

Université de Montréal

**ARF1 contrôle la migration des cellules hautement  
invasives du cancer du sein via Rac1**

par

Sebastian Lewis-Saravalli

Département de pharmacologie, Université de Montréal

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences  
en pharmacologie option moléculaire

Décembre, 2012

© Sebastian Lewis-Saravalli, 2012

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

ARF1 contrôle la migration des cellules hautement invasives du cancer du sein via Rac1

Présenté par :  
Sebastian Lewis-Saravalli

évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jean-François Gauchat, président-rapporteur  
Dr. Jean-François Côté, examinateur externe  
Dre. Audrey Claing, directrice de recherche

## SOMMAIRE

Dans un contexte où la forte prévalence du cancer du sein chez les femmes demeure depuis plusieurs années un enjeu de société majeur, les nouvelles stratégies visant à réduire la mortalité associée à cette maladie sont le sujet de nombreuses recherches scientifiques. Les facteurs d'ADP-ribosylation sont des petites protéines G monomériques importantes pour la réorganisation du cytosquelette d'actine, le remodelage des lipides membranaires et la formation de vésicules. Notre laboratoire a précédemment montré qu'ARF1 est surexprimée dans les cellules hautement invasives du cancer du sein et contribue à leur phénotype migratoire accru. Dans le cadre de ce mémoire, nous avons défini le rôle de cette GTPase dans la migration de telles lignées cellulaires. Pour ce faire, nous avons étudié le rôle d'ARF1 dans l'activation de Rac1, un membre de la famille des GTPases Rho connu pour son implication dans la formation de lamellipodes ainsi que dans la migration cellulaire. Globalement, nous avons déterminé que l'activation d'ARF1 permet l'activation subséquente de Rac1 ainsi que de la voie de signalisation nécessaire au processus de migration. Par une approche d'interférence à l'ARN dans les cellules MDA-MB-231, nous avons d'abord montré la contribution essentielle de Rac1 la migration dépendante d'ARF1. Puis, de façon à établir le mécanisme derrière cette régulation, nous avons montré que l'inhibition de l'expression endogène d'ARF1 altère l'activation de Rac1 dépendante de l'EGF. Nous avons ensuite examiné les conséquences d'une telle inhibition sur les partenaires d'interaction de Rac1. Nous avons découvert qu'ARF1 et Rac1 forment un complexe constitutif, puis qu'ARF1 est nécessaire à l'association de Rac1 à IRSp53, une protéine importante dans la formation de lamellipodes. La translocation dépendante de l'EGF du complexe Rac1/IRSp53 à la membrane plasmique est également sous le contrôle d'ARF1. En conclusion, cette étude fournit un nouveau mécanisme par lequel ARF1 régule la migration cellulaire et identifie cette GTPase en tant que cible pharmacologique prometteuse pour freiner le développement des métastases chez les patients atteints du cancer du sein.

**Mots-clés :** Cancer du sein, Récepteur du facteur de croissance épidermique, Facteur d'ADP-ribosylation 1, Rac1, Migration cellulaire, IRSp53

# TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	i
TABLE DES MATIÈRES.....	ii
LISTE DES FIGURES.....	iv
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	v
REMERCIEMENTS.....	viii
<b>CHAPITRE I. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1. <b>Le cancer du sein.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. L'origine.....	1
1.1.2. La carcinogenèse.....	2
1.1.2.1. La formation de métastases.....	4
1.1.3. Les sous-types.....	5
1.1.4. Les traitements.....	6
1.1.4.1. Les thérapies générales.....	6
1.1.4.2. Les thérapies ciblées.....	7
1.2. <b>Les récepteurs à activité tyrosine kinase.....</b>	<b>9</b>
1.2.1. Les récepteurs du facteur de croissance épidermique.....	10
1.2.1.1. Le mécanisme d'activation de l'EGFR.....	12
1.2.1.2. Les voies de signalisation associées à l'EGFR.....	13
1.2.1.2.1. La voie Ras/MAPK.....	15
1.2.1.2.2. La voie PI3K/Akt.....	15
1.2.1.2.3. La voie STAT.....	16
1.2.1.3. L'implication de l'EGFR dans le cancer du sein.....	16
1.2.1.3.1. Les thérapies ciblant l'EGFR.....	17
1.3. <b>Les petites protéines G monomériques.....</b>	<b>18</b>
1.3.1. La famille des facteurs d'ADP-ribosylation.....	20
1.3.1.1. La structure des ARFs.....	21
1.3.1.2. La régulation de l'activité des ARFs.....	22
1.3.1.3. La GTPase ARF1.....	23

1.3.2.	La famille des Rho .....	24
1.3.2.1.	La régulation de l'activité des Rho.....	25
1.3.2.2.	La GTPase Rac1 .....	26
1.4.	<b>La migration cellulaire</b> .....	27
1.4.1.	La protéine IRSp53 .....	30
1.5.	<b>Hypothèse de recherche</b> .....	31
<b>CHAPITRE II. ARTICLE</b> .....		32
	Résumé .....	33
	Abstract .....	34
	Introduction .....	35
	Materials and Methods .....	36
	Results .....	40
	Discussion .....	43
	References .....	45
	Figures .....	50
<b>CHAPITRE III. DISCUSSION</b> .....		56
3.1.	ARF1 dans la migration cellulaire .....	56
3.2.	La communication entre ARF1 et Rac1 .....	57
3.3.	ARF1 dans le remodelage du cytosquelette d'actine.....	58
3.4.	Conclusion .....	60
3.5.	Perspectives .....	60
3.5.1.	La modulation de l'état d'activation d'ARF1 et Rac1 .....	60
3.5.2.	La modulation de l'interaction ARF1/Rac1 .....	61
3.5.3.	L'implication des GEFs.....	61
3.5.4.	L'implication des isoformes d'ARF1 .....	62
3.5.5.	La régulation de l'activité de WAVE.....	63
3.5.6.	ARF1 dans la formation de métastases .....	64
3.5.7.	ARF1 dans les autre types de cancer.....	65
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....		66

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> La carcinogénèse.....	3
<b>Figure 2.</b> La famille du récepteur du facteur de croissance épidermique .....	11
<b>Figure 3.</b> Modèle d'activation de l'homodimère EGFR .....	13
<b>Figure 4.</b> Les voies de signalisation de l'EGFR .....	14
<b>Figure 5.</b> Le cyclage des GTPases .....	19
<b>Figure 6.</b> La structure tridimensionnelle d'ARF1.....	22
<b>Figure 7.</b> La migration cellulaire.....	29

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AREG :	amphiréguline
ARF:	facteur d'ADP-ribosylation
Arp2/3 :	protéine reliée à l'actine 2/3
ARNO :	<i>ADP-Ribosylation factor Nucleotide-binding site Opener</i>
BRCA :	<i>breast cancer</i>
BTC:	bêtacelluline
Cdk:	kinase dépendante des cyclines
EGF :	facteur de croissance épidermique
EGFR :	récepteur du facteur de croissance épidermique
ER :	récepteur à l'œstrogène
ERK :	<i>Extracellular-Regulated Kinase</i>
EREG :	épiréguline
GAP :	protéine activatrice de GTPase
GEF :	facteur d'échange de nucléotide guanylique
GDI :	inhibiteurs de la dissociation du GDP
GDP :	guanosine diphosphate
GTP :	guanosine triphosphate
HB-EGF :	facteur de croissance épidermique liant l'héparine
HER2 :	récepteur humain du facteur de croissance épidermique de type 2
IMD :	<i>IRSp53 and MIM (missing in metastases) homology Domain</i>
IRSp53 :	substrat p53 du récepteur tyrosine kinase à l'insuline
MAPK :	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MEK :	<i>MAP ERK kinase</i>
MMP :	métalloprotéase matricielle
PARP :	poly(ADP-ribose) polymérase
PI3K :	phosphoinositide 3-kinase
PIP2 :	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP3 :	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate

