et ABL. Le Tyr-1148 recrutera Grb2, Shc, PTP-1B et DOK-R, tandis que le Tyr-1173 se liera avec Grb2, Shc, SHP-1 et PLC- γ [9]. La phosphorylation de ces résidus Tyr est dépendante de la liaison du ligand avec l'EGFR. Cependant, il a été récemment découvert que les résidus Tyr-845 et Tyr-1101 sont phosphorylés de manière indépendante de l'autophosphorylation du récepteur, soit par l'interaction directe de la kinase Src (Figure 2) [18].

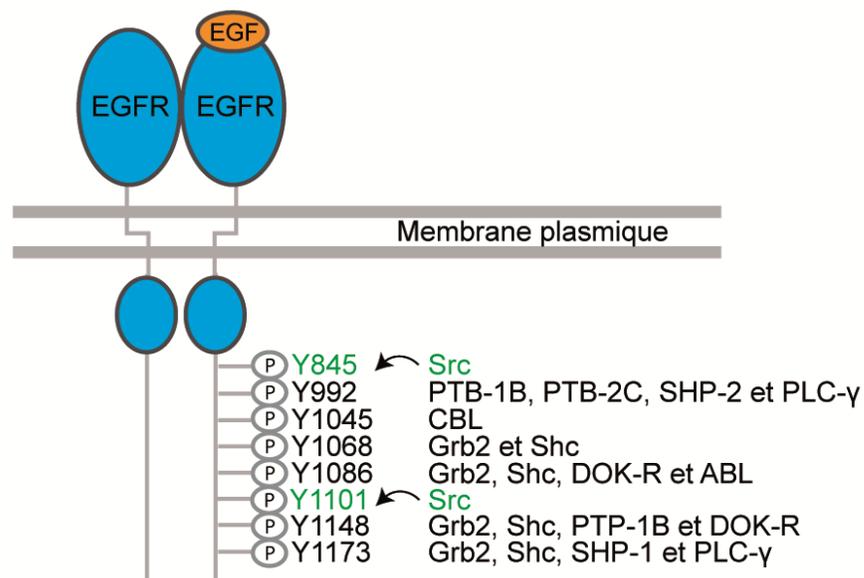


Figure 2: Sites de phosphorylation du récepteur à l'EGF.

Lorsque l'EGFR est activé par son ligand, ce dernier s'homodimérise ou s'hétérodimérise et est phosphorylé sur plusieurs résidus tyrosine par un mécanisme d'autophosphorylation ou de manière dépendante de Src (résidus marqués en vert). Cette phosphorylation induit le recrutement des protéines adaptatrices impliquées dans la transduction du signal depuis la surface de la cellule (*Inspirée de Bryan Linggi et Graham Carpenter, 2006*) [9].

I.2.5 Mécanisme d'activation de l'EGFR

En absence de ligand, les ErbBs sont sous formes de monomères, dû à l'incapacité du motif de liaison monomère-monomère de former des dimères. Le ligand, tel que l'EGF, induit la formation d'un dimère, soit un événement clé dans l'activité kinase du récepteur, puisque la mutagenèse d'un EGFR constitutivement dimérique induira une phosphorylation soutenue des tyrosines impliquées dans l'autophosphorylation de la queue cytoplasmique du récepteur. Le futur dimère peut être de nature homodimérique ou hétérodimérique. En effet, suite à l'interaction de l'EGF avec l'EGFR, un monomère de l'EGFR peut associer un autre monomère de l'EGFR (homodimérisation EGFR/EGFR) ou un monomère d'un autre membre de la famille des ErbBs, soient ErbB2, ErbB3 et ErbB4 (hétérodimères EGFR/ErbB2, EGFR/ErbB3 et EGFR/ErbB4). Lors d'une absence du complexe ligand-récepteur, la structure extracellulaire, formée de quatre sous-domaines I-IV, demeure dans une conformation dite fermée où le motif de dimérisation (présent dans le sous-domaine II) est séquestré à l'intérieur de la structure via l'interaction avec le sous-domaine IV. Au niveau de la queue cytoplasmique du récepteur monomérique, plus précisément dans le domaine kinase composé de deux lobes constitués d'une région N-terminale et C-terminale, se déroule aucune activité catalytique. En présence du ligand, le motif de dimérisation, constitué de 10 acides aminés, est exposé et accessible à un autre motif de dimérisation présent sur un second monomère d'EGFR. Lors du processus de dimérisation, les deux monomères du récepteur subissent une transphosphorylation de manière réciproque et asymétrique. En effet, le domaine C-terminal d'un lobe du domaine kinase de l'un des monomères active le domaine N-terminal d'un lobe du domaine kinase de l'autre monomère. Cette activation des domaines kinases induit par la suite l'autophosphorylation de la partie C-terminale de la portion cytoplasmique du dimère des résidus tyrosines impliqués. Toutefois, il est intéressant de mentionner que la mutation du motif de dimérisation ou d'une boucle adjacente à ce motif bloque la dimérisation du récepteur sans toutefois empêcher la liaison du ligand sur le récepteur. La phosphorylation des tyrosines constitue un événement moléculaire important pour le recrutement de plusieurs protéines adaptatrices qui assureront la transmission du signal provenant du milieu extra-cellulaire

vers des seconds messagers, des activateurs de calcium ou des voies mitogéniques. Par exemple, suivant une stimulation, la formation de l'hétérodimère EGFR/ErbB2 déclenche le recrutement de plusieurs protéines dites adaptatrices, telles que Src, Shc, Grb2, GrbB7, Crk, Ras-GAP, PLC γ , c-Cbl, c-Abl et SHP2 [9]. Ces adaptateurs sont pourvus de domaines d'interaction protéine-protéine SH2 et/ou PTB.

I.2.6 Les inhibiteurs de l'EGFR et Her2

La modulation de l'activation des RTKs constitue une cible thérapeutique de choix en termes de thérapie anti-cancer. Le cetuximab ou Erbitux est un anticorps monoclonal chimérique de type immunoglobuline IgG₁ qui lie l'EGFR et bloque la liaison au ligand. De plus, il induit la régulation à la baisse du récepteur en favorisant l'internalisation et la dégradation de ce dernier. Le cetuximab inhibe également la translocation de l'EGFR dans le noyau, empêchant ainsi l'activation de la kinase DNA-PK, qui est impliquée dans la réparation des brins d'ADN [19]. Cette inhibition de la DNA-PK a pour conséquence d'augmenter le dommage à l'ADN lors de traitements radiothérapeutiques. Un dérivé du cetuximab, soit le panitumumab, entièrement humanisé, compétitionne de la même manière que le cetuximab avec le ligand de l'EGFR [20]. Utilisé en thérapie dans le cancer du sein, le trastuzumab ou Herceptin consiste en un anticorps monoclonal humanisé de type immunoglobuline-1 (IgG₁) dirigé contre la portion extracellulaire de l'ErbB2 [21]. Cet anticorps bloque l'homodimérisation du récepteur, empêchant ultimement la signalisation cellulaire induite par l'ErbB2. Le Gefitinib ou Iressa (ZD1839) est un inhibiteur de l'EGFR de phase II en clinique, dont le mécanisme d'action est d'entrer en compétition avec l'ATP au niveau du domaine kinase du récepteur. Il bloque ainsi toute la transduction impliquée dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses [22]. Le lapatinib est un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase à la fois d'EGFR et d'ErbB2 en phase II au niveau clinique démontrant une efficacité significative dans le cancer du sein Her2⁺ et pas Her2⁻ [23]. L'erlotinib ou Tarceva est un inhibiteur d'autophosphorylation de l'EGFR et chemine en phase I au niveau clinique [24]. Le bevacizumab ou Avastin est également utilisé en thérapie anti-cancer contre le cancer du sein, en plus d'être utilisé contre les cancers

colorectal et du poumon. Ce composé reconnaît et interagit avec toutes les isoformes de VEGF de même qu'avec le ligand du VEGFR. Il bloque ainsi la prolifération des cellules endothéliales et la croissance des tumeurs associées aux cancers du sein et colorectal [25].

Bien que l'administration d'anticorps monoclonaux dans les traitements anti-cancer soit une approche prometteuse, il faut tenir compte des dommages collatéraux qu'ils induisent. En effet, l'utilisation d'anticorps monoclonaux de type IgG induira malencontreusement des réponses immunitaires cytotoxiques via le récepteur Fc γ RIII.

I.2.7 Les voies de signalisation médiées par l'EGFR

Les RTKs comme l'EGFR peuvent induire trois voies classiques nécessaires aux fonctions biologiques de la cellule : 1) Ras/Raf/MAPK, 2) PI3K/AKT/mTOR et 3) PLC- γ (Figure 3). Dans la prochaine section, nous discuterons de ces voies signalétiques ainsi que de leurs contributions dans le contexte du cancer.

Étant donné que l'étude présentée dans cette thèse porte un intérêt particulier aux rôles des petites GTPases dans les processus biologiques et moléculaires impliqués dans la pathologie du cancer, ces dernières seront citées dans les chapitres suivants, mais abordées en détail dans le chapitre portant sur les GTPases monomériques.

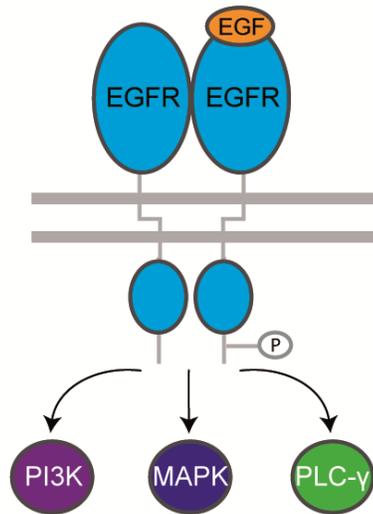


Figure 3: Les voies signalétiques induites par l'EGFR.

La stimulation de l'EGFR active trois voies classiques de signalisation: PI3Kinase, MAPKinase et PLC- γ .

I.2.7.1 La voie des MAPKinases

Les MAPKinases (MAPKs) constituent une classe d'enzymes de type sérine/thréonine impliquées dans plusieurs processus biologiques de l'organisme tels que la différenciation, l'apoptose, la prolifération et la motilité. Le patron moléculaire de l'activation des MAPKinases est caractérisé par la cascade d'activation $\text{MAPKKK} \rightarrow \text{MAPKK} \rightarrow \text{MAPK}$, où les MAPKs constituent les protéines effectrices impliquées dans la réponse biologique (Figure 4).

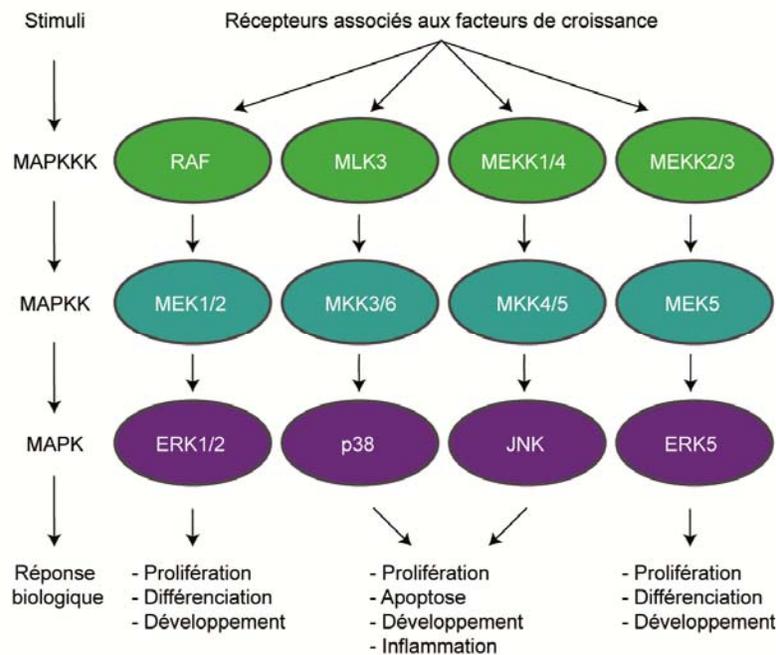


Figure 4: La voie MAPKinase.

L'activation de la voie MAPKinase (MAPK) est déclenchée suite à une stimulation exogène. De manière séquentielle, les RTKs assurent l'activation des MAPKKKs (RAF, MLK3, MEKK1/4, MEKK2/3) qui phosphoryleront à leur tour les MAPKKs (MEK1/2, MKK3/6, MKK4/5, MEK5) où ces dernières phosphoryleront les MAPKs (ERK1/2, p38, JNK, ERK5). L'activation des MAPKs régule divers processus biologiques dont la prolifération, la différenciation, le développement et l'apoptose. (*Adaptée de Cell Signaling Technology*)

Par exemple, suite à l'activation de l'EGFR, les protéines adaptatrices Grb2 et Shc associent les résidus tyrosines 1068 et 1086 et activent la MAPKKK RAF qui phosphorylera la MAPKK MEK1/2. Cette dernière phosphorylera les MAPKs effectrices ERK1/2. Les MAPKs effectrices contrôlent divers processus biologiques dont la prolifération, la différenciation, le développement et l'apoptose. On dénombre trois types de MAPKinases, soit les groupes ERK1 et ERK2, N-terminales de type jun (JNKs), p38 et enfin, ERK5. Les MAPKinases peuvent être activées suivant une activation d'un RTK, tel l'EGFR, par les cytokines pro-inflammatoires ou par irradiation (ex : rayons ultra-violet).

I.2.7.1.1 ERK1/2

L'activation des kinases de type sérine/thréonine ERK1/2 est l'une des voies signalétiques centrale de la cellule, puisqu'elle assure de multiples fonctions biologiques de celle-ci, notamment la prolifération cellulaire et la transcription de plusieurs gènes, dont *Elk-1*. L'activation de la voie MAPKinase s'effectue suivant la stimulation de l'EGFR (exemple), qui assure le recrutement de Shc et de Grb2 aux sites spécifiques des tyrosines phosphorylées. Par la suite, la Ras-GEF, SOS, est recrutée afin d'activer la petite protéine G monomérique Ras qui assurera l'activation de la MAPKKK Raf1, où cette dernière activera les MAPKK MEKK1/2 [26, 27]. Comme les autres MAPKK, MEKK1/2 est hautement sélective quant aux MAPKinases ciblées, à savoir les MAPKinases ERK1/2. Suivant leur activation, les MAPKinases ERK1/2 ont la capacité de contrôler l'axe de signalisation Ras/Raf1/MEKK1/2/ERK1/2 soit en inactivant MEKK1 ou en régulant à la hausse l'activité des phosphatases [26, 27] MKP2 et MKP3, ce qui contribue à atténuer l'amplification du signal. Suivant leur activation, les kinases ERK1/2 quittent le site d'échafaudage et se relocalisent dans le noyau, permettant ainsi d'induire l'activation des facteurs transcriptionnels pro-mitogéniques tels que c-fos et Elk-1 [26, 27]. Environ 30% des cancers du sein humain possèdent des mutations présentes dans l'axe ERK1/2 MAPKinase [28]. ERK1/2 est hautement activée dans un large éventail de tumeurs mammaires et est également associé au potentiel métastatique des tumeurs. De plus, il a été rapporté que la détection d'une baisse d'expression d'ERK1/2 dans les tumeurs primaires de cancer du sein est associée à un bon pronostic, améliorant ainsi la survie des patients atteints. L'utilisation de l'inhibiteur de MEKK1/2 par l'inhibiteur biochimique PD98059 permet de bloquer l'activation d'ERK1/2 et d'étudier le rôle moléculaire de cette kinase *in vitro*, tout en préservant la protéine endogène. L'utilisation de cette méthode démontre qu'ERK1/2 est essentielle à la polarisation des cellules épithéliales. Par ailleurs, il a été démontré qu'une activation soutenue d'ERK1/2 de concert avec TGF β déclenche l'EMT, un processus clé menant à la formation de métastases. ERK1/2 peut moduler l'EMT par sa présence dans le noyau. En effet, l'un des substrats d'ERK1/2 est le facteur transcriptionnel Ets1, impliqué dans le processus de transformation des cellules normales en cellules

cancéreuses. Par exemple, l'activation d'Ets1 induit la transformation d'une lignée de cellules épithéliales normales et non transformées, soit les MCF12A, qui permettent de former des colonies de cellules dans une matrice semi-solide [29]. Enfin, l'activation d'Ets1 médiée par ERK1/2 promeut de façon générale la formation de métastases en augmentant l'expression des MMPs, FGF et EGF [30]. En plus de contrôler les processus de polarité cellulaire et l'EMT, ERK1/2 induit l'expression et l'activité des MMPs. Ces dernières sont directement impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire, notamment en décomposant le collagène de type IV, ce qui permet ultérieurement à la cellule d'augmenter son potentiel d'invasion cellulaire. De récents travaux de recherche ont démontré une fonction d'ERK1/2 associée aux récepteurs nucléaires ER α / β , surexprimés dans les cancers du sein hormono-dépendants. La redistribution nucléaire d'ERK1/2 permet à cette kinase d'interagir avec le domaine de transcription indépendant aux ligands localisé en N-terminal d'ER α et phosphoryle les résidus Ser118 [31]. La phosphorylation sur Ser118 par ERK1/2 augmente la fonction transcriptionnelle du récepteur, signifiant que l'ER α peut être activé sans ligand estrogénique et donc, par l'activation en amont d'un RTK, tel l'EGFR. Ce phénomène ligand-indépendant de ER α a permis d'expliquer le développement de résistance au Tamoxifen, un puissant inhibiteur des récepteurs ER α / β . Cependant, certaines hypothèses tendent à affirmer que la kinase de type Sérine/Thréonine AKT serait l'acteur principal de la phosphorylation du résidu Ser167 [31]. ERK1/2 peut également être activée par transactivation via, par exemple, un RCPG tel que GPR30 dans les MCF7 et dans les SKBR3 [32]. Agissant comme régulateurs négatifs de la transduction du signal émis depuis les RTKs, les protéines p66Shc et Dok-R atténuent l'activation d'ERK1/2 [33]. De plus, d'autres médiateurs comme le partenaire d'interaction de la protéine Abl, soit Abi-1, bloquera l'activation des MAPKinases en bloquant la fonction de la Ras-GEF, SOS. ERK1/2 régule également le réarrangement du cytosquelette d'actine, notamment en modulant l'activité de ROCK et des MLCs. Ces dernières sont d'ailleurs importantes pour la contractilité actino-myosine.

I.2.7.1.2 p38/JNK/ERK5

La MAPKinase p38 est principalement impliquée dans les processus de différenciation, de prolifération et d'apoptose. On retrouve quatre isoformes de p38, soit p38 α , β , γ et δ . Situées en amont de la cascade signalétique, les MEKK 3/6 assurent l'activation de p38 [26, 27]. De par sa redistribution au noyau, p38 peut également réguler le cycle cellulaire en agissant à titre de point de contrôle. Dès qu'elle est activée, cette kinase phosphoryle de nombreux substrats tels p53 et Stat1. De plus, une activité constitutive de p38 mène à l'augmentation drastique d'uPA, une protéine aux propriétés pro-invasives dans les cellules du cancer du sein. Une augmentation de l'activité de p38 est directement liée à la hausse d'expression de l'EGFR et d'ErbB2. Cela suggère en fait un rôle majeur de p38 dans la régulation des voies signalétiques modulées par les RTKs. La troisième MAPKinase JNK, où les trois isoformes 1, 2 et 3 sont activées par les MEKK4/7 [26], est impliquée principalement dans les processus de prolifération et d'apoptose. Brièvement, la kinase JNK phosphoryle son substrat c-Jun, ce qui entraînera la formation du complexe transcriptionnel c-Jun/c-Fos et l'activation d'AP-1, un médiateur de la croissance cellulaire. Cette MAPKinase joue un rôle crucial dans le développement de l'épithélium mammaire. En effet, l'inhibition de JNK bloque la polarité de cellules épithéliales, ce qui affecte le maintien des structures des jonctions adhérentes et ultimement la formation d'anneaux acinaires. Cette observation soulève l'importance de cette kinase dans la carcinogenèse des cellules épithéliales mammaires. Parallèlement à l'assemblage des structures acinaires, il y a également une induction de l'activation du marqueur pro-apoptotique c-Myc qui est activé principalement par la voie JNK et pas ERK1/2. Ensemble, ces données rapportées soulignent la difficulté à cibler JNK dans un contexte thérapeutique, puisque cette kinase contrôle des événements biologiques se déroulant autant dans les cellules normales que cancéreuses. ERK5, aussi nommée *big* MAPKinase, diffère des autres MAPKinases de part sa taille moléculaire [26, 34]. Activée par MEK5, cette MAPKinase régule la prolifération et la survie cellulaire. Son activation converge comme JNK à l'activation des facteurs AP-1 et c-Fos [35]. Il a été démontré que 20% des tumeurs associées au cancer du sein possèdent des hauts niveaux d'expression et de phospho-ERK5 [36]. De plus, l'expression d'ERK5

est essentielle à l'activation d'ErbB2, ce qui en fait une cible pharmacologique importante dans les cancers de type Her2⁺(ErbB2⁺).

I.2.7.2 La voie de la phospholipase C- γ (PLC- γ)

La PLC- γ est activée par une interaction et par une phosphorylation des protéines à activité tyrosine kinase, comme les récepteurs associés aux facteurs de croissance tels que l'EGFR, PDGFR, NGFR, FGFR, VEGFR, HGFR et IGFR [37]. L'activation de la PLC- γ et son interaction avec le PI(3,4,5)P₃, via son domaine PH, induit son activité enzymatique qui consiste à hydrolyser le PI(4,5)P₂ en inositol-triphosphate (IP₃) et endiacylglycérol (DAG), deux seconds messagers. La PLC- γ est requise dans le processus d'invasion des cellules tumorales du carcinome de la prostate. De plus, cette enzyme contrôle la motilité cellulaire des fibroblastes, des kératinocytes, des cellules gliales et des cellules de carcinomes et ce, de manière dépendante à l'activation des RTKs [38]. Suivant l'activation d'un RTK, la PLC- γ est phosphorylée sur deux résidus tyrosine, soit 783 et 1253 et ce, via le domaine d'autophosphorylation du récepteur, tel que cité précédemment avec l'exemple de l'EGFR [37]. Lors de l'interaction RTK/ PLC- γ à la membrane plasmique, la PLC- γ effectue l'hydrolyse du PI(4,5)P₂ en inositol-triphosphate (IP₃) et endiacylglycérol (DAG), deux seconds messagers. Cette étape libère la gelsoline de son complexe avec la PI(4,5)P₂, ce qui promeut la réorganisation du cytosquelette d'actine par l'activation de ARP2/3 au front migratoire de la cellule [39, 40]. De plus, l'IP₃ déclenche la relâche du calcium conservé dans le réticulum sarcoplasmique, tandis que le DAG active la PKC. Le calcium, étant un modulateur du système de contractilité d'actine-myosine à activité dépendante au calcium, contribue au potentiel migratoire des cellules. Pareillement, l'activation de la PKC au sein de la formation des jonctions adhérentes, plus spécifiquement à la région apicale de la cellule en partenariat avec Par3 et Par6, module le processus de motilité de la cellule. De plus, la PLC- γ module le phénotype agressif des carcinomes de la prostate par un processus génomique. En effet, la PLC- γ régule l'expression de gène pro-invasif comme *uPAR*, *IGF-1* et *HGF* [41-44] de même que également l'expression de gènes suppresseurs de l'invasion comme *DPM3* et *Hsp70* [45]. En effet, dans un modèle *in vitro* où l'interaction RTK/PLC- γ

est défectueuse, la sécrétion d'uPAR promeut la dissémination tumorale par l'activation de l'HGF. Enfin, il a été rapporté que le domaine SH3 de la PLC- γ exerce une activité GEF sur PIKE, une PIkinase nucléaire, où l'activation de cette dernière contribue à la mitogenèse [46].

I.2.7.3 La voie de PI3Kinase

L'activation de la voie PI3Kinase assure le maintien de la survie cellulaire en régulant les processus d'apoptose et de prolifération. Les PI3Kinases constituent une famille d'enzymes capable fondamentalement d'effectuer le transfert du phosphate en position D3 de l'anneau inositol sur les phospholipides membranaires. La kinase lipidique ou PI3Kinase catalyse ainsi la synthèse des phospholipides membranaires, nécessaires à la structure de la membrane plasmique et servant de substrats à diverses protéines signalétiques.

I.2.7.3.1 Structure et classification

On dénombre au-delà de 12 membres dans cette famille d'enzymes au sein du génome humain. Ce dernier peut être divisé en trois classes, soit les classes I (I_A et I_B), II et III. La PI3Kinase est archaïquement composée de deux sous-unités, soit une sous-unité régulatrice et une sous-unité catalytique, où la première sous-unité assure l'activation de la PI3Kinase tandis que la seconde permet le clivage des phosphatidylinositols présents à la membrane plasmique. Au sein de la classe I_A , soit la classe de PI3Kinase activée par les RTK tels que l'EGFR, la sous-unité régulatrice est retrouvée sous diverses isoformes dont $p85\alpha$, $p85\beta$, $p55\alpha$, $p55\gamma$ ou $p50\alpha$. De même, la sous-unité catalytique $p110$ existe sous les isoformes α , β et δ . En ce qui concerne la classe I_B , soit la classe activée par les RCPGs via les protéines G hétérotrimériques $G\beta\gamma$ et Ras, deux isoformes de la sous-unité régulatrice sont disponibles à savoir $p84$ et $p101$ et une seule sous-unité catalytique est impliquée, soit la $p110\gamma$ [47]. Il est important de mentionner que les classes II et III sont représentées par les PI3Kinases PI3K-C2 $\alpha/\beta/\gamma$ (classe II) et hVps34p (classe III) [47]. La sous-unité régulatrice est pourvue de deux motifs riches en proline, deux domaines SH2, d'un domaine

inter-SH2 (IS) et d'un domaine SH3 en N-terminal. La liaison entre les deux sous-unités est assurée par le domaine IS qui fait office de site de liaison pour p110 [47]. Les domaines SH2 et SH3 interagissent avec divers partenaires protéiques comme les RTK et les Rac-GEFs de même qu'avec une sous-unité catalytique p110. Cette sous-unité de la PI3Kinase interagit avec les phosphatidyl-inositols (PIs) membranaires et assure le clivage des phosphatidyl-inositols-4,5-biphosphate (PIP₂) en phosphatidyl-inositols-3,4,5-triphosphates (PIP₃). Cette catalyse de phospholipides est renversée par le gène suppresseur de tumeur, *PTEN*, stoppant ainsi la production de PIP₃.

I.2.7.3.2 L'axe signalétique PI3Kinase/AKT

Tel qu'illustré à la figure 5 (version simplifiée), suite à l'activation d'un RTK, le récepteur activera directement la PI3Kinase ou le fera par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice IRS1 (voie de l'insuline). Dans les deux cas, l'activation de la PI3Kinase permettra la formation du PIP₃ via sa sous-unité catalytique. Ce produit lipidique formé sert de substrat à la protéine effectrice à activité sérine-thréonine kinase, AKT via son domaine PH (*Pleckstrin Homology domain*), et assure ainsi le recrutement de cette kinase à la membrane plasmique. Ensuite, AKT est phosphorylée par PDK1 sur Thr308 et par mTORC2 sur Ser473, où ce dernier résidu sérine sera déphosphorylé par la phosphatase PHLPP. Suite à son activation, AKT assure la survie de la cellule en régulant négativement les protéines TSC1, TSC2 et PRAS40. En effet TSC1 et TSC2 modulent l'activation de la GTPase Rheb qui contrôle le complexe mTORC1 constitué de mTOR, Raptor et mLST8, où PRAS40 semble réguler négativement et directement ce complexe protéique. Par la

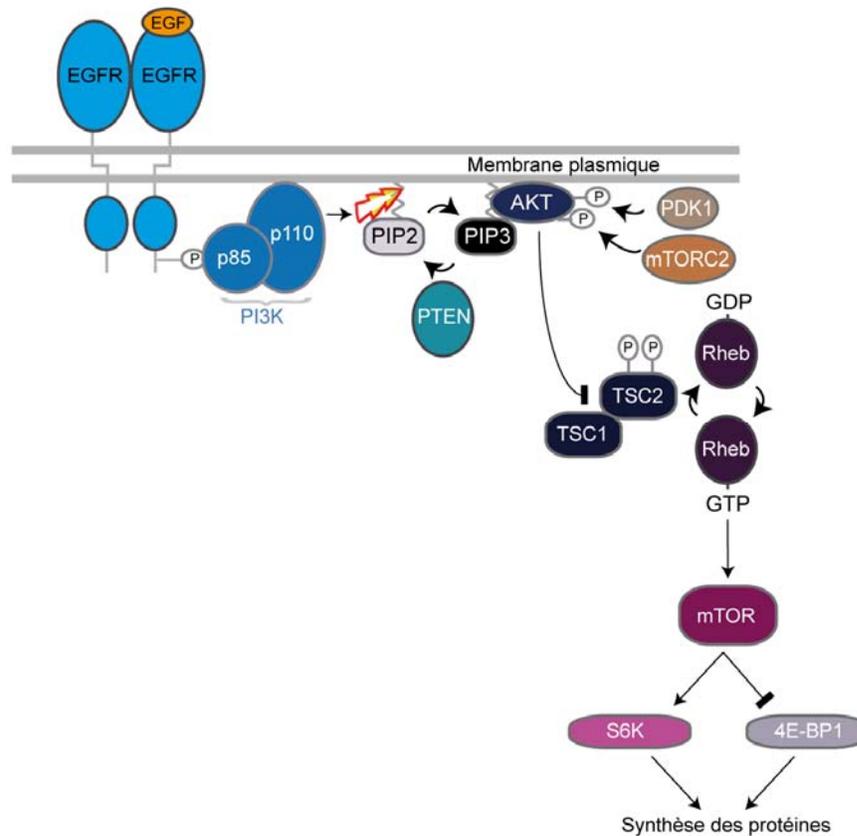


Figure 5: La voie PI3Kinase.

Suivant l'activation d'un RTK tel que l'EGFR, la PI3Kinase est phosphorylée via sa sous-unité régulatrice de PI3Kinase (p85 α) qui est phosphorylée par l'EGFR. Par la suite, la sous-unité catalytique (p110 α) effectue la catalyse (symbole d'éclair) du PIP₂ en PIP₃. Le PIP₃ assure le recrutement à la membrane de la kinase AKT. Ensuite, cette dernière est phosphorylée par PDK1 et mTORC2. Une fois activée, AKT module négativement le complexe TSC1 et TSC2. L'inhibition de TSC2 par AKT a pour effet d'inhiber sa fonction GAP (*GTPase-Activating Protein*) et de permettre ainsi l'activation de Rheb (forme liée au GTP) et mTOR. L'activation de mTOR promeut la phosphorylation de p70S6K (S6K), qui permet l'activation de S6 et l'inhibition de 4E-BP1 et favorise, par conséquent, l'activation de eIF4E. L'activation de S6K et de eIF4E augmente la synthèse des protéines impliquées dans la masse et la prolifération cellulaire (*Adaptée de Brendan D. Manning et Lewis C. Cantley, 2007*) [48].

suite, l'activation du complexe mTORC1 assurera, d'une part, la régulation de la kinase p70^{S6K} par phosphorylation sur Thr389 et, d'autre part, l'activation du facteur initiateur de la transcription 4E-BP1. Le signal de l'activation de la voie PI3Kinase prend fin lorsque le complexe mTORC1 et p70^{S6K} phosphoryle la protéine adaptatrice IRS1 sur des résidus sérine spécifiques, entraînant sa dégradation et par conséquent, l'interruption de l'activation de la PI3Kinase [48]. Des études de génomiques ont relatées que des mutations somatiques ont été détectées dans le gène *PIK3CA*, lequel encode la sous-unité catalytique p110 α dans plusieurs types de tumeurs solides. En effet, ces tumeurs possèdent des mutations ponctuelles comme E545K au niveau du domaine hélical et comme la mutation H1047R au sein du domaine kinase [49].

1.2.7.3.3 AKT, une protéine polyvalente

La protéine dirigeante et polyvalente de la voie PI3Kinase, AKT, est impliquée dans plusieurs évènements biologiques comme la prolifération cellulaire, le métabolisme, l'absorption du glucose, l'angiogenèse, la masse cellulaire et enfin la survie cellulaire. Les phénomènes biologiques médiés par AKT dans la progression tumorale sont principalement la prolifération, la survie cellulaire et l'angiogenèse. AKT contrôle la prolifération notamment en régulant négativement les inhibiteurs des cyclines p21^{CIP} et p27^{KIP} via phosphorylation sur Thr145 et Thr157 respectivement. De plus, AKT1 phosphorylera et inhibera p21^{CIP}, alors qu'AKT2 interagira et stabilisera p21^{CIP} afin de bloquer la progression du cycle. Par ailleurs, AKT affectera l'expression de p21^{CIP} en activant l'ubiquitine ligase MDM2 qui activera p53, un médiateur de la transcription de p21^{CIP}. Dès qu'elle sera phosphorylée par AKT, p27^{KIP} demeurera séquestrée dans le cytosol en interagissant avec 14-3-3 σ , ce qui atténuera l'effet inhibiteur du cycle cellulaire assuré par p27^{KIP}. AKT régule négativement GSK3, un important médiateur de la phosphorylation des cyclines D et E et qui est également nécessaire à la progression du cycle. Tel que mentionné ci-haut, le complexe mTORC1 régule l'activation de 4E-BP1. Ce facteur initiateur transcriptionnel est nécessaire à la transcription de la Cycline D1 et c-Myc. De plus, la protéine du rétinoblastome Rb, un régulateur central de la phase transitionnelle

G₁/S dont il sera question dans le chapitre portant sur la prolifération, est régulée par phosphorylation via le complexe CyclinD1/Cdk4/6 sur plusieurs résidus sérine et thréonine. La fonction de régulateur des cyclines par AKT se déroule principalement durant la phase G₁. Or, des données suggèrent qu'AKT module également l'entrée des cellules en mitose en modulant l'activité de Chk1, une kinase du point de contrôle de détection du dommage à l'ADN (G₂/M). Ainsi une activation soutenue d'AKT, notamment par l'absence de PTEN, entraîne une suractivation de Chk1 et augmentant alors les risques d'un dysfonctionnement du système de réparation de l'ADN induisant des mutations au sein du génome. AKT est impliquée dans la survie cellulaire et ce, en inhibant le processus d'apoptose par l'inactivation des protéines pro-apoptotiques comme Bcl-2 (membre des protéines dites seulement-BH₃). De plus, AKT phosphoryle sur Ser136, un autre membre des BH₃[48], BAD. Tel que rapporté ci-haut, AKT contrôle la stabilité de p53 par l'intermédiaire de MDM2, car cette dernière, agissant comme ubiquitine ligase, promeut la dégradation de p53 vers le protéasome. La régulation à la baisse de p53 atténue la transcription de PUMA et NOXA, deux autres membres des protéines dites pro-apoptotiques « BH₃-seulement » [50]. De plus, l'activité pro-apoptotique de la pro-Caspase-9, qui est activée par la relâche du Cytochrome-c des mitochondries et également, directement par Smac est également régulée par AKT. En effet, AKT phosphoryle la pro-Caspase-9 sur Ser196, ce qui diminue drastiquement son activité protéolytique, atténuant conséquemment l'activation des caspases effectrices 3 et 7 [48]. Il est intéressant de mentionner que, malgré la régulation de plusieurs processus biologiques par AKT, le rôle de cette kinase dans la migration et l'invasion demeure à ce jour peu défini. Néanmoins, deux hypothèses émergentes suggèrent que, premièrement, AKT1 et pas AKT2 modulerait la migration et que la diminution endogène d'expression de l'isoforme 1 favoriserait l'activation des MAPKinases ERK1/2, impliquées dans la migration et l'invasion. Deuxièmement, l'effet inhibiteur d'AKT1 sur la migration cellulaire serait lié à la dégradation du facteur nucléaire associé aux cellules T (NFAT). Or, le mécanisme par lequel AKT1 contrôle ce processus reste à déterminer. Cependant, l'étape limitante majeure dans la migration cellulaire (incluant les processus d'adhésion, de formation de protusion et de polarisation) est la production de PIP₃ par la

PI3Kinase même. En effet, la synthèse de ce substrat assure, en plus de l'activation d'AKT, l'activation de Rho-GEFs qui ultimement favoriseront la formation de protusions et la régulation de la polarité de la cellule par la voie signalétique médiée par Rac1. De plus, la sous-unité régulatrice p85 de la classe I_A des PI3Kinases interagit avec WAVE3. Cette interaction bloque la formation de lamellipodes d'une manière dépendante à la stimulation d'un RTK tel que le PDGFR [51]. De plus, la polarité sera maintenue par la formation du complexe Par3/Par6/PKC α et ce, via l'activation de Cdc42 et le recrutement de la RacGEF Tiam1. Le complexe Par6/ α PKC inhibera l'activité de RhoA par l'intermédiaire de p190RhoGAP. Cette inactivation de RhoA, inhibera également l'activation de ROCK, qui stimulée par RhoA, permet l'activation de PTEN pour renverser la catalyse de PIP₃ [47]. AKT joue un rôle crucial dans l'angiogenèse et ce, tant dans les cellules endothéliales que dans les cellules cancéreuses. AKT phosphoryle directement eNOS (monoxyde d'azote synthase endothéliale) qui assure la production de protoxyde d'azote ou NO qui induit au niveau vasculaire une vasodilatation et une néo-vascularisation. De plus, AKT permet l'augmentation du facteur hypoxique inductible HIF α par l'activation du complexe mTORC1/4E-BP1. Cette augmentation de HIF α survient notamment dans la progression tumorale, où ce facteur assurera l'expression et la sécrétion de VEGF, un puissant facteur pro-angiogénique impliquée dans l'angiogenèse tumorale. Tel que relaté ci-haut, GSK3 est régulé négativement par AKT, notamment sur les résidus Ser-21 et Ser-9 pour les isoformes GSK3 α et GSK3 β [48] respectivement. Indépendamment de la voie PI3Kinase/AKT, GSK3 contrôle la transition épithéliale-mésenchymateuse en modulant l'activité de la β -caténine. Brièvement, on retrouve deux populations de β -caténine dans la cellule, soit l'une à la membrane plasmique en interaction avec les cadhérines et la p120-caténine aux jonctions intercellulaires et l'autre oscillant entre le cytosol et le noyau qui est dépendant de Wnt. En absence de Wnt, cette dernière distribution de la β -caténine est contrôlée par le complexe de destruction AXIN1/AXIN2/APC/CK1/GSK3, où GSK3 hyperphosphorylera la β -caténine et ainsi le complexe SKP1/cullin-1/F-box (SCF ^{β -TrCP}) ubiquitylera la β -caténine. Cela entraînera sa dégradation vers le protéasome. Cependant, lorsque Wnt est présent, ce ligand active les deux récepteurs transmembranaires LRP5/6 et Frizzled. Il en découle un

recrutement de GSK3 au récepteur LRP et une phosphorylation sur le résidu Ser1490 de la portion cytoplasmique du récepteur. Cet événement moléculaire, en plus du recrutement de CK1 au récepteur LRP, permet la dissociation de la β -caténine avec l'AXIN. Cela promeut la stabilisation de la β -caténine et subséquentement sa translocation dans le noyau afin de permettre la transcription de gènes favorisant la transition épithéliale-mésenchymateuse [52, 53].

I.3 : La formation de métastases

La formation de métastases est un phénomène complexe qui consiste globalement à la formation de foyers tumoraux à des sites distants du site primaire de la tumeur. Ce processus se résume en 7 principales étapes : 1) l'initiation de la formation de la tumeur primaire; 2) le détachement de la tumeur de la masse primaire; 3) l'invasion au sein du tissu hôte (site primaire); 4) la migration transendothéliale des tumeurs dans le réseau lymphatique et/ou sanguin local; 5) la survie dans la circulation sanguine et l'arrêt aux capillaires ou aux veinules des organes cibles 6) la pénétration dans le parenchyme et 7) l'adaptation de même que la colonisation au site secondaire.

I.3.1 Tumeur primaire

Tel que mentionnée ci-haut, la carcinogenèse est un processus qui prend naissance soit par sélection clonale sous des pressions du microenvironnement et/ou par les cellules souches résidentes du stroma. La transformation de cellules normales épithéliales promeut la formation de carcinomes *in situ* (état de malignité). La perte des interactions cellule-cellule via le *switch* ou le remplacement de Cadhérine-E en Cadhérine-N entraînera le passage du carcinome *in situ* vers un carcinome invasif. L'initiation de la formation de la tumeur primaire est caractérisée par une dérégulation de l'homéostasie existante dans la balance « prolifération cellulaire/mort cellulaire », incluant les interactions cellule-cellule. Cette homéostasie préexistante chez les cellules normales est avortée chez la cellule tumorale. En effet, les quelques cellules tumorales, survivant aux stress de l'environnement du site primaire et à l'altération de leur état prolifératif, parviennent à

parer les processus de réparation et d'apoptose. En effet, face aux pressions de sélection de l'environnement tumoral sur les tumeurs, comme le manque d'oxygène et de nutriments, ces dernières subissent entre autres des mutations d'ordre chromosomique, incluant des mutations au sein des gènes impliqués dans la réparation des brins d'ADN comme *BRCA1*. Durant l'étape d'initiation de la formation de métastases, plusieurs processus biologiques sont mis au profit des cellules tumorales, tels que l'angiogenèse tumorale, l'adhésion, l'EMT et l'invasion (incluant la protéolyse).

I.3.2 Angiogenèse tumorale

Les tissus entourant le site primaire tumoral, dont le stroma, sont considérés comme à des hôtes pour les tumeurs. L'un des principaux stress environnemental au site de la formation de la tumeur primaire est le manque d'oxygène. L'environnement hypoxique exerce une pression de sélection sur la population de cellules tumorales et seulement celles capables de croître dans ces conditions hostiles parviendront à acquérir un phénotype invasif. En effet, l'absence d'oxygène promeut la stabilisation de HIF-1 (*Hypoxia Inductible Factor*) qui permet la formation de nouveaux vaisseaux permettant à certaines cellules tumorales de quitter le site primaire et d'emprunter la circulation systémique et/ou lymphatique. L'induction du gène *HIF-1* constitue un événement clé dans le déclenchement de l'angiogenèse tumorale. Cette stimulation induira une néovascularisation permettant l'apport de nutriments et d'oxygène afin de promouvoir la progression de la tumeur. Une myriade de gènes sont contrôlés par HIF-1, incluant le VEGF, la Vimentine, la Fibronectine, les Cytokératine14/18 et 19, la MMP2, la Cathepsine-D, uPAR, AMF, c-Met de même que CXCR4 [54, 55]. De plus, HIF-1 promeut l'expression de la lysyl-oxydase (LOX) en condition pauvre en oxygène. LOXL2, un membre de la famille LOX, induit l'activation de Snail, un puissant répresseur de la transcription de la Cadhérine-E. Suivant la sécrétion depuis le foyer tumoral primaire, LOX s'accumule principalement au niveau des poumons. Ainsi, LOX ferait office de niche permissive pour les cellules cancéreuses infiltrantes. En effet, LOX servirait de matrice extracellulaire pour les futures cellules tumorales circulant vers le foyer secondaire, comme les poumons. Ainsi, en plus d'assurer

sa fonction de facteur pro-angiogéniques, HIF-1 est donc multivalent de par son rôle dans l'induction de la protéolyse, de la migration et de l'EMT. Afin de stimuler le processus d'angiogenèse, les cellules tumorales en partenariat avec les cellules stromales, sécréteront des facteurs solubles pro-inflammatoires et pro-angiogéniques tels que la cytokine $TNF\alpha$, le VEGF et l'IL8.

I.3.3 Détachement de la tumeur primaire

Les cellules épithéliales polarisées sont liées entre elles par des jonctions d'adhésion formées principalement par des liaisons homophiliques cadhérine-cadhérine, incluant la Cadhérine-E. La perte de fonction de la Cadhérine-E est un processus hautement activé dans les cellules tumorales malignes. Le détachement de la cellule tumorale est donc médié par le dysfonctionnement des interactions cellule-cellule, mais également par leurs propriétés d'adhésion à la membrane basale (lamina). La membrane basale est une structure hautement spécialisée servant de support physique aux cellules tout en séparant et connectant celles-ci à la matrice extracellulaire. Les composantes ubiquitaires de la membrane basale sont les glycoprotéines de type laminine, le collagène de type IV, le protéoglycane perlecan de même que les nidogène-1 et 2 [56]. Ces composantes font office de ligands pour les récepteurs aux intégrines dans le but d'établir une stabilité de contact entre la cellule et la membrane basale. En effet, les intégrines peuvent s'associer à divers ligands via le motif RGD (Arg-Gly-Asp). Cette association ligands-intégrines induit comme chez les RTKs ou les RCPGs une transduction du signal externe vers l'intérieur de la cellule porteuse du récepteur déclenchant des réponses biologiques telles que l'adhésion, la protéolyse, la migration et l'angiogenèse.

I.3.4 Invasion de la tumeur

Afin de rejoindre le lit néo-vasculaire local, la cellule tumorale dégrade la membrane basale par le biais des métalloprotéases. Les métalloprotéases les plus sécrétées par les cellules tumorales sont les collagénases MMP2 et MMP9. L'activation de celles-ci implique plusieurs étapes. Par exemple, l'activation de la MMP2 débute par son association

avec son inhibiteur TIMP2. La métalloprotéinase transmembranaire MT1-MMP recrute le complexe MMP2/TIMP2 à la surface de la cellule, où MT1-MMP clive le pro-domaine MMP2 [57]. L'activation de la MMP2 est complétée par son interaction avec l'intégrine $\alpha\beta3$, via la compétition avec le fragment auto-protéolytique PEX. La sécrétion des métalloprotéases de type collagénase transmembranaire MMP14, 15 et 16 permettent aux cellules tumorales d'être en contact avec des composantes du stroma, telles que les fibroblastes. À noter que la dégradation de la membrane basale est restreinte à ces trois MMPs lors du stade précoce d'initiation de la formation de la tumeur primaire (carcinome *in situ*). Cependant, lors de l'acquisition du profil invasif (carcinome invasif), ces protéases induiront l'activation des MMPs solubles comme les MMP2 et MMP9, couramment associées à l'invasion tumorale. Des essais *in vitro* démontrent qu'en absence de protéolyse, les cellules tumorales sont de conformation sphérique, ce qui altère leur potentiel de croître dans un plan tridimensionnel. Le stroma participe également à la progression des tumeurs au site primaire par l'activation des métalloprotéases. Par exemple, dans le cancer du sein, les MMP9 et MMP11 sont hautement exprimées par les cellules stromales. Cette forte expression du stroma de la MMP9 est indicative d'un faible pronostic, alors que l'expression de la MMP11 est, à l'inverse, indicatif d'un meilleur pronostic [58]. De façon générale, les cellules tumorales circuleront vers les ganglions lymphatiques afin de former le premier site métastatique. Les cellules de carcinomes atteignent ce site via les capillaires ou les vaisseaux lymphatiques pré-existants ou néoformés [59]. Le contact des cellules tumorales avec les fibroblastes induit une altération de leur phénotype en myofibroblastes, où ces derniers en partenariat avec les cellules tumorales sécrètent des enzymes de dégradation de la matrice extra-cellulaire, incluant les MMPs et les cathepsines. Simultanément, lors du processus de dégradation matricielle, la cellule tumorale migre vers le lit de capillaires suivant un gradient chimiotactique. Par exemple, la sécrétion de VEGF des cellules endothéliales favorise la migration des tumeurs selon un gradient de concentration. Le processus d'invasion à travers la membrane basale et l'envahissement du stroma par les cellules tumorales sont suivis de l'activation du phénomène de migration. La cellule tumorale se détachant de la masse primaire peut

adopter deux comportements migratoires. Les cellules mésenchymateuses ou tumorales peuvent migrer de manière classique, incluant la formation de protrusion au front migratoire, la formation de points de contacts focaux, la contraction du système actine-myosine. De plus, les cellules tumorales peuvent se déplacer par un mouvement généré à partir de filaments d'actine corticale où, contrairement au premier comportement, il y a absence de fibres contractiles (fibres de stress d'actine) et de contacts focaux [60]. De plus, les cellules tumorales peuvent se mouvoir sous deux différents aspects morphologiques. Premièrement, celles-ci peuvent se déplacer en groupes de quelques cellules ou en agrégats et donner ultimement une structure en forme de chaîne. Cette morphologie est adoptée notamment par les cellules tumorales de carcinomes invasifs de type lobulaire du cancer du sein. Le second phénotype migratoire imite celui observé lors du développement embryonnaire. Lors de la fermeture du tube neural, les cellules de l'ectoderme et du blastoderme migrent en feuilles ou en agrégats. Ce même comportement est également adopté par les cellules épithéliales des glandes mammaires lors du processus d'arborisation, mais aussi lors de la migration de tumeurs malignes.

I.3.5 Pénétration de la tumeur dans la circulation

Les cellules cancéreuses se propagent par trois voies principales formées par l'angiogenèse et la lymphangiogenèse (1), soit la circulation sanguine (2) et lymphatique (3). Quelques tumeurs se déposeront sur des surfaces sereuses transcoelomiques. En général les carcinomes invasifs épithéliaux débiteront leur dissémination dans la circulation lymphatique pour poursuivre leur route par la suite dans la circulation sanguine. À la différence des carcinomes, les sarcomes envahiront la circulation sanguine dont une faible fraction de ces cellules tumorales formera des métastases au niveau transcoelomique, soit les mésothéliomes et les carcinomes ovariens. Le phénomène de pénétration des tumeurs dans la circulation est coordonné principalement par l'adhésion des cellules cancéreuses sur l'endothélium, un mécanisme similaire à celui des leucocytes lors d'une réponse T inflammatoire. Ce phénomène implique l'intervention de plusieurs types de molécules d'adhésion dont les sélectines, les intégrines et les membres de la superfamille

des immunoglobulines. Parmi ces molécules, les sélectines sont hautement employées par les cellules cancéreuses. Ces protéines d'adhésion présentent un domaine lectine leur permettant d'associer les membranes d'une manière dépendante au calcium. On les regroupe en trois sous-types: 1) les sélectines exprimées à la surface des leucocytes (Sélectine-L), 2) les plaquettes (Sélectine-P) et 3) les cellules endothéliales (Sélectine-E). L'activation des sélectines est médiée principalement par la glycosylation. En effet, les glycosyltransférases GlcNac transférase, Gal transférase, sialyl transférase et fucosyl transférases permettent la synthèse des hydrates de carbone sialyl- Lewis x/a, soit le ligand majeur des sélectines exprimées par les cellules endothéliales. L'attachement des cellules tumorales sur l'endothélium est médié par les interactions sialyl-Lewis/sélectine et ce, à l'aide de la sécrétion des cytokines IL-8 β et TNF- α [61]. L'étape de roulement sur la surface endothéliale est peu exercée par les cellules cancéreuses. Cependant, quelques types de cancers, dont celui de la prostate, utilisent cette méthode de locomotion employée par les leucocytes. Le roulement des cellules tumorales s'effectue selon un gradient chimiotactique induit par les chimiokines sécrétées depuis l'endothélium. La migration transendothéliale est déclenchée par l'activation des intégrines des cellules tumorales où ces dernières formeront un complexe d'adhésion avec les membres de la superfamille des immunoglobulines Ig-CAM, tel que ICAM. Par exemple, l'activation de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ par son ligand, la fibronectine, promeut la transmigration endothéliale en associant V-CAM, présent à la surface de l'endothélium vasculaire et des cellules stromales de la moëlle osseuse [62]. De concert avec la dynamique d'interaction intégrines CAMs [62], les GTPases de type Rho modulent la structure du cytosquelette des cellules endothéliales. Il a été démontré que la migration transendothéliale des lymphocytes T est modulée par la portion cytoplasmique d'ICAM-1 qui induit l'activation de la voie de Rho et l'activation des protéines impliquées dans la réorganisation du cytosquelette [63, 64], où la portion extracellulaire (domaine *Ig-like*) est responsable de l'adhésion avec l'endothélium. En effet, ICAM-1 et VCAM-1, deux ligands des sous-unités $\beta 1$ et $\beta 2$ des intégrines, induisent l'activation de RhoA en séquestrant une RhoGDI, où cette dernière maintient normalement la GTPase en conformation inactive ou liée au GDP. De concert avec la protéine

d'adhésion CD44, le complexe ERM (Ezrin/radixin/moesin) en plus d'interagir avec celle-ci, associe et séquestre la Rho-GDI, permettant l'activation de RhoA [65]. Dès qu'elles sont en circulation, les cellules tumorales n'adhèrent plus à la membrane basale ou via la matrice extracellulaire. À la différence des cellules tumorales, les cellules normales meurent par apoptose lorsque celles-ci perdent leurs propriétés d'adhésion. Ce processus de mort cellulaire dépendant de l'adhésion est appelé anoïkose. Cependant, les cellules tumorales résistent à ce phénomène de mort cellulaire. Par exemple, la voie de signalisation de FAS est connue pour l'induction du programme de l'apoptose. Or, on retrouve dans certains types de cancers, dont ceux du poumon et colorectal, une forme mutante du récepteur FAS, où ce dernier ne peut être activé par son ligand Fas. En maintenant leur état de survie dans la circulation, les cellules tumorales sont véhiculées dans la circulation sanguine ou lymphatique où elles s'associent graduellement aux plaquettes et aux leucocytes dans le but de former ultimement un emboli tumoral. En utilisant les propriétés d'adhésion des plaquettes et des leucocytes, les cellules tumorales adhèrent aisément à la paroi du vaisseau à proximité de l'organe cible (foyer secondaire). L'intégrine $\alpha v \beta 3$ contribue à l'amplification de la colonisation au site secondaire. En effet, on retrouve dans les carcinomes de cancer du sein de haut niveau d' $\alpha v \beta 3$ et ce, tant dans les cellules tumorales que dans les plaquettes, où l'expression d' $\alpha v \beta 3$ semble corrélérer avec la co-agrégation de deux types de cellules [66]. Le phénomène d'extravasation est similaire à l'intravasation et implique les mêmes mécanismes moléculaires, incluant presque les mêmes protéines. En effet, un éventail de récepteurs aux intégrines participe à cette transition circulation/organe. Par exemple, l'intégrine $\alpha 3 \beta 1$ exprimée par les cellules tumorales interagit avec la Laminine-5 de la membrane basale endothéliale [67]. Un second exemple de cette situation est l'interaction de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ avec les canaux à chlore à activité dépendante au calcium, où cette isoforme des intégrines est présentée à la surface des cellules endothéliales pulmonaires [68].

I.3.6 Infiltration/latence/colonisation

Entre les processus d'infiltration (période entre l'invasion et l'extravasation) et de colonisation (période de prolifération), les cellules tumorales entrent en état de latence pouvant varier de quelques mois pour le cancer du poumon à des décennies pour le cancer du sein [69]. L'infiltration des tumeurs de cancer du sein ER⁺ peut survenir à des stades précoces, mais leur période de latence est toutefois prolongée où la survie de certaines cellules entrant en prolifération est parée par l'induction de mort cellulaire. Selon les sites métastatiques (os, poumons et/ou cerveau), la période de latence peut être de courte, de moyenne et de longue durée. En fonction du bagage génétique ou épigénétique des cellules tumorales latentes, certaines d'entre elles survivront et émergeront de ce processus de dormance. Les cellules tumorales compétentes à infiltrer des organes distants du site primaire tumoral ne sont pas toujours compétentes à coloniser (impliquant la prolifération des tumeurs) à ces sites. L'hypothèse actuelle de la colonisation des tumeurs à des sites spécifiques repose sur l'expression de gènes pro-métastatiques participant à la fois au site primaire et à l'environnement métastatique [70]. Ces gènes pro-métastatiques établissent une signature moléculaire favorisant la dissémination des cellules tumorales issues du site primaire. Par exemple, l'expression des gènes *EREG*, *COX-2* et *MMP-1* dans le cancer du sein fournira une signature spécifique à la formation de métastases au niveau des poumons, de la moëlle osseuse ou du foie. En effet, l'expression de ces gènes augmente l'habileté des cellules disséminées à traverser la cloison parenchymateuse pulmonaire [71]. Toutefois, des signaux externes du site primaire coordonnent dans le temps le déclenchement de la dissémination et de la colonisation des cellules dans l'organisme. Dès que la chimiokine CCL5 (RANTES) est relâchée dans les tumeurs mammaires par les cellules progénitrices mésenchymateuses, dérivées de la moëlle osseuse, celle-ci stimule la capacité des tumeurs à métastaser aux poumons et ce, sans affecter le processus de tumorigenèse se déroulant au site primaire. La cytokine TGFβ est hautement présente dans le microenvironnement tumoral et induit l'expression d'un large éventail de gènes, dont *ANGPTL4*. Classé comme un gène pro-métastatique pulmonaire, *ANGPTL4* est détectable dans les tumeurs mammaires et semble exercer ses fonctions que lors de l'arrivée des cellules cancéreuses

aux capillaires pulmonaires. Il exerce donc son rôle à l'étape d'extravasation des cellules à travers les cellules endothéliales [72]. De plus, le concept émergent de niche pré-métastatique semble répondre à l'hypothèse de la colonisation spécifique des tumeurs à des sites distants du foyer primaire tumoral. Cette hypothèse soutient que le futur site de métastase soit amorcé par des facteurs de croissance dérivés des tumeurs, tels que le VEGFA, PlGF et TGF β . Cela serait en réponse aux cellules immunitaires associées aux tumeurs comme les HPCs (*Hematopoietic Progenitor Cells*) et les macrophages. En effet, les cellules myéloïdes hématopoïétiques de la moëlle osseuse expriment le récepteur VEGFR1 et sont localisées à la niche pré-métastatique avant l'arrivée des cellules tumorales [73]. Ainsi, l'expression de ces ligands assure la trajectoire que les cellules tumorales auront à suivre à travers la circulation sanguine.

En conclusion, la formation de métastase est régulée par plusieurs processus biologiques tels que la migration cellulaire, la transition épithéliale-mésenchymateuse, l'invasion cellulaire, l'angiogenèse et la prolifération. Afin de respecter les limites du sujet de la thèse, seulement les processus de prolifération, de transition épithéliale-mésenchymateuse et de migration seront expliqués en détails dans les chapitres ultérieurs.

I.4 : La prolifération cellulaire

La prolifération est un événement biologique omniprésent tout au long du processus de formation de métastases. Afin de mieux comprendre le processus de prolifération dans les cellules tumorales, il est important d'introduire la notion de prolifération des cellules normales non transformées. Le cycle cellulaire est constitué de 5 phases G0, G1 (Gap 1-phase de transition), S (phase répliquative de l'ADN), G2 (Gap2- phase de transition), M (phase mitotique). Le cycle débute par la sortie de la phase G0 (phase de latence) via un stimulus mitogène. La phase de transition G1/S constitue un point de contrôle majeur de la division cellulaire au cours duquel des complexes cyclines-cdks activeront ou non la transcription des gènes nécessaires à la progression du cycle en phase S et ainsi déclencher la répliquative de l'ADN. Les phases G1, S et G2 constituent l'interphase. La phase mitotique (M) débute par la condensation des chromosomes et est suivie par le déplacement

des corps polaires disposés de manière opposée dans le noyau. Par la suite, la dynamique des microtubules génère un fuseau mitotique. À la métaphase, les microtubules se lient au kinétochores des chromosomes et forment une structure chromatique séparant de manière symétrique les deux corps polaires. Par la suite, l'anaphase débute par le déplacement des chromosomes à chacun des pôles et se termine avec la cytokinèse de même que par la séparation du cytoplasme. Ce dernier génère alors deux cellules filles en phase G1.

I.4.1 Les kinases dépendantes des cyclines et les cyclines

Chez les eucaryotes, le déroulement du cycle cellulaire est coordonné par les kinases dépendantes des cyclines ou cdks (*Cyclin dependent kinases*). En s'associant avec les cdks, les cyclines modulent l'activité de celles-ci. À ce jour, on dénombre 8 membres chez les Cdks (Cdk1-8) et 16 membres chez les cyclines, où leurs fonctions et partenaires d'interaction demeurent à l'étude. Les inhibiteurs des cdk ou CKI contribuent également à la régulation des Cdks au cours du cycle cellulaire. On distingue les cyclines principalement en fonction des fenêtres temporelles du cycle. Les cyclines dites G1, Cycline-C et les Cycline-D (1-3) démontrent leur maximum de niveau d'expression au cours de cette phase. C'est également le cas de la Cycline-E qui est hautement exprimée lors de la transition G1/S. Les cyclines mitotiques sont les cyclines A et B, où ces dernières sont hautement exprimées lors de la transition G2/ M. La Cdk1 n'est pas exprimée dans les cellules quiescentes (G0/G1) [74]. La quantité de Cdk1 varie au cours du cycle mitotique, mais elle demeure minimale en phase G1. Au cours de la phase S, Cdk1 interagit avec la Cycline B, où Cdk1 peut aussi associer la Cycline A avant d'interagir avec la Cycline B. La Cdk2 acquiert son activité kinase lors de son association avec la Cycline A et la Cycline E. Cdk2 interagit avec la Cycline A de la phase G1 jusqu'à la phase mitotique, alors que l'association Cdk2/Cycline E prend également naissance au cours de la phase G1 pour se terminer au début de la phase S. La formation du complexe Cdk2/Cycline E est indispensable à l'initiation de la phase S. La Cdk4 devient active par son interaction avec la Cycline D1 à la moitié de la transition G1/S. La Cdk5 est active de manière indépendante aux Cyclines. La Cdk6 interagit avec toutes les isoformes de la Cycline D et exerce sa

fonction de régulatrice du cycle durant la phase G1 [74]. La Cdk7 orchestre l'activité kinase des Cdk1,2 et 4 sur l'Histone H1. En effet, la Cdk7 phosphoryle les Cdks indiquées sur les résidus thréonine 160, 161 et 172 [74]. Le mécanisme d'action de la Cdk7 demeure encore obscur, mais les évidences suggèrent que son expression et son activité kinase n'oscillent pas au cours du cycle [74]. Quant à la Cdk8, elle est connue comme étant un partenaire d'interaction pour la Cycline C [74]. La Cycline D1 est surexprimée dans le cancer oesophagien [75]. On retrouve dans les cellules B de lymphomes, une surexpression de la Cycline D. Cela est la conséquence d'une translocation chromosomique [76]. Le virus de l'herpès Saimiri exprime parfois sa propre Cycline D1 (oncovirale) au sein du site primaire de cancer prostatique. De plus, Cdk4 est hautement exprimée dans certains types de cancers, tel que les glioblastomes [77].

L'activation des cdk

Suite à la liaison de la cycline à la cdk, le complexe CAK active les Cdk1 et Cdk2 par la phosphorylation des résidus thréonine 160 et 161 respectivement. Les Cdks sont également phosphorylées sur les résidus thréonines 14 et 15 par la kinase Wee1. D'ailleurs, c'est lors de la déphosphorylation de ces résidus par la phosphatase Cdc25 que la Cdk devient active [74]. Ainsi la dynamique Wee1/Cdc25 contribue à l'initiation de la phase mitotique. La phosphorylation des Cdks ne correspond pas au reflet de son activation. Seule la phosphorylation des résidus thréonines 160 ou 161 assure l'activation de la kinase [74]. Le principal substrat de la Cycline D1 est pRb. En effet, la Cycline D1 inactive pRb en associant les Cdk4/6. L'activation de la Cycline D1 peut prendre naissance par l'induction d'une voie mitogénique comme Ras/MAPKinase. Les Cyclines D2 et D3 ont également l'habileté d'inactiver pRb.

I.4.2 Les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines

Les CKIs sont classés en deux groupes; INK4 et CIP/KIP. Un troisième groupe p14^{ARF}, indépendant des complexes Cyclines/Cdks, contrôle plutôt l'axe MDM2/p53. Le groupe INK4 est représenté par les membres p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} et p19^{INK4d} où

ceux-ci inhibent spécifiquement Cdk4 et Cdk6. Le groupe CIP/KIP est composé des membres p21^{CIP/WAF1}, p27^{KIP1} et p57^{KIP2}, où ces derniers bloquent un large éventail de complexes Cyclines/Cdks. P16^{INK4a} exerce la fonction de régulateur négatif du cycle cellulaire en inhibant spécifiquement la fonction de la Cycline D1 associée aux Cdk4 et Cdk6. Par conséquent, l'absence de p16^{INK4a} promeut l'activation du complexe Cycline D1/Cdks qui phosphoryle pRb pour ainsi permettre la progression du cycle cellulaire. Les CKIs p15^{INK4b} et p16^{INK4a} sont souvent supprimés dans les cancers du poumon et dans les glioblastomes [77, 78]. Au sein de ces tumeurs, le gène codant pour la protéine p16^{INK4a} est inactivé à partir des modifications génétiques de types mutations ponctuelles et/ou délétions homozygote de même que par hyperméthylation des îlots CpG du promoteur de p16^{INK4a} [79]. P16^{INK4a} est souvent exprimée dans les cellules sénescents et contrôlerait l'inactivation de pRb via l'inhibition du complexe Cycline D1/Cdk4. Les inhibiteurs KIP et CIP ont comme propriété de bloquer l'activité de toutes les Cdks. Brièvement, leur mécanisme d'action est basé sur l'inhibition de la liaison de l'ATP au site catalytique de la Cdk. p21^{CIP/WAF1} se lie aux complexes Cycline D/Cdk4 et Cycline E/Cdk2 et ce, au cours de la phase G1. Également, p21^{CIP/WAF1} est exprimée de manière ubiquitaire et son expression est modulée par p53. L'expression de p21^{CIP/WAF1} corrèle avec la progression de plusieurs types de cancers, dont les cancers de l'ovaire, de l'estomac et colo-rectal. En effet, la progression des tumeurs durant leur changement de phénotype non invasif vers un profil invasif est hautement associé à l'expression de p21^{CIP/WAF1} [80]. P27^{KIP} est hautement exprimé durant la période de quiescence et stabilise le complexe Cycline A/E/Cdk2. P27^{KIP} peut également inhiber l'activité du complexe Cycline D/Cdk4. La translocation nucléaire de P27^{KIP} est contrôlée par la phosphorylation des résidus thréonine 157 ou 198 par AKT. En effet, l'activation de la voie PI3K/AKT induit la phosphorylation de p27^{KIP} et sa séquestration dans le cytoplasme provoque l'arrêt de cellule en phase G1 [81]. La polyubiquitination de p27^{KIP} s'effectue par l'intermédiaire du complexe SCF (Skp1/Cul1/F-box) ubiquitine ligase, où Skp2 et son cofacteur Csk1 capture la forme phosphorylée de celle-ci [82, 83]. La stabilité de l'interaction Skp2/Csk1 est contrôlée par le complexe APC/C. Dès qu'il est activé, ce dernier promeut la séparation de la chromatide durant la

mitose de même qu'à sa sortie et ce, en déclenchant l'ubiquitination de la Sécurine et des Cyclines mitotiques. L'activité de p27^{KIP} demeure élevée jusqu'à la fin de la phase G1, où le complexe APC débute son activité. Les inhibiteurs CIP/KIP modulent également la motilité cellulaire. P27^{KIP} interagit et bloque l'activation de RhoA, diminuant l'activation de l'effecteur ROCK, résultant en l'inhibition de la formation des fibres de stress d'actine et de l'assemblage des points d'adhérence [84, 85]. À l'inverse, une régulation à la baisse de p27^{KIP} induit une hyperactivation de RhoA et une déficience au niveau de la motilité. De plus, p27^{KIP} module de manière indépendante de son activité CKI, la migration des cellules HepG2 dépendante de Rac, via le domaine C-terminal de p27^{KIP} [86].

I.4.3 Les protéines RB

Le substrat principal des Cyclines est pRb et ses deux homologues p107 et p130. Ces membres de la famille RB gouvernent la progression de la phase G1. Le membre de cette famille le mieux caractérisé est pRb, une protéine produite à partir du gène humain *Rb-1*, où l'inactivation des deux copies du gène promeut la formation de rétinoblastome ou tumeur maligne de la rétine [87]. PRb, p107 et p130 partagent une structure moléculaire similaire, notamment au niveau de la longue région C-terminale pourvue de deux domaines *pocket* A et B qui médient l'interaction avec les protéines oncovirales des E1A (adénovirus), antigène grand T (SV40) et E7 (virus du papillome humain), où ces dernières bloquent la fonction des trois membres. Ces oncoprotéines s'associent avec le domaine *pocket*, via un motif LxCxE. L'alignement des trois séquences de pRb, p107 et p130 montre que p107 et p130 possèdent un motif de liaison avec les Cycline A/Cdk2 et Cycline E/Cdk2. De plus, en région N-terminale de p107 et p130, est situé un site inhibiteur de la fonction des Cdks [88]. La région C-terminale des trois membres est pourvue d'un peptide signal de localisation nucléaire ou NLS, qui consiste en deux groupes de résidus basiques. Ce peptide, en plus de permettre la translocation nucléaire des protéines RB, est impliqué dans la translocation nucléaire des protéines E2F4 et E2F5, où tous deux ne présentent pas de NLS [89]. Les membres de la famille RB sont modulés au niveau post-traductionnel, notamment par phosphorylation. Des analyses phosphopeptidiques ont démontré que pRb

est phosphorylable sur une douzaine de résidus sérine et thréonine. La phosphorylation graduelle de pRb, p107 et p130 résulte en leur inactivation. Durant la phase G₀, le contenu en ARN de la cellule est faible et la forme hypophosphorylée de pRb et p107 contribue à stabiliser l'état G₀ en réprimant l'ARN ribosomal de même que l'expression de l'ARN de transfert. C'est par l'intermédiaire des Cyclines/Cdks au cours de la phase G₁ que la phosphorylation des protéines RB est déclenchée et induit la sortie de la phase G₀ et la progression successive de la phase G₁ [90]. La sortie de la phase G₀ s'effectue par la phosphorylation de pRb par Cycline C/Cdk3, suivie rapidement de la phosphorylation par le complexe Cycline D1/Cdk4/6 jusqu'à la moitié de la phase G₁. L'inactivation de ces protéines est maximale lors de la période tardive de la phase G₁ et ce, par la phosphorylation médiée par le complexe Cycline E/Cdk2 [91]. Les protéines RB ont la capacité d'associer les membres E2Fs afin de moduler leur activité transcriptionnelle. En s'associant le domaine transactivateur des E2Fs et les promoteurs régulés par les E2Fs, pRb, p107 et p130 bloquent l'activité de transcription des E2Fs et répriment de manière active les promoteurs dépendant des E2Fs. À l'inverse, p130 est phosphorylé durant la phase G₀/G₁ par des kinases non définies. Durant la phase G₁ et au début de la phase S, la chromatine se restructure et forme des foci en périphérie du noyau où nichent dans ces régions pRb, p107, p130, les E2Fs de même que certaines HDACs. Au sein de ces foci sont localisés les sites de régulation des E2Fs [92]. Ces mêmes régions seraient considérées comme des sites initiateurs de la réplication de l'ADN lors de l'entrée des cellules en phase S. Au-delà de leur homologie de séquence, les trois membres pRb, p107 et p130 adoptent des profils différents d'expression et d'interaction avec les membres E2Fs. Considérant la fenêtre temporelle incluant la phase G₀ (quiescence), G₁ et la période précoce de la phase S (état de différenciation), pRb est exprimé de manière constante. À l'inverse, p107 est faiblement et hautement exprimé aux phases G₀ et S, respectivement. De plus, p130 est hautement exprimé et faiblement exprimé aux phases G₀ et S respectivement. Paradoxalement, pRb et p130 sont hautement exprimés dans plusieurs types de cellules différenciées.

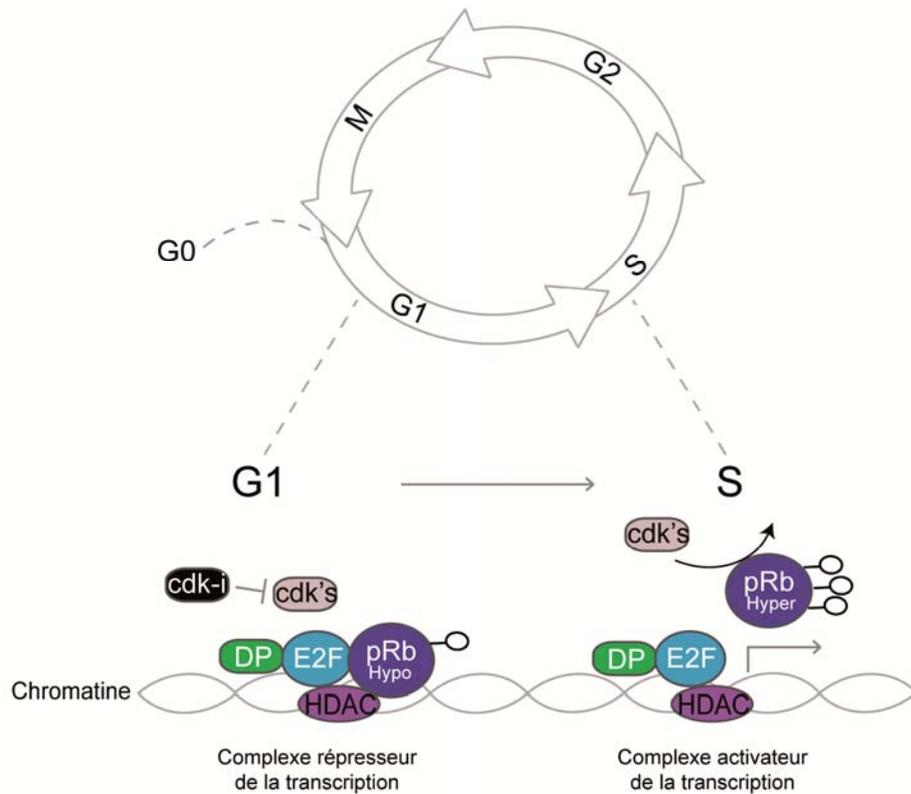


Figure 6: La phase de transition G1/S.

En phase G0/G1, les complexes cyclines-cdks sont inactivés via les inhibiteurs des cdks (cdk-i). Ainsi, pRb, sous sa forme hypophosphorylée, est associée en complexe avec les facteurs de transcription E2Fs et les HDACs (complexe répresseur de la transcription). Au cours de la transition G1/S, pRb est phosphorylée progressivement par les complexes cyclines-cdks. À l'état hyperphosphorylée, pRb est dissociée des E2Fs et des HDACs (complexe activateur de la transcription) et favorise l'entrée des cellules en phase S (*Inspirée de Sherr et McCormick, 2002*) [93].

On classe les facteurs transcriptionnels E2F1 à E2F3 comme étant des activateurs de la transcription. E2F4 à E2F6, pour leur part, agissent comme des répresseurs de la transcription. PRb interagit seulement avec les E2Fs activatrices E2F1-3 et E2F4 alors que les deux autres membres, p107 et p130, n'associent que les E2Fs répresseurs E2F4 et E2F5.

Cependant, la spécificité de liaison en fonction du type cellulaire reste à déterminer, puisque des résultats démontrent, par le biais du système double-hybride en levure, que p107 et p130 ont la capacité de s'associer aux trois E2Fs activatrices [94-96]. Les membres de la famille RB interagissent avec plusieurs partenaires, où pRb a l'habileté d'interagir avec plus de 110 protéines. Des interactions importantes, comme pRb/E2F et pRb/HDAC sont nécessaires pour la fonction répresseur des protéines RB, principalement lors de la phase précoce de la phase G1. Lors de la formation du complexe répresseur pRb/E2F, des enzymes modulatrices de la structure de la chromatine interagiront avec pRb afin d'augmenter la stabilité du complexe (Figure 6). En effet, les histones déacétyltransférases (HDACs) induisent une condensation de la chromatine de telle sorte qu'ils empêchent les E2Fs d'atteindre les régions promotrices de leurs gènes cibles. Au cours de la transition G1/S, principalement lors de la phosphorylation de Cycline D1/Cdk4/6 sur la région C-terminale pRb, l'interaction HDAC/pRb médiée par motif de liaison LxCxE aux domaines *pocket* A et B est rompue, permettant ainsi aux complexes Cycline A/E/Cdk2 de lier les domaines A et B et d'engager la relâche des E2Fs de pRb (Figure 6).