PR :	récepteur à la progestérone
RTK :	récepteur à activité tyrosine kinase
SH2/3 :	<i>Src Homology 2/3</i>
STAT :	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TGF $\alpha$ :	facteur de croissance transformant alpha
VEGF :	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
WASP :	protéine du syndrome de Wiskott–Aldrich
WAVE :	protéine homologue à la verproline de la famille des WASP



*À mes parents  
Isabelle et Miguel*

## REMERCIEMENTS

J'aimerais avant tout remercier ma directrice de recherche Dre. Audrey Claing. La généreuse confiance dont tu m'as témoigné en m'acceptant au sein de ton laboratoire me touche beaucoup et je t'en serai reconnaissant tout au long de ma vie professionnelle. Merci de m'avoir ouvert les yeux sur le monde de la science et d'avoir été pour moi un mentor aussi inspirant.

Je tiens également à remercier tous les membres de mon équipe, soit Pierre-Luc Boulay, Shirley Campbell, Sabrina Schlienger, Ricardo Charles, Eric Haines, Danaë Tassy et Mohamed Bourmoum, pour avoir fait de mon passage au laboratoire une expérience plus humaine. Merci particulièrement à Rick et Sab pour les beaux moments culturels (théâtre, impro, humour), les 5 à 7 impromptus, les courses de chaises, et tous ces autres beaux souvenirs qui m'ont fait sentir que nous étions plus que de simples collègues de laboratoire.

Il m'est évidemment très important de remercier tous les membres de mon jury pour avoir si gentiment accepté d'examiner mon mémoire. Sachez que votre temps et dévouement sont sincèrement appréciés.

D'un point de vue plus personnel, merci infiniment à ma famille d'avoir fait de moi la personne que je suis. Votre amour a été pour moi la plus grande des motivations et votre soutien m'a été essentiel tout au long de ma maîtrise. J'espère de tout cœur que cet accomplissement contribuera à vous rendre fiers.

Merci à ma copine Marie-France pour son immense support et ses belles attentions qui ont apporté l'équilibre nécessaire au maintien de ma persévérance. Je t'aime! Merci également à mon grand ami Marc-André de s'être occupé de moi en me faisant constamment rire aux éclats! Toujours là pour moi, même quand je suis sur les "chapeaux de roue".

Finalement, merci à des femmes courageuses telles que Solange Longpré, Sylvie Mathurin, et Louise Gareau qui ont tous été touchées à différents niveaux par les problématiques discutées dans cet ouvrage. Votre courage est pour moi une grande source d'inspiration.

# CHAPITRE I. INTRODUCTION

## 1.1. Le cancer du sein

### 1.1.1. L'origine

Le cancer du sein est la forme de cancer la plus répandue chez les Canadiennes. Il est estimé qu'une femme sur neuf risque d'en être atteinte au cours de sa vie (Société canadienne du cancer, 2012). Bien que les causes ne puissent pas toujours être décrites avec précision, de nombreux gènes de susceptibilité au cancer du sein ont été identifiés. Des mutations dans ces gènes peuvent être retrouvées au niveau des cellules germinales dans le cas d'une prédisposition héréditaire au cancer, ou dans les cellules somatiques dans le cas de tumeurs sporadiques (1).

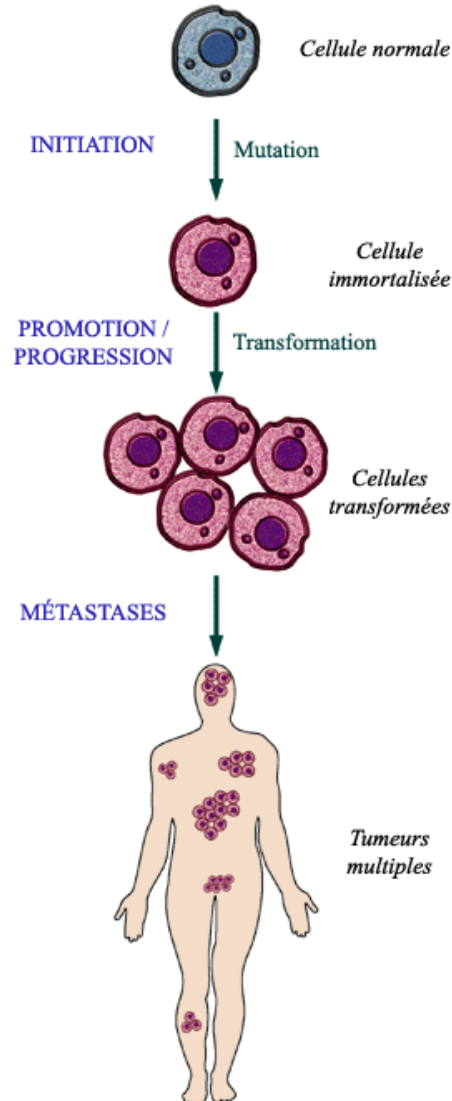
Les individus héritant d'une mutation germinale au niveau des gènes de susceptibilités BRCA (*Breast Cancer*), particulièrement BRCA1 et BRCA2, ont un risque significativement plus élevé de développer le cancer du sein (2,3). Ces gènes sont reconnus pour leur implication dans la régulation de la réparation des dommages à l'ADN (4). Ainsi, un défaut de fonctionnalité des protéines codant pour ces gènes crée une instabilité génétique favorisant l'apparition du cancer en interférant avec la fidélité du processus de réplication de l'ADN. Plusieurs autres gènes de plus faible pénétrance tels que CHEK2, ATM, NBS1, RAD50, BRIP1 et PALB2 ont été associés à un risque modéré de cancer du sein et sont également impliqués dans les cancer du sein familiaux (5,6).

Bien que les mutations liées aux gènes précédemment évoqués puissent être retrouvés au niveau germinale, il est estimé que l'hérédité n'est responsable que de 5 à 10% des cas de cancer du sein reportés (7,8). La majorité des cas résultent plutôt de l'accumulation de mutations au niveau des gènes somatiques, sans égard aux mutations germinales. Ces cancers, dits sporadiques, seraient causés par l'exposition à des carcinogènes environnementaux tels que les œstrogènes (9), les radiations (10), la cigarette (11,12) et/ou des éléments de la diète (13).

### 1.1.2. La carcinogenèse

Le développement d'un carcinome, ou carcinogénèse, peut prendre des décennies suite à l'exposition à une dose suffisante de carcinogène (14). De plus, il faut généralement plusieurs mutations dans les gènes de susceptibilité au cancer avant qu'une tumeur se développe (9). Un modèle de progression en plusieurs étapes a été proposé pour décrire ce processus de carcinogenèse. Tel que décrit dans la **figure 1**, celui-ci comprend les étapes d'initiation, de promotion et de progression vers la formation de métastases (15). Notons cependant que ce processus n'est pas linéaire puisque certaines tumeurs peuvent être éliminées alors que d'autres ne progressent pas jusqu'à la formation de métastases.