Durant la phase G0/G1, les facteurs transcriptionnels E2Fs répresseurs sont associés à leurs promoteurs respectifs et s'inscrivent en complexe avec p107 et avec p130. L'initiation de la phase G1 engage l'activation des diverses Cdks, ce qui compromet l'association du complexe E2Fs répresseur p107 ou p130. La phosphorylation de pRb par la Cycline D1/Cdk4/6 induit donc un *switch* des E2Fs lié au site de régulation, c'est-à-dire i qu'il se produira dans un premier temps la relâche des complexes répresseurs aux sites de régulation et, dans un deuxième temps, l'association des E2Fs activateurs aux sites transcriptionnels des promoteurs impliqués. La résultante étant la division cellulaire à cause de l'activation des protéines responsables de la progression du cycle, comme les protéines Mcms (qui contrôlent la réplication de l'ADN au niveau de la fourche même) et les Cyclines, dont les fonctions principales sont rattachées à la modulation du cycle cellulaire. Ainsi pRb contrôle la répression de la transcription coordonnée par les E2Fs et ce, par trois voies différentes : 1) pRb bloque l'activité transcriptionnelle des E2Fs simplement par une association directe avec le domaine activateur des E2Fs; 2) le recrutement de pRb au site de

régulation des E2Fs inhibe l'assemblage des complexes d'initiation de la transcription et, par conséquent, bloque l'activité transcriptionnelle des E2Fs, étant situés à proximité de ces complexes initiateurs; 3) pRb interagit avec des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine, ce qui entraîne, lors de sa liaison à cette dernière, un changement conformationnel de celle-ci, bloquant les sites de transcription nécessaires à l'activité des E2Fs. Plusieurs protéines participent à l'activité transcriptionnelle médiée par les E2Fs. La fonction des protéines RB est de moduler l'activité transcriptionnelle des E2Fs pour ainsi contrôler la transcription des gènes impliqués dans la division cellulaire. pRb est également connue pour sa fonction biologique au cours du développement embryonnaire. Des études dans le modèle murin ont démontré que la mutation homozygote de pRb produit un embryon se développant normalement jusqu'à 12 à 13 semaines de gestation, où l'embryon meurt dû à un défaut de l'érythropièse hépatique de même qu'à un problème survenu au cours du développement neural [97]. La génération de souris chimérique $Rb^{-}/p107^{-}$ ou $Rb^{-}/p130^{-}$ a permis d'observer la formation de rétinoblastomes, de tumeurs thyroïdiennes, d'ostéosarcomes et de lymphosarcomes [98]. L'ablation ou *knock out* des protéines pRb et p53 dans le modèle murin promeut un effet synergique sur la formation de tumeurs en comparaison avec les simples *knock out*, où le double *knock out* mène au développement de cancers du sein et de médulloblastomes [99]. De plus, pRb est impliqué dans la différenciation cellulaire. À l'inverse, l'expression de Cdk4 tend à diminuer au cours de la différenciation des cellules érythroleucémiques murines, où l'augmentation de pRb hypophosphorylé est renversée par la surexpression d'une forme mutée de Cdk4 constitutivement active [100]. De plus, le développement des os est défectueux dans les modèles murins $p107^{-}/p130^{-}$ [99]. En effet, l'absence de ces 2 protéines est responsable d'une augmentation excessive de la prolifération des chondrocytes via le processus d'ossification endochondriale [101]. Les cellules déficientes pour le gène *pRb* ont une phase G1 de courte durée et une phase S allongée, ce qui résulte à des temps de division similaire à des cellules exprimant une forme fonctionnelle de pRb. À l'opposé, dans certaines conditions pathologiques comme le cancer, l'activation de ces protéines est anormalement contrôlée. En effet, dans la majorité des tumeurs, la protéine pRb est

constitutivement inactivée soit par une mutation directe de la protéine ou par un dysfonctionnement des Cdks. p107 est impliquée dans la formation de rétinoblastome. En effet, par le biais de modèles murins, il a été démontré que la mutation hétérozygote de pRb (pRb^{+/-}) n'est pas suffisante pour le développement de tumeurs, alors que l'animal pRb^{+/-}/p107^{-/-} développe une dysplasie de la rétine. Cela démontre que p107 peut également agir comme suppresseur de tumeur [102]. De plus, p130 est faiblement exprimée dans les tumeurs nasopharyngées, incluant une mutation dans la portion C-terminale de la protéine et suggérant également que p130 agit à titre de suppresseur de tumeur pour p130 [103]. Dans les rétinoblastomes, le cancer du poumon à petites cellules et les sarcomes, la fonction de pRb est abrégée et ce, par la présence de mutations chromosomiques [104]. Dans les carcinomes cervicaux, des protéines oncovirales du virus du papillome humain, comme E7, promeut la dégradation de pRb spécifiquement et, par conséquent, élimine pRb des cellules [105].

I.4.4 Les facteurs de transcription E2Fs

Les facteurs de transcriptions E2F s'associent aux promoteurs contenant des sites consensus TTCGCGC, présents notamment sur les gènes *c-myc*, *b-myb*, *Cdc2* et *DHFR* (Dihydrofolate reductase) [106-108]. Les principaux gènes contrôlés par les E2Fs sont *Cycline A*, *D* et *E*, *Mcm5*, *Mcm6* et *PCNA*. On dénombre, chez les mammifères, au moins 7 membres E2Fs et deux sous-familles DP. Les facteurs E2Fs forment des hétérodimères avec les protéines DP1/2. Les E2Fs associent l'ADN de manière dépendante aux DPs. Les membres E2F1 à E2F5 se lient aux membres de famille RB, alors qu'E2F6 et E2F7 assurent leur fonction de manière indépendante à la famille RB. Les E2Fs s'associent avec les domaines *pocket* A et B en plus de posséder un motif LxCxE [109]. Les E2Fs agissent comme activateur ou répresseur de la transcription. En effet, la surexpression de celles-ci a permis de déterminer celles qui ont l'habileté d'activer la transcription ou de permettre le passage des cellules de la phase G0/G1 vers les diverses phases où les E2Fs sont positionnés sur les sites E2F régulateur de la transcription.

I.4.5 La chromatine

La chromatine chez les eucaryotes est composée d'unités structurales que l'on nomme nucléosomes. Les nucléosomes sont formés d'un octamère d'histones enroulés d'une longueur de 147 pb d'ADN, où l'octamère contient deux histones H2A, H2B, H3 et H4 [110]. La structure des histones se résume à une région globulaire, un domaine de repliement de la protéine et une queue N-terminale sortant de l'extérieur du nucléosome.

La chromatine peut se réorganiser en deux structures distinctes, soit l'euchromatine et l'hétérochromatine. Ces deux structures diffèrent par leur état de condensation. En effet, l'euchromatine, contrairement à l'hétérochromatine, est hyperacétylée permettant une conformation ouverte ou active favorisant l'accès aux facteurs de transcription à leur site de régulation transcriptionnelle (promoteur). L'hétérochromatine est hypoacétylée, démontrant une structure compacte et inadéquate à la transcription. Cette condensation de la chromatine a pour effet, en partenariat avec des protéines répressives de l'activité transcriptionnelle, de réprimer l'activation transcriptionnelle. L'hétérochromatine sert fondamentalement à égaliser et à doser les gènes mâles et femelles dans la cellule en réprimant la transcription de nombreux gènes présents sur un des deux chromosomes. Également, les régions d'hétérochromatine se formant à des zones d'ADN répétitives péri-centromériques serviront à la ségrégation égale des chromosomes au cours de la mitose [111].

I.4.6 Les modifications épigénétique des histones

La région N-terminale des histones est souvent modifiée de façon post-traductionnelle, incluant la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et l'ADP-ribosylation [112]. Ces modifications entraînent une restructuration de la chromatine et sont essentielles à l'activation et la répression de la transcription des gènes. Les modifications post-traductionnelles des histones les plus caractérisées sont l'acétylation et la méthylation des histones H3 et H4. Afin de favoriser la transcription, les histones sont acétylées, voire hyperacétylées, ce qui induit un dépliement de la chromatine. Cela permet aussiaux facteurs transcriptionnels d'accéder aux sites régulateurs de la transcription. La

phosphorylation des histones affecte la condensation de la chromatine en altérant les charges. L'histone la mieux caractérisée dans la modification par phosphorylation est H2AX [113]. La phosphorylation de H2AX survient principalement en réponse d'un dommage à l'ADN, où cet événement exerce un rôle dans la réparation des cassures de l'ADN double-brins [114, 115]. La méthylation des histones est également impliquée dans le processus de réparation de l'ADN. En effet, l'induction d'un dommage à l'ADN chez la levure, par exemple par radiation ionisante, promeut la formation de foci nucléaires représentant les sites de réparation de l'ADN. Ces sites contiennent des H4meK20 et recrutent Crb2, responsable de l'activation du point de contrôle G2/M [116, 117]. La phosphorylation des histones promeut le recrutement des 14-3-3, impliquées autant dans des processus d'ordre prolifératifs que dans ceux associés à la polarité cellulaire [118]. De plus, la phosphorylation de H3S10 a été rapportée comme un événement moléculaire modulant l'activation des gènes contrôlés par NFκB, de même que les gènes *c-fos* et *c-jun* [119]. La modification des histones est modulée par des enzymes spécifiques. Les classes d'enzymes les mieux caractérisées sont les histones acétyltransférases (HATs) et les histones déacétyltransférases (HDACs) qui favorisent respectivement l'acétylation et la déacétylation. Les HATs HAT1, CBP/ P300, PCAF/GCN5 et TIP60 ciblent des résidus lysine présents dans plusieurs histones. À titre d'exemple, CBP/ P300 assure l'acétylation de l'histone 3 sur K14 et K18; l'histone 4, sur K5 et K8; l'histone 2A, sur K5 et l'histone 2B, sur K12 et K15 [120]. La principale fonction de l'acétylation est la neutralisation de la charge basique de la lysine, ce qui permet ainsi l'accès des facteurs de transcription à leurs promoteurs respectifs. L'hypoacétylation de même que la méthylation des histones rendent la transcription impossible, donnant lieu au phénomène que l'on nomme *gene silencing*. Contrairement à l'acétylation, la méthylation des histones sur les résidus lysine ou arginine ne modifie pas les charges des nucléosomes, mais plutôt la conformation de la chromatine. Cependant, il a été démontré que la méthylation simple ou triple (triméthylation) des lysines 9 ou 27 de l'histone-3 (H3meK9/H3meK27) ou sur la lysine 20 de l'histone 4 (H4meK20) réprime la transcription génique alors que la méthylation sur la lysine 4 de cette même histone (H3meK4) de même que la triméthylation, comme H3K4, H3K6 et

H3K79, n'adopte pas un profil de répresseur transcriptionnel. L'ajout ou le retrait des groupements méthyles sur les histones est un processus régulé par les E2Fs et pRb et ce, dans les régions d'hétérochromatine. Les régions d'hétérochromatine dites constitutives, comme les centromères et les télomères, sont également accompagnées de modifications épigénétiques, incluant le processus post-traductionnel. Au niveau de l'hétérochromatine péricentrique (relative aux centromères), la tri-méthylation de H3meK9 et H4meK20 par les histones méthyltransférases Suv39H1 et Suv39H2 (pour H3meK9) ainsi que Suv420H1/2 (pour H4meK20) permettent la création d'un site de liaison pour HP1. Ce dernier qui assure un réarrangement de l'ADN en hétérochromatine [112, 121-123]. De la même façon que les centromères, les régions télomériques sont isolées au sein de l'hétérochromatine par un processus de triméthylation et de recrutement de protéines modifiant la structure de l'ADN, incluant l'histone méthyltransférase Suv39H1 et HP1, respectivement. La formation de régions riches en hétérochromatine est nécessaire pour la fonction des centromères et des télomères. En effet, la génération du modèle *Suv39H1^{-/-}/Suv39H2^{-/-}* a permis d'observer que la diminution de la méthylation des histones déclenche une dysfonction dans les programmes d'élongation des télomères et de la ségrégation chromosomique [124]. Le groupe de Narita et al a démontré par des essais d'immunoprécipitation de la chromatine que pRb est absente dans des conditions physiologiques de prolifération et de quiescence aux sites de régulation des E2Fs tels que la Cycline A [125]. En effet, c'est seulement lors de l'induction de la sénescence que pRb associe le promoteur de la Cycline A. De plus, dans les mêmes conditions physiologiques, on retrouve HP1 γ et la H3meK9, toutes deux recrutées aux mêmes sites de régulation des E2Fs, autrement dit spécifiquement dans les régions d'hétérochromatine.

La découverte récente des familles de déméthylases à domaine LSD1 et JmjC a permis l'identification de nouvelles cibles moléculaires antagonistes spécifiques des histones méthylées, soit une modification épigénétique hautement détectée dans les cancers. LSD1 possède un domaine déméthylase LSD1 et déméthyle H3K4 afin de supprimer la transcription [126]. Une seconde famille de déméthylase incluant 7 membres possédant un domaine déméthylase JmjC assure la démétylation de H3K9 [127-132]. De plus, il semble

que ces déméthylases démontrent un profil de sélectivité relative aux lysines mono-, di- ou tri-méthylées [133].

I.4.7 L'activation des voies ATM/ATR

Le dommage à l'ADN déclenche dans les cellules normales des processus de réparation de l'ADN directement, de survie et d'apoptose. L'induction du dommage à l'ADN déclenche l'activation des kinases ATM et ATR. C'est alors que ces dernières phosphorylent Chk1, qui inactive les phosphatases de type Cdc25 induisant l'arrêt du cycle en phase G2 [134]. En parallèle, l'activation d'ATM et ATR promeut la phosphorylation directement de p53 sur le résidu Ser15 ou via l'activation de Chk1 et/ou Chk2. C'est là que ces kinases phosphorylent la forme tétramérique de p53 sur Thr18 et Ser20 et ainsi augmentent l'expression de p21^{CIP/WAF1}, 14-3-3 σ et GADD45. D'ailleurs, ces trois protéines assurent alors principalement l'arrêt en G2 [135]. La CKI p21^{CIP/WAF1} promeut l'arrêt en phase G2 en interagissant et en bloquant le complexe Cycline B1/Cdk1 pour ainsi inhiber l'activation de la Cdk1 médiée par CAK [136, 137]. La fonction de 14-3-3 σ demeure obscure, mais il semble que cette dernière induit la séquestration du complexe Cycline B1/Cdk1 dans le cytoplasme, avortant la fonction du complexe. GADD45 s'associe avec la Cdk1, unie au complexe Cycline B1/Cdk1, engageant la rupture du complexe et par conséquent, sa fonction. L'activation préférentielle de Chk1 ou Chk2 dans la voie ATM/ATR n'est pas clairement définie. Une récente hypothèse suggère que d'autres protéines (non définies) soient responsables de l'activation allostérique de ces deux kinases [138]. De plus, l'ubiquitine ligase MDM2 est également la cible de la voie ATM/ATR, où cette dernière assure la stabilité de p53 dans la cellule [139, 140]. Donc la régulation négative de MDM2 et p53 contribue à la stabilisation et à l'accumulation de la protéine de même qu'à son activité transcriptionnelle en partenariat avec p300. L'induction de l'accumulation de p21^{CIP/WAF1} par le dommage à l'ADN promeut l'arrêt de la phase G1/S de manière dépendante au complexe Cycline E/Cdk2 et affecte également l'état d'activation de pRb. Cela se produit via l'inhibition du complexe Cycline D1/Cdk4/6. Contrairement aux phases G1 et G2/M, l'arrêt de la phase S est notamment de courte durée,

lors d'une exposition à des facteurs génotoxiques et demeure complètement indépendant de l'activité de p53 [140]. Le seul mécanisme correctement défini impliqué dans l'arrêt de la phase S, voire intra-S, est la voie signalétique ATM/ATR/Chk1/Chk2/Cdc25/Cycline E/A-Cdk2/Cdc45, une cascade en fonction lors de la phase G1.

I.4.8 La sénescence

La sénescence cellulaire a été mise en évidence par le groupe de Hayflick comme un processus limitant la prolifération des cellules humaines en culture [141]. Brièvement, il a été démontré qu'au fil des divisions cellulaires, les fibroblastes humains perdent de leur capacité à proliférer par l'absence de la télomérase. Cela entraîne un dysfonctionnement télomérique et l'arrêt du cycle cellulaire. La sénescence se distingue principalement de la quiescence par l'arrêt de croissance irréversible. Plusieurs types de stress peuvent induire la sénescence. Premièrement, le stress peut être de type intrinsèque. En effet, la sénescence peut résulter de raccourcissements des télomères, d'une dysfonction télomérique, d'une instabilité chromosomique, d'une mutation endogène oncogénique et/ou d'une dysfonction de la machinerie moléculaire impliquée dans le dommage à l'ADN. Deuxièmement, la sénescence peut être déclenchée suite à l'exposition à des stress extrinsèques. Par exemple, dans l'environnement tissulaire, les cellules peuvent être exposées à des signaux mitogéniques, à des facteurs de croissance et/ ou pro-inflammatoires (IL-6, TGF β) de même qu'à des radiations (rayons-X, ultra-violets) [142, 143]. L'entrée des cellules en sénescence suite à l'exposition à un ou plusieurs stress cellulaires, est médiée par l'axe ou les axes p16^{INK4a}/ pRb et/ou p14^{ARF}/p53. L'état de sénescence verrouille la cellule par l'arrêt du cycle cellulaire, protégeant cette dernière des dommages cellulaires pouvant survenir dans les cellules filles suivant la division cellulaire [144]. Initialement, l'état de sénescence fut déterminé biochimiquement par la mesure de l'activité de la bêta-galactosidase, où cette enzyme lysosomale est hautement présente dans les cellules sénescents [145]. De plus, les cellules sénescents présentent une morphologie aplatie et la formation de régions riches en hétérochromatine. Au niveau moléculaire, la sénescence est principalement induite par les protéines pRb et p53. Récemment, il a été montré que les

cellules sénescents associées à un phénotype sécrétoire (SASP, *Senescence-Associated Secretory Phenotype*) sécrètent plusieurs facteurs pro-inflammatoires et pro-invasifs. En effet, les travaux de Coppé et ses collègues ont démontré que des fibroblastes et des cellules épithéliales humaines en état de sénescence ont la capacité de sécréter des interleukines, des cytokines pro-inflammatoires, des facteurs de croissance et des MMPs. Tous ces facteurs affectent évidemment les cellules adjacentes [146]. Ainsi les cellules sénescents ont le potentiel de modifier le microenvironnement tissulaire. La sénescence est considérée comme un processus suppresseur de la formation des tumeurs. Le caractère irréversible de l'arrêt de croissance associé à la sénescence est induit par pRb. pRb module la méthylation des histones par son interaction avec SUV39H1, une histone méthyltransférase. SUV39H1 est hautement caractérisée pour son habileté à ajouter des groupements méthyles sur la lysine 9 de l'histone-3. Cette méthylation génère des sites d'affinité pour les protéines associant la chromatine comme les HP1. Celles-ci sont garnies d'un domaine de liaison à la chromatine (chromodomaine). La méthylation des histones H3meK9 et le recrutement de HP1- γ permet la réorganisation de l'euchromatine en hétérochromatine. En complexe avec H3meK9/pRb/HP1- γ , les E2Fs sont incapable d'activer la transcription des promoteurs cibles comme la Cycline E. Dans cette conformation, la chromatine devient résistante aux nucléases. L'hétérochromatine associée à la sénescence est aussi appelée SAHF (*Senescence Associated Heterochromatin Foci*). Les SAHFs diffèrent de l'hétérochromatine constitutive, mais sont plutôt exclusifs aux cellules sénescents. En effet, les SAHFs ne contiennent pas de marqueurs de la chromatine condensée détectée par exemple lors de la mitose ou de l'apoptose, comme H3S10P (Histone 3 phosphorylée sur S10), H2B14P et H3S28P [147, 148]. Les SAHFs sont riches en macroH2A et en protéines HMGA, importantes dans l'interruption de l'expression des gènes ou *gene silencing*, et dans la suppression de tumeur respectivement [149]. Cette restructuration de la chromatine inhibe la transcription des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire et ce, malgré un stimulus mitogénique.

I.4.8.1 L'implication pathologique de la sénescence

Au cours de la dernière décennie, la caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction de la sénescence a permis le développement d'approches par thérapie génique afin de moduler le programme de sénescence dans certaines pathologies. Par exemple, dans l'arthrite rhumatoïde, le tissu synovial est affecté par une augmentation de la prolifération résultant en la destruction du cartilage et des os. Des cellules synoviales dérivées d'un tissu synovial hypertrophique expriment de haut niveau de p16^{INK4a} lorsque la prolifération est inhibée. Ainsi l'ajout de p16^{INK4a} dans un modèle murin d'arthrite rhumatoïde permet de bloquer le développement de la pathologie [150]. De plus, le SASP est associé à l'initiation de la formation des tumeurs de cancer du sein. En effet, les MMPs sécrétées par les fibroblastes sénescents présents dans le microenvironnement tumoral sont responsables du potentiel tumorigénique des xéno greffes de cellules épithéliales mammaires chez la souris [151]. Par ailleurs, la régulation à la hausse de l'expression de CXCR4 des cellules tumorales de la prostate est causée par la sécrétion de SDF1 par les cellules stromales sénescents présentes dans le microenvironnement [152]. Les traitements par radiothérapie et par chimiothérapie, induisent, par leurs effets génotoxiques, la sénescence. Cela explique les rechutes de cancers accompagnés de cellules tumorales aux caractéristiques inflammatoires (phénotype de sécrétion associé à la sénescence) [146]. Également, dans le cancer du sein, des hauts niveaux d'IL6 et IL8 sécrétés par les fibroblastes sénescents sont responsables de l'augmentation du phénotype d'invasion des carcinomes mammaires [146].

I.5 : La transition épithéliale-mésenchymateuse

La transition épithéliale-mésenchymateuse ou EMT est un processus biologique par lequel les cellules épithéliales subissent une perte de leur polarité, ce qui entraîne un changement morphologique de type mésenchymateux ou fibroblastoïde. Cette phase de transition est à la base nécessaire à l'organogenèse lors du développement embryonnaire et au remodelage tissulaire, notamment lors d'un processus de réparation des tissus. Ainsi une mauvaise régulation de l'EMT peut déclencher des processus pathologiques tels que la formation de

fibroses et de cancers. Cela va même jusqu'à augmenter le caractère invasif de ces derniers. Tel qu'illustré à la figure 7, l'EMT débute par une perte de la polarité apico-basale des cellules épithéliales dû à une dislocation des jonctions dites serrées. De plus, d'autres composantes, comme les jonctions GAP et les points d'adhérence, se désassemblent peu à peu, ce qui engendre une restructuration de la membrane basale. Ainsi, les protéines de surfaces qui médient les interactions intercellulaires, telles que la Cadhérine-E et les intégrines, seront remplacées par d'autres composantes comme la Cadhérine-N, préparant ainsi la cellule pour la transformation mésenchymateuse. Le cytosquelette d'actine se réorganise de la sorte que l'actine en périphérie sera remplacée par les fibres de stress et les filaments de cytokératines, par la Vimentine. Cette dernière est à ce moment distribuée en périphérie du noyau.

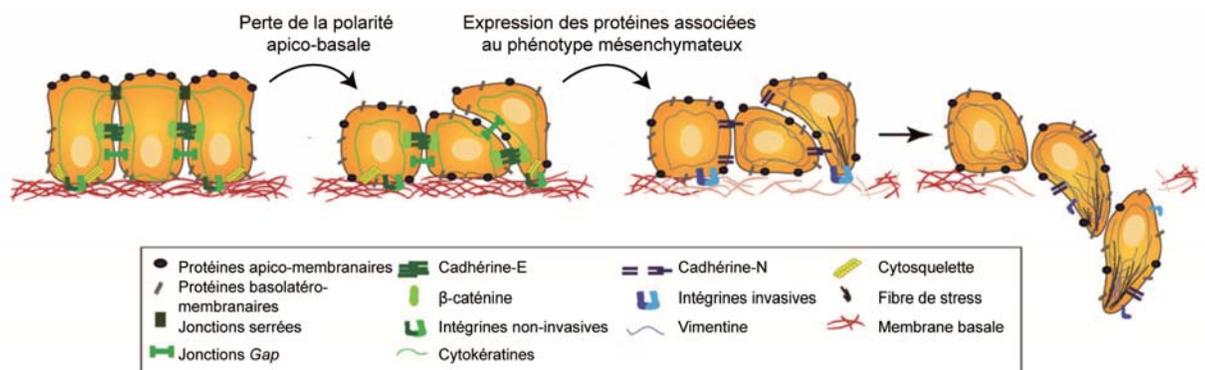


Figure 7: Les bases de la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT).

Au cours de l'EMT, les cellules épithéliales perdent leur polarité apico-basale et adopte une morphologie de type mésenchymateuse. Ce changement de phénotype est la résultante d'un désassemblage des jonctions d'adhésion et gap. Ce phénomène est principalement causé par le remplacement des marqueurs épithéliaux par les marqueurs mésenchymateux. En effet, les protéines impliquées dans le phénotype épithélial comme la Cadhérine-E, les cytokératines et les intégrines épithéliales sont changées pour de la Cadhérine-N, de la Vimentine et des intégrines mésenchymateuses respectivement. De plus, la membrane basale est progressivement dégradée permettant aux cellules d'envahir le microenvironnement tissulaire (*Adaptée de Micalizzi et al., 2010 [52]*).

I.5.1 La Cadhérine-E

La principale protéine impliquée dans la formation des jonctions adhérentes est la Cadhérine-E. Les cadhérines classiques représentent une famille de molécules d'adhésion qui servent à la formation de jonctions intercellulaires [153, 154]. La classification selon Nollet et ses collègues [155] divise les cadhérines en 5 sous-familles. Les 4 groupes principaux sont les cadhérines classique (type I), les atypiques (type II), les desmogléines et les desmoculines. Le cinquième groupe est représenté par un seul membre, soit la Cadhérine-BS. Les types I et II sont impliquées dans le maintien des jonctions adhérentes. Cette famille inclut environ 19 membres de cadhérines classiques regroupés en 4 classes : N-cad, P-cad, E-cad et R-cad [156]. La région cytoplasmique hautement conservée en C-terminal interagit avec les caténines [157]. Ces dernières sont d'ailleurs associées au cytosquelette d'actine. La portion extracellulaire (EC) des cadhérines est constituée de 5 régions répétées (EC1-EC5) qui sont unies par la présence du calcium [158]. Le motif EC le plus éloigné est nécessaire à la liaison homophile des cadhérines [159, 160]. Ce même motif EC contient une séquence tripeptidique (HAV) qui est impliquée dans la formation de dimère de cadhérines. Enfin, les cadhérines sont pourvues d'un domaine à 1 passage transmembranaire [161]. Fondamentalement, les cadhérines sont connues pour leurs rôles dans la reconnaissance cellulaire et l'adhésion au cours du développement embryonnaire [154, 162]. Faisant partie de la famille des Cadhérines, la Cadhérine-E est une glycoprotéine de surface à un seul domaine transmembranaire pouvant s'associer d'une manière dépendante au calcium avec d'autres Cadhérine-E présentées sur les cellules voisines et ce, par liaison homophile. À la base, les interactions cellules-cellules médiées par la Cadhérine-E modulent la réorganisation du cytosquelette d'actine. Le complexe Cadhérine-E/ α -caténine/ β -caténine n'interagit pas directement avec les filaments d'actine. En effet, il a été rapporté que la Cadhérine-E se relocalise dans les points de jonctions adhérents, un processus modulé par la protéine Épline s'associe avec l'actine. Le domaine juxtamembranaire de la Cadhérine-E sert de site d'interaction pour la p120-caténine. Cette dernière assure la stabilité d'interaction des jonctions d'adhésion entre les cellules épithéliales. De plus, p120-caténine régule négativement l'activité des GTPases

RhoA, Rac1 et Cdc42 de la même façon qu'une RhoGDI. L'endocytose de la Cadhérine-E constitue un processus crucial dans sa dégradation. Toutefois, des modifications post-traductionnelles, comme la O-glycosylation, bloquera la maturation de la Cadhérine-E vers la membrane [163]. Or, en situation où elle est synthétisée de *novo* ou recyclée vers la membrane plasmique, celle-ci peut subir deux types de clivages protéolytiques, soit dans la portion extracellulaire ou intracellulaire. La portion extracellulaire peut être clivée par la MMP3 libérant dans le milieu extracellulaire un fragment libre de la Cadhérine-E. Par contre, la fonction de ce fragment reste à déterminer [164]. La portion intracellulaire est clivée par la sécrétase- γ qui engendre la formation d'un segment CTF2. Ce dernier sera relâché dans le cytoplasme de la cellule et transporté par p120-caténine afin d'interagir avec le facteur transcriptionnel Kaiso. Le processus d'endocytose, incluant le recyclage à la membrane plasmique, reste encore à être élucidé. Cependant, le modèle classique suggère que, suite à la formation du complexe Cadhérine-E/p120-caténine/ β -caténine, la stimulation d'un RTK ou Src promeut la phosphorylation de la β -caténine [164] et de la queue cytoplasmique de la Cadhérine-E [165]; le recrutement de la ligase E3 Hakai à la Cadhérine-E et la perte de contact entre la Cadhérine et le cytosquelette d'actine de même que le désassemblage de la jonction adhérente [166]. En effet, la ligase β -caténine E3 Hakai favorise la polyubiquitination β -caténine, ce qui entraîne indubitablement sa dégradation au protéasome via la sous-unité 26S. De plus, Hakai assure le transfert d'ubiquitine sur la Cadhérine-E, ce qui n'engendre pas de dégradation de manière constitutive, mais plutôt l'internalisation de celle-ci. Aussi, la désubiquitination par Dubs, via le clivage des chaînes d'ubiquitine, déclenche le recyclage de la Cadhérine-E à la membrane [166]. Le complexe Cadhérine-E/Hakai est internalisé dans les vésicules tapissées de puits de clathrine [165]. Ce processus d'internalisation est rapide et est suivi de la dislocation des clathrines formant l'enrobage des vésicules. Par la suite, ces vésicules fusionnent avec les compartiments endosomaux, notamment par l'intermédiaire des GTPases Rab5 et Rab7 [166]. Ensuite, la Cadhérine-E est dégradée ou non vers les lysosomes. Le recyclage de la Cadhérine-E vers la surface de la cellule semble être régulé par Rab11 [166]. En plus d'internaliser par la voie des clathrines, la Cadhérine-E emprunte

également la voie des caveolae et des phagosomes (vésicules enrobées d'actine), où ces deux voies partagent le même mécanisme d'endocytose des vésicules enrobées de clathrines. En conclusion, l'endocytose et le recyclage à la membrane plasmique de la Cadhérine-E constituent des événements moléculaires nécessaires au maintien ainsi qu'à la dynamique de l'assemblage et du désassemblage des jonctions adhérentes.

I.5.2 La Cadhérine-N

L'un des événements caractéristiques de l'EMT est le remplacement de la Cadhérine-E par la Cadhérine-N. Cette dernière exerce également la fonction de pont moléculaire entre les cellules. La Cadhérine-N interagit avec les RTKs, comme le FGFR, en activant les voies de signalisation classique telles que la PLC- γ , la PI3Kinase et les MAPKinases. De manière similaire à la Cadhérine-E, la Cadhérine-N subit un clivage protéolytique de son domaine extracellulaire, ce qui a pour conséquence de bloquer les interactions Cadhérine/Cadhérine entre les cellules. De plus, la portion cytoplasmique de la Cadhérine-N sert également de substrat pour la sécrétase- γ . Ce segment clivé par cette protéase est dirigé vers le noyau et bloque l'activité transcriptionnelle des protéines associées à CREB [167]. Par ailleurs, la Cadhérine-N, exprimée lors de la phase mésenchymateuse, est également internalisée par la voie des clathrines et des caveolae.

I.5.4 Les facteurs répresseurs de la transcription de la Cadhérine-E

Les facteurs de transcription contrôlant l'expression à la baisse de la Cadhérine-E, soit Snail, Slug et Twist, constituent des composantes de la voie signalétique impliquée dans l'activation de l'EMT. En effet, ces facteurs répriment l'expression de la Cadhérine-E, notamment par la reconnaissance du motif E-box présent dans la structure de la Cadhérine-E. Mise à part l'activation de la voie Wnt/ β -caténine, l'ajout seul d'EGF peut induire l'activation de Snail alors que l'activation du récepteur TGF- β peut induire l'activation de Snail et Slug [168]. Lors d'un mécanisme peu caractérisé, seulement un environnement hypoxique permet l'induction de l'activation de Snail, Slug et Twist. L'une

des voies signalétiques importantes dans le programme d'EMT est la voie TGF- β . TGF- β est une cytokine qui interagit spécifiquement avec les récepteurs TGF- β de type I et de type II. L'activation de ces RTKs promeut l'activation des protéines Smad2/3. Par l'intermédiaire de Smad4, le complexe Smad2/3/4 transloque dans le noyau et réprime l'expression de la Cadhérine-E via l'activation du facteur de transcription Twist. De plus, TGF- β active d'autres protéines effectrices de manière indépendante aux Smads, telles que Par6, NF- κ B, ILK, FAK, Src, RhoA, Rac-1 et Cdc-42 afin de permettre non seulement l'activation de Stat3, mais aussi de contrôler ultimement l'EMT, notamment en médiant la répression de la Cadhérine-E via l'activation de Snail [53].

I.6 : La migration

La migration cellulaire est un événement biologique nécessaire au développement tissulaire et au processus de transmigration des cellules immunitaires [169, 170]. De plus, la migration peut également s'inscrire dans un contexte pathologique. Par exemple, les cellules tumorales utilisent grandement le processus de migration lors de la formation des métastases [171]. La migration peut être conceptualisée sous forme de processus cyclique et divisée en 5 étapes (Figure 8). 1) La migration est initiée par la détection de facteurs chimiotactiques tels que des facteurs de croissance et des chimiokines, ce qui permet la polarisation de la cellule via Cdc42 en collaboration avec le complexe Par3/Par6/PKC α . D'autres protéines, comme les microtubules, et la localisation du MTOC et du Golgi favorisent également la génération de la polarité cellulaire. Suivant une stimulation par un agent chimiotactique, le PI(4,5)P₃ est synthétisé au front de la cellule, alors que PTEN est distribuée à l'arrière de la cellule. 2) Par la suite, la cellule produit une extension du cytosquelette d'actine ou protrusion via l'activation de Rac et Cdc42 qui active à son tour les complexes WASP/WAVE/ARP2/3. La polymérisation d'actine est contrôlée par plusieurs protéines contrôlant la polymérisation et la dépolymérisation des filaments. 3) Les protrusions sont stabilisées par la formation des points d'adhésion qui s'étendent de l'avant jusqu'à l'arrière du corps cellulaire. L'adhésion est principalement induite par l'activation des intégrines et le recrutement des composantes nécessaires à l'adhésion de la cellule. 4)

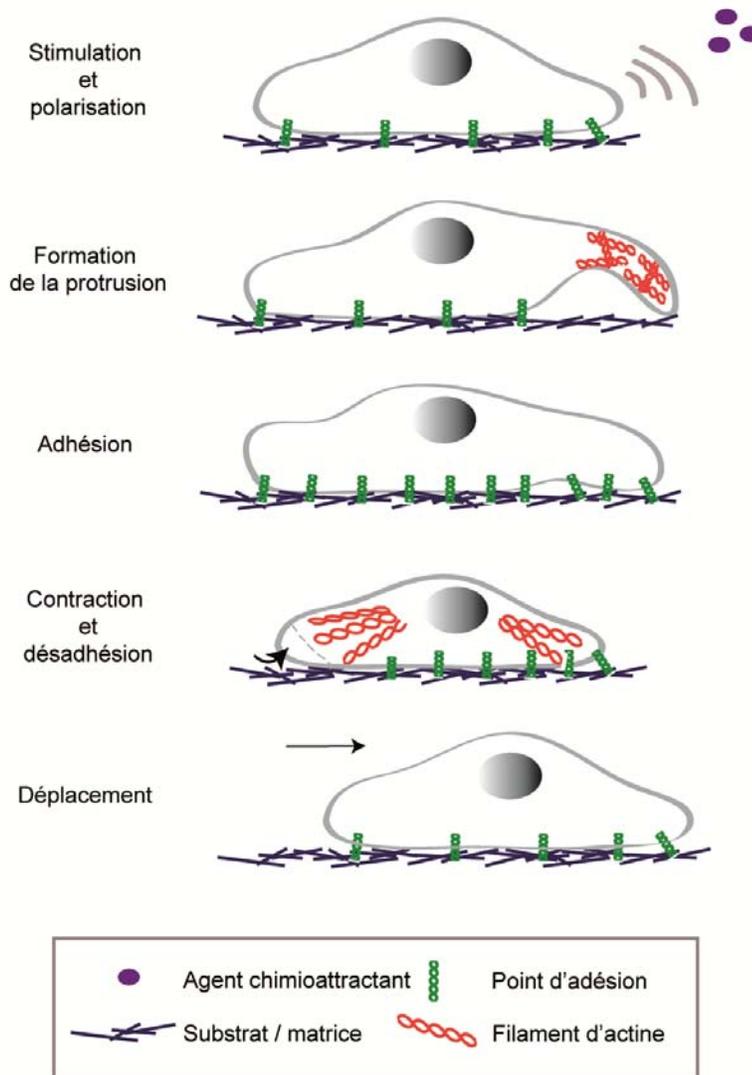


Figure 8: Représentation schématique du cycle de la migration cellulaire.

Lorsque la cellule détecte la présence d'un stimulus, celle-ci se **polarise** et génère la formation d'une **protrusion** à l'avant de la cellule. Par la suite, la cellule formera plusieurs **points d'adhésion** partant de l'avant jusqu'à l'arrière du corps cellulaire. Ensemble, la génération d'une **force de traction (contraction)** et le **désassemblage des points d'adhésion (désadhésion)** (flèche noire) à l'arrière induira le **déplacement** de la cellule en direction de l'agent chimioattractant (*Inspirée de Ridley et al., 2003*)[172].

Afin de faciliter son déplacement, la cellule se contractera préférentiellement à l'arrière afin de générer une force de traction où se déroule, en parallèle, le désassemblage des points d'adhésion. 5) Dès que les points d'adhésion sont relâchés, la force de traction générée permet à la cellule d'avancer. À ce moment, en simultané, s'effectue le recyclage des protéines d'adhésion [172].

I.6.1 Les bases moléculaires de la migration

La capacité de la cellule à se déplacer est dépendante de la réorganisation de son cytosquelette d'actine. Sous la coordination des GTPases Rho, le cytosquelette formera des extensions des filaments d'actine à l'avant de la cellule, aux bordures latérales et à l'arrière, où se générera des forces de contraction. L'orientation de la cellule est contrôlée par la polarité induite selon un gradient de concentration d'un chimioattractant présent dans le milieu entourant la cellule. La polarité de la cellule est modulée par Cdc42 et PTEN qui sont distribuées à l'avant et à l'arrière de la cellule respectivement. La polarité cellulaire présentée ici diffère de la polarité apico-basale observée dans les cellules épithéliales.

À l'avant de la cellule, Rac1 agira de concert avec le complexe WAVE/ARP2/3 en réorganisant le cytosquelette d'actine en une structure qu'on nomme lamellipode. Comme pour le maintien de la stabilité des jonctions adhérentes, la forme Rac1-GTP assure le processus de formation de lamellipodes au front cellulaire. Ce processus dépendant de la génération de PIP₃ est modulée à la baisse sur les bordures latérales et à l'arrière de la cellule par PTEN [173]. L'orientation de la cellule sera régie par Cdc42, qui est également impliquée dans la formation d'une seconde structure extensive de l'actine, soit les filipodes. L'inactivation de Rho chez les macrophages induit une désorientation de ceux-ci [174]. À l'arrière de la cellule, l'activation de RhoA induira la formation des fibres de stress produisant une force de contraction servant de propulseur à la cellule. Leurs fonctions réunies, les trois GTPases Rac1, Cdc42 et RhoA, assurent la réorganisation du cytosquelette d'actine et ce, par la régulation des composantes de l'actine même [175].

I.6.2 La polarisation

La première étape qui déclenche le processus de migration est tout d'abord la réponse cellulaire en fonction d'un agent promoteur de migration pouvant être de nature chimioattractante. La cellule se polarise et il se forme à l'avant de la cellule une protrusion orientée en direction de l'agent pro-migratoire. L'extrémité de la protrusion sera stabilisée par un point d'adhésion sur une matrice extracellulaire ou via une interaction avec une cellule voisine qui se liera à l'autre cellule par l'intermédiaire d'un récepteur transmembranaire. C'est ce qui est observable chez les cadhérines et les intégrines qui traversent la membrane plasmique pour s'attacher au cytosquelette de l'autre cellule. Ces structures d'adhésion ont pour office de servir de point de traction à la cellule lors de son déplacement vers l'avant où ces points d'adhérence se désassembleront à l'arrière de la cellule. Les constituants de la structure protusive sont formés par la dynamique de polymérisation et de dépolymérisation des filaments d'actine. Les filaments d'actine sont dits polarisés puisqu'ils possèdent une extrémité à croissance rapide (+) ou *barbed-end* et une extrémité à croissance lente (-) ou *pointed-end*. La polarité de la cellule est un processus contrôlé par le complexe Par3/Par6/PKC via Cdc42 (Figure 9) de même que par le complexe MTOC. Le MTOC est principalement constitué de microtubules polarisés, partant habituellement du centrosome vers la membrane plasmique. La polarité des microtubules est assurée par deux protéines effectrices de Rac, soit IQGAP et PAK. IQGAP permet à CLIP-170 d'interagir avec Rac afin de stabiliser l'extrémité *barbed end* (+) des microtubules tandis que PAK semble inhiber l'activation des membres Op18/Stahmine, bloquant ultimement le désassemblage des microtubules [176, 177]. Cependant, Cdc42 contrôle la relocalisation du MTOC devant le noyau et ce, près du front migratoire. Il semble que le MTOC permet non seulement la formation de microtubules au sein de la structure du lamellipode, mais sert également à contrôler le transport golgien afin d'assurer le transport des vésicules contenant des protéines membranaires participants à l'orientation de la protrusion. En postérieur comme en antérieur de la cellule, les microtubules sont responsables du désassemblage de l'adhésion [178] et ce, par le relâchement des tensions présentes aux points de contacts. Les microtubules contrôlent

également l'activité et la localisation de kinase Arg. Dès qu'elle est active, Arg inhibe l'activité de RhoA et de la RhoGAP p190RhoGAP [179]. La localisation des RhoGEFs Lfc et H1 sur les microtubules, à l'arrière de la cellule, contribue à l'activation de Rho lorsque ceux-ci se dépolymérisent [180-182]. La polarité est également instaurée par la voie PI3Kinase. En effet, les phospholipides PIP₂ et PIP₃ deviennent polarisés en présence d'un agent chimioattractant et activent la polarisation de même que la formation des lamellipodes en modulant l'activité des GEFs et des GAPs associées aux GTPases Rho (Figure 9). Des études effectuées avec le modèle de *Dictyostelium* rapportent que la PI3Kinase se retrouve au front de migration tandis que PTEN se redistribue à l'arrière et sur les faces latérales de la cellule [173, 183]. L'absence de PI3Kinase ou PTEN n'empêche pas la capacité de la cellule à migrer, mais bloquera par contre l'habileté de cette dernière à s'orienter, malgré la présence d'un gradient chimioattractant. L'actine peut se réorganiser selon le type de protusion, soit en forme d'embranchement de type dendritique (lamellipodes) et en forme de fibres organisées de manière parallèle (filopodes). Le complexe protéique ARP2/3 joue un rôle crucial dans la croissance des filaments d'actine puisqu'il assure la formation de filaments d'actine « fille » à partir du filament « mère ». Ainsi l'apparence d'un embranchement est le reflet de l'activité de ce complexe. La distribution d'ARP2/3 est modulée par les membres WASP/WAVE, une cible de Rac et Cdc42.

D'autres protéines assurent la dynamique du cytosquelette d'actine lors de la formation de protusion. Par exemple, la cortactine stabilise les branches d'actine tandis que la filamine A et l' α -actinine stabilise tout le réseau d'actine en permettant une inter-liaison des filaments.

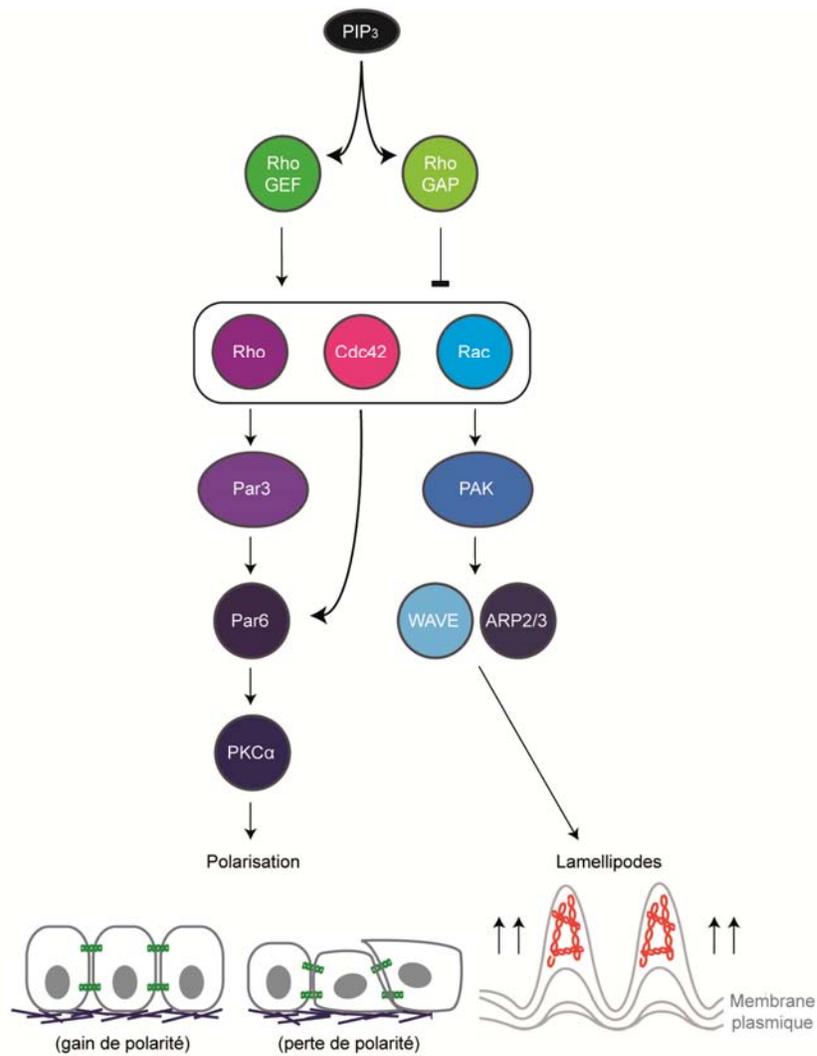


Figure 9: La signalisation des GTPases de type Rho dans la migration.

L'activation des Rho GEFs et Rho GAP par le PIP₃ induit l'activation ou l'inactivation de Rho, Rac et Cdc42. L'activation de ces GTPases promeut la migration cellulaire en modulant la formation de lamellipodes via l'axe signalétique PAK/WAVE/ARP2/3 et/ou la polarité via les protéines Par3/Par6/PKCα. (*Adaptée de Robert J. Cain and Anne J. Ridley, 2009*)[47].

La formation de filopodes implique une phase d'élongation des filaments d'actine plutôt qu'une nucléation d'embranchement de part la structure élongée. Les membres Ena/VASP assureront l'élongation continue de filopodes en agissant comme antagoniste aux extrémités (+) *barbed-end* sur la formation d'embranchement et de coiffe (*capping*). La formation de protusion est un processus qui doit être maintenu afin de permettre le mouvement de la cellule. Plusieurs boucles de rétroaction positive impliquant Rac assurent cet équilibre. De récentes études démontrent que Rac peut lui-même contrôler le recrutement de la PI3Kinase à la membrane plasmique et son activation. La génération de PIP₃ par la PI3Kinase sert de substrat aux RacGEFs sensibles aux PIP₃ pour ainsi ultimement activer la Rac [184, 185].

De plus, la formation de microtubules semble favoriser l'activation de Rac1 alors que Rac1 assure la stabilité microtubulaire. Enfin, l'activation des intégrines déclenchera l'activation de Rac1 aux points d'adhérences et également l'acheminement de la GTPase à la membrane plasmique. L'activation de Rac1 induit le regroupement de plusieurs intégrines au front migratoire afin de former le point d'adhérence servant de traction à l'avant de la cellule.

I.6.3 L'adhésion

L'un des événements importants dans l'initiation de la migration cellulaire est le maintien de l'adhérence entre le substrat et la cellule. L'assemblage et le désassemblage des points d'adhésion focaux est régie par plusieurs voies signalétiques et tensions mécano-moléculaires amenées par l'attachement à la matrice par l'intermédiaire de protéines transmembranaires qui assurent un lien physique entre le cytosquelette de la cellule et la matrice extracellulaire.

I.6.3.1 La formation des points d'adhérence

Le premier événement nécessaire à la formation de point d'adhésion est la formation de points d'adhésion primordiaux. Ces structures prennent naissance en fonction

de l'activation du complexe ARP2/3. Ces structures d'adhésion sont riches en plusieurs protéines dont l' α -actinine, la taline, la Paxiline et la ou le FAK. Les points d'adhésion primordiaux mûriront en complexes focaux et ce, en fonction du maintien de la structure du front migratoire. Il faut mentionner que le tout se fera de manière dépendante à Myosine II et sa fonction dans la contractilité des filaments d'actine. Les mécanismes de nucléation des points d'adhésion primordiaux demeurent encore à l'étude. Toutefois, deux hypothèses suggèrent que 1) la formation de ces points dépendrait de la liaison des récepteurs aux intégrines à leurs ligands présentés sur la matrice extracellulaire ou 2) la polymérisation de l'actine, incluant l'actine dendritique en guise de gabarit sert pour la nucléation des points d'adhésion. L'action de la Myosine II exerce une tension et perturbe la formation de complexe d'adhésion. La taline agit comme un partenaire d'interaction avec l'actine en formant des homodimères antiparallèles. La Taline interagit avec la sous-unité β via son domaine *FERM/protein-4.1/ezrin/radixin/moesin* [186]. De plus, en associant les filaments d'actine et les intégrines, la taline transmet une réponse mécanique du cytosquelette d'actine vers la matrice due à la tension générée par la contraction des filaments d'actine via l'activation de la Myosine II. Cette force de tension générée est donc distribuée par la présence de la taline et ainsi module l'adhérence de la cellule sur le substrat. La Taline est modulée négativement par la protéase à activité dépendante calcique Calpaïne. En effet, cette dernière promeut d'emblée le désassemblage des complexes d'adhésion en ciblant spécifiquement la Taline et la sous-unité $\beta 3$ des intégrines [186, 187].

L'activité de la Myosine II est régulée par phosphorylation sur la chaîne légère régulatrice aux résidus Thr18 et Ser19, incluant d'autres sites régulateurs localisés dans la chaîne lourde [188]. Il faut noter que l'activité de la Myosine IIA et IIB contrôle la rétraction et la dynamique d'assemblage/désassemblage des points d'adhésion et ce, conjointement avec l' α -actinine qui entrecroise les brins des myosines à l'arrière de la cellule [188]. Cependant, seulement la Myosine IIA peut moduler le *turnover* de la formation des points d'adhésion via les filaments d'actine et de l' α -actinine au front migratoire. De plus, la Vinculine sert de pont entre l'actine et la taline. Cette force de tension permet entre autres de moduler mécaniquement une protéine où cette dernière

effectuera la transmission signalétique. Par exemple, le récepteur aux intégrines $\alpha 5\beta 1$ change de conformation de manière dépendante à l'activité de la Myosine II. Celle-ci en transmettant des forces de tension dans le cytosquelette d'actine semble activer ce récepteur et induire une transmission signalétique de manière à recruter les composantes du complexe d'adhésion [189].

1.6.3.1.1 Le rôle des protéines régulatrices de l'activation des GTPases Rho dans l'adhésion

La dynamique du cytosquelette d'actine est principalement contrôlée par les GTPases Rho. Ces protéines sont donc directement impliquées dans l'assemblage et le désassemblage des complexes d'adhésion. Comme la fonction de ces GTPases dépend de leur état d'activation, les facteurs d'activation et d'inactivation des GTPases ou Rho-GEF et Rho-GAP constituent également des protéines clés dans la dynamique de l'adhésion. Les Rho-GEF PIXs (*PAK-interacting exchange factor*) sont connues initialement pour interagir ainsi que activer Cdc42 et Rac. Elles sont aussi reconnues pour leur capacité à associer PAK (*p21-activated kinase*). PIX α et PIX β contiennent un domaine DH (DBL homology domain), mais seulement la PIX α possède une activité GEF sur Rac [188, 190]. DOCK180 (*180 kDa protein downstream of CRK*) constitue une RhoGEF pour Rac1 et est connue pour interagir avec p130CAS. La GAP GIT, (*GRK-interactor*) connue pour moduler l'activation des facteurs d'ADP-ribosylation. est également impliquée dans l'adhésion [191]. Les GITs interagissent avec la Paxiline, la PIX, les GRKs (*G protein-coupled receptor kinase*) et FAK [190]. La fonction moléculaire des GITs aux complexes focaux est peu étudiée. Il semblerait que les GITs assurent le pont signalétique entre les ARFs et les intégrines. ARHGAP22 assure l'inactivation de Rac1 notamment aux lamellipodes [192]. P190RhoGAP exerce de multiples fonctions dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, dans la formation d'ondulation des membranes, dans la contraction des muscles lisses et également dans la cytokinèse [193].

La modulation réciproque entre Rho et Rac constitue un système d'activation et d'inactivation hautement exploité par la cellule dans la migration cellulaire, notamment au

niveau du lamellipode, de la lamelle (zone juxtaposée au lamellipode) et de l'arrière de la cellule. Tel que mentionné ci-haut, l'activation de Rac se déroule dans le lamellipode. Son activation se voit alors à la baisse au niveau de la lamelle et de l'arrière de la cellule. À l'inverse, l'activité de Rho est contrôlée à la hausse dans la lamelle et en zone postérieure de la cellule et pas dans le lamellipode. Comme Rac peut inhiber l'activité de RhoA via p190RhoGAP, cela engendre une diminution des tensions dans les filaments d'actine au front de migration et favorise ainsi le développement de lamellipodes. La maturation des complexes focaux en complexe d'adhésion implique l'activation de Rho via une RhoGEF en amont de l'activation de Rac. Cependant, par l'activation de ROCK, Rho peut inhiber l'activation de Rac par la modulation des forces de tensions et activer l'ARHGAP22 qui semble être modulable mécaniquement [192, 194]. À la lumière de ce nouveau concept, il apparaît évident que le contrôle de la boucle d'activation entre Rho et Rac constitue un événement clé dans la formation des complexes d'adhésion via les composantes du cytosquelette. Des composantes du complexe d'adhésion comme la Paxiline peuvent dès qu'elles sont activées recruter des GTPases et ainsi moduler leur activation. En effet, la phosphorylation sur tyrosine de la Paxiline contrôle le recrutement des modulateurs positifs de la formation des points d'adhésion Rac et Cdc42 [188]. De plus, la protéine CAS en recrutant et associant la protéine adaptatrice CRK permet à celle-ci de recruter ou d'activer la RhoGEF DOCK180, DOCK1 et RAP1. Également, suite à son activation, la kinase FAK semble moduler l'activation de plusieurs RhoGEFs et RhoGAPs [195]. Par exemple, FAK peut moduler la formation de lamellipodes en contrôlant l'activation de RhoA. En effet, FAK active la p190RhoGAP, ce qui inhibe l'activité de RhoA et ce, au cours d'une stimulation à la fibronectine depuis la matrice extracellulaire.

1.6.3.1.2 Les points focaux d'adhésion

Fondamentalement, les points focaux d'adhésion prennent place légèrement à l'écart du front migratoire, spécifiquement dans la zone de formation du lamellipode. Au fur et à mesure que la migration de la cellule évolue, les points focaux s'étendent jusqu'à l'arrière de la cellule ainsi qu'aux régions bilatérales. Lorsque la traction à l'avant de la

cellule augmente, les points focaux localisés à l'arrière se désassemblent. Les points d'adhésion sont la résultante de l'agrégation des protéines transmembranaires, telles que les intégrines, et se localisent aux extrémités des fibres d'actinomyosine. Les intégrines recrutent des protéines adaptatrices qui assurent la transduction signalétique nécessaire au maintien des interactions cellule-matrice extracellulaire. En effet, dès qu'elles sont activées, les intégrines induisent un recrutement spectaculaire de protéines s'inter-associant via leur domaine SH2 ou SH3 (*Src homology regions 2 and 3*). Ce complexe est principalement constitué des protéines FAK, Src, Grb2, Fyn, PI3K, PLC γ , p130Cas, Rho et Sos. La kinase FAK est connue pour son rôle dans la formation des points d'adhérence. Suivant la liaison de son ligand comme la fibronectine, les récepteurs aux intégrines activent FAK via phosphorylation sur au moins 6 résidus tyrosine [196] Y397, Y407, Y576, Y861 et Y925, dont le résidu d'autophosphorylation Y397 assure l'association FAK/Src via le domaine SH₂ de la kinase Src. Les autres résidus tyrosines indiqués font office de substrats pour d'autres membres de la famille de Src [197]. Suite à la phosphorylation de ces sites, plusieurs protéines comprenant des motifs SH2 et SH3 assureront la transduction du signal depuis la membrane plasmique. En effet, l'activation de Shc sur les résidus tyrosine Y239 et Y317 potentialisera l'association de la protéine adaptatrice Grb2 avec la GEF SOS, activant ainsi Ras et ultimement la voie des MAPKinase [196-198]. FAK promeut l'activation de plusieurs protéines notamment impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine, comme Grb7 et la PLC- γ . Enfin, l'activation de la kinase FAK constitue un facteur limitant dans la signalisation médiée par les récepteurs aux intégrines.

I.7 : Les GTPases monomériques

La superfamille des Ras possèdent une activité GTPasique et est impliquée dans plusieurs événements cellulaires tels la migration, la prolifération, la différenciation ou le réarrangement du cytosquelette d'actine [199]. Ces petites protéines G monomériques sont de faible poids moléculaire, soit d'environ 20 kDa. À titre de nomenclature, cette famille de protéines a été divisée en cinq groupes selon leur homologie de séquence en acides aminés et leurs rôles primaires dans la cellule. Il s'agit donc des 5 groupes suivants : Ras, Rho,

Rab, Ran et ARFs. Fondamentalement, ces petites protéines G ont la capacité de passer d'une forme inactive vers une forme active et ce, en liant le GDP (Guanosine diphosphate) et le GTP (Guanosine triphosphate) (Figure 10). Démontrant une faible activité intrinsèque, ces protéines nécessitent l'intervention de facteurs d'échange de nucléotides afin de permettre la transition entre les deux états d'activation. En effet, des facteurs d'échange de nucléotides de type guanine (GEFs) assurent la conversion du GDP en GTP. À l'inverse, l'inactivation de la GTPase s'effectue via des protéines régulatrices de l'activité GTPasiques (GAPs), qui hydrolyseront le GTP en GDP. À l'exception du groupe des ARFs, les autres membres peuvent passer à l'état actif de manière spontanée. Or, les inhibiteurs de la dissociation du nucléotide ou GDI séquestrent la GTPase sous sa forme liée au GDP [200].

Les fonctions de ces petites protéines G à l'intérieur de la cellule sont principalement médiées par une modification lipidique post-traductionnelle présente en N-terminal ou en C-terminal de leur structure. En effet, cette modification permet aux GTPases de se relocaliser dans divers compartiments intracellulaires à cause de leur spécificité à associer les phospholipides membranaires. Les Ras sont farnésylées et/ou palmitoylées, tandis que les Rho et Rab sont géranyl-géranylées [201]. Les membres des ARFs sont majoritairement myristoylées [202].

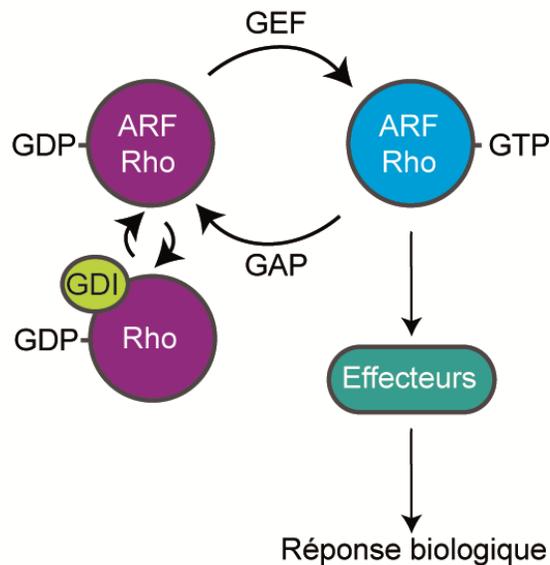


Figure 10: Le mécanisme d'activation des petites protéines G monomériques.

Les petites GTPases cyclent d'une forme active, liée au GTP, à une forme inactive, liée au GDP. Les GEFs permettent l'échange du GDP en GTP et par conséquent, permettent aux GTPases d'associer leurs protéines effectrices respectives et de moduler des réponses biologiques de la cellule. À l'inverse, les GAPs inhibent l'activité GTPasique en effectuant l'hydrolyse du GTP en GDP. Les membres de la sous-famille des GTPases Rho sont également maintenus sous en conformation inactive par la liaison de GDI. Ils peuvent ainsi interagir avec différents effecteurs incluant des protéines d'échafaudage, des kinases à cibles lipidiques, sérines/thréonines ou encore tyrosines [203].

Les Rans ne possèdent aucune modification lipidique [201]. Jusqu'à ce jour, les petites protéines G agissent comme interrupteurs moléculaires via leur forme liée au GTP.

I.7.1 La GTPase Rho

La sous-famille de Rho est constituée de RhoA, RhoB et RhoC [204]. Dans plusieurs types de cancer, RhoA et RhoC sont hautement activées et exprimées alors qu'on observe une régulation à la baisse de l'expression de RhoB [205]. La voie de signalisation

RhoA/ROCK est connue pour induire la contraction des fibres d'actine-myosine à l'arrière de la cellule [172]. L'activité de la MyosineII est contrôlée par la MLC. L'activation de cette dernière est modulée positivement par la kinase MLCK ou ROCK et négativement par la phosphatase MLCP. Cette phosphatase MLCP est elle-même phosphorylée et inhibée par ROCK [172]. La fonction de Rho dans les réponses cellulaires a longtemps été étudiée à l'aide de la C3 transférase, une enzyme inhibitrice des Rho [206]. En effet, cet enzyme de nature bactérienne (*Clostridium* et *Staphylococcus*) ADP-ribosyle sur l'asparagine 41 présent dans le domaine effecteur de RhoA, bloquant ainsi sa liaison avec sa protéine effectrice, ROCK. RhoA est présente à plusieurs stades du développement du cancer. Elle serait impliquée lors de la prolifération des cellules tumorales et de leur survie. Dans des cellules épithéliales normales, RhoA contribue à la polarité et à la jonction cellulaire [207], mais induit également le désassemblage des jonctions d'adhésion lors de la progression des tumeurs. De plus, RhoA contrôle la production de métalloprotéases qui sont impliquées lors de la dégradation de la matrice extracellulaire, nécessaire à l'invasion de la cellule en mouvement [208]. RhoB est connue pour être distribuée dans les vésicules intracellulaires telles que les endosomes. RhoB interagit avec Dia1 au niveau N-terminale, ce qui déclenche le dépliement de la protéine pour subséquemment promouvoir son activité stimulatrice de nucléation de l'actine autour des endosomes [204]. Ce tapissement d'actine en périphérie des endosomes ralentit le mouvement du transport vésiculaire, un événement moléculaire observé notamment dans le cas du récepteur à l'EGF [209]. Comme Rac1, les GTPases Rho peuvent également activer la LIMK par l'intermédiaire de ROCK, ce qui subséquemment bloquera l'activation de la coffiline par phosphorylation [204]. À l'opposé, la phosphatase Slingshot permet la réactivation de la coffiline, ce qui promeut la dépolymérisation d'actine notamment au niveau des lamellipodes [204]. La forme constitutivement active de RhoA, tout comme Rac1, bloque l'endocytose par la voie des puits tapissés de clathrine. Il semble que cette inhibition soit la résultante de l'activation de ROCK qui phosphorylerait l'endophiline, une protéine partenaire de la synaptotagmine. Celle-ci est impliquée dans le désassemblage des vésicules [210]. Une autre hypothèse possible de la régulation de l'endocytose par les GTPases Rho est que ces dernières

modulent indirectement les GTPases de type ARFs hautement impliquées dans la formation des vésicules de clathrine. Le pont entre ces deux types de GTPase est qu'à la fois les Rhos et les ARFs sont inactivées par une GAP commune, c'est-à-dire la ARF GAP, ARAP, qui toutes les deux possèdent à la fois un domaine Rho GAP et ARF GAP.

I.7.2 La GTPase Cdc42

La sous-famille Cdc42 est composée de Cdc42, RhoQ/TC10 et RhoJ/TCL, où à ce jour, seulement Cdc42 module la migration cellulaire [204]. En effet, cette GTPase module la migration notamment en contrôlant la polarité de la cellule conjointement avec le complexe Par3/Par6/PKC [211]. Cela régule ainsi le recrutement de Tiam1 afin d'activer Rac1 au compartiment membranaire. Ainsi, par sa fonction dans la polarité, Cdc42 inhibe le processus de migration et d'invasion, deux phénomènes contrôlés à la hausse dans les cancers. Cependant, dans certains types de cancer du sein, où les cellules tumorales ont une morphologie épithéliale, on détecte de hauts niveaux de Cdc42 associés à la formation de filipodes via une interaction avec WASP [212-214].

I.7.3 La GTPase Rac1

La sous-famille de Rac comprend les isoformes Rac1, Rac2, Rac3 et RhoG, où le domaine C-terminal diverge parmi cette sous-famille [215]. L'architecture moléculaire de Rac1 est définie par deux régions *Switch*, *SwitchI* et *SwitchII*, qui constituent des sites de liaison au GDP et/ou GTP [216, 217]. Rac1 est coiffée en C-terminal d'une modification post-traductionnelle telle une géranyl-géranlylation sur un motif CAAX [201]. Cette modification lipidique est cruciale pour la distribution aux membranes. Rac1 est exprimée dans tous les types de cellules de l'organisme alors que Rac2 et Rac 3 sont respectivement présentes dans les cellules hématopoïétiques et dans le cerveau [218, 219]. La délétion du gène *RAC1* inhibe le développement embryonnaire, notamment au niveau des étapes de la gastrulation et de l'organogenèse. Il faut noter que son expression est nécessaire afin d'assurer les processus de migration et d'adhésion [220]. Certains types de cancers du sein expriment un homologue de Rac1, Rac1b et Rac3 [221]. Le variant de Rac1, Rac1b,

constitue une forme suractivée de Rac, due à la présence d'un exon additionnel la région *switch II* [222] [223]. De plus, Rac1b est incapable de s'associer à une RhoGDI [223]. Cette forme de Rac1 mutée ne semble pas interagir avec l'un des effecteurs des Rac1, soit PAK [224]. Cet isoforme est hautement exprimée dans divers cancers comme le cancer du côlon et ce, à cause de sa capacité à esquiver les processus de dégradation et d'ubiquitination [225] [226]. Bien que Rac1 soit impliquée dans la formation de lamellipodes et dans le maintien des jonctions adhérentes, cette dernière peut moduler la prolifération cellulaire en augmentant l'expression de la Cycline D1 par un mécanisme moléculaire peu étudié [227]. Rac2 n'a, à ce jour, aucune contribution dans la progression tumorale. Toutefois, la fonction de régulateur de la migration de Rac2 se confine particulièrement aux neutrophiles. [228]. Selon des études *in vitro*, RhoG démontre une fonction de régulateur de la polymérisation d'actine et de la migration de la cellule de concert avec la voie Rac, alors que son rôle dans l'invasion des cellules tumorales demeure à l'étude. Rac1 assure la formation de lamellipodes en activant le complexe protéique WAVE qui activera ARP2/3 [199]. Le rôle de Rac1 dans la migration a été particulièrement étudié dans le guidage axonal, notamment par l'habileté de cette GTPase à favoriser la formation d'un prolongement orienté de l'axone [229]. Une mutation du domaine effecteur de Rac1 dont la résultante est une forme suractivée de Rac1 lui confère des propriétés tumorigéniques dans certains cancers [230]. Des données *in vivo* démontrent que, dans le cancer du poumon, Rac1 est impliquée dans la voie signalétique médiée par K-Ras [231]

I.7.4 Les facteurs de ribosylation de l'ADP (ARFs)

Historiquement, les ARFs furent découvertes pour leur rôle de co-facteurs de l'activité ADP-ribosyltransférase de la toxine du choléra sur la protéine G hétérotrimérique Gas [232, 233]. La conséquence au niveau intestinale de cet ajout constitutif d'un groupement ADP-ribose sur la protéine G est l'induction d'une diarrhée conduisant à la mort. Tel que mentionné précédemment, la sous-famille des ARFs appartient à la superfamille des Ras. Cette sous-famille des GTPases Ras est composée des membres Sar, Arl et ARF dont le poids moléculaire se situe aux environs de 20 kDa. Or, une sous-famille

supplémentaire dite « domaine additionnel », dont TRIM23, possède un domaine de 20 kDa dans sa portion C-terminal qui partage environ 60% d'homologie de séquence avec les autres ARFs [234]. La portion N-terminale de TRIM23 est pourvue d'une activité GAP sur son propre domaine ARF et d'une activité E3 ubiquitine ligase [235, 236], ce qui totalise un poids moléculaire final se situant aux alentours de 60 kDa. Une dernière protéine se distingue des autres ARFs de part l'absence de son résidu glycine en N-terminal et de sa manière unique à modifier sa conformation lors de la liaison des nucléotides [237]. Le sous-groupe des Sars pour *secretion-associated and Ras-related proteins* est composé de Sar1A et Sar1B. Sar1 est le premier gène à être cloné parmi la sous-famille des ARFs [238]. Les Sars, comme les ARFs, participent à la formation des vésicules de transport au niveau de l'appareil de Golgi. Les Arls pour *ARF-like* sont définies comme étant des cofacteurs de la toxine du choléra et des activateurs de la PLD. Les Arls ont la capacité de renverser la mutation *arf1/arf2^{-/-}* létale chez *Saccharomyces cerevisiae* [239]. On dénombre 22 membres dans le sous-groupe des Arls incluant les différents variants issus de l'épissage alternatif. À la différence des autres ARFs, les isoformes Arl2 et Arl3 possèdent le résidu glycine en position 2, sans toutefois être reconnu par la N-myristoyltransférase [240]. Les membres Arl4 et Arl5 détiennent en C-terminal une séquence peptidique associée au signal de localisation nucléaire et également un chromodomaine qui permet l'association avec HP1, une protéine de structure de la chromatine [241]. Les trois Arls (Arl4a, Arl4c et Arl4d) ont la capacité de recruter la ARF GEF ARNO/Cytohésine-2 de même que les domaines PH des autres Cytohésines (Cytohésine-1, 3 et 4) à la membrane plasmique [242].

Caractérisation moléculaire des ARFs

On dénombre six isoformes des ARFs soient d'ARF1 à ARF6, où ARF2 est absent chez l'humain. Les ARFs sont classés selon leur homologie de séquence en trois groupes distincts, soit la classe I (ARF1-ARF3), la classe II (ARF4 et ARF5) et la classe III (ARF6), où ARF6 est la plus divergente en termes de séquence en acides aminés. La structure des ARFs est pourvue principalement d'une modification lipidique post-

traductionnelle en N-terminale (Figure 11). En effet, à la différence de la protéine Ras, les ARFs possèdent une glycine en position 2 qui devient l'accepteur d'un acide myristique, constituant la myristoylation de la protéine. Cette extension en N-terminale prend la structure d'une hélice amphiphatique. Cette hélice exerce deux fonctions majeures. Elle sert premièrement de bras moléculaire permettant à la GTPase de s'ancrer aux divers phospholipides présentés aux membranes de la cellule et ce, tant au niveau de la surface qu'aux organelles. Par exemple, des essais *in vitro* démontrent que l'ajout de phosphatidylinositols-4,5diphosphates et de phosphatidylinositols-3,4,5triphosphates augmentent de manière significative l'activité d'échange de GDP pour le GTP par la Cytohésine-1 sur ARF1 [243]. Deuxièmement, cette hélice sert de verrou d'activation en s'intercalant dans la région *interswitch*, située entre la région *switch1* (acides aminés 45 à 54) et *switch 2* (acides aminés 70 à 80). Elle est formée par deux brins β (Figure 11) [244]. Lorsque l'ARF est en conformation inactive, la région *interswitch* est rétractée à l'intérieur de la protéine. Dès que la GTPase est activée, le déploiement de l'hélice amphiphatique dégage la région *interswitch* et le déplacement de deux résidus à l'intérieur du domaine G prépare le site de liaison pour le GTP afin de faciliter le passage vers la forme active (Figure 11). De plus, la signature moléculaire W/GG/R augmente la stabilité de la conformation active de la GTPase (Figure 11) [245]. Ainsi, la fonction biologique des ARFs est entièrement révolue à sa localisation aux membranes. Classiquement, les ARFs interagissent avec des protéines effectrices COPI, AP-1, AP-3, GGA1, GGA-3, MINT1-3/X11 α - γ /APBA1-3, PLD1, PIP4/5K et PIP4K [240]. La liaison du N-terminal de la ARF aux membranes favorise l'initiation de la formation de tapissage de COPI sur les néo-vésicule et la terminaison de la fission des vésicules COPI positives.

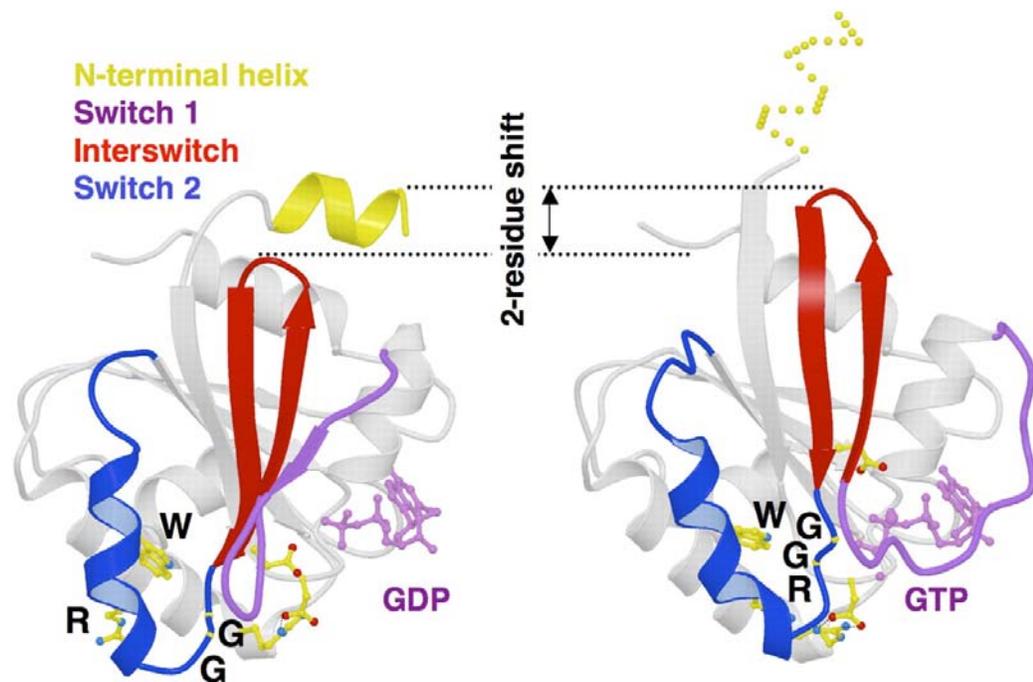


Figure 11: Structure moléculaire des ARFs.

Sous leur conformation inactive (liée au GDP), la région *interswitch* des ARFs, localisée entre les régions *switch1* et *switch2*, est rétractée dans la structure de la protéine. Suivant le dépliement de l'hélice amphiphatique localisée en N-terminale, la région *interswitch* est dégagée. Elle favorise alors le déplacement (*shift*) de deux résidus à l'intérieur du domaine G et permet la liaison du GTP (forme active). Le motif W/GG/R augmente la stabilité de la conformation de l'ARF liée au GTP [240].

I.7.4.1 ARF1

Longue de 181 acides aminés, ARF1 est connue pour son rôle de régulateur du transport vésiculaire via l'enrobage des vésicules COPI. Des études cristallographiques de l'interaction entre ARF1 et le domaine catalytique Sec7 présent dans les ARF GEFs ont permis d'établir le mécanisme d'échange de nucléotides nécessaires à l'activation des ARFs [246].