L'initiation consiste en une altération génétique dans un gène lié au cancer de l'épithélium mammaire. Tel que mentionné dans la section précédente, cette mutation peut être d'origine héréditaire ou sporadique et sera conservée de manière permanente et irréversible. Vient ensuite l'étape de la promotion dans laquelle la cellule mutée, alors génétiquement instable, est sensible aux effets d'un promoteur (ex : hormone) stimulant la prolifération cellulaire. Lorsqu'en présence d'une exposition suffisante au promoteur, cette étape donne lieu à une expansion clonale interruptible et réversible qui initie le processus de néoplasie, soit la prolifération anormale des cellules mutées (16). Au fil de cette expansion, qui constitue l'étape de progression, les cellules filles acquièrent des mutations somatiques additionnelles conduisant à un changement karyotypique. Celles-ci acquièrent alors de nouvelles fonctions telles que la perte de différenciation et d'inhibition de contact, une croissance incontrôlée, la capacité d'invasion, la néo-angiogénèse ainsi qu'une capacité d'échapper au système immunitaire et aux signaux d'apoptose (17). Les cellules transformées évoluent ainsi d'une tumeur bénigne vers un carcinome à caractère malin et, ultimement, vers la formation de métastases (18).



**Figure 1. La carcinogénèse**

Lors de l'initiation, une cellule normale subit une mutation permanente et irréversible lui offrant des avantages de prolifération. La promotion et la progression consistent en une expansion clonale donnant lieu à des cellules filles transformées. Ces cellules s'organisent d'abord en tumeur primaire, puis évoluent vers un carcinome à caractère malin.

### 1.1.2.1. La formation de métastases

La formation de métastases est un processus en plusieurs étapes par lequel les cellules cancéreuses doivent envahir la matrice extracellulaire, pénétrer dans la circulation sanguine (intravasation), survivre au transport dans le système circulatoire, et finalement ressortir de la circulation sanguine (extravasation) afin de coloniser les organes distants (19-21). Puisqu'environ 90% des cas de décès liés au cancer sont dues aux métastases (22,23), il y a intérêt à développer des stratégies de traitements permettant d'inhiber leur formation.

Plusieurs mécanismes sont utilisés pour permettre aux cellules tumorales d'envahir les tissus environnants et les vaisseaux sanguins. Premièrement, la cellule doit être en mesure de se détacher des autres cellules. En effet, il a été démontré qu'une forte expression d'E-cadhérine, une protéine d'adhésion cellule-cellule, est retrouvée dans les carcinomes mammaires *in situ* alors que les carcinomes avec métastases en expriment très peu (24). Cette différence d'expression reflète la nécessité pour la cellule cancéreuse de se détacher des autres cellules afin de former une métastase. Deuxièmement, la cellule doit être en mesure de migrer. Tel qu'il le sera décrit à la section 1.4 du présent manuscrit, le remodelage du cytosquelette d'actine est essentiel à ce processus. Ainsi, la suractivation des protéines promouvant ce remodelage contribue au cancer du sein. L'activation de WAVE3 (25) ou du complexe WAVE2-Arp2/3, par exemples, promeuvent la migration de cellules de cancer du sein hautement invasif (26). À l'opposé, l'expression d'un dominant négatif de la Rho GTPase Rac1 inhibe la migration cellulaire de cellules de cancer du sein hautement invasif (27). Troisièmement, la cellule doit être en mesure de remodeler la matrice extracellulaire qui constitue une barrière à ses déplacements. Pour se faire, les cellules produisent des métalloprotéases matricielles (MMP) permettant la dégradation de protéines de la matrice extracellulaire de façon à se déplacer et à pénétrer dans la circulation sanguine (28). La MMP-1 et 7, par exemples, sont surexprimées dans les cellules de cancer du sein hautement invasives (29).

Après avoir envahies les tissus environnant, les cellules tumorales doivent pénétrer à l'intérieur des vaisseaux sanguins de façon à s'éloigner de la tumeur primaire. Encore une

fois, la motilité cellulaire constitue une étape importante à ce processus puisqu'il a été démontré que l'inhibition de CD151, une protéine associée à l'intégrine, permet d'inhiber l'intravasation cellulaire et la formation de métastases en réduisant la migration cellulaire (30). De plus, afin de voyager à travers la circulation sanguine, les cellules doivent acquérir une résistance à l'anoïkose, soit l'apoptose qui survient normalement lors de la perte de contact avec la matrice extracellulaire ou des cellules voisines (31). La surexpression de la protéine D4-GDI, par un mécanisme dépendant de Rac1, augmente la résistance à l'anoïkose dans les cellules de cancer du sein hautement invasif (32).

Une fois pénétrées dans la circulation sanguine, les cellules tumorales doivent finalement en ressortir afin de coloniser un organe secondaire. À ce moment, les cellules doivent retrouver leurs propriétés leur permettant de croître en formant une masse tumorale (33). De plus, la théorie de «la graine et du sol», formulée par Paget *et al.* (34), stipule que toutes les cellules complétant l'étape d'extravasation ne réussiront pas à se développer. En effet, la cellule, qui représente la graine, doit se trouver dans un environnement favorable à sa croissance, représenté par le sol, afin qu'une tumeur secondaire puisse se former. Pour le cancer du sein, les sites de métastases les plus communs incluent les os, les poumons, le foie et le cerveau (35).

### **1.1.3. Les sous-types**

On peut diviser le cancer du sein en au moins cinq sous-types basés sur un profil d'expression de 500 gènes, soit le luminal de type A, luminal de type B, basal, ErbB2, et normal (36). Ceux-ci sont associés à des pronostics particuliers et à des potentiels de survie distincts (37,38). Les sous-types moléculaires sont généralement caractérisés par leur niveau d'expression protéique du récepteur à l'œstrogène (ER), à la progestérone (PR), ainsi qu'au récepteur humain du facteur de croissance épidermique de type 2 (HER2).

Les tumeurs lumorales regroupent les cellules positives pour ER et exprimant les cytokératines de faibles poids moléculaires 8/18, un profil d'expression rappelant les cellules épithéliales lumorales de la glande mammaire normale (39). Parmi ce sous-type, les

tumeurs lumineales de type B ont souvent un plus haut grade histologique, un taux de prolifération supérieur et un pire pronostic que les tumeurs lumineales de type A (40). Les tumeurs ErbB2, quant à elles, sont généralement négatives pour ER et caractérisées par une surexpression de HER2 (36). Les tumeurs de type basal expriment les cytokératines de hauts poids moléculaires 5/6 et 17 et sont elles aussi généralement négatives pour ER, un profil rappelant les cellules basales/mésoépithéliales normales du sein (41,42). De plus, elles surexpriment souvent le récepteur du facteur de croissance épidermique (43).

Parmi tous les cancers du sein, environ 15-20% sont dits triples négatifs (44). Cette appellation faisant référence à l'absence des récepteurs ER, PR et HER2 est souvent confondue avec le sous-type basal. Bien qu'aucun consensus ne soit établi quant à la différence entre ces 2 sous-types de cancers, des phénotypes différents suggèrent une distinction entre le cancer du sein triple-négatif et basal (45). Les cancers du sein triple-négatifs sont associés à un mauvais pronostic, notamment en raison du manque de thérapies ciblées (46,47).

#### **1.1.4. Les traitements**

Le traitement du cancer du sein repose sur plusieurs stratégies thérapeutiques. Des thérapies générales, pouvant s'appliquer à tous les sous-types, constituent la base du traitement. À celles-ci peuvent s'ajouter des thérapies ciblées, pouvant offrir des bénéfices dans certains sous-types particuliers.

##### **1.1.4.1. Les thérapies générales**

Selon de nombreuses considérations cliniques telles que l'âge, le type de tumeur, le grade histologique, l'emplacement, le métabolisme de l'individu, etc, différents traitements généraux sont mis à la disposition des patients atteints du cancer du sein. Parmi ceux-ci, on compte des traitements locaux tels que la chirurgie et la radiothérapie, ainsi que des



traitements systémiques tels que la chimiothérapie. Une association de traitements est généralement préconisée pour optimiser l'efficacité de traitement (48).

La chirurgie constitue le traitement le plus commun face au cancer du sein (49). Elle a pour but de retirer la tumeur ainsi qu'une partie du tissu sain environnant (ex : ganglions, vaisseaux lymphatiques voisins, etc) susceptible de contenir des cellules tumorales. On parle d'une tumorectomie dans le cas d'une ablation mammaire partielle ou d'une mastectomie dans le cas d'une ablation totale. La radiothérapie et la chimiothérapie, pour leur part, ont pour but de freiner la progression tumorale. La radiothérapie consiste à créer des lésions à l'ADN par exposition à de multiples doses de radiations (50). Les cellules cancéreuses répliquatives n'ayant pas le temps de réparer ces dommages meurent tandis que les cellules saines, dont la machinerie de réparation est plus efficace, possèdent un avantage de survie (51). La chimiothérapie cible elle aussi les cellules en répliquations (52) et consiste en l'administration, souvent concomitante, de diverses molécules telles que des agents alkylants, des alcaloïdes, des antibiotiques ou des anti-métabolites par exemples. La combinaison de molécules possédant différents mécanismes d'actions permet de réduire la possibilité de résistance aux médicaments (53).

#### **1.1.4.2. Les thérapies ciblées**

Selon les particularités associées aux différents sous-types de cancer du sein, des traitements ciblés peuvent être envisagés. Les patients dont les tumeurs expriment les récepteurs hormonaux (ER et PR) par exemple, peuvent avoir recours à l'hormonothérapie. Celle-ci a pour but de freiner la progression tumorale en empêchant la signalisation via ces récepteurs, bien connus pour favoriser la prolifération cellulaire en réponse aux hormones (27,54-56). Ainsi, les antagonistes des récepteurs aux œstrogènes (ex : tamoxifène), les inhibiteurs de la synthèse d'œstrogènes (ex : anastrozole) ou la suppression ovarienne constituent tous des exemples de l'arsenal de l'hormonothérapie. Les patients dont les tumeurs expriment HER2, quant à eux, peuvent avoir recours à des anticorps monoclonaux

(ex : trastuzumab) dirigés contre ce récepteur. L'approbation de cette thérapie a d'ailleurs grandement améliorée la survie des patients répondant à ce traitement (57,58). Dans le cas des patients triple négatifs par contre, le manque de cibles thérapeutiques a poussé la recherche vers le développement de thérapies ciblant des molécules surexprimées dans les cellules tumorales. Parmi les molécules ciblées, on retrouve par exemples le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, certaines protéines impliquées dans les mécanismes de réparations, le facteur de croissance épidermique, la cible humaine de la rapamycine, certaines protéines de la voie de signalisation associée à Src, les histones déacétylases et les récepteurs aux androgènes (59).

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) joue un rôle majeur sur l'apport en oxygène aux tissus corporels, soit une étape essentielle à la formation de vaisseaux sanguins. Une forte expression du VEGF est associée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein (60,61). Les inhibiteurs de l'angiogénèse forment donc une stratégie thérapeutique intéressante pour contrer la progression tumorale. Le bevacizumab, par exemple, est un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF. Néanmoins, les études de phase III menées jusqu'à présent sur cette molécules n'ont pas permis de démontrer une amélioration du taux de survie des patients (62-64).

La poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) est une protéine nucléaire abondante appartenant à une famille d'enzymes permettant la poly(ADP-ribosylation) de protéines liant d'ADN. De par son rôle clé dans la réparation de l'ADN, la famille des PARPs constitue une bonne cible thérapeutique contre le cancer. En ce sens, plusieurs études cliniques de phase I et de phase II ont conduits à des résultats positifs, ce qui a permis de mener les inhibiteurs de PARP aux études de phase III (65). La plupart de ces inhibiteurs sont des analogues de la  $\beta$ -nicotinamide adénine dinucléotide qui compétitionnent avec le site actif de l'enzyme, une région hautement conservée à travers les différents homologues des PARPs (66). Utilisé en monothérapie, ils auraient le potentiel d'induire l'apoptose dans certains cancers en raison d'une forte accumulation de dommages à l'ADN, alors qu'en combinaison avec un agent thérapeutique, ils pourraient potentialiser les effets du premier traitement (67).

Plusieurs autres molécules ont démontré un intérêt dans le traitement du cancer du sein triple-négatif. La voie PI3K/Akt étant souvent dérégulée dans le cancer du sein (68,69), l'everolimus, un inhibiteur de mTOR, a conduit à des effets bénéfiques chez les femmes atteintes d'un cancer du sein positif pour HER2 (70). Le dasatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase, est actuellement en essai mais n'a pas encore démontré d'efficacité lorsque pris seul (71). La bicalutamide, un inhibiteur des récepteurs aux androgènes, est présentement à l'essai pour les patients atteints du cancer du sein métastatiques (72).

Finalement, le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) est surexprimé dans environ 60% des cancers triples négatifs (73). Ce récepteur, faisant parti de la grande famille des récepteurs à activité tyrosine kinase, été associé aux processus de prolifération, de migration et de survie à l'apoptose (74-76), faisant de l'EGFR une cible intéressante pour freiner le développement tumoral.

## **1.2. Les récepteurs à activité tyrosine kinase**

Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) sont des récepteurs de surface cellulaire possédant une grande affinité envers plusieurs facteurs de croissance, de cytokines et d'hormones (77). Près de 20 classes différentes de RTK ont été identifiées (78). À l'exception du récepteur à l'insuline (79) et du récepteur au facteur de croissance semblable à l'insuline-1 (80), ceux-ci existent tous sous la forme de monomères (81). Chaque monomère possède une région N-terminale extracellulaire, un domaine transmembranaire et une région C-terminale intracellulaire (82). La portion N-terminale contient une variété d'éléments conservés propre à chaque famille de RTK et qui agissent à titre de sites de liaison à leurs ligands extracellulaires respectifs. La portion C-terminale est quant à elle très conservée entre les familles de RTK et contient des domaines catalytiques responsables de l'activité kinase de ces récepteurs. Suite à la liaison de leur ligand, la dimérisation des récepteurs monomériques catalyse l'autophosphorylation des résidus tyrosine du domaine intracellulaire des récepteurs et la phosphorylation des substrats des RTK.