1.7.4.1.1 Mécanisme moléculaire d'activation d'ARF1 et mutations

La région hydrophobique conservée dans le domaine Sec7 permet l'engagement des régions *switch* 1 et *switch* 2 dans un contexte d'interaction ARF1/Sec7. Le déploiement du site actif d'ARF1 permet l'insertion d'un glutamate spécifique présent dans le domaine Sec7, tels que les glutamates 156 et 157 pour Cytohésine-2/ARNO et Cytohésine-1 respectivement. La résultante de cette interaction est la répulsion électrostatique des groupements phosphate en position β et des ions magnésium sur ARF1 entraînant une dissociation du nucléotide. Le changement structural d'ARF1 suivant la liaison avec le GDP ou le GTP s'effectue principalement dans le segment localisé entre le 38^e et le 83^e résidu [246]. Cette séquence polypeptidiques comprend la région *switch* 1, les brins β 2 et β 3, la boucle γ 3 et la région *switch* 2. Il en résulte au final en un simple réarrangement de la structure en feuillet β d'ARF1, incluant le déplacement de deux résidus. Les deux régions *switch* sont rétractées lors de la conformation active et sont déplacées vers le site actif de liaison. La configuration finale de la forme active d'ARF1 est terminée par le phosphate- γ du GTP à l'intérieur des résidus 57 à 63. Le résidu glutamine en position 71, inclus dans la région *switch* 2 [246], joue un rôle critique dans l'orientation d'une molécule d'eau hydrophobe pour la réaction de la catalyse par une GAP. Ainsi la mutation de la glutamine en position 71 pour une leucine (Q⁷¹L) induit une inhibition de l'activité GTPasique. Celle-ci est régie par la glycine et résulte en une forme mutante d'ARF1 constitutivement active. Les seuls éléments moléculaires impliqués dans la conformation d'ARF1-GDP consistent en un réarrangement de brins β au cœur de la séquence située entre le 42^e et 51^e résidu [246]. Cette région est hautement conservée dans les GTPases de type ARF. Le résidu clé pour l'échange du GDP pour le GTP est la thréonine 48 présente dans la région *switch* 1. En effet, via son groupe -OH, cet acide aminé coordonne les ions magnésium. Un autre ligand du magnésium comme la thréonine 31 a été étudié pour la synthèse d'un mutant dominant négatif d'ARF1 par la substitution de la thréonine par une asparagine (T³¹N). De plus, cette mutation induit la formation d'un complexe ARF1/GDP et semble également entraîner la séquestration des ARF GEFs nécessaires à son activation [247].

1.7.4.1.2 La distribution d'ARF1 à l'appareil de Golgi et à la membrane plasmique

De plus, ARF1 possède, au milieu de sa séquence, un motif MXXE de localisation à l'appareil de Golgi [248]. ARF1 est exprimé de façon ubiquitaire dans les diverses cellules de l'organisme. ARF1 est classiquement localisée à la région *cisternae* de l'appareil de Golgi et module le transport vésiculaire antérograde des protéines cargos sortant du réticulum endoplasmique en facilitant l'enrobage des vésicules COPI. ARF1 contrôle également le recrutement des clathrines dans la région *trans* du Golgi et aux endosomes tardifs via le recrutement de protéines adaptatrices AP1, AP3 et AP4, de même que de la GGA (*Golgi-localized year containing ARF-binding proteins*) [249]. Des études *in vitro* ont démontré qu'afin de favoriser la formation de vésicules en région *cis* du Golgi et de favoriser leur associations avec les coatomères de type COPI, ARF1 se doit d'être dans sa conformation liée au GTP et par conséquent, associée aux membranes du Golgi [250]. À la base, ARF1 sous forme inactive est retrouvée dans la fraction cytosolique du Golgi. Le passage du cytosol vers les membranes golgiennes est favorisé par son interaction avec les protéines transmembranaires p23 et p24 qui agissent en tant que récepteurs des protéines-cargos. Cette transition cytosol-membrane d'ARF1 est également modulée par la Membrine, une protéine SNARE présente à l'interface réticulum endoplasmique/Golgi [251]. De plus, cette transition est médiée par le groupement myristoylé d'ARF1 qui permet son association avec les phospholipides membranaires. La ARF GEF GBF1 s'associe aux membranes golgiennes afin d'activer ARF1, augmentant ainsi l'affinité d'ARF1 aux membranes à cause de sa conformation active. L'ARF1 activée recrute le complexe heptamérique de coatomères (α , β , β' , γ , δ , ϵ et ζ -COP) du cytosol vers la membrane et promeut la formation d'un bourgeonnement à la surface de la membrane du Golgi. Par la suite, le recrutement de la ARF GAP, ARFGAP1 pré-associée aux récepteurs KDEL est activé par le coatomère et la courbure membranaire [252, 253]. La population d'ARF1 présente dans le complexe coatomère/ARFGAP1 subit l'hydrolyse de son GTP pour devenir inactive et est relâchée de la membrane. De plus, la présence d'ARF1 GTP aux membranes golgiennes stimule la production de PI(4,5)P₂ par l'activation des

PIPkinases. Ces dernières recrutent alors la Spectrine impliquée dans la réorganisation du cytosquelette [254, 255]. La forme active d'ARF1 recrute la GAP de Cdc42, ARHGAP21 afin de moduler l'activation de Cdc42 aux membranes golgiennes. Au niveau de la région *Trans-Golgi Network* (TGN), ARF1 module le recrutement de la cortactine et de la dynamine-2. La cortactine assure la stabilité entre les embranchements des filaments d'actine et les complexes ARP2/3 de même qu'avec la fission des vésicules nouvellement sécrétées [255-257]. L'inhibition de l'expression endogène d'ARF1 dans les cellules n'induit aucun effet sur le transport vésiculaire à cause de l'effet de compensation maintenu entre les ARFs de classe I et II. Cependant, la combinaison de la suppression d'ARF1 et d'ARF4 déclenche le désassemblage de l'appareil de Golgi, inhibant tout transport vésiculaire.

Un fait intéressant est que la combinaison de la suppression d'ARF1 avec d'autres isoformes comme ARF3 ou ARF5 n'entraîne pas la fragmentation du Golgi, mais plutôt l'inhibition du transport rétrograde dirigé vers le réticulum endoplasmique [258]. De plus, ARF1 contrôle le désassemblage du Golgi et la cytokinèse des cellules normales de reins de rat (NRK). Lorsqu'ARF1 est inactivé par la brefeldine A ou par la surexpression du mutant dominant négatif d'ARF1 (ARF1T³¹N), il en résulte un désassemblage du Golgi et un transport des enzymes golgiens rétrogradés vers le réticulum endoplasmique [259, 260]. Le désassemblage du Golgi lors de la mitose est un processus dépendant de deux kinases, soit MEK1 et Cdc2. MEK1 déclenche l'initiation de la fragmentation alors que Cdc2 convertit les fragments du Golgi en de petits éléments membranaires et en vésicules [261, 262]. Durant l'initiation de la mitose, entre la prophase et la métaphase, ARF1 se redistribue dans le cytoplasme, correspondant au moment où le Golgi initie son désassemblage et sa dispersion. Le traitement des cellules NRK avec le composé H89 (inhibiteur de la PKA et autres kinases) inhibe l'inactivation d'ARF1. La surexpression du mutant constitutivement actif d'ARF1 (ARF1Q⁷¹L) bloque le désassemblage du Golgi lors de la mitose, mais pas la fonction des kinases MEK1 et Cdc2. Dans les mêmes conditions expérimentales, les structures du Golgi peuvent ségréger avec les centrosomes aux pôles opposés du fuseau mitotique. Cependant, lors de la télophase les brins de chromatides sœurs sont incapables

de se séparer, bloquant la cytokinèse de la cellule. Ainsi, l'inactivation d'ARF1 lors de la mitose serait un processus nécessaire dans la terminaison de la cytokinèse [263]. Plusieurs protéines cytoplasmiques COPI, Ankyrine, Spectrine, Tankyrase, membres des Culline, MyosineIIA et Cdc42 [264] [265-267] s'associent aux membranes golgiennes dont certaines exercent des fonctions au cours de la mitose, notamment au niveau de la chromatine. La redistribution dans le cytoplasme des protéines MyosineII, COPI et Tankyrase durant la prophase corrèle avec la translocation d'ARF1 dans le cytoplasme [263]. Récemment, il a été rapporté qu'ARF1 peut former des homodimères et ce, via deux interfaces, soit des acides aminés 31 à 36 (interface 1) et 152 à 178 (interface 2) [268]. La mutation de la tyrosine 35 pour une alanine (interface 1) a pour effet de bloquer l'homodimérisation et l'activation d'ARF1 sans toutefois freiner le recrutement de coatomères aux membranes golgiennes. Cependant, cette mutation bloque la formation de bourgeonnement de vésicules au Golgi. Des études de complémentation dans un système de levure *Saccharomyces cerevisiae* (*arf1Δ* et *arf2Δ*) ont démontré que la transformation de la forme sauvage d'ARF1 renverse le phénotype de croissance, mais pas le mutant ARF1Y35A [268]. Étant donné l'homologie de 77% existant entre la séquence d'ARF1 humaine et celle de la levure *Saccharomyces Cerevisiae*, il demeure à déterminer si cette mutation est également létale dans les cellules de mammifères. Enfin, de récentes évidences démontrent qu'ARF1 est également retrouvée à la membrane plasmique, notamment en associant le RCPG M3 (muscarinique) de manière dépendante à l'agoniste [269], suggérant ainsi un rôle potentiel pour cette GTPase à être impliquée dans la signalisation membranaire.

I.7.4.2 ARF6

Les membres de la classe II, ARF4 et ARF5 sont peu caractérisées, mais sont impliquées dans le transport inter-golgien [258]. La classe III, l'une des plus étudiée, est simplement représentée par ARF6. Cette GTPase contrôle à la fois le transport vésiculaire aux endosomes, l'internalisation des RCPGs et la réorganisation du cytosquelette d'actine [270].

1.7.4.2.1 La distribution d'ARF6 à la membrane plasmique

ARF6 est principalement retrouvée à la membrane plasmique, tandis que les autres isoformes des ARFs sont distribuées majoritairement dans l'appareil de Golgi. La raison biologique de la présence d'ARF6 en périphérie de la cellule provient du fait que celle-ci contrôle la synthèse de lipides. ARF6 active la phospholipase D (PLD) [271], produisant l'acide phosphatidique qui permet d'activer la PIP5Kinase [272]. En effet, l'ARF6 activée par la Cytohésine-1a a la capacité d'activer la PLD dans les neutrophiles, induisant la production et la sécrétion de superoxyde [273]. La PIP5Kinase est également activée par ARF6. La PIP5Kinase effectue la synthèse de PI(4,5)P₂, un substrat universel et essentiel au maintien de la polarité cellulaire [274].

1.7.4.2.2 ARF6 et l'endocytose

ARF6 se démarque de ses homologues par son rôle dans l'endocytose des RCPGs. Des études récentes ont démontré que l'expression d'ARF6 est nécessaire à l'endocytose des RCPGs qui empruntent la voie des vésicules tapissées de clathrines ou CCV (*Clathrin Coated Vesicles*). En effet, la suppression d'ARF6 compromet l'endocytose de plusieurs RCPGs internalisant par les CCVs, les caveolae et la voie indépendante des CCVs [275]. De plus, il a été illustré que l'activation des récepteurs β 2AR et LTHR par leur ligand respectif induit l'activation d'ARF6 via les β -arrestines [276, 277]. Suivant l'activation des récepteurs, la forme active d'ARF6 favorise l'internalisation du récepteur AT₁R et ce, autant de manière dépendante qu'indépendante de la voie des CCVs [278]. Par ailleurs, il a été mis en évidence que l'expression d'ARF6 est nécessaire au recrutement des protéines β -Adaptine et Clathrine au récepteur AT₁R, soit un événement clé dans l'endocytose de ce RCPG [279]. De plus, ARF6 est également présente dans les caveolae [280].

1.7.4.2.3 ARF6 et le cytosquelette d'actine

Cette GTPase joue un rôle majeur dans le remodelage du cytosquelette d'actine en participant à la formation d'ondulations membranaires au front de migration et à la formation de pseudopodes [281], la migration cellulaire [274] et la phagocytose [282]. Par

l'utilisation de lignée de cellules épithéliales MDCK, il a été possible de caractériser la relation étroite entre Rac1 et ARF6 dans la génération du phénotype migratoire. Lorsque les cellules sont organisées et polarisées, ARF6 est sous forme active, où la protéine Nm23H1 module à la baisse l'activité de Rac1. Cela est fort probablement explicable par la séquestration d'une Rac GEF telle que Tiam1. De plus, ARF6 contrôle la réorganisation du cytosquelette en partenariat avec Rac1 [278]. L'activation de Rac1 par ARF6 nécessite l'activation de cette dernière par une ARF GEF spécifique à ARF6 comme EFA6 [283-286]. Cette dynamique d'interaction est notamment modulable par l'activation des RCPGs, tels que le récepteur AT₁R, par l'angiotensine II [278].

1.7.4.2.4 ARF6 et l'adhésion

La formation des points de jonctions d'adhérence primordiaux constitue un processus clé dans le maintien de la polarité apico-basale des cellules épithéliales. Suivant l'activation par la Cytohésine-1, ARF6 est activée à ces sites d'adhésion et ce, via FRMD4. FRMD4 permet l'association de Par3 avec Cytohésine-1 aux sites d'adhérence primordiaux dans les cellules épithéliales intestinales de souris EpH4 [287]. ARF6 est également impliquée dans la formation des jonctions d'adhérence des cellules épithéliales MDCK et contrôle l'endocytose de la Cadhérine-E [288]. ARF6 module aussi la formation de points d'adhésion focaux en contrôlant la dynamique d'interaction FAK/GIT dans les cellules endothéliales [289]. La migration cellulaire des MDCK est également coordonnée par ARF6 et ce, de manière dépendante de la ARF GEF ARNO. Cette dernière, par son domaine *Coiled-Coil*, interagit avec la Rac-GEF DOCK180 et promeut l'activation de Rac1 [290]. Récemment, il a été démontré dans des études *in vitro*, à partir de cellules endothéliales, qu'ARF6 est impliquée dans le processus de formation de nouveaux vaisseaux et ce, dans un contexte d'angiogenèse non tumorale [291].

1.7.4.2.5 ARF6 et le cancer

ARF6 contrôle le processus d'invasion dans le cancer du sein. En effet, il a été démontré par le groupe de Sabe que l'expression d'ARF6, de même que la capacité de cette GTPase à cycle entre sa forme inactive vers sa forme active contrôle l'invasion des cellules invasives associées au cancer du sein [292]. Ce même groupe a également établi qu'ARF6 est hautement exprimée dans les cellules invasives de cancer du sein [292]. Par ailleurs, il a été rapporté que la surexpression de la forme GTP promeut la sécrétion des gélatinases MMP9 et MMP2. Ces dernières permettent à la cellule de se déplacer dans son microenvironnement en dégradant des composantes de la matrice extracellulaire. Ce processus de relâche des MMPs semble être contrôlé par la sécrétion des microvésicules dans le microenvironnement cellulaire. L'activation d'ARF6 module la sécrétion des microvésicules produites des cellules de carcinomes humains LOX (lignée de mélanome) exprimant de façon stable, la forme active d'ARF6 [293]. Les microvésicules présentes à la surface des cellules LOX sont de tailles hétérogènes variant de 300 à 900 nm par rapport aux exosomes dont leurs tailles oscillent entre 50 et 70 nm. En effet, l'activation d'ARF6 promeut l'activation d'ERK1/2 et subséquemment l'activation de la MLCK. Celle-ci est requise pour la sécrétion des microvésicules. L'inhibition d'ARF6 est accompagnée de la phosphorylation de la MLC par la PKC, bloquant de cette façon la formation de microvésicules. Ainsi, la modulation de la sécrétion des microvésicules par ARF6 serait un phénomène dépendant de la machinerie moléculaire modulant l'activité actine/myosine du cytosquelette. Ce processus de formation de microvésicules à la surface des cellules peut être à la fois normal et/ou pathologique. Récemment, il a été démontré que le sérum de patients atteints de divers cancers contenait des microvésicules transportant plusieurs types de protéines, dont les métalloprotéases et certains microARN. De plus, la forme active d'ARF6 a été détectée dans ces microvésicules. Ces dernières démontrent d'ailleurs des hauts niveaux de complexes de CMH de classe I, VAMP3 et d'intégrine $\beta 1$ de même qu'une forme mature de la MT1MMP. Il est à noter que d'autres lignées cellulaires cancéreuses comme les SW480 (carcinome du côlon), MDA-MB-231 (lignée invasive du cancer du sein) et PC3 (adénocarcinome de la prostate) expriment ARF6 dans les

microvésicules sécrétées [293]. Il a été démontré que l'activation de ARF6 amplifie l'activation des MAPKinases ERK1/2 dans les cellules de mélanomes et de gliomes et ce, de manière dépendante à la PLD [293].

1.7.4.2.6 Études d'ARF6 *in vivo*

La délétion du gène *ARF6* dans le modèle murine inhibe le développement du foie. En effet, les embryons dont les cellules n'expriment pas ARF6 montrent un développement anormal du foie causé par une absence de réponse au facteur de croissance hépatique [294]. De récentes analyses *in vivo* ont permis d'élucider l'importance de l'état d'activation d'ARF6 dans la tumorigenèse. Par le biais de souris athymique, il a été rapporté que l'injection de cellules invasives de mélanome exprimant de manière stable la forme active ou inactive d'ARF6 diminue la capacité des cellules à métastaser [293]. Par ces résultats, il apparaît évident que la capacité d'ARF6 à cycliser de la forme inactive vers la forme active et, inversement, est importante dans un contexte de formation de tumeurs et de métastases dans le cancer.

1.7.5 Les protéines régulatrices de l'activité des ARFs

Tel que présenté ci-haut, les ARFs, comme les autres membres de la superfamille des Ras, nécessitent l'intervention de co-facteurs afin de moduler leur activité [233].

1.7.5.1 Les ARF-GEFs

L'activation des ARFs nécessite l'intermédiaire d'un facteur d'échange de nucléotide que l'on nomme ARF GEF. Au total, 15 ARF GEFs ont été séquencées dans le génome humain qui, selon la classification de Casanova et *al.* se divisent en 5 familles distinctes : GBF/BIG (GBF1, BIG1 et BIG2), Cytohésines (1 à 4), EFA6 (A à D), BRAGs ou IQSEC (BRAG1 à BRAG3) et Fbox8 (Figure 12) [295]. Les ARF GEFs ont tous en

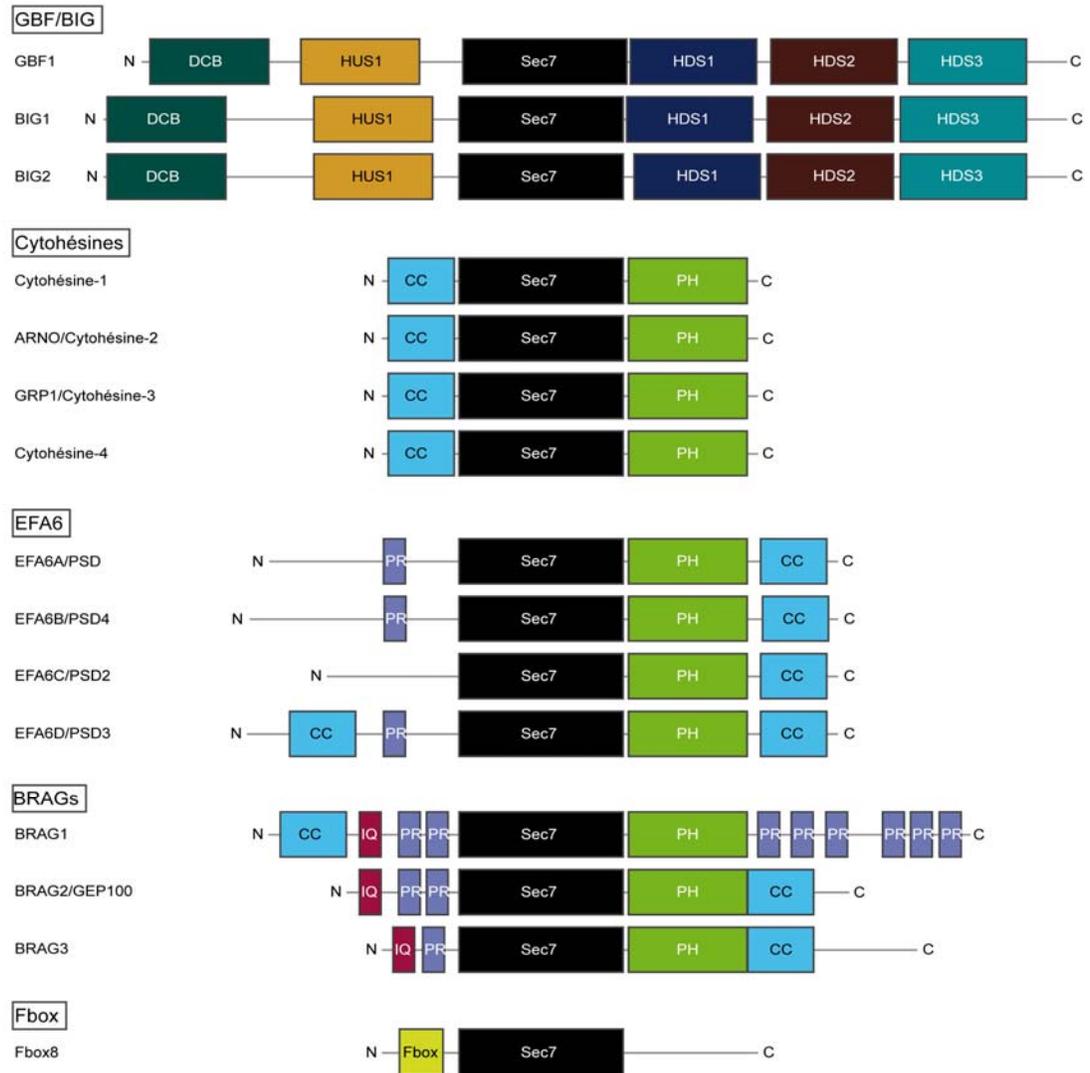


Figure 12: Organisation des domaines des ARF GEFs.

Les ARF GEFs sont classées en 5 familles en fonction de l'organisation de leurs domaines protéiques : GBF/BIG (GBF1, BIG1 et BIG2), Cytohésines (1 à 4), EFA6 (A à D), BRAGs ou IQSEC (BRAG1 à BRAG3) et Fbox8. L'arrangement des domaines est disposé de la région amino-terminale (N) vers la région carboxyl-terminale (C) (*Adaptée de James E. Casanova, 2007 [296]*).

commun un domaine catalytique, le domaine Sec7. Ce domaine Sec7 constitue la région catalytique de l'ARF GEF qui permet la dissociation du GDP pour le GTP. Les premières études cristallographiques du domaine Sec7 furent réalisées en complexe avec ARF1 [297-299]. Tel que mentionné ci-haut, les régions *switch* 1 et 2 pénètrent à l'intérieur de la poche hydrophobique de Sec7. La catalyse du GDP pour le GTP est permise par le résidu glutamate du domaine Sec7.

Le premier inhibiteur des GTPase de type ARFs la Brefeldine A (BFA) fut identifié il y a plus de 60 ans dans le microorganisme fongique *Eupenicillium brefeldianum* [300]. Cependant, ce n'est que 40 ans plus tard que fut élucidé le mécanisme moléculaire d'inhibition de la BFA. Cet inhibiteur cible spécifiquement la forme d'ARF1, et pas ARF6 liée au GDP, et le domaine Sec7 des ARF GEFs sensibles à la BFA [301-303]. Le complexe ARF1-GDP/ARF GEF formé par la BFA résulte en l'inactivation d'ARF1 accompagné d'une perte de fonction des ARF GEFs séquestrées. De plus, la BFA induit le désassemblage de l'appareil de Golgi, incluant le freinage du recrutement d'ARF1 aux membranes golgiennes ainsi que l'association des heptamères COP. Récemment, la synthèse d'un nouveau composé inhibiteur de l'activation des ARFs, le LM11, inspiré du modèle d'inhibition d'ARF1 par la BFA, permet de bloquer l'activité catalytique des ARF GEFs sensibles et résistantes à la BFA. Le LM11s'intercale entre ARF1 et l'ARF GEF Cytohésine-2/ARNO et induit la formation d'un complexe ARF1GDP/Cytohésine-2 non fonctionnel [304]. Des essais *in vitro* démontrent que ce composé inhibe les ARF1-5, mais pas ARF6. Des résultats démontrent également que le LM11 bloque la migration des MDCK, affecte la localisation d'ARF1 dans l'appareil de Golgi et, comme la BFA, peut induire le désassemblage de l'appareil de Golgi. Les ARF GEFs sont classées selon leur sensibilité ou leur résistance à la BFA.

1.7.5.1.1 Les ARF GEFs sensible à la BFA

Les mammifères expriment trois ARF GEFs sensibles à la BFA, soit GBF1, BIG1 et BIG2 [305, 306]. Une quatrième BIG, soit BIG3 n'est pas classée comme une ARF GEF

[296]. GBF1 et BIG1 /2 sont toutes trois distribuées à l'appareil de Golgi et activent les classes I et II de la famille des ARFs. GBF1 s'associe avec p115 en région *cisternae* du Golgi et est impliquée dans le recrutement des protéines d'enrobage COPI aux vésicules [228, 229]. La surexpression de GBF1 renverse l'effet de la BFA sur la dissociation des coatomères COPI [225]. À l'inverse, la surexpression d'un mutant dont l'activité catalytique est défectueuse (GBF1E794K) induit le même phénotype que la BFA [307]. La caractérisation des substrats de GBF1 est peu détaillée, mais il semble que GBF1 lie préférentiellement ARF5 *in vitro* [225]. De plus, il a été démontré que GBF1 interagit avec soit Rab1b et ce, à la sortie du réticulum endoplasmique via le domaine DCB [308], un domaine peu caractérisé. Partageant une similarité au niveau de la structure de GBF1, les membres BIG1 et BIG2 sont aussi résidentes du Golgi, mais dans des compartiments tardifs de l'organelle, tels que le réseau *trans*-golgien. La surexpression d'un dominant négatif de BIG2 entraîne une perte de la protéine adaptatrice AP1 et de GGA, autrement dit des protéines effectrices d'ARF1 [232]. La surexpression d'un mutant de BIG2 dont l'activité catalytique est corrompue bloque l'association d'AP1 et de GGA aux membranes du réseau *trans* golgien et induit la tubulation de cette région du Golgi et ce, sans affecter la distribution de COPI. De plus, BIG2 a été détectée en association avec les endosomes en périphérie du noyau. La suppression de BIG2 et pas BIG1 affecte la structure des endosomes et ralentit le recyclage de certains récepteurs, dont le récepteur à la transférine. Ce dernier démontre qu'à l'intérieur de cette sous-famille de ARF GEFs, deux isoformes exercent des fonctions différentes [309]. Il semble que le domaine N-terminal de GBF1 de même que des deux BIGs serait impliqué dans la distribution de ces GEFs à l'appareil de Golgi [310]. De plus, BIG1 a la capacité de se redistribuer dans le noyau et d'interagir avec la nucléoline [235, 236]. D'autres domaines situés de part et d'autre du domaine Sec7 demeure encore à l'étude. En effet, la fonction des domaines HUS et HDS1-3 est encore non définie (Figure 12). Cependant, il semble que le domaine DCB (Figure 12) ne soit pas impliqué dans le transport de ces GEFs aux compartiments membranaires. Des mutations dans le gène *BIG2* ont été associées à une pathologie d'ordre héréditaire qui entraîne une malformation du cortex cérébral associée à une déficience des neurones à

migrer [237]. En plus de porter un allèle générant un produit génique tronqué, le deuxième allèle possède une mutation ponctuelle E209K dans le domaine DCB, indiquant que ce domaine puisse être impliqué dans des processus pathologiques. Outre l'action de la BFA sur l'activité des ARF GEFs GBF1, BIG1/2, la protéine virale 3A du coxsakovirus peut s'associer à GBF1 pour en inhiber son activité catalytique et ce, sans affecter le domaine Sec7. Curieusement, la protéine virale 3A bloquerait la fonction de l'ARF GEF en s'associant avec la région N-terminale en aval du domaine DCB [238]. La protéine 3CD interagit avec BIG1/2 tout en stabilisant ARF1 aux membranes.

I.7.5.1.2 Les ARF GEFs résistante à la BFA : Les Cytohésines

Les ARF GEFs résistantes à la BFA les mieux définies sont les Cytohésines. On détecte chez les vertébrés 4 isoformes de ces protéines : Cytohésine-1, ARNO/Cytohésine-2, GRP1/Cytohésine-3 et Cytohésine-4. Partageant 68% d'homologie de séquence, les 4 Cytohésines sont garnies d'un domaine *Coiled-Coil* (CC) en N-terminal, du domaine Sec7 disposé en tandem avec un domaine PH (*Pleckstrin Homology domain*) et suivi en C-terminal d'une région riche en acides aminés chargés positivement (Figure 12). Cytohésine-4 est uniquement exprimée dans les leucocytes, alors que les Cytohésine-2 et 3 sont exprimées de façon ubiquitaire. Cytohésine-1 est trouvée principalement dans les leucocytes, mais également dans d'autres types de cellules, comme les cellules intestinales [287]. Cytohésine-1 fut initialement caractérisée comme une protéine activatrice de l'adhésion cellulaire médiée par l'intégrine $\beta 2$ [239]. Cependant, la fonction précise du rôle de Cytohésine-1 dans la signalisation via les intégrines demeure encore à l'étude. Récemment, un nouveau composé inhibiteur des Cytohésines a été synthétisé, le SecinH3. Cet inhibiteur consiste en un aptamère antagoniste spécifique des Cytohésines et rapporté pour exercer ses fonctions au niveau des cellules hépatiques dans la résistance à l'insuline via la dynamique d'interaction du récepteur à l'insuline et aux Cytohésines [240]. Les Cytohésines sont classiquement distribuées en périphérie de la cellule et sont recrutées de manière dépendante du $PI(3,4,5)P_3$. L'une des particularités moléculaires des isoformes 1-3 est la présence de deux ou trois résidus glycines issus de l'épissage alternatif. Ces glycines

en position N-terminale assurent la spécificité de la Cytohésine à interagir avec le PI(4,5)P₂ et/ou le PI(3,4,5)P₃. En effet, la présence de deux résidus glycines démontre une forte association des Cytohésines avec le PIP₃, alors que l'insertion de trois glycines promeut l'interaction des Cytohésines avec le PIP₂ que le PIP₃ [241]. Des essais *in vitro* montrent que les Cytohésines ont la capacité d'activer ARF1 et ARF6 [242-244]. Il semblerait que d'autres facteurs *in vivo* influenceraient la spécificité de la GEF à activer une ARF de même que la localisation même de la ARF dans la cellule. Il semblerait qu'ARF6 interagissait avec le domaine PH des Cytohésines, favorisant leur recrutement à la membrane pour médier l'activation d'ARF1 [311]. La surexpression de Cytohésine-2 augmente l'activation d'ARF6, suggérant que cette GTPase puisse assurer la fonction de substrat et d'effecteur des Cytohésines [274]. Le recrutement à la membrane plasmique des Cytohésines peut s'effectuer indépendamment de la production de PIP₃. En effet, le recrutement membranaire des variants 2G et 3G des Cytohésines-1 à 3 est également modulé par Arl4 de même que par ARF6 via une interaction directe avec leur domaine PH [132, 245]. Il a été rapporté chez la Drosophile que le seul orthologue des Cytohésines soit impliqué dans le développement larvaire causé par un dysfonctionnement de la voie de signalisation de l'insuline [312]. La Cytohésine-2 est impliquée dans plusieurs facettes du transport vésiculaire. La Cytohésine-2 module, par exemple, l'endocytose du β2AR. En effet, suite à la stimulation du récepteur les βarrestines1 et 2 interagissent avec la forme inactive de ARF6 et avec la Cytohésine-2, où l'interaction avec cette dernière est indépendante de l'activation du récepteur [276]. Cytohésine-2 contrôle l'activation de Rac1 en recrutant la Rac GEF DOCK180 et ce, dépendamment de la présence de son domaine *Coiled-Coil* [181]. Les protéines IPCEF et GRASP semblent assurer la fonction d'adaptateur faisant un pont moléculaire entre les Cytohésines et d'autres protéines et ce, via leur domaine *Coiled-Coil* en N-terminal. De plus, il a été démontré que la Cytohésine-1 exerce une fonction cruciale dans la formation des jonctions d'adhésion pour le maintien de la polarité des cellules épithéliales. Lors de la formation des points d'adhésion primordiaux dans les cellules EpH4, Par3, présente à la membrane apicale, recrute la protéine d'échaffaudage FRMD4 (*FERM Domain containing 4A*). FRMD4 module l'association

entre Par3 et la Cytohésine-1 [287]. La surexpression de la forme mutante dominante négative de ARF6T²⁷N de même que le traitement à la SecinH3 retarde la formation des jonctions adhérentes des cellules EpH4 [287].

I.7.5.1.3 Les ARF GEFs résistante à la BFA : EFA6

La famille des EFA6 a une structure similaire aux Cytohésines, à savoir un domaine Sec7, PH et *Coiled-Coil*. Toutefois, le motif *Coiled-Coil* est disposé en C-terminal et la région N-terminale est caractérisée par une région variable, incluant la présence de régions riches en proline (PR, *Proline-Rich*) (Figure 12). On retrouve chez les mammifères 4 isoformes de EFA6, soit EFA6A à EFA6D (Figure 12) [247]. La famille des EFA6s contrôle l'activation d'ARF6 spécifiquement (*in vitro*). Les EFA6 associent uniquement le PI(4,5)P₂ et la surexpression de ceux-ci semble corrélée à une réorganisation de l'actine corticale et ce, via le motif *Coiled-Coil* plutôt qu'à l'activité catalytique de la GEF [247]. L'isoforme EFA6A est la plus étudiée de cette famille. L'activité GEF et le domaine *Coiled-Coil* de l'isoforme EFA6A est impliquée dans le maintien de la structure des jonctions serrées entre les cellules épithéliales [313].

I.7.5.1.4 Les ARF GEFs résistante à la BFA : Les BRAGs

La famille des BRAGs, aussi nommée famille des IQSEC, inclut les membres IQSEC1-3 pour BRAG1, BRAG2/GEP100 et BRAG3 respectivement. Chaque membre est retrouvé sous deux variants issus de l'épissage alternatif [296]. Leur structure moléculaire est similaire aux autres ARF GEFs. Brièvement, ces protéines possèdent un domaine central Sec7, un domaine PH et un domaine IQ (Figure 12) qui semble permettre l'association de la GEF avec la Calmoduline [249]. À la différence de BRAG1 et de BRAG3, BRAG2 n'est pas seulement exprimée au cerveau, mais aussi au niveau des muscles squelettiques, du cœur, du foie, des reins et également au niveau du placenta [249]. GEF100 active spécifiquement ARF6 lors d'essais *in vitro* et est résistante à la BFA [249]. Différemment des Cytohésines, le domaine PH de BRAG2 n'entre pas en association avec les phospholipides tels que le PI(4,5)P₂, le PI(3,4,5)P₃ ou les phosphatidyl sérine [248].

Cependant, les deux isoformes existantes, soit BRAG2a et BRAG2b ont la capacité d'activer ARF6 *in vivo*. GEP100 est impliqué dans la phagocytose [249]. En effet, la suppression de GEP100 diminue le processus de la phagocytose des macrophages de manière dépendante du rôle d'ARF6 sur le remodelage des fibres d'actine-F. GEP100 est exprimée dans 70% des tumeurs primaires de carcinome invasif ductal du cancer du sein [250]. GEP100 permet l'activation d'ARF6 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 et contribue au phénotype invasif de ces cellules. Le mécanisme d'activation d'ARF6 par GEP100 a été clairement défini par le groupe de Sabe. En effet, suite à l'activation de l'EGFR, GEP100 est recrutée au récepteur par l'intermédiaire de son domaine PH et s'associe directement au site d'autophosphorylation 1068/1086 du récepteur pour par la suite, activer ARF6 [250]. L'expression de GEP100 est importante pour l'EMT des cellules cancéreuses. La surexpression de cette ARF GEF renverse l'EMT des MCF7, une lignée de cellules non invasives du cancer du sein MCF7. De plus, GEP100 module l'adhésion des cellules HeLa en contrôlant l'endocytose des récepteurs aux intégrines $\beta 1$ en partenariat avec ARF6 [250].

I.7.5.1.5 Les ARF GEFs résistante à la BFA : Fbox8

Cette famille comprend uniquement le membre Fbox8. La structure moléculaire de cette GEF longue de 40 acides aminés se résume à un domaine F-box en N-terminal et un domaine Sec7 en C-terminal (Figure 12). Le domaine F-box est un motif d'interaction pour les ligases de type E3. Actuellement, Fbox8 a été caractérisé pour sa capacité à entraîner l'ubiquitination et la perte de fonction d'ARF6, sans toutefois promouvoir sa dégradation [251]. La surexpression de Fbox8 dans les cellules MDA-MB-231 inhibe le processus d'invasion contrôlé par ARF6. Par ailleurs, la perte du potentiel invasif des MDA-MB-231 diminue l'expression de Fbox8 [250]. De récentes données démontrent que la surexpression de c-Myc dans les cellules 293T affecte la distribution de Fbox8 et renverse l'inhibition de l'invasion médiée par Fbox8 ([251]

I.7.5.2 Les ARF-GAPs

L'inactivation des ARF GTPases s'effectue par l'hydrolyse du GTP en GDP et ce, par l'intermédiaire de protéines à activité GTPasique associées aux ARFs (ARF GAP). On dénombre 24 protéines chez les mammifères pourvues d'un domaine ARF GAP. Ces dernières peuvent être divisées en 10 groupes : ARFGAP1, ARFGAP3, SMAP1, Hrb, Centaurine α 1, GIT1, Centaurine β 1, DDEF1, Centaurine- γ 1 et Centaurine δ 1 [295]. Le domaine ARF GAP constitue une séquence d'environ 140 acides aminés et contient une séquence invariable C-X₂-C-X₁₆₋₁₇-C-X₂-C-X₄-R. Les 4 cystéines présentent dans cette structure coordonne la position d'un atome de zinc afin de former une structure en doigt de zinc, où cette conformation joue un rôle structural. De plus, l'arginine située à la fin du motif assure l'activité catalytique du domaine ARF GAP. Cette arginine module également l'activité GAP des autres protéines G comme les Ras, Rho, Rab et Sar1 [314]. Les 10 groupes d'ARF GAP partagent en commun le domaine ARF GAP et sont différenciés par l'ajout de domaines expliquant la diversité et l'évolution de cette famille de protéines. Des 10 familles des ARF GAP, ARFGAP1 fut la première ARF GAP à être identifiée. Celle-ci est distribuée à l'appareil de Golgi et a comme substrat ARF1 [315]. Le domaine ARF GAP peut se localiser soit en région N-terminal (nommée ARFGAP1) ou entre les deux motifs ankyrine (ANK) et PH. La famille 1, constituée d'ARFGAP1, contient, comme les trois sous-familles de type ARF GAP (ARFGAP3, SMAP et Hrb), une région variable en C-terminale. ARFGAP1 possède dans cette région deux motifs ALPS qui servent à former une hélice amphiphatique qui assure la liaison d'ARFGAP1 aux phospholipides membranaires [316]. La famille ARFGAP3, contrairement à ARFGAP1, ne contient pas de motifs ALPS, mais sont pourvus de deux motifs ISSxxxFG dont la fonction demeure inconnue. La famille SMAP1, qui tire son nom de *Stromal Membrane-Associated Protein 1*. SMAP1 chez l'humain, agit comme GAP sur ARF6 et pas ARF1. Pour sa part, la paralogue SMAP2 agit plutôt comme GAP sur ARF1 et pas ARF6 [317] [318]. Les GAP SMAPs possèdent un motif de liaison pour la clathrine dans leur région C-terminal. Des études *in vivo* rapportent que les SMAPs sont impliquées dans le processus d'endocytose, puisque la suppression de SMPAPL (homologue de SMAP2) freine le recyclage du

récepteur à la transférine. La famille Hrb tient son nom de *HIV-Rev-binding protein* puisqu'elle a été caractérisée comme importante dans l'exportation de l'ARN messager du VIH [319]. Bien qu'Hrb soit garnie d'un domaine ARF GAP en position N-terminale, la fonction GTPasique de cette protéine demeure un élément à élucider. La région variable en C-terminale contient plusieurs motifs FG et NFG servant notamment à la liaison avec la protéine adaptatrice de la clathrine Eps15 via son domaine EH [320]. Des essais de criblage d'interaction protéine-protéine par double-hybride ont permis de déterminer une nouvelle protéine s'associant avec GRK. Cependant, *in vivo*, les GITs n'interagissent pas avec GRK [321]. GIT1 et 2 possèdent trois motifs ANK en N-terminal, suivis d'un motif Spa et d'un domaine d'interaction pour la Paxiline [322]. Les GITs interagissent avec PIX (*PAK-interactive Rho/Cdc42 exchange factor*) via un domaine central SHD (*Spa2 Homology Domain*) [323]. La liaison de GIT avec la Paxiline aux complexes d'adhésion focaux permet l'activation de la Rho GEF et de l'effecteur de Rac1 et Cdc42, PIX et PAK respectivement. *In vitro*, les GITs peuvent agir sur les trois classes des ARFs [321]. GIT1 est exprimée dans les poumons, le cerveau et le foie alors que GIT2 est exprimé de manière ubiquitaire [324] [325]. La forme courte de GIT2 est distribuée au niveau de l'appareil de Golgi et assure spécifiquement l'inactivation d'ARF1 [326]. Le domaine ARF GAP de GIT n'agit pas sur la formation de points focaux, de même que sur les interactions entre les protéines impliquées. Cependant, comme GIT a la capacité de moduler l'inactivation de ARF6 et que l'activation de ARF6 a récemment été associée à la formation des points d'adhérence primordiaux (non matures) [287], il n'est pas exclu que GIT puisse inactiver cette distribution de ARF6. La famille de Centaurine- α possède deux domaines PH à la suite de son domaine ARF GAP. La Centaurine- α 1 associe avec une haute affinité les phospholipides-1, 3, 4, 5-tétrakisphosphate ou phosphatidylinositols-3, 4, 5 triphosphate et ce, par l'intermédiaire des deux motifs PH. La Centaurine- α 2 est exprimée de façon ubiquitaire alors que l'isoforme α 1 est restreinte au cerveau [327]. Les fonctions *in vivo* des Centaurines- α demeurent à ce jour, indéterminées. De plus, l'activité GTPasique de ces protéines reste à tester *in vitro*. Cependant, leur surexpression bloque le recrutement d'ARF6 à la membrane plasmique [328]. La famille des Centaurine- β s composée des

isoformes $\beta 1$, 2 et 5 contient en plus d'un domaine *Coiled-Coil* en N-terminal un motif BAR. Aussi nommée ACAPs pour *Coiled-Coil domain, ANK repeat and PH domain*, les Centaurine- $\beta 1$ et 2 ont une activité GTPasique sur ARF6 qui est dépendante de la liaison au PI(4,5)P₂ et également aux ARF1 et ARF5 [329]. Bien que les Centaurine- β s ne démontrent aucune fonction *in vivo*, il demeure important de mentionner que d'autres protéines contenant le domaine BAR sont impliquées dans la formation d'extension tubulaire de la membrane. En effet, la Centaurine- $\beta 2$, lorsque surexprimée, déclenche la formation de tubules intracellulaires [330]. La Centaurine- $\beta 1$ peut associer les tubules endosomaux lorsqu'ARF6 ou la kinase PIP5K sont surexprimés [331]. La famille DDEF1 exerce également des activités GTPasiques qui, comme la famille des Centaurine- β s, sont dépendantes de la liaison aux PI(4,5)P₂. Initialement, DDEF1 fut identifiée comme une ARF GAP d'ARF1 dans les cerveaux bovins [332]. Or, il semble que DDEF1 soit également impliquée dans la différenciation des fibroblastes en adipocytes. À cause de ces observations expérimentales, elle fut nommée DDEF1 pour *Development and Differentiation Enhancing Factor1* [333]. DDEF1 est aussi connue sous l'appellation d'ASAP pour *ARF GAP with SH3, ANK repeat and PH domain*. Les deux isoformes DDEF1 et DDEF2 furent isolées chez les vertébrés. Outre le fait que la structure de DDEF1 partage les domaines BAR, PH, ARF GAP et ANK des Centaurines, DDEF1 se distingue par son C-terminal garni d'une région riche en proline et d'un motif SH3. D'une part, le domaine SH3 de DDEF1 s'associe *in vitro* à FAK. De plus, la région riche en proline permet à DDEF1 de s'associer aux protéines pourvues d'un domaine SH3, comme Src, CD2 et CN85 [333] [334] [335]. Des essais *in vitro* démontrent que DDEF1 a une activité GAP plus élevée sur ARF1 et ARF5 que sur ARF6 [336]. Comme ARF6, DDEF1 ou ASAP1 ou AMAP1 sont anormalement surexprimées dans les MDA-MB-231, une lignée du cancer du sein hautement invasive en comparaison avec les cellules non invasives épithéliales mammaires humaines (HMEC) [337]. La Centaurine- $\gamma 1$, membre de la famille des Centaurine- γ s, aussi nommée AGAP pour *ARF GAP with GTP binding protein like, ANK repeat and PH domain*, est exprimée uniquement au cerveau alors que l'isoforme $\gamma 2$ est exprimée de façon ubiquitaire. Ces deux isoformes présentent une activité GTPasique

sur ARF1 et ARF5, mais pas ARF6 [338, 339]. L'isoforme 1 co-localise avec la protéine adaptatrice de clathrine AP3, tandis que l'isoforme 2 s'associe avec AP-1 [339, 340]. Ces observations suggèrent que ces Centaurines assurent leur fonction de ARF GAP lors de l'enrobage des vésicules via AP-1 et AP-3 [339] et ce, indépendamment du domaine Miro. De plus, des analyses d'immunohistochimie et de FISH révèlent une forte expression d'ASAP1 dans le cancer de la prostate associée au potentiel métastatique de ce cancer [341]. De plus, il y a la famille des Centaurine- δ , aussi nommée ARAP pour *ARF GAP with Rho GAP, ANK repeat and PH domain*. La Centaurine- $\delta 1$ agit sur l'inactivation d'ARF1 et ARF5, tandis que les isoformes $\delta 2$ et $\delta 3$ inactivent préférentiellement ARF6 [342-344]. Exprimées de façon ubiquitaire, les Centaurine- δ s semblent contrôler la coordination entre ARF6 et l'activité des GTPases Rho. Ces Centaurines ont la capacité de moduler la structure du cytosquelette d'actine et ainsi d'en affecter la morphologie de la cellule. Cet effet biologique semble toutefois être dépendant de la présence des domaines ARF GAP et Rho GAP. Enfin, récemment, il a été démontré que PIKE (AGAP2/Centaurin- $\gamma 1$) peut se relocaliser dans le noyau [345].

I.8 Hypothèse de recherche

Les deux GTPases de type ARF les plus étudiées sont ARF1 et ARF6. Au cours de la dernière décennie, plusieurs études démontrent qu'ARF6 est impliquée dans divers processus physiopathologiques, tels que le cancer du sein. De plus, les études menées jusqu'à maintenant dans le modèle cellulaire et murin démontrent qu'ARF6 contrôle les processus d'adhésion, de migration, d'invasion et de formation de métastases. Le groupe de Schorey a démontré qu'ARF6 contrôle la formation des jonctions d'adhérence des cellules épithéliales MDCK, notamment en modulant l'endocytose de la Cadherine-E [176]. La migration cellulaire des MDCK est également modulée par ARF6 et ce, de manière dépendante de la ARF GEF Cytohésine-2/ARNO [274]. En lien avec ces études, il a été illustré que BRAG2/GEP100 module spécifiquement l'activation d'ARF6 par un mécanisme impliquant l'activation de l'EGFR. La suppression d'ARF6 ou de

GEP100 bloque les processus de migration, d'invasion et de formation de métastases des cellules cancéreuses du cancer du sein [248].

Bien qu'ARF1 soit reconnue pour être classiquement distribuée à l'appareil de Golgi, afin de moduler le transport vésiculaire, des données suggèrent que cette GTPase est également retrouvée à la membrane plasmique de certains types cellulaires [154, 241, 251, 252]. Par ailleurs, il a été démontré qu'ARF1 contrôle la ségrégation des chromosomes, principalement lors de la terminaison de la cytokinèse [152].

Hypothèse. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'ARF1 module les phénomènes de migration et de prolifération des cellules cancéreuses du cancer du sein. Afin d'étudier le rôle physiologique d'ARF1 dans ces phénomènes biologiques, nous examinerons l'importance de l'expression et de l'état d'activation de la GTPase. Pour ce faire, nous utiliserons la technique de l'interférence à l'ARN afin de diminuer le niveau d'expression endogène d'ARF1 et l'approche par surexpression des mutants dominants négatifs (ARF1T³¹N) et constitutivement actifs (ARF1Q⁷¹L) d'ARF1.

Dans le but d'étudier le rôle d'ARF1 dans le cancer du sein, nous avons choisi comme modèle la lignée cellulaire des MDA-MB-231, soit des cellules hautement invasives associées au cancer du sein et négatives pour les récepteurs à l'estrogène, la progestérone et l'Her2/Neu.

Objectif 1. Nous étudierons le rôle d'ARF1 dans la migration cellulaire médiée par l'activation du récepteur à l'EGF, incluant la ou les voie(s) de signalisation modulée(s) par ARF1 dans les mêmes conditions physiologiques.

Objectif 2. Nous éluciderons le rôle d'ARF1 dans la prolifération des MDA-MB-231, notamment en étudiant le rôle d'ARF1 sur la régulation de protéine pRb dans l'induction de la sénescence.

Objectif 3. Nous définirons le rôle des ARF GEFs Cytohésine-1 et Cytohésine-2 dans l'activation d'ARF1 régulée par l'activation de l'EGFR. De plus, nous investiguerons le rôle d'ARF1 et des ARF GEFs d'intérêt dans l'initiation de la transition épithéliale-

mésenchymateuse (EMT) des MDA-MB-231 et des MCF7 (cellules non invasives du cancer du sein).

Chapitre II

ARF1 controls the activation of the PI3K pathway to regulates EGF dependent growth and migration of breast cancer cells

(publié dans le journal: The Journal of Biological Chemistry,
(283;52,36425-36434, December 26, 2008)

Pierre-Luc Boulay#, Mathieu Cotton#, Paul Melançon&, and Audrey Claing#

Contribution des auteurs:

PLB: Réalisation de la majorité des expériences, conceptualisation du projet et l'écriture

MC: Réalisation des analyses de PCR en temps réel

PM : Don de l'anticorps p115 et des plasmides ARF1-GFP et ARF3-GFP

AC : Conceptualisation du projet e l'écriture

From the #Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montréal, Montréal, QC, Canada H3C 3J7, &Department of Cell Biology, University of Alberta, Edmonton, AB, T6G 2H7.

Running title: EGFR activates ARF1 to regulate growth and migration

Correspondence to Audrey Claing, P.O. Box 6128, Downtown station, Montreal, QC, Canada H3C 3J7

Telephone: (514) 343-6352

Fax: (514) 343-2291

II.1 Summary

Activation of intracellular signaling pathways by growth factors is one of the major causes of cancer development and progression. Recent studies have demonstrated that monomeric G proteins of the Ras family are key regulators of cell proliferation, migration, and invasion. Using an invasive breast cancer cell lines, we demonstrate that the ADPribosylation factor 1 (ARF1), a small GTPase classically associated with the Golgi, is an important regulator of the biological effects induced by epidermal growth factor (EGF). Here, we show that this ARF isoform is activated following EGF stimulation and that in MDA-MB-231 cells, ARF1 is found in dynamic plasma membrane ruffles. Inhibition of endogenous ARF1 expression results in the inhibition of breast cancer cell migration and proliferation. The underlying mechanism involves the activation of the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) pathway. Our data demonstrate that depletion of ARF1 markedly impairs the recruitment of the PI3K catalytic subunit (p110 α) to the plasma membrane, and the association of the regulatory subunit (p85 α) to the activated receptor. These results uncover a novel molecular mechanism by which ARF1 regulates breast cancer cell growth and invasion during cancer progression.

II.2 Introduction

The epidermal growth factor receptor (EGFR) is considered a major oncogenic factor and its presence in tumors is indicative of poor prognosis (1,2). EGFRs not only modulate growth properties of transformed cells, but are causally involved in survival signaling, cell migration, angiogenesis and metastasis (3-5). EGFR belongs to the ErbB family of membrane-bound receptor tyrosine kinases (RTKs) that comprises four structurally related receptors, namely, the EGFR (HER-1, HerB1), HER-2 (ErbB2 or Neu), HER-3/ErbB3, and

HER-4/ErbB4 (6). With the exception of HER-2, which has no obvious ligand, these receptors bind to their ligands and become activated by homo-dimerization or hetero-dimerization and subsequent tyrosine auto-phosphorylation. The bestknown ligands of EGFRs are EGF, transforming growth factor- α (TGF α), and heparin-binding EGFlike growth factor (HB-EGF) (7). EGFRs transmit extracellular mitogenic signals through the activation of a number of downstream signaling cascades. These include signaling modules that involve the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) pathway (8). Although multiple forms of PI3K exist in higher eukaryotes, the class 1A enzymes are primarily responsible for production of D-3 phosphoinositides in response to ligand-dependent receptor stimulation and tyrosine-kinase activation. Over the past decade, it has become evident that the PI3K signaling pathway is one of the most highly mutated systems in human cancers, underscoring its central role in human carcinogenesis (8). Class 1A PI3Ks are obligate heterodimers in vivo since the p110 catalytic subunits are labile and unstable as monomers (9). Dimerization of a p110 subunit with a p85 regulatory subunit maintains the enzyme in a low-activity state in quiescent cells. Activation requires translocation of the normally cytosolic enzyme to a membrane and direct interaction with an activated receptor (8). The most commonly accepted mechanism for activation of class 1A PI3K by RTKs involves the binding of SH2 domains in p85 to phosphorylated YXXM motifs of activated receptors or their substrates (10,11). Enhanced migration is a fundamental characteristic of tumor cells. This process is believed to be involved in invasion and metastasis. As cells migrate, intracellular signaling cascades are activated to promote remodeling of the actin cytoskeleton to form membrane protrusions. Small GTPases of the Rho and ARF families have been characterized as key players regulating this process. These cycle between an inactive GDP-bound form and an active GTP-bound form through the action of guanine nucleotide exchange factors (GEFs) and GTPase-activating proteins (GAPs) (12). ARF proteins consist of a family of 6 isoforms, and of these, ARF1 and ARF6 are the best characterized. ARF1 is classically associated with the Golgi to regulate vesicle trafficking, while ARF6 is present at the plasma membrane, where it is involved in receptor endocytosis and actin remodeling (13). Fifteen ARF-GEFs are encoded in the human

genome (14). The large number of these regulatory proteins compared to the relatively small number of ARFs suggests that activation of these GTPases is under extensive regulatory control. ARF6 is overexpressed in highly invasive breast cancer cells and plays an essential role during invasion (15,16). Recently, GEP100 was identified as the ARF-GEF linking the EGFR to ARF6 activation in breast cancer cells (16). Furthermore, AMAP1, was reported to act as an effector of ARF6-GTP during invasion of glioblastomas and lung tumors (17). It was suggested that the regulation of invasion by ARF6 is dependent on the activation of the extracellular signal regulated kinase (Erk) (18). Collectively, these findings highlight the importance of ARF6 during cancer progression. Several reports have suggested that ARF1 can also be present on plasma membranes and transmit signal from transmembrane proteins (17,19-21). To better define the role of this ARF isoform in breast cancer development and progression, we examined whether ARF1 can regulate migration and proliferation of invasive cell lines. Our study demonstrates that ARF1 is localized to dynamic plasma membrane ruffles together with the EGFR, and this ARF isoform is activated following EGF stimulation. This small GTPase is critical for both cell migration and proliferation by directly regulating the activation of the PI3K pathway. These findings reveal an unexpected role for ARF1 in the regulation of cancer cell migration and proliferation.

II.3 Materials and Methods

Reagents and Antibodies- Biotinylated EGF complexed to Alexa-Fluor 488 streptavidin, anti-Flag polyclonal antibodies, and Lipofectamine 2000™ were purchased from Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada). EGF was purchased from Fitzgerald Industries International, Inc (Concord, MA, USA). Anti-GFP and Anti-ARF1 (raised against amino acids 174-180: SNQLRNQ of human ARF1 sequence) antibodies were obtained from Abcam (Cambridge, MA, USA). Anti-phosphotyrosine (Y99), anti-p85 α , phospho-p85 α (Y508) and p110 α (N-20) were from Santa Cruz Biotech. Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Anti-Erk1/2, phospho- Erk1/2, phospho-Akt (Ser 473), Akt, EGFR, and phospho-EGFR (Y1148) antibodies were from Cell Signaling Technology® (Danvers, MA, USA). Anti-

HA (3F10) antibody was from Roche Applied Science (Laval, QC, CANADA). Monoclonal anti-p115 antibody (7D1; (22)) was a gift from Dr. Dennis Shields (A. Einstein College of Medicine, NY, USA). Polyclonal anti-ARF6 antibody was a gift from Dr. Julie Donaldson (NIH, USA). LY294002 was from Cayman Chemicals (MI, USA). MEBM was from Cambrex Bio Science Walkersville Inc (Walkersville, MD, USA). Alexa-Fluor 488 phalloidin and all secondary antibodies coupled to an Alexa-Fluor were from Molecular Probes (Eugene, OR). All others products were from Sigma Aldrich Company (Oakville, ONT, CANADA).

DNA plasmids and Small interfering RNAs- ARF1-Flag was a gift from Dr Jean-Luc Parent (University of Sherbrooke, QC, Canada). ARF1-GFP and ARF3-GFP plasmids were previously described (23). siRNA insensitive ARF1 mutant (ARF1mut) was constructed by introducing silent mutations (aatattttgca), which contained an Ssp1 site into nucleotide sequence 7-18 (aa 3-6) of wild type ARF1 (pBKΔ) by PCR. All constructs were analyzed by DNA sequencing (Sequencing service, IRIC, University of Montreal, QC, Canada). Double-stranded scrambled, ARF1, and ARF6 (#1) siRNAs, with 19-nt duplex RNA and 2-nt 3'dTdT overhangs were previously described (24,25). The 21-nucleotide sequence for the second siRNA targeting ARF1 (#2) was 5'-gaaatgcgcatcctcatggtgg-3' corresponding to region 50 to 71 of the human ARF1 mRNA. All siRNA were synthesized using the Silencer™ siRNA Construction Kit from Ambion (Austin,TX).

Cell culture and Transfection- MDA-MB-231, SKBR3 and MCF10a cells were obtained from Dr. Sylvie Mader (University of Montreal, QC, Canada) and MDA-MB-435 were provided by Dr. Morag Park (McGill University, QC, Canada). Cells were maintained at 37°C, 5%CO₂ in DMEM supplemented with 10% FBS(MDA-MB-231, MDA-MB-435 and SKBR3 cells) or in MEBM supplemented with 0.52 mg/ml bovine pituitary extract, 10 ng/ml recombinant EGF, 10 µg/ml insulin, 1 µg/ml hydrocortisone, 0.1 mg/ml gentamycin and 0.1 µg/ml amphotericin B (MCF10a cells). Cells were transfected with DNA (48 h) and/or siRNA (72 h) using Lipofectamine™ 2000 according to the manufacturer's instructions.

Western blotting- Cells were harvested in 60 μ l of TGH buffer (pH 7.3, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 50 mM NaCl, 50 mM HEPES, 5 mM EDTA) complemented with protease inhibitors and 1 mM sodium orthovanadate. Cell lysates were solubilized (4°C, 1 h) and total soluble proteins were run on polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blotted for relevant proteins using specific primary antibodies (described for each experiment). Secondary antibodies were all FITC-conjugated and fluorescence was detected using a Typhoon 9410 scanner (Amersham Biosciences). Quantification of the digital images obtained was performed using ImageQuant 5.2 software.

Real-time PCR- For real-time reverse transcription-PCR, 5 μ g of total mRNA was reverse-transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with random primers (Applied Biosystems, Foster City, CA). Gene expression level was determined using primers and probe sets from Applied Biosystems (ABI Gene Expression Assays, <http://www.appliedbiosystems.com/>). PCR reactions for 384 well plate formats were performed using 2 μ l of cDNA samples (20-50 ng), 5 μ l of the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA), 0.5 μ l of the TaqMan® Gene Expression Assays (20X) and 2.5 μ l of water in a total volume of 10 μ l. The ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) was used to detect the amplification level and was programmed to an initial step of 10 min at 95°C, followed by 45 cycles of 15 sec at 95°C and 1 min at 60°C. All reactions were run in triplicate and the average values were used for quantification. Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, β Actin, and 18S ribosomal RNA were used as endogenous controls. Primers for ARFs were the following: ARF1 gccactactccagaacacaca (forward) and ctcggtcacacgctctctgt (reverse), ARF3 werecgcagctgatagcaggaac (forward) and ctgctttctggggacagtg (reverse), ARF4 were catgggectcactatctct (forward) and gcagcatccaatccaacc (reverse), ARF5 tcttcgggaagaagcagatg (forward) and aagcctatggtgggatggt (reverse), and ARF6 were gactgcaaaggcagtatacagga (forward) and accatgatatcccgtcaat (reverse).

Activation of ARF1 and ARF6- Cells were plated into 6 well dishes, and serum-starved for 24 h. Cells were stimulated with EGF (10 ng/ml) at 37°C for the indicated times and

activation of ARF1 and ARF6 was measured as described previously (25). Briefly, cells were lysed in 60 μ l of ice-cold lysis buffer E. Samples were incubated for 30 min (4°C) and spun for 10 min at 10 000 rpm. GST-GGA3 (1-316) (26) coupled to glutathione Sepharose 4B were added to each tube and samples were rotated at 4°C for 1 h. Proteins were eluted in 25 μ l SDS-sample buffer by heating to 95°C for 5 min. Detection of ARF1-GTP and ARF6-GTP was performed by immunoblot analysis using an anti-ARF1 or anti-ARF6 antibody.

Confocal Microscopy- MDA-MB-231 cells transfected with ARF1-Flag or ARF6-HA constructs were serum-starved for 1 h, stimulated with EGF (10 ng/ml) as indicated, and fixed using paraformaldehyde (4%) for 15 min at room temperature. Overexpressed ARF1-Flag or ARF6-HA were detected using a polyclonal anti-Flag antibody and a secondary antibody coupled to Alexa-Fluor 568 or a monoclonal anti-HA antibody and an anti-mouse antibody coupled to Alexa-Fluor 568, respectively. In some experiments, cells were subsequently incubated with Phalloidin-488 for 1 h. In a second set of experiments, the secondary antibody used to detect ARF1-Flag was coupled to Alexa-Fluor 488. These cells were subsequently incubated with a p115 antibody (monoclonal) and a secondary antibody coupled to Alexa-Fluor 568. For labelling of the EGFR, cells were transiently transfected with siRNA directed against ARF1 (together with 5 nM of an Alexa-Fluor 546-labelled control siRNA (24) or with a scrambled siRNA (25 nM for 72 h). Cells were washed once and incubated with biotinylated EGF complexed with Alexa-Fluor 488 streptavidin (EGF-488) (5 μ g/ml) for 30 min on ice. For internalization experiments, cells were simply incubated with the EGF-488 for 20 min, and fixed. Alternatively, cells were labelled with a polyclonal anti-EGFR or a polyclonal anti-phospho-EGFR (Y1148), and a secondary anti-rabbit antibody coupled to Alexa-Fluor 488. All fixed cells were mounted onto slides using Gel Tol mounting medium. All images were acquired using a 63X oil immersion objective (Carl Zeiss, Inc.), at room temperature, on a Zeiss LSM-510 META laser scanning microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Assessment of receptor levels at the plasma membrane was performed using MetaMorph software's analytical functions. Images obtained from five cells (2 different experiments) were analyzed for each condition

(control and ARF1 depleted cells). Briefly, cells were labelled as described above (polyclonal anti-EGFR antibody and secondary anti-rabbit antibody coupled to Alexa-Fluor 488), and images acquired on the confocal microscope. For each image, 10 areas of the plasma membrane of identical size, per cell, were examined using MetaMorph. EGFR levels correspond to the average fluorescence intensity determined for each condition.

Wound healing assay- 8×10^6 MDA-MB-231 cells were seeded onto coverslips in 6-wells plates, transfected with a scrambled or ARF1 siRNA (25 nM for 72 h), and serum starved for 24 h. Three scratches were performed using a micropipette tip to wound confluent cells. Cells were subsequently treated with EGF and fixed after 6 h using paraformaldehyde, and stained using crystal violet (0.1 % in 20% MeOH: overnight). Pictures of 5 different fields were taken, and a representative picture is presented for each condition.

Migration assay- Cells were transfected with siRNA (72 h) or plasmid DNA (48 h) and serum starved 24 h before the assay as in (25). Briefly, cells were trypsinized and seeded into Boyden chambers (24-well inserts with 8 μ m pore, coated with collagen). One hour after plating, cells were stimulated with EGF (10 ng/ml). After 6 h, cells were fixed using paraformaldehyde and incubated with crystal violet. Membranes were washed (dH₂O), cells present in the upper chamber were removed and migrated cells quantified in the lower chamber. For some experiments, cells were pretreated with PD98059 or LY294002 (15 μ M) for 30 min before EGF (10 ng/ml) stimulation.

Growth assay- Cells were transiently transfected with siRNA (72 h) or plasmid DNA (48 h), and serum starved for 24 h. Equal amounts of cells were reseeded into 10 cm dishes. After 1h, for some experiments, cells were pretreated with PD98059 or LY294002 (15 μ M) for 30 min, and then stimulated with EGF (10 ng/ml) or left untreated. 24 h later, the media was changed for fresh complete media and all sets of cells were left for 4 days. Cells were counted for each condition.

Co-immunoprecipitation- MDA-MB-231 cells were serum-starved overnight and stimulated with EGF (10 ng/ml, 37°C) for the indicated times. Coimmunoprecipitation experiments were described previously (25). Briefly, cells were lysed into TGH buffer (60

μl) and EGFR was immunoprecipitated (IP) using the anti-EGFR antibody. Interacting p85α was assessed by Western blot analysis.

p110α membrane recruitment- MDA-MB-231 cells transfected with a scrambled siRNA, ARF1 siRNA, or ARF1 siRNA and ARF1mut were serum starved and stimulated with EGF (10 ng/ml) for the indicated times. Cells were then harvested in 300 μl of PBS buffer containing protease inhibitors. Cell membranes were disrupted by passing 3 times through a 27G1/2 syringe. Cell lysates were then centrifuged for 10 min at 500 x g to discard the nucleus and cellular debris, and the supernatants were ultracentrifuged at 100 000 x g (30 min, 4°C), to separate cytosolic and membrane fractions. Membrane pellets were then lysed for 10 min in 100 μl of ice-cold TGH buffer. Samples were run on a 10% polyacrylamide gel. Proteins were detected by immunoblot analysis using specific antibodies (anti-p110α, anti-Akt).

Statistical analysis- Statistical analysis was performed using either a one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni's multiple comparison test using GraphPad Prism (ver. 4.0a; San Diego, CA).

II.4 Results

EGF stimulation promotes the transient activation of ARF1 and ARF6

To determine whether stimulation of endogenously expressed EGFR led to the activation of ARF1 and/or ARF6 in invasive breast cancer cells, we first examined levels of GTP-bound ARFs. As shown in Fig. 13A, EGF-treatment of MDA-MB-231 cells resulted in the rapid and transient activation of endogenous ARF6 and ARF1, where maximal levels of GTP-binding were detected after 30 and 60 sec, respectively. In order to assess the role of endogenous ARF1 in EGF-dependent cellular responses, we designed siRNAs that specifically targeted the human ARF1 sequence and tested their effects on MDA-MB-231 cells. As illustrated in Supplementary Fig. 21A, transfection of either ARF1 siRNA (#1, #2) reduced the expression of ARF1 without affecting ARF6 levels. Western blot analysis revealed that the minimal concentration of siRNA (ARF1#1) to produce the maximal inhibition of ARF1 expression (90%) was 25 nM (Supplementary Fig. 21B) and the

optimal time of transfection to achieve this inhibition was 3 days (Supplementary Fig. 21C). Efficacy of siRNA transfection for these conditions was over 90%, and cell viability assessed by Trypan blue was similar in scrambled and ARF1 siRNA transfected cells (data not shown). Because no commercial antibodies are available to examine expression levels of other ARF isoforms, we next quantified mRNA levels of all ARF isoforms using Real-Time PCR. As illustrated in Supplementary Fig. 21D, only ARF1 mRNA levels were reduced in ARF1 siRNA (25 nM, 72h) transfected cells. In order to control for siRNA off target effects, we designed an ARF1 mutant insensitive to ARF1 siRNA #1 (ARF1mut). As illustrated in Supplementary Fig. 21E, expression of ARF1mut in cells transfected with ARF1 siRNA resulted in ARF1 expression levels similar to those observed under control conditions. Finally, we confirmed the specificity of the ARF1 antibody against ARF3 since these two isoforms are highly homologous. As illustrated in Supplementary Fig. 21F, the anti-ARF1 antibody does not detect overexpressed GFP-tagged ARF3. Additional transfection experiments with ARF6 siRNA reduced expression of this ARF isoform by 80% in MDAMB-231 cells (Supplementary Fig. 21G). Using the siRNA strategy, we next investigated whether the activation of ARF1 was necessary for the activation of ARF6, and vice-versa. It was previously suggested that activated ARF6 recruits ARNO family GEFs for further activation of other ARF isoforms (20). As illustrated in Fig. 13B, depletion of ARF6 did not affect ARF1 activation following EGF stimulation of MDA-MB-231 cells. Similarly, ARF1 depletion did not affect the ability of the EGFR to activate ARF6 suggesting that these two GTP-binding proteins are activated independently following EGF stimulation.

ARF1 and ARF6 are both localized to the plasmamembrane of MDA-MB-231 cells

We next examined the cellular distribution of ARF1 and ARF6. As presented in Fig. 14A, ARF1-Flag is found inside the cytoplasm, but also present on dynamic plasma membrane ruffles, co-localizing with actin. Scanning of the cells, at a different confocal plane, confirmed that ARF1-Flag is present at the Golgi complex where it colocalizes with p115 (Supplementary Fig. 22). EGF stimulation led to the formation of membrane protrusions but had no significant effect on the cellular distribution of this ARF isoform, which

remained associated with ruffling areas. As expected, overexpressed ARF6-HA associated primarily with the plasma membrane (Fig. 14). Altogether, these data demonstrate that localization of ARF1 to dynamic plasma membrane ruffles is consistent with signalling events emanating from the cell surface.

ARF1 regulates the EGF-dependent migration and proliferation of MDA-MB-231 cells

Breast cancer cell migration is an important cellular process necessary for metastasis. The role of ARF6 in regulating cellular invasiveness has been previously demonstrated (15,18). In this study, we therefore focused on ARF1 and next investigated whether this ARF isoform can also act to control cell migration. As expected, EGF stimulation increased the motility and invasive capacity of MDA-MB-231 cells in the wound healing assay as well as in the collagen-coated Boyden chamber assay (Fig. 15). Depletion of ARF1 completely abolished the EGF-dependent effects (Fig. 15A and B), which was reversed by overexpressing an siRNA insensitive ARF1 mutant (ARF1mut). Furthermore, overexpression of wild type ARF1 (1.6 fold, 44% transfection efficiency) increased EGF-promoted migration (Fig. 15C), while overexpression of a dominant negative mutant of ARF1, ARF1T31N (1.5 fold, 63% efficiency), prevented EGF-stimulated cell migration. These data suggest that modulation of ARF1 activation leads to altered cell migration. EGFR activation is also associated with enhanced breast cancer cell growth. Accordingly, EGF treatment increased the proliferation rate of MDA-MB-231 cells by 1.6 fold compared to non-stimulated cells assessed after 4 days of culture. Transfection of ARF1 siRNA totally blocked the EGF-mediated response, and co-transfection of ARF1mut increased basal and EGF-stimulated proliferation compared to control conditions (Fig. 16A). As illustrated in Fig. 16B, both basal and EGF-dependent cell proliferation was enhanced in conditions where ARF1 was overexpressed. In contrast, expression of ARF1T31N blocked the EGF-mediated response. Our findings are therefore in agreement with the hypothesis that the small GTPase ARF1 plays an essential role not only in EGFdependent breast cancer cell migration, but also proliferation.

Depletion of ARF1 does not alter EGFR expression or activation

One possible explanation for a reduced migration and growth of breast cancer cells depleted of ARF1 is the possibility that this ARF isoform plays a role in the expression of EGFR and/or its activation by EGF. To test this possibility, we first examined the distribution of endogenous EGFR (identified with EGF coupled to Alexa-Fluor 488) in control and ARF1 depleted (identified by cotransfection with an irrelevant siRNA coupled to Alexa-Fluor 546) cells. Our data indicate that ARF1 knockdown does not affect targeting of the EGFR to the plasma membrane, nor its internalization from the cell surface (Fig. 17A). Alternatively, we next examined the distribution of receptors using a specific EGFR antibody. As expected, endogenous EGFRs were found in dynamic plasma membrane ruffles and to a lesser extent, on cytoplasmic structures (Fig 17B). Moreover, analysis of EGFR levels present at the plasma membrane, using MetaMorph software, confirmed that the intensity of the fluorescence was similar in control and ARF1 depleted cells. Finally, the ability of EGF to promote activation of its endogenously expressed receptors as assessed by receptor tyrosine phosphorylation appears similar in control and ARF1 siRNA-transfected MDA-MB-231 cells (Fig. 17C, D and E). These data strongly suggest that EGFRs are functional in ARF1-depleted cells. Because growth factors such as the EGFR use the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) and Phosphoinositide-3 kinase (PI3K) pathways to transmit signal from their receptors, we next examined the role of ARF1 in regulating the activation of these two signaling cascades.

Depletion of ARF1 significantly impairs the ability of the EGFR to signal through the PI3K but not the MAPK pathway

EGF promoted migration and proliferation of MDA-MB-231 cells can be significantly reduced by pretreatment with biochemical inhibitors of either the MAPK or the PI3K pathway, the PD98059 and LY294002 compounds, respectively (Fig. 18A and B). Fig. 18C and D demonstrate that these inhibitors are indeed effective in blocking the EGF-dependent phosphorylation of Erk1/2 as well as Akt, respectively, in cells transfected with a scrambled siRNA. To test the involvement of ARF1 in the regulation of these two signaling pathways, we measured EGFR-induced phosphorylation of Erk1/2 and Akt in ARF1-depleted cells. ARF1 knockdown did not affect the ability of EGF to activate the MAPK

pathway (Fig. 18E and G). However, activation of the PI3K pathway following EGF stimulation was completely abolished under these conditions (Fig. 18F and H). To further support the role of ARF1 in regulating the PI3K/Akt pathway, we examined the effect of overexpressing the ARF1 dominant negative mutant. As illustrated in Supplementary Fig. 23A, transfection of ARF1T31N blocked the EGF-dependent phosphorylation of Akt, while it had no effect on Erk1/2 activation. In addition, our data show that depletion of ARF6 had no effect on Akt phosphorylation while it markedly reduced the ability of the EGFR to promote the activation of Erk1/2 (Supplementary Fig. 24B). These data therefore support the idea that ARF1, at the plasma membrane, specifically regulates the activation of the PI3K pathway, while ARF6 is an important player in the activation of the MAPK pathway. Hence, we next investigated the role of *ARF1 in regulating PI3K activation*

Impaired recruitment of PI3K in ARF1 depleted cells. Upon RTK stimulation, class 1A PI3K are classically recruited to the activated receptor at the plasma membrane to convert PIP2 into PIP3, leading to the recruitment of Akt allowing its phosphorylation (27,28). Here, we first used a biochemical approach to examine the plasma membrane translocation of p110, the catalytic subunit of PI3K as well as Akt. As illustrated in Fig. 19A, EGF-stimulation led to the enrichment of p110 α and Akt in membrane fractions. Depletion of ARF1 completely abolished the agonist-dependent recruitment of the catalytic subunit of PI3K and Akt to the plasma membrane, which was reversed by expression of the ARF1 siRNA insensitive construct (ARF1mut). Although the regulatory subunit of PI3K exhibits no enzymatic activity, it is crucial for regulating the activation of class 1A PI3K by RTKs. Upon EGF stimulation, p85 α has been shown to be recruited to the activated receptor and become phosphorylated. As illustrated in Fig. 19B, EGF stimulation led to the formation of a complex including the EGFR and p85 α . Depletion of ARF1 markedly impaired the interaction between the activated receptor and the regulatory subunit of PI3K. We also monitored tyrosine phosphorylation of the p85 α regulatory subunit. As shown in Fig. 19C, EGF stimulation led to the phosphorylation of p85 α assessed by a phosphospecific p85 α Y508) antibody and a total phosphotyrosine (Y99) antibody. Depletion of ARF1 abrogated

the EGF-dependent phosphorylation of p85 α . Collectively, our data suggest that ARF1 is a key protein regulating the PI3K pathway in breast cancer cells.