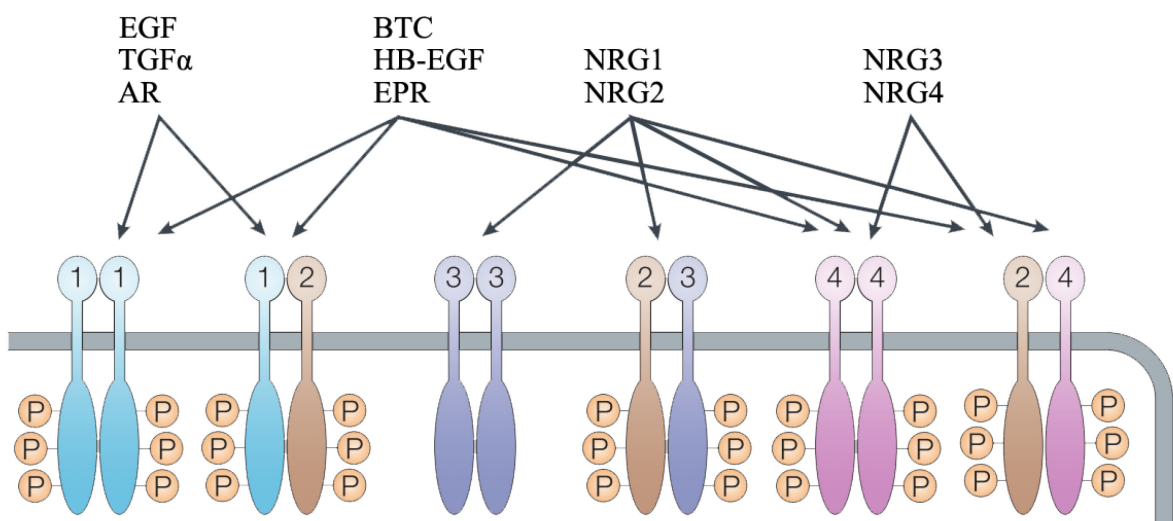
Bien que considérés comme des régulateurs importants des processus biologiques normaux, les récepteurs tyrosine kinases ont aussi un rôle critique dans le développement et la progression du cancer du sein (83-85). Plus particulièrement, puisque la majorité des cancers du sein surexpriment l'EGFR, celui-ci représente actuellement un domaine de recherche très actif.

### **1.2.1. Les récepteurs du facteur de croissance épidermique**

La famille du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), également appelée ErbB, constitue une des classes de RTK. Tel que représenté dans la **figure 2**, cette famille comprend quatre membres structurellement reliés : ErbB1 (aussi appelé HER-1, ErB1 ou EGFR), ErbB2 (HER-2 ou Neu), ErbB3 (HER-3) et ErbB4 (HER-4). Ces récepteurs sont activés par dimérisation et bien qu'une combinaison de 10 dimères soit possible, ceux-ci ne sont pas tous biologiquement actifs (86). ErbB2, par exemple, ne possède aucun ligand connu, mais constitue le partenaire préféré de tous les membres de la famille en raison d'une vaste boucle d'interaction le rendant constitutivement disponible pour la dimérisation. ErbB3, quant à lui, ne possède pas d'activité catalytique mais peut s'associer aux autres membres pour les activer (87).

Plusieurs ligands sont connus pour lier la famille de l'EGFR, tel que le facteur de croissance épidermique (EGF), le facteur de croissance semblable à l'EGF liant l'héparine (HB-EGF), l'amphiréguline (AREG), l'épiréguline (EREG), le facteur de croissance transformant alpha ( $TGF\alpha$ ), l'épigène, la bêtacelluline (BTC) et quatre isoformes de neuréguline (88,89). Ceux-ci comprennent tous une séquence connue comme le motif EGF constituée de six résidus cystéine spatialement conservés (90). Ce motif est nécessaire pour la liaison des membres de la famille de l'EGFR. Les ligands de cette famille existent sous forme de précurseurs ancrés à la membrane dont les ectodomains sont clivés par des métalloprotéinases, ce qui mène à la relâche de facteurs solubles permettant l'activation de l'EGFR (91). La portion de ligand transmembranaire peut également stimuler l'EGFR des

cellules adjacentes via un mécanisme de signalisation juxtacrine (92). De plus, l'EGFR est souvent transactivé par des récepteurs hétérologues tels que les récepteurs couplés aux protéines G (93).



**Figure 2. La famille du récepteur du facteur de croissance épidermique**

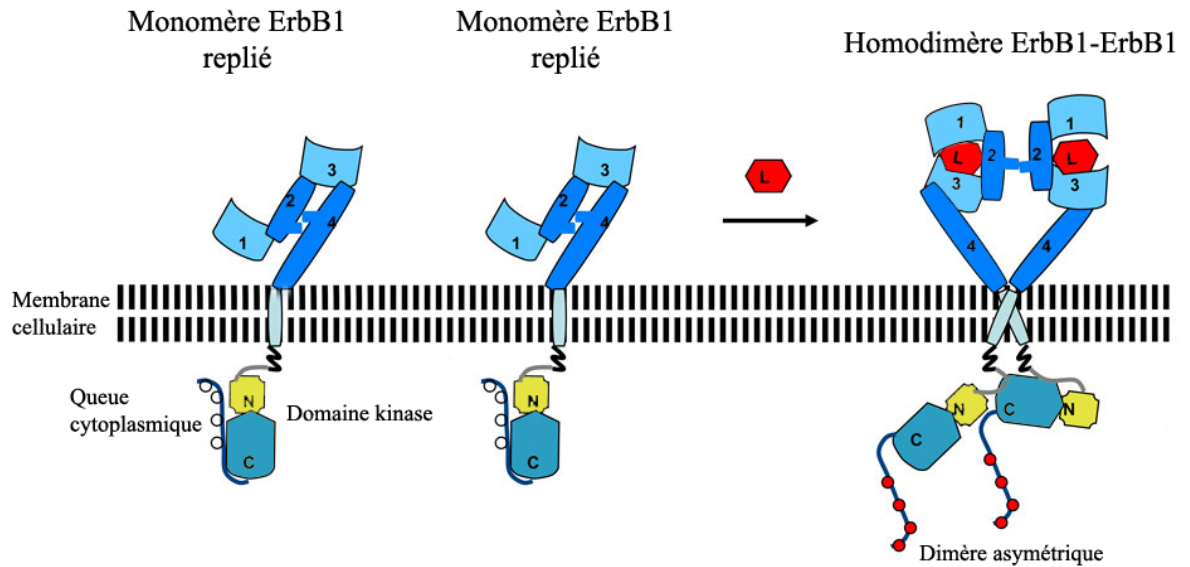
La famille du récepteur du facteur de croissance épidermique comprend les membres ErbB(1 à 4). La liaison de leur ligand respectif conduit à la dimérisation des récepteurs, un processus nécessaire à leur activation. Le récepteur ErbB2 ne possède pas de ligand connu. Le récepteur ErbB3 ne possède pas d'activité catalytique. (*Inspiré de Hynes et al., 2005*) (94)

### 1.2.1.1. Le mécanisme d'activation de l'EGFR

Le mécanisme d'activation de l'EGFR comprend les étapes d'activation du récepteur depuis la liaison du ligand au niveau de sa portion extracellulaire jusqu'à la phosphorylation de son domaine kinase intracellulaire où les effecteurs interagissent. Ce mécanisme peut être schématisé selon l'exemple de l'hétérodimère ErbB2-ErbB3 illustré à la **figure 3**.

La portion extracellulaire de l'EGFR est formée de quatre domaines (I-IV). Les domaines I et III servent à la liaison bivalente du ligand à l'intérieur d'un même monomère. Le domaine II, quant à lui, contient une boucle de dimérisation qui, en absence de ligand, se trouve séquestré par des interactions moléculaires du domaine IV. Ces interactions stabilisent la conformation repliée du récepteur, inhibant ainsi la dimérisation du récepteur. Suite à la liaison du ligand, un changement conformationnel libère et expose la boucle de dimérisation. Cette conformation allongée lui permet d'interagir avec un second récepteur lié à un ligand de façon à former un homodimère ou un hétérodimère (95,96).

Le domaine kinase intracellulaires de l'EGFR est, pour sa part, constitué de deux lobes. Lors de la dimérisation des récepteurs, le lobe C-terminal d'un récepteur entre en contact avec le lobe N-terminal de l'autre récepteur de façon à le transphosphoryler asymétriquement. Cette activation induit l'autophosphorylation des résidus tyrosine des domaines cytoplasmiques des récepteurs, ce qui génère des sites de recrutement pour plusieurs protéines en aval (97-99). Le complexe EGFR-ligand est ensuite internalisé dans les endosomes précoces de façon à être recyclé à la membrane plasmique ou ubiquitiné pour sa dégradation (88).

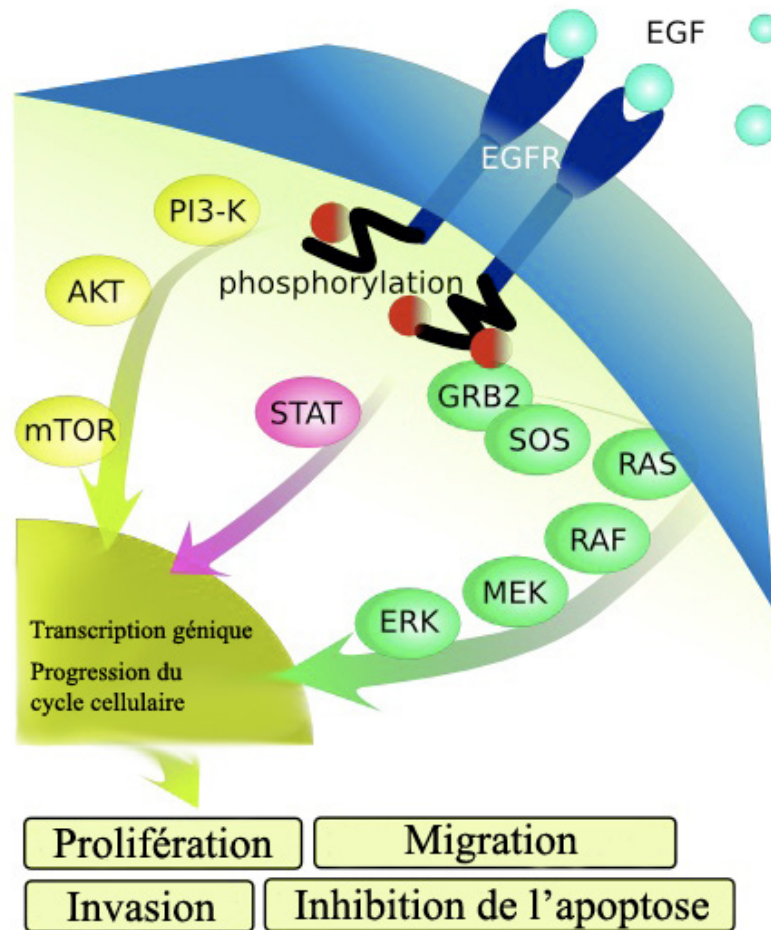


**Figure 3. Modèle d'activation de l'homodimère EGFR**

En absence de ligand (L), l'EGFR adopte une conformation repliée. Lors de la liaison du ligand, l'EGFR activé adopte une conformation allongée. Au niveau de la portion extracellulaire, les récepteurs dimérisent au niveau du domaine II. Au niveau de la portion intracellulaire, le lobe C-terminal d'un récepteur transphosphoryle asymétriquement le lobe N-terminal de l'autre récepteur, provoquant l'autophosphorylation des résidus sur les queues cytoplasmiques. (*Inspiré de Carraway et al., 2009*) (100)

#### 1.2.1.2. Les voies de signalisation associées à l'EGFR

Tel qu'illustré à la **figure 4**, l'activation de l'EGFR induit la cascade de plusieurs voies de signalisation. Parmi celles-ci, l'EGFR est principalement connu pour activer la voie Ras/MAPK, la voie PI3K/Akt et la voie STAT, résultant en l'activation de plusieurs processus biologiques tels que, la survie cellulaire (101), l'invasion (102), la prolifération ou la migration cellulaire (74).



**Figure 4. Les voies de signalisation de l'EGFR**

Suite à l'activation de l'EGFR, celui-ci signale via les voies de signalisation Ras/MAPK, PI3K/Akt et STAT. Ces voies consistent en une cascade de phosphorylation de protéines résultant en la transcription de gènes responsables de nombreux processus biologiques.



#### **1.2.1.2.1. La voie Ras/MAPK**

Une fois l'EGFR activé, les résidus tyrosines phosphorylés des domaines cytoplasmiques du récepteur servent de site de liaison pour une série de protéines adaptatrices permettant l'activation de la GTPase Ras. Pour ce faire, la protéine Grb2 se lie aux résidus tyrosines phosphorylés via son domaine SH2. Les domaines SH3 de cette protéine adaptatrice permettent ensuite la liaison aux motifs riches en proline de SOS, un facteur d'échange de nucléotide catalysant l'activation de la GTPase Ras (103). Une fois la GTPase activée, celle-ci initie une cascade de phosphorylation de protéines constituant les MAP kinases, en débutant par la protéine kinase Raf. Raf activée phosphoryle ensuite les résidus sérines et thréonines des protéines kinases MEK1/2. Ces dernières phosphorylent à leur tour les résidus thréonines et tyrosines de ERK1/2, un groupe de protéines qui, une fois activées, transloquent au noyau afin d'y phosphoryler plusieurs facteurs de transcription. Parmi les protéines activées par ERK1/2, on retrouve Jun, une protéine composant le facteur de transcription AP-1, et des protéines de la famille des facteurs de transcription Ets (104). Ces facteurs de transcriptions activent la transcription de gènes précoces codant pour la production d'autres facteurs de transcription, incluant Myc, Fos, et Jun, qui activent à leur tour la transcription d'une famille de gènes tardifs. Un de ces gènes code pour le facteur de transcription E2F dont le rôle est de contrôler l'entrée en phase S (105). Parmi les gènes tardifs, plusieurs gènes codent également pour les cyclines ou les kinases dépendantes des cyclines (Cdk) dont la production conduit à la formation de complexes Cdk-cycline qui phosphoryle Rb et, ainsi, provoque le passage de la phase G1 à S.