Migration and proliferation of MDA-MB-435 and SKBR3 cells are also regulated by ARF1

In order to determine whether the mechanism we uncovered is general, we examined the role of ARF1 in regulating migration and growth of other breast cancer cell lines. We chose MDA-MB-435 cells, which are similar to MDA-MB-231, as well as SKBR3 cells, which express high levels of HER2 (29). All cell lines expressed high level of EGFR when compared to a control immortalized, non-cancerous human mammary epithelial cell line, MCF10a (Fig. 20A). MDA-MB-435 cells expressed low levels of ARF1, similar to those of MCF10a, while MDA-MB-231 cells contained levels of ARF1 higher than MDAMB-435. SKBR3 cells expressed much higher levels of ARF1. In all cancer cell lines, EGF-stimulation resulted in the activation of ARF1 (data not shown). EGF stimulation led to a 3.7 and 1.7 fold increased of MDA-MB-435 and SKBR3 cell migration, respectively. Depletion of ARF1 markedly reduced the EGF-mediated response (Fig.20B). Interestingly, overexpression of wild type ARF1 had no effect on the extent of the EGF-dependent response in MDA-MB-435 cells while it markedly increased the migration of SKBR3 cells (Supplementary Fig. 24A). As previously observed, expression of the ARF1 dominant negative mutant inhibited the EGF-dependent response in the two cell lines studied (Supplementary Fig. 24A). Knockdown of ARF1 expression blocked the EGF-stimulated proliferation of both MDA-MB-435 and SKBR3 cells. In the case of the latter, ARF1 knockdown also reduced basal growth (Fig. 20C). Overexpression of ARF1 increased proliferation of both cell lines, while expression of the ARF1 dominant negative (ARF1T31N) was inhibitory (Supplementary Fig. 23B). As observed in MDA-MB-231 cells, depletion of ARF1 in SKBR3 cells differentially affected the PI3K and MAPK pathways: it totally abolished the ability of the EGFR to induce phosphorylation of Akt (Supplementary fig. 24C), but did not impair activation of Erk1/2 (Supplementary Fig. 24D). Taken together, these studies suggest that ARF1 plays a general role in the migratory and proliferative abilities of breast cancer cell lines through the regulation of the PI3K pathway.

II.5 Discussion

In this study, we describe a critical role for the small GTPase ARF1 in EGF-dependent breast cancer cell migration and proliferation. Specifically, we show that this ARF isoform is present at the plasma membrane and regulates activation of the PI3K pathway. Although ARF1 has classically been associated with the Golgi and the secretory pathway (13), our data together with recent reports (20) clearly illustrate that it can also be found at the cell periphery and regulate signaling from the plasma membrane. It was proposed that the ability of ARF1 to cycle off the Golgi to the cytosol upon GTP hydrolysis makes it available for recruitment onto other membrane (20). In addition, Li and colleagues have shown that insulin stimulation promotes the transient recruitment of ARF1-GFP to the plasma membrane of HeLa cells (30). Here, we demonstrate that in MDA-MB-231 cells, this ARF isoform partially localized to dynamic plasma membrane ruffles in non-stimulated conditions, and that EGF-stimulation promotes its rapid and transient activation. ARF1 also colocalizes with p115 at the Golgi, as expected, and appears diffusely through the cytoplasm, a distribution characteristic of an inactive form. Using a silencing approach, our findings indicate that ARF6 is not required for the EGF-dependent activation of ARF1 in MDA-MB-231 cells. Conversely, ARF1 depletion does not impair EGF-dependent activation of ARF6. These results therefore suggest that EGF stimulation of invasive breast cancer cells can lead to both ARF1 and ARF6 activation. In order to study the role of ARF1 in cell migration and proliferation, we have used two different strategies: the reduction of cellular expression levels by RNA interference, and overexpression of wild type or mutant ARF1 proteins. Altogether, these complementary approaches yielded consistent results demonstrating that ARF1 is an important regulator of both the migration and proliferation of invasive breast cancer cells. Because this ARF isoform is a central regulator of the secretory pathway, we first investigated whether EGFR expression and signaling might be altered in ARF1-depleted cells, thereby resulting in decreased migration and proliferation. Using a different cell line, Volpicelli-Daley and colleagues previously reported that no single ARF was essential for any step of membrane trafficking (31). Our data revealed similar findings. Depletion of ARF1 did not impair EGFR expression, targeting to the cell

surface, activation by EGF, or signaling through the MAPK pathway. In addition, expression of an ARF1 mutant insensitive to ARF1 siRNA effectively restored EGF-dependent cell migration and proliferation, thereby excluding off-target effects of the ARF1 siRNA. Therefore, the inhibition of migration and growth observed following ARF1 depletion are unlikely to be due to impaired EGFR function, but specific for EGFR-dependent signalling events. To confirm our data, we next examined the impact of ARF1 overexpression using a method that yielded elevated transfection efficiency. Under these conditions, EGF-dependent cell migration, and both basal and stimulated growth were enhanced. In contrast, transfection of a dominant negative mutant, ARF1T31N, causing ARF1 to exist primarily in a GDP-bound state, blocked the EGF-dependent effects. Expression of this mutant has previously been shown to result in the redistribution of β -COP from the Golgi membranes to the cytosol and the collapse of the Golgi into the ER (32). In our experiments and conditions, activation of the MAPK pathway in ARF1T31N transfected cells remained intact suggesting that EGF-dependent signalling events are not altered by expression of this ARF1 mutant. The nature of the ARF-GEF responsible for ARF activation upon EGF treatment remains unknown. Although overexpression of ARNO has been previously reported to increase basal migratory phenotypes (33), further experiments are required to identify the endogenous ARF-GEF(s) responsible for ARF1 activation upon EGFR stimulation. In our experiments, ARF6 is not required to promote the EGF-dependent activation of ARF1 or the activation of the PI3K pathway. Furthermore, treatment of MDA-MB-231 cells with a PI3K inhibitor (LY294002) has no effect on ARF1 activation (data not shown) suggesting that the endogenous GEF promoting GTP loading on ARF1 does not require PIP3 production. Our data suggest that the two GTPases are activated independently following EGFR stimulation to regulate distinct signaling pathways acting in concert to enhance breast cancer cell migration and proliferation. It is well known that class IA PI3Ks are translocated to activated RTKs to regulate cell migration and growth downstream of RTKs (8). In this study, we demonstrate that depletion of ARF1 markedly inhibits activation of the PI3K pathway, as assessed by the phosphorylation of Akt, the plasma membrane recruitment of p110 α , the interaction of

p85 α with the EGFR, and the tyrosine phosphorylation of p85 α . Conversely, overexpression of ARF1 potentiated EGF-dependent effects. Whether in EGF-stimulated MDA-MB-231 cells, p85 α interacts directly or via an adaptor protein remains to be determined. In either case, our data suggest that ARF1 might act as a switch to regulate this key event. In our experiments, depletion of ARF1 greatly impaired the activation of the PI3K pathway without affecting the activation of the MAPK pathway. It was previously reported that ARF6, highly overexpressed in invasive breast cancer cells (15), can regulate tumor cell invasion through the activation of the MEK-Erk pathway in a human melanoma cell line (LOX) (18). Our data indicate that ARF6 controls Erk activation in MDA-MB-231 cells as well. Taken together, these findings suggest that ARF1 and ARF6 may both contribute to cancer cell progression and invasiveness by controlling the PI3K and MAPK pathways, respectively. We previously observed that in HEK 293 cells, depletion of ARF6 led to spontaneous membrane ruffling and cell migration (25). Here, we show that depletion of ARF1 or overexpression of a dominant negative mutant does not affect basal cell migration but significantly reduces EGF-dependent effects. In HEK 293 cells, basal migration and angiotensin II promoted migration is not affected by the depletion of ARF1. These contrasting findings highlight the complexity of the signaling pathways activated by stimulation of G protein-coupled and tyrosine kinase receptors in different cellular contexts. We have also observed that EGF-induced proliferation of MDAMB-231 cells is greatly impaired by the depletion of ARF1. The exact mechanism by which this phenomenon occurs needs to be further investigated. Altan-Bonnet et al have suggested that ARF1 plays an important role in the orchestration of mitotic Golgi breakdown, chromosome segregation, and cytokinesis (34). In our experiments, depletion of ARF1 or expression of the ARF1T31N mutant did not significantly impair basal cell growth, after 4 days, but consistently blocked EGF-stimulated effects. The fact that ARF1 depletion had similar effects on several different breast cancer cell lines, suggests that the mechanisms that we have uncovered may be widely used. Taken together, our findings reveal an unsuspected role for ARF1 and indicate that this small GTPase may be a potential therapeutic target for the treatment of invasive breast cancers. It is of special interest to note the recent

identification of an inhibitor that specifically prevents ARF1 activation (35). Further studies using such compounds will provide insights into the precise role of ARF1 during tumorigenesis.

Acknowledgements

We would like to thank Raphaëlle Lambert and Dr. Pierre Chagnon from the genomics facility at IRIC, University of Montreal, Canada. We are grateful to Drs. Stéphane A Laporte and May Simaan from McGill University, Montreal, Canada for their help with confocal microscopy, and MetaMorph Software. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant MOP-79470 to AC. AC is the recipient of a New Investigator Award from the CIHR.

ABBREVIATION LIST

ARF, ADP-ribosylation factor; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; MAPkinase, Mitogen Activated Protein kinase, PI3K ; phosphatidylinositol-3 kinase; siRNA, small interfering RNA.

II.6 References

1. Klijn, J. G., Berns, P. M., Schmitz, P. I., and Foekens, J. A. (1992) *Endocr Rev* 13(1), 3-17
2. Nicholson, R. I., McClelland, R. A., Gee, J. M., Manning, D. L., Cannon, P., Robertson, J. F., Ellis, I. O., and Blamey, R. W. (1994) *Breast Cancer Res Treat* 29(1), 117-125
3. Wells, A. (1999) *Int J Biochem Cell Biol* 31(6), 637-643
4. Wells, A. (2000) *Adv Cancer Res* 78, 31-101
5. Normanno, N., Ciardiello, F., Brandt, R., and Salomon, D. S. (1994) *Breast Cancer Res Treat* 29(1), 11-27

6. Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., and Salomon, D. S. (2006) *Gene* 366(1), 2-16
7. Lo, H. W., Hsu, S. C., and Hung, M. C. (2006) *Breast Cancer Res Treat* 95(3), 211-218
8. Engelman, J. A., Luo, J., and Cantley, L. C. (2006) *Nat Rev Genet* 7(8), 606-619
9. Yu, J., Zhang, Y., McIlroy, J., Rordorf-Nikolic, T., Orr, G. A., and Backer, J. M. (1998) *Mol Cell Biol* 18(3), 1379-1387
10. Rordorf-Nikolic, T., Van Horn, D. J., Chen, D., White, M. F., and Backer, J. M. (1995) *J Biol Chem* 270(8), 3662-3666
11. Cantley, L. C., Auger, K. R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R., and Soltoff, S. (1991) *Cell* 64(2), 281-302
12. Gillingham, A. K., and Munro, S. (2007) *Annu Rev Cell Dev Biol*
13. D'Souza-Schorey, C., and Chavrier, P. (2006) *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(5), 347-358
14. Casanova, J. E. (2007) *Traffic* 8(11), 1476-1485
15. Hashimoto, S., Onodera, Y., Hashimoto, A., Tanaka, M., Hamaguchi, M., Yamada, A., and Sabe, H. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(17), 6647-6652
16. Morishige, M., Hashimoto, S., Ogawa, E., Toda, Y., Kotani, H., Hirose, M., Wei, S., Hashimoto, A., Yamada, A., Yano, H., Mazaki, Y., Kodama, H., Nio, Y., Manabe, T., Wada, H., Kobayashi, H., and Sabe, H. (2008) *Nat Cell Biol* 10(1), 85-92
17. Hashimoto, S., Hirose, M., Hashimoto, A., Morishige, M., Yamada, A., Hosaka, H., Akagi, K., Ogawa, E., Oneyama, C., Agatsuma, T., Okada, M., Kobayashi, H., Wada, H., Nakano, H., Ikegami, T., Nakagawa, A., and Sabe, H. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(18), 7036-7041
18. Tague, S. E., Muralidharan, V., and D'Souza-Schorey, C. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(26), 9671-9676
19. Galas, M. C., Helms, J. B., Vitale, N., Thierse, D., Aunis, D., and Bader, M. F. (1997) *J Biol Chem* 272(5), 2788-2793.
20. Cohen, L. A., Honda, A., Varnai, P., Brown, F. D., Balla, T., and Donaldson, J. G. (2007) *Molecular biology of the cell* 18(6), 2244-2253

21. Mitchell, R., Robertson, D. N., Holland, P. J., Collins, D., Lutz, E. M., and Johnson, M. S. (2003) *J Biol Chem* 278(36), 33818-33830
22. Waters, M. G., Clary, D. O., and Rothman, J. E. (1992) *The Journal of cell biology* 118(5), 1015-1026
23. Chun, J., Shapovalova, Z., Dejgaard, S. Y., Presley, J. F., and Melancon, P. (2008) *Molecular biology of the cell* 19(8), 3488-3500
24. Houndolo, T., Boulay, P. L., and Claing, A. (2005) *J Biol Chem* 280(7), 5598-5604
25. Cotton, M., Boulay, P. L., Houndolo, T., Vitale, N., Pitcher, J. A., and Claing, A. (2007) *Molecular biology of the cell* 18(2), 501-511
26. Giguere, P., Rochdi, M. D., Laroche, G., Dupre, E., Whorton, M. R., Sunahara, R. K., Claing, A., Dupuis, G., and Parent, J. L. (2006) *Cellular signalling* 18(11), 1988-1994
27. Luo, J., and Cantley, L. C. (2005) *Cell Cycle* 4(10), 1309-1312
28. Cantley, L. C. (2002) *Science* 296(5573), 1655-1657
29. Kraus, M. H., Popescu, N. C., Amsbaugh, S. C., and King, C. R. (1987) *Embo J* 6(3), 605-610
30. Li, H. S., Shome, K., Rojas, R., Rizzo, M. A., Vasudevan, C., Fluharty, E., Santy, L. C., Casanova, J. E., and Romero, G. (2003) *BMC Cell Biol* 4, 13
31. Volpicelli-Daley, L. A., Li, Y., Zhang, C. J., and Kahn, R. A. (2005) *Molecular biology of the cell* 16(10), 4495-4508
32. Dascher, C., and Balch, W. E. (1994) *J Biol Chem* 269(2), 1437-1448
33. Santy, L. C., and Casanova, J. E. (2001) *The Journal of cell biology* 154(3), 599-610
34. Altan-Bonnet, N., Phair, R. D., Polishchuk, R. S., Weigert, R., and Lippincott-Schwartz, J. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(23), 13314-13319
35. Viaud, J., Zeghouf, M., Barelli, H., Zeeh, J. C., Padilla, A., Guibert, B., Chardin, P., Royer, C. A., Cherfils, J., and Chavanieu, A. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(25), 10370-10375

II.7 Figures

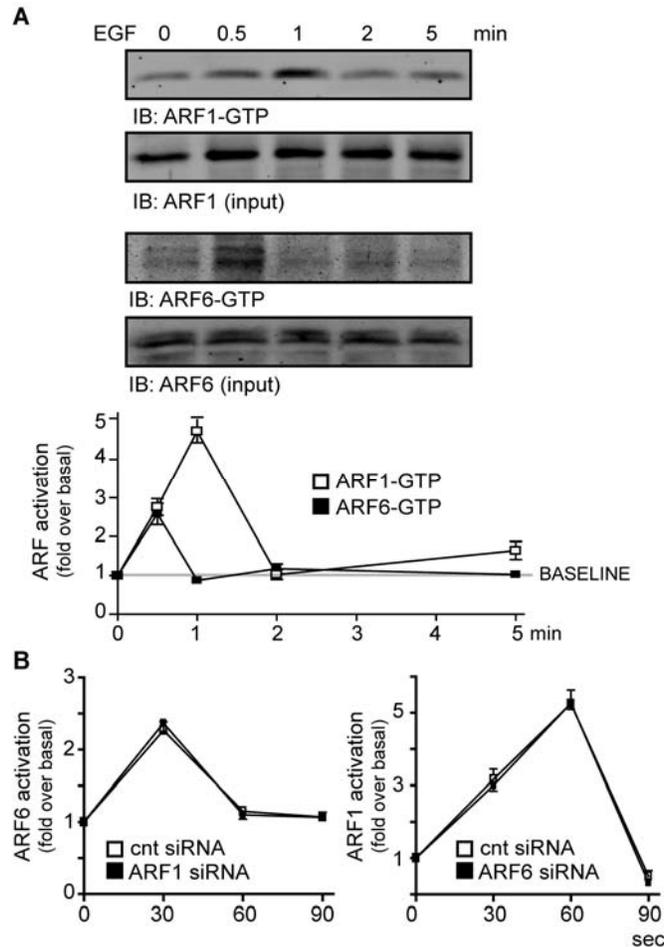


Figure 13: EGF promotes the activation of ARF1 and ARF6.

(A) MDA-MB-231 cells were treated with EGF for the indicated times. Cells were lysed and activated ARF1 and ARF6 captured using GST-GGA3 coupled to glutathione-Sepharose 4B beads in a GST pull down assay. Endogenous levels of activated ARF1 and ARF6 were assessed by Western blotting. The levels of ARF proteins in total cell lysates were similarly assessed. Representative immunoblots are presented. Input represents 15% of the total protein present in the sample. Quantifications experiments are presented as fold increase over basal, and are the mean \pm SEM of 5 independent experiments. (B) Activation of ARF1 and ARF6 were assessed as in A in ARF6 and ARF1 depleted MDA-MB-231 cells, respectively. Data (fold over basal) are the mean \pm SEM of 3 independent experiments.

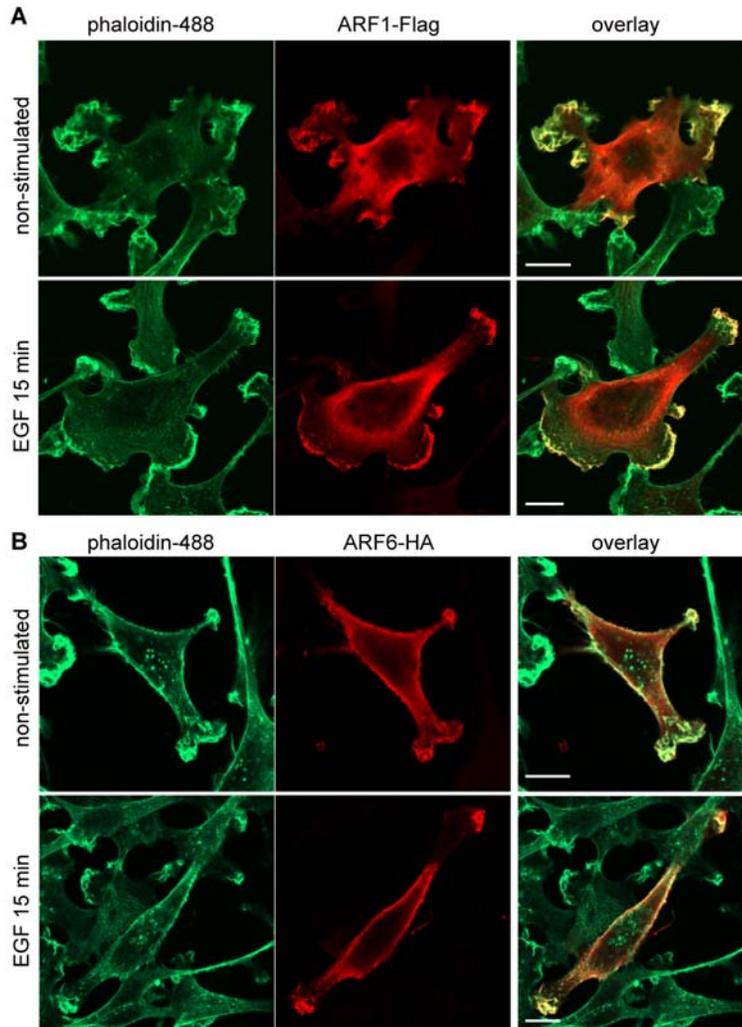


Figure 14: ARF1 is localized to dynamic plasma membrane ruffles.

(A) MDA-MB-231 cells were transiently transfected with ARF1-Flag and distribution was assessed by confocal microscopy. Cells left untreated or stimulated with EGF were fixed, permeabilized and labeled using an anti-Flag, a secondary antibody coupled to Alexa-Fluor 568, and Phalloidin-488. (B) MDA-MB-231 cells were transiently transfected with ARF6-HA and cellular localization was assessed as in A. Cells were either left untreated or stimulated with EGF, and labeled using an anti-HA, a secondary antibody coupled to Alexa-Fluor 568, and Phalloidin-488. These images are representative of at least 30 cells observed in 5 independent experiments. Scale bar, 10 μm .

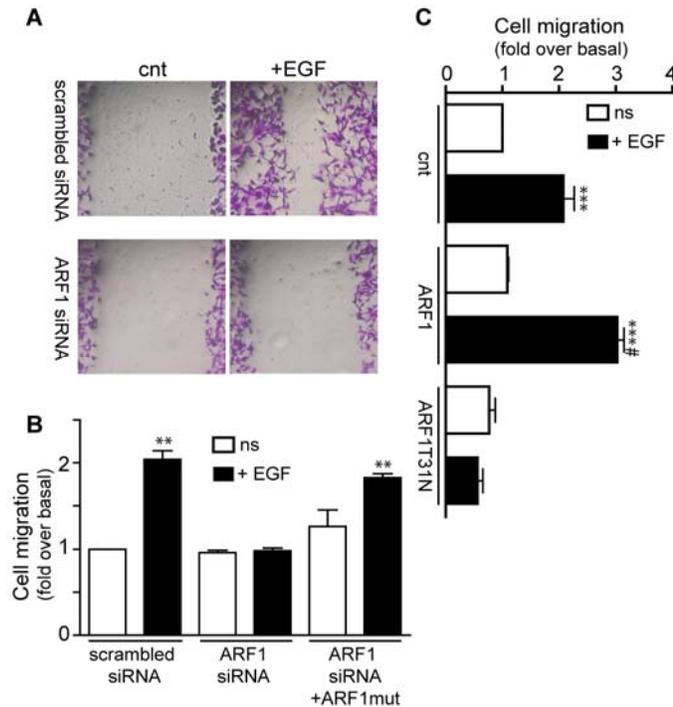


Figure 15: EGF stimulation promotes ARF1-dependent migration of MDA-MB-231 cells.

(A) Cells were seeded onto coverslips, and transfected with either a scrambled or ARF1 siRNA. Three days later, scratches were performed, cells were stimulated or not with EGF, and wound healing assessed after 6 h. Pictures are representative of 5 independent experiments. (B) MDA-MB-231 cells transfected with a scrambled, ARF1 siRNA, or ARF1 siRNA insensitive construct (ARF1mut). Cells were reseeded into Boyden chambers, stimulated or not with EGF, and migration was assessed after 6 h. Results are the mean \pm SEM of 4 to 8 independent experiments. (C) Cell migration was assessed as in B. Cells were transfected with empty vector, ARF1, or ARF1T31N and migration through the Boyden chambers was assessed. Results are the mean \pm SEM of 3 to 4 independent experiments. ** P <0.01, *** P <0.001 are values compared to the control unstimulated condition. # P <0.01 are values compared to the control EGF stimulated condition.

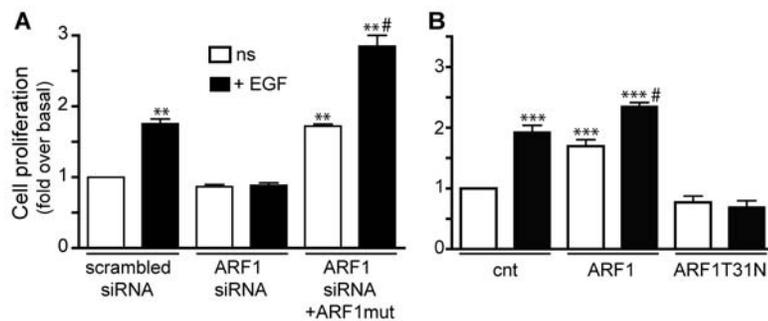


Figure 16: EGF stimulation promotes ARF1-dependent proliferation of MDA-MB-231 cells.

(A) Cells transfected with a scrambled, ARF1 siRNA, or ARF1 siRNA and ARF1 siRNA insensitive construct (ARF1mut) were reseeded into a 10 cm dish, stimulated or not with EGF and allowed to grow for 4 days. Cell proliferation was expressed as the number of cells for each condition compared to the non-stimulated, control value (fold increase over basal). These data are the mean \pm SEM of 4 to 7 independent experiments. (B) Cells were transfected with empty vector, ARF1 or ARF1T31N and proliferation was assessed as in A. Results are the mean \pm SEM of 4 independent experiments. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ are values compared to the control unstimulated condition. # $P < 0.01$ are values compared to the control EGF stimulated condition.

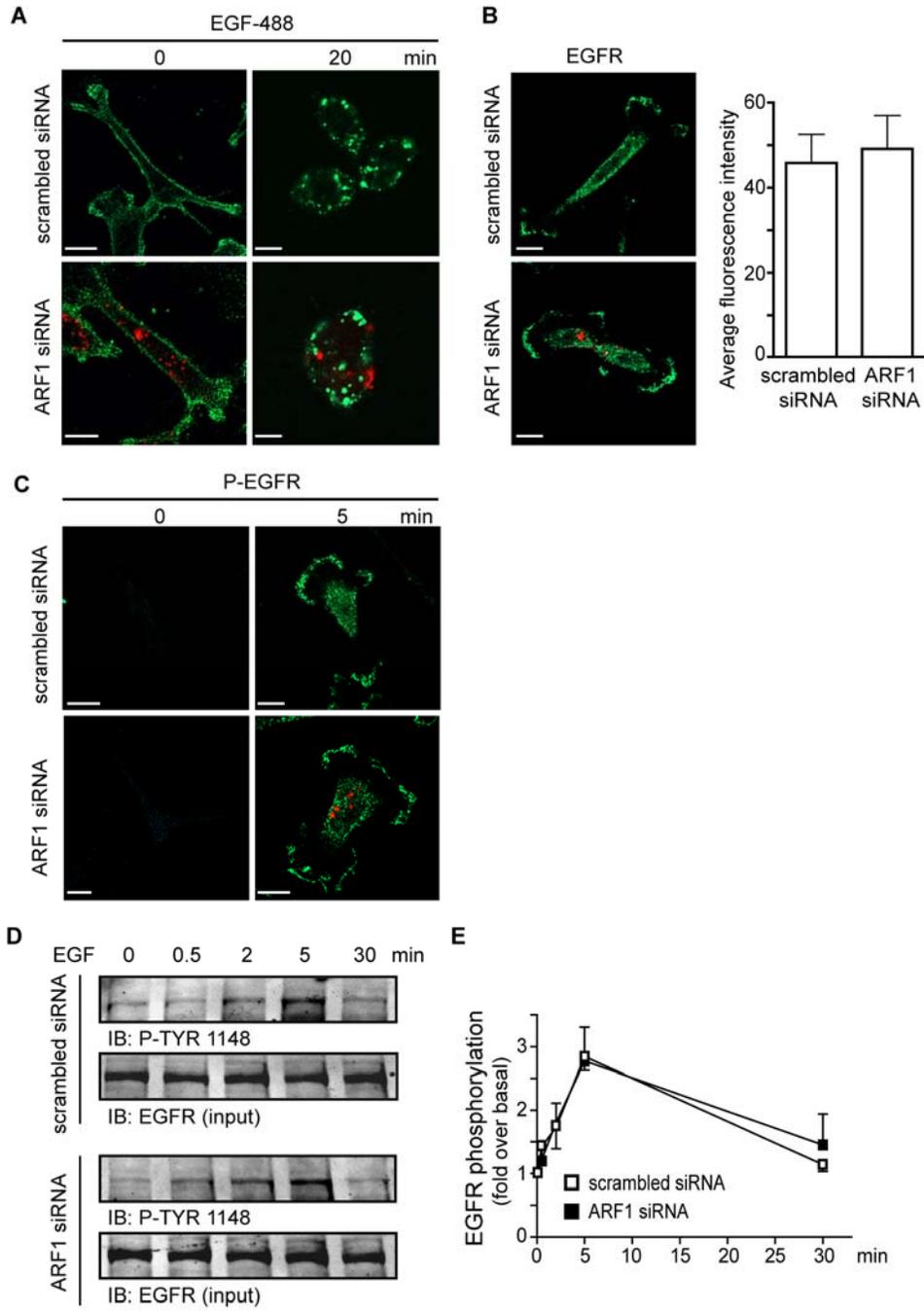


Figure 17: Depletion of ARF1 does not impair the activation of the EGFR by EGF.

A) MDA-MB-231 cells transfected with a scrambled siRNA or ARF1 siRNA (together with an irrelevant siRNA coupled to Alexa-Fluor 546) were incubated with EGF-coupled to Alexa-Fluor 488 for 30 min on ice (0) or for 20 min at 37°C to assess EGFR distribution. Cells were fixed and imaging was performed using confocal microscopy. This figure is representative of more than 30 cells observed in 4 independent experiments. (B) Cells transfected as above were fixed, permeabilized and labeled using an anti-EGFR, and a secondary antibody coupled to Alexa-Fluor 488. This figure is representative of more than 30 cells observed in 2 independent experiments. Quantification of EGFR immunolabelling at the cell surface expressed as average fluorescence intensity is presented in the right panel. Results are the mean \pm SEM of 10 areas assessed on 5 different cells for each condition. (C) Cells transfected as in (A) were stimulated with EGF, fixed, permeabilized and labeled using a phosphospecific EGFR antibody (Y1148) and a secondary antibody coupled to Alexa-Fluor 488. This figure is representative of more than 30 cells observed in 3 independent experiments. Scale bar, 10 μ m. (D) MDA-MB-231 cells transfected with either a scrambled or ARF1 siRNA were stimulated with EGF for different times. EGFR levels were examined using an anti-EGFR antibody and phosphorylated EGFR detected using a phospho-specific antibody, P-TYR 1148. This experiment is representative of 3 others, and input represents 15% of the total protein present in the sample. (E) Quantification of the data presented in D. EGFR phosphorylation is expressed as fold phosphorylation over basal (non-stimulated). Results are the mean \pm SEM of 4 independent experiments.

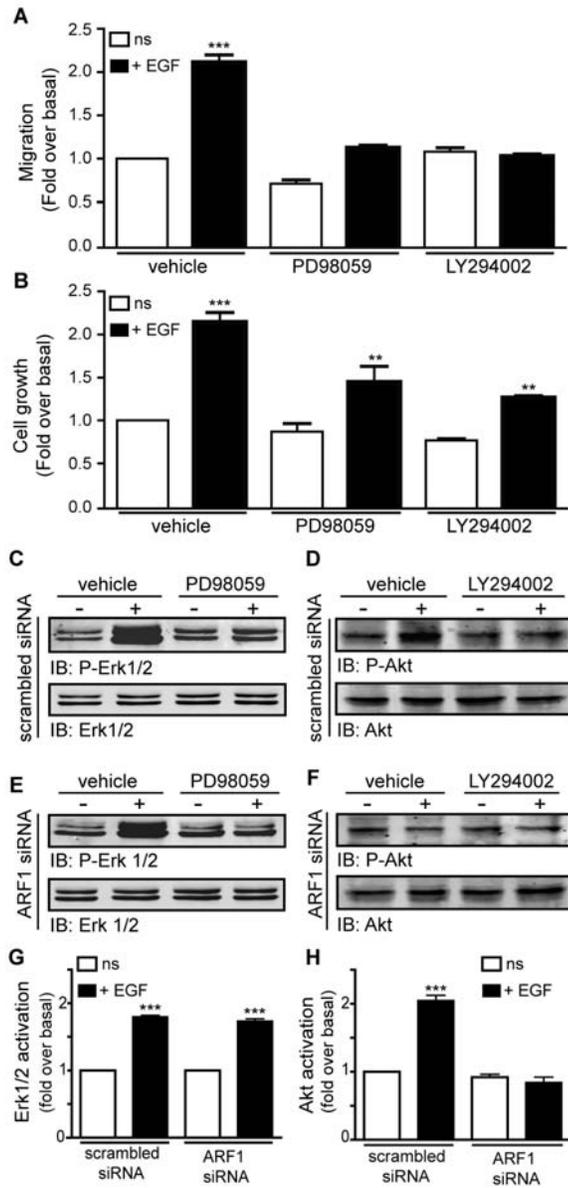


Figure 18: ARF1 regulates the activation of the PI3K pathway following EGF stimulation.

(A) MDA-MB-231 cells were treated with vehicle, PD98059, an inhibitor of the MAPK pathway or LY294002, an inhibitor of the PI3K pathway (15 μ M, 30 min). Migration of non-stimulated and EGF-stimulated cells was assessed after 6 h using the Boyden chamber assay. Results are the mean \pm SEM of 4 independent experiments and expressed as fold increase in migration over basal (non-stimulated, control conditions). (B) As in A, cells were treated with vehicle, PD98059 or LY294002 and proliferation was performed after 4 days. Data are expressed as fold over basal and are the mean \pm SEM of 4 independent experiments. (C, E) Cells transfected with a scrambled (C) or ARF1 (E) siRNA were treated with vehicle or PD98059, stimulated or not with EGF (0 or 2 min) and activation of Erk1/2 was determined by Western blotting. Membranes were blotted with phospho-specific anti-Erk1/2 and anti-Erk1/2 antibodies. Input represents 15% of the total lysate. These are representative of 4 independent experiments. (D, F) Cells transfected with a scrambled (D) or ARF1 (F) siRNA were treated with vehicle or LY294002, stimulated or not with EGF (0 or 2 min) and activation of Akt was determined by Western blotting. Membranes were blotted with phospho-specific anti-Akt and anti-Akt antibodies. Immunoblots are representative of 4 independent experiments. Input represents 15% of the total lysate. (G) Quantification of the data presented in C and E (Erk1/2 activation). Results are presented as mean \pm SEM of 4 independent experiments. (H) Quantification of the data presented in D and F (Akt activation). Results are presented as the mean \pm SEM of 4 independent experiments. **P<0.01, ***P<0.001 are values compared to the control unstimulated condition.

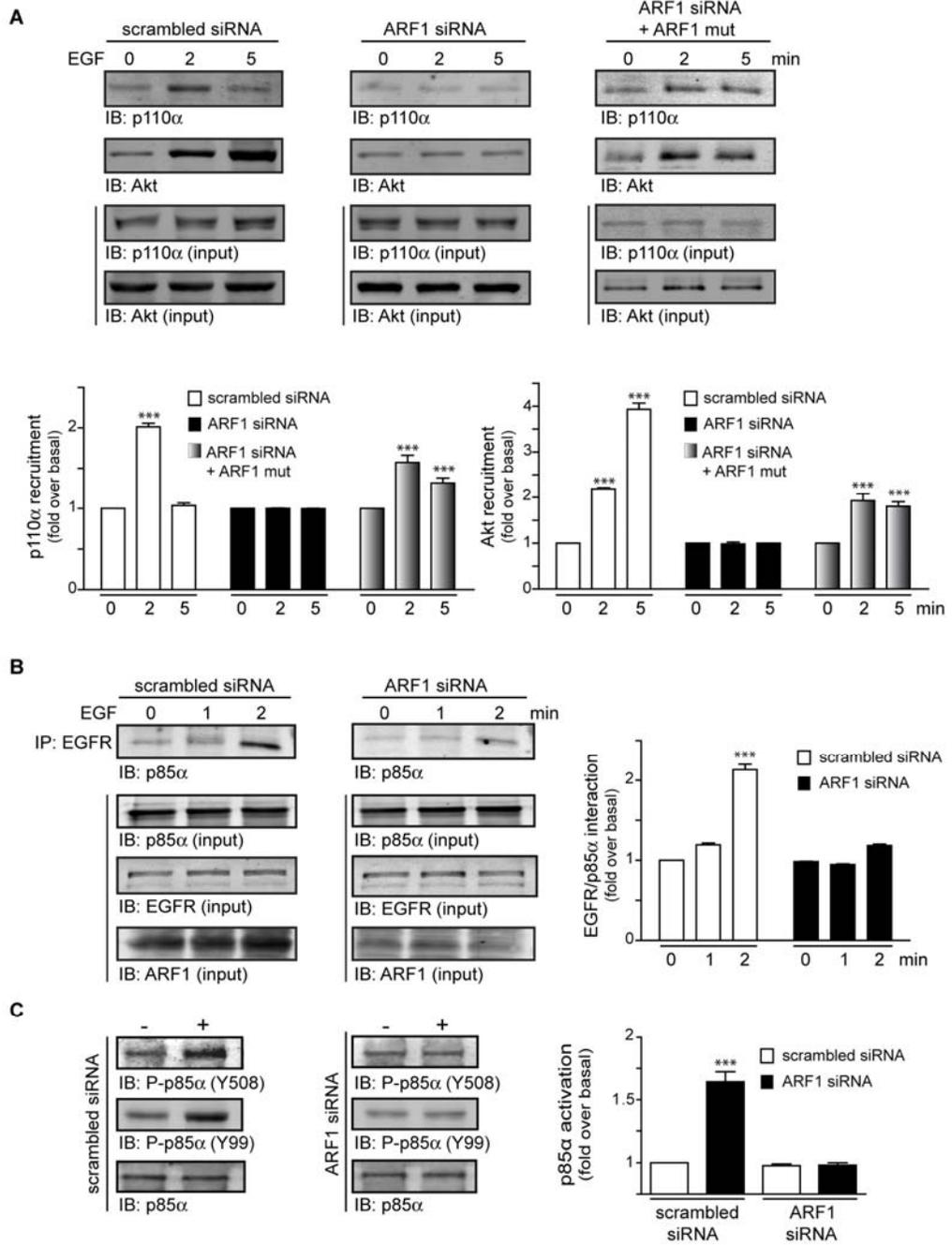


Figure 19: Role of ARF1 and the recruitment of PI3K.

(A) MDA-MB-231 cells transfected with a scrambled, ARF1 siRNA, or ARF1 siRNA and ARF1 siRNA insensitive construct (ARF1mut) were stimulated with EGF for the indicated times. Membrane fractions were prepared, and amounts of associated p110 α and Akt were assessed by Western blotting. Input represents 15% of the sample. Data are the mean \pm SEM of 4 to 8 experiments. (B) Cells transfected with a scrambled or ARF1 siRNA were stimulated or not with EGF (0, 1, 2 min). Endogenously expressed EGFR were immunoprecipitated using the anti-EGFR antibody and associated p85 α was examined by Western blotting using a p85 α antibody. Input represent 15% of the total cell lysate. Data are the mean \pm SEM of 4 experiments. (C) MDA-MB-231 cells were stimulated with EGF (0 or 2 min), and phosphorylation of p85 α (Y508) was determined by Western blotting using a phospho-specific p85 α or an anti-phosphotyrosine antibody (Y99). Input represent 15% of the total cell lysate. Data are the mean \pm SEM of 5 experiments. ***P<0.001 are values compared to the control unstimulated condition.

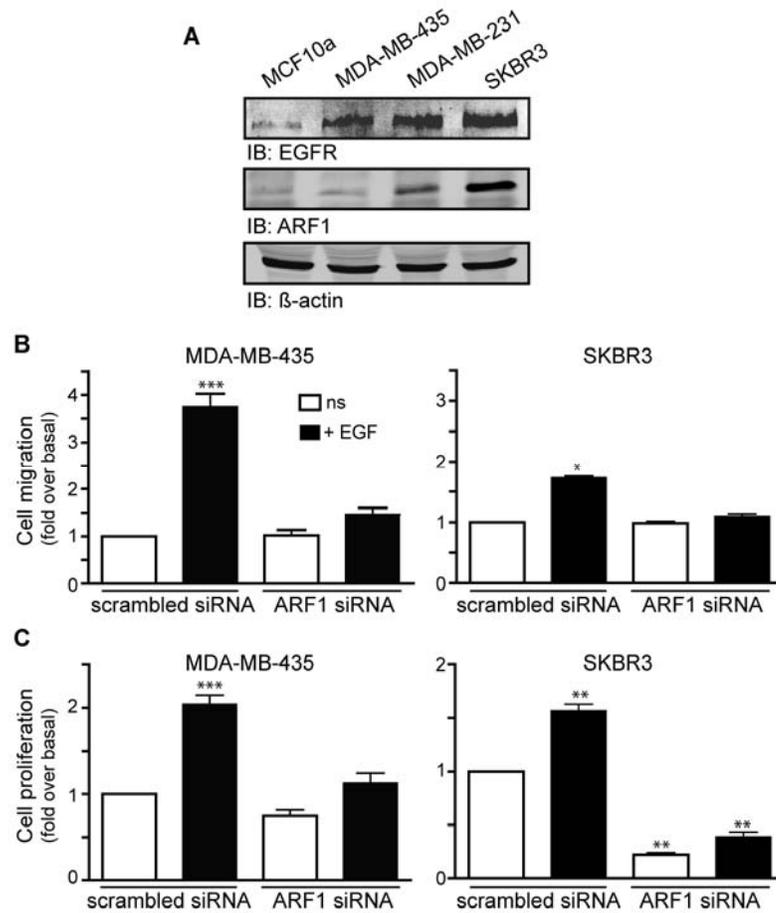


Figure 20: Depletion of ARF1 blocks the migration and proliferation of MDA-MB-435 and SKBR3 cells.

(A) Endogenous expression levels of EGFR and ARF1 were examined in MCF10a, MDA-MB-435, MDA-MB-231, and SKBR3 cells. Lysates, as indicated, were subjected to Western blot analysis using anti-EGFR, anti-ARF1 and anti-β-actin antibodies. These results are representative of 2 other independent experiments. (B) Cells transfected with a scrambled or ARF1 siRNA were reseeded into Boyden chambers, stimulated or not with EGF, and migration was assessed after 6 h. Results are the mean ± SEM of 4 independent experiments. (C) Cells transfected with a scrambled or ARF1 siRNA were reseeded into a 10 cm dish, stimulated or not with EGF and allowed to grow for 4 days. Cell proliferation was expressed as the number of cells for each condition compared to the non-stimulated, control value (fold increase over basal). These data are the mean ± SEM of 3 independent experiments. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 are values compared to the control unstimulated condition.

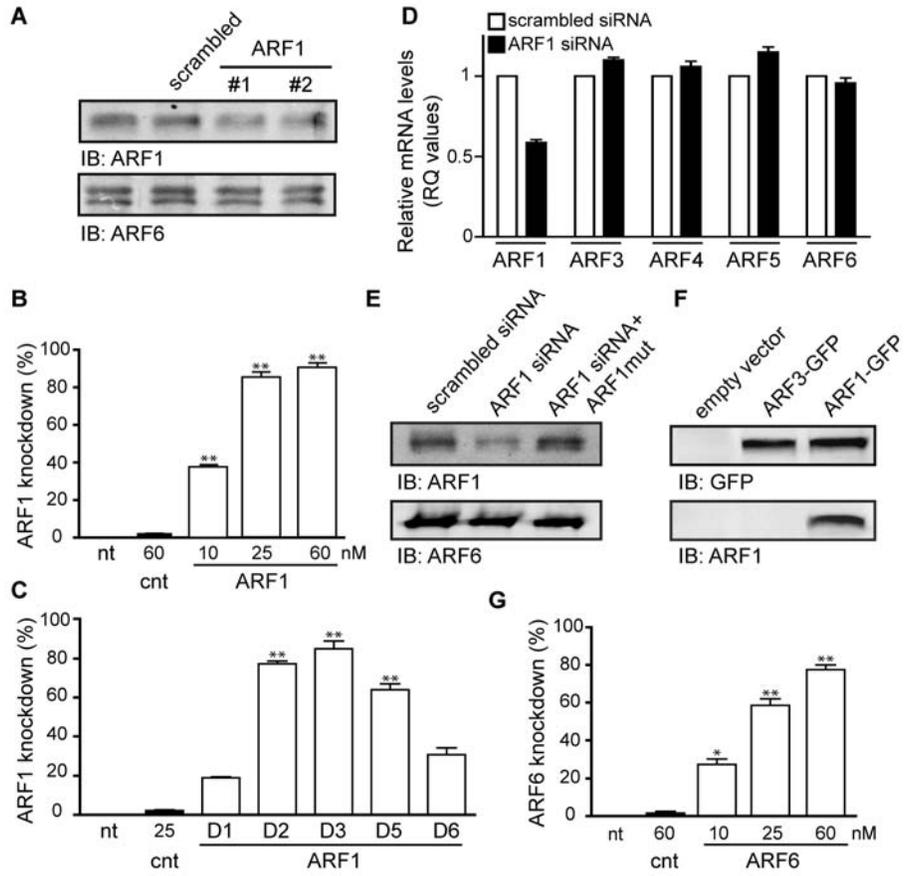


Figure 21: Expression levels of ARF1 and ARF6, and effect of siRNA.

(A) MDA-MB-231 cells were left untransfected or transfected with either a scrambled or two different ARF1 siRNA (#1 or #2) (25 nM, 72h). Endogenously expressed ARF1 and ARF6 were examined by Western blot analysis using specific antibodies. Data are representative of 3 experiments. (B) Cells were left untransfected or transfected with either a scrambled or increasing concentrations of ARF1 (#1) siRNA. 72h after transfection, amounts of endogenously expressed ARF1 were determined by Western blot analysis as in A. Results are expressed as percent knockdown of ARF1 expression and are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. (C) MDA-MB-231 cells were left untransfected or transfected with either a scrambled or ARF1 siRNA (25 nM). Samples were collected over a 6-day period and amounts of ARF1 expressed were determined as in B. Data are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. (D) MDA-MB-231 cells were transfected with a scrambled or ARF1 (#1) siRNA (25 nM, 72h) and total mRNA were prepared for each conditions. Real-time PCR were performed to analyze the levels of ARF1, ARF3, ARF4, ARF5, and ARF6 in all samples. Data are presented as relative mRNA levels, and are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. (E) Cells were transfected with either a scrambled siRNA, ARF1 siRNA or ARF1 siRNA together and an siRNA resistant ARF1 mutant (ARF1mut). Amounts of expressed ARF1 and ARF6 were determined by Western blotting. These results are representative of 2 other experiments. (F) MDA-MB-231 cells were transfected with ARF1-GFP or ARF3-GFP. The expression of both ARF clones were detected by Western blotting using an anti-GFP antibody and a secondary anti- mouse antibody coupled to FITC, and the expression of ARF1 was detected using the anti-ARF1 (Abcam) antibody. These results are representative of 2 independent experiments. (G) Cells were left untransfected or transfected with either a scrambled (60 nM) or increasing concentrations of ARF6 siRNA. 48h after transfection amounts of endogenously expressed ARF6 were determined by Western blot analysis as in B. Results are expressed as percent knockdown of ARF6 expression and are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. *P<0.05, **P<0.01 are values compared with the control condition.

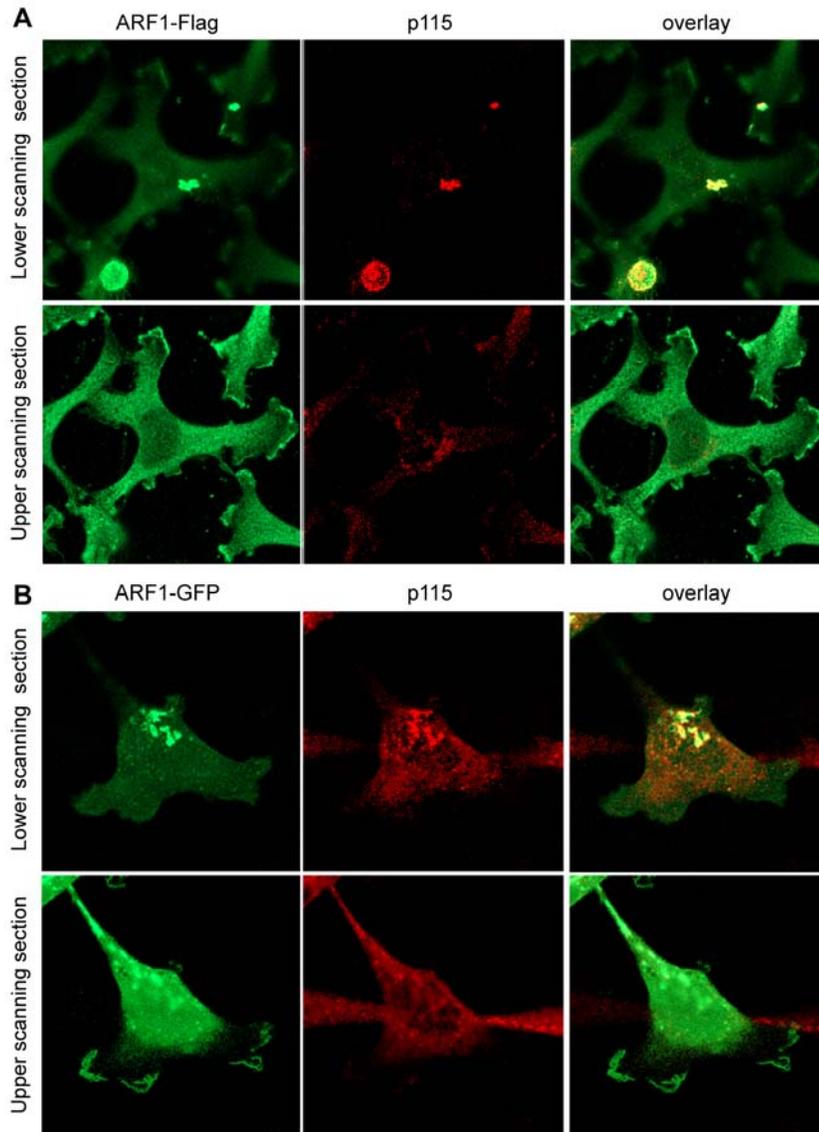


Figure 22: Cellular distribution of ARF1.

MDA-MB-231 cells were transfected with ARF1-Flag, fixed, and permeabilized. The distribution of ARF1-Flag was examined using an anti-Flag (polyclonal) antibody and a secondary antibody coupled to Alexa-Fluor 488. The localization of the Golgi marker p115 was examined using an anti-p115 (monoclonal) antibody and a secondary antibody coupled to Alexa-Fluor 568. Two scanning plan are presented to illustrate the distribution of ARF1-Flag colocalizing with a Golgi marker (lower scanning section) and the dynamic plasma membrane ruffles (upper scanning section). These images are representative of 20 cells observed in 3 independent experiments.

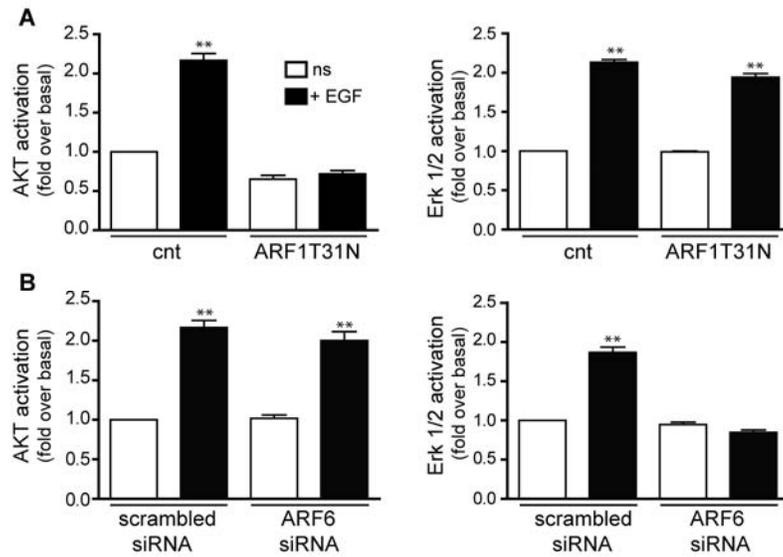


Figure 23: Regulation of Akt and Erk1/2 phosphorylation by ARF1T31N and depletion of ARF6.

(A) MDA-MB-231 cells transfected with empty vector or ARF1T³¹N were stimulated or not with EGF (0 or 2 min) and phosphorylation of Akt and Erk1/2 were determined by Western blotting as in figure 18. Data are the mean \pm SEM of 4 independent experiments. (B) Cells were transfected with a scrambled or ARF6 siRNA (60 nM, 48h) and activation of Akt and Erk following EGF stimulation was assessed as in A. These are representative of 4 independent experiments. **P<0.01 are values compared with the control unstimulated condition.

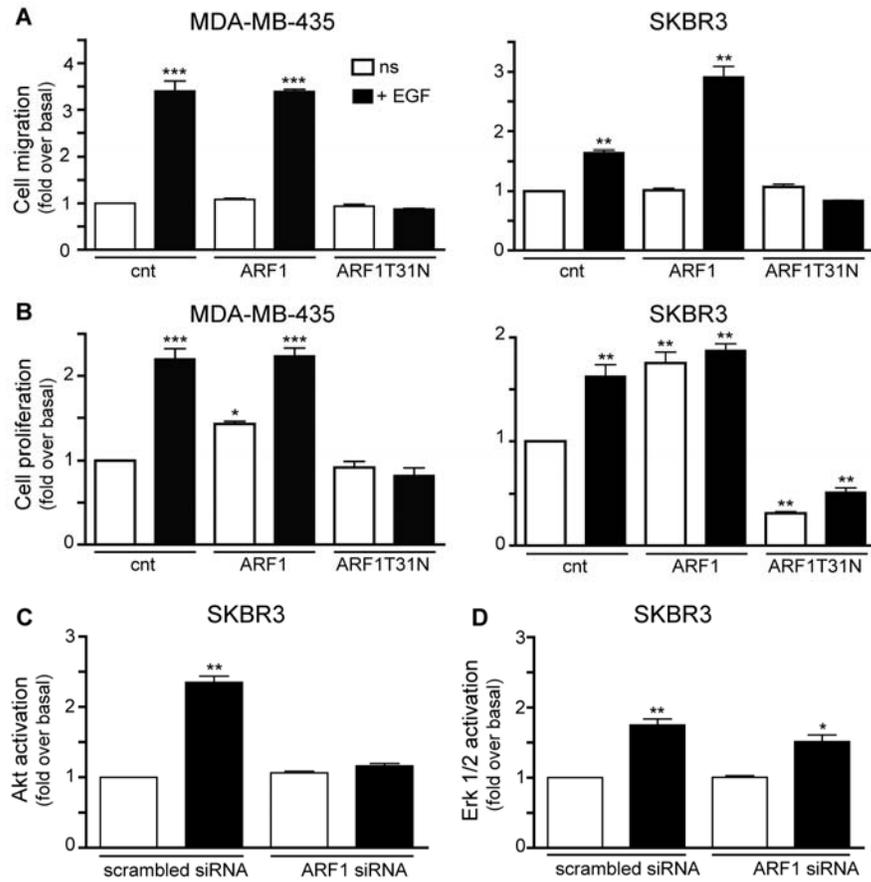


Figure 24: ARF1 controls migration and proliferation of MDA-MB-435 and SKBR3 cells.

(A) MDA-MB-435 and SKBR3 cells transfected with an empty vector, ARF1 or ARF1T³¹N were resseeded into Boyden chambers, stimulated or not with EGF, and migration was assessed after 6 h. Results are the mean \pm SEM of 4 independent experiments. (B) Cells transfected as in A were resseeded into a 10 cm dish, stimulated or not with EGF and allowed to grow for 4 days. Cell proliferation was expressed as the number of cells for each condition compared to the non-stimulated, control value (fold increase over basal). These data are the mean \pm SEM of 4 independent experiments. (C,D) SKBR3 cells transfected with a scrambled or ARF1 siRNA were stimulated or not with EGF (0 or 2 min) and phosphorylation of Akt (C) and Erk1/2 (D) were determined by Western blotting as in figure 18. Data are the mean of 4 independent experiments. * P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Chapitre III :

ARF1 controls proliferation of breast cancer cells by regulating the Retinoblastoma protein

(publié dans le journal: Oncogene, in press)

Pierre-Luc Boulay¹, Sabrina Schlienger¹, Sebastian Lewis-Saravalli¹, Nicolas Vitale³, Gerardo Ferbeyre², and Audrey Claing^{1,2}.

Contribution des auteurs:

PLB: Réalisation de la majorité des expériences, conceptualisation du projet et l'écriture

SS: Participation aux essais d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

SLS : Participation aux essais de *GST-pull down*

NV : Don de la protéine ARF1 purifiée

GF : Conceptualisation du projet (volet sénescence)

AC : Conceptualisation du projet et de l'écriture

From the ¹Department of Pharmacology and ²Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Montréal, P.O. Box 6128, Downtown station, Montréal, QC, Canada H3C 3J7; ³ Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives Unité Propre de Recherche-3212 Centre National de la Recherche Scientifique/Université de Strasbourg 67084, Strasbourg, France

Running title: ARF1 controls cell proliferation

The authors declare that they have no conflict of interest

Correspondence: Professor Audrey Claing,
Department of Pharmacology,
Faculty of Medicine
University of Montreal
P.O. Box 6128, Downtown station
Montreal, QC, CANADA, H3C 3J7
Telephone: (514) 343-6352
Fax: (514) 343-2291

II.1 Summary

The ADP-ribosylation factors (ARFs) 1 and 6 are small GTP-binding proteins highly expressed and activated in several breast cancer cell lines and are associated with enhanced migration and invasiveness. In this study, we report that ARF1 plays a critical role in cell proliferation. Depletion of this GTPase or expression of a dominant negative form, which both resulted in diminished ARF1 activity, led to sustained cell-growth arrest. This cellular response was associated with the induction of senescent markers in highly invasive breast cancer cells as well as in control mammary epithelial cells by a mechanism regulating pRB function. When examining the role of ARF1, we found that this GTPase was highly activated in normal proliferative conditions, and that a limited amount could be found in the nucleus, associated with the chromatin of MDA-MB-231 cells. However, when cells were arrested in the G0/G1 phase or transfected with a dominant negative form of ARF1, the total level of activated ARF1 was markedly reduced and the GTPase significantly enriched in the chromatin. Using biochemical approaches, we demonstrated that the GDP-bound form of ARF1 directly interacted with pRB, but not other members of this family of proteins. In addition, depletion of ARF1 or expression of ARF1T31N resulted in the constitutive association of pRB and E2F1, thereby stabilizing the interaction of E2F1

as well as pRB at endogenous sites of target genes promoters, preventing expression of E2F target genes such as Cyclin D1, Mcm6, and E2F1 important for cell cycle progression. These novel findings provide direct physiological and molecular evidence for the role of ARF1 in controlling cell proliferation, dependent on its ability to regulate pRB/E2F1 activity and gene expression for enhanced proliferation and breast cancer progression.

Keywords: ADP-ribosylation factor/ breast cancer/ cell cycle/ proliferation/ retinoblastoma protein

III.2 Introduction

Cell division is a physiological process that occurs in almost all tissues and under many circumstances. Under normal conditions, the balance between proliferation and programmed cell death is maintained by tightly regulating both processes to ensure the integrity of organs and tissues. Activation or up-regulation of oncogenes disrupts these orderly processes by disrupting the program regulating cell cycle entry and death. The conversion of normal cells into tumor cells involves changes in the activity of a number of different genes and proteins. One of the best characterized oncogenes is the small GTP-binding protein Ras (Der et al., 1982; Parada et al., 1982). Its uncontrolled activation and/or up-regulation promote the transformation of a pre-malignant to a malignant phenotype. Ectopic expression of H-Ras induces senescence in normal fibroblast (Serrano et al., 1997). Several other GTPases have been linked to cancer progression. For example, members of the Rho family of proteins were found to regulate adhesion and motility (Azab et al., 2009; Larrea et al., 2009; Myhre and Blobel, 2009; Wu et al., 2009). We and others recently reported that ADP-ribosylation factors (ARF), another family of small GTP-binding proteins, are highly expressed in cancer cells and regulate migration, invasion as well as proliferation (Boulay et al., 2008; D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006; Hashimoto et al., 2004). These proteins are different from the alternate reading frame tumour-suppressor

protein, also known as p14ARF, initially identified as an alternative transcript of the INK4a/ARF tumour-suppressor locus (Duro et al., 1995).

Like all GTPases, ARF proteins cycle between an inactive GDP-bound and an active GTP-bound state through the dynamic interaction of guanine-nucleotide exchange factors (GEFs) and GTPase-activating proteins (GAPs), respectively. ARF1 and ARF6 are the most studied isoforms. ARF1 is mainly found in the Golgi apparatus and acts to promote carrier vesicle biogenesis by nucleating the assembly of coat protein complexes at sites of vesicle formation (Stearns et al., 1990). Several reports have suggested that ARF1 can also localize to the plasma membrane transmitting signals from transmembrane proteins (Boulay et al., 2008; Cohen et al., 2007; Galas et al., 1997; Mitchell et al., 2003). In invasive breast cancer cells, stimulation of the epidermal growth factor (EGF) receptor leads to the activation of ARF1, the PI3K pathway and ultimately cell migration and proliferation (Boulay et al., 2008). Alternatively, ARF6, the isoform classically associated with the plasma membrane, is activated by this receptor to stimulate activation of the MAPK pathway (Boulay et al., 2008; D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006; Hashimoto et al., 2004).

Activation of the PI3K/Akt pathway by growth factors is associated with cell survival and growth (i.e. an increase in cell mass) as well as proliferation through multiple downstream targets impinging on cell cycle regulation (Manning and Cantley, 2007). Namely, Akt potently drive cell proliferation by regulating the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 (Liang et al., 2002; Motti et al., 2005; Narita et al., 2002; Yakes et al., 2002), and the ubiquitin ligase Mdm2 (Zhou et al., 2001). In addition, Akt inhibits CHK1 activity, a cell cycle checkpoint (Tonic et al., 2010) as well as many other effects. Furthermore, activation of the PI3K-Akt-mTOR-p70S6K signaling axis controls the function of the Retinoblastoma (pRB) protein, a central regulator of cell cycle progression. At the molecular level, pRB is recognized as a pivotal regulator of G1 checkpoint thereby inhibiting S-phase entry and cell cycle progression (Weinberg, 1995). RB function is controlled by upstream cyclin-dependent kinases (CDK) that are activated during the G0/G1 transition phase. When in an hypophosphorylated state, pRB inhibits proliferation by repressing the activity of E2F transcription factors, limiting expression of cell cycle regulatory genes, such as Cyclin A,

Cyclin D1, Cyclin E, Mcm5 and Mcm6 (Nevins et al., 1991; Ohtani et al., 1995; Ohtani et al., 1999; Watanabe et al., 1998), essentials for progression from G1 into S-phase (Weinberg, 1995). Hyperphosphorylation of pRB (ppRB) results in the dissociation of E2Fs allowing transactivation of E2F-targets and transition through G1/S phases of the cell cycle. It is now believed that pRB has many additional roles such as control of cellular differentiation, regulation of apoptotic cell death, maintenance of permanent cell cycle arrest and preservation of chromosomal stability (Burkhart and Sage, 2008).

In benign tumors, the process of senescence, which is characterized by an irreversible growth-arrest program, occurs following oncogene activation or telomere shortening. Cellular senescence therefore acts to restrict tumor progression. Recently, we have shown that benign prostate tumors are senescent and have low E2F gene expression (Vernier et al.). In advanced cancers, this defence mechanism is bypassed by mutations in tumor suppressor genes (Courtois-Cox et al., 2008). Senescence is regulated by a complex signalling network and characterized by a persistent activation of the DNA damage signalling pathway (Malette and Ferbeyre, 2007), chromatin remodelling through the formation of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF) (Narita et al., 2003) and an increase of lysosomal β -galactosidase (β -gal) (Dimri and Campisi, 1994). Although SAHF help to maintain E2F targets in a repressed state, other mechanisms contribute to the overall inhibition of E2Fs in senescence. The activation state of pRB can be altered by disrupting signaling through the cyclin D/p16INK4a/pRB pathway (Takano et al., 1999). Cellular senescence takes several days to establish, and in oncogene expressing cells, usually follows an initial cell proliferation phase (Ferbeyre et al., 2002). Once initiated, this program can not be reversed by the cell (Ferbeyre et al., 2002; Sun et al., 2007).

In this study, we have investigated the molecular mechanisms by which the small GTP-binding protein ARF1 regulates proliferation of an invasive breast cancer cell line, MDA-MB-231 (negative for estrogen receptor, progesterone receptor and Her2/Neu receptor). Triple negative tumors constitute 12-24% of breast cancers and show aggressive clinical behavior such as lung and bone metastasis formation. These tumors are not responsive to

available therapies (Yagata et al.). The identification of novel pharmacological targets is therefore urgent. Here, we show that by lowering active levels of ARF1, by either using RNA interference or overexpression of a dominant negative mutant, proliferation of MDA-MB-231 was markedly reduced by a mechanisms involving senescence. This permanent cell growth arrest was associated with the inhibition of pRB hyperphosphorylation, dissociation of pRB/E2F1 protein complex, constitutive association of E2F1 and pRB with target gene promoters, and expression of E2F responsive genes. In addition, we show that ARF1 can directly interact with pRB, and translocate to the nucleus during G0/G1 phase. The understanding of the molecular mechanism by which ARF1 controls tumor cell proliferation, especially senescence induction, is important for the development of future anti-breast cancer therapies.

III.3 Materials and Methods

Reagents and Antibodies- Lipofectamine 2000™, Alexa-Fluor 488, Alexa-Fluor 568 and Hoescht 33258 were purchased from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Anti-ARF1 (raised against amino acids 174-180: SNQLRNQ of human ARF1 sequence) and anti-H3meK9 antibodies were obtained from Abcam (Cambridge, MA, USA). Anti-pRB, anti-ppRB Ser795, anti-E2F1, anti-pan-actin and anti-Histone-3 were from Cell Signaling Technology® (Danvers, MA, USA). Anti-p16 (H156), anti-Cdk4, anti-Cyclin D1, anti-p107, anti-p130, anti-GM130 and anti-polyubiquitin (P4D1) were purchased from Santa Cruz Biotech. Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Mammary epithelium basal medium (MEBM) was from Cambrex Bio Science Walkersville Inc (Walkersville, MD, USA). All others products were from Sigma Aldrich Company (Oakville, ON, CANADA).

DNA plasmids and small interfering RNAs- siRNA insensitive ARF1 mutant (ARF1mut) was previously described (Boulay et al., 2008). Double-stranded scrambled, ARF1siRNA, with 19-nt duplex RNA and 2-nt 3' dTdT overhangs were previously described (Cotton et al., 2007; Houndolo et al., 2005). All siRNA were synthesized using the Silencer™

siRNA Construction Kit from Ambion (Austin, TX). p16INK4a cDNAs in lentivirus were obtained from Dr. Christian Beauséjour (University of Montreal, QC, Canada).

Cell culture, transfection and infection- MDA-MB-231, SKBR3 and COS-7 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS. BT474 and T47D cells were maintained in DMEM:Ham's F12 supplemented with 10% FBS while MCF10A cells were maintained in MEM supplemented with 0.52 mg/ml bovine pituitary extract, 10 ng/ml recombinant EGF, 10 µg/ml insulin, 1 µg/ml hydrocortisone, 0.1 mg/ml gentamycin, and 0.1 µg/ml amphotericin B. All cells were maintained at 37°C and 5% CO₂. Cells were transfected with DNA and/or siRNA using Lipofectamine 2000™ according to the manufacturer's instructions. Cells were infected with p16INK4a cDNA expressed in p-Lenti plasmids using Lentivirus as described (Beausejour et al., 2003).

Growth assay- Cells were transiently transfected, trypsinized and equal numbers (1 X 10⁴ cells) were reseeded in a 10 cm dish for all transfection conditions. After 24 hours, the media was changed for fresh complete media (FBS 10%) and all sets of cells were left for 12 days. For each indicated time point, cells were trypsinized and counted.

Soft-agar growth assay- MDA-MB-231 cells were transiently transfected with siRNA (scrambled or ARF1, 25 nM) or with plasmid DNA (pBKA or ARF1T31N). Soft agar assays were performed by seeding 2 X 10³ transfected cells in DMEM containing 0.2% agarose in 10 cm dish, coated with a layer of 0.8% agarose/DMEM.

Senescence associated with β-galactosidase assay- Cells were transiently transfected with siRNA (scrambled or ARF1, 25 nM for 72 h) or plasmid DNA (pBKA, ARF1 or ARF1T31N). Cells were washed twice in PBS and fixed with formalin solution 10% for 5 minutes at room temperature. Cells were washed again twice and then incubated for 16 h in staining solution (40 mM; citric acid/phosphate buffer pH 6.0, 5 mM; potassium ferricyanide, 5 mM; potassium ferrocyanide, 150 mM; sodium chloride, 2 mM; dichloride

magnesium and 1 mg/ml; 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β D-galactopyranoside) in a 37°C chamber. Pictures were taken using a 40X magnification with a Zeiss Axioskop microscope (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) connected to a SPOT Digital Camera (Diagnostic Instruments inc., Sterling Heights, MI).

Western blotting- Whole cells lysates were harvested in 100 μ l of TGH buffer (pH 7.3, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 50 mM NaCl, 50 mM HEPES, 5 mM EDTA) complemented with protease inhibitors and 1 mM sodium orthovanadate. Whole cell lysates were solubilized (4 °C, 1 h), and total soluble proteins (40 μ g) were loaded onto polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blotted for relevant proteins using specific primary antibodies (described for each experiment). Secondary antibodies were all FITC-conjugated and fluorescence was detected using a Typhoon 9410 scanner (Amersham Biosciences). Quantification of the digital images obtained was performed using ImageQuant 5.2 software.

Cell fractionation- Cells were harvested in 100 μ l of PBS containing protease inhibitors and passed three times through a 27G 1/2 syringe. Samples were spun at 500g for 10 minutes, at 4°C. Supernatants were spun at 100 000 rpm for 30 minutes, at 4°C, to separate membrane (pellet) and cytosol (supernatant). Whole nuclear extracts were obtained by solubilizing the pellets from the 500g centrifugation in Buffer I (160 mM sodium chloride, 38 mM HEPES pH: 7.4, 1 mM dichloride magnesium and 1 mM EGTA) containing protease inhibitors. Samples were put on ice for 30 minutes and then spun at 14 000 rpm for 30 minutes. For chromatin fractions, cells were harvested in 100 μ l of Buffer I containing protease inhibitors and put on ice for 5 minutes. Nuclei were isolate by centrifugation at 500 g for 10 minutes, at 4°C. Pellets were resuspend in Buffer II (100 mM PIPES pH:6.8, 300 mM sodium chloride, 300 mM sucrose, 3 mM dichloride magnesium, 1 mM EGTA, 1 mM DTT and 0.5% Triton X-100) containing protease inhibitors. Insoluble chromatin fraction were collected by centrifugation (600 g for 5 minutes, at 4°C) and then washed once in Buffer II containing protease inhibitors. Samples were run on a 10% or

14% polyacrylamide gel. Proteins were detected by immunoblot analysis using specific antibodies.

Real-time PCR- For real-time reverse transcription-PCR, 5 µg of total mRNA was reverse-transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with random primers (Applied Biosystems, CA, USA). As previously described (Boulay et al., 2008), gene expression levels were determined using primers and probe sets from Applied Biosystems (ABI Gene Expression Assays). Primers for pRB, E2F1, Cyclin D1 and Mcm6 are available upon request.

ARF1 activation- Cells were plated in 6 well dishes, and treated or not with fresh serum medium or with Hydroxyurea (20 µM) or Vincristine (1 µM), at 37°C for 16 h and activation of ARF1 were performed as described (Cotton et al., 2007). Briefly, cells were lysed in 60 µl of ice-cold lysis buffer E (pH 7.4, 50 mM Tris HCl, 1% NP-40, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM MgCl₂, 20 mM NaF, 1 mM NaPPi, 1 mM Na₃VO₄, and protease inhibitors). Samples were incubated for 30 minutes (4°C) and spun for 10 minutes at 10 000 rpm. GST-GGA3 coupled to glutathione Sepharose 4B were added to each tube and samples were rotated at 4°C for 1 h. Proteins were eluted in 25 µl SDS-sample buffer by heating to 65°C for 15 minutes. Detection of ARF1-GTP was performed by immunoblot analysis using a specific anti-ARF1 antibody.

Microscopy- Cells were serum-starved or not for 16 h, fixed using paraformaldehyde (4%) for 15 minutes at room temperature. For detection of endogenous ARF1, cells were stained with a monoclonal anti-ARF1 antibody and then with an anti-mouse antibody coupled to Alexa-Fluor 488. For some conditions, cells were subsequently incubated with Hoescht 33258 for 10 minutes. Images were acquired using a 63X oil immersion objective (Carl Zeiss, Inc.) on a Zeiss LSM-510 META laser scanning microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). To determine SAHF positive cells, these were stained with a polyclonal anti-H3meK9 antibody and then with an anti-rabbit antibody coupled to Alexa-

Fluor 568. Cells were then fixed, mounted onto slides using Gel Tol mounting medium. Pictures were taken using a 40X magnification with a Zeiss Axioskop microscope (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) connected to a SPOT Digital Camera (Diagnostic Instruments inc., Sterling Heights, MI).

Co-immunoprecipitation experiments- MDA-MB-231 cells were treated or not with fresh medium for 16 h. Co-immunoprecipitation experiments (Co-IP) were described previously (Boulay et al., 2008). When Co-IP were performed in whole cell lysates or chromatin fractions, cells were lysed into TGH buffer (100 μ l) or lysed using the cell fractionation protocol, respectively. Interacting ARF1, pRB or E2F1 was assessed by Western Blot analysis.