#### **1.2.1.2.2. La voie PI3K/Akt**

L'activation de l'EGFR conduit également à l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Celle-ci peut être activée de plusieurs façons, soit par sa liaison directe aux résidus tyrosines phosphorylés du récepteur, via l'intermédiaire de protéines adaptatrices telles qu'IRS-1 (106), ou via d'autres protéines telle que la GTPase Ras

activée (107). Une fois activée, la PI3K migre dans la paroi interne de la membrane plasmique et catalyse l'addition d'un groupement phosphate sur le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>), un des lipides membranaires constituant la bicouche lipidique de la membrane plasmique. Le PIP<sub>2</sub> est alors converti en phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP<sub>3</sub>). Le PIP<sub>3</sub> recrute ensuite des protéines kinases à la surface interne de la membrane plasmique conduisant à l'activation de la sérine-thréonine kinase Akt. En phosphorylant plusieurs protéines clés, telles que GSK3, mTOR, et des facteurs de transcription de la famille *Forkhead*, Akt permet la suppression de l'apoptose et inhibe l'arrêt du cycle cellulaire (108). L'effet net de la voie de signalisation PI3K est donc de promouvoir la survie cellulaire et la prolifération.

#### **1.2.1.2.3. La voie STAT**

Les protéines STAT ont la capacité d'être activés par leur liaison aux résidus tyrosines phosphorylés de l'EGFR activé via leur domaine SH2. Une fois activés, les STAT dimérisent et transloquent au noyau où ils se lient à des gènes ou des facteurs de transcription tels que Fos et Jun, permettant ainsi la prolifération cellulaire (109).

#### **1.2.1.3. L'implication de l'EGFR dans le cancer du sein**

L'EGFR joue des rôles majeurs dans la pathogénèse associée au cancer du sein tels que la prolifération, la migration et la survie à l'apoptose (74-76). La plupart des récepteurs ErbB et de leurs ligands sont surexprimés dans la glande mammaire (110). L'intérêt de l'EGFR dans le contexte du cancer du sein a vu le jour suite à la démonstration du profil d'expression génique de plusieurs carcinomes mammaires. Bien que l'utilisation de l'EGFR à titre de marqueur pronostic demeure à ce jour controversée, il reste qu'une association entre certains sous-types de cancer du sein et la surexpression du récepteur a été établie (111). Tous les membres de la famille ErbB sont exprimés à différents niveaux dans le cancer du sein: ErbB2>EGFR>ErbB3>ErbB4 (112).

Plusieurs dérégulations de la voie EGFR ont été décrites. Parmi les mécanismes menant à ces dérégulations, on dénote la surexpression ainsi que la suractivation du récepteur (110,113). La surexpression du récepteur est occasionnée par amplification génique ou par des mécanismes épigénétiques. La suractivation du récepteur est quant à elle liée à l'action de ses ligands ou à des mutations sur le récepteur. La mutation EGFRvIII a également été décrite dans certaines études (114,115). Cette mutation délétère cause une forme tronquée de l'EGFR le rendant insensible aux ligands en raison de la délétion du domaine I et II du domaine extracellulaire. En revanche, le récepteur muté possède une activité d'autophosphorylation supérieure et reste constamment disponible puisqu'il ne se fait pas internaliser (116). Malgré tout, les mutations de l'EGFR sont rarement retrouvés dans le cancer du sein (117).

Les cancers du sein triples-négatifs surexpriment fréquemment l'EGFR (43,118,119). Dans ce contexte, la surexpression du récepteur est généralement associée à des tumeurs larges, faiblement différenciées, et liées à un mauvais pronostic (120,121). Une corrélation entre l'expression de l'EGFR et la mutation du gène BRCA1 semble également être retrouvée dans les cancers du sein triple-négatifs (122,123). Il a d'ailleurs été démontré qu'une inhibition de l'expression endogène de BRCA1 peut induire l'expression de l'EGFR via des mécanismes d'activation transcriptionnelle ainsi que des mécanismes post-traductionnels (124). Ces résultats suggèrent que des inhibiteurs de l'EGFR pourraient être bénéfiques pour les patients présentant une mutation dans le gène BRCA1.

#### **1.2.1.3.1. Les thérapies ciblant l'EGFR**

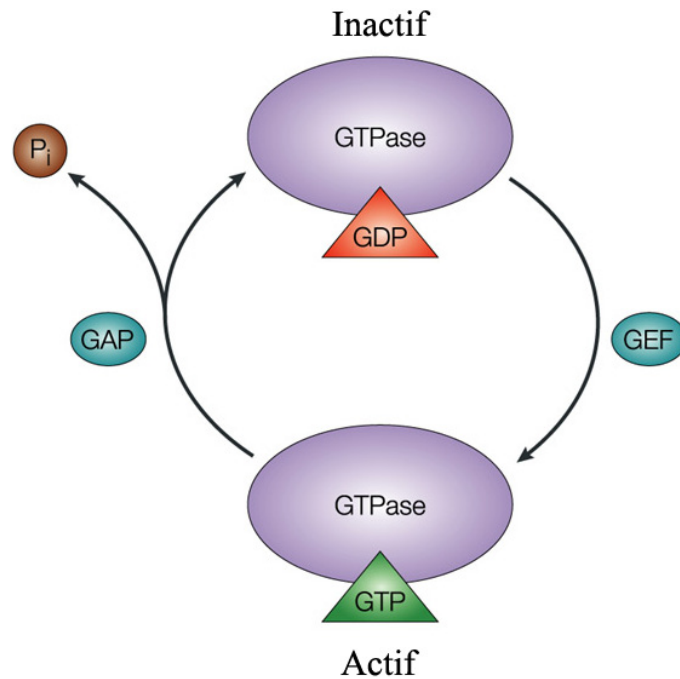
En se basant sur le mécanisme d'activation de l'EGFR, des thérapies ciblées sont présentement en développement dans le but de traiter les patients atteints du cancer de sein. Ces thérapies peuvent être divisées en au moins 2 catégories, soit les inhibiteurs de l'activité kinase du récepteur, ainsi que les inhibiteurs de la dimérisation ou de la liaison du ligand.

Les inhibiteurs de l'activité kinase sont des petites molécules inhibitrices se fixant au site de liaison à l'ATP du domaine tyrosine kinase intracellulaire de l'EGFR, empêchant ainsi la signalisation du récepteur. Malheureusement, la majorité de ces molécules, tel que l'erlotinib ou le gefitinib, n'ont démontré qu'un taux de réponse pas plus haut que 5% chez les patients atteints de cancer du sein métastatique (125). Les inhibiteurs de la dimérisation/liaison au ligand consistent plutôt en des anticorps monoclonaux dirigés contre la portion extracellulaire du récepteur. Un de ces inhibiteurs, le cetuximab, est actuellement approuvé pour le traitement de certains carcinomes colorectaux métastatiques (Santé Canada, 2012). Néanmoins, les études cliniques portées jusqu'à présent dans le contexte du cancer du sein n'ont démontré qu'une faible efficacité lorsqu'administré en combinaison (126,127).

Le manque d'efficacité global associé aux thérapies ciblant l'EGFR remet en question le développement de telles futures drogues pour le cancer du sein. Toutefois, les protéines impliquées dans la signalisation de ce récepteur demeurent des cibles potentielles intéressantes. Parmi les protéines impliquées dans les voies de signalisation de l'EGFR, les petites protéines G monomériques représentent une cible prometteuse en raison de leurs nombreuses implications dans le cancer du sein (128,129).