GST-pull down assay- Equal amounts of GST and GST-pRB were incubated in buffer NETN (20 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.5% Nonidet, 1 mM DTT, 0.5 mg/ml BSA, 100 mM sodium chloride and protease inhibitors) with 1 μ g of purified recombinant ARF1 protein. ARF1 loading was performed using GDP β S (100 μ M) or GTP γ S (10 μ M) in buffer NETN in a final volume of 250 μ l. Loading of nucleotide was arrested with MgCl₂ (60 mM) after 30 minutes at 30°C and then samples were mixed with GST-pRB for a final volume of 250 μ l. In some experiments, GST and GST-pRB were incubated with IgG or Cdk4 immunoprecipitated from MDA-MB-231 cells, as described above using a specific anti-Cdk4 antibody, in a kinase buffer (Tris 20 mM pH 7.5, MgCl₂ 7.5 mM, DTT 1 mM, EGTA 0.5 mM) for 1 h at 30°C. Kinase reaction was stopped by adding 10 μ l of GST glutathione sepharose 4B beads and then put on ice for 20 min. Samples were rotated for 4 h at 4°C. Beads were recovered by centrifugation, washed five times, and proteins were eluted into 20 μ l of SDS-sample buffer by heating to 65°C for 15 minutes. All samples were run on a 10% or 14% polyacrylamide gel, and pRB/ARF1 interaction was detected by Western blotting using a specific anti-ARF1 antibody and an anti-pRB antibody. GST-pRB was a gift from Dr. Tony Kouzarides (The Gurdon Institute and Department of Pathology, University of Cambridge, Cambridge, UK).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay- Methods were modified from (Takahashi et al., 2000). Briefly, a first set of MDA-MB-231 cells were transfected or not with ARF1 siRNA (25 nM) for 7 days. A second set of cells were incubated in the absence or presence of fresh medium (16 h). All cells were treated with 1.5% formaldehyde for 10 minutes at RT and then incubated with glycine (125 mM) for 5 min. Cells were washed twice with PBS, harvested in cold PBS containing protease inhibitors, spun at 700 g for 5 minutes, and washed once with PBS. Pellets were successively resuspended in ChIP1 buffer (EDTA 2 mM, SDS 0.1%, Tris-HCl 20mM pH 7.5, Triton X-100 1%, containing protease inhibitors), and ChIP2 buffer (EDTA 1 mM, SDS 0.1%, Tris-HCl 20mM pH 8.0, Triton X-100%, NaCl 150 mM, containing protease inhibitors). Samples were sonicated to generate DNA fragments of approximately 500 bp. For immunoprecipitation experiments, 0.5 mg of protein extract was precleared for 3 h with 25 µl of a 50% slurry of protein A/G agarose beads and 6 µg of salmon sperm DNA at 4°C. Anti-pRB, anti-E2F1, anti-ARF1 antibodies or beads alone (No Ab) were incubated with the samples overnight at 4°C. Immunoprecipitates were recovered by a 2 h-incubation at 4°C with 25 µl of a 50% slurry of protein A/G agarose beads. Precipitates were washed 3 times with ChIP3 buffer (EDTA 1 mM, SDS 0.1%, Tris-HCl 20mM pH 8.0, Triton X-100%, NaCl 150 mM, 500 mM LiCl). Immunocomplexes were eluted for 10 minutes at 65°C with 1% SDS and crosslinking was reversed by adding an equal volume of TE, NaCl (up to 200 mM), and RNase (10 mg) by incubating overnight at 65°C. After 2 h of Proteinase K treatment, DNA was extracted with phenol/chloroform and chloroform. Samples were then precipitated with 0.2M of NaCl (containing 20 mg of glycogen carrier) and 2.5 volumes of EtOH before being resuspended in 60 µl of TE buffer. First, PCR reactions were performed using 2 µl of each sample. Forward and reverse primers (250 nM), dNTP (0.2 mM), PFU MgSO₄ buffer (1X), and PFU (0.5 unit) were added to a final volume of 20 µl. PCR were performed using a thermocycler T-Personnal Biometra® (Montreal Biotech, Kirkland, Canada) to amplify E2F-responsive promoter regions. Second, qPCR reactions were performed using Universal Probe Library (UPL) for Actin or SYBR green assays for Mcm6 and Cyclin D1. Gene expression level was determined using assays designed with the UPL

(www.universalprobelibrary.com) from Roche. qPCR reactions were performed using 1.5 μ l of cDNA samples (5-25 ng), 5 μ l of the TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2 μ M of each primer and 1 μ M of a UPL probe #17 in a total volume of 10 μ l. SYBR green qPCR reactions were performed using 1.5 μ l of cDNA samples (5-25 ng), 5 μ l of the Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) and 2 μ M of each primer in a total volume of 10 μ l. Melting curves were performed using dissociation curve software (SDS 2.2.2) to ensure only a single product was amplified. The ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) was used to detect the amplification level and was programmed with an initial step of 3 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of: 5 sec at 95°C and 30 sec at 60°C. All reactions were run in triplicate and the average values of Cts were used for quantification. The relative quantification of target genes was determined using the $\Delta\Delta$ CT method. Briefly, the Ct (threshold cycle) values of target genes were normalized to an endogenous actin control gene (Δ CT = Ct target – Ct CTL) and compared with a calibrator: $\Delta\Delta$ CT = Δ Ct Sample - Δ Ct Calibrator. Relative expression (RQ) was calculated using the Sequence Detection System (SDS) 2.2.2 software (Applied Biosystems) and the formula is $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$. Primers sequences are available upon request.

Statistical analysis- Statistical analysis was performed using a one-way and two-way analysis of variance followed by a Bonferroni's multiple comparison tests using GraphPad Prism (ver. 4.0a; San Diego, CA).

III.4 Results

ARF1 regulates breast cancer cell proliferation

To define the role of ARF1 in breast cancer cell proliferation, we first examined the effect of depleting this GTPase in the MDA-MB-231 cell line. As reported previously, endogenous ARF1 expression was reduced by 90% 3 days following transfection of our siRNA (Fig. 25A) (Boulay et al., 2008). As illustrated in figure 25B, cells transfected with a control siRNA gradually proliferated over a 12-day period. During the first 6 days

following transfection, depletion of ARF1 did not significantly impair the proliferation rate of MDA-MB-231 cells. However, ARF1 knockdown markedly reduced the ability of the cells to proliferate from day 7 to 12, the later time point we examined. The effect of depleting ARF1 was prevented by overexpressing an siRNA-insensitive ARF1 construct (ARF1mut) demonstrating specificity. We also examined proliferation of human breast epithelial cells, MCF10A, an immortalized and non transformed cell line harboring no mutation in the Ras and HER2 genes (Soule et al., 1990). As illustrated in figure 25C, depletion of ARF1 significantly blocked the proliferation of MCF10A cells, an effect observed 7 days post-transfection. In these cells, ARF1 siRNA reduced by 81% the endogenous levels of protein, 3 days after the transfection (Supplemental Fig. 31). We next examined the ability of the MDA-MB-231 cells to form colonies on soft agar to assess anchorage independent cell proliferation. ARF1 depleted cells were significantly impaired in their ability to form colonies, over a 21-day period, compared to control transfections (Fig. 25D). Finally, we examined the effect of overexpressing a constitutively active (ARF1Q71L) and a dominant negative (ARF1T31N) form of this GTPase in MDA-MB-231 cells. As illustrated in figure 25E, ARF1Q71L expression led to enhance cell proliferation while ARF1T31N expression was inhibitory. We next examined the effect of this later ARF1 mutant in colonies formation on soft agar media. ARF1T31N inhibited the ability of MDA-MB-231 cells to form spots of colonies over a 21-day period compared to the control condition (empty vector) (Fig. 25F).

To determine whether this growth-arrest we observed in ARF1 depleted or inactivated cells was associated with the induction of senescence, we next examined more closely cell entry into this program known to prevent unlimited cell proliferation.

Depletion of ARF1 promotes cellular senescence

First, we performed a senescence-associated- β -galactosidase (SA- β -gal) activity assay to measure levels of this lysosomal enzyme found to be more active in senescent cells. As illustrated in figure 26A, no staining was observed in the control condition (non transfected MDA-MB-231 cells) demonstrating that in normal conditions, these cells are not senescent, but proliferate normally. The tumor suppressor p16INK4a, a cyclin-dependent kinase

inhibitor known to induce G1 arrest, was reported to be deleted in MDA-MB-231 cells (Supplemental. Fig. 33A) (Hui et al., 2000). As expected, its overexpression increased the number of SA- β -gal/senescent positive MDA-MB-231 cells (Fig. 26A). Inhibition of ARF1 expression resulted in senescence of MDA-MB-231 cells. A process observed 4 days after transfection of the siRNA, but maximal after 7 days. This effect was completely prevented by overexpressing the oncoviral protein E7, which promoted the degradation of pRB through the ubiquitin-proteasome pathway (Boyer et al., 1996). Depletion of ARF1 was also effective in inducing β -gal activity in SKBR3 cells, a cell line known to express high levels of p16INK4a (Supplemental. Fig. 33B) (Hui et al., 2000). We also assessed the effect of overexpressing the dominant negative form of ARF1. Expression of ARF1T31N increased the number of senescent MDA-MB-231 cells (Supplemental Fig. 34A). We next performed SA- β -gal activity assays in MCF10A cells. As illustrated in figure 26B, no activity was detected in control siRNA conditions. In contrast, ARF1 depletion increased the number of SA- β -gal positive cells. Representative pictures from SA- β -gal staining, 7 days post-transfection, are shown.

Senescent cells have flattened shape and exhibit heterochromatin foci formation called Senescence Associated Heterochromatin Foci (SAHF). These heterochromatic regions are characterized by an enrichment of histone H3 methylated on lysine-9 (H3meK9) (Narita et al., 2003). We examined SAHF to confirm that depletion of ARF1 can engage breast cancer cells senescence. As illustrated in figure 26C, control cells presented a normal cell shape (phase contrast picture) and a diffuse nuclear pattern of H3meK9 staining, where no chromatin condensation was observed. In contrast, cells transfected with ARF1 siRNAs harbored a flat shape (phase contrast picture) and displayed foci of heterochromatic regions enriched in H3meK9. Quantification of positive SAHF cells revealed that under ARF1 depletion, 54% of the cells harbored this phenotype. Finally, we examined the number of SAHF positive cells when ARF1T31N was expressed. We observed that in these conditions, 53% of the cells were positive (Supplemental Fig. 34B). Taken together, our data show that the number of senescent cells, assessed by SA- β -gal activity, correlates with the quantification of SAHF positive cells.

The rescue of the senescence phenotype by E7 and the presence of SAHF suggested a role for pRB in the senescence response induced by ARF1 depletion or expression of an inactive form. To define the molecular mechanism by which endogenously expressed ARF1 controls cellular proliferation, we next examined the association of pRB with the transcription factor E2F1, known to regulate cell cycle progression.

The association of pRB and E2F1 is regulated by ARF1

The main function of the pRB protein is to bind and inhibit transcription factors of the E2F family. Upon cells entry into S phase, pRB becomes hyperphosphorylated and allows E2F to dissociate and initiate transcription of target genes that facilitate the G1/S transition and S-phase. We first examined the role of ARF1 in controlling pRB hyperphosphorylation, and its subsequent association with E2F1. When cells were in the presence of serum containing media, pRB was highly phosphorylated on Ser 795 (ppRB). Depletion of ARF1 markedly inhibited this effect (Fig. 27A). In addition, when cells overexpressed a constitutively activated or a dominant negative form of ARF1, hyperphosphorylation of pRB was enhanced or diminished, respectively, when compared to the control condition (empty vector) (Fig. 27A). Third, when cells were arrested in the G0/G1 phase (no serum), pRB and E2F1 remained associated, thereby preventing cell cycle progression (Fig. 27B). In contrast, when cells were in the presence of serum (cnt), pRB was dissociated from E2F1. Four days after transfection of ARF1 siRNA, pRB was already found constitutively in complex with E2F1 (Fig. 27B). This effect was prevented when an ARF1 construct, insensitive to the siRNA, was expressed. To define whether the association of pRB to E2F1 was dependent upon the presence of the GTPase or its ability to become activated, we expressed the ARF1 mutants mimicking the GDP and GTP-bound form. Expression of ARF1T31N resulted in the association of pRB and E2F1, while the active form of the GTPase prevented the interaction (Fig. 27B) suggesting that activation of the GTPase promotes dissociation of the pRB/E2F1 complex. Similar observations were obtained 7 days post-transfection (data not shown).

In these experiments, we systematically observed a small but significant decrease of total pRB expression when ARF1 siRNA was transfected (Supplemental Fig. 35A), while levels

of p107 and p130 remained unaffected (data not shown). We therefore examined whether decreased levels of total pRB were the result of altered gene expression or increased degradation by performing qRT-PCR. The levels of pRB mRNA transcripts were found to be similar in control and ARF1 siRNA transfected cells 4 days after transfection (Supplemental Fig. 35B). Depletion of ARF1 led to increased ubiquitination of pRB, a process maximal 4 days after transfection (Supplemental Fig. 35C).

To further understand the role of ARF1 in regulating cell cycle progression, we examined the expression profile of E2F1 responsive genes, Cyclin D1, Mcm6 and E2F1 known to respectively regulate CDK, initiation of genome replication, and gene transcription. Depletion of ARF1 significantly reduced the expression of these genes both at the protein (Fig. 27C) and mRNA levels (Fig. 27D). Notably, these effects were only observed after 6 and 7 days of siRNA transfection, the time point at which a maximal number of cells are senescent.

Altogether, these data suggested to us that the level of activated ARF1 might change during cell cycle progression to modulate the association of pRB and E2F1, and subsequent cell cycle gene transcription.

Activation and cellular distribution of ARF1 during cell cycle progression

To better understand the role of endogenously expressed ARF1 in MDA-MB-231 cells, we examined the activation profile of this GTPase through the cell cycle. We first used GST-pull down assays to assess ARF1-GTP levels during G0/G1, G1/S and M phases. MDA-MB-231 cells were maintained in fresh media containing serum (cnt), synchronized in the G0/G1 phase using serum starving media or treated with cell cycle inhibitors, hydroxyurea and vincristine to synchronize cells in G1/S and M phase, respectively. As described in figure 28A, ARF1-GTP levels were found to be higher in control conditions where cells can proliferate normally. In contrast, activated ARF1 levels were significantly lower when cells were arrested in the G0/G1 phase, but gradually increased during the G1/S and M phases. We next examined the cellular localization of the GTPase. We overexpressed ARF1-Flag and performed cell fractionation assays to assess ARF1 distribution in the soluble, nuclear and chromatin fractions. First, levels of ARF1-Flag were found similar in

the soluble fraction of cells proliferating normally (cnt) or arrested in the different phases of the cell cycle (Fig. 28B). However, when cells were arrested in the G0/G1 or M phase, amounts of ARF1-Flag were found increased in the nuclear fraction, in contrast to GM130 a Golgi marker, present in large amounts in the membrane fraction, but also in the cytosolic fraction (Fig. 28B and Supplemental Fig. 36A). We next extracted chromatin from the nucleus and observed that ARF1-Flag levels were increased when cells were arrested in G0/G1, as well as the M phase (Supplemental Fig. 36B). Using a specific ARF1 antibody, we examined the distribution of endogenously expressed ARF1. Similarly to what we observed when ARF1 was overexpressed, the amount of endogenous ARF1 in the chromatin was increased during the G0/G1, but not during M phase (Fig. 28C). Lastly, we examined the distribution of ARF1 using confocal microscopy. In normal conditions and at the confocal plane we examined, much of the endogenous ARF1 protein was found in the Golgi (single green spot), next to the nucleus (Fig. 28D). However, when cells were synchronized in the G0/G1 phase (no serum), ARF1 was localized to the nucleus. Altogether, these results suggest that the activity of ARF1 is modulated during the different phases of the cell cycle although protein levels remain constant. In addition, our data suggest that depending on its activation state, this GTPase can be relocalized to different cellular compartments.

We next examined the possibility that ARF1 might interact with pRB. In these experiments pRB or other members of the family were immunoprecipitated and amounts of interacting ARF1 detected by Western blot analysis. In control conditions, when cells were allowed to proliferate normally, endogenously expressed ARF1 did not interact with pRB, p107 or p130 (Fig. 29A). However, arrest in the G0/G1 phase led to the formation of a complex including pRB and ARF1. In these experiments, p107 and p130 did not interact with the GTPase. In order to determine whether the activation state of ARF1 may modulate its ability to interact with pRB in chromatin extracts, we overexpressed the dominant negative and constitutively active mutants of ARF1. When cells were arrested in the G0/G1 phase, endogenously expressed ARF1 was also found in the chromatin extract, in complex with pRB. Similar results were observed when ARF1T31N was expressed (Fig. 29B). In

contrast, ARF1Q71L did not relocalize to the chromatin and interact with pRB. When cells were allowed to proliferate normally (cnt), endogenously expressed ARF1 did not interact with pRB possibly because low levels of ARF1 were present within the chromatin in these conditions. However, the inactive mutant (ARF1T31N), but not the constitutively active form of ARF1 (ARF1Q71L), was found in the chromatin and interacted with pRB (Fig. 29B). Using confocal microscopy, ARF1T31N was found to be present in the nucleus of proliferating MDA-MB-231 cells, in contrast to ARF1 (Supplemental Fig. 37A). In COS-7 cells, which expressed large T antigen known to inhibit the growth-regulatory function of pRB (Chellappan et al., 1992; Gluzman, 1981; Miller et al., 2007), the ARF1 mutant was not found in the nucleus but perinuclearly (Supplemental Fig. 37B). To further determine whether the endogenous expression of pRB could regulate the enrichment of endogenous ARF1 or ARF1T31N in chromatin, we next overexpressed E7 to specifically decrease pRB level. When MDA-MB-231 cells were synchronized in the G0/G1 phase (no serum) or allowed to proliferate (serum), overexpression of E7 prevented the enrichment of ARF1 and ARF1T31N in chromatin (Supplemental Fig. 37C). We next examined whether ARF1 and pRB could directly interact using purified proteins. As illustrated in figure 29C, GST-pRB interacted preferentially with the GDP-bound form of the GTPase. Because the phosphorylation status of pRB impacts its ability to interact with binding partners, we investigated whether the interaction between ARF1 and pRB could be modulated by the phosphorylation state of pRB. As illustrated in figure 29D, phosphorylation of GST-pRB by Cdk4, immunoprecipitated from MDA-MB-231 cells, abolished its ability to interact with ARF1. Altogether, these data demonstrate that in some conditions, ARF1 can interact with pRB.

ARF1 regulates the stability of the association of pRB/E2F1 to its target genes promoters

We next investigated whether ARF1 could regulate the association of E2F1 and pRB to promoters of Cyclin D1 and Mcm6 genes using chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays. PCR analysis revealed that in control growing cells, a fraction of E2F1, but not pRB, interacts with Cyclin D1 and Mcm6 promoters (Fig. 30A). Depletion of ARF1 resulted in the stabilization of the interaction between E2F1 and its target gene promoters.

Interestingly, pRB was also found interacting with Cyclin D1 and Mcm6 promoters. To evaluate the enrichment of pRB and E2F1 as a function of the input fraction, we performed quantitative PCR experiments. In control cells, no pRB or E2F1 were enriched at CyclinD1 and Mcm6 promoter sites (Fig. 30B). Depletion of ARF1 however led to the recruitment of both pRB and E2F1 at these gene promoter sites. The enrichment of pRB at CyclinD1 and Mcm6 sites was 2.93 and 1.49 fold respectively and the enrichment of E2F1 at the same promoter sites was 3.40 and 1.70 fold, respectively. These data suggest that in conditions where ARF1 expression is reduced, the interaction of E2F1 and pRB to their gene promoters, is more stable and probably dependent on a less dynamic chromatin.

Finally, we investigated the possibility that ARF1 could interact with Cyclin D1 and Mcm6 promoters. Chromatin immunoprecipitation of this GTPase revealed its ability to interact with both gene promoters during G0/G1 phase, but not during proliferative conditions (Fig. 30C). Q-PCR showed that ARF1 enrichment to CyclinD1 and Mcm6 promoter sites was respectively 6.30 and 3.82 fold (Fig. 30D). Altogether, these results demonstrate that ARF1 directly impacts pRB/E2F1 interplay, on chromatin, at endogenous sites of E2F1 action.

III.5 Discussion

In invasive breast cancer cells, ARF GTPases are found highly expressed and regulate migration as well as invasion (Boulay et al., 2008; Hashimoto et al., 2004). In this study, we have used 2 approaches to define the role of ARF1 on cellular proliferation: reduction of expression of this protein by RNA interference, and overexpression of mutants mimicking either an inactive or active form. These strategies allowed us to study the impact of significantly lowering ARF1 levels as well as the consequence of modulating its activation state. Reduction of ARF1 expression in breast cancer cells as well as normal epithelial breast cells, limited proliferation. In contrast, expression of an ARF1 mutant mimicking a constitutively activated GTPase enhanced proliferation. Our findings revealed that the molecular mechanism by which ARF1 depletion or inactivation limited proliferation is through the modulation of pRB hyperphosphorylation, its association with E2F1, as well as cell cycle gene expression leading to cellular senescence.

We have previously reported that short-term depletion of ARF1 (4 days post-transfection) had no effect on basal, but markedly inhibited EGF stimulated proliferation of MDA-MB-231 cells (Boulay et al., 2008). Here, we present evidence that at this time point, inhibition of ARF1 expression already affects the association of pRB with E2F1, although most cells have not yet entered the senescence program. Long-term depletion of ARF1 (4 to 12 days post-transfection) led to impaired basal proliferation rate of both control and tumor breast epithelial cells. The induction of senescence is considered an effective mechanism to promote permanent cell cycle arrest, and is mainly associated with pRB and p53 pathways. In MDA-MB-231 cells, p53 is mutated and no longer an effective tumor suppressor (Olivier et al., 2002). In contrast pRB controls cell cycle gene expression thereby limiting cell proliferation. It was previously reported that induction of senescence could take place in non-invasive MCF7 breast cancer cells. For example, retinoic acid treatment first induced a slower cell growth rate between days 4 and 6, a decrease in cell number between day 6 and 9, and finally detectable SA- β -gal activity at day 8 (Roninson and Dokmanovic, 2003). Furthermore, senescence was also demonstrated in MDA-MB-231 cells (Bartholomew et al., 2009; Sullivan et al., 2008). In our experiments, SA- β -gal activity could be detected as soon as 4 days post-transfection to reach a maximum at day 7. Because we were able to revert the induction of senescence promoted by ARF1 depletion when we overexpressed the human papilloma virus E7 oncoprotein, we concluded that the induction of senescence observed was dependent on the RB family of pocket proteins as E7 is known to enhance pRB degradation via the ubiquitin-proteasome pathway (Boyer et al., 1996). We also observed that depletion of ARF1 led to chromatin condensation and appearance of heterochromatin foci, a process detectable by methylation of histone H3 on lysine-9 residue. Condensation of heterochromatic regions is known to silence transcriptional activities of E2F members by inhibiting the availability of gene promoter target sites (Narita et al., 2003). Interestingly, when cells were depleted of ARF1, we observed a significant reduction of Cyclin D1, Mcm6, and E2F1 mRNA as well as protein expression. Altogether, our findings suggest that a strategy aiming at reducing ARF1 levels in breast cancer cells would be effective in limiting tumor growth.

In order to better define the molecular mechanism by which ARF1 regulated cellular proliferation, we examined in more details pRB. First, our findings indicated that ARF1 acted specifically on this member of the RB family of proteins. P107 and p130 are also known to bind E2F responsive promoters, but are rather associated with quiescence (Chicas et al.; Rayman et al., 2002; Takahashi et al., 2000). We found that reduction of ARF1 levels markedly reduced hyperphosphorylation of pRB suggesting that ARF1 depletion might inhibit CDK via a mechanism independent of p16INK4a since this cell line exhibit an homologous deletion of this gene (Hui et al., 2000). These findings are further supported by our observation that deletion of ARF1 can also promote senescence of SKBR3 cells, a p16INK4a positive cell line (Hui et al., 2000). In our experiments, depletion of ARF1 led to increased pRB/E2F1 association suggesting that in conditions where ARF1 cannot become activated, E2F1 is not able to fulfill its main function and act to promote gene transcription to initiate cell cycle progression. Using ChIP assays, we demonstrated that reduction of ARF1 levels markedly contributed to stabilize the interaction of E2F1, but also pRB, to target gene promoters, and repress transcription. We observed that depletion of ARF1 led to a reduction of mRNA and protein levels of Cyclin D1, Mcm6, and E2F1, three E2F1 target genes.

In order to control cell proliferation, we hypothesized that the activation state and the localization of endogenously expressed ARF1 may change during the different phases of the cell cycle. First, when cells were grown in the presence of serum, ARF1 was highly basally activated and mainly present at the Golgi, but also associated with dynamic plasma membrane ruffles (Boulay et al., 2008). However, when cells were arrested in the G0/G1 phase, amounts of GTP-bound ARF1 markedly decreased and endogenously expressed proteins were found within nuclei, associated with the chromatin at E2F-responsive promoter sites. Levels of cellular activated ARF1 progressively increased during progression through the G1/S and M phases of the cell cycle. These results demonstrate that the activation state as well as the cellular localization of ARF1 changes during cell cycle. Although the role of ARF isoforms, in carrier vesicle formation, is well characterized, it has been speculated by different groups that these proteins may have additional functions.

Altan-Bonnet and colleagues have shown that in mitosis (M-phase), ARF1 becomes inactive and is dissociated from the Golgi. These events are essential for chromosome segregation, and cytokinesis (Altan-Bonnet et al., 2003). Arl5, an ARF sub-family member, was shown to be present within the chromatin (Lin et al., 2002). In contrast to this Arl isoform, ARF1 does not contain a nuclear localization signal peptide in its sequence or a chromatin-binding domain. Its relocalization to the nucleus might require binding to nucleoporins. ARF GEFs such as BRAG2 have been detected in nuclei both biochemically and morphologically (Dunphy et al., 2007). Moreover, both BIG1, a GEF that is localized to the trans Golgi network at steady state, and Centaurin α 1, a GAP for ARF6, have been reported to enter the nucleus and interact with the nucleolar protein nucleolin (Dubois et al., 2003; Padilla et al., 2008). Similarly, PIKE (AGAP2/Centaurin- γ 1) was also found within nuclei (Dunphy et al., 2007). In addition, small GTP-binding proteins of the Ran family are best known for their crucial roles in the regulation of nucleocytoplasmic transport and in the function of mitotic spindle (Yudin and Fainzilber, 2009). Similar to other small G proteins, ARF1 may regulate processes in the nucleus, Golgi and at the plasma membrane.

The use of ARF1 mutants has confirmed the importance of this GTPase in the process of cell proliferation. Here, we have shown that expression of ARF1T31N, known to sequester ARF GEFs and prevent activation of endogenously expressed ARF1 proteins, resulted in the inhibition of cell growth further supporting the hypothesis that ARF1 activation is a key event regulating cell cycle progression. The observation that overexpression of ARF1Q71L, a dominant activating mutant, enhanced proliferation further demonstrated the importance of ARF1 activation in this process. Expression of ARF1 mutants was also effective in modulating hyperphosphorylation of pRB. Like depletion of ARF1, expression of the dominant negative form reduced pRB hyperphosphorylation while the dominant activating form further enhanced this effect. In addition, ARF1T31N markedly increased the ability of pRB to associate with E2F1 when cells were in the presence of serum, an interaction only observed upon cell growth arrest. Finally, using ARF1 mutants, we have shown that when this GTPase is inactive, it is able to directly interact with pRB, in chromatin extract. In contrast, a constitutively active form is not present in the chromatin extract and not binding

to pRB. The exact role of the ARF1/pRB interacting remains to be defined. Our data clearly demonstrated that the activation state of this GTPase dictates its ability to associate and modulate pRB hyperphosphorylation as well as its association with E2F1 therefore suggesting that a strategy that would impair the ability of this ARF to become activated when highly expressed in invasive breast cancer cells would be effective in limiting dissociation of the pRB/E2F1 complex, and cell cycle progression. The observation that ARF1 depletion and ARF1 inactivation consistently resulted in inhibition of proliferation suggest that it is the activation process of ARF1 that is essential for cell cycle progression. In G0/G1, ARF1 becomes mainly under its inactivated form even though it is highly expressed in MDA-MB-231 cells. However, as cells progress to G1/S phase, this GTPase progressively becomes reactivated. Depletion of ARF1 or expression of the dominant negative form would markedly impact this reactivation process of the GTPase. The importance of ARF cycling between a GDP- and GTP-bound form has been demonstrated previously during mitosis (Altan-Bonnet et al., 2003). In light of our findings, ARF1 may have additional roles. Its ability to be recruited to the chromatin upon G0/G1 arrest, directly interact with pRB, and associate with cell cycle gene promoters suggests that this GTPase may directly control the function of key cell cycle proteins and well as gene expression. These interesting observations will be important topics for future investigations.

In summary, our findings demonstrate that the GTPase ARF1 is a key regulator of proliferation, a cellular response often misregulated in pathological conditions such as breast cancer. The rapid activation of this molecular switch, following EGF stimulation, to control activation of the PI3K/AKT pathway as well as its direct regulation of pRB function makes it an attractive target for novel therapies. In this paper, we show that high levels of active ARF1 (WT or Q71L) present in MDA-MB-231 cells contributes to the enhanced proliferative potential of these tumor cells. By being mainly under its GTP-bound form, ARF1 remains outside of the nucleus allowing pRB to be hyperphosphorylated, dissociate from E2F1, promoting cell cycle gene expression (Fig. 29A). Cells growing in serum-deprived media or overexpressing ARF1T31N have ARF1 mainly in its GDP-bound form. Inactive ARF is free to translocate to the nucleus to associate with pRB. In these

conditions, pRB is found mainly hypophosphorylated and associated with E2F1 thereby limiting gene transcription. This results in permanent cell growth arrest (Fig. 29B). Finally, reduction of ARF1 levels leads to a decrease of both active and inactive ARF1. In these conditions, pRB hyperphosphorylation is compromised and as a consequence remains in complex with E2F1, limiting gene transcription. Depletion of ARF1 therefore results in cell growth arrest (Fig. 29C). The cell growth arrest observed upon transfection of ARF1 siRNA or overexpression of ARF1T31N presented all the biochemical characteristics classically associated with the induction of senescence such as the formation of SAHF, the constitutive association of pRB and E2F, the stabilization of pRB/E2F1 to E2F-responsive gene promoters, and the decreased expression of Cyclin D1 and Mcm6, known to activate Cdk4/6 and be important for pRB hyperphosphorylation and DNA replication (Ewen et al., 1993; Ohtani et al., 1995). Recently, different tools were developed to inhibit ARF activation (Hafner et al., 2006; Viaud et al., 2007). Our results suggest that these or other strategies to limit the ability of ARF1 to become highly activated or expressed could effectively reduce cell proliferation and breast cancer progression.

Acknowledgements

We would like to thank Dr Tony Kouzarides (The Gurdon Institute, University of Cambridge, UK) for GST-pRB. We thank Raphaëlle Lambert from genomic platform of IRIC (Montreal, Canada). We are grateful to Dr Christian Beauséjour (University of Montreal, Montreal, Canada) for reagents and helpful discussion. We thank Dr. Stéphane A Laporte (McGill University, Montreal, Canada) for the use of his confocal microscope and Dr. Denis de Blois and Julie-Émilie Huot-Marchand (University of Montreal, Montreal, Canada) for the use of their photo-microscopy platform. We thank Dr. Véronique Bourdeau (University of Montreal, Montreal, Canada) for helpful discussion and critical

reading of the manuscript. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant MOP-79470 to AC. PLB is the recipient of a Frederick Banting and Charles Best PhD Research Award from the CIHR. AC is the recipient of a New Investigator Award from the CIHR.

III.6 References

Altan-Bonnet N, Phair RD, Polishchuk RS, Weigert R, Lippincott-Schwartz J (2003). A role for Arf1 in mitotic Golgi disassembly, chromosome segregation, and cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13314-9.

Azab AK, Azab F, Blotta S, Pitsillides CM, Thompson B, Runnels JM et al (2009). RhoA and Rac1 GTPases play major and differential roles in stromal cell-derived factor-1-induced cell adhesion and chemotaxis in multiple myeloma. *Blood* 114: 619-29.

Bartholomew JN, Volonte D, Galbiati F (2009). Caveolin-1 regulates the antagonistic pleiotropic properties of cellular senescence through a novel Mdm2/p53-mediated pathway. *Cancer Res* 69: 2878-86.

Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P et al (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo J* 22: 4212-22.

Boulay PL, Cotton M, Melancon P, Claing A (2008). ADP-ribosylation factor 1 controls the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway to regulate epidermal growth factor-dependent growth and migration of breast cancer cells. *J Biol Chem* 283: 36425-34.

Boyer SN, Wazer DE, Band V (1996). E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* 56: 4620-4.

Burkhart DL, Sage J (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* 8: 671-82.

Chellappan S, Kraus VB, Kroger B, Munger K, Howley PM, Phelps WC et al (1992). Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 4549-53.

Chicas A, Wang X, Zhang C, McCurrach M, Zhao Z, Mert O et al (2010). Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. *Cancer Cell* 17: 376-87.

Cohen LA, Honda A, Varnai P, Brown FD, Balla T, Donaldson JG (2007). Active Arf6 recruits ARNO/cytohesin GEFs to the PM by binding their PH domains. *Mol Biol Cell* 18: 2244-53.

Cotton M, Boulay PL, Houndolo T, Vitale N, Pitcher JA, Claing A (2007). Endogenous ARF6 Interacts with Rac1 upon Angiotensin II Stimulation to Regulate Membrane Ruffling and Cell Migration. *Mol Biol Cell* 18: 501-511.

Courtois-Cox S, Jones SL, Cichowski K (2008). Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene* 27: 2801-9.

D'Souza-Schorey C, Chavrier P (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 347-58.

Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM (1982). Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 3637-40.

Dimri GP, Campisi J (1994). Molecular and cell biology of replicative senescence. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59: 67-73.

Dubois T, Zemlickova E, Howell S, Aitken A (2003). Centaurin-alpha 1 associates in vitro and in vivo with nucleolin. *Biochem Biophys Res Commun* 301: 502-8.

Dunphy JL, Ye K, Casanova JE (2007). Nuclear functions of the Arf guanine nucleotide exchange factor BRAG2. *Traffic* 8: 661-72.

Duro D, Bernard O, Della Valle V, Berger R, Larsen CJ (1995). A new type of p16INK4/MTS1 gene transcript expressed in B-cell malignancies. *Oncogene* 11: 21-9.

Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato J, Livingston DM (1993). Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 73: 487-97.

Ferbeyre G, de Stanchina E, Lin AW, Querido E, McCurrach ME, Hannon GJ et al (2002). Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol Cell Biol* 22: 3497-508.

Galas MC, Helms JB, Vitale N, Thierse D, Aunis D, Bader MF (1997). Regulated exocytosis in chromaffin cells. A potential role for a secretory granule-associated ARF6 protein. *J Biol Chem* 272: 2788-93.

Gluzman Y (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23: 175-82.

Hafner M, Schmitz A, Grune I, Srivatsan SG, Paul B, Kolanus W et al (2006). Inhibition of cytohesins by SecinH3 leads to hepatic insulin resistance. *Nature* 444: 941-4.

Hashimoto S, Onodera Y, Hashimoto A, Tanaka M, Hamaguchi M, Yamada A et al (2004). Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6647-52.

Houndolo T, Boulay PL, Claing A (2005). G protein-coupled receptor endocytosis in ARF6-depleted cells. *J Biol Chem* 280: 5598-604.

Hui R, Macmillan RD, Kenny FS, Musgrove EA, Blamey RW, Nicholson RI et al (2000). INK4a gene expression and methylation in primary breast cancer: overexpression of p16INK4a messenger RNA is a marker of poor prognosis. *Clin Cancer Res* 6: 2777-87.

Larrea MD, Hong F, Wander SA, da Silva TG, Helfman D, Lannigan D et al (2009). RSK1 drives p27Kip1 phosphorylation at T198 to promote RhoA inhibition and increase cell motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 9268-73.

Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K et al (2002). PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 8: 1153-60.

Lin CY, Li CC, Huang PH, Lee FJ (2002). A developmentally regulated ARF-like 5 protein (ARL5), localized to nuclei and nucleoli, interacts with heterochromatin protein 1. *J Cell Sci* 115: 4433-45.

Mallette FA, Ferbeyre G (2007). The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence. *Cell Cycle* 6: 1831-6.

Manning BD, Cantley LC (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129: 1261-74.

Miller CL, Arnold MM, Broering TJ, Eichwald C, Kim J, Dinoso JB et al (2007). Virus-derived platforms for visualizing protein associations inside cells. *Mol Cell Proteomics* 6: 1027-38.

Mitchell R, Robertson DN, Holland PJ, Collins D, Lutz EM, Johnson MS (2003). ADP-ribosylation factor-dependent phospholipase D activation by the M3 muscarinic receptor. *J Biol Chem* 278: 33818-30.

Motti ML, Califano D, Troncone G, De Marco C, Migliaccio I, Palmieri E et al (2005). Complex regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in thyroid cancer cells by the PI3K/AKT pathway: regulation of p27kip1 expression and localization. *Am J Pathol* 166: 737-49.

Mythreya K, Blobel GC (2009). The type III TGF-beta receptor regulates epithelial and cancer cell migration through beta-arrestin2-mediated activation of Cdc42. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 8221-6.

Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA et al (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113: 703-16.

Narita Y, Nagane M, Mishima K, Huang HJ, Furnari FB, Cavenee WK (2002). Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas. *Cancer Res* 62: 6764-9.

Nevins JR, Chellappan SP, Mudryj M, Hiebert S, Devoto S, Horowitz J et al (1991). E2F transcription factor is a target for the RB protein and the cyclin A protein. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 56: 157-62.

Ohtani K, DeGregori J, Nevins JR (1995). Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 12146-50.

Ohtani K, Iwanaga R, Nakamura M, Ikeda M, Yabuta N, Tsuruga H et al (1999). Cell growth-regulated expression of mammalian MCM5 and MCM6 genes mediated by the transcription factor E2F. *Oncogene* 18: 2299-309.

Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P (2002). The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 19: 607-14.

Padilla PI, Uhart M, Pacheco-Rodriguez G, Peculis BA, Moss J, Vaughan M (2008). Association of guanine nucleotide-exchange protein BIG1 in HepG2 cell nuclei with nucleolin, U3 snoRNA, and fibrillarin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3357-61.

Parada LF, Tabin CJ, Shih C, Weinberg RA (1982). Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 297: 474-8.

Rayman JB, Takahashi Y, Indjeian VB, Dannenberg JH, Catchpole S, Watson RJ et al (2002). E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev* 16: 933-47.

Roninson IB, Dokmanovic M (2003). Induction of senescence-associated growth inhibitors in the tumor-suppressive function of retinoids. *J Cell Biochem* 88: 83-94.

Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88: 593-602.

Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson WD, Jr., Brenz R, McGrath CM et al (1990). Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res* 50: 6075-86.

Stearns T, Willingham MC, Botstein D, Kahn RA (1990). ADP-ribosylation factor is functionally and physically associated with the Golgi complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1238-42.

Sullivan R, Pare GC, Frederiksen LJ, Semenza GL, Graham CH (2008). Hypoxia-induced resistance to anticancer drugs is associated with decreased senescence and requires hypoxia-inducible factor-1 activity. *Mol Cancer Ther* 7: 1961-73.

Sun P, Yoshizuka N, New L, Moser BA, Li Y, Liao R et al (2007). PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell* 128: 295-308.

Takahashi Y, Rayman JB, Dynlacht BD (2000). Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev* 14: 804-16.

Takano Y, Takenaka H, Kato Y, Masuda M, Mikami T, Saegusa M et al (1999). Cyclin D1 overexpression in invasive breast cancers: correlation with cyclin-dependent kinase 4 and

oestrogen receptor overexpression, and lack of correlation with mitotic activity. *J Cancer Res Clin Oncol* 125: 505-12.

Tonic I, Yu WN, Park Y, Chen CC, Hay N (2010). Akt activation emulates Chk1 inhibition and Bcl2 overexpression and abrogates G2 cell cycle checkpoint by inhibiting BRCA1 foci. *J Biol Chem* 285: 23790-8.

Vernier M, Bourdeau V, Gaumont-Leclerc MF, Moiseeva O, Begin V, Saad F et al (2011). Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. *Genes Dev* 25: 41-50.

Viaud J, Zeghouf M, Barelli H, Zeeh JC, Padilla A, Guibert B et al (2007). Structure-based discovery of an inhibitor of Arf activation by Sec7 domains through targeting of protein-protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 10370-5.

Watanabe G, Albanese C, Lee RJ, Reutens A, Vairo G, Henglein B et al (1998). Inhibition of cyclin D1 kinase activity is associated with E2F-mediated inhibition of cyclin D1 promoter activity through E2F and Sp1. *Mol Cell Biol* 18: 3212-22.

Weinberg RA (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81: 323-30.

Wu D, Asiedu M, Wei Q (2009). Myosin-interacting guanine exchange factor (MyoGEF) regulates the invasion activity of MDA-MB-231 breast cancer cells through activation of RhoA and RhoC. *Oncogene* 28: 2219-30.

Yagata H, Kajiura Y, Yamauchi H Current strategy for triple-negative breast cancer: appropriate combination of surgery, radiation, and chemotherapy. *Breast Cancer*.

Yakes FM, Chinratanalab W, Ritter CA, King W, Seelig S, Arteaga CL (2002). Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt Is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res* 62: 4132-41.

Yudin D, Fainzilber M (2009). Ran on tracks--cytoplasmic roles for a nuclear regulator. *J Cell Sci* 122: 587-93.

Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC (2001). HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 3: 973-82.

III.7 Figures

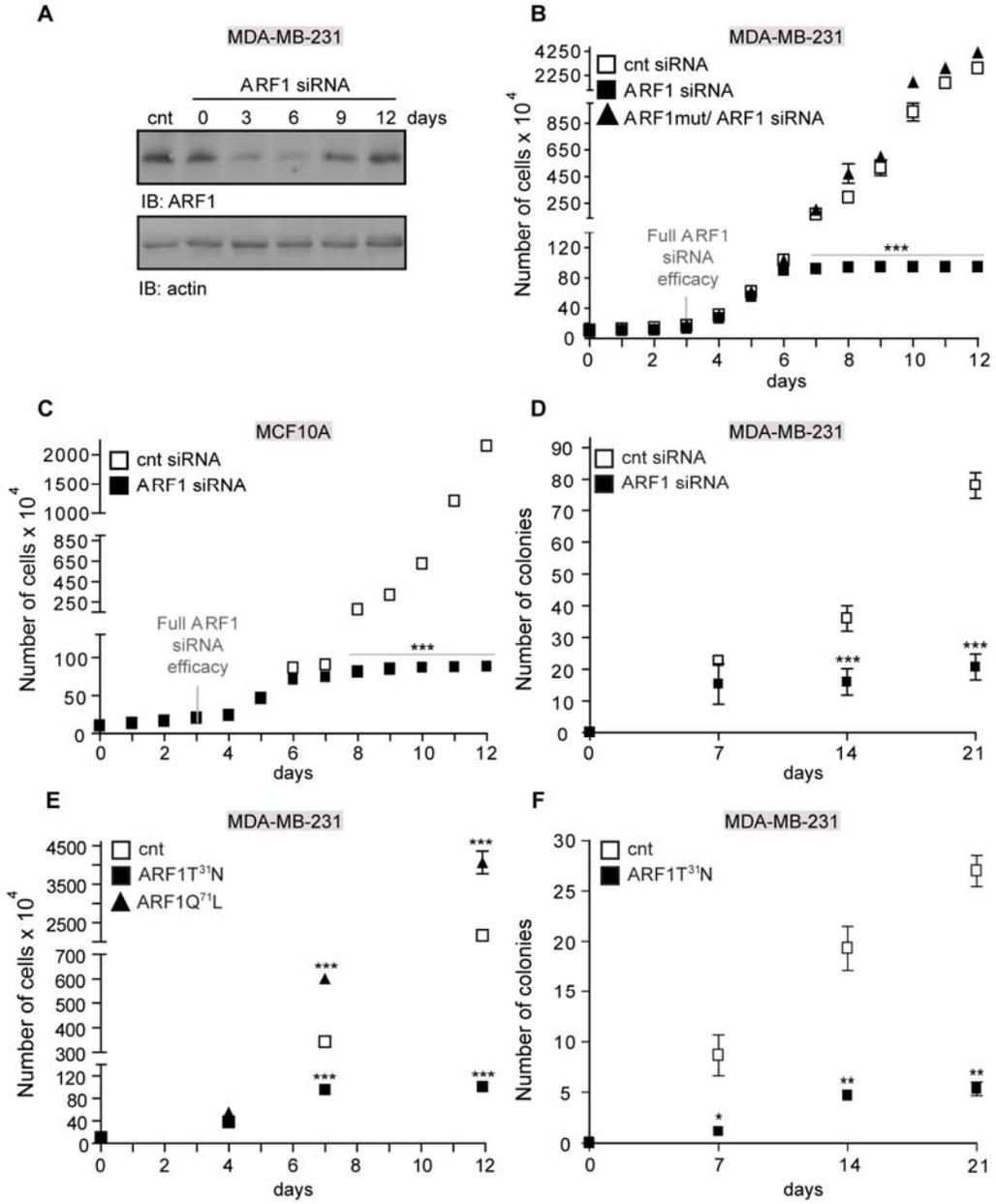


Figure 25: ARF1 regulates cell proliferation.

(A) MDA-MB-231 cells were transfected with a scrambled (cnt) or ARF1 siRNA. Endogenous expression of ARF1 and actin were examined by Western Blotting 0, 3, 6, 9 and 12 day(s) after siRNA transfection. These results are representative of 3 independent experiments. (B) MDA-MB-231 cells were transfected with a scrambled (cnt), ARF1 siRNA or ARF1 siRNA together with ARF1mut. Cells were reseeded into a 10 cm dish and left to grow for 12 days. Cell proliferation was represented as the number of cells, for each transfection condition as indicated. These results are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. ***P<0.001 are values compared to the paired control siRNA transfection condition. (C) MCF10A cells were transfected with a scrambled (cnt) or ARF1 siRNA, and proliferation was assessed as in A. Results are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. ***P<0.001 are values compared to the paired control siRNA transfection condition. (D) MDA-MB-231 cells were transfected with either a scrambled (cnt) or ARF1 siRNA and were plated onto soft agar. Fresh media was added and cells were left for 21 days. Results are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. ***P<0.001 are values compared to the paired control siRNA transfection condition. (E) MDA-MB-231 cells were transfected with an empty vector (cnt), ARF1Q⁷¹L or ARF1 T³¹N. Cell proliferation was assessed as in C. Results are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. ***P<0.001 are values compared to the paired control siRNA transfection condition. (F) MDA-MB-231 cells were transfected with an empty vector or ARFT³¹N and allowed to grow onto soft agar as in D. Results are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. *P<0.05, **P<0.01 are values compared to the paired empty vector control condition.

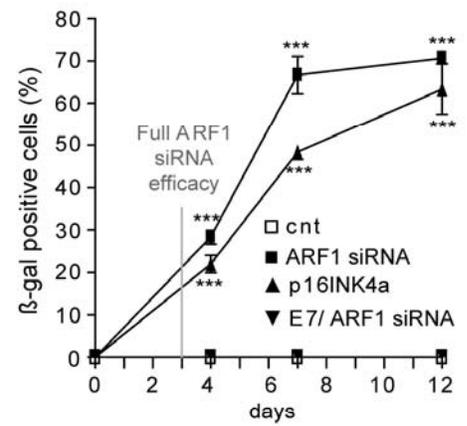
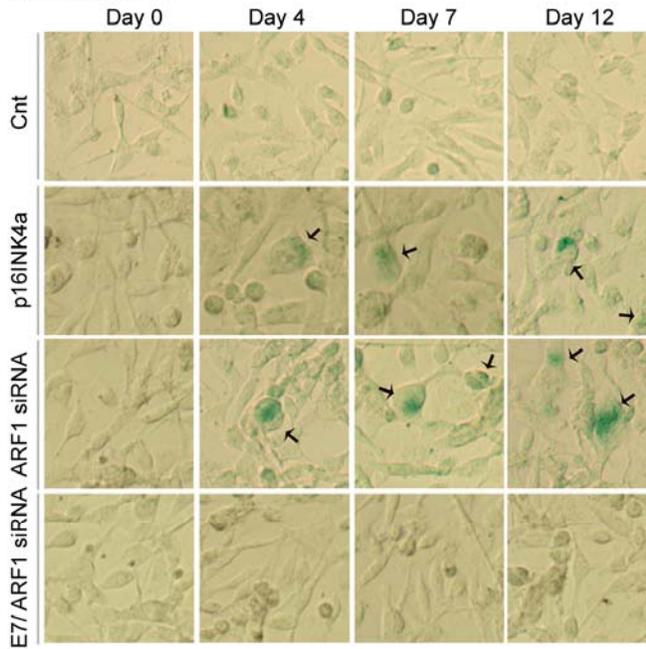
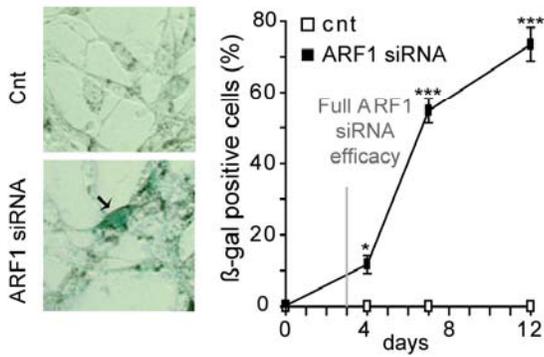
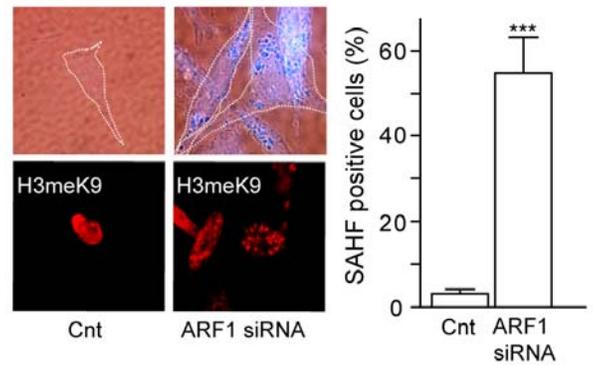
A MDA-MB-231**B MCF10A Day 7****C MDA-MB-231 Day 7**

Figure 26: ARF1 depletion leads to cellular senescence.

(A) MDA-MB-231 cells were transfected or not with an ARF1 siRNA or infected with p16^{INK4a}. In some conditions, ARF1 depleted cells were infected with E7. Cells were fixed and assessed for β -gal activity detection. Images represent pictures from 5 different fields taken after 0, 4, 7 and 12 day(s) post-transfection or post-infection. β -gal positive blue cells are marked by a black arrow. Quantifications represent the number of β -gal positive cells. Results are the mean \pm SEM of 7 independent experiments. ***P<0.001 are values compared to the paired non transfected condition. (B) MCF10A cells were transfected or not with an ARF1 siRNA. After the indicated times, cells were fixed and assessed for β -gal activity as in A. Results are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. *P<0.05, ***P<0.001 are values compared to the paired control siRNA transfection condition. (C) MDA-MB-231 cells were transfected with a scrambled (cnt) or ARF1 siRNA, fixed and stained with X-gal (contrast phase image) and anti-H3meK9 antibody (immunofluorescence image), 7 days post-transfection. Quantification represents the percentage of cells that exhibited the SAHF phenotype. Images represent pictures from 5 different fields taken. These results are representative of 6 independent experiments. ***P<0.001 are values compared with the cnt siRNA transfection condition.

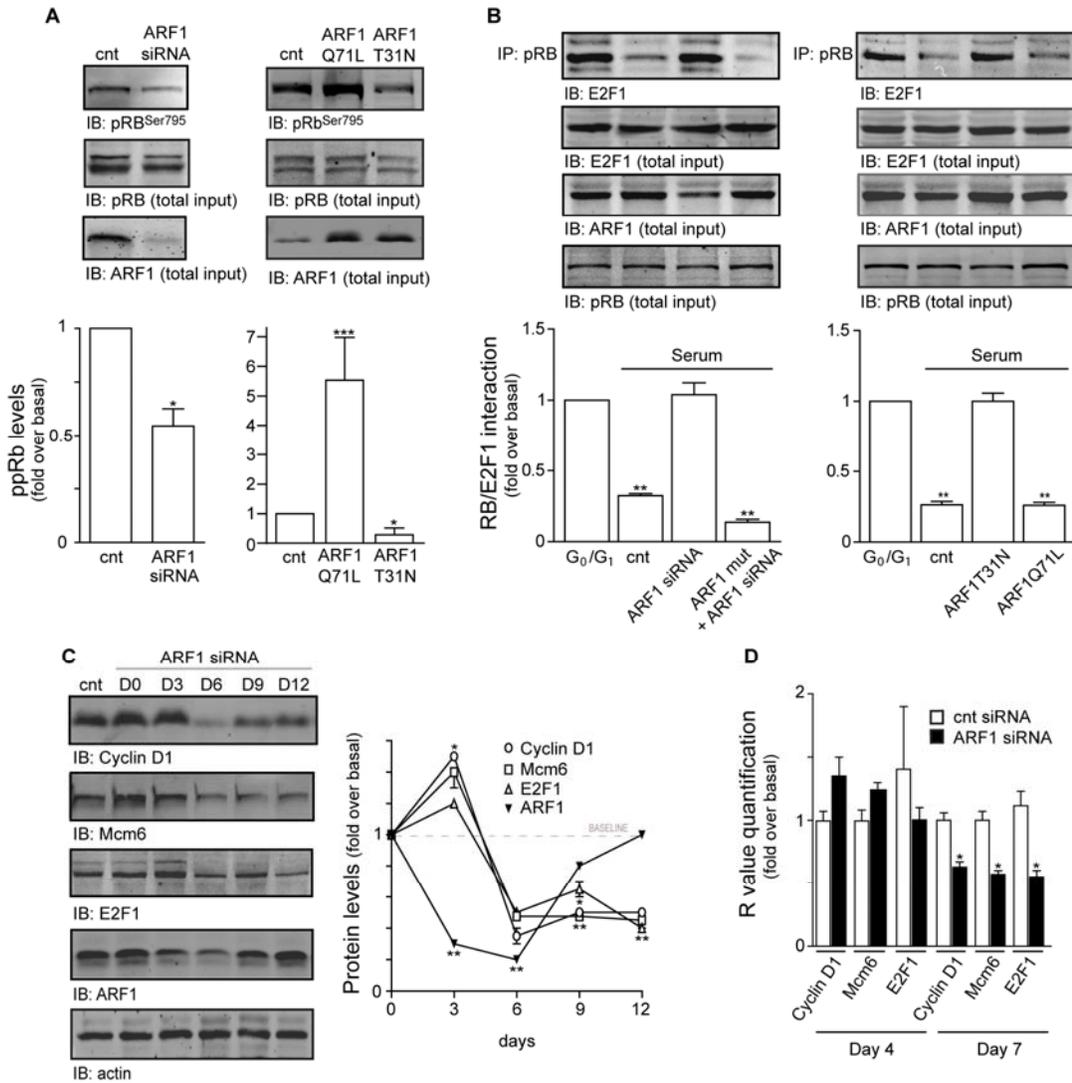


Figure 27: The association of pRB and E2F1 is regulated by ARF1.

(A) MDA-MB-231 cells were transfected with a control siRNA, ARF1 siRNA, empty vector, ARF1Q⁷¹L or ARF1T³¹N. Cells were then harvested and levels of pRB hyperphosphorylated on Ser 795 assessed by Western blotting. Quantifications are the mean \pm SEM of 4 independent experiments. *P<0.05, ***P<0.001 are values compared with the cnt condition. (B) MDA-MB-231 cells were transfected with ARF1 siRNA, ARF1 siRNA and ARF1mut, ARF1T³¹N or ARF1Q⁷¹L. Endogenous pRB was immunoprecipitated and interacting E2F1 was detected using Western Blot analysis. Quantifications are the mean \pm SEM of 4 independent experiments. **P<0.01 are values compared with non transfected cells treated under serum starved condition. (C) Cells were transfected with a scrambled (cnt) or ARF1 siRNA. Endogenous expression of Cyclin D1, Mcm6, E2F1, ARF1 and actin were examined by Western Blotting 0, 3, 6, 9 and 12 days after siRNA transfection. The control condition was assessed 3 days post-transfection. Quantifications are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. *P<0.05, **P<0.01 are values compared with the scrambled (cnt). (D) MDA-MB-231 cells were transfected with a scrambled (cnt) or ARF1 siRNA. mRNA levels of Cyclin D1, Mcm6 and E2F1 were assessed by quantitative real-time PCR after 4 and 7 days post-transfection. Data are presented as relative mRNA levels, and are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. *P<0.05, when compared to the cnt condition.

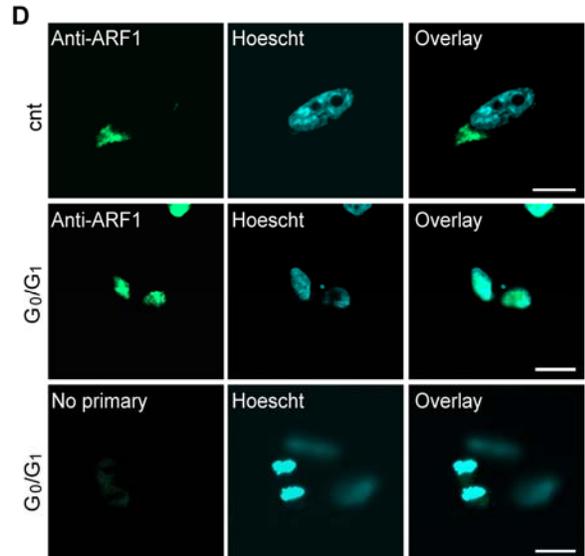
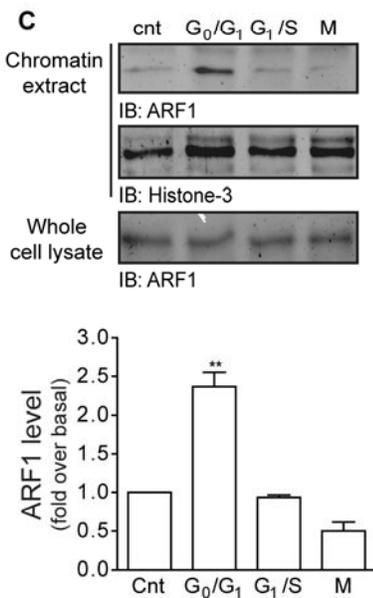
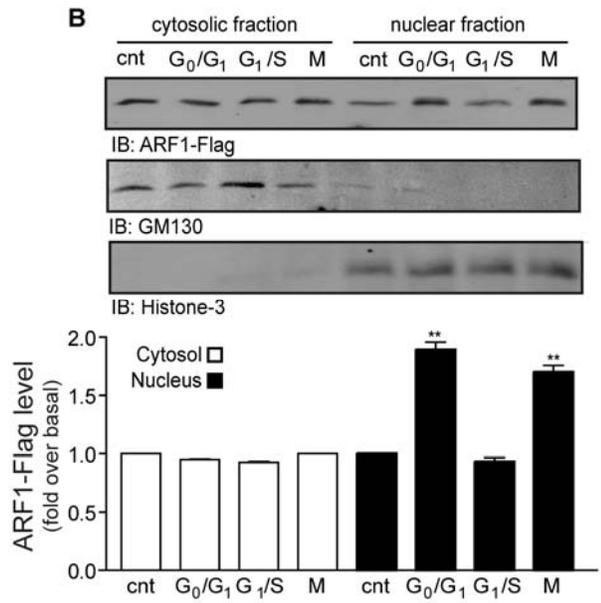
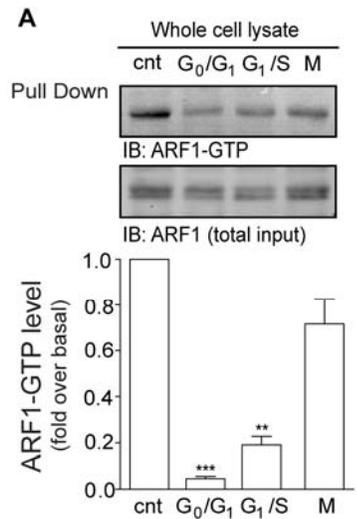


Figure 28: Redistribution of ARF1 in the nucleus in non proliferative conditions.

(A) MDA-MB-231 cells were arrested in the different phases of the cell cycle or left in normal serum conditions. ARF1-GTP levels were detected by Western blotting using a specific anti-ARF1 antibody. Quantifications are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. **P<0.01, ***P<0.001 are values compared to the cnt untreated condition for each cell fractions. (B) Cells were transfected with ARF1-Flag and treated as in (A). Cytosolic and nuclear cellular fractions were prepared and the presence of ARF1 examined. Quantifications are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. **P<0.01 are values compared to the control untreated cells. (C) Cells were left in normal serum conditions or arrested in different phases of the cell cycle. Chromatin was isolated and endogenously expressed ARF1 as well as Histone-3 were detected, in each condition, by Western blotting. Quantifications are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. **P<0.01 are values compared to the cnt untreated cells. (D) Cells were treated or not with serum for 16 h, fixed, stained for ARF1 and counter stained with Hoescht. Scale bar represents 10 μ m. These images are representative of 20 cells observed in 3 independent experiments.

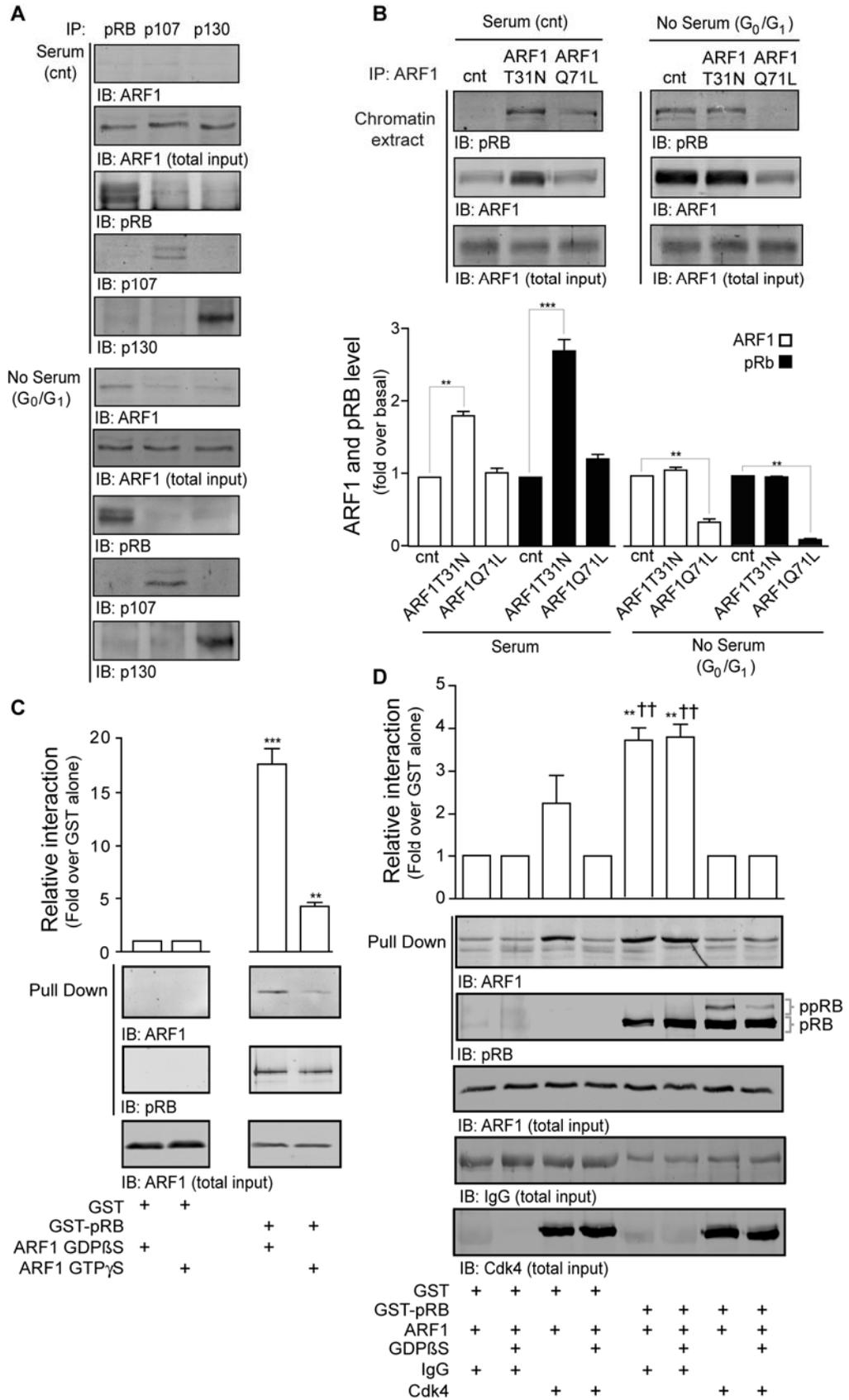


Figure 29: ARF1 directly interacts with pRB.

(A) MDA-MB-231 cells were left in normal serum conditions or arrested in the G₀/G₁ phase. Endogenously expressed pRB, p107 or p130 were immunoprecipitated and interacting ARF1 was detected by Western blotting. This experiment is representative of 2 others. (B) Cells were transfected with empty vector (cnt), ARF1T³¹N or ARF1Q⁷¹L and treated or not with serum for 16 h. ARF1 (endogenous or expressed clones) was immunoprecipitated from the chromatin extract and interacting pRB was detected by Western blotting. Quantifications are the mean ± SEM of 3 independent experiments. **P<0.01, ***P<0.001 are values compared to the paired empty vector transfection condition. (C) GST-pRB was incubated with ARF1 (loaded with GDPβS or GTPγS) and the interaction was detected by Western blotting. Quantifications are the mean ± SEM of 4 independent experiments. **P<0.01 and ***P<0.001 are values compared with the paired control GST. (D) GST-pRB was incubated with immunoprecipitated Cdk4 or IgG and then mixed with ARF1 (loaded or not with GDPβS). The interaction was detected by Western blot analysis. Quantifications are the mean ± SEM of 3 independent experiments. **P<0.001 are values compared with the GST, ARF1 and IgG condition. ††P<0.01 are values compared with the GST-pRB, ARF1 and IgG condition.

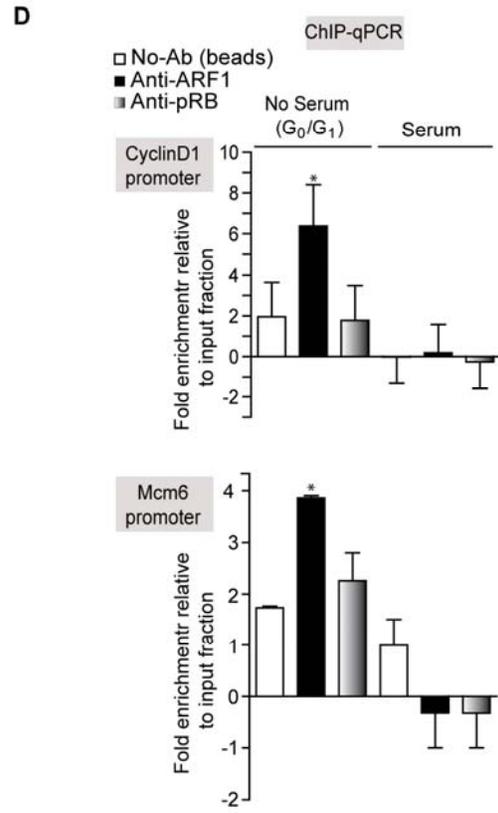
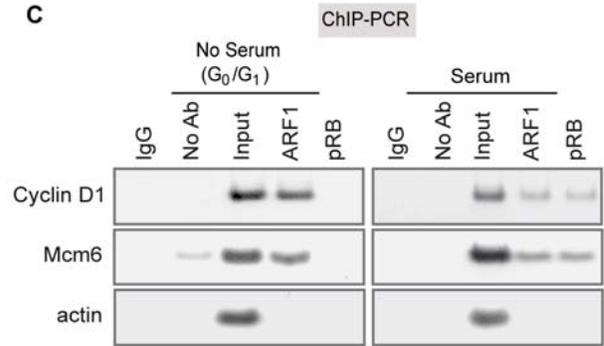
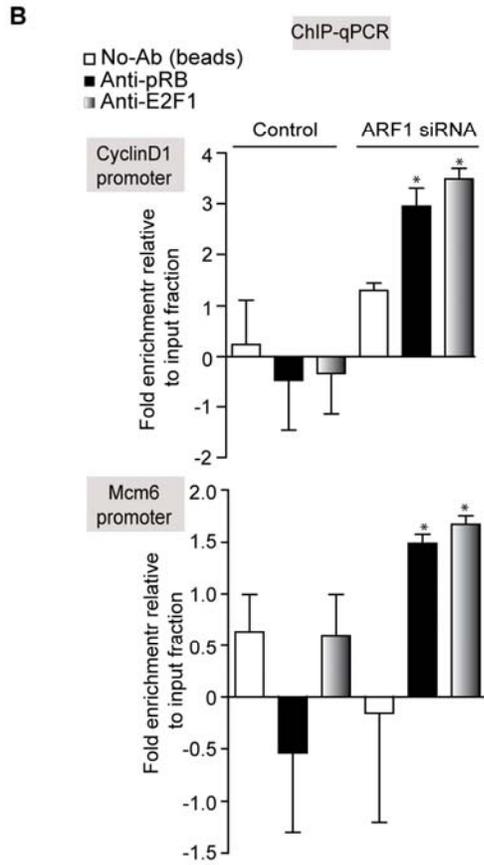
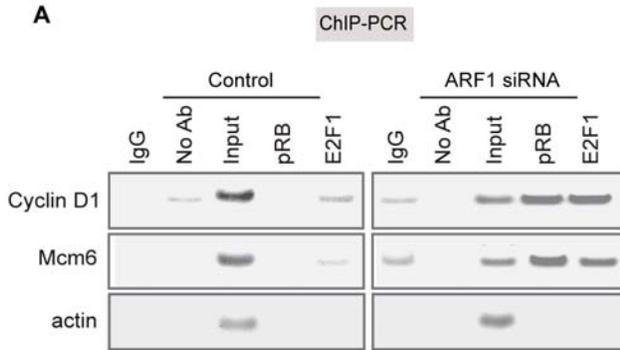


Figure 30: ARF1 regulates the recruitment of E2F and pRB to E2F-responsive promoters.

(**A, B**) MDA-MB-231 cells were transfected or not with ARF1 siRNA for 7 days and then subjected to ChIP analysis. Interactions of endogenous pRB or E2F1 with Cyclin D1 and Mcm6 promoters or β -actin coding region were detected using PCR (**A**). These results are representative of 3 independent experiments. Quantifications were performed by qPCR and are expressed as fold enrichment relative to input fraction (**B**). Quantifications are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. (**C, D**) MDA-MB-231 cells were serum starved or not for 16 h. Interactions of endogenously expressed ARF1 or pRB with Cyclin D1 and Mcm6 promoters or β -actin coding region were assessed by ChIP assays and detected using PCR (**C**). These results are representative of 3 independent experiments. Quantifications were performed by qPCR as in B and data are expressed as fold enrichment relative to input fraction and are the mean \pm SEM of 3 independent experiments (**D**). * $P < 0.05$ are values compared with the input.

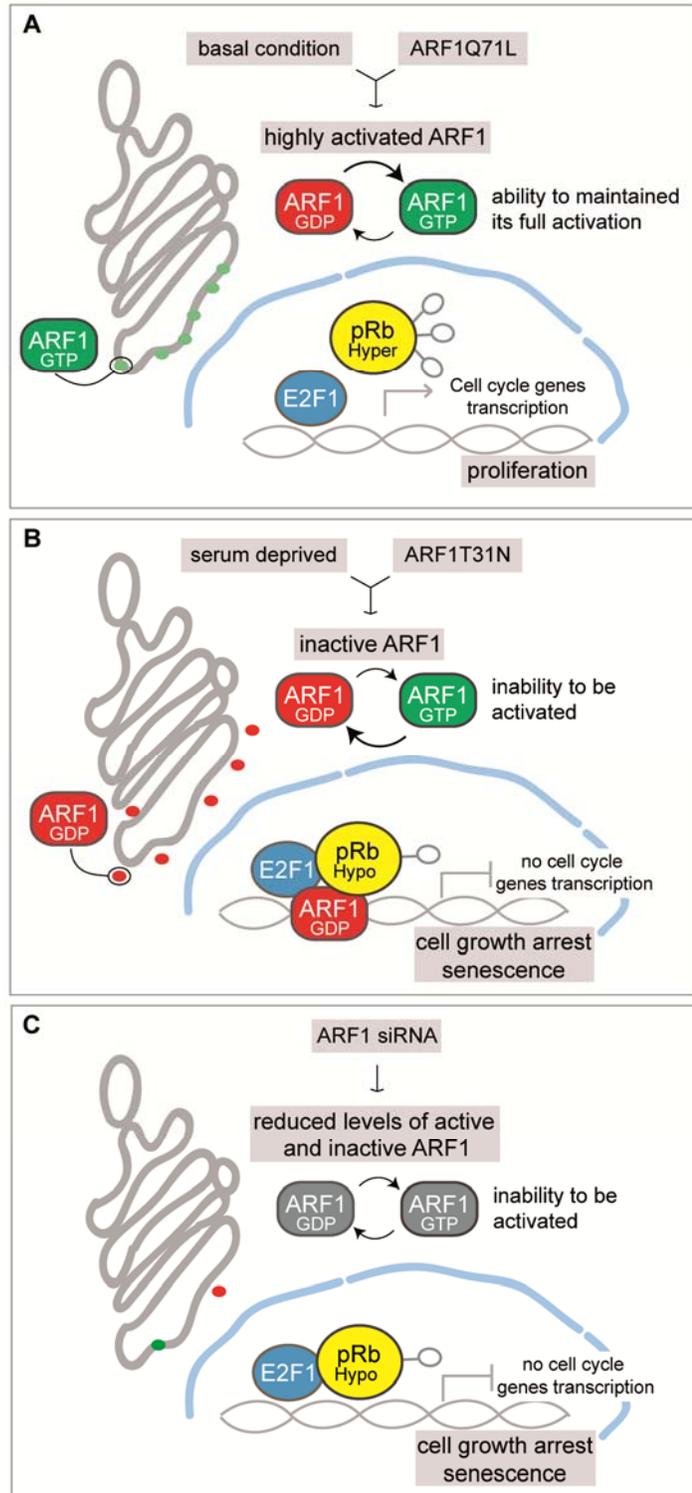


Figure 31: Model illustrating the role of ARF1 in cell proliferation.

(A) In basal condition (media containing serum) or when cells overexpressed ARF1Q⁷¹L, ARF1 is highly activated. In these conditions, pRB is hyperphosphorylated, can dissociate from E2F1, which can act to promote cell cycle genes expression. (B) When cells are deprived of serum or transfected with ARF1T³¹N, ARF1 is mainly in its inactive form. The GTPase is found in the nucleus, pRB is mainly hypophosphorylated and in complex with E2F1. Transcription of cell cycle genes is impaired and proliferation limited. (C) Similarly, depletion of ARF1 impairs the hyperphosphorylation state of pRB and its association to E2F1, prevents cell cycle gene expression and inhibits cell growth. The sustained inhibition of proliferation in cells expressing ARF1T³¹N or depleted of ARF1 is due to initiation of replicative senescence.

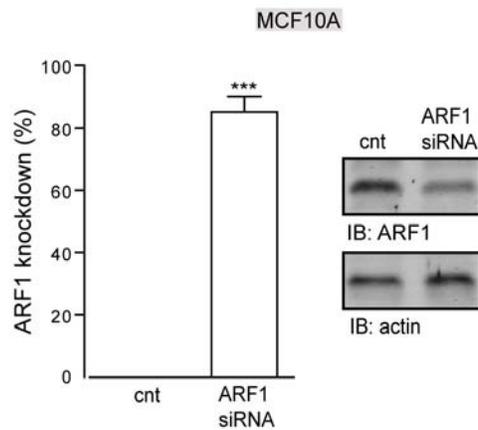


Figure 32: Knockdown of ARF1 expression in MCF10A.

MCF10A cells were transfected with a scrambled (cnt) or ARF1 siRNA. ARF1 expression was performed 3 days post-transfection using a specific anti-ARF1 antibody. These results are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. *** $P < 0.001$ are values compared with the control siRNA transfection condition.

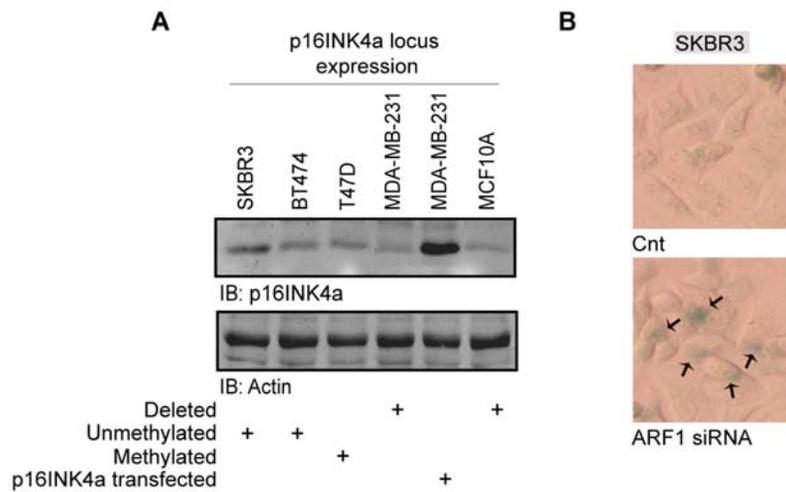


Figure 33: p16^{INK4a} locus expression in breast cancer cells and ARF1-dependent senescence of SKBR3 cells.

(A) SKBR3, BT474, T47D, MDA-MB-231 and MCF10A cells were harvested and endogenous level of p16^{INK4a} and actin were detected using Western blot. One set of MDA-MB-231 cells were transfected with p16^{INK4a} and then subjected to Western blot analysis. These results are representative of 3 independent experiments. (B) SKBR3 cells were transfected or not with ARF1 siRNA and assessed for β -gal activity. Images represent pictures from 5 different fields taken after 7 days post-transfection. β -gal positive blue cells are marked by a black arrow. These images are representative of 2 other experiments.

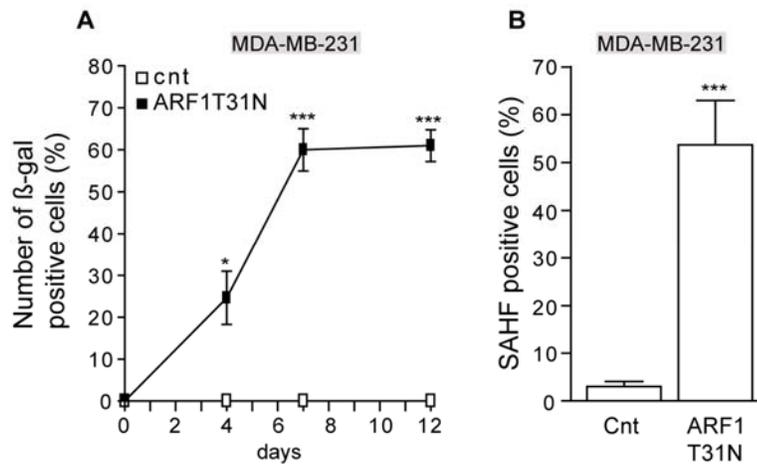


Figure 34: Expression of an ARF1 dominant negative mutant and senescence of MDA-MB-231 cells.

(A) MDA-MB-231 cells were transfected with an empty vector or ARF1^{T31N}, fixed and incubated with an X-gal staining solution to detect β -gal activity. Results are expressed as the percentage of β -gal positive cells and results are the mean \pm SEM of 4 experiments. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ are values compared to the paired empty vector transfection condition. (B) MDA-MB-231 cells were transfected with an empty vector or ARF1^{T31N} DNA plasmid, fixed and stained with X-gal and anti-H3meK9. SAHF cells were represented as the percentage of cells positive for H3meK9. These results are results are the mean \pm SEM of 6 independent experiments. *** $P < 0.001$ are values compared with the empty vector control condition.

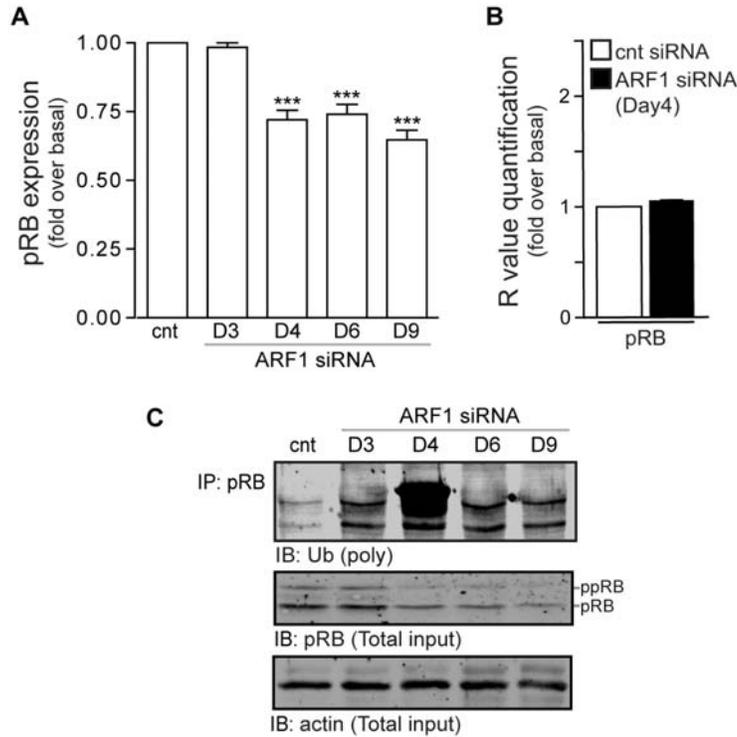


Figure 35: ARF1 depletion leads to a modulation of pRB expression.

(A) MDA-MB-231 cells were transfected with a scrambled (cnt) or ARF1 siRNA and expression of pRB was assessed by Western Blot analysis 3, 4, 6, and 9 days post-transfection. Results are the mean \pm SEM of 4 independent experiments. *** $P < 0.001$ are values compared with the control siRNA transfected condition. (B) Cells were transfected with a scrambled (cnt) or ARF1 siRNA and total mRNA were prepared 4 days after transfections. Real-time PCR were performed to determine the levels of pRB expression. Data are presented as relative mRNA levels, and are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. (C) Endogenous pRB was immunoprecipitated and poly-ubiquitination was performed by Western blotting. Endogenous expression of pRB, and actin were examined by Western Blotting using specific antibodies. This experiment is representative of 3 other independent experiments.

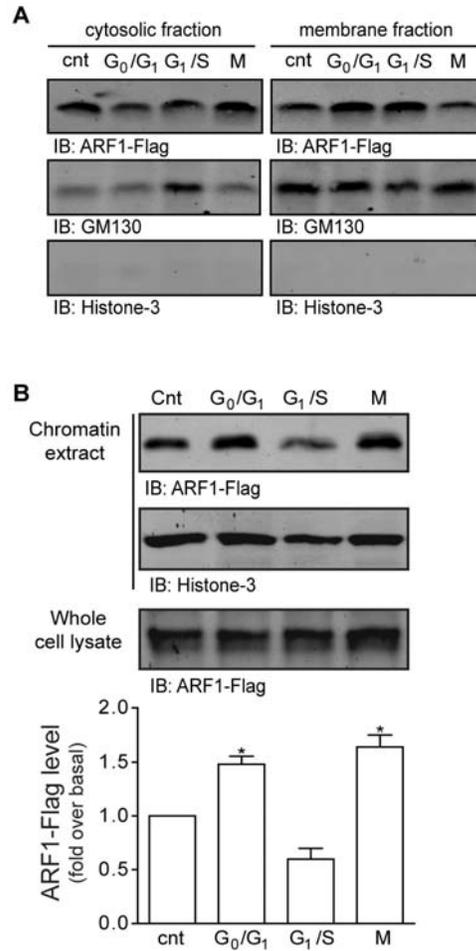


Figure 36: Redistribution of ARF1.

(A) MDA-MB-231 cells were transfected with ARF1-Flag and arrested in the different phases of the cell cycle. Cytosolic and membrane fractions were prepared and the presence of ARF1 as well as GM130 and Histone-3 examined. This experiment is representative of 3 others. (B) Cells expressing ARF1-Flag were left in normal serum conditions or arrested in different phases of the cell cycle. Chromatin was isolated and ARF1-Flag as well as Histone-3 were detected, in each condition, by Western blotting. Quantifications are the mean \pm SEM of 4 independent experiments. * $P < 0.05$ are values compared to the cnt untreated cells.

Figure 37: Localization of ARFT31N in MDA-MB-231 and COS7 cells.

(A) MDA-MB-231 and (B) COS7 cells were transfected with ARF1 or ARFT^{31N}, fixed, and stained for ARF1 and counter stained with Hoescht. Scale bar represents 10 μ m. These images are representative of 20 cells observed in 3 independent experiments. (C) Cells were transfected as indicated and were treated or not with serum. Chromatin was isolated and endogenously expressed ARF1, Histone-3 and pRB were detected, in each condition, by Western blotting. This experiment is representative of 2 others.

Chapitre IV:

Cytohesin-1 and Cytohesin-2 regulates EGF-mediated ARF1 activation in breast cancer cells

(article en préparation)

Pierre-Luc Boulay¹, Eric Haines¹, Sabrina Schlienger¹, Danaë Tassy¹, Sebastian Lewis-Saravalli¹, Einas Yosif³, Louis Gaboury³ and Audrey Claing^{1,2}

Contribution des auteurs:

PLB: Réalisation de la majorité des expériences, conceptualisation du projet et de l'écriture

EH : Réalisation des essais d'immunomarquage de la Vimentine par microscopie confocale et conceptualisation de l'écriture

SS: Caractérisation du LM11

DT : Caractérisation de l'expression endogène des Cytohésines dans les modèles cellulaires

SLS : Caractérisation du rôle de la Cytohésine-2 dans la migration cellulaire

EY : Caractérisation de l'expression d'ARF1 et des Cytohésines par immunohistochimie

LG : Collaboration aux analyses d'immunohistochimie

AC : Conceptualisation du projet et de l'écriture

From ¹Department of Pharmacology, and ²Biochemistry, Faculty of Medicine, ³Institute for Research in Immunology and Cancer, University of Montréal, P.O. Box 6128, Downtown station, Montréal, QC, Canada H3C 3J7

Correspondence should be addressed:

Audrey Claing,

P.O. Box 6128, Downtown station,

Montreal (QC)
Canada
H3C 3J7
Telephone: (514) 343-6352
Fax: (514) 343-2291

Running title: EGFR and Cytohesins regulates ARF1 in MDA-MB-231

Keywords: Epidermal Growth Factor Receptor/ ADP-ribosylation Factor-1/ Cytohesins/
breast cancer/ cell migration/ Epithelial Mesenchymal Transition

IV.1 Summary

Tyrosine kinases, such as the epidermal growth factor receptor (EGFR), are overexpressed in several human cancers. We have previously demonstrated that the

small GTP-binding protein ADP-Ribosylation Factor-1 (ARF1) is highly expressed in invasive breast cancer cells and its activation is modulated by EGFR activation. As the activation of ARF GTPases is dependent on GTP nucleotide binding and occurs via interactions with specific ARF Guanine nucleotide Exchange Factors (ARF-GEFs), we proposed to evaluate the role of the ARF-GEFs, Cytohesin-1 and Cytohesin-2 in mediating signals downstream of EGFR activation. We demonstrate that both Cytohesin-1 and Cytohesin-2 are highly expressed in invasive breast cancer cell lines such as MDA-MB-231. Moreover, using overexpression models and RNA interference we determined that both Cytohesins are necessary for the activation of ARF1 and cell migration. Furthermore, the Cytohesins were shown to control the Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) program of MDA-MB-231 cells. Interestingly, the overexpression of Cytohesin-1 but not Cytohesin-2 led to an increase in the basal activity of ARF1 and cell migration of the non-invasive MCF7 cell line. Again, the Cytohesin-1 but not Cytohesin-2 controls the EMT program of MCF7 cells by regulating endogenous levels of E-Cadherin and Vimentin. Moreover, our results highlight the importance of Cytohesin dimerization in mediating its transforming properties leading to ARF1 activation, cell migration and the induction of EMT. Overall, the knowledge of the cell signaling involved in the activation of ARF1 may lead to the discovery of novel pharmacological molecules involved in the treatment of breast cancer.

Keywords: Epidermal Growth Factor Receptor, ADP-ribosylation factor/ Cytohesins/ breast cancer/ cell migration/ Epithelial Mesenchymal Transition

IV.2 Introduction

Tumor cells exhibit two major phenotypes, non-invasive (epithelial) and invasive (mesenchymal). In response to environmental and genetic cues, tumor cells can transition from an epithelial phenotype to a mesenchymal. This process is known as epithelial-mesenchymal transition (EMT). The capacity of tumor cells to transition into an invasive

form is a critical step in the metastatic process and is directly correlated with the grade of the cancer. One of best characterized family of receptors involved in the EMT program of highly invasive breast cancer cells is the Epidermal Growth Factor Receptors (EGFR) [1]. This receptor tyrosine kinase family has been shown to activate several membrane and intracellular pathway such as PI3Kinase and MAPKinase. These pathways are well characterized for their roles in cell invasion, cell survival, cell migration and cell growth, all which constitute biological process necessary for metastasis formation. The EGFR family consists of 4 members, EGFR, ErbB2, ErbB3 and ErbB4. Moreover, a variety of ligands such as epidermal growth factor (EGF) have been shown to bind and activate this tyrosine kinase receptor family. Following ligand binding, the EGFR can homodimerize or heterodimerize with ErbB2 and/or ErbB3 to promote the autophosphorylation of several intracellular phosphotyrosine residues such as Y992, Y1045, Y1068/1086, Y1148 and Y1173. These phosphorylated tyrosines are docking sites for a variety of adaptor proteins. These adaptor proteins serve as initiators of downstream signaling cascades.

During the last decades, small monomeric and heterotrimeric G proteins were characterized for their roles in signal transduction. The Ras superfamily members are the most studied monomeric G proteins and that includes the ADP-ribosylation-factors (ARFs) subfamily. These small GTPases cycle between an inactive GDP-bound form and an active GTP-bound form through the action of guanine nucleotide exchange factors (GEFs) and GTPase-activating proteins [2]. There are exist six ARF isoforms separated into three distinct classes. First, class I, ARF1-3, which known to regulates the secretory pathway. Second, class II, ARF4 and ARF5 are still less characterized and therefore their role remains undetermined. Third class III, ARF6 modulates the intracellular trafficking between the plasma membrane and the endosomes and the organization of actin cytoskeleton network. We and other recently attributed new role for ARF1 and/or ARF6 in the progression of breast tumor cells associate with an increasing of expression and activation of these small GTPases in invasive breast cancer cell lines such as MDA-MB-231, MDA-MB-435 and SKBR3 [3, 4]. In addition, we have characterized the localization of ARF1 to the dynamic

plasma membrane ruffles compartments [3]. Finally, we have shown that ARF1 is activated upon EGF stimulation and insure the activation of PI3kinase signaling pathway [3].

The human genome encodes for 15 ARF-GEF genes. This class of genes is subdivided in 5 groups, Golgi BFA-resistance factor 1/BFA inhibited GEF (GBF1/BIG1/2), Cytohesins (1 to 4), exchange factor for ARF-6 (EFA6 [A-D]), Brefeldin resistant ARF GEF (BRAG [1-3]) and F-box only protein 8 (FBX8) (REF). Cytohesins are recently reported to be involved in cell membrane signaling and in the regulation of actin cytoskeleton. The Cytohesins are mainly distributed in the cell periphery to insure the recruitment of ARF-GTPases to cell surface. Cytohesin-1 is a member of one subfamily of ARF-GEFs, which also includes Cytohesin-2/ARNO, Cytohesin-3/GRP-1, and Cytohesin-4, sharing similar domain architecture [5]. The four isoforms of Cytohesin are present in all vertebrates. Human Cytohesins share 68% of homology of sequence. Cytohesins described three main functional domains such as a Coiled-Coil motif in N-terminal, a central catalytic Sec7 domain and a Pleckstrin Homology domain (PH). Cytohesin-1 and Cytohesin-2 are expressed in the 3G splicing variant, while Cytohesin-3 and Cytohesin-4 are present natively in the 2G form [6]. The 3G variants interacts with phosphatidylinositol-3,4,5 triphosphate PI(3,4,5)P3 as well as phosphatidylinositol-4,5 biphosphate PI(4,5)P2 whereas 2G variants demonstrated higher affinity for PI(3,4,5)P3 [6]. Initially Cytohesin-1 was found to regulate integrin activity [7] and to activate ARF6-mediated PLD activity [8]. Cytohesin-2 /ARNO is the best characterized of the Cytohesin family. It has the potential to regulate the activation of ARF1 and ARF6 and its presence at the plasma membrane modulates ARF recruitment and activation [9-11]. Cytohesin-2 is classically described to modulate the activation of cytoskeleton regulated-proteins such as ARF6 and Rac1. First studies reported that overexpression of Cytohesin-2 also called ARNO enhanced activation of ARF6 suggested that GTPase serve as a substrate and effectors for Cytohesins family [12]. In addition, Cytohesin-2 was found to associates and activates ARF6 independently of the β 2AR activation as well as regulates endocytosis of this later GPCR (G-Protein Coupled Receptor [13]. Recent evidences support that Cytohesin-2 controls the activation

of Rac1 by interacting with the Coiled-Coil motif of the Rac GEF DOCK180 [14]. Recent evidences showed that depletion of Cytohesin-2 led to block cell migration of 3T3-L1 adipocytes [15]. Additionally, Cytohesin-1 was found to associate Par3 via FRMD4 (FERM Domain containing 4A) interaction and regulate cell polarity of Eph4 epithelial cells [16]. Recently, the ARF-GEF BRAG2/GEP100 was demonstrated to interact with EGFR and ARF6 to regulate the activation of this ARF isoform [17]. Moreover, the reduction of the expression of GEP100 inhibited cellular migration and invasion of MDA-MB-231 cell line [17]. Moreover, we have demonstrated that ARF1 can localize to the dynamic plasma membrane ruffle compartments, that ARF1 is activated upon EGF stimulation and it is important regulatory of PI3kinase signaling.

The newly ARF inhibitor called LM11 was designed from the interaction of the Sec7 catalytic domain of Cytohesin-2 with GDP-bound ARF1 through a hydrophobic groove generated by the insertion of the Sec7 domain into the GDP dissociating pocket [18]. At molecular level, treatment by LM11 promotes the sequestration of Cytohesin-2-Sec7/ARF1-GDP resulting in the inhibition of ARF1 activity as well as the cellular function of Cytohesin-2. LM11 compound inhibits both Cytohesin-2/ARNO-mediated cell migration of MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cells and the activation of ARF1 but not ARF6 in vitro [18].

Here we identified two ARF GEFs essential for the activation of ARF1 in breast cancer cells. We demonstrated that the invasive MDA-MB-231 cells expressed high levels of both Cytohesin-1 and Cytohesin-2 and both Cytohesins are necessary for ARF1 activation and cell migration. In contrast, the lower Cytohesin-expressing, non invasive MCF7 cell line, the overexpression of Cytohesin-1 but not Cytohesin-2 led to an induction of EMT and enhancement basal cell migration. Both of these biological phenomena were shown to be regulated by an elevation in ARF1 activity. This structure alteration of the cytoskeleton was shown to be associated with a loss of E-Cadherin and an increase in Vimentin expression, two classical biomarkers of EMT. Overall, these findings highlight a critical role for

Cytohesin-1 and Cytohesin-2 in the regulation of EGF-induced ARF1 activation and cell migration in breast cancer cells.

IV.3 Materials and Methods

Reagents and Antibodies- Lipofectamine 2000™, Alexa-Fluor 488 and 568 phalloidin, secondary antibodies coupled to an Alexa-Fluor and Hoescht 33258 were purchased from Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada). EGF was purchased from Fitzgerald Industries International, Inc. (Concord, MA). Anti-ARF1 (raised against amino acids 174–180: SNQLRNQ of human ARF1 sequence) antibodies were obtained from Abcam (Cambridge, MA). Anti-Cytohesin-1, Cytohesin-2, anti-Cytohesin-3 and anti-ERK1/2 were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Anti-AKT, anti-phospho-AKT (S473), anti-phospho-ERK1/2, anti-EGFR, anti-E-Cadherin, anti-Vimentin and anti-Actin antibodies were from Cell Signalling Technology® (Danvers, MA). Anti-HA (12CA5) was purchased from was from Upstate (Lake Placid, NY). LM11 compound was synthesized by Dr. Pierre Lavallée (Combinatory chemistry laboratory, University of Montreal, Canada). All other products were from Sigma-Aldrich.

DNA Plasmids and siRNAs- Cytohesin-1 and Cytohesin-2 cloned into pEGFP vector was a gift from Dr. Lambright (University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, USA). pEGFP empty vector was a gift from Dr. Stéphane A Laporte (McGill University, Montreal, Canada). HA-tagged version of ARF1 was a gift from Dr. Nicolas Vitale, (University of Strasbourg, Strasbourg, France). Double-stranded scrambled, ARF1 siRNA, with 19-nt duplex RNA and 2-nt 3' dTdT overhangs were previously described [19, 20]. The 19-nucleotide sequences for the three human Cytohesin-1 siRNA targets was 5' AAC AGG AGC TGC TGG CTG A-3' (target 1), 5' CAG GAG CTG CTG GCT GAC A-3' (target 2) and 5' TAT GGA CCC TAA AAA GGG G-3' (target 3) corresponding to the mRNA Cytohesin-1 coding region 66-85, 82-101 and 228-247 respectively. The 19-nucleotide sequence for the human Cytohesin-2 siRNA was 5' GAT GGC AAT GGG CAG GAA G-3' [21]. All siRNA include 2-nucleotide 3' dTdT overhangs and were purchased from Dharmacon Inc (Lafayette, CO, USA).

Cell Culture and Transfection- MDA-MB-231 and MCF7 were maintained at 37 °C, 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (MDA-MB-231) or Alpha-DMEM (MCF7) supplemented with 10% fetal bovine. Cells were transfected with plasmid cDNA and/or siRNA using Lipofectamine™ 2000 according to the manufacturer's instructions. Culture conditions of MDA-MB-361, MDA-MB-468, BT-20, BT-474, SKBR3, HMEC, MCF10A, MCF10F and ZR75 cell lines are available upon request.

Western Blotting- Cells were harvested in 60 µl of TGH buffer (pH 7.3, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 50 mM NaCl, 50 mM HEPES, 5 mM EDTA) complemented with protease inhibitors and 1 mM sodium orthovanadate. Cell lysates were solubilized (4 °C, 1 h), and total soluble proteins were run on polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blotted for relevant proteins using specific primary antibodies (described for each experiment). Secondary antibodies were all fluorescein isothiocyanate-conjugated, and fluorescence was detected using a Typhoon 9410 scanner (Amersham Biosciences). Quantification of the digital images obtained was performed using ImageQuant 5.2 software.

Immunohistochemistry- Cells were fixed with formalin 10% and parafilm embedded according to usual methods. Immunohistochemistry (IHC) was performed according to manufacturer recommendations on an immunostainer (Discovery XT system, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Antigen retrieval was performed with proprietary reagents. Anti-ARF1 (1:500), anti-Cytohesin-1 (1:50) and anti-Cytohesin-2 (1:50) antibodies were applied on every cells. Sections were then incubated with a specific secondary biotinylated antibody. Streptavidin horseradish peroxidase, and 3,3-diaminobenzidine were used according to the manufacturer's instructions (Ventana Medical Systems) Finally, sections were counter stained with hematoxylin. All images were acquired using 40X objective on a NanoZoomer 2.0-HT (Hamamatsu Photonics, Japan/ Distribution Olympus).

Activation of ARF1- Cells were plated into 6-well dishes and serum-starved for 4 h. Cells were stimulated with EGF (10 ng/ml) at 37 °C for the indicated times, and activation of ARF1 and ARF6 was measured as modified [22]. Briefly, cells were lysed in 100 µl of ice-cold lysis buffer E (pH 7.4, 50 mM Tris HCl, 1% NP-40, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 5

mM MgCl₂, 20 mM NaF, 1 mM NaPPi, 1 mM Na₃VO₄, protease and phosphatase inhibitors) and for 2 min at 14 000g. GST-GGA3-(1–316) coupled to glutathione-Sepharose 4B was added to each tube, and the samples were rotated at 4 °C for 30 min. Proteins were eluted in 20 µl of SDS-sample buffer by heating to 65°C for 15 min. Detection of ARF1-GTP was performed by immunoblot analysis using an anti-ARF1 antibody. For some experiments, cells were pretreated with LM11 (10 or 100 µM) for 30 min.

Confocal microscopy- MDA-MB-231 cells were transfected with cnt-siRNA, Cytohesin-1-siRNA or Cytohesin-2-siRNA and fixed using paraformaldehyde (4%) for 15 min at room temperature. For detection of endogenous Vimentin, cells were stained with a polyclonal anti-Vimentin antibody and then to a rabbit antibody coupled to Alexa-Fluor 488. Cells were counter stained with Phalloidin coupled to Alexa-Fluor 568. For MDA-MB-231 cells pretreated with LM11, the Golgi was tracked with a polyclonal anti-Giantin and then to a rabbit coupled to Alexa-Fluor 568. Some MDA-MB-231 cells were counter stained with Phalloidin coupled to Alexa-Fluor 488 or 568. MCF7 cells were transfected with pEGFP, Cytohesin-1-GFP or Cytohesin-2-GFP, fixed. For detection of endogenous E-Cadherin, cells were stained with a polyclonal anti-E-Cadherin antibody and then to a rabbit antibody coupled to Alexa-Fluor 568. Staining of Vimentin was assessed as above. All MCF7 cells were counter stained with Hoescht 33258. All fixed cells were mounted onto slides using Geltol mounting medium. All images were acquired using a 63X oil immersion objective (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), at room temperature, on a Zeiss LSM-510 META laser scanning microscope (Carl Zeiss).

Migration Assay- Cells were transfected with siRNA (48 h) or plasmid DNA (48 h) and serum starved 4 h before the assay as in a previous study [3]. Briefly, cells were trypsinized and seeded into Boyden chambers (24-well inserts with 8-µm pore). One hour after plating, some set of cells were stimulated with EGF (10 ng/ml). After 6 h, cells were fixed using paraformaldehyde and incubated with crystal violet. Membranes were washed (dH₂O), cells present in the upper chamber were removed, and migrated cells were quantified in the

lower chamber. For some experiments, cells were pretreated with LM11 (0.1, 1, 10 or 100 μ M) for 30 min.

Co-immunoprecipitation- MDA-MB-231 cells were transfected with cnt-siRNA, Cytohesin-1-siRNA or Cytohesin-2-siRNA, serum-starved for 4 h and stimulated with EGF (10 ng/ml, 37 °C) for the indicated times. Co-immunoprecipitation experiments were described previously [3]. Briefly, cells were lysed into TGH (pH 7.3, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 50 nM NaCl, 50 mM HEPES, 5 mM EDTA) complemented with protease and phosphatase inhibitors and 1 nM sodium orthovanadate buffer (100 μ l) and endogenous EGFR was co-immunoprecipitated using the anti-EGFR. Interacting ARF1, Cytohesin-1 or Cytohesin-2 was assessed by Western blot analysis.

Statistical Analysis- Statistical analysis was performed using either a one-way or two-way analysis of variance followed by a Bonferroni multiple comparison tests using GraphPad Prism (version 4.0a, San Diego, CA).

IV.4 Results

Endogenous expression of Cytohesin-1 and Cytohesin-2 in breast cancer cells. As we were interested in determining the key ARF GEFs involved in mediating EGF-induced ARF1 activation cell migration we first assessed the endogenous expression profile of both Cytohesin-1 and Cytohesin-2 in a variety of classical invasive and non-invasive breast cancer cell lines, as well as normal mammary epithelial cells. We decided to examine the role of the Cytohesin family of ARF GEFs because they specific ARF GEF activity for class I ARFs (ARF1-3). However, they have been reported to act also on ARF6. Furthermore, Cytohesins have been shown to localize to the plasma membrane, the sight of EGF-induced ARF1 activation. Moreover, it has been recently reported that Cytohesins are important regulator of EGFR signaling [23]. While Cytohesin-3 like Cytohesin-1 and Cytohesin-2 is ubiquitously expressed within the body, it is most characterized for its role in T cells and liver cells [24]. Moreover, Cytohesin-4 is predominantly found in immune cells [25]. Therefore, we focused our research on evaluating the importance of Cytohesin-1 and Cytohesin-2 in breast tumor cell migration.

By examining the endogenous level of Cytohesin-1, Cytohesin-2 and ARF1 in a large set of human breast carcinoma cell lines, including normal cells, we demonstrated that some of these cells expressed or not high level of our three proteins of interest. As depicted in figure 38A, the highly invasive MDA-MB-231 and SKBR3 breast cancer cells as well as the non invasive normal mammary MCF10F cell line were Cytohesin-1, Cytohesin-2 and ARF1 positive. In contrast, the non invasive ER α -positive cell lines MCF7 and ZR75 as well as the normal mammary HMEC cells were Cytohesin-1, Cytohesin-2 and ARF1 negative. The highly invasive MDA-MB-361 and slightly invasive MDA-MB-468 and BT-20 in addition to the normal mammary MCF10A cells were not Cytohesin-1, Cytohesin-2 and ARF1 positive or negative. For the remainder of experiments, we utilized the MDA-MB-231 cell line as a prototypical invasive (blue star), Cytohesins and ARF1 positive breast cancer cell line and the MCF7 cell line (blue star), as a non-invasive, Cytohesins and ARF1 negative breast cancer cell line.

We next examined the expression and distribution of ARF1, Cytohesin-1 and Cytohesin-2 using immunohistochemistry method. As illustrated in figure 38B, ARF1 is highly expressed (dark brown staining) in MDA-MB-231 where its distribution is diffused throughout the cytoplasm, plasma membrane and poorly into the nucleus (see isolated cell). A number of cells exhibited vesicles relative to Golgi distribution. In contrast, ARF1 is faintly expressed in MCF7 cells (faded brown staining) where its distribution is restricted into or at periphery of the nuclei (see chosen cells). Additionally, Cytohesin-1 and Cytohesin-2 are highly expressed in MDA-MB-231 cells particularly throughout the cytoplasm (see selected cells). However, both Cytohesins are unsuccessfully expressed in MCF7 (see indicated cells). Together, these findings suggest that Cytohesin-1 and Cytohesin-2 are expressed in invasive breast cancer cells such as MDA-MB-231 and both Cytohesins may be considered a biomarker for breast cancer invasiveness.

Cytohesin-1 and Cytohesin-2 are necessary for the activation of ARF1 in MDA-MB-231 cells. Previously, we have demonstrated that EGFR activation induced ARF1 activation, localization of ARF1 to the plasma membrane and ARF1 dependent cell migration and cell proliferation. Next, we sought out to determine whether the expression of Cytohesin-1 and Cytohesin-2 were important for EGF-mediated ARF1 activation in MDA-MB-231 cells. To do this, we examined the EGF-induced ARF1 activation in MDA-MB-231 cells depleted of either Cytohesin-1 or Cytohesin-2 via RNA interference. As described in Figure 39A, control cells (scrambled siRNA) exhibited a maximal ARF1-GTP induction (4.05 fold increase over unstimulated) after 1 minute of EGF stimulation, whereas the depletion of Cytohesin-1 completely abolished ARF1 activation. Again, the depletion of Cytohesin-2 abrogated ARF1 activity compared to the 3.8 fold induction of ARF1 activity observed in EGF stimulated control cells (Figure 39B). Target protein knockdown was confirmed using specific antibodies. As depicted in Figure S45A, the transfection of Cytohesin-1 siRNA decreased the endogenous expression of Cytohesin-1 by 52%, 95% and 97% for target 1, target 2 and target 3, respectively. The target 2 Cytohesin-1 siRNA was used for the remainder of experiments in this manuscript. (See methods for human amino acid target sequences). As demonstrated in Figure S45B, the Cytohesin-2 siRNA reduced Cytohesin-2 protein levels by 82%. Next, we confirmed the specificity of the Cytohesin siRNAs by measuring the expression levels of Cytohesin-1, Cytohesin-2 and Cytohesin-3 in MDA-MB-231 cells transfected with either the Cytohesin-1 siRNA or the Cytohesin-2 siRNA (Figure S45A and S45B).

To further characterize the role of Cytohesin-2 in the regulation of EGF-induced ARF1 activation in MDA-MB-231 cells, we next treated cells with the ARF1 inhibitor LM11. LM11 has been shown to act by targeting both inactive ARF1 or ARF1-GDP and the ARF1-GDP/Cytohesin-2 complex resulting in the production of a nonfunctional ARF1-GDP/Cytohesin-2 complex [18]. ARF1 activity was determined by pre-treating MDA-MB-231 cells with either with a vehicle (DMSO) or LM11 (10 or 100 μ M) for 30 minutes before stimulation or not with EGF for the described times. As can be seen in Figure 39C,

in control cells (DMSO) a 3.3 fold increase in ARF1 activation was observed following a 1 minute stimulation with EGF, whereas in cells pretreated with LM11 (10 μ M) this EGF-induced ARF1 activation was partially inhibited. Interestingly, in cell pretreated with LM11 (100 μ M) the EGF-mediated ARF1 activation was completely abolished. The integrity of the Golgi of the LM11 (100 μ M) treated MDA-MB-231 cells was microscopically confirmed by staining with the Golgi marker, Giantin (Figure S46).

Together, these results demonstrate the importance of both Cytohesin-1 and Cytohesin-2 in the EGF mediated ARF1 activation. Moreover, results using the ARF1 inhibitor (LM11) demonstrate the requirement of an active ARF1/Cytohesin-2 complex in the activation of ARF1 downstream of the EGFR.

Cytohesin-1 and Cytohesin-2 control cell migration of MDA-MB-231. Next, we examined the requirement of Cytohesin-1 and Cytohesin-2 in the regulation of EGF-mediated MDA-MB-231 cell migration. As illustrated in Figure 40A, EGF stimulation induced a 1.78 fold increase in the migration of control cells in comparison to non-stimulated control cells (scrambled siRNA). Interestingly, transfection of Cytohesin-1 siRNA blocked both EGF-independent (0.3 fold) and EGF-mediated (0.34 fold) cell migration. Meanwhile, the knockdown of Cytohesin-2 via siRNA only inhibited EGF-dependent cell migration (0.68 fold) and not EGF-independent cellular migration. Together, our results suggest that both Cytohesin-1 and Cytohesin-2 play an essential role in regulating EGF-induced cell migration.

To further confirm the necessity of Cytohesin-2 mediated ARF1 activation in EGF dependent cell migration of MDA-MB-231 cells, we next examined the effects of pre-treating cells with the ARF1 inhibitor, LM11, on EGF-induced cell migration. As represented in figure 40B, pretreatment with LM11 (10 μ M) abolished both EGF-independent and dependent MDA-MB-231 cell migration. Next, using the LM11 inhibitor, we determined the requirement of Cytohesin-2 in the mediation of Cytohesin-1-dependent

cell migration. As depicted in figure 40B, Cytohesin-1 overexpression significantly increased EGF-induced cell migration. Interestingly, the ability of Cytohesin-1 to potentiate EGF-induced cell migration was attenuated by LM11 (10 μ M) pretreatment. In parallel, dose response curve experiments were used to predetermine the minimal LM11 concentration required to inhibit basal cell migration (Fig.S47A) without inducing cell death (Fig.S47B). Moreover, microscopy was used to demonstrate that Golgi organization was unaffected by LM11. As illustrated in supplemental figure 47C, following 8 hours of LM11 (10 μ M) exposure, the structure components of the Golgi were unaffected. However, defects in the Golgi were observed following 18 hours of exposure.

The ARF1/EGFR interaction is mediated by Cytohesin-1 and Cytohesin expression. We had previously reported ARF1 requirement to the EGFR upon receptor activation. Therefore, we next sought out to determine whether the receptor recruitment of ARF1 is dependent on Cytohesin expression. To address to this point, MDA-MB-231 cells were depleted of Cytohesin-1 or Cytohesin-2 via siRNA. As shown in Figure 41A, a 2.2 fold increase in EGFR/ARF1 complex formation was observed in control cells (scrambled siRNA) following 1 minute of EGF stimulation. Surprisingly, the depletion of Cytohesin-1 markedly impaired EGF-mediated ARF1/EGFR complex formation. Furthermore a reduction in ARF1/EGFR complex formation was detected in Cytohesin-2 depleted cells. As observed in Figure 41B, a 2.69 fold increase in ARF1/EGFR interaction was detected in control cells (scrambled siRNA) treated with EGF for 1 minute whereas, no ARF1/EGFR interaction was observed cells depleted in Cytohesin-2. Moreover, the ability of Cytohesin-1 to interaction with the EGFR was reduced upon the depletion of Cytohesin-2. In parallel, Western blot analysis was used to confirm the efficacy and isoform selectivity of the Cytohesin-1 and Cytohesin-2 siRNAs.

To further emphasize the importance of ARF1 activation and Cytohesin-2 in mediating the EGFR/ARF1 interaction, we next pretreated MDA-MB-231 cells with the ARF1 inhibitor, LM11. As shown in Figure 41C, EGF induced both EGFR/ARF1 (2.8 fold)

and EGFR/Cytohesin-1 (3.2 fold) interactions following 1 minute of EGF stimulation compared to control unstimulated cells. Interestingly, EGFR/ARF1 and EGFR/Cytohesin-1 interactions were significantly reduced by LM11 pretreatment. Together, these findings suggest that the interaction between ARF1 and EGFR is regulated by Cytohesin-1 and Cytohesin-2. Moreover, Cytohesin-2 is required for the recruitment of Cytohesin-1 to the EGFR.

Next we examined the influence of LM11 on the functionality of ARF1. As shown in Figure 41D, LM11 pretreatment significantly reduced EGF-induced AKT phosphorylation while not affecting the phosphorylation of ERK1/2.

Cytohesin-1 and Cytohesin-2 mediate epithelial-mesenchymal transition of MDA-MB-231. Next, we examined the expression of Vimentin, a marker characteristic of mesenchymal cells and a common biomarker used in examining epithelial-mesenchymal transition (EMT) in MDA-MB-231 cells depleted of ARF1, Cytohesin-1 or Cytohesin-2. Since, the E-Cadherin gene locus is deleted in MDA-MB-231 cells [346] we used a reduction in the expression of Vimentin as a biomarker of cellular transition from a mesenchymal-like to an epithelial-like cell. To do this, we first used Western blot analysis to determine the expression of Vimentin in cells depleted of ARF1, Cytohesin-1 and Cytohesin-1 by siRNA. As shown in Figure 42A and 42B, control cells (scrambled siRNA) expressed Vimentin, whereas the depletion of ARF1 (Figure 42A) and Cytohesins (Figure 42B) markedly decreased Vimentin expression. Next, we confirmed this reduction in Vimentin in Cytohesin-depleted MDA-MB-231 cells by confocal microscopy. As depicted in Figure 42C, Vimentin staining was evident in the perinuclear area of both Cytohesin-depleted and control (scrambled siRNA) MDA-MB-231 cells. Interestingly, the depletion of either Cytohesin-1 or Cytohesin-2 drastically decreased Vimentin expression levels compared to control cells. All together, the depletion of ARF1, as well as both Cytohesins, significantly reduced the expression of the invasive phenotypical marker Vimentin in MDA-MB-231 cells.

Overexpression of Cytohesin-1 but not Cytohesin-2 enhanced ARF1 activation and cell migration in MCF7 cells. To further characterize the role of Cytohesin-1 and Cytohesin-2 in the regulation of cell migration, we next overexpressed the Cytohesins in the non-invasive MCF7 breast cancer cell line. First we determined whether the overexpression of Cytohesin-1 and Cytohesin-2 can induce the activation of ARF1 in MCF7 cells. As shown in Figure 43A, compared to control cells (pEGFP vector), an observed 2.2 fold increase in ARF1 activation was observed in cells overexpressing Cytohesin-1. However, unlike Cytohesin-1, the overexpression of Cytohesin-2 was unable to induced ARF1 activation.

Before examining the influences the Cytohesin have on cell migration, we first determined whether the overexpression of ARF1 in MCF7 cells influenced cell migration. As demonstrated in Figure 43B, stimulation of untransfected control cells with EGF significantly induced the migration of MCF7 cells (4.0 fold). More interestingly, the overexpression of ARF1 drastically enhanced cell migration in both untreated (11.5 fold) and EGF treated cells (18.6 fold). Now knowing that ARF1 plays an important regulatory role in the migration of MCF7 cells, we next examined the influence of the ARF GEFs Cytohesin-1 and Cytohesin-2 in MCF7 cell migration. As described in Figure 43C, control MCF7 cells (pEGFP) have a poor migratory potential. However, treatment with EGF promoted their cell migration (2.25 fold). Interestingly, the overexpression of Cytohesin-1, but not Cytohesin-2 enhanced both EGF-independent and dependent cell migration by 10.8 fold and 14.3 fold, respectively. Together these results suggest that the overexpression of only Cytohesin-1 and not Cytohesin-1 can induce ARF1 activation leading to cell migration.

Cytohesin-1 but not Cytohesin-2 can induce the epithelial-mesenchymal transition of MCF7 cells. As described above, the overexpression of Cytohesin-1 in the non-invasive MCF7 cell line promoted cell migration. Thus, we next determined whether the overexpression of Cytohesin-1 and Cytohesin-2 induced the EMT of MCF7. Since, unlike

MDA-MB-231 cells, MCF7 cells express the epithelial tight junction marker E-Cadherin, we first examined the effect of overexpressing ARF1, Cytohesin-1 and Cytohesin-2 on the expression of E-Cadherin and Vimentin by Western blot analysis. As shown in Figure 44A, overexpression of ARF1 reduced the expression of E-Cadherin and enhanced the Vimentin expression by a 2.5 fold increase compared to control cells (pcDNA3 vector). Similarly, the overexpression of Cytohesin-1 but not Cytohesin-2 decreased the E-Cadherin level and increased the Vimentin (2.0 fold) (Figure 44B).

Next, we confirmed our Western analysis results by confocal microscopy. As shown in Figure 44C, in control cells (pEGFP vector) we detected a positive staining for E-Cadherin in the cell junctions of MCF7 cells. In contrast, cells transfected with Cytohesin-1 we observed a drastic decrease in E-Cadherin staining. Once again, the overexpression of Cytohesin-2 had no effect on E-Cadherin expression compared to control cells (pEGFP vector). In parallel, we determined the influence of Cytohesin-1 and Cytohesin-2 on Vimentin expression in MCF7 cells. As shown in Figure 44D, the overexpression of Cytohesin-1 but not Cytohesin-1 increased the expression of Vimentin compared to control cells (pEGFP). Together, these results suggest that the overexpression of Cytohesin-1, but not Cytohesin-2 can promote the initiation of EMT in MCF7 cells.

IV.5 Discussion

We have previously shown that EGF-mediated ARF1 activation lead to the migration of the breast cancer MDA-MB-231 cell line [3]. Here, we further characterize ARF1 as an important mediator of EGF-induced cell migration MDA-MB-231 cells. Our results demonstrate that the ARF GEFs Cytohesin-1 and Cytohesin-2 are required for EGF-dependent ARF1 activation as well as cell migration. We also demonstrate that both Cytohesins in MDA-MB-231 cells and only Cytohesin-1 in MCF7 cells are important regulators of the EMT program.

Recent studies have implemented the ARF GEF BRAG2/GEP100 in the control the breast cancer cell invasiveness [17]. It was shown that BRAG2/GEP100 was important in the EGF-dependent activation of ARF6 leading to cell invasion of MDA-MB-231 cells. Here, we demonstrate that EGF-induced MDA-MB-231 cell migration is dependent in Cytohesin-1 and Cytohesin-2 mediated ARF1 activation. These results suggest that ARF1 and ARF6 have distinct signaling cascade leading to breast cancer cell migration. However, the Cytohesins have been reported to activate both ARF1 and ARF6 thus suggesting convergent signaling of ARFs in cell migration. More along this line, it has been recently shown that Cytohesin-2 reported to regulate both the PI3K/AKT and MAPK pathways downstream of EGFR activation [23]. Since ARF1 has been reported to activate the PI3K pathway ARF6 the MAPK pathway upon EGF stimulation, Cytohesin-2 may act as an upstream linker of ARF1 and ARF6 signaling. Within the same study, it was demonstrated that Cytohesin-2 directly controlled the dimerization of the EGFR. In fact, the overexpression of Cytohesin-2 was shown to enhance EGFR and Shc phosphorylation, as well as enhance the activation of both the PI3K/AKT and MAPK pathways. Our findings add further evidence for the important role of Cytohesins in regulating EGF signaling in breast cancer cells. We propose that Cytohesins play an essential role in not only increase EGFR activation, but also enhancing ARF1 activation, an important regulator of EGF-induced breast cancer cell migration.

We have previously demonstrated that ARF1 mediated EGF-induced cell migration of breast cancer cell [3]. The results presented in this manuscript highlight for the first time a role for Cytohesins in ARF1 mediated cell migration. While recent studies have reported that the depletion of the ARF GEF Cytohesin-2 diminished the ability of 3T3-L1 cells to migrate [15], this migration was shown to be dependent on ARF6. Moreover, Cytohesin-2 has also been shown to induce ARF6 dependent cell migration by regulating Rac1 activation [12]. Furthermore the expression of another ARF GEF, BRAG2/GEP100, was shown to be highly expressed in invasive ductal carcinomas and to be associated with a poor prognosis [17]. In addition, Cytohesin-2 is highly expressed, linked to EGFR phosphorylation and associated to an increased of EGFR signalling in human lung

adenocarcinomas [23]. Here we show that Cytohesin-1, Cytohesin-2 and ARF1 positive cells are relative to highly invasive breast cancer MDA-MB-231 and SKBR3 cells whereas negative cells are associated to normal breast HMEC cells or non-invasive breast cancer MCF7 and ZR-75-1. Curiously, we detected high level of Cytohesins and ARF1 in normal mammary MCF10F cells. The fact is that MCF10F as well as MDA-MB-231 compared to MCF10A are found to highly express Ki-67, which associates to poor prognostic in breast cancer [8, 27]. In addition, MCF10F cells are positive for the cell surface progenitor markers EpCAM+/CD24-/CD49f+ which are linked to breast cancer differentiated basal subtype [28]. Our results propose that high expression of Cytohesins and ARF1 could be involved in cell differentiation.

Here we demonstrate that the deletion of either Cytohesin-1 or Cytohesin-2 significantly diminished EGF-induced cell migration. Interestingly, our data expect that the depletion of Cytohesin-1 but not Cytohesin-2 prevent basal cell migration. However, we demonstrate that the Cytohesin-1 siRNA expected higher knockdown effect than the Cytohesin-2 siRNA. These data propose that is essential to reach at least 95% of endogenous knockdown of Cytohesins to limit basal cell migration. Moreover, we show a correlation between breast cancer cell invasiveness and Cytohesin expression. Together these results suggest that both ARFs and ARF GEFs are important mediators of breast cancer cell migration.

One of crucial biological event responsible of the capacity of cancer cells to form metastasis is the EMT program. This transition step is mainly control by transcription factors such as Snail, Slug and Twist. EMT is characterized by a loss in epithelial markers such as Cytokeratins and E-Cadherin and an up-regulation of mesenchymal markers such as Vimentin and N-Cadherin. E-Cadherin plays an important role in regulating cell polarity and contributes to the formation of adherens junctions [29]. The loss in E-Cadherin during EMT is associated with a deregulation of cell polarity and the destruction of adherens junctions which in turns leads to an increase invasiveness of breast cancer cells [29]. Here we define that both Cytohesin-1 and Cytohesin-2 exert a control on the EMT program of breast cancer cells. We show that the deletion of Cytohesin-1 and Cytohesin-2 in MDA-

MDA-MB-231 cells reduced the expression of the mesenchymal marker Vimentin. These results may suggest that MDA-MB-231 cells possess mutant forms of Cytohesins that may increase ARF1 responsiveness to EGF stimulation. Furthermore, we show that the overexpression of Cytohesin-1, but not Cytohesin-2 in MCF7 cells was associated with a decrease in E-Cadherin and an increase in Vimentin. While MCF7 cells have a low potential to migrate, we propose that the overexpression of the ARF GEF, Cytohesin-1, creates a state of increased ARF1 activation which disrupts adherens junctions and favors cell migration. Palacios et al. demonstrated that ARF6 mediated adherent junction formation of MDCK epithelial cells by regulating E-Cadherin endocytosis [30]. Here we depict that overexpression of ARF1 in MCF7 cells reduced the expression of E-Cadherin and enhanced Vimentin level.

Even more interestingly, our results show that inhibition of endogenous function of Cytohesin-2 by LM11 blocked ARF1 signalling mechanism mediated cell migration. Furthermore, the sequestration of Cytohesin-2 by LM11 inhibitor limited the association of Cytohesin-1 with EGFR. Our data propose that emerging a new adaptor function of Cytohesin-2 and or the recruitment of essential scaffold protein such as IPCEF and GRASP which were found to mediate protein-protein interactions of Cytohesins through their N-terminal Coiled-Coil domain [31, 32]. Our results demonstrate that adequately concentration LM11 targeted Cytohesin-2 function without affecting the integrity of the Golgi apparatus. Regarding LM11 as a therapeutic tool, used at non toxic and optimal concentration, this drug-like compound could be relevant for a triple negative breast cancer therapy.

Overall, our and other results highlight that EGFR independently mediates activation of ARF1 and ARF6 by recruiting specific ARF GEFs. Recent in vivo studies demonstrated that BRAG2/GEP100 and Cytohesin-2 regulate activation of ARF6 and ARF6-mediated cell invasion and migration [12, 17]. Together, these evidences suggest that ARF6 should be targeted by Cytohesins and therefore involved in ARF1-dependent biological process.

In summary, we show that both Cytohesin-1 and Cytohesin-2 are required for EGF-induced ARF1 activation and cell migration. Moreover, we demonstrate the deletion of Cytohesin-1

and Cytohesin-2 in MDA-MB-231 cells transitioned cells from a mesenchymal-like to an epithelial-like phenotype. Furthermore, we demonstrate that Cytohesin-1 and not Cytohesin-2 overexpression in MCF7 was associated with the initiation of the EMT program. In addition, we depict that the LM11 serves as a useful molecular tool to examine ARF1-regulated signalling pathways and biological responses in breast cancer cells. Overall, our results propose that these strategies to prevent the activation of ARF1 as well as Cytohesin-2 or Cytohesin-1 functions could effectively reduced cell migration and EMT process in breast cancer.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Stéphane A Laporte (McGill University, Montreal, Canada) for the use of his confocal microscope. We would like to thank Dr. Lambright for the Cytohesins cDNAs (University of Massachusetts, MA, USA). We thank Dr. Pierre Lavallée for LM11 synthesis (University of Montreal, Canada). We thank Dr. Sylvie Mader for breast cancer cell lines (IRIC, Canada). This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). PLB is the recipient of a Frederick Banting and Charles Best PhD Research Award from the CIHR. AC is the recipient of a New Investigator Award from the CIHR.

IV.6 References

1. Thiery, J.P., [Role of growth factor signaling in epithelial cell plasticity during development and in carcinogenesis]. *Bull Acad Natl Med*, 2001. 185(7): p. 1279-92; discussion 1293-4.
2. Gillingham, A.K. and S. Munro, The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007. 23: p. 579-611.

3. Boulay, P.L., et al., ADP-ribosylation factor 1 controls the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway to regulate epidermal growth factor-dependent growth and migration of breast cancer cells. *J Biol Chem*, 2008. 283(52): p. 36425-34.
4. Hashimoto, S., et al., Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(17): p. 6647-52.
5. Jackson, C.L. and J.E. Casanova, Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol*, 2000. 10(2): p. 60-7.
6. Klarlund, J.K., et al., Distinct polyphosphoinositide binding selectivities for pleckstrin homology domains of GRP1-like proteins based on diglycine versus triglycine motifs. *J Biol Chem*, 2000. 275(42): p. 32816-21.
7. Geiger, C., et al., Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1. *EMBO J*, 2000. 19(11): p. 2525-36.
8. El Azreq, M.A., et al., Cytohesin-1 regulates the Arf6-phospholipase D signaling axis in human neutrophils: impact on superoxide anion production and secretion. *J Immunol*, 2010. 184(2): p. 637-49.
9. Chardin, P., et al., A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature*, 1996. 384(6608): p. 481-4.
10. Langille, S.E., et al., ADP-ribosylation factor 6 as a target of guanine nucleotide exchange factor GRP1. *J Biol Chem*, 1999. 274(38): p. 27099-104.
11. Macia, E., M. Chabre, and M. Franco, Specificities for the small G proteins ARF1 and ARF6 of the guanine nucleotide exchange factors ARNO and EFA6. *J Biol Chem*, 2001. 276(27): p. 24925-30.
12. Santy, L.C. and J.E. Casanova, Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D. *J Cell Biol*, 2001. 154(3): p. 599-610.
13. Claing, A., et al., beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *J Biol Chem*, 2001. 276(45): p. 42509-13.

14. White, D.T., et al., GRASP and IPCEF promote ARF-to-Rac signaling and cell migration by coordinating the association of ARNO/cytohesin 2 with Dock180. *Mol Biol Cell*, 2010. 21(4): p. 562-71.
15. Torii, T., et al., Cytohesin-2/ARNO, through its interaction with focal adhesion adaptor protein paxillin, regulates preadipocyte migration via the downstream activation of Arf6. *J Biol Chem*, 2010. 285(31): p. 24270-81.
16. Ikenouchi, J. and M. Umeda, FRMD4A regulates epithelial polarity by connecting Arf6 activation with the PAR complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(2): p. 748-53.
17. Morishige, M., et al., GEP100 links epidermal growth factor receptor signalling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion. *Nat Cell Biol*, 2008. 10(1): p. 85-92.
18. Viaud, J., et al., Structure-based discovery of an inhibitor of Arf activation by Sec7 domains through targeting of protein-protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(25): p. 10370-5.
19. Houndolo, T., P.L. Boulay, and A. Claing, G protein-coupled receptor endocytosis in ARF6-depleted cells. *J Biol Chem*, 2005. 280(7): p. 5598-604.
20. Cotton, M., et al., Endogenous ARF6 Interacts with Rac1 upon Angiotensin II Stimulation to Regulate Membrane Ruffling and Cell Migration. *Mol Biol Cell*, 2007. 18(2): p. 501-511.
21. Li, C.C., et al., ARL4D recruits cytohesin-2/ARNO to modulate actin remodeling. *Mol Biol Cell*, 2007. 18(11): p. 4420-37.
22. Cotton, M., et al., Endogenous ARF6 interacts with Rac1 upon angiotensin II stimulation to regulate membrane ruffling and cell migration. *Mol Biol Cell*, 2007. 18(2): p. 501-11.
23. Bill, A., et al., Cytohesins are cytoplasmic ErbB receptor activators. *Cell*, 2010. 143(2): p. 201-11.
24. Kolanus, W., Guanine nucleotide exchange factors of the cytohesin family and their roles in signal transduction. *Immunol Rev*, 2007. 218: p. 102-13.

25. Ogasawara, M., et al., Similarities in function and gene structure of cytohesin-4 and cytohesin-1, guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors. *J Biol Chem*, 2000. 275(5): p. 3221-30.
26. Pierceall, W.E., et al., Frequent alterations in E-cadherin and alpha- and beta-catenin expression in human breast cancer cell lines. *Oncogene*, 1995. 11(7): p. 1319-26.
27. Subik, K., et al., The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer (Auckl)*, 2010. 4: p. 35-41.
28. Keller, P.J., et al., Mapping the cellular and molecular heterogeneity of normal and malignant breast tissues and cultured cell lines. *Breast Cancer Res*, 2010. 12(5): p. R87.
29. Thiery, J.P., Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(6): p. 442-54.
30. Palacios, F., et al., An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration. *EMBO J*, 2001. 20(17): p. 4973-86.
31. Kitano, J., et al., Tamalin, a PDZ domain-containing protein, links a protein complex formation of group 1 metabotropic glutamate receptors and the guanine nucleotide exchange factor cytohesins. *J Neurosci*, 2002. 22(4): p. 1280-9.
32. Venkateswarlu, K., Interaction protein for cytohesin exchange factors 1 (IPCEF1) binds cytohesin 2 and modifies its activity. *J Biol Chem*, 2003. 278(44): p. 43460-9.

IV.7 Figures

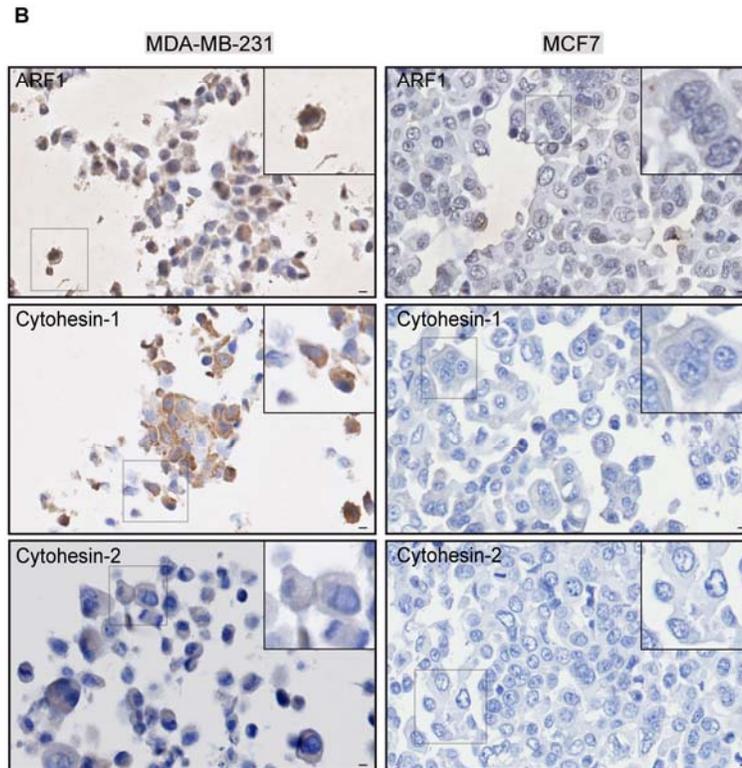
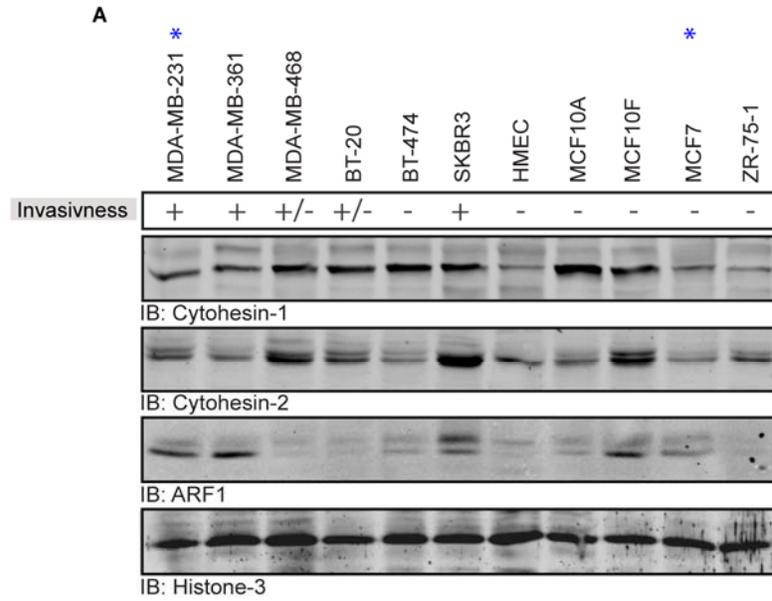


Figure 38: Cytohesin-1, Cytohesin-2 and ARF1 are highly expressed in invasive breast cancer cell lines

(A) Endogenous expression levels of Cytohesin-1, Cytohesin-2 and ARF1 were examined in MDA-MB-231, MDA-MB-361, MDA-MB-468, BT-20, BT474, SKBR3, HMEC, MCF10A, MCF10F, MCF7 and ZR-75-1 cells. All lysates were subjected to Western blot analysis using anti-Cytohesin-1, anti-Cytohesin-2, anti-ARF1 and anti-Histone-3 antibodies. These results are representative of 2 other independent experiments. **B)** Endogenous levels of Cytohesin-1, Cytohesin-2 and ARF1 were detected in MDA-MB-231 and MCF7 cell lines. Cells were fixed, stained for Cytohesin-1, Cytohesin-2 or ARF1 and counterstained with hematoxylin. Scale bar represents 10 μm . These images are representative of 2 independent experiments.

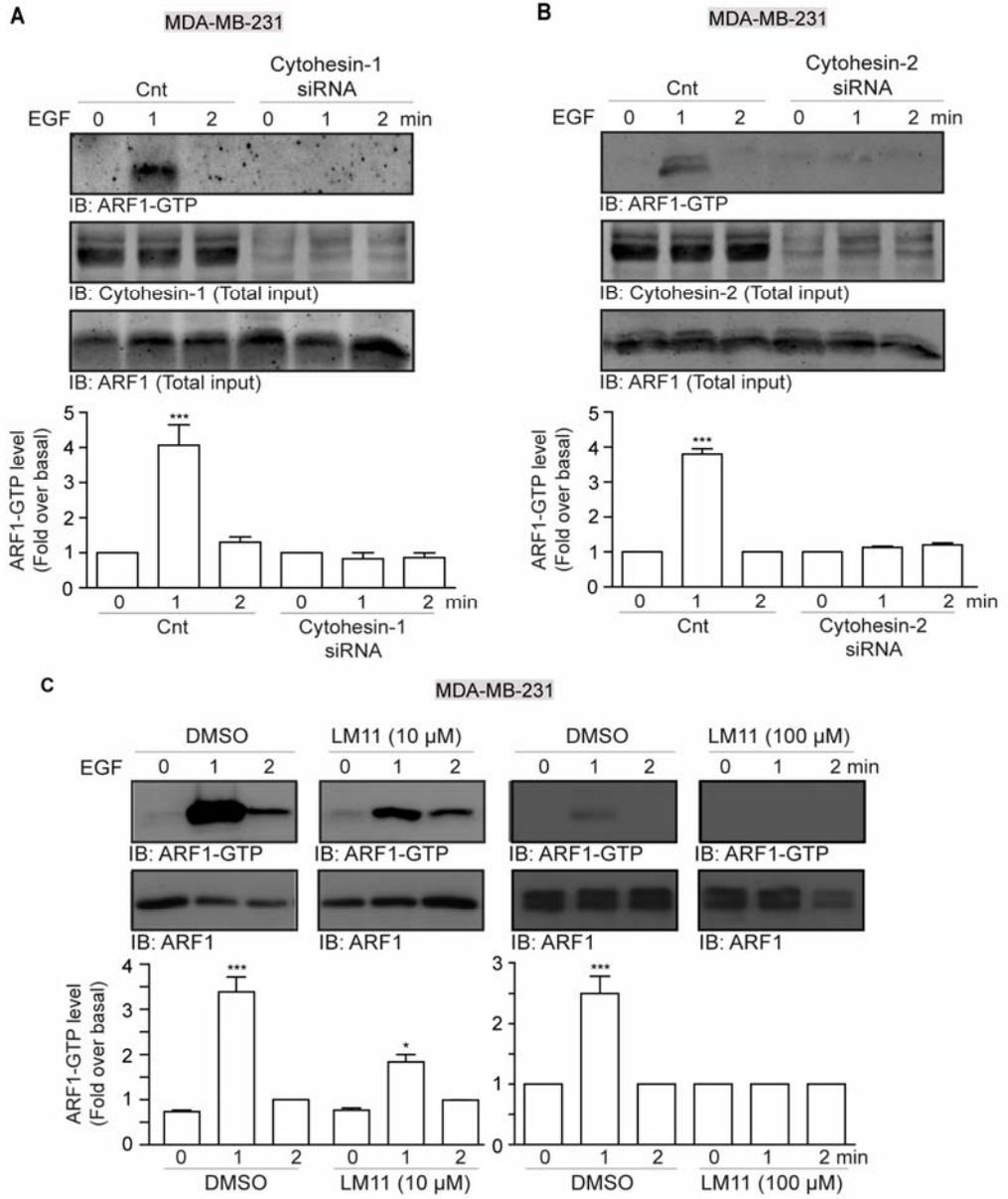


Figure 39: Cytohesin-1 as well as Cytohesin-2 depletion abolishes EGF-regulated ARF1 activation in MDA-MB-231.

(A) MDA-MB-231 cells were transfected with a scrambled (cnt) or Cytohesin-1 siRNA (target #2, 50 nM, 72h), serum starved for 4 h and then stimulated with EGF (10 ng/ml) at indicated time. ARF1-GTP levels as well as endogenous expression of Cytohesin-1 and ARF1 were detected by Western blotting using a specific anti-ARF1 and anti-Cytohesin-1 antibodies. (B) Cells were transfected with a scrambled (cnt) or Cytohesin-2 siRNA (50 nM, 72h) and treated as in A. ARF1-GTP levels and endogenous level of Cytohesin-2 as well as ARF1 were detected by Western blotting using a specific anti-ARF1 and anti-Cytohesin-2 antibodies. (C) MDA-MB-231 cells were serum starved for 4 h, pre-treated with DMSO or LM11 (10 μ M or 100 μ M) for 30 min and then stimulated with EGF (10 ng/ml) at indicated time. ARF1-GTP levels were detected by Western blotting using a specific anti-ARF1 antibody. Quantifications are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. *P<0.05, ***P<0.001 are values compared to the cnt condition.

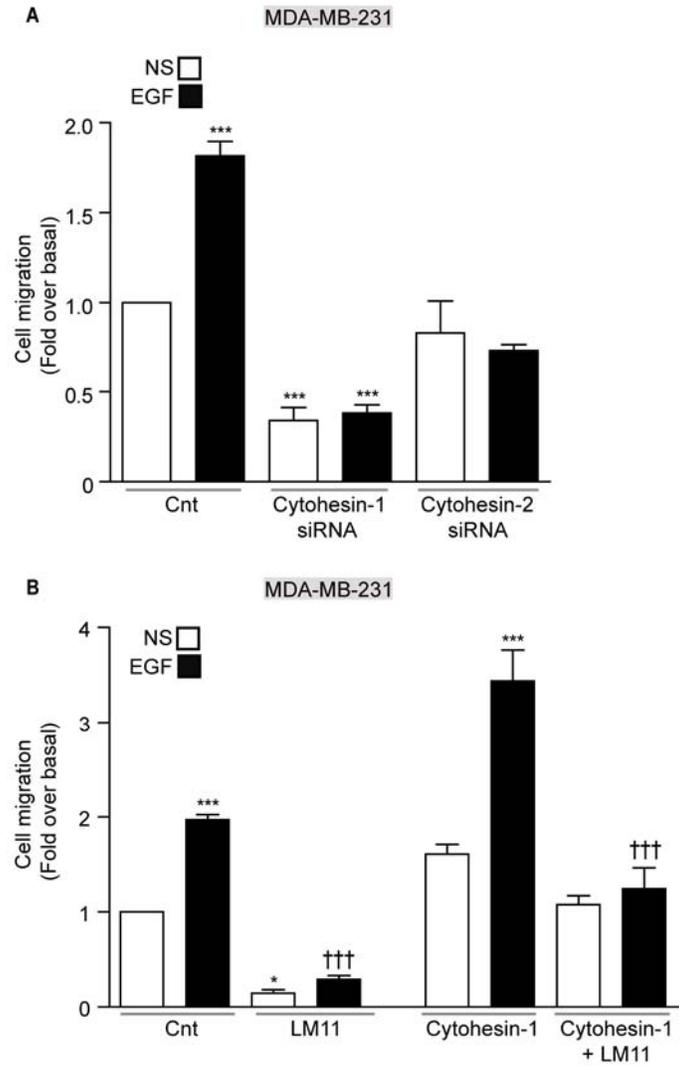


Figure 40: Depletion of Cytohesin-1 and Cytohesin-2 as well as the pretreatment with LM11 compound prevent EGF induced migration of MDA-MB-231.

(A) MDA-MB-231 cells were transfected with a scrambled, Cytohesin-1 or Cytohesin-2 siRNA serum starved for 4 h and were reseeded into Boyden chambers. Cells were stimulated or not with EGF (10 ng/ml), and migration was assessed after 6 h. Results are the mean \pm SEM of 4 independent experiments. (B) Cells were transfected or not with Cytohesin-1, serum starved and pretreated or not with LM11 (10 μ M) before EGF stimulation. Cell migration was performed as in A. Results are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. ***P<0.001 are values compared to the control cnt (scrambled) or DMSO condition, †††P<0.001 are values compared to the EGF stimulated condition.

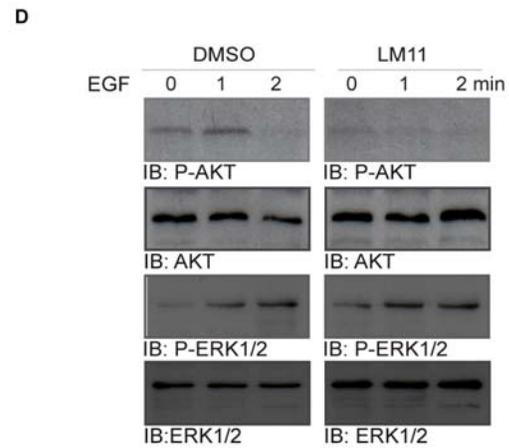
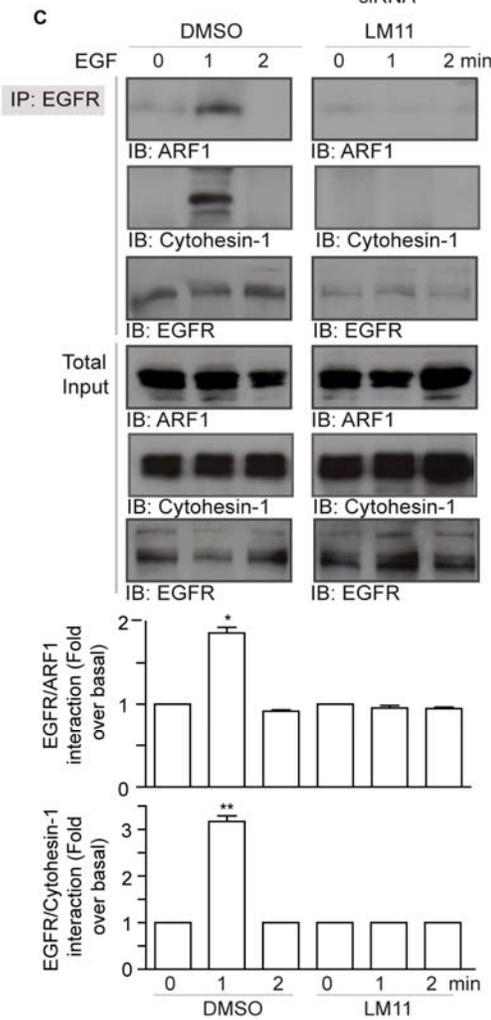
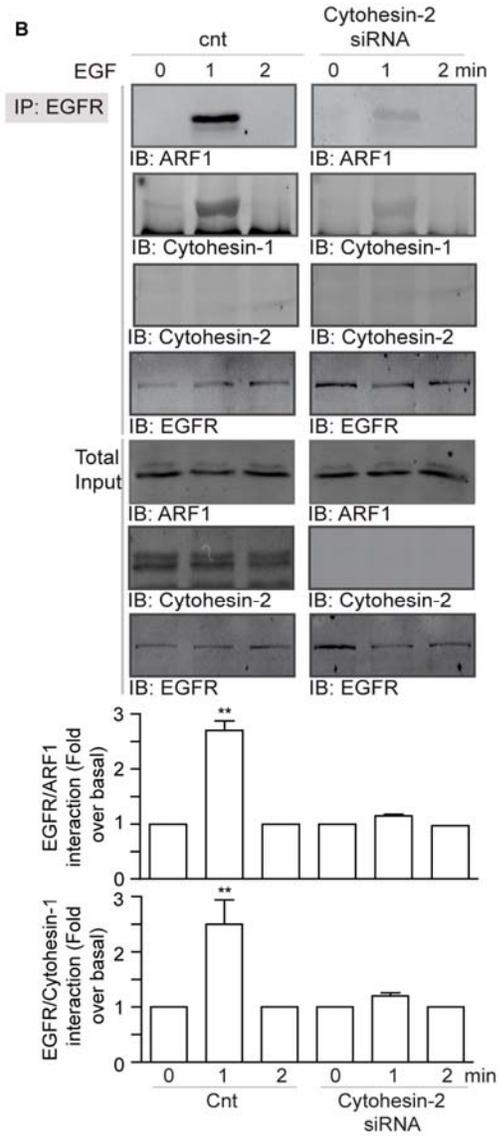
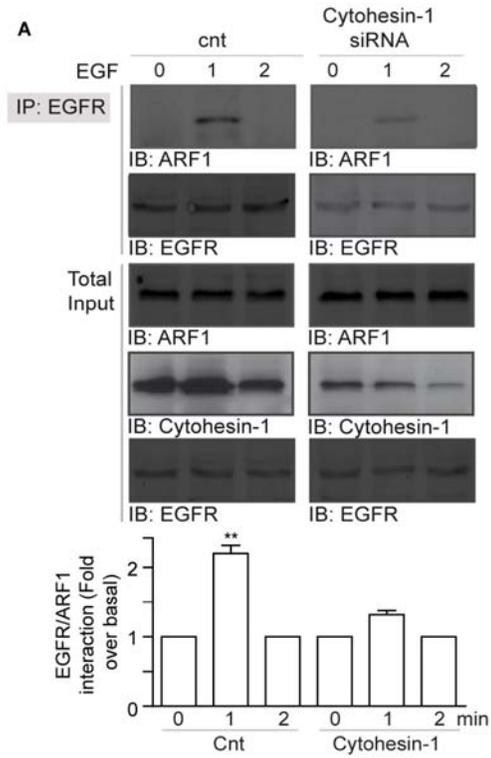


Figure 41: Depletion of Cytohesins as well as LM11 treatment impairs the recruitment of ARF1 and Cytohesin-1 to EGFR in MDA-MB-231 cells and effect of LM11 on the activation of AKT and ERK1/2.

(A) MDA-MB-231 cells were transfected with a scrambled or Cytohesin-1 siRNA serum starved for 4 h and then stimulated with EGF (10 ng/ml) for the indicated times. Endogenous EGFR were immunoprecipitated using the anti-EGFR and associated Cytohesin-1, Cytohesin-2 and ARF1 were examined by Western blotting using specific antibodies. (B) Cells were transfected with Cytohesin-2 siRNA and assessed as in A. (C) Cells were serum starved, pretreated with LM11 (100 μ M) and then subjected as in A and B. (D) Cells were treated as in C and endogenous levels of phospho-AKT, phospho-ERK1/2, AKT and ERK1/2 were detected by Western blot analysis using specific antibodies. Quantifications are the mean \pm SEM of 3 experiments. *P<0.05, **P<0.01 are values compared to the control cnt (scrambled) or DMSO condition.

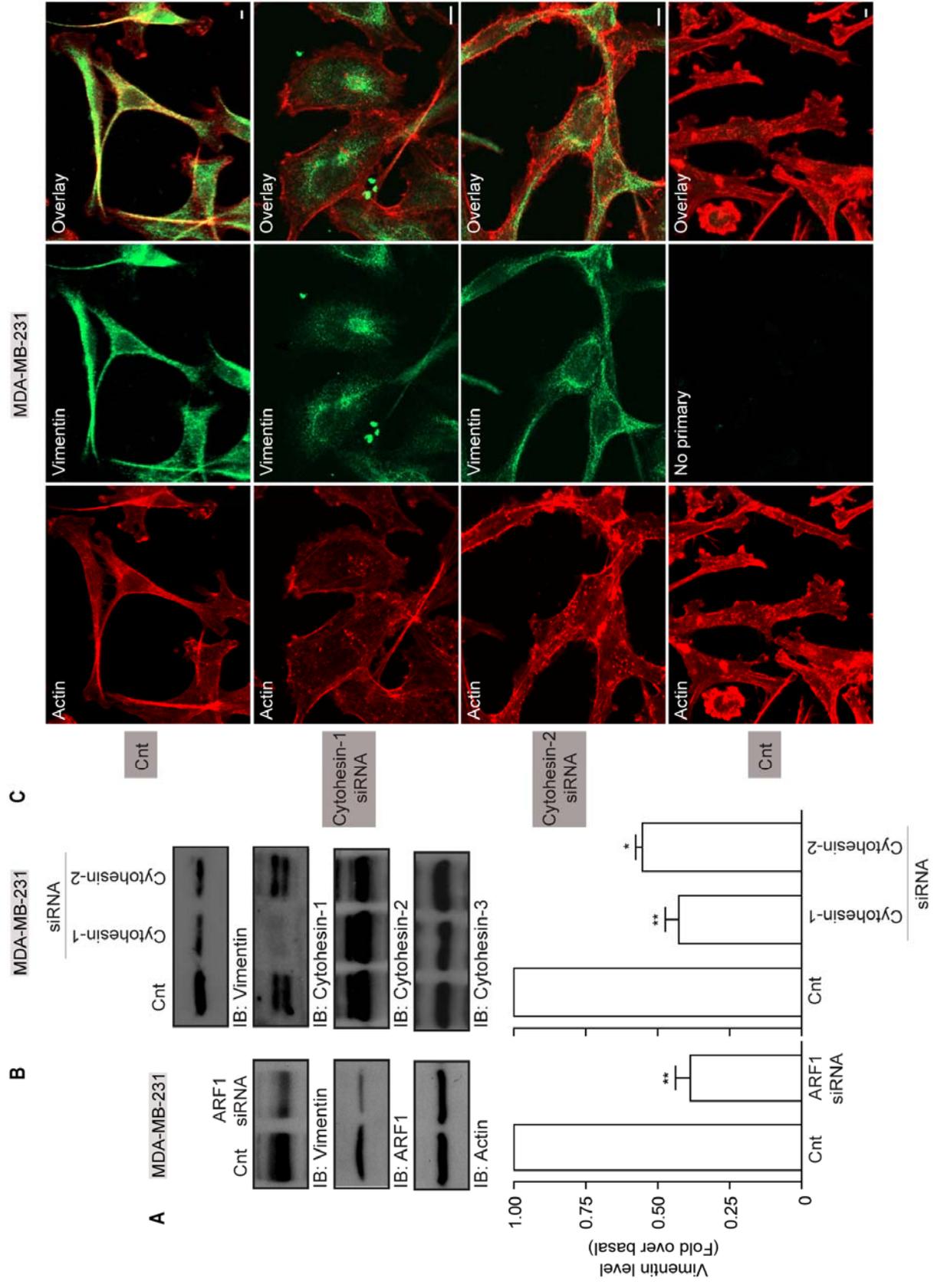


Figure 42: Depletion of ARF1 as well as Cytohesins lead to enhanced Vimentin expression in MDA-MB-231 cells.

(A) Cells were transfected with a scrambled (cnt) or ARF1 siRNA and lysates were assessed to Western blot analysis using anti-Vimentin, anti-ARF1 and anti-Actin antibodies. (B) MDA-MB-231 cells were transfected with a scrambled (cnt), Cytohesin-1 or Cytohesin-2 siRNA and lysates were assessed to Western blot analysis using anti-Vimentin, anti-Cytohesin-1, anti-Cytohesin-2 and anti-Cytohesin-3 antibodies. These results are representative of 3 other independent experiments. $**P<0.01$, $*P<0.05$ are values compared to the cnt (scrambled) condition. (C) Cells were transfected as in B, fixed and stained for Vimentin and counter stained with Phalloidin. Scale bar represents 10 μm . These images are representative of 20 cells observed in 2 independent experiments.

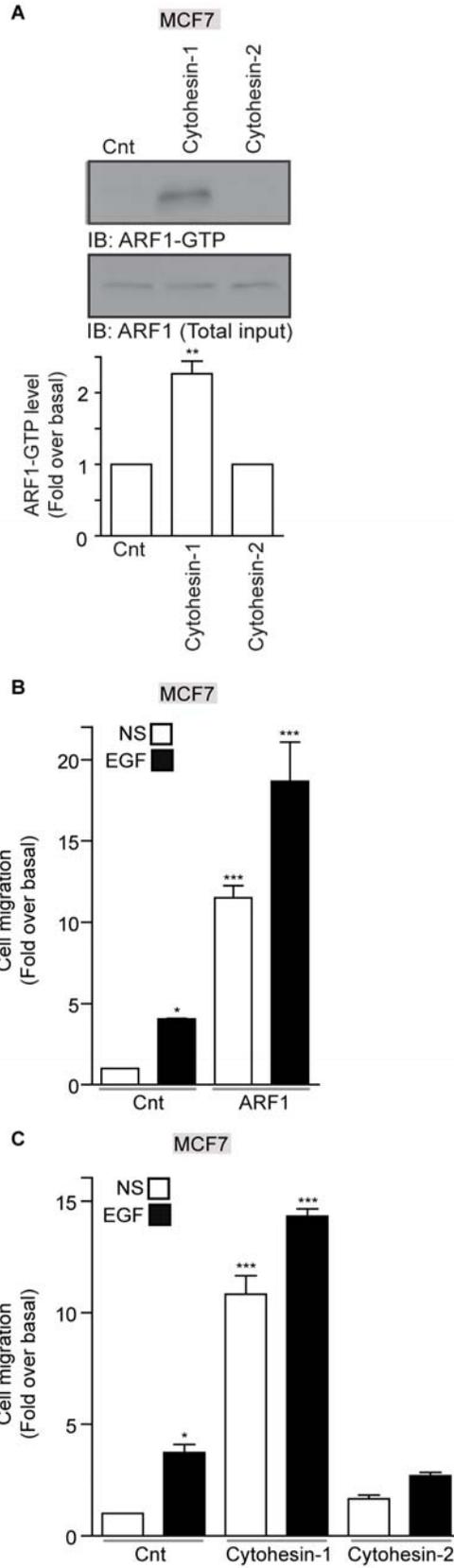


Figure 43: Role of Cytohesin-1 and Cytohesin-2 on ARF1 activation as well as migration in MCF7 cells.

(A) MCF7 cells were transfected with an empty vector (cnt), Cytohesin-1 and Cytohesin-2. ARF1-GTP levels were detected by Western blotting using a specific anti-ARF1 antibody. (B) Cells were transfected with empty vector or ARF1 and were reseeded into Boyden chambers. Cells were stimulated or not with EGF (10 ng/ml) and migration was assessed after 6 h. (C) Cells were transfected as in A, serum starved for 4 h, reseeded into Boyden chambers and then stimulated or not with EGF (10 ng/ml). Cells were subjected to cell migration for 6 h. Results are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ are values compared to the cnt (empty vector) condition.

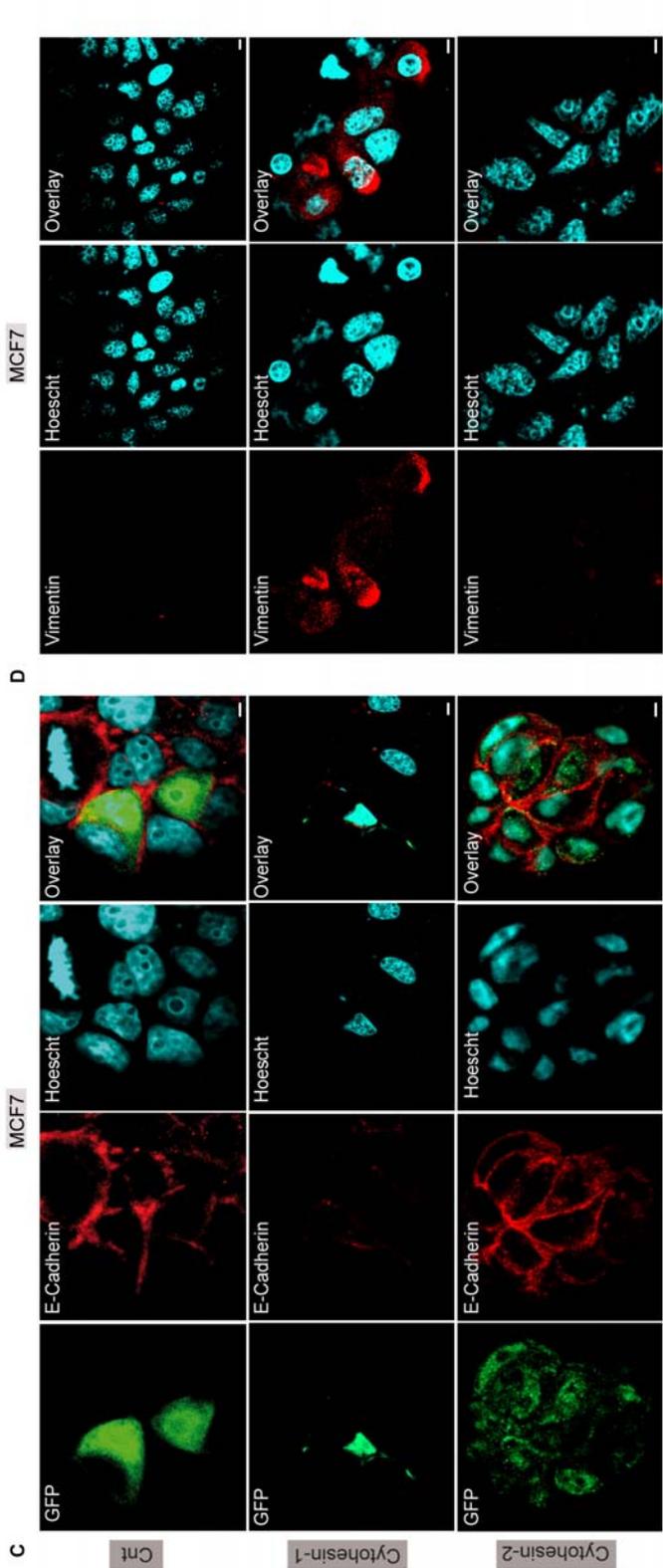
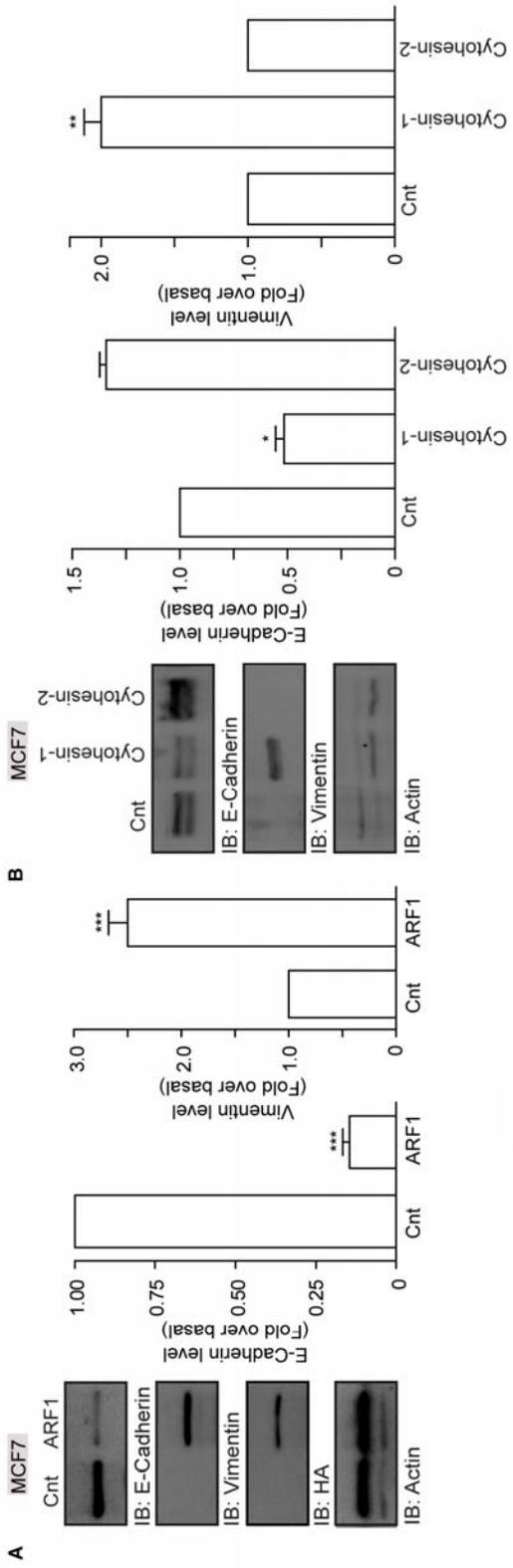


Figure 44: Role of ARF1 and Cytohesins in EMT program of MCF7 cells.

(A) MCF7 cells were transfected with an empty vector (cnt) or ARF1 and lysates were subjected to Western blot analysis using anti-E-Cadherin, anti-Vimentin, anti-HA and anti-Actin antibodies. These results are representative of 3 other independent experiments. *** $P < 0.001$, are values compared to the cnt (empty vector) condition. (B) Cells were transfected with an empty vector (cnt), Cytohesin-1 or Cytohesin-2. All lysates were assessed to Western blot analysis using anti-E-Cadherin, anti-Vimentin and anti-Actin antibodies. These results are representative of 3 other independent experiments. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ are values compared to the cnt condition. (C) Cells were transfected as in A, fixed and stained for E-Cadherin. (D) MCF7 cells were treated as in B and were stained for Vimentin. All cells were counter stained with Hoescht. Scale bar represents 10 μm . These images are representative of 20 cells observed in 2 independent experiments.

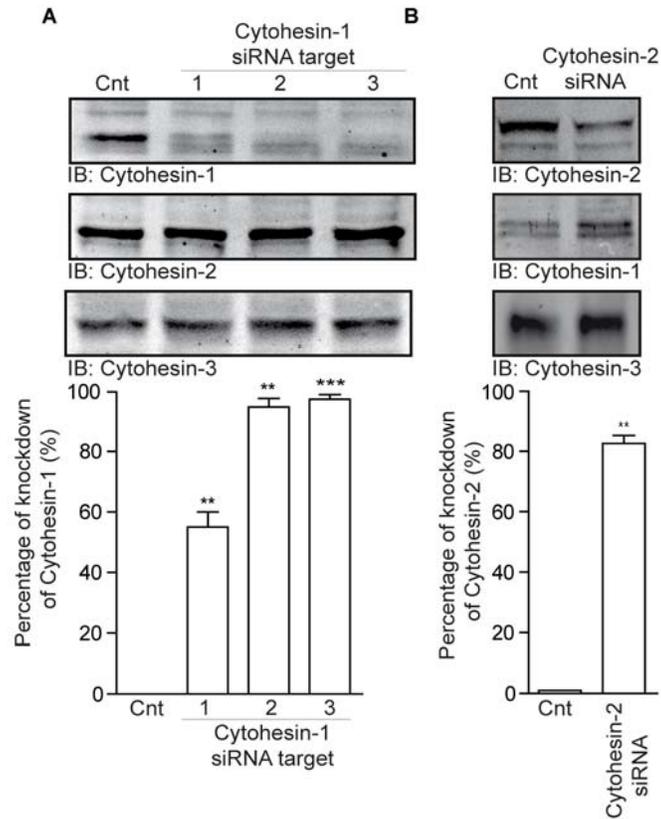


Figure 45: Expression levels of Cytohesin-1 and Cytohesin-2 and effect of siRNA.

(A) MDA-MB-231 cells were transfected a scrambled or three different Cytohesin-1 siRNA (#1, #2 or #3) (50 nM, 72h) or (B) Cytohesin-2 siRNA. Endogenously expressed Cytohesin-1, Cytohesin-2 and Cytohesin-3 were examined by Western blot analysis using specific antibodies. These results are representative of 3 independent experiments. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, are values compared to the cnt (scrambled) condition.

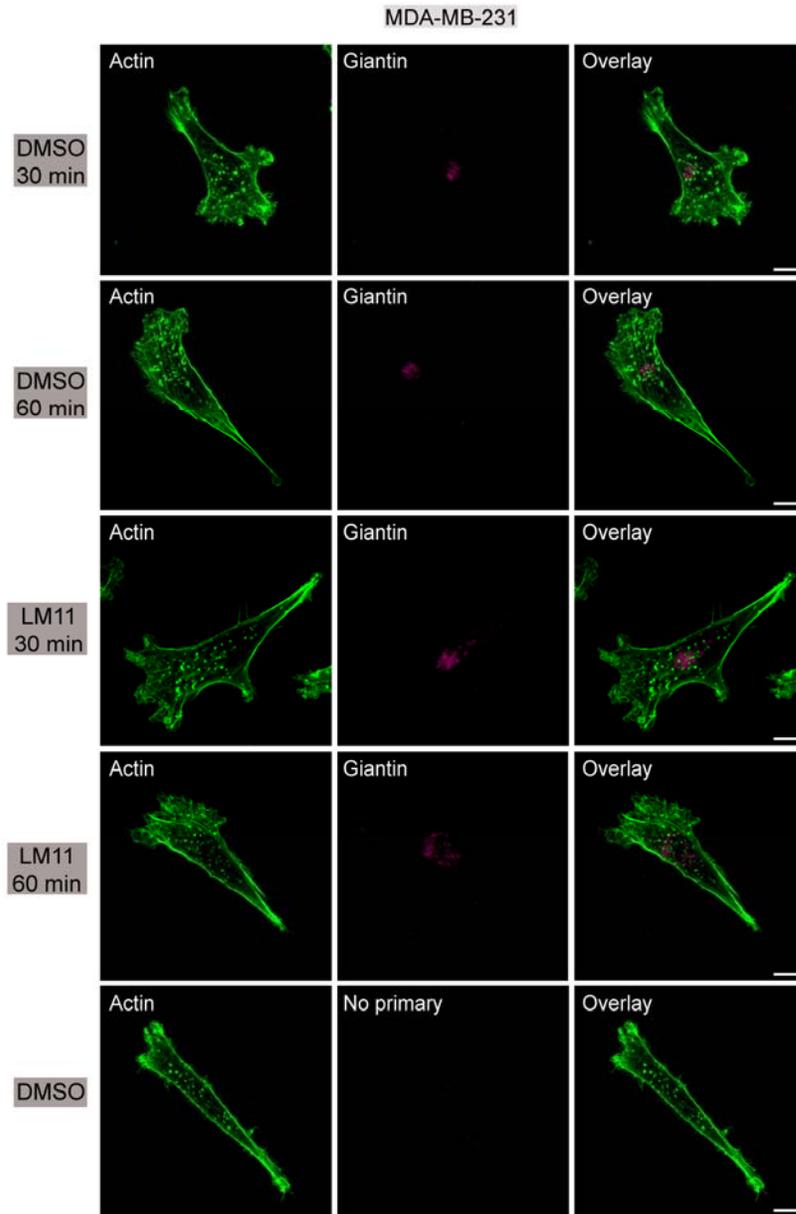


Figure 46: Effect of LM11 on Golgi assembling in MDA-MB-231 cells.

Cells were serum starved for 4 h, treated with LM11 (100 μ M) for 30 or 60 min, fixed and stained for Giantin and counter stained with Phalloidin. Scale bar represents 10 μ m. These images are representative of 20 cells observed in 2 independent experiments.

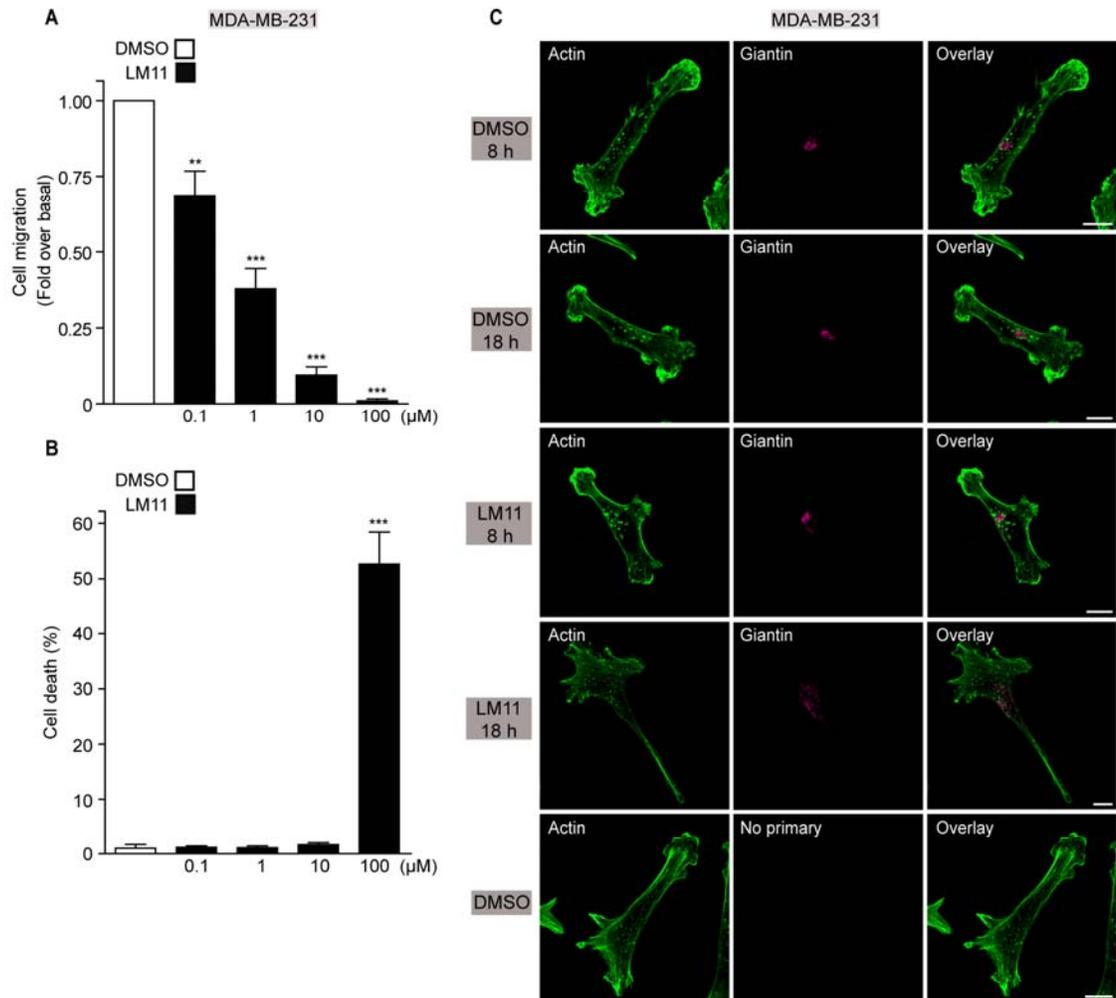


Figure 47: Effect of LM11 on migration and death of MDA-MB-231.

(A) MDA-MB-231 cells were treated with DMSO or indicated concentrations of LM11 for 16 h and cell death was determined by Trypan blue staining. Results are the mean \pm S.E.M of 3 independent experiments. *** $P < 0.001$, are values compared to the DMSO condition. (B) Cells were reseeded into Boyden chambers, pretreated with DMSO or indicated concentrations of LM11 for 30 min and then stimulated with EGF (10 ng/ml). Cell migration was assessed after 6 h. Results are the mean \pm S.E.M of 3 independent experiments. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, are values compared to the DMSO condition. (C) Cells were serum starved, treated with LM11 (10 μ M) for 8 or 18 h, fixed and stained for Giantin and counter stained with Phalloidin. Scale bar represents 10 μ m. These images are representative of 20 cells observed in 2 independent experiments.

Chapitre V: Discussion

De manière générale, au cours de la présente étude, nous avons mis en évidence que la GTPase ARF1 est surexprimée dans les cellules invasives du cancer du sein, que celle-ci est activée suite à la stimulation de l'EGFR, et que cette GTPase est importante pour la migration et la prolifération médiées par l'activation de l'EGFR. De plus, nous avons démontré qu'ARF1 contrôle la prolifération et l'EMT de manière indépendante de l'activation de l'EGFR.

Avant le début de mes travaux de recherche, la fonction d'ARF1 se résumait à moduler le transport vésiculaire et ce, à cause de sa distribution à l'appareil de Golgi. Or, des données démontrent qu'ARF1 est également distribuée à la membrane plasmique, notamment en associant le récepteur M3, un récepteur transmembranaire de type RCPG [154, 241]. Bien qu'à la base ARF1 fut caractérisée pour son rôle de régulateur de transport vésiculaire, Althan-Bonnet et ses collègues ont montré que cette GTPase est également impliquée dans la ségrégation des chromosomes, un événement clé de la division cellulaire [152]. Enfin, récemment le groupe de Sabe a mis en évidence que la GTPase, ARF6, est nécessaire pour l'invasion des cellules invasives de cancer du sein : MDA-MB-231. Ces dernières exhibent des hauts niveaux d'expression et d'activation d'ARF6 [292]. À ce jour, aucun rôle moléculaire n'a été défini pour ARF1 dans un contexte pathologique comme le cancer. Combinées, ces évidences laissent entrevoir un rôle potentiel d'ARF1 dans la pathophysiologie du cancer du sein, notamment par la régulation de la signalisation membranaire, la migration et la prolifération cellulaire.

Dans cette étude, nous avons déterminé qu'ARF1 contrôle les divers événements biologiques impliqués dans la formation des métastases. Afin de mettre en évidence le rôle d'ARF1 dans la pathologie à l'étude, nous avons utilisé le modèle cellulaire des MDA-MB-231. Ces cellules du cancer sein sont triple négative pour les récepteurs ER, PR et Her2. Elles expriment aussi fortement l'EGFR et ce, en plus de démontrer des propriétés invasives. D'un point de vue méthodique, nous avons conservé la même approche scientifique pour l'étude des rôles d'ARF1 dans la migration, dans la progression de l'EMT

et dans la prolifération. En effet, nous avons défini, selon des conditions physiologiques prédéterminées; la distribution intracellulaire de notre entité d'intérêt, son profil d'activation, son importance dans les voies signalétiques investiguées et son impact dans les réponses biologiques à l'étude.

Expression d'ARF1

Dans le but de circonscrire l'importance d'ARF1 dans le cancer du sein, nous avons comparé le niveau d'expression d'ARF1 au sein de diverses lignées cellulaires associés au cancer du sein invasif comme les MDA-MB-231, SKBR3, MDA-MB-435 et non invasif, tel que les MCF7, et ce, en plus d'inclure des lignées de cellules épithéliales mammaires non cancéreuses et non transformées, comme les HMEC, MCF10A et MCF10F. Ainsi, les lignées arborant un phénotype invasif et identifiées comme étant positives pour le récepteur à l'EGF, soit les MDA-MB-231, MDA-MB-435 et SKBR3, démontrent des hauts niveaux d'ARF1 en comparaison avec les HMEC. De manière similaire, il a été démontré qu'ARF6 est également surexprimée dans les cellules invasives comme les MDA-MB-231 et les MDA-MB-435 et, inversement, dans les cellules non invasives comme les MCF7 ou les HMEC [292]. Curieusement, les niveaux d'ARF1 sont élevés dans les MCF10F. Cependant, cette lignée de cellules épithéliales, tout comme les MCF10A, démontre des profils de différenciation élevés [347]. Quelques évidences récentes permettent d'expliquer cette surexpression d'ARF1 dans les modèles cellulaires à l'étude. Les résultats du groupe de Maquat indiquent que la protéine Staufen1 (Stau1) associe la région 3'UTR de l'ARNm d'ARF1 et agit comme modulateur de l'activité transcriptionnelle de la GTPase [255]. De plus, la suppression de Stau1 dans les cellules HeLa promeut l'augmentation d'expression d'ARF1 [256], suggérant donc que Stau1 contrôle négativement l'expression d'ARF1 et que les MDA-MB-231 exprimeraient des faibles niveaux de Stau1. Dans le même ordre d'idée, des analyses bioinformatiques tirées de <http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/>, démontrent qu'ARF1 est ciblée par 354 microRNA (miRNA). Or, il s'avère que le miRNA196a module potentiellement l'expression d'ARF1 à la baisse. Un fait intéressant est que la surexpression de ce miRNA dans les MDA-MB-231 inhibe les processus de

migration, d'invasion et de formation de métastases [348]. Ainsi, ces données suggèrent que les MDA-MB-231 expriment faiblement miRNA196a afin de moduler à la hausse l'expression d'ARF1 dans ce type cellulaire.

Par ailleurs, peu d'évidences soulignent l'importance de l'expression des ARF GEFs dans les cellules cancéreuses. Le groupe de Sabe a démontré que les ARF GEFs sont exprimées à différents niveaux, où dans les MDA-MB-231, les ARF GEFs les plus exprimées sont BRAG2/GEP100, les Cytohésines 1 à 4 et EFA6B [247]. Dans le même ordre d'idée, nous avons démontré que dans les lignées dites positives pour ARF1, les Cytohésines 1 et 2 sont également surexprimées et, inversement, dans les MCF7 et les HMEC. De manière générale, certaines lignées sont dites positives pour ARF1, Cytohésine-1 et Cytohésine-2.

Distribution d'ARF1

Étant donné qu'ARF1 est surexprimée dans les cellules cancéreuses, nous avons examiné si sa distribution était altérée. Fondamentalement, ARF1 est connue pour être classiquement associée à l'appareil de Golgi et ce, via son motif de localisation MXXE [248]. ARF1 se distribue plus spécifiquement au niveau de la région *cisternae (cis)* du Golgi et participe à l'assemblage et au bourgeonnement des vésicules enrobées des cotaomères COPI. Par le biais de la microscopie confocale, nous avons observé qu'en absence ou en présence d'EGF, ARF1 est distribuée de manière constitutive à l'appareil de Golgi de même qu'à la membrane plasmique [349]. Par ailleurs, le groupe de Johnson a rapporté qu'ARF1 peut également se retrouver à la membrane plasmique en association avec le RCPG M3 et ce, de manière dépendante à la stimulation par l'agoniste [154]. De plus, le groupe de Donaldson a rapporté que la surexpression de la Cytohésine-2/ARNO déclenche le recrutement d'ARF1 à la membrane plasmique, plus spécifiquement au niveau des régions d'ondulation des membranes [311]. Au cours de la présente étude, nous avons montré pour la première fois la localisation d'ARF1 à la membrane plasmique par l'utilisation de la microscopie confocale. En effet, nous avons présenté que les formes d'ARF1 sauvages étiquetées (*tagged*) Flag et GFP (*Green Fluorescent Protein*) sont

distribuées tant au Golgi qu'à la membrane plasmique et ce, suivant ou non l'activation de l'EGFR [349].

Mécanisme d'activation d'ARF1 par l'EGFR

L'EGFR est une cible thérapeutique importante dans le traitement anti-cancer. Nous avons donc vérifié si la stimulation de ce récepteur pouvait moduler l'état d'activation d'ARF1. Suite à l'activation de l'EGFR par son ligand, ARF1 s'active rapidement et, par la suite, retourne à son état basal. Ce résultat complètement original fut la première évidence qu'ARF1 puisse être activée par un RTK. De manière similaire, Daher et ses collaborateurs ont montré récemment qu'ARF1 est activée suite à la stimulation du VEGFR2 et ce, de manière rapide et transitoire [176]. L'activation rapide d'ARF1 par l'EGFR que nous avons observée semble être un événement précurseur dans l'activation des voies classiques médiées par l'EGFR au même titre que le recrutement au récepteur des protéines adaptatrices, telles que Grb2 et Shc. Comme l'a montré le groupe de Sabe, ARF6 est activée de manière dépendante de l'activation de l'EGFR et ce, via BRAG2/GEP100 [247]. De manière similaire, notre modèle propose qu'ARF1 soit activée de manière dépendante de l'activation de l'EGFR, par l'intermédiaire des Cytohésines 1 et 2. Un fait important est que le mécanisme d'activation d'ARF1 ne chevauche pas le mécanisme d'activation d'ARF6. En effet, comme la suppression d'ARF1 n'affecte pas l'activation d'ARF6, cela signifie que les deux ARFs sont activées de manière indépendante. De plus, il a été montré par Cohen et ses collègues qu'ARF6 est essentielle au recrutement de la Cytohésine-2 à la membrane plasmique afin de moduler l'activité d'ARF1 [311]. Ces résultats suggèrent donc que dans les MDA-MB-231, ARF6 n'est pas nécessaire au recrutement de Cytohésine-2 à la membrane pour médier l'activation d'ARF1. De plus, il a été défini lors d'études antérieures qu'ARF1 constitue un substrat classique de la Cytohésine-2. Enfin, nous avons défini que l'activation d'ARF1 est médiée par des GEFs ayant une affinité préférentiellement pour le PI(4,5)P₂ (Annexe II, figure 48), où les formes endogènes de Cytohésine-1 et Cytohésine-2 sont connues pour lier PI(4,5)P₂. De manière générale, ARF1 est activée de manière rapide et transitoire par l'EGFR et ce, par l'intermédiaire de la

Cytohésine-2. Or, nous proposons qu'une seconde ARF GEF soit nécessaire dans l'activation d'ARF1, soit la Cytohésine-1. Un fait intéressant est que seulement Cytohésine-1 est retrouvée de manière simultanée en complexe avec l'EGFR et ARF1 et ce, de manière dépendante de l'expression de Cytohésine-2. Ainsi, ce phénomène exclut la possibilité que les deux GEFs compétitionnent pour l'activation d'ARF1, mais qu'elles agiraient plutôt de concert, en étant associées l'une à l'autre sous forme d'hétérodimère. Il est défini que le domaine *Coiled-Coil* en N-terminal des Cytohésines sert de motif d'homodimérisation [350]. Cependant, aucune évidence ne démontre que les Cytohésines puissent former des hétérodimères entre elles. Ainsi, il est possible que dans les cellules invasives de cancer du sein, des formes mutantes des Cytohésines soient exprimées. Ces formes mutées permettraient aux Cytohésines d'être associées l'une à l'autre, afin d'amplifier l'activation d'ARF1. À l'inverse, dans des cellules non invasives ou normales, l'absence d'interaction entre la Cytohésine-1 et Cytohésine-2 résulterait en une faible activité d'ARF1.

Les travaux de Sabe démontrent que l'ARF GEF BRAG2/GEP100 est recrutée à l'EGFR aux sites d'autophosphorylation 1068/1086 de manière dépendante de l'activation du récepteur, pour ensuite assurer l'activation d'ARF6 [247]. De manière similaire, nous montrons que la Cytohésine-1 est recrutée au récepteur de manière dépendante à la stimulation par l'EGF, pour ainsi activer ARF1. Or, il est intéressant de mentionner que nos résultats préliminaires proposent que l'activation du résidu Y845 est nécessaire à l'activation d'ARF1 (Annexe II, figure 49). L'activation de cette tyrosine ne relève pas du mécanisme d'autophosphorylation de l'EGFR, mais plutôt de l'activité de Src, puisqu'il a été défini par le groupe de Parsons que la phosphorylation des Y845 et Y1101 est médiée par Src [351]. En effet, la résultante d'une inhibition de l'activité de Src par le pré-traitement des cellules avec PP2 ou par la surexpression du mutant dont l'activité catalytique est défectueuse, SrcKD, (*Src Kinase Death*) inhibe l'activation d'ARF1 (Annexe II, figure 50). Ainsi, Src agirait à titre de protéines adaptatrices pour le recrutement de la Cytohésine-1 à l'EGFR, pour alors assurer l'activation d'ARF1.

La transduction signalétique engagée par ARF1

Nous avons défini qu'ARF1 joue un rôle essentiel dans la transduction signalétique médiée par l'EGFR. En effet, nos résultats proposent qu'ARF1 contrôle l'activation de la voie PI3Kinase, connue comme étant nécessaire principalement à la survie cellulaire. À l'état basal, les MDA-MB-231 démontrent des hauts niveaux d'expression et d'activation d'ARF1. Considérant que la suppression d'ARF1 inhibe l'activation de la voie PI3Kinase, notre modèle soulève l'importance de l'expression basale d'ARF1 dans l'origine de l'augmentation de la survie des MDA-MB-231. Nos données rapportent que la suppression de l'expression d'ARF1 bloque l'activation de cette voie et la prolifération et ce, de manière dépendante à l'activation de l'EGFR. Il est important de mentionner que la première caractérisation d'ARF1 dans la prolifération se déroulait sur une période de 4 jours, incluant la condition de stimulation par l'EGF. Ainsi, la présence d'ARF1 dans les MDA-MB-231 est indispensable pour la survie des cellules. D'une manière différente de notre modèle d'ARF1, le groupe de Schorey a démontré qu'ARF6 modulait plutôt la voie des MAPKinases [352]. Les deux GTPases assureraient donc la transduction signalétique des voies classiques d'activation de l'EGFR et ce, de manière indépendante. Cependant, il a été démontré depuis longtemps que les protéines adaptatrices telles que Grb2, Gab1 et Shc, sont les principales protéines nécessaires à cette transduction. À défaut de ne pas posséder de motifs d'interaction SH2 et/ou SH3, tel qu'observé chez ces protéines adaptatrices, les ARFs semblent plutôt profiter de la fonction des adaptateurs moléculaires afin d'associer, par exemple, l'EGFR.

Au cours de la présente étude, nous avons défini qu'ARF1 module l'activation de la PI3Kinase. Le processus d'activation de cet enzyme est plus complexe que les composantes moléculaires de la voie MAPKinase. En effet, suivant l'activation de l'EGFR, il est important de considérer que la PI3Kinase est activée de deux façons : l'une impliquant l'interaction de la PI3Kinase avec Gab1 et l'autre, nécessitant l'association physique entre la sous-unité régulatrice p85 α et le récepteur ErbB3. En effet, suivant l'activation de l'EGFR, l'ErbB3 peut former un hétérodimère avec celui-ci. Il a été montré que p85 α interagit avec l'ErbB3 sur plus de 5 résidus tyrosine phosphorylés par l'EGFR et non, sur

un site spécifique [353]. Cependant, à ce jour, une ambiguïté subsiste quant au mécanisme d'activation spécifique des voies MAPKinase ou PI3Kinase. En effet, ces deux voies signalétiques sont coordonnées en amont de la cascade d'activation par Grb2, où cette dernière a la capacité d'associer constitutivement SOS et Gab1 [261, 262] SOS sert de GEF pour activer Ras et, subséquemment, la MAPKKK, Raf1. Ce serait donc précisément à cette étape de la transduction du signal que la fonction d'interrupteur d'ARF1 et d'ARF6 pourrait se déclencher.

L'activation de la voie PI3Kinase permet la synthèse du $PI(3,4,5)P_3$, un substrat essentiel pour la polarité cellulaire, de même que pour la formation de lamellipodes (voir section 1.6.1, figure 9). Par ailleurs, l'activation de la voie des MAPKinases induit le réarrangement du cytosquelette d'actine, notamment en modulant la contractilité via le système actino-myosine et ce, en activant l'axe ROCK/MLC. Dans le but de mieux comprendre le rôle d'ARF1 dans la migration induite par l'activation de l'EGFR, nous avons également montré, au cours de cette étude, que l'inhibition des voies signalétiques PI3Kinase et MAPKinase, par le biais d'inhibiteurs biochimiques spécifiques, diminue la migration des cellules MDA-MB-231, dépendantes de l'activation de l'EGFR. Il faut noter que l'inhibition des voies signalétiques PI3Kinase et MAPKinase se produit sans toutefois bloquer la migration basale de celles-ci [349]. Nos données suggèrent donc l'existence d'une complémentarité au sein des voies PI3Kinase et MAPKinase afin de maintenir un niveau de migration basale des cellules cancéreuses. Ainsi, ces données ont permis d'appuyer le fait que l'abolition de l'expression d'ARF1 parvient à bloquer la migration cellulaire dépendante de l'activation de la PI3Kinase suivant l'activation de l'EGFR. Or, dans les mêmes conditions expérimentales, nous n'avons pas détecté d'effet sur la migration basale des MDA-MB-231.

Approches expérimentales utilisées pour étudier le rôle endogène d'ARF1 dans nos modèles cellulaires

Afin de caractériser notre modèle d'ARF1, nous avons utilisé deux types d'approches expérimentales, soit l'interférence à l'ARN et la surexpression de formes

mutantes d'ARF1, imitant soit la forme inactive (ARF1T³¹N) ou active (ARF1Q⁷¹L). L'interférence à l'ARN nous a permis, en diminuant le niveau endogène d'ARF1, d'étudier l'importance de la surexpression de cette protéine dans les MDA-MB-231. Étant donné que nous nous sommes principalement limités au modèle cellulaire au cours de cette étude, l'utilisation des siRNA au lieu, par exemple des shRNA, fut adéquate considérant les fenêtres de temps post-transfection (3 à 4 jours suivant la transfection) de courtes durées impliquées dans l'étude d'ARF1, notamment au niveau de la migration et de l'EMT. Cependant, nous avons assisté à un événement exceptionnel lors de l'étude du rôle d'ARF1 dans la prolifération, puisque nous avons observé un effet soutenu de la déplétion d'ARF1 via l'utilisation d'un siRNA, plutôt qu'un shRNA. Cet outil permet d'induire une diminution d'expression constante dans le temps. Cependant, la synthèse d'un shRNA inductible serait essentielle pour l'étude du rôle d'ARF1 dans la formation des métastases *in vivo*. En effet, à cause des résultats obtenus avec l'utilisation du siRNA contre ARF1 (inhibition de la prolifération après 7 jours post-transfection), nous pouvons affirmer que nous ne serions pas en mesure de pouvoir générer, dans un premier temps, des métastases aux sites propices (poumons, cerveau, moelle osseuse) et, dans un second temps, d'évaluer avec exactitude si l'induction de la suppression d'ARF1 inhibera la formation de ces dernières.

La diminution ou l'augmentation des niveaux endogènes d'ARF1 implique que les quantités d'ARF1 liées au GDP et au GTP devraient diminuer ou augmenter respectivement et ce, de manière proportionnelle. Ainsi, considérant que les MDA-MB-231 expriment des hauts niveaux d'ARF1 liée au GTP, la modulation d'expression d'ARF1 affecte principalement cette forme d'activation d'ARF1 en plus d'influencer l'effet de masse ou de surexpression d'ARF1 dans la cellule. Ainsi, cette méthode, bien qu'efficace quant à l'élucidation des divers rôles d'ARF1 étudiés au cours de cette étude, nous a renseignés sur l'effet de la présence ou de l'absence d'ARF1, et pas sur l'importance de son état d'activation.

Dans le but de définir si l'état d'activation d'ARF1 est indispensable à la migration et à la prolifération cellulaire, nous avons utilisé un système de surexpression des formes mutantes

d'ARF1, soit l'une imitant la forme inactive (ARF1T³¹N), dite dominante négative, et l'une imitant la forme active (ARF1Q⁷¹L), dite constitutivement active. Ainsi, sous leur forme liée au GTP, les ARFs sont dites en position « marche » et induisent l'activation d'effecteurs pour ultimement moduler les fonctions biologiques de la cellule. Le modèle cellulaire à l'étude, soit les MDA-MB-231, présente majoritairement des formes actives d'ARF1. Ainsi, nous nous sommes donc interrogés à savoir si l'effet de surexprimer une forme inactive d'ARF1 (ARF1T³¹N) parviendrait à altérer les fonctions pathophysiologiques engagées par la forme prédominante d'ARF1 (ARF1-GTP). Nous avons donc démontré que, de manière drastique, l'incapacité d'ARF1 à passer sous sa forme active déclenche un arrêt de la migration et de la prolifération et ce, de manière tant dépendante, qu'indépendante de l'activation de l'EGFR. Malgré le fait que les MDA-MB-231 démontrent des hauts niveaux d'ARF1 liée au GTP, la surexpression d'ARF1Q⁷¹L permet d'amplifier l'effet biologique de base engagé par la forme endogène d'ARF1 (liée au GTP). À cause de nos essais de prolifération, la surexpression d'ARF1Q⁷¹L a permis d'augmenter la prolifération basale des MDA-MB-231 en abolissant l'effet anti-prolifératif médié par la forme endogène d'ARF1 liée au GDP.

Récemment, Viaud et ses collègues ont généré une approche biochimique visant à bloquer l'activation d'ARF1 et ce, sans affecter les niveaux d'expression endogène d'ARF1 [220]. La cristallisation du complexe ARF1-GDP/ARF GEF formé par la BFA a donné naissance à d'autres molécules inhibitrices de ce complexe, dont le M69, le SecinH3 et le LM11. Le M69 est un aptamère d'ARN qui cible spécifiquement le domaine Sec7 de la Cytohésine-1 [263] alors que le SecinH3 est un inhibiteur du domaine Sec7 de la famille des Cytohésines et, par conséquent, abolit la fonction GEF de manière non sélective de ces dernières. Bien que le M69 ait été utile dans la caractérisation des rôles moléculaire de Cytohésine-1 [262], cet aptamère, au même titre que les petits ARN interférents doubles brins, est dégradés en présence de sérum et décheu également des réponses immunitaires [354]. À cause des résultats présentés par Viaud et ses collaborateurs, le LM11 est un composé présentant un potentiel thérapeutique pouvant servir à l'étude de la progression du cancer du sein. Nous avons donc sélectionné le LM11 au cours de la présente étude par sa spécificité à

inhiber de manière sélective Cytohésine-2. Utilisé à des concentrations efficaces et non cytotoxiques, un outil moléculaire, comme le LM11, permet de caractériser plus rapidement le modèle d'ARF1 dans le cancer du sein. Afin de compléter nos résultats relatifs à la suppression de Cytohésine-2 sur l'activation d'ARF1 et la migration, nous avons démontré que le pré-traitement des MDA-MB-231 avec le LM11 bloque l'activation d'ARF1 et la formation du complexes ARF1/EGFR de manière dépendante à l'EGF. De manière intéressante, le LM11 empêche également l'association Cytohésine-1/EGFR suivant la stimulation à l'EGF. Ainsi ces résultats obtenus avec le LM11 montrent que l'abolition des fonctions de Cytohésine-2 imite les effets de la suppression de Cytohésine-2. Nous avons également étudié l'effet du LM11 sur la migration des MDA-MB-231. De manière méthodique, nous avons examiné, comme pour les essais d'activation d'ARF1, l'intégrité de la structure du Golgi et ce, en fonction de la dose et du temps d'utilisation du composé pharmacologique. Le traitement au LM11 des MDA-MB-231, à des doses et temps adéquats, inhibe à la fois la migration basale et celle stimulée à l'EGF. Or, la suppression de Cytohésine-2 bloque uniquement la migration induite par l'EGF. Il a été montré que le LM11 bloque la migration basale des cellules MDCK de même que la migration induite par la surexpression de la Cytohésine-2. Cependant, notre étude rapporte que le LM11 abolit la formation du complexe Cytohésine-1/EGFR. Ainsi, nous avons vérifié si l'usage de cet inhibiteur affecte également le potentiel de la Cytohésine-1 à moduler la migration basale des MDA-MB-231. Tel qu'indiqué à la figure 41 du 3^e article présenté au Chapitre IV), le LM11 abolit seulement la réponse médiée par l'EGF dans les cellules surexprimant Cytohésine-1, suggérant un effet indirect du LM11 dans les conditions basales de migration telles que décrites dans l'étude effectuée par Viaud et ses collègues [219].

Les Cytohésines contrôlent la migration et le phénotype invasif des cellules cancéreuses.

Le groupe de Sabe a démontré que sur 14 ARF GEFs sélectionnées, incluant les Cytohésines (1-4), seule la suppression de l'ARF GEF BRAG2/GEP100 bloque l'invasion des MDA-MB-231 à travers une matrice extracellulaire synthétique contenant des facteurs

de croissance [246]. Or, dans la présente étude, nous démontrons que les Cytohésines 1 et 2 contrôlent la migration des MDA-MB-231. De manière intéressante, la suppression de Cytohésine-1 parvient à bloquer la migration basale des MDA-MB-231, tandis que la suppression de Cytohésine-2 inhibe la migration dépendante de l'activation de l'EGFR. Nous suggérons que cet effet biologique géré par Cytohésine-1 obéisse à un événement moléculaire indépendant d'ARF1. Il a été montré que le niveau basal d'activation de Rac1 est plus élevé dans les MDA-MB-231 que dans les MCF7 [264]. De plus, il a été démontré que Cytohésine-2 est nécessaire à l'activité de Rac1 et ce, en modulant l'interaction avec la Rac GEF DOCK180 [176]. Ainsi, de manière similaire, nous suggérons que, dans des conditions basales, Cytohésine-1 contribue à l'activation basale élevée de Rac1 présente dans les MDA-MB-231 par un mécanisme similaire à celui proposé par le groupe de Santy. Au cours de la dernière décennie, il a été rapporté qu'ARF6 de même que les Cytohésines 1 et Cytohésines-2 contrôlaient les processus d'adhésion et de migration. Ces évidences ont donc soulevé l'importance d'investiguer le rôle de ces protéines dans le cancer. L'un des phénomènes limitant la progression d'un carcinome *in situ* en carcinome invasif est l'assemblage des jonctions d'adhésion coordonnées de près par l'EMT. Dans la présente étude, nous avons démontré qu'en plus de moduler l'activation d'ARF1, la formation du complexe ARF1/EGFR et la migration cellulaire, les Cytohésine-1 et Cytohésine-2 contrôlent également la progression de l'EMT dans le cancer du sein. L'un des marqueurs classiques de l'EMT est la perte d'expression de la Cadhérine-E, connue comme étant un marqueur du phénotype non invasif ou épithélial. Cependant, les MDA-MB-231 n'exprimant pas de Cadhérine-E, nous avons donc centré nos analyses sur l'expression de la Vimentine, un marqueur du phénotype invasif. Nos données montrent donc que la suppression d'ARF1, au même titre que la suppression de Cytohésine-1 et Cytohésine-2, promeut la diminution d'expression de la Vimentine dans les MDA-MB-231 (Tiré du 3^e article présenté au Chapitre IV). De manière intéressante, dans les mêmes conditions expérimentales, nous avons noté que les MDA-MB-231 semblent former des jonctions intercellulaires en plus de diminuer la formation de lamellipodes. Ces phénomènes observés semblent être liés à l'initiation de la transition mésenchymateuse-épithéliale, mais

également à la contribution de Rac1, principale médiatrice de la voie WAVE/ARP2/3 impliquée dans la formation des lamellipodes [199]. Afin de mieux établir l'importance de la régulation de l'activité d'ARF1 et des Cytohésines dans l'EMT, nous avons donc opté pour un modèle de cellules non invasives, les MCF7, qui expriment des faibles niveaux d'ARF1, Cytohésine-1 et Cytohésine-2 (Tiré du 3^e article présenté au Chapitre IV). De manière évidente, nous avons confirmé que la surexpression d'ARF1 et Cytohésine-1 dans les MCF7 engage le passage complet de la forme non invasive vers la forme invasive. Cela est accompagné par la perte d'expression de la Cadhérine-E et l'augmentation d'expression de la Vimentine. Cet effet phénotypique engendré par la surexpression de Cytohésine-1 est directement associé à l'augmentation de l'activation basale d'ARF1 dans les mêmes conditions expérimentales. L'une des propriétés que les cellules acquièrent lors de leur passage de la forme non invasive vers la forme invasive est la capacité à migrer. Tel que montré à la figure 43 (Tiré du 3^e article présenté au chapitre IV), la surexpression d'ARF1 et de Cytohésine-1 amplifie la migration basale des MCF7. Ces dernières résultent de l'acquisition du phénotype invasif.

Curieusement, au cours de cette étude, nous avons déterminé dans les MDA-MB-231 et MCF7 qu'à l'état basal Cytohésine-1 et Cytohésine-2 se comportent de manière différente, mais que dans les MDA-MB-231, toutes deux participent aux phénomènes moléculaires et biologiques modulés par l'EGFR. La capacité des Cytohésines à moduler l'activation d'ARF1, la migration de même que l'EMT dépend de leur habileté à associer la membrane plasmique. Les Cytohésines sont recrutées à la membrane via leur domaine PH où ce dernier s'associe de manière spécifique ou non aux phospholipides membranaires. Cependant, via leur domaine PH, les Cytohésines peuvent également interagir avec des protéines d'échaffaudage ancrées à la membrane plasmique. En effet, la Cytohésine-2 interagit spécifiquement avec des protéines d'échaffaudage telles que IPCEF, GRASP, CNK1, CNK2A, alors que Cytohésine-1 associe CYTIP. Des évidences démontrent que CNK1 est hautement exprimée dans les MDA-MB-231 et inversement dans les MCF7 [355]. IPCEF est exprimée dans les MCF7 [176]. De plus, il a été montré qu'IPCEF favorise l'activité GEF et le recrutement de Cytohésine-2 et ce, de manière dépendante à la stimulation avec

des facteurs de croissance [176]. Cependant, il a été montré dans les cellules Jurkat que CYTIP est constitutivement associée à Cytohésine-1 à la membrane plasmique et ce, en condition basale (absence de stimuli exogène) [266]. Dans le même ordre d'idée, nous proposons que l'augmentation de la migration et l'acquisition du phénotype invasif, en conditions basales, associées à la surexpression de Cytohésine-1 seraient la résultante d'une association constitutive entre Cytohésine-1 et une protéine d'échaffaudage, telle que CYTIP.

Nouvelles fonctions d'ARF1

Nous avons défini que l'activation d'ARF1 à la membrane plasmique est dépendante à l'EGF au même titre que son rôle dans la migration cellulaire. Cependant, nous avons également établi au cours de la présente étude qu'ARF1 contrôle la prolifération à court terme de manière dépendante de l'activation de l'EGFR, mais également à long terme, dans des conditions physiologiques normales.

Récemment, le groupe de Schwartz a démontré qu'ARF1 est importante pour la cytokinèse [151]. En effet, par un mécanisme moléculaire non défini, la surexpression d'ARF1Q⁷¹L dans les cellules normales de reins de rat (NRK) empêche la redistribution d'ARF1 dans le cytoplasme, freine la fission des fuseaux mitotiques pour ainsi inhiber le processus de cytokinèse. À l'issue de ces évidences, nous avons soulevé l'hypothèse qu'ARF1 est essentielle à la prolifération des cellules de cancer du sein.

De manière intéressante, nous avons défini que l'incapacité d'ARF1 à être activée promeut l'entrée des cellules en sénescence, de manière indépendante de p16^{INK4A}. En effet, ARF1 contrôle ce processus biologique en contrôlant la fonction de la protéine pRb, où son état de phosphorylation est connu pour être bloqué par l'intermédiaire de p16^{INK4A}, notamment lors de l'induction de la sénescence. Ces résultats indiquent donc qu'ARF1 puisse moduler l'activité de pRb directement et ce, en association avec cette dernière. Nous avons donc exploré la possibilité qu'ARF1 exerce une nouvelle fonction dans la cellule et ce, par son habileté à se relocaliser au noyau afin de moduler la fonction des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire.

Des études antérieures ont démontré qu'Arf5, un membre de la sous-famille des ARFs, associe les protéines HP1 via leur chromodomaine [241]. Ces résultats ont permis de mettre en évidence que les ARFs ont la capacité de se relocaliser au noyau et d'associer la chromatine. En tenant compte de ces résultats, nous avons démontré qu'au niveau endogène qu'ARF1 se redistribue au noyau uniquement lors de la phase G0/G1 du cycle cellulaire. Dans la même condition physiologique, les niveaux d'activation d'ARF1 sont presque nulle tandis qu'au cours des phases S et M, l'activation d'ARF1 augmente progressivement (Tiré du 2^e article présenté au chapitre III). De plus, nous avons confirmé qu'ARF1T³¹N se relocalise au noyau, spécifiquement au niveau de la chromatine (Tiré du 2^e article présenté au chapitre III). De manière intéressante, nous avons démontré, par le modèle des cellules COS7, que cette redistribution nucléaire d'ARF1 est spécifique au statut d'activation de pRb. En préservant les formes endogènes d'ARF1 et de pRb, nous avons montré que la dégradation spécifique de pRb par la surexpression d'E7 déclenche l'expulsion d'ARF1 et d'ARF1T³¹N hors du noyau. Nous avons également remarqué, dans des essais *in vitro* et *in vivo*, que la forme d'ARF1 liée au GDP associe spécifiquement pRb via un motif d'interaction qui reste à déterminer. Ainsi, nous avons mis en évidence, pour la première fois, qu'une ARF peut associer physiquement une protéine régulatrice du cycle cellulaire. De plus, nos résultats indiquent que l'interaction entre ARF1-GDP et pRb est inhibée par la phosphorylation de pRb. Par conséquent, ces données *in vitro* et celles détaillées dans nos essais *in vivo* de co-immunoprécipitation, nous permettent de confirmer qu'ARF1 lie préférentiellement pRb sous sa forme hypophosphorylée.

En plus de permettre la dissociation du complexe pRb/E2F par phosphorylation, les Cdk5 contrôlent également l'exportation de pRb hors du noyau. Suivant la phosphorylation par Cdk4 en C-terminal, pRb est relocalisée à l'extérieur du noyau par Exportine-1, un récepteur de transport nucléaire [269, 270]. Toutefois, le mécanisme d'importation nucléaire de pRb demeure incertain. Dans la présente étude, nous montrons par des essais de co-immunoprécipitation de la forme endogène de pRb effectués dans des extraits de chromatine, que la surexpression d'ARF1T³¹N (forme inactive) et pas ARF1Q⁷¹L (forme active) induit la séquestration de pRb de manière constitutive dans la chromatine. De plus,

nous avons établi, par des essais d'immunoprécipitation de la chromatine, qu'au cours de la phase G0/G1, ARF1 se relocalise au niveau des promoteurs des gènes contrôlés par E2F1 tels que *Cycline D1* et *Mcm6*, où sont retrouvées également les protéines pRb et E2F1. À l'issue de nos résultats, nous pouvons conclure qu'au cours de la phase G0/G1, ARF1 interagit avec la forme hypophosphorylée de pRb au niveau des régions promotrices des gènes modulés par les E2Fs. De plus, la capacité d'ARF1 à être activée ou à lier le GTP est nécessaire à la fonction de la protéine pRb dans le contrôle du cycle cellulaire des MDA-MB-231. En effet, la forme mutante ARF1T³¹N induit l'hypophosphorylation de pRb et l'association constitutive entre pRb et E2F1 inhibant la transcription des gènes contrôlés par E2F1 (Boulay et al., 2011, Chapitre III). Par conséquent, cela favorise la prolifération cellulaire. Dans les mêmes conditions expérimentales, nous montrons qu'ARF1 est responsable de la formation de SAHFs, de même que de l'augmentation de la méthylation de l'Histone-3 sur lysine 9 (H3meK9), deux caractéristiques des cellules sénescents.

Par ailleurs, nous avons démontré l'association entre ARF1 et pRb *in vitro* et *in vivo*. Or, nos données préliminaires proposent que l'ARF GAP GIT1 soit une cible d'intérêt dans la modulation de ce complexe *in vivo*. En effet, la surexpression de GIT1 dans les MDA-MB-231 augmente drastiquement l'interaction entre ARF1 et pRb (Annexe I, figure 55). Cela suggère donc qu'en condition basale la quantité de GIT1 endogène ne parvient pas à inhiber les hauts niveaux d'ARF1 liés au GTP. Ainsi, l'augmentation de la forme sauvage de GIT1 permet de bloquer la capacité d'ARF1 endogène à être activée et ce, par un mécanisme qui demeure encore à l'étude.

Bien qu'au cours de cette étude nous n'ayons pas étudié le rôle des Cytohésines dans la prolifération, nos résultats suggèrent que Cytohésine-2 serait impliquée dans la prolifération médiée par l'EGFR. En effet, le traitement des cellules avec le LM11 inhibe l'activation d'AKT, et par conséquent, la voie de survie. Ainsi, la fonction endogène de Cytohésine-2 pourrait moduler la prolifération en modulant la voie PI3Kinase.

ARF1 comme cible thérapeutique

D'un point de vue thérapeutique, ARF1 est une cible de choix dans le traitement anti-cancer du sein. En effet, nos résultats démontrent que cette GTPase est essentielle à de multiples niveaux : migration, EMT et prolifération. En termes d'approche anti-cancer ciblant spécifiquement ARF1, nous devrions considérer les phénomènes contrôlés en conditions physiologiques normales, soit en absence de stimuli. Parmi ces phénomènes figureraient l'EMT et la prolifération. Cependant, comme l'EMT est un processus modulable à court terme, nous devrions considérer ARF1 dans un événement qui se déroule à long terme, tel que la prolifération. En effet, nous avons démontré qu'ARF1 est responsable de l'induction de la sénescence dans les MDA-MB-231, un processus soutenu dans le temps. La sénescence est un phénomène à considérer avec rigueur dans l'étude du cancer. Dans un contexte thérapeutique, il faut tenir compte que ce processus est en fonction durant la formation des métastases, spécifiquement lors de l'entrée des cellules tumorales en état de dormance et ce, par un mécanisme peu caractérisé. Or, pouvant être associés au microenvironnement des cellules tumorales, il a été démontré que des fibroblastes sénescents sécrètent de nombreux facteurs pro-inflammatoires pouvant être responsables de la relance de nouvelles tumeurs. Bien que cette hypothèse n'ait pas été vérifiée dans un modèle de cancer du sein, il est important de considérer ce concept dans notre modèle d'ARF1 dans la sénescence. Globalement, une approche thérapeutique visant à cibler la prolifération des cellules tumorales en abolissant la capacité d'ARF1 à être activée devra inclure une thérapie anti-inflammatoire afin de réduire les effets néfastes induit par les cellules sénescents.

À ce jour, si nous avons à effectuer un choix quant au type d'approche utilisée afin de cibler ARF1 dans un contexte thérapeutique, nous serions confrontés à deux principes moléculaires : l'expression et l'état d'activation d'ARF1. Parmi les technologies récentes, certaines approches permettent d'inhiber l'expression des protéines, telles que les antagomirs, où cet outil moléculaire servirait à l'inhibition spécifique d'un miRNA modulant l'expression d'ARF1. Or, comme nous ne connaissons pas les effets de la suppression d'expression d'ARF1 sur la stabilité du génome, il serait audacieux, voire risqué, de choisir

cette méthode comme choix numéro un. Partant de nos résultats obtenus, l'approche la plus efficace serait de bloquer la capacité d'ARF1 à être activée, afin de diminuer les niveaux d'ARF1 liés au GTP. En effet, en générant un composé inhibiteur de la liaison du GTP spécifique à ARF1, cela permettrait d'induire l'association constitutive entre ARF1 et pRb, afin d'entraîner l'entrée des cellules tumorales en état de sénescence. Pour faire un parallèle avec nos résultats obtenus avec le LM11, cette nouvelle approche proposée, n'affecterait pas l'intégrité du Golgi, puisqu'il n'y aurait pas de séquestration du complexe ARF1 GDP/Cytohésine-2. À priori, cette nouvelle approche thérapeutique démontrerait nettement moins d'effets indésirables que celle suggérée avec le LM11.

Les cellules MDA-MB-231 utilisées pour l'étude d'ARF1 dans le cancer du sein, ont un potentiel pro-métastatique élevé. Les données amassées au cours de cette étude indiquent qu'ARF1 soit essentielle pour la formation des métastases et ce, à cause de sa capacité à contrôler les événements biologiques et moléculaires nécessaires à l'initiation et à la progression de ce processus pathologique. Ainsi, l'élaboration d'une thérapie ciblant ARF1 pourrait également s'appliquer à d'autres types de cancers, tels que les cancers de la prostate, des poumons, du pancréas et du côlon. En effet, comme ces cancers forment, au même titre que celui du sein, des carcinomes invasifs pro-métastatiques en fonction du niveau d'expression et d'activation d'ARF1, notre entité d'intérêt pourrait également moduler la progression de la formation de tumeurs associées à d'autres cancers.

En résumé, à la lumière de cette étude, nous avons souligné l'importance de l'expression et de l'activation des petites GTPases telles qu'ARF1 dans la régulation de la migration, de la progression de l'EMT et de la prolifération dans la pathologie du cancer du sein. Nos résultats mettent en évidence que la modulation de l'état d'activation des petites GTPases par des systèmes de surexpression ou par le biais d'inhibiteurs pharmacologiques constitue une stratégie de choix en termes de thérapie anti-cancer du sein.

Conclusion

Nous avons clarifié au cours de cette étude que les cellules invasives du cancer du sein expriment de haut niveau d'expression et d'activation d'ARF1 et que cette dernière est essentielle pour le maintien de la migration, de la prolifération cellulaire, de même que pour la progression de l'EMT. De plus, nous avons défini qu'ARF1 contrôle ces événements biologiques en fonction de sa localisation intracellulaire et des conditions physiologiques de base des cellules cancéreuses.

Dans la présente étude, nous avons démontré pour la première fois qu'ARF1 est activée dans les cellules cancéreuses suivant la stimulation d'un RTK. En effet, nos données indiquent que dans les MDA-MB-231, ARF1 est activée rapidement et ce, de manière transitoire, suivant l'activation de l'EGFR. En respectant la fenêtre temporelle d'activation de notre GTPase d'intérêt, nous avons défini qu'ARF1 est indispensable pour l'activation de la voie PI3Kinase, une voie signalétique essentielle pour la survie des cellules, mais aussi pour la migration cellulaire. De plus, nous avons montré qu'ARF1 module l'activation de la voie PI3Kinase et non pas celle de MAPKinase, démontrant un rôle sélectif d'ARF1 dans les voies classiques de signalisation médiées par l'EGFR.

De plus, nous avons démontré au cours de la présente étude, que les ARF GEFs Cytohésine-1 et Cytohésine-2 constituent de nouvelles cibles moléculaires afin de moduler l'activation d'ARF1 dans les cellules invasives de cancer du sein. Nos résultats indiquent, qu'au même titre qu'ARF1, que ces ARF GEFs sont fortement exprimées dans les cellules invasives de cancer du sein. De plus, nous démontrons pour la première fois que Cytohésine-1 et Cytohésine-2 contrôlent la migration et la progression de l'EMT des cellules tumorales associées au cancer du sein.

Nous avons également démontré que le LM11 constitue un outil pharmacologique puissant dans l'étude des rôles physiopathologiques d'ARF1 et de Cytohésine-2. L'avantage majeur de ce composé est la préservation des niveaux endogènes de nos protéines d'intérêt. Ainsi, à des concentrations non cytotoxique, le traitement des MDA-

MB-231 avec le LM11 a permis de confirmer que Cytohésine-2 est nécessaire à l'activation d'ARF1, de même qu'à la migration cellulaire des cellules cancéreuses.

Par ailleurs, nos données démontrent, qu'en conditions basales ou en absence de stimuli, qu'ARF1 contrôle les phénomènes de prolifération et de progression de l'EMT.

Nous avons également mis en évidence qu'ARF1 a la capacité de se relocaliser au noyau et d'associer la protéine pRb aux sites de régulation d'E2F1 dans la chromatine et d'ainsi moduler, selon son état d'activation, l'association de ces protéines essentielles à la progression du cycle cellulaire. De plus, par la compréhension de cette nouvelle fonction endogène d'ARF1, nous avons conclu que lorsque cette GTPase ne parvient pas à être activée, celle-ci engage un arrêt soutenu de la prolifération, plus spécifiquement l'entrée des cellules en sénescence.

L'ensemble de nos travaux nous a permis de définir le rôle moléculaire d'ARF1 dans divers processus biologiques impliqués dans la physiopathologie du cancer du sein. Nos résultats soulignent l'importance de l'étude des petites GTPases et l'impact du débalancement de leur état d'activation et d'expression dans le cancer. Ainsi, la découverte de nouvelles cibles moléculaires permettra l'élaboration de nouvelles approches anti-cancer, afin d'améliorer le sort des patients atteints de cette maladie mortelle.

Perspectives

1-La double fonction d'ARF1. Tel que mentionné ci-haut, pRb contrôle l'expression de Cadhérine-E via AP-2 α . En lien avec notre modèle d'ARF1, il serait d'intérêt de déterminer le rôle d'ARF1 dans la dynamique d'interaction entre pRb et AP-2 α , afin d'expliquer la perte d'expression de la Cadhérine-E dans les MCF7 dans des conditions de surexpression d'ARF1 (Boulay et al., 2011, en préparation). De plus, par des essais de ChIP, nous pourrions vérifier si notre protéine d'intérêt associe le promoteur d'AP-2 α dans les conditions prolifératives requises pour qu'ARF1 interagisse avec les gènes régulés par pRb/E2F1 (Boulay et al., 2011, sous presse).

2-L'importance d'ARF3 et ARF4 dans la prolifération. Comme ARF1 et ARF3 partagent 96% d'homologie de séquence et les mêmes ARF GEFs au Golgi, soit GBF1, BIG1, BIG2, de même que Cytohésine-2/ARNO à la membrane plasmique, il serait important d'effectuer la caractérisation moléculaire de ces isoformes dans les MDA-MB-231 et d'examiner leurs rôles dans les mêmes phénomènes biologiques étudiés avec ARF1. Kahn et ses collaborateurs ont démontré que la suppression d'expression de chacune des ARFs, individuellement, n'altère pas l'intégrité de la structure du Golgi, mais que la combinaison de la suppression d'expression d'ARF1 et ARF4 promeut le désassemblage de l'appareil de Golgi, incluant la dissociation des cotaomères COPI du Golgi [258]. Il serait intéressant d'étudier le même phénomène de complémentation dans les processus biologiques et moléculaires médiés ou non par l'EGFR, tel qu'investigué avec ARF1. De plus, il serait judicieux d'étudier les profils d'expression et d'activation d'ARF3 et d'ARF4 dans les cellules invasives et non invasives du cancer du sein.

3- Caractériser le rôle d'ARF1 in vivo dans le développement de tumeurs et dans la formation des métastases. Dans l'optique de produire une lignée de cancer du sein exprimant de manière stable un shRNA inducible couplé à une GFP (*Green Fluorescent Protein*) ciblé contre ARF1, nous effectuerons des essais de formation de tumeurs dans le modèle murin athymique. De plus, nous utiliserons la technologie de la bioluminescence

afin de localiser les tumeurs positives pour le shRNA-GFP et ainsi évaluer l'effet de la suppression d'ARF1 dans la formation de métastases.

Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier le rôle d'ARF1 *in vivo* dans le développement des tumeurs au niveau des glandes mammaires. À ce jour, il existe certains modèles murins transgéniques utilisés pour l'étude du cancer du sein. En effet, l'un des modèles les plus caractérisés est celui représentant le cancer du sein positif pour HER2/ErbB2. Brièvement, il s'agit d'un modèle murin transgénique dont l'expression d'ARF1 serait sous le contrôle d'un promoteur inductible et serait généré de la manière suivante. Nous utiliserions un modèle murin MMTV-*neu*, où l'expression de l'oncogène *neu* (*erbB2*) est sous le contrôle transcriptionnel de la région LTR (*Long term repeat*) du MMTV (*Mouse mammary tumor virus*). Cependant, nous aurions besoin de modifier le vecteur cible de sorte à insérer une séquence d'induction du gène *neu* par l'ajout de séquence loxP, flanquant une cassette de néomycine, en aval du gène *neu*, empêchant ainsi l'expression d'ErbB2 en absence de la recombinaison Cre et ce, dans le but d'éviter la mort des cellules embryonnaires des souris provoquée par l'oncogène *erbB2*. Ainsi, par le biais d'un croisement entre un animal MMT-Cre avec un second animal porteur d'un vecteur cible dont le gène *arf1* est bordé par des séquences loxP, permettra de générer une lignée murine ARF1^{KO}, où la protéine ARF1 sera absente de l'épithélium mammaire. Ainsi, lorsque la recombinaison Cre sera présente, la formation des tumeurs débutera également par l'activation de l'oncogène *erbB2* et nous serions en mesure d'évaluer si l'expression d'ARF1 parvient à inhiber ou non, la croissance des tumeurs dans les glandes mammaires. De plus, la force de ce système réside dans le fait que l'altération d'expression d'ARF1 s'effectuera dans les cellules luminales mammaires, puisqu'à la base, le système MMTV-*neu* produit spécifiquement des tumeurs dans ce type de cellules [356]. De plus, nous pourrions envisager de tester uniquement le modèle ARF1^{KI} en absence de la recombinaison Cre. Cependant, afin de déterminer si ARF1 est impliquée seulement dans un contexte tumoral, nous effectuerons au préalable des analyses du développement des glandes mammaires dans les mêmes conditions expérimentales élaborées ci-haut.

4- Évaluer les niveaux d'expression d'ARF1 dans des tissus humains. Par le biais de la technologie du Tissu Micro-Array (TMA), nous investiguerons le niveau d'expression d'ARF1 dans plusieurs types de cancer du sein afin de définir l'importance de son expression aux stades précoces et avancés de la maladie. De plus, la détection d'ARF1 dans diverses tumeurs nous renseignera également sur l'expression d'ARF1 selon les composantes de l'épithélium mammaire : cellules myoépithéliales, ductales ou luminales, en plus des types de cellules composant le stroma. À partir des résultats obtenus en modèle cellulaire, nous pouvons affirmer qu'ARF1 est exprimé à différent niveau selon le caractère invasif, non invasif ou normal des cellules à l'étude. Ainsi, nous devrions observer un niveau d'expression de base dans des biopsies composées de tissu épithélial mammaire sain, mais y détecter une augmentation d'expression dans les cellules tumorales et ce, en fonction du grade et de l'agressivité des tumeurs.

5- Le mécanisme moléculaire du recrutement membranaire des Cytohésines. Le recrutement des Cytohésines à la membrane est un événement limitant dans l'activation des ARFs. Les protéines d'échaffaudages CNK1, IPCEF, GRASP et CYTIP associent le domaine PH des Cytohésines et favorisent le recrutement de ces dernières à la membrane plasmique. Tel que cité plus haut, CNK1 est hautement exprimée dans les cellules invasives de cancer du sein telles que les MDA-MB-231. Le phénomène inverse est observé dans les cellules non invasives comme les MCF7, soit la même situation observée avec les Cytohésines 1 et 2. Il a été démontré que CYTIP associe de manière constitutive Cytohésine-1 dans les cellules de lymphocytes T. Ainsi, il serait important de vérifier l'expression de CYTIP dans notre modèle de cancer du sein et d'en caractériser sa dynamique d'interaction avec la forme endogène de Cytohésine-1. De plus, il serait intéressant d'intégrer cette protéine d'interaction à notre modèle d'association Cytohésine-1/EGFR. En parallèle, nous pourrions également étudier l'importance de l'expression d'IPCEF et de GRASP dans la capacité de Cytohésine-1 à associer l'EGFR, où ces deux protéines d'échaffaudage sont connues pour faciliter le recrutement de Cytohésine-2 à la membrane plasmique.

6- Le complexe d'interaction ARF1/pRb. Afin de mieux comprendre le mécanisme d'interaction entre ARF1 et pRb, nous déterminerons le motif d'interaction protéine-protéine dans la séquence d'ARF1. Il est connu que la majorité des partenaires d'interaction de pRb possèdent le motif LxCxE, mais hélas, ce motif est absent dans la séquence d'ARF1. De manière intéressante, il a été montré que le résidu tyrosine 35 d'ARF1 est responsable de la formation d'homodimères d'ARF1. Ainsi, comme les interfaces de dimérisation permettent également la formation d'hétérodimères, tels qu'observés chez les RTKs, le résidu tyrosine 35 d'ARF1 pourrait donc permettre à ARF1 sous sa forme dimérique d'interagir avec pRb. Par la synthèse d'un mutant ARF1Y35F, nous serons en mesure de clarifier si cette l'interface de dimérisation d'ARF1 est importante pour l'association d'ARF1 avec d'autres protéines, comme pRb.

7- Le rôle d'ARF1 dans le complexe d'interaction EGFR/Grb2. Nos données préliminaires suggèrent que la suppression d'ARF1 inhibe l'interaction Grb2/EGFR et à l'inverse, l'inhibition d'expression de Grb2 bloque l'activation d'ARF1 (Annexe II, figures 53 et 54, respectivement) et par conséquent, son recrutement au récepteur. Ainsi, une protéine adaptatrice, comme Grb2, contrôlerait l'interaction ARF1/EGFR et, réciproquement. Les ARFs agiraient donc de concert avec les protéines adaptatrices afin de permettre la transduction signalétique. Aucune évidence ne démontre qu'ARF6 interagisse avec une protéine adaptatrice de type Grb2, Gab1 ou autre, tandis que nos données préliminaires soulèvent un rôle original pour ARF1. Ainsi, il serait intéressant de caractériser l'association EGFR/Grb2 notamment dans des conditions de surexpression des formes mutantes d'ARF1 dans le but de définir si l'état d'activation d'ARF1 est nécessaire à l'interaction EGFR/Grb2. De plus, il serait d'intérêt de définir si l'expression de Grb2 est importante pour le recrutement de Cytohesine-1 au récepteur afin de moduler l'activation d'ARF1.

Annexe I

Les protéines ARF : Interrupteurs moléculaires de la prolifération des tumeurs et de la formation des métastases

(publié dans le journal: Médecine/Science (Paris)
25:783-5 Octobre 10, 2009)

Pierre-Luc Boulay et Audrey Claing

Université de Montréal, Département de pharmacologie, CP 6128,
Succursale Centre-ville, Montréal (Québec), H3C 3J7 Canada.

Contribution des auteurs :

PLB : Conceptualisation du projet d'écriture

AC : Conceptualisation du projet d'écriture

Le cancer du sein est la forme de cancer la plus fréquente chez la femme. Le haut niveau d'expression et/ou d'activation de plusieurs récepteurs à activité tyrosine kinase comme le récepteur du facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor receptor : EGFR) est une caractéristique des cancers invasifs, dit agressifs, et également l'indication d'un mauvais pronostic. Afin de former des métastases, les cellules cancéreuses doivent pouvoir migrer (Figure 48). Ce processus implique l'activation de plusieurs voies de signalisation qui vont induire un remodelage du cytosquelette d'actine. Plusieurs protéines

intracellulaires régissent la prolifération, la migration et la capacité invasive des cellules cancéreuses. L'oncogène *RAS* est l'un des gènes les plus importants dans l'apparition des cancers puisqu'environ 20 à 30 % des tumeurs possèdent une mutation pour cette protéine G monomérique [3]. La superfamille des Ras se divise en 6 groupes : Ras, Rho, Rab, Ran, Rad et ARF [4]. En particulier, le rôle des protéines ARF (ADP-ribosylation factors) dans cette réponse cellulaire est maintenant reconnu [1, 2]. Nous avons donc émis l'hypothèse que les ARF sont des facteurs importants facilitant la migration cellulaire stimulée par l'EGF et par conséquent, des protéines clés dans la progression du cancer.

Les GTPases de la famille des ARF

Six gènes encodent les protéines ARF (1 à 6). Les isoformes ARF1 à ARF5 sont principalement localisées dans l'appareil de Golgi ; ARF6 est associée à la membrane plasmique et est présente dans les compartiments endosomaux [1]. ARF6 activée agit comme interrupteur moléculaire pour déclencher, entre autres, le remodelage de l'actine, un processus important pour la formation de lamellipodes et d'invadopodes (structures qui confèrent aux cellules des capacités migratoires et invasives). Au cours d'une première étape, nous avons établi qu'ARF6 est surexprimée dans des lignées cellulaires de cancer du sein hautement invasives [5]. Des arguments récents ont suggéré qu'ARF1, l'isoforme typiquement localisé dans l'appareil de Golgi, pourrait également être associé à la membrane plasmique [6]. Nous nous sommes donc employés à vérifier ensuite si ARF1 était elle aussi surexprimée dans les cellules cancéreuses et si elle pouvait être associée à la membrane plasmique. Nous avons montré que tout comme ARF6, ARF1 était présente en grande quantité dans les lignées hautement invasives et qu'en plus d'être localisée dans l'appareil de Golgi, cette isoforme cohabitait avec l'actine dans les ondulations dynamiques membranaires [5].

La protéine ARF1 : un interrupteur moléculaire qui régit la prolifération et la migration cellulaires

Par le biais de l'interférence à l'ARN et de la surexpression d'un mutant inactif d'ARF1, nos travaux récents montrent que cette isoforme d'ARF contribue à la progression du cancer en influençant la migration et la croissance cellulaires. En effet, la réduction de l'expression endogène d'ARF1 et la surexpression de son mutant inactif (ARF1T31N) entraînent une inhibition du processus de transmigration à travers un filtre microporeux et de la croissance de cellules MDA-MB-231 stimulées par l'EGF [5]. Parce qu'ARF1 associée à l'appareil de Golgi joue un rôle très important dans la voie de sécrétion, nous avons d'abord vérifié que le récepteur de l'EGF était fonctionnel et ancré à la membrane plasmique dans notre modèle expérimental. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la déplétion d'ARF1 seule n'a pas modifié la capacité du récepteur de l'EGF à être orientée vers les membranes plasmiques, à être activée et à stimuler la voie mitogénique Erk [5]. Cependant, lorsque nous avons examiné l'activation de la voie PI3K, nous avons remarqué une inhibition spécifique de l'activation de cette cascade de signalisation assurant la survie cellulaire, processus essentiel pour la progression du cancer. L'activation de la PI3K permet la transformation des phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphates (PIP2) en phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphates (PIP3), ce qui produit l'activation de Akt, une enzyme importante pour la survie cellulaire. Ainsi, nous avons démontré qu'en l'absence d'ARF1, l'activation de la PI3K est affectée puisque le recrutement même de la sous-unité régulatrice de la PI3K (p85 α) à l'EGFR ainsi que la translocation de la sous-unité catalytique (p110 α) à la membrane sont inhibés. En contrepartie, l'activation d'ARF6 demeure nécessaire à l'activation de la voie mitogénique (Erk) [5]. Ces résultats cumulés permettent donc d'attribuer un rôle d'interrupteur moléculaire aux petites GTPases ARF1 et ARF6 : ARF1 déclenche l'activation de la voie PI3K et ARF6 est importante pour la voie MAPK (Figure 49) [5, 7].

Un potentiel thérapeutique intéressant

Dans un contexte d'approche thérapeutique, la génération de composés pharmacologiques ciblant spécifiquement l'activation des protéines ARF pourrait être efficace pour enrayer la prolifération et la migration aberrantes des cellules cancéreuses. Ainsi, la détection des

facteurs d'échanges responsables de l'activation d'ARF1 est primordiale. Bien qu'au total on dénombre 15 ARF GEF (guanine nucleotide exchange factor) et 24 ARF GAP (GTPase activating protein) [8, 9], de récents résultats suggèrent qu'ARF6 est activée par le recrutement de BRAG2/ GEP100 au niveau de l'EGFR [10]. Cette ARF GEF interagit directement avec les résidus tyrosine 1068/1086 et, par la suite, permet la liaison du GTP sur ARF6. Déjà, certains inhibiteurs non compétitifs ont été mis au point. Par exemple, le LM11, qui s'intercale entre ARF1 et ARNO (ARF GEF spécifique d'ARF6 et ARF1), empêche l'activation de la GTPase. Des études portant sur le processus migratoire indiquent que le LM11 bloque la migration des cellules MDCK (Madin-Darby canine kidney) de façon ARNO dépendante et affecte la localisation d'ARF1 dans l'appareil de Golgi [11]. Ces derniers résultats suggèrent donc qu'il existe un potentiel thérapeutique intéressant en vue de la création de composés inhibiteurs des ARF pour le traitement du cancer du sein.

[ARF proteins: molecular switches controlling tumour proliferation and metastasis]

CONFLIT D'INTÉRÊTS : Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

Figures

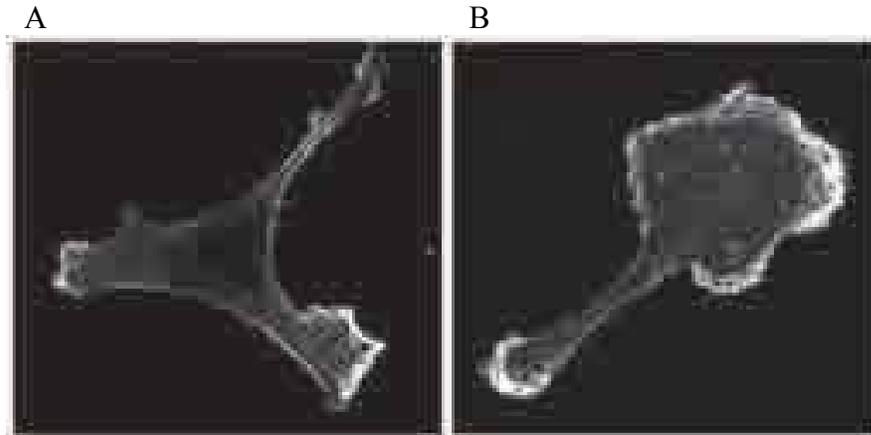


Figure 48: L'activation du récepteur à l'EGF induit la migration des cellules du cancer du sein.

Les cellules MDA-MB-231 non stimulées (**A**) et stimulées par l'EGF (**B**) ont été fixées et incubées avec la phalloïdine couplée à l'Alexa-Fluor 488 afin de marquer l'actine. La stimulation de l'EGF produit l'extension cellulaire et la formation d'un lamellipode.

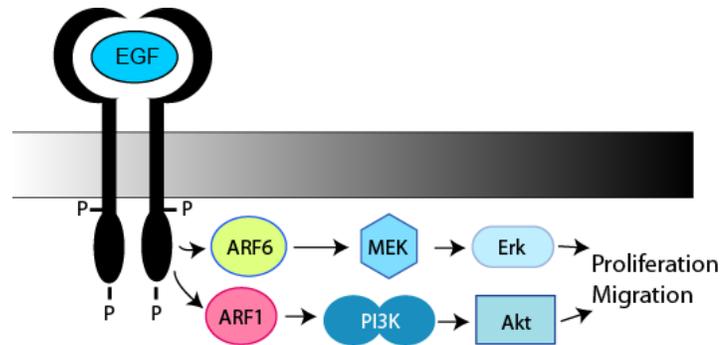


Figure 49 : Rôles cellulaires de ARF1 et ARF6.

Les GTPases ARF1 et ARF6 régissent la migration et la prolifération cellulaires stimulées par le récepteur de l'EGF. ARF1 permet l'activation de la voie PI3K/Akt, tandis qu'ARF6 assure l'activation de la voie mitogénique des MAPK avec les intermédiaires Ras, Raf, MEK et Erk.

RÉFÉRENCES

1. D'Souza-Schorey C, Chavrier P. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006 ; 7: 347-58.
2. Cotton M, Boulay PL, Houndolo T, et al. Endogenous ARF6 interacts with Rac1 upon angiotensin II stimulation to regulate membrane ruffling and cell migration. *Mol Biol Cell* 2007 ; 18 : 501-11.
3. Malaney S, Daly RJ. The ras signaling pathway in mammary tumorigenesis and metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001 ; 6 : 101-13.
4. Oxford G, Theodorescu D. Ras superfamily monomeric G proteins in carcinoma cell motility. *Cancer Lett* 2003 ; 189 : 117-28.
5. Boulay PL, Cotton M, Melancon P, Claing A. ADPribosylation factor 1 controls the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway to regulate epidermal growth factor-dependent growth and migration of breast cancer cells. *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 36425-34.
6. Cohen LA, Honda A, Varnai P, et al. Active Arf6 recruits ARNO/cytohesin GEFs to the PM by binding their PH domains. *Mol Biol Cell* 2007 ; 18 : 2244-53.
7. Tague SE, Muralidharan V, D'Souza-Schorey C. ADP ribosylation factor 6 regulates tumor cell invasion through the activation of the MEK/ERK signalling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 9671-6.
8. Casanova JE. Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors. *Traffic* 2007 ; 8 : 1476-85.

9. Inoue H, Randazzo PA. Arf GAPs and their interacting proteins. *Traffic* 2007 ; 8 : 1465-75.
10. Morishige M, Hashimoto S, Ogawa E, et al. GEP100 links epidermal growth factor receptor signalling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion. *Nat Cell Biol* 2008 ; 10 : 85-92.
11. Viaud J, Zeghouf M, Barelli H, et al. Structure-based discovery of an inhibitor of Arf activation by Sec7 domains through targeting of protein-protein complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 10370-5

Annexe II

Dans cette présente section, quelques résultats non publiés seront exposés. Ceux-ci viennent appuyer certaines explications mentionnées dans le chapitre V : Discussion. Une brève explication de même qu'une légende descriptive seront jointes pour chacune des figures indiquées.

Tel que mentionné à la section 1.7.5.1.2 du Chapitre I, les Cytohésines 1 et 2 peuvent associer des phospholipides membranaires spécifiques, comme le $\text{PIP}(4,5)_2$ et/ou le $\text{PIP}(3,4,5)_3$. À l'inverse, les Cytohésines 3 et 4 ne démontrent que de l'affinité pour le PIP_3 . Ainsi, tel que démontré à la figure 50, en inhibant la synthèse du $\text{PIP}(3,4,5)_3$, par le biais d'un inhibiteur de l'activité de la PI3Kinase, soit le LY294002, nous avons démontré que l'activation d'ARF1 n'est pas dépendante de l'activation de la PI3Kinase et par conséquent, de la présence du $\text{PIP}(3,4,5)_3$. À la suite de ces résultats, nous avons donc affirmé que seules les Cytohésines 1 et 2 étaient potentiellement impliquées dans l'activation d'ARF1. Ainsi, nous avons démontré que ces deux ARF GEFs sont nécessaires à l'activation d'ARF1, tel que décrit au cours du Chapitre IV.

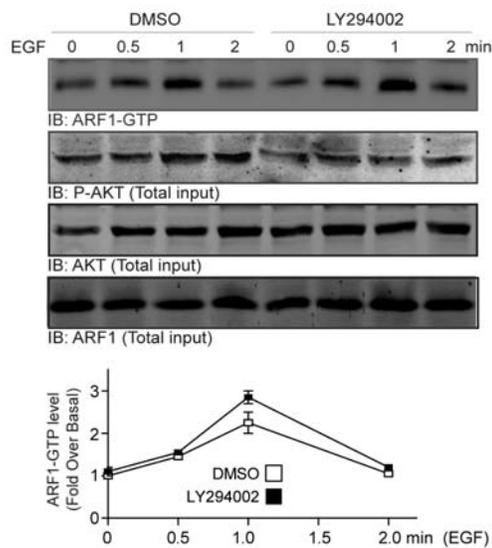


Figure 50: The activation of ARF1 is unaffected by PI3Kinase inactivation.(A) MDA-MB-231 cells were serum starved for 4 hh, pretreated with LY294002 (15 μM) for 30 min and then stimulated with EGF (10 ng/ml) for indicated times. ARF1-GTP levels as well as endogenous ARF1, phospho-AKT and AKT were detected by Western blotting using specific antibodies. Quantifications are the mean \pm SEM of 3 independent experiments.

L'une des étapes initiales de la transduction signalétique des RTKs est la phosphorylation des résidus tyrosine localisés dans la portion cytoplasmique du récepteur. Ainsi, nous avons étudié le rôle du résidu Y845 de l'EGFR, dont la phosphorylation dépend de l'activation de Src, sur l'activation d'ARF1. Tel qu'illustré à la figure 51, nous avons transfecté, dans les cellules MDA-MB-231, une forme sauvage (EGFR) ou mutante de l'EGFR (Y845F) dont le résidu Y845 a perdu de sa capacité à être phosphorylé. Nous avons donc conclu que la phosphorylation du résidu Y845 de l'EGFR est nécessaire à l'activation d'ARF1.

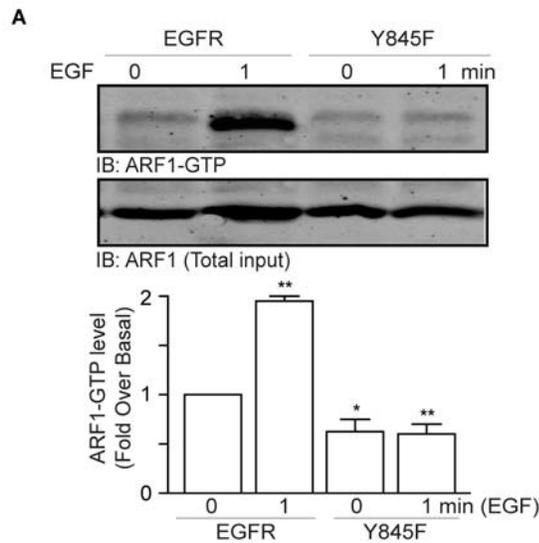


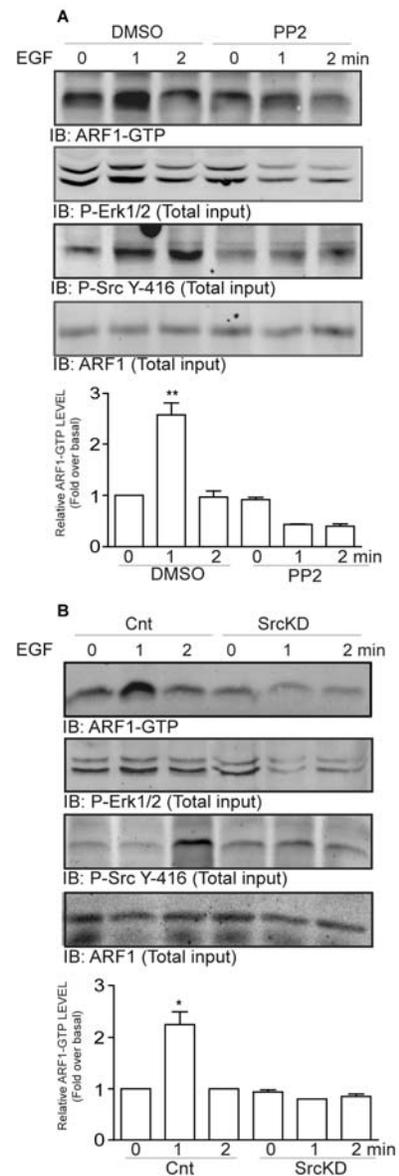
Figure 51: The phosphorylation of Y845 (EGFR) regulates the activation of ARF1.

MDA-MB-231 cells were transfected with EGFR or Y845F mutant, serum starved for 4 h, stimulated with EGF for 1 minute and then assessed for ARF1 activation assay. ARF1-GTP was detected by Western blot using specific anti-ARF1 antibody. These results are the mean \pm SEM of 4 independent experiments. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ are values compared to the paired control EGFR transfected condition.

L'activation du résidu Y845 de l'EGFR nécessite au préalable que Src soit activée. Dans le but de déterminer le rôle de l'activation de Src sur l'activation d'ARF1, nous avons procédé à deux approches, soit le traitement des MDA-MB-231 avec PP2, un l'inhibiteur endogène des membres de la famille Src, et la surexpression de la forme mutante de Src dont l'activité catalytique est abolie (SrcKD; Src Kinase Death). Ainsi, à l'aide de ces deux approches expérimentales, nous avons procédé à la mesure de l'activation d'ARF1 et ce, dans des conditions de stimulation du récepteur à l'EGF.

Figure 52: The activation of Src controls the activation of ARF1.

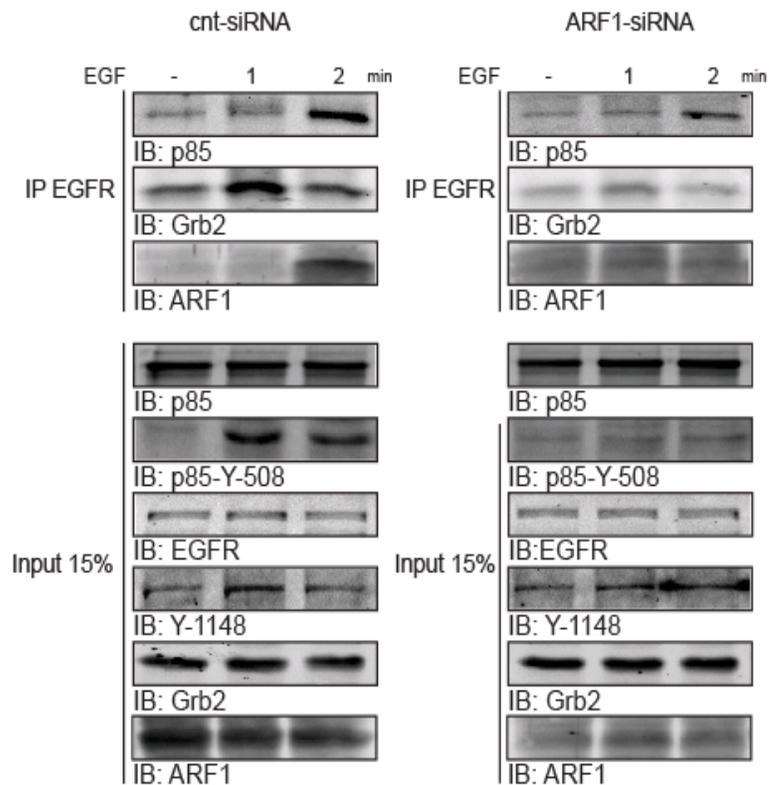
(A) MDA-MB-231 cells were serum starved for 4 h, pretreated with DMSO or PP2 (10 μ M) for 30 min) and then stimulated with EGF as indicated times and assessed for ARF1 activation assay. ARF1-GTP was detected by Western blot using specific anti-ARF1 antibody. (B) Cells were MDA-MB-231 cells were transfected with Src or SrcKD mutant, serum starved for 4 h, stimulated with EGF as indicated times and then assessed for ARF1 activation assay. ARF1-GTP was detected by Western blot using specific anti-ARF1 antibody. For all experiments, phospho-ERK1/2 and phospho-Src (Y416) were detected using specific antibodies. These results are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. **P<0.01, *P<0.05 are values compared to the paired control condition.



Dans la présente illustration (Figure 53), nous avons souligné l'importance des analyses supplémentaires effectuées au cours des études de recrutement de la sous-unité régulatrice p85 α au récepteur à l'EGF dans des conditions normales et, également, dans des conditions où l'expression endogène d'ARF1 fut réprimée (résultats présentés à la figure 19 du Chapitre II). En effet, nous rajoutons ici, à la figure 53, que la dynamique d'interaction de la protéine adaptatrice Grb2 au récepteur à l'EGF est dépendante de l'expression d'ARF1. De plus, nous démontrons qu'ARF1 est également recrutée à l'EGFR après 2 minutes de stimulation à l'EGF. Ainsi, ces résultats laissent entrevoir la possibilité que l'activation d'ARF1 soit impliquée dans le recrutement de Grb2 au récepteur, considérant que l'abolition de l'expression d'ARF1 élimine préférentiellement la forme d'ARF1 liée au GTP.

Figure 53: Role of ARF1 and the recruitment of PI3K.

MDA-MB-231 cells were transfected with a scrambled (cnt) or ARF1 siRNA, serum starved 16 h and stimulated or not with EGF (0, 1, 2 min). Endogenously expressed EGFR were immunoprecipitated using the anti-EGFR antibody and associated p85 α , Grb2 and ARF1 were examined by Western blotting using specific antibodies. Input represent 15% of the total cell lysate. Data are the mean \pm SEM of 4 experiments.



Dans le même ordre d'idée que les résultats présentés à la figure 53, nous démontrons ici, à la figure 54, que l'activation d'ARF1 est dépendante de l'expression de Grb2 et ce, tant en condition basale (non stimulée) que stimulée à l'EGF. Ce résultat suggère donc que Grb2 assure le recrutement d'une ou plusieurs ARF GEFs à la membrane plasmique et/ou à l'EGFR, afin de médier l'activation d'ARF1. En continuité avec les résultats présentés à la figure 53, nos données proposent donc que ces deux protéines doivent vraisemblablement s'associer à l'état basal afin de maintenir mutuellement leur fonction de protéine transductrice du signal depuis l'activation de l'EGFR.

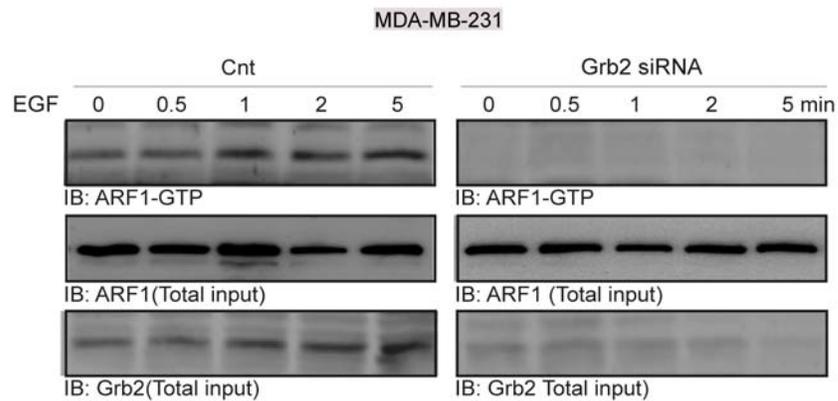


Figure 54: The expression of Grb2 is essential for the activation of ARF1.

MDA-MB-231 cells were transfected with scrambled siRNA (cnt) or Grb2 siRNA (50 μ M, 48 h), serum starved for 4 h, stimulated with EGF as indicated times and assessed for ARF1 activation assay. ARF1-GTP was detected by Western blot using specific anti-ARF1 antibody. Knockdown of Grb2 was monitored using specific anti-Grb2 antibody. These results are the mean \pm SEM of 2 independent experiments.

Au cours de l'étude présentée dans le Chapitre III, nous avons décrit que la forme inactive d'ARF1 promeut l'activation de pRb (hypophosphorylation de pRb) et l'association constitutive entre ARF1 et pRb. Ainsi, afin de déterminer une nouvelle protéine candidate d'intérêt dans le rôle d'ARF1 dans la prolifération, nous avons opté pour l'ARF GAP, GIT1 (une brève description de cette ARF GAP est présentée à la section 1.7.5.2 du Chapitre I). Ainsi, nous avons démontré que la surexpression de la forme sauvage de GIT1 promeut l'association constitutive entre ARF et pRb (Figure 55A) et l'inactivation d'ARF1 (Figure 55B). De plus, nous avons montré que la forme mutante R39A, où cette forme de GIT1 ne possède pas d'activité GAP, induit donc l'activation d'ARF1. Ces données démontrent que GIT1 constitue une nouvelle cible moléculaire permettant de contrôler l'activité d'ARF1 dans les cellules invasives du cancer du sein.

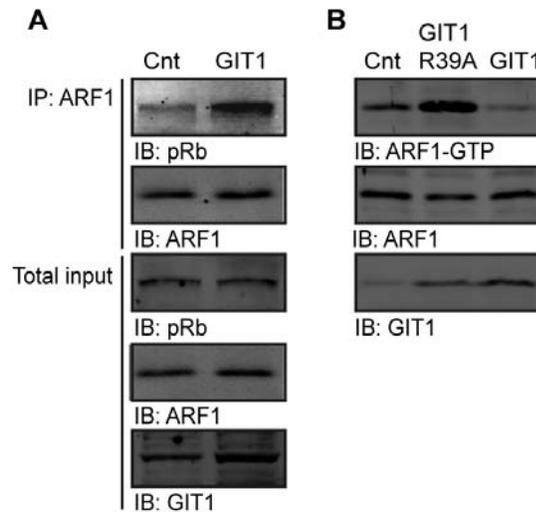


Figure 55: The association of ARF1 and pRB is regulated by GIT1.

(A) MDA-MB-231 cells were transfected with emptyvector or GIT1 and were left in normal serum condition. Endogenous ARF1 was immunoprecipitated and interacting pRB was detected using Western Blot analysis. This experiment is representative of 2 others. (B) Cells were transfected with empty vector, GIT1R39A or GIT1. ARF1-GTP levels were detected by Western blotting using a specific anti-ARF1 antibody. This result is representative of 2 others.

Références

1. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
2. Sims, A.H., et al., *Origins of breast cancer subtypes and therapeutic implications*. Nat Clin Pract Oncol, 2007. **4**(9): p. 516-25.
3. Karn, T., et al., *Gene expression profiling of luminal B breast cancers reveals NHERF1 as a new marker of endocrine resistance*. Breast Cancer Res Treat, 2011.
4. Podo, F., et al., *Triple-negative breast cancer: present challenges and new perspectives*. Mol Oncol, 2010. **4**(3): p. 209-29.
5. Oakes, S.R., et al., *Prolactin regulation of mammary gland development*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2008. **13**(1): p. 13-28.
6. Han, Y., et al., *JAK2 and STAT5, but not JAK1 and STAT1, are required for prolactin-induced beta-lactoglobulin transcription*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(8): p. 1180-8.
7. Harris, T.J. and F. McCormick, *The molecular pathology of cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2010. **7**(5): p. 251-65.
8. Zhang, H., et al., *ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies*. J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2051-8.
9. Linggi, B. and G. Carpenter, *ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(12): p. 649-56.
10. Sibilia, M., et al., *Mice humanised for the EGF receptor display hypomorphic phenotypes in skin, bone and heart*. Development, 2003. **130**(19): p. 4515-25.
11. Iwamoto, R., et al., *Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(6): p. 3221-6.
12. Jackson, L.F., et al., *Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling*. EMBO J, 2003. **22**(11): p. 2704-16.
13. Park, J.Y., et al., *EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle*. Science, 2004. **303**(5658): p. 682-4.
14. Sasaki, H., et al., *L858R EGFR mutation status correlated with clinico-pathological features of Japanese lung cancer*. Lung Cancer, 2006. **54**(1): p. 103-8.
15. Ji, H., et al., *The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in vivo sensitivity to EGFR-targeted therapies*. Cancer Cell, 2006. **9**(6): p. 485-95.
16. Wong, A.J., et al., *Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(7): p. 2965-9.
17. Zhu, H., et al., *EGFR and EGFRvIII interact with PUMA to inhibit mitochondrial translocation of PUMA and PUMA-mediated apoptosis independent of EGFR kinase activity*. Cancer Lett, 2010. **294**(1): p. 101-10.

18. Tice, D.A., et al., *Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(4): p. 1415-20.
19. Dittmann, K., C. Mayer, and H.P. Rodemann, *Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity*. Radiother Oncol, 2005. **76**(2): p. 157-61.
20. Messersmith, W.A. and M. Hidalgo, *Panitumumab, a monoclonal anti epidermal growth factor receptor antibody in colorectal cancer: another one or the one?* Clin Cancer Res, 2007. **13**(16): p. 4664-6.
21. Nahta, R. and F.J. Esteva, *HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance*. Breast Cancer Res, 2006. **8**(6): p. 215.
22. Normanno, N., M.R. Maiello, and A. De Luca, *Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs): simple drugs with a complex mechanism of action?* J Cell Physiol, 2003. **194**(1): p. 13-9.
23. Kim, H.P., et al., *Lapatinib, a dual EGFR and HER2 tyrosine kinase inhibitor, downregulates thymidylate synthase by inhibiting the nuclear translocation of EGFR and HER2*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5933.
24. Schettino, C., et al., *Erlotinib: an EGF receptor tyrosine kinase inhibitor in non-small-cell lung cancer treatment*. Expert Rev Respir Med, 2008. **2**(2): p. 167-78.
25. Hsu, J.Y. and H.A. Wakelee, *Monoclonal antibodies targeting vascular endothelial growth factor: current status and future challenges in cancer therapy*. BioDrugs, 2009. **23**(5): p. 289-304.
26. Garrington, T.P. and G.L. Johnson, *Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(2): p. 211-8.
27. Johnson, G.L. and R. Lapadat, *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1911-2.
28. Cantwell-Dorris, E.R., J.J. O'Leary, and O.M. Sheils, *BRAFV600E: Implications for Carcinogenesis and Molecular Therapy*. Mol Cancer Ther, 2011. **10**(3): p. 385-94.
29. Prescott, J.D., et al., *The ETS transcription factor ESE-1 transforms MCF-12A human mammary epithelial cells via a novel cytoplasmic mechanism*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(12): p. 5548-64.
30. Pourtier-Manzanedo, A., et al., *Expression of an Ets-1 dominant-negative mutant perturbs normal and tumor angiogenesis in a mouse ear model*. Oncogene, 2003. **22**(12): p. 1795-806.
31. Murphy, L.C., S.V. Seekallu, and P.H. Watson, *Clinical significance of estrogen receptor phosphorylation*. Endocr Relat Cancer, 2011. **18**(1): p. R1-14.
32. Filardo, E.J., et al., *Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF*. Mol Endocrinol, 2000. **14**(10): p. 1649-60.
33. Prenzel, N., et al., *The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification*. Endocr Relat Cancer, 2001. **8**(1): p. 11-31.

34. Fukuhara, S., et al., *Signaling from G protein-coupled receptors to ERK5/Big MAPK 1 involves G α q and G α 12/13 families of heterotrimeric G proteins. Evidence for the existence of a novel Ras AND Rho-independent pathway.* J Biol Chem, 2000. **275**(28): p. 21730-6.
35. Terasawa, K., K. Okazaki, and E. Nishida, *Regulation of c-Fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway.* Genes Cells, 2003. **8**(3): p. 263-73.
36. Montero, J.C., et al., *Expression of Erk5 in early stage breast cancer and association with disease free survival identifies this kinase as a potential therapeutic target.* PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5565.
37. Rhee, S.G., *Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C.* Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 281-312.
38. Wells, A., et al., *Growth factor-induced cell motility in tumor invasion.* Acta Oncol, 2002. **41**(2): p. 124-30.
39. Chou, J., et al., *Distribution of gelsolin and phosphoinositol 4,5-bisphosphate in lamellipodia during EGF-induced motility.* Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(7): p. 776-90.
40. Condeelis, J., *How is actin polymerization nucleated in vivo?* Trends Cell Biol, 2001. **11**(7): p. 288-93.
41. Pollak, M., W. Beamer, and J.C. Zhang, *Insulin-like growth factors and prostate cancer.* Cancer Metastasis Rev, 1998. **17**(4): p. 383-90.
42. Miyake, H., et al., *Elevation of urokinase-type plasminogen activator and its receptor densities as new predictors of disease progression and prognosis in men with prostate cancer.* Int J Oncol, 1999. **14**(3): p. 535-41.
43. Chan, J.M., et al., *Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study.* Science, 1998. **279**(5350): p. 563-6.
44. Nishimura, K., et al., *Prostate stromal cell-derived hepatocyte growth factor induces invasion of prostate cancer cell line DU145 through tumor-stromal interaction.* Prostate, 1999. **41**(3): p. 145-53.
45. Manos, E.J., et al., *Dolichol-phosphate-mannose-3 (DPM3)/prost-in-1 is a novel phospholipase C-gamma regulated gene negatively associated with prostate tumor invasion.* Oncogene, 2001. **20**(22): p. 2781-90.
46. Ye, K., et al., *Phospholipase C gamma 1 is a physiological guanine nucleotide exchange factor for the nuclear GTPase PIKE.* Nature, 2002. **415**(6871): p. 541-4.
47. Cain, R.J. and A.J. Ridley, *Phosphoinositide 3-kinases in cell migration.* Biol Cell, 2009. **101**(1): p. 13-29.
48. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream.* Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
49. Zhao, J.J., et al., *The oncogenic properties of mutant p110alpha and p110beta phosphatidylinositol 3-kinases in human mammary epithelial cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(51): p. 18443-8.
50. Villunger, A., et al., *p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa.* Science, 2003. **302**(5647): p. 1036-8.

51. Sossey-Alaoui, K., et al., *WAVE3-mediated cell migration and lamellipodia formation are regulated downstream of phosphatidylinositol 3-kinase*. J Biol Chem, 2005. **280**(23): p. 21748-55.
52. Micalizzi, D.S., S.M. Farabaugh, and H.L. Ford, *Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010. **15**(2): p. 117-34.
53. Taylor, M.A., J.G. Parvani, and W.P. Schiemann, *The pathophysiology of epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor-beta in normal and malignant mammary epithelial cells*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010. **15**(2): p. 169-90.
54. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 721-32.
55. Pennacchietti, S., et al., *Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene*. Cancer Cell, 2003. **3**(4): p. 347-61.
56. Timpl, R. and J.C. Brown, *Supramolecular assembly of basement membranes*. Bioessays, 1996. **18**(2): p. 123-32.
57. Sternlicht, M.D. and Z. Werb, *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 463-516.
58. Pellikainen, J.M., et al., *Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(22): p. 7621-8.
59. Stacker, S.A., et al., *Lymphangiogenesis and cancer metastasis*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 573-83.
60. Friedl, P. and K. Wolf, *Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 362-74.
61. Iwai, K., et al., *Importance of E-selectin (ELAM-1) and sialyl Lewis(a) in the adhesion of pancreatic carcinoma cells to activated endothelium*. Int J Cancer, 1993. **54**(6): p. 972-7.
62. Matsuura, N., et al., *Induction of experimental bone metastasis in mice by transfection of integrin alpha 4 beta 1 into tumor cells*. Am J Pathol, 1996. **148**(1): p. 55-61.
63. Durieu-Trautmann, O., et al., *Intercellular adhesion molecule 1 activation induces tyrosine phosphorylation of the cytoskeleton-associated protein cortactin in brain microvessel endothelial cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(17): p. 12536-40.
64. Lyck, R., et al., *T-cell interaction with ICAM-1/ICAM-2 double-deficient brain endothelium in vitro: the cytoplasmic tail of endothelial ICAM-1 is necessary for transendothelial migration of T cells*. Blood, 2003. **102**(10): p. 3675-83.
65. Takahashi, K., et al., *Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein*. J Biol Chem, 1997. **272**(37): p. 23371-5.
66. Aoudjit, F. and K. Vuori, *Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-flip and implications for anoikis*. J Cell Biol, 2001. **152**(3): p. 633-43.

67. Wang, H., et al., *Tumor cell alpha3beta1 integrin and vascular laminin-5 mediate pulmonary arrest and metastasis*. J Cell Biol, 2004. **164**(6): p. 935-41.
68. Abdel-Ghany, M., et al., *Focal adhesion kinase activated by beta(4) integrin ligation to mCLCA1 mediates early metastatic growth*. J Biol Chem, 2002. **277**(37): p. 34391-400.
69. Schmidt-Kittler, O., et al., *From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7737-42.
70. Chiang, A.C. and J. Massague, *Molecular basis of metastasis*. N Engl J Med, 2008. **359**(26): p. 2814-23.
71. Gupta, G.P., et al., *Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis*. Nature, 2007. **446**(7137): p. 765-70.
72. Padua, D., et al., *TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4*. Cell, 2008. **133**(1): p. 66-77.
73. Guise, T., *Examining the metastatic niche: targeting the microenvironment*. Semin Oncol, 2010. **37 Suppl 2**: p. S2-14.
74. Viallard, J.F., et al., *[Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology]*. Cancer Radiother, 2001. **5**(2): p. 109-29.
75. Jiang, W., et al., *Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer*. Cancer Res, 1992. **52**(10): p. 2980-3.
76. Motokura, T., et al., *A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene*. Nature, 1991. **350**(6318): p. 512-5.
77. Schmidt, E.E., et al., *CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas*. Cancer Res, 1994. **54**(24): p. 6321-4.
78. Nobori, T., et al., *Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers*. Nature, 1994. **368**(6473): p. 753-6.
79. Kim, J.R., et al., *Alterations of CDKN2 (MTS1/p16INK4A) gene in paraffin-embedded tumor tissues of human stomach, lung, cervix and liver cancers*. Exp Mol Med, 1998. **30**(2): p. 109-14.
80. Huang, L.W., et al., *p53 and p21 expression in precancerous lesions and carcinomas of the uterine cervix: overexpression of p53 predicts poor disease outcome*. Gynecol Oncol, 2001. **83**(2): p. 348-54.
81. Liang, J., et al., *PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest*. Nat Med, 2002. **8**(10): p. 1153-60.
82. Carrano, A.C., et al., *SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(4): p. 193-9.
83. Sutterluty, H., et al., *p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(4): p. 207-14.
84. Ridley, A.J. and A. Hall, *The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors*. Cell, 1992. **70**(3): p. 389-99.
85. Kimura, K., et al., *Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)*. Science, 1996. **273**(5272): p. 245-8.

86. McAllister, S.S., et al., *Novel p27(kip1) C-terminal scatter domain mediates Rac-dependent cell migration independent of cell cycle arrest functions*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(1): p. 216-28.
87. Friend, S.H., et al., *A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma*. Nature, 1986. **323**(6089): p. 643-6.
88. Woo, M.S., I. Sanchez, and B.D. Dynlacht, *p130 and p107 use a conserved domain to inhibit cellular cyclin-dependent kinase activity*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(7): p. 3566-79.
89. Dingwall, C. and R.A. Laskey, *Nuclear targeting sequences--a consensus?* Trends Biochem Sci, 1991. **16**(12): p. 478-81.
90. Beijersbergen, R.L., et al., *Regulation of the retinoblastoma protein-related p107 by G1 cyclin complexes*. Genes Dev, 1995. **9**(11): p. 1340-53.
91. Cobrinik, D., *Pocket proteins and cell cycle control*. Oncogene, 2005. **24**(17): p. 2796-809.
92. Kennedy, B.K., et al., *Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells*. Genes Dev, 2000. **14**(22): p. 2855-68.
93. Sherr, C.J. and F. McCormick, *The RB and p53 pathways in cancer*. Cancer Cell, 2002. **2**(2): p. 103-12.
94. Beijersbergen, R.L., et al., *E2F-4, a new member of the E2F gene family, has oncogenic activity and associates with p107 in vivo*. Genes Dev, 1994. **8**(22): p. 2680-90.
95. Hijmans, E.M., et al., *E2F-5, a new E2F family member that interacts with p130 in vivo*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(6): p. 3082-9.
96. Sardet, C., et al., *E2F-4 and E2F-5, two members of the E2F family, are expressed in the early phases of the cell cycle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(6): p. 2403-7.
97. Clarke, A.R., et al., *Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development*. Nature, 1992. **359**(6393): p. 328-30.
98. Robanus-Maandag, E., et al., *p107 is a suppressor of retinoblastoma development in pRb-deficient mice*. Genes Dev, 1998. **12**(11): p. 1599-609.
99. Williams, B.O., et al., *Extensive contribution of Rb-deficient cells to adult chimeric mice with limited histopathological consequences*. EMBO J, 1994. **13**(18): p. 4251-9.
100. Kiyokawa, H., et al., *Suppression of cyclin-dependent kinase 4 during induced differentiation of erythroleukemia cells*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(11): p. 7195-203.
101. Cobrinik, D., et al., *Shared role of the pRB-related p130 and p107 proteins in limb development*. Genes Dev, 1996. **10**(13): p. 1633-44.
102. Lee, M.H., et al., *Targeted disruption of p107: functional overlap between p107 and Rb*. Genes Dev, 1996. **10**(13): p. 1621-32.
103. Claudio, P.P., et al., *Mutations in the retinoblastoma-related gene RB2/p130 in lung tumors and suppression of tumor growth in vivo by retrovirus-mediated gene transfer*. Cancer Res, 2000. **60**(2): p. 372-82.

104. Horowitz, J.M., et al., *Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(7): p. 2775-9.
105. Dyson, N., et al., *The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product*. Science, 1989. **243**(4893): p. 934-7.
106. Nevins, J.R., *Transcriptional regulation. A closer look at E2F*. Nature, 1992. **358**(6385): p. 375-6.
107. Nevins, J.R., *E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins*. Science, 1992. **258**(5081): p. 424-9.
108. La Thangue, N.B., *Histone deacetylase inhibitors and cancer therapy*. J Chemother, 2004. **16 Suppl 4**: p. 64-7.
109. Lee, J.O., A.A. Russo, and N.P. Pavletich, *Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7*. Nature, 1998. **391**(6670): p. 859-65.
110. Frolov, M.V. and N.J. Dyson, *Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 11): p. 2173-81.
111. Pidoux, A.L. and R.C. Allshire, *The role of heterochromatin in centromere function*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005. **360**(1455): p. 569-79.
112. Lachner, M., R.J. O'Sullivan, and T. Jenuwein, *An epigenetic road map for histone lysine methylation*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 11): p. 2117-24.
113. Fillingham, J., M.C. Keogh, and N.J. Krogan, *GammaH2AX and its role in DNA double-strand break repair*. Biochem Cell Biol, 2006. **84**(4): p. 568-77.
114. Downs, J.A., N.F. Lowndes, and S.P. Jackson, *A role for Saccharomyces cerevisiae histone H2A in DNA repair*. Nature, 2000. **408**(6815): p. 1001-4.
115. Cheung, W.L., et al., *Phosphorylation of histone H4 serine 1 during DNA damage requires casein kinase II in S. cerevisiae*. Curr Biol, 2005. **15**(7): p. 656-60.
116. Sanders, S.L., et al., *Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage*. Cell, 2004. **119**(5): p. 603-14.
117. Botuyan, M.V., et al., *Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair*. Cell, 2006. **127**(7): p. 1361-73.
118. Ling, C., et al., *A novel role for 14-3-3sigma in regulating epithelial cell polarity*. Genes Dev, 2010. **24**(9): p. 947-56.
119. Macdonald, N., et al., *Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3*. Mol Cell, 2005. **20**(2): p. 199-211.
120. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
121. Melcher, M., et al., *Structure-function analysis of SUV39H1 reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation, and mitotic progression*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(10): p. 3728-41.
122. Nakayama, J., et al., *Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly*. Science, 2001. **292**(5514): p. 110-3.
123. Bannister, A.J., et al., *Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 120-4.

124. Peters, A.H., et al., *Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability*. Cell, 2001. **107**(3): p. 323-37.
125. Narita, M., et al., *Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence*. Cell, 2003. **113**(6): p. 703-16.
126. Shi, Y., et al., *Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1*. Cell, 2004. **119**(7): p. 941-53.
127. Yamane, K., et al., *JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor*. Cell, 2006. **125**(3): p. 483-95.
128. Tsukada, Y. and Y. Zhang, *Purification of histone demethylases from HeLa cells*. Methods, 2006. **40**(4): p. 318-26.
129. Whetstine, J.R., et al., *Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases*. Cell, 2006. **125**(3): p. 467-81.
130. Fodor, B.D., et al., *Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells*. Genes Dev, 2006. **20**(12): p. 1557-62.
131. Shin, S. and R. Janknecht, *Diversity within the JMJD2 histone demethylase family*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **353**(4): p. 973-7.
132. Cloos, P.A., et al., *The putative oncogene GASCI demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3*. Nature, 2006. **442**(7100): p. 307-11.
133. Shi, Y. and J.R. Whetstine, *Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases*. Mol Cell, 2007. **25**(1): p. 1-14.
134. Sancar, A., et al., *Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 39-85.
135. Niculescu, A.B., 3rd, et al., *Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(1): p. 629-43.
136. Smits, V.A., et al., *p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint*. J Biol Chem, 2000. **275**(39): p. 30638-43.
137. Baus, F., et al., *Permanent cell cycle exit in G2 phase after DNA damage in normal human fibroblasts*. EMBO J, 2003. **22**(15): p. 3992-4002.
138. Harrington, E.A., et al., *pRB plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11945-50.
139. Donzelli, M., et al., *Dual mode of degradation of Cdc25 A phosphatase*. EMBO J, 2002. **21**(18): p. 4875-84.
140. Bartek, J. and J. Lukas, *Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(6): p. 738-47.
141. Hayflick, L., *THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS*. Exp Cell Res, 1965. **37**: p. 614-36.
142. Ben-Porath, I. and R.A. Weinberg, *The signals and pathways activating cellular senescence*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(5): p. 961-76.
143. Ben-Porath, I. and R.A. Weinberg, *When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence*. J Clin Invest, 2004. **113**(1): p. 8-13.
144. Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna, *Cellular senescence: when bad things happen to good cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 729-40.

145. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
146. Coppe, J.P., et al., *Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor*. PLoS Biol, 2008. **6**(12): p. 2853-68.
147. Funayama, R., et al., *Loss of linker histone H1 in cellular senescence*. J Cell Biol, 2006. **175**(6): p. 869-80.
148. Peterson, C.L. and M.A. Laniel, *Histones and histone modifications*. Curr Biol, 2004. **14**(14): p. R546-51.
149. Fedele, M., et al., *Critical role of the HMGA2 gene in pituitary adenomas*. Cell Cycle, 2006. **5**(18): p. 2045-8.
150. Taniguchi, K., et al., *Induction of the p16INK4a senescence gene as a new therapeutic strategy for the treatment of rheumatoid arthritis*. Nat Med, 1999. **5**(7): p. 760-7.
151. Liu, D. and P.J. Hornsby, *Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion*. Cancer Res, 2007. **67**(7): p. 3117-26.
152. Coppe, J.P., et al., *The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 99-118.
153. Hyafil, F., C. Babinet, and F. Jacob, *Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium*. Cell, 1981. **26**(3 Pt 1): p. 447-54.
154. Buxton, R.S. and A.I. Magee, *Structure and interactions of desmosomal and other cadherins*. Semin Cell Biol, 1992. **3**(3): p. 157-67.
155. Nollet, F., P. Kools, and F. van Roy, *Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members*. J Mol Biol, 2000. **299**(3): p. 551-72.
156. Gallin, W.J., *Evolution of the "classical" cadherin family of cell adhesion molecules in vertebrates*. Mol Biol Evol, 1998. **15**(9): p. 1099-107.
157. Jou, T.S., et al., *Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin-catenin complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 5067-71.
158. Pokutta, S., et al., *Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding*. Eur J Biochem, 1994. **223**(3): p. 1019-26.
159. Nose, A., K. Tsuji, and M. Takeichi, *Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules*. Cell, 1990. **61**(1): p. 147-55.
160. Blaschuk, O.W., et al., *Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence*. Dev Biol, 1990. **139**(1): p. 227-9.
161. Lampugnani, M.G., et al., *A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts*. J Cell Biol, 1992. **118**(6): p. 1511-22.
162. Takeichi, M., *Morphogenetic roles of classic cadherins*. Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(5): p. 619-27.
163. Zhu, W., B. Leber, and D.W. Andrews, *Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis*. EMBO J, 2001. **20**(21): p. 5999-6007.

164. Noe, V., et al., *Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 1): p. 111-118.
165. Fujita, Y., et al., *Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(3): p. 222-31.
166. Pece, S. and J.S. Gutkind, *E-cadherin and Hakai: signalling, remodeling or destruction?* Nat Cell Biol, 2002. **4**(4): p. E72-4.
167. Marambaud, P., et al., *A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations*. Cell, 2003. **114**(5): p. 635-45.
168. Yilmaz, M. and G. Christofori, *EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion*. Cancer Metastasis Rev, 2009. **28**(1-2): p. 15-33.
169. Dormann, D. and C.J. Weijer, *Chemotactic cell movement during development*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(4): p. 358-64.
170. Schneider, I.C. and J.M. Haugh, *Mechanisms of gradient sensing and chemotaxis: conserved pathways, diverse regulation*. Cell Cycle, 2006. **5**(11): p. 1130-4.
171. Condeelis, J., R.H. Singer, and J.E. Segall, *The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. **21**: p. 695-718.
172. Ridley, A.J., et al., *Cell migration: integrating signals from front to back*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1704-9.
173. Merlot, S. and R.A. Firtel, *Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 17): p. 3471-8.
174. Allen, W.E., et al., *A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis*. J Cell Biol, 1998. **141**(5): p. 1147-57.
175. Etienne-Manneville, S. and A. Hall, *Rho GTPases in cell biology*. Nature, 2002. **420**(6916): p. 629-35.
176. Daub, H., et al., *Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16*. J Biol Chem, 2001. **276**(3): p. 1677-80.
177. Cassimeris, L., *The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(1): p. 18-24.
178. Kaverina, I., O. Krylyshkina, and J.V. Small, *Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation*. J Cell Biol, 1999. **146**(5): p. 1033-44.
179. Peacock, J.G., et al., *The Abl-related gene tyrosine kinase acts through p190RhoGAP to inhibit actomyosin contractility and regulate focal adhesion dynamics upon adhesion to fibronectin*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(10): p. 3860-72.
180. Glaven, J.A., et al., *The Dbl-related protein, Lfc, localizes to microtubules and mediates the activation of Rac signaling pathways in cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(4): p. 2279-85.
181. Kwan, K.M. and M.W. Kirschner, *A microtubule-binding Rho-GEF controls cell morphology during convergent extension of Xenopus laevis*. Development, 2005. **132**(20): p. 4599-610.

182. 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*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18392-400.
183. Devreotes, P. and C. Janetopoulos, *Eukaryotic chemotaxis: distinctions between directional sensing and polarization*. J Biol Chem, 2003. **278**(23): p. 20445-8.
184. Srinivasan, S., et al., *Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis*. J Cell Biol, 2003. **160**(3): p. 375-85.
185. Welch, H.C., et al., *P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P3- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac*. Cell, 2002. **108**(6): p. 809-21.
186. Campbell, I.D. and M.H. Ginsberg, *The talin-tail interaction places integrin activation on FERM ground*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(8): p. 429-35.
187. Flevaris, P., et al., *A molecular switch that controls cell spreading and retraction*. J Cell Biol, 2007. **179**(3): p. 553-65.
188. Parsons, J.T., A.R. Horwitz, and M.A. Schwartz, *Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(9): p. 633-43.
189. Friedland, J.C., M.H. Lee, and D. Boettiger, *Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function*. Science, 2009. **323**(5914): p. 642-4.
190. Premont, R.T., et al., *The GIT/PIX complex: an oligomeric assembly of GIT family ARF GTPase-activating proteins and PIX family Rac1/Cdc42 guanine nucleotide exchange factors*. Cell Signal, 2004. **16**(9): p. 1001-11.
191. Cote, J.F. and K. Vuori, *GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways*. Trends Cell Biol, 2007. **17**(8): p. 383-93.
192. Sanz-Moreno, V., et al., *Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement*. Cell, 2008. **135**(3): p. 510-23.
193. Tomar, A., et al., *A FAK-p120RasGAP-p190RhoGAP complex regulates polarity in migrating cells*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 11): p. 1852-62.
194. Katsumi, A., et al., *Effects of cell tension on the small GTPase Rac*. J Cell Biol, 2002. **158**(1): p. 153-64.
195. Defilippi, P., P. Di Stefano, and S. Cabodi, *p130Cas: a versatile scaffold in signaling networks*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(5): p. 257-63.
196. Polte, T.R. and S.K. Hanks, *Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crk-associated substrate (p130(Cas)) are elevated in cytoskeleton-associated fractions following adhesion and Src transformation. Requirements for Src kinase activity and FAK proline-rich motifs*. J Biol Chem, 1997. **272**(9): p. 5501-9.
197. Schlaepfer, D.D. and T. Hunter, *Focal adhesion kinase overexpression enhances ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src*. J Biol Chem, 1997. **272**(20): p. 13189-95.
198. Schlaepfer, D.D., et al., *Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase*. Nature, 1994. **372**(6508): p. 786-91.
199. Jaffe, A.B. and A. Hall, *Rho GTPases: biochemistry and biology*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. **21**: p. 247-69.

200. Olofsson, B., *Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling*. Cell Signal, 1999. **11**(8): p. 545-54.
201. Wennerberg, K., K.L. Rossman, and C.J. Der, *The Ras superfamily at a glance*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 5): p. 843-6.
202. D'Souza-Schorey, C. and P.D. Stahl, *Myristoylation is required for the intracellular localization and endocytic function of ARF6*. Exp Cell Res, 1995. **221**(1): p. 153-9.
203. Bishop, A.L. and A. Hall, *Rho GTPases and their effector proteins*. Biochem J, 2000. **348 Pt 2**: p. 241-55.
204. Ridley, A.J., *Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(10): p. 522-9.
205. Vega, F.M. and A.J. Ridley, *Rho GTPases in cancer cell biology*. FEBS Lett, 2008. **582**(14): p. 2093-101.
206. Winton, M.J., et al., *Characterization of new cell permeable C3-like proteins that inactivate Rho and stimulate neurite outgrowth on inhibitory substrates*. J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 32820-9.
207. Braga, V.M. and A.S. Yap, *The challenges of abundance: epithelial junctions and small GTPase signalling*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(5): p. 466-74.
208. Lozano, E., M. Betson, and V.M. Braga, *Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion*. Bioessays, 2003. **25**(5): p. 452-63.
209. Gampel, A., P.J. Parker, and H. Mellor, *Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB*. Curr Biol, 1999. **9**(17): p. 955-8.
210. Kaneko, T., et al., *Rho mediates endocytosis of epidermal growth factor receptor through phosphorylation of endophilin A1 by Rho-kinase*. Genes Cells, 2005. **10**(10): p. 973-87.
211. Etienne-Manneville, S., *Cdc42--the centre of polarity*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 8): p. 1291-300.
212. Fritz, G., I. Just, and B. Kaina, *Rho GTPases are over-expressed in human tumors*. Int J Cancer, 1999. **81**(5): p. 682-7.
213. Machesky, L.M. and R.H. Insall, *Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex*. Curr Biol, 1998. **8**(25): p. 1347-56.
214. Miki, H., et al., *Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 93-6.
215. Boureux, A., et al., *Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes*. Mol Biol Evol, 2007. **24**(1): p. 203-16.
216. Jezyk, M.R., et al., *Crystal structure of Rac1 bound to its effector phospholipase C-beta2*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(12): p. 1135-40.
217. Worthylake, D.K., K.L. Rossman, and J. Sondek, *Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1*. Nature, 2000. **408**(6813): p. 682-8.
218. Didsbury, J., et al., *rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates*. J Biol Chem, 1989. **264**(28): p. 16378-82.
219. Shirsat, N.V., et al., *A member of the ras gene superfamily is expressed specifically in T, B and myeloid hemopoietic cells*. Oncogene, 1990. **5**(5): p. 769-72.

220. Sugihara, K., et al., *Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation*. *Oncogene*, 1998. **17**(26): p. 3427-33.
221. Mira, J.P., et al., *Endogenous, hyperactive Rac3 controls proliferation of breast cancer cells by a p21-activated kinase-dependent pathway*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(1): p. 185-9.
222. Jordan, P., et al., *Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors*. *Oncogene*, 1999. **18**(48): p. 6835-9.
223. Matos, P., J.G. Collard, and P. Jordan, *Tumor-related alternatively spliced Rac1b is not regulated by Rho-GDP dissociation inhibitors and exhibits selective downstream signaling*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(50): p. 50442-8.
224. Fiegen, D., et al., *Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(6): p. 4743-9.
225. Singh, A., et al., *Rac1b, a tumor associated, constitutively active Rac1 splice variant, promotes cellular transformation*. *Oncogene*, 2004. **23**(58): p. 9369-80.
226. Visvikis, O., et al., *Activated Rac1, but not the tumorigenic variant Rac1b, is ubiquitinated on Lys 147 through a JNK-regulated process*. *FEBS J*, 2008. **275**(2): p. 386-96.
227. Nheu, T., et al., *PAK is essential for RAS-induced upregulation of cyclin D1 during the G1 to S transition*. *Cell Cycle*, 2004. **3**(1): p. 71-4.
228. 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*, 1999. **10**(2): p. 183-96.
229. Chen, L., et al., *Rac1 controls the formation of midline commissures and the competency of tangential migration in ventral telencephalic neurons*. *J Neurosci*, 2007. **27**(14): p. 3884-93.
230. Hwang, S.L., et al., *Rac1 gene mutations in human brain tumours*. *Eur J Surg Oncol*, 2004. **30**(1): p. 68-72.
231. Kissil, J.L., et al., *Requirement for Rac1 in a K-ras induced lung cancer in the mouse*. *Cancer Res*, 2007. **67**(17): p. 8089-94.
232. Enomoto, K. and D.M. Gill, *Cholera toxin activation of adenylate cyclase. Roles of nucleoside triphosphates and a macromolecular factor in the ADP ribosylation of the GTP-dependent regulatory component*. *J Biol Chem*, 1980. **255**(4): p. 1252-8.
233. Kahn, R.A. and A.G. Gilman, *The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein*. *J Biol Chem*, 1986. **261**(17): p. 7906-11.
234. Mishima, K., et al., *ARD 1, a 64-kDa guanine nucleotide-binding protein with a carboxyl-terminal ADP-ribosylation factor domain*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(12): p. 8801-7.
235. Ding, M., et al., *Characterization of a GTPase-activating protein that stimulates GTP hydrolysis by both ADP-ribosylation factor (ARF) and ARF-like proteins. Comparison to the ARD1 gap domain*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(39): p. 24005-9.
236. Vichi, A., J. Moss, and M. Vaughan, *ADP-ribosylation factor domain protein 1 (ARD1), a multifunctional protein with ubiquitin E3 ligase, GAP, and ARF domains*. *Methods Enzymol*, 2005. **404**: p. 195-206.

237. Schurmann, A., et al., *The ADP-ribosylation factor (ARF)-related GTPase ARF-related protein binds to the ARF-specific guanine nucleotide exchange factor cytohesin and inhibits the ARF-dependent activation of phospholipase D*. J Biol Chem, 1999. **274**(14): p. 9744-51.
238. Nakano, A. and M. Muramatsu, *A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus*. J Cell Biol, 1989. **109**(6 Pt 1): p. 2677-91.
239. Tamkun, J.W., et al., *The arflike gene encodes an essential GTP-binding protein in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(8): p. 3120-4.
240. Kahn, R.A., et al., *Nomenclature for the human Arf family of GTP-binding proteins: ARF, ARL, and SAR proteins*. J Cell Biol, 2006. **172**(5): p. 645-50.
241. Lin, C.Y., et al., *A developmentally regulated ARF-like 5 protein (ARL5), localized to nuclei and nucleoli, interacts with heterochromatin protein 1*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 23): p. 4433-45.
242. Hofmann, I., et al., *The Arl4 family of small G proteins can recruit the cytohesin Arf6 exchange factors to the plasma membrane*. Curr Biol, 2007. **17**(8): p. 711-6.
243. Knorr, T., W. Nagel, and W. Kolanus, *Phosphoinositides determine specificity of the guanine-nucleotide exchange activity of cytohesin-1 for ADP-ribosylation factors derived from a mammalian expression system*. Eur J Biochem, 2000. **267**(12): p. 3784-91.
244. Zhao, L., et al., *Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatamer subunit beta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4418-23.
245. Pasqualato, S., L. Renault, and J. Cherfils, *Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for 'front-back' communication*. EMBO Rep, 2002. **3**(11): p. 1035-41.
246. Amor, J.C., et al., *Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP*. Nature, 1994. **372**(6507): p. 704-8.
247. Dascher, C. and W.E. Balch, *Dominant inhibitory mutants of ARF1 block endoplasmic reticulum to Golgi transport and trigger disassembly of the Golgi apparatus*. J Biol Chem, 1994. **269**(2): p. 1437-48.
248. Donaldson, J.G. and A. Honda, *Localization and function of Arf family GTPases*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 4): p. 639-42.
249. Bonifacino, J.S., *The GGA proteins: adaptors on the move*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(1): p. 23-32.
250. Spang, A., et al., *Coatamer, Arf1p, and nucleotide are required to bud coat protein complex I-coated vesicles from large synthetic liposomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(19): p. 11199-204.
251. D'Souza-Schorey, C. and P. Chavrier, *ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(5): p. 347-58.
252. Majoul, I., et al., *KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET*. Dev Cell, 2001. **1**(1): p. 139-53.

253. Aoe, T., et al., *The KDEL receptor, ERD2, regulates intracellular traffic by recruiting a GTPase-activating protein for ARF1*. EMBO J, 1997. **16**(24): p. 7305-16.
254. Godi, A., et al., *ADP ribosylation factor regulates spectrin binding to the Golgi complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8607-12.
255. Fucini, R.V., et al., *Activated ADP-ribosylation factor assembles distinct pools of actin on golgi membranes*. J Biol Chem, 2000. **275**(25): p. 18824-9.
256. Fucini, R.V., et al., *Golgi vesicle proteins are linked to the assembly of an actin complex defined by mAbp1*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(2): p. 621-31.
257. Chen, J.L., et al., *Cytosol-derived proteins are sufficient for Arp2/3 recruitment and ARF/coatomer-dependent actin polymerization on Golgi membranes*. FEBS Lett, 2004. **566**(1-3): p. 281-6.
258. Volpicelli-Daley, L.A., et al., *Isoform-selective effects of the depletion of ADP-ribosylation factors 1-5 on membrane traffic*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(10): p. 4495-508.
259. Donaldson, J.G. and C.L. Jackson, *Regulators and effectors of the ARF GTPases*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(4): p. 475-82.
260. Burgess, T.L., D.A. Skoufias, and L. Wilson, *Disruption of the Golgi apparatus with brefeldin A does not destabilize the associated dephosphorylated microtubule network*. Cell Motil Cytoskeleton, 1991. **20**(4): p. 289-300.
261. Acharya, U., et al., *Signaling via mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) is required for Golgi fragmentation during mitosis*. Cell, 1998. **92**(2): p. 183-92.
262. Colanzi, A., C. Suetterlin, and V. Malhotra, *Cell-cycle-specific Golgi fragmentation: how and why?* Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(4): p. 462-7.
263. Altan-Bonnet, N., et al., *A role for Arf1 in mitotic Golgi disassembly, chromosome segregation, and cytokinesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13314-9.
264. Feng, H., et al., *CUL-2 is required for the G1-to-S-phase transition and mitotic chromosome condensation in Caenorhabditis elegans*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(8): p. 486-92.
265. Drechsel, D.N., et al., *A requirement for Rho and Cdc42 during cytokinesis in Xenopus embryos*. Curr Biol, 1997. **7**(1): p. 12-23.
266. Smith, S. and T. de Lange, *Cell cycle dependent localization of the telomeric PARP, tankyrase, to nuclear pore complexes and centrosomes*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt 21): p. 3649-56.
267. Sutterlin, C., et al., *Polo-like kinase is required for the fragmentation of pericentriolar Golgi stacks during mitosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(16): p. 9128-32.
268. Beck, R., et al., *Membrane curvature induced by Arf1-GTP is essential for vesicle formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(33): p. 11731-6.
269. Mitchell, R., et al., *ADP-ribosylation factor-dependent phospholipase D activation by the M3 muscarinic receptor*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 33818-30.
270. Donaldson, J.G., *Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane*. J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 41573-6.

271. Brown, H.A., et al., *ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity*. Cell, 1993. **75**(6): p. 1137-44.
272. Honda, A., et al., *Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation*. Cell, 1999. **99**(5): p. 521-32.
273. El Azreq, M.A., et al., *Cytohesin-1 regulates the Arf6-phospholipase D signaling axis in human neutrophils: impact on superoxide anion production and secretion*. J Immunol, 2010. **184**(2): p. 637-49.
274. Santy, L.C. and J.E. Casanova, *Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D*. J Cell Biol, 2001. **154**(3): p. 599-610.
275. Houndolo, T., P.L. Boulay, and A. Claing, *G protein-coupled receptor endocytosis in ADP-ribosylation factor 6-depleted cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(7): p. 5598-604.
276. Claing, A., et al., *beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 42509-13.
277. Mukherjee, S., et al., *The ADP ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO promotes beta-arrestin release necessary for luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor desensitization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 5901-6.
278. Cotton, M., et al., *Endogenous ARF6 interacts with Rac1 upon angiotensin II stimulation to regulate membrane ruffling and cell migration*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(2): p. 501-11.
279. Poupart, M.E., et al., *ARF6 regulates angiotensin II type 1 receptor endocytosis by controlling the recruitment of AP-2 and clathrin*. Cell Signal, 2007. **19**(11): p. 2370-8.
280. Ikeda, S., et al., *Novel role of ARF6 in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis*. Circ Res, 2005. **96**(4): p. 467-75.
281. Radhakrishna, H., R.D. Klausner, and J.G. Donaldson, *Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF6 GTPase*. J Cell Biol, 1996. **134**(4): p. 935-47.
282. Niedergang, F., et al., *ADP ribosylation factor 6 is activated and controls membrane delivery during phagocytosis in macrophages*. J Cell Biol, 2003. **161**(6): p. 1143-50.
283. Brown, F.D., et al., *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic*. J Cell Biol, 2001. **154**(5): p. 1007-17.
284. Franco, M., et al., *EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization*. EMBO J, 1999. **18**(6): p. 1480-91.
285. Boshans, R.L., et al., *ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(10): p. 3685-94.

286. Radhakrishna, H., et al., *ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt **6**): p. 855-66.
287. Ikenouchi, J. and M. Umeda, *FRMD4A regulates epithelial polarity by connecting Arf6 activation with the PAR complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(2): p. 748-53.
288. Palacios, F., et al., *An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration*. EMBO J, 2001. **20**(17): p. 4973-86.
289. Daher, Z., J. Noel, and A. Claing, *Endothelin-1 promotes migration of endothelial cells through the activation of ARF6 and the regulation of FAK activity*. Cell Signal, 2008. **20**(12): p. 2256-65.
290. White, D.T., et al., *GRASP and IPCEF promote ARF-to-Rac signaling and cell migration by coordinating the association of ARNO/cytohesin 2 with Dock180*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(4): p. 562-71.
291. Daher, Z., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-2 activates ADP-ribosylation factor 1 to promote endothelial nitric-oxide synthase activation and nitric oxide release from endothelial cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(32): p. 24591-9.
292. Hashimoto, S., et al., *Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(17): p. 6647-52.
293. Muralidharan-Chari, V., et al., *ADP-ribosylation factor 6 regulates tumorigenic and invasive properties in vivo*. Cancer Res, 2009. **69**(6): p. 2201-9.
294. Suzuki, T., et al., *Crucial role of the small GTPase ARF6 in hepatic cord formation during liver development*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(16): p. 6149-56.
295. Gillingham, A.K. and S. Munro, *The small G proteins of the Arf family and their regulators*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 579-611.
296. Casanova, J.E., *Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors*. Traffic, 2007. **8**(11): p. 1476-85.
297. Goldberg, J., *Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching*. Cell, 1998. **95**(2): p. 237-48.
298. Mossessova, E., R.A. Corpina, and J. Goldberg, *Crystal structure of ARF1*Sec7 complexed with Brefeldin A and its implications for the guanine nucleotide exchange mechanism*. Mol Cell, 2003. **12**(6): p. 1403-11.
299. Renault, L., B. Guibert, and J. Cherfils, *Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor*. Nature, 2003. **426**(6966): p. 525-30.
300. Singleton, V.L., N. Bohonos, and A.J. Ullstrup, *Decumbin, a new compound from a species of Penicillium*. Nature, 1958. **181**(4615): p. 1072-3.
301. Peyroche, A., et al., *Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain*. Mol Cell, 1999. **3**(3): p. 275-85.
302. Robert, C.H., et al., *Integrating three views of Arf1 activation dynamics*. J Mol Biol, 2004. **337**(4): p. 969-83.

303. Misumi, Y., et al., *Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes*. J Biol Chem, 1986. **261**(24): p. 11398-403.
304. Viaud, J., et al., *Structure-based discovery of an inhibitor of Arf activation by Sec7 domains through targeting of protein-protein complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(25): p. 10370-5.
305. Claude, A., et al., *GBF1: A novel Golgi-associated BFA-resistant guanine nucleotide exchange factor that displays specificity for ADP-ribosylation factor 5*. J Cell Biol, 1999. **146**(1): p. 71-84.
306. Togawa, A., et al., *Purification and cloning of a brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factors*. J Biol Chem, 1999. **274**(18): p. 12308-15.
307. Garcia-Mata, R., et al., *ADP-ribosylation factor/COPI-dependent events at the endoplasmic reticulum-Golgi interface are regulated by the guanine nucleotide exchange factor GBF1*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(6): p. 2250-61.
308. Monetta, P., et al., *Rab1b interacts with GBF1 and modulates both ARF1 dynamics and COPI association*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(7): p. 2400-10.
309. Shen, X., et al., *Association of brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2 (BIG2) with recycling endosomes during transferrin uptake*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(8): p. 2635-40.
310. Mansour, S.J., et al., *Human GBF1 is a ubiquitously expressed gene of the sec7 domain family mapping to 10q24*. Genomics, 1998. **54**(2): p. 323-7.
311. Cohen, L.A., et al., *Active Arf6 recruits ARNO/cytohesin GEFs to the PM by binding their PH domains*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(6): p. 2244-53.
312. Fuss, B., et al., *The cytohesin Steppke is essential for insulin signalling in Drosophila*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 945-8.
313. Luton, F., *The role of EFA6, exchange factor for Arf6, for tight junction assembly, functions, and interaction with the actin cytoskeleton*. Methods Enzymol, 2005. **404**: p. 332-45.
314. Hillig, R.C., et al., *The crystal structure of rnalp: a new fold for a GTPase-activating protein*. Mol Cell, 1999. **3**(6): p. 781-91.
315. Cukierman, E., et al., *The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization*. Science, 1995. **270**(5244): p. 1999-2002.
316. Mesmin, B., et al., *Two lipid-packing sensor motifs contribute to the sensitivity of ArfGAP1 to membrane curvature*. Biochemistry, 2007. **46**(7): p. 1779-90.
317. Tanabe, K., et al., *A novel GTPase-activating protein for ARF6 directly interacts with clathrin and regulates clathrin-dependent endocytosis*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(4): p. 1617-28.
318. Natsume, W., et al., *SMAP2, a novel ARF GTPase-activating protein, interacts with clathrin and clathrin assembly protein and functions on the AP-1-positive early endosome/trans-Golgi network*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(6): p. 2592-603.
319. Sanchez-Velaz, N., et al., *hRIP, a cellular cofactor for Rev function, promotes release of HIV RNAs from the perinuclear region*. Genes Dev, 2004. **18**(1): p. 23-34.

320. de Beer, T., et al., *Molecular mechanism of NPF recognition by EH domains*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(11): p. 1018-22.
321. Premont, R.T., et al., *beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(24): p. 14082-7.
322. Vitale, N., et al., *GIT proteins, A novel family of phosphatidylinositol 3,4, 5-trisphosphate-stimulated GTPase-activating proteins for ARF6*. J Biol Chem, 2000. **275**(18): p. 13901-6.
323. Hoefen, R.J. and B.C. Berk, *The multifunctional GIT family of proteins*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 8): p. 1469-75.
324. Premont, R.T., et al., *The GIT family of ADP-ribosylation factor GTPase-activating proteins. Functional diversity of GIT2 through alternative splicing*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 22373-80.
325. Schmalzigaug, R., et al., *Differential expression of the ARF GAP genes GIT1 and GIT2 in mouse tissues*. J Histochem Cytochem, 2007. **55**(10): p. 1039-48.
326. Mazaki, Y., et al., *An ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein Git2-short/KIAA0148 is involved in subcellular localization of paxillin and actin cytoskeletal organization*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(3): p. 645-62.
327. Whitley, P., et al., *Identification of centaurin-alpha2: a phosphatidylinositide-binding protein present in fat, heart and skeletal muscle*. Eur J Cell Biol, 2002. **81**(4): p. 222-30.
328. Venkateswarlu, K., K.G. Brandom, and J.L. Lawrence, *Centaurin-alpha1 is an in vivo phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent GTPase-activating protein for ARF6 that is involved in actin cytoskeleton organization*. J Biol Chem, 2004. **279**(8): p. 6205-8.
329. Jackson, T.R., B.G. Kearns, and A.B. Theibert, *Cytohesins and centaurins: mediators of PI 3-kinase-regulated Arf signaling*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(10): p. 489-95.
330. Peter, B.J., et al., *BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure*. Science, 2004. **303**(5657): p. 495-9.
331. Shinozaki-Narikawa, N., T. Kodama, and Y. Shibasaki, *Cooperation of phosphoinositides and BAR domain proteins in endosomal tubulation*. Traffic, 2006. **7**(11): p. 1539-50.
332. Brown, M.T., et al., *ASAPI, a phospholipid-dependent arf GTPase-activating protein that associates with and is phosphorylated by Src*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(12): p. 7038-51.
333. King, F.J., et al., *DEF-1, a novel Src SH3 binding protein that promotes adipogenesis in fibroblastic cell lines*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(3): p. 2330-7.
334. Kowanetz, K., et al., *CIN85 associates with multiple effectors controlling intracellular trafficking of epidermal growth factor receptors*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(7): p. 3155-66.
335. Sabe, H., et al., *ArfGAP family proteins in cell adhesion, migration and tumor invasion*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(5): p. 558-64.

336. Andreev, J., et al., *Identification of a new Pyk2 target protein with Arf-GAP activity.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(3): p. 2338-50.
337. Onodera, Y., et al., *Expression of AMAP1, an ArfGAP, provides novel targets to inhibit breast cancer invasive activities.* EMBO J, 2005. **24**(5): p. 963-73.
338. Nie, Z., et al., *AGAPI, an endosome-associated, phosphoinositide-dependent ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein that affects actin cytoskeleton.* J Biol Chem, 2002. **277**(50): p. 48965-75.
339. Nie, Z., et al., *The Arf GAPs AGAPI and AGAP2 distinguish between the adaptor protein complexes AP-1 and AP-3.* J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 15): p. 3555-66.
340. Nie, Z., et al., *Specific regulation of the adaptor protein complex AP-3 by the Arf GAP AGAPI.* Dev Cell, 2003. **5**(3): p. 513-21.
341. Lin, D., et al., *ASAPI, a gene at 8q24, is associated with prostate cancer metastasis.* Cancer Res, 2008. **68**(11): p. 4352-9.
342. Krugmann, S., et al., *Identification of ARAP3, a novel PI3K effector regulating both Arf and Rho GTPases, by selective capture on phosphoinositide affinity matrices.* Mol Cell, 2002. **9**(1): p. 95-108.
343. Miura, K., et al., *ARAP1: a point of convergence for Arf and Rho signaling.* Mol Cell, 2002. **9**(1): p. 109-19.
344. Yoon, H.Y., et al., *ARAP2 effects on the actin cytoskeleton are dependent on Arf6-specific GTPase-activating-protein activity and binding to RhoA-GTP.* J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 22): p. 4650-66.
345. Dunphy, J.L., K. Ye, and J.E. Casanova, *Nuclear functions of the Arf guanine nucleotide exchange factor BRAG2.* Traffic, 2007. **8**(6): p. 661-72.
346. Pierceall, W.E., et al., *Frequent alterations in E-cadherin and alpha- and beta-catenin expression in human breast cancer cell lines.* Oncogene, 1995. **11**(7): p. 1319-26.
347. Keller, P.J., et al., *Mapping the cellular and molecular heterogeneity of normal and malignant breast tissues and cultured cell lines.* Breast Cancer Res, 2010. **12**(5): p. R87.
348. Li, Y., et al., *Ratio of miR-196s to HOXC8 messenger RNA correlates with breast cancer cell migration and metastasis.* Cancer Res, 2010. **70**(20): p. 7894-904.
349. Boulay, P.L., et al., *ADP-ribosylation factor 1 controls the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway to regulate epidermal growth factor-dependent growth and migration of breast cancer cells.* J Biol Chem, 2008. **283**(52): p. 36425-34.
350. Mason, J.M. and K.M. Arndt, *Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications.* Chembiochem, 2004. **5**(2): p. 170-6.
351. Biscardi, J.S., et al., *c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function.* J Biol Chem, 1999. **274**(12): p. 8335-43.
352. Tague, S.E., V. Muralidharan, and C. D'Souza-Schorey, *ADP-ribosylation factor 6 regulates tumor cell invasion through the activation of the MEK/ERK signaling pathway.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9671-6.

353. Hellyer, N.J., K. Cheng, and J.G. Koland, *ErbB3 (HER3) interaction with the p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase*. *Biochem J*, 1998. **333 (Pt 3)**: p. 757-63.
354. Keefe, A.D., S. Pai, and A. Ellington, *Aptamers as therapeutics*. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. **9(7)**: p. 537-50.
355. Lim, J., et al., *The CNK1 scaffold binds cytohesins and promotes insulin pathway signaling*. *Genes Dev*, 2010. **24(14)**: p. 1496-506.
356. Andrechek, E.R., et al., *Amplification of the neu/erbB-2 oncogene in a mouse model of mammary tumorigenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97(7)**: p. 3444-9.