### **1.3. Les petites protéines G monomériques**

Les petites protéines G monomériques, également appelées GTPases, appartiennent à une famille d'enzymes ayant la capacité de lier les nucléotides guanyliques. Tel qu'illustré dans la **figure 5**, la régulation de ces protéines se fait sous le contrôle de protéines régulatrices permettant à la petite protéine G de cycler entre son état actif et son état inactif. D'une part, les facteurs d'échange de nucléotide guanylique (GEF) stimulent l'échange d'une molécule de guanosine diphosphate (GDP) pour une molécule de guanosine triphosphate (GTP), activant ainsi la GTPase qui interagira avec ses effecteurs. À l'opposé, les protéines activatrices de GTPase (GAP) catalysent l'activité hydrolase intrinsèque de la GTPase, permettant ainsi l'inactivation de la GTPase en hydrolysant le GTP en GDP.



**Figure 5. Le cyclage des GTPases**

Les GTPases possèdent une activité hydrolase intrinsèque. Celles-ci sont toutefois sous le contrôle de protéines régulatrices, leur permettant de cycliser entre leur état inactif (lié au GDP) et leur état actif (lié au GTP). Les GAPs catalysent la réaction d'hydrolyse du GTP en GDP. Les GEFs favorisent le remplacement du GDP par du GTP. (*Inspiré de Taylor et al., 2004*) (130)

Jusqu'à présent, plus d'une centaine de petites protéines G monomériques ont été identifiées chez l'eucaryote (131). Celles-ci constituent la superfamille Ras, un nom faisant référence au premier membre à avoir été découvert, soit l'oncogène Ras (132). Les petites protéines G sont classifiées en au moins 5 familles selon leur homologie de structure : la famille Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf et Ran (133). Les membres de la famille Ras sont principalement connus pour réguler l'expression génique (134-136). Ceux de la famille des Rho ont de plus été montrés comme des protéines importantes pour la réorganisation du

cytosquelette (137-141). Les membres de la famille de Rab (142-144) et Sar1/ARF (145-148) sont d'avantage connus pour réguler le trafic vésiculaire intracellulaire. Finalement, les membres de la famille Ran régulent le transport nucléocytoplasmique pendant la phase G1, S et G2 du cycle cellulaire (149,150) et l'organisation des microtubules pendant la phase M (151,152).

### **1.3.1. La famille des facteurs d'ADP-ribosylation**

Les facteurs d'ADP-ribosylation (ARF) sont des petites protéines G monomériques de 20 kDa faisant parti de la superfamille de Ras. La famille des ARFs est composée de 6 isoformes regroupées en 3 classes selon leur similarité de séquence : la classe I incluant ARF1, ARF2 et ARF3, la classe II comprenant ARF4 et ARF5, et la classe III contenant ARF6. Bien que présents chez la plupart des mammifères, le gène codant pour l'isoforme ARF2 semble avoir été perdu au courant de l'évolution (153).

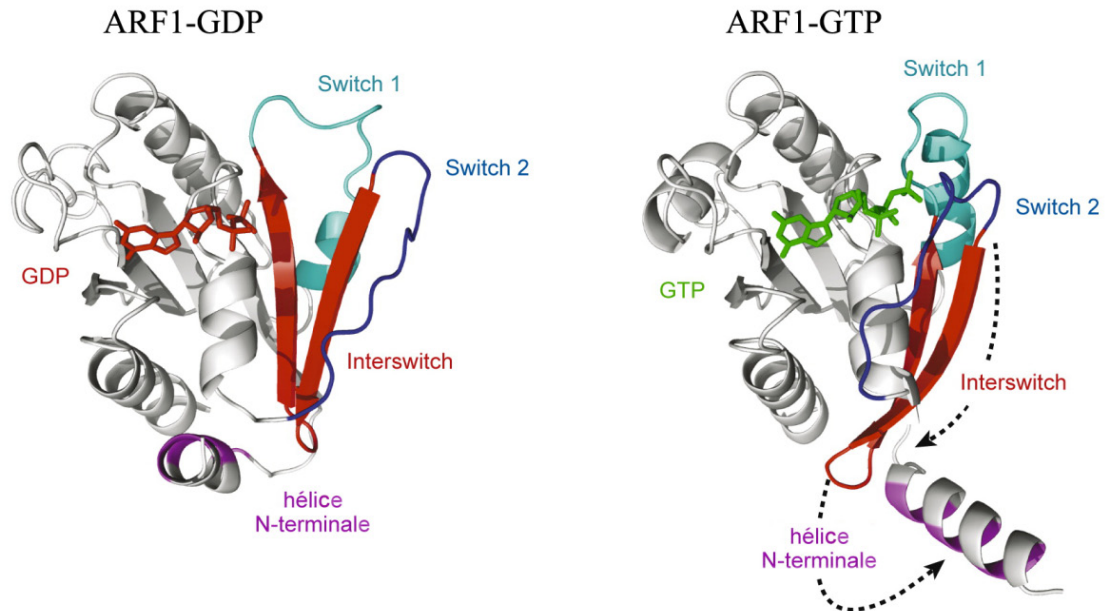
Les membres de la classe I et II possèdent des fonctions redondantes puisque l'inhibition de l'expression de chacun de ces membres individuellement n'affecte pas la morphologie du Golgi (154). Ceux-ci sont principalement localisés au niveau de l'appareil de Golgi et des endosomes où ils régulent les voies de sécrétion cellulaires. Dans leur état inactif, les ARFs de classe I/II sont localisés dans le cytosol puis, lorsqu'activés, transloquent au niveau des compartiments membranaires du Golgi où ils recrutent des protéines essentielles à la formation de vésicules et au trafic rétrograde (Golgi vers réticulum endoplasmique) et antérograde (réticulum endoplasmique vers Golgi) (155).

L'unique membre constituant la classe III, ARF6, est structurellement et fonctionnellement moins similaire que les isoformes des autres classes. Dans son état inactif, ARF6 est localisé dans les compartiments endosomaux puis, lorsqu'activé, transloque au niveau de la membrane plasmique (146,156). ARF6 est impliqué dans plusieurs processus tels que le trafic membranaire via la régulation du métabolisme lipidique (157), l'internalisation de

certains récepteurs couplés aux protéines G aux compartiments endosomaux (158), ainsi que le remodelage du cytosquelette d'actine (159,160).

#### **1.3.1.1. La structure des ARFs**

Les membres familles des ARFs possèdent certaines caractéristiques structurales communes. Tout d'abord, ils possèdent une hélice amphipathique en N-terminal leur permettant de s'insérer aux membranes. Cette hélice distingue la famille des ARFs des autres familles de GTPases qui possèdent plutôt une modification lipidique en C-terminal (161). Une autre caractéristique des ARFs réside dans le fait que leur liaison au GTP cause le déplacement d'une boucle située entre les régions *switch* et permettant le déplacement de l'hélice amphipathique N-terminale loin du site de liaison au GTP. Cette boucle, formée d'un feuillet beta et constituant la région *interswitch*, provoque ainsi le déplacement de l'hélice d'une poche hydrophobe vers une région hydrophobe adjacente telle qu'une membrane cellulaire (**Figure 6**) (162). L'insertion de l'hélice est nécessaire aux fonctions de la ARF aux membranes (163). De plus, les ARFs sont modifiées par myristoylation sur leur second résidu glycine en N-terminale. Cette modification est également requise pour son recrutement membranaire (164).



**Figure 6. La structure tridimensionnelle d'ARF1**

La liaison d'ARF1 au GTP modifie la conformation des régions *switch* et cause le déplacement d'une boucle constituée de la région *interswitch*. Cette modification permet le déplacement de l'hélice amphipathique N-terminale d'une poche hydrophobe vers une région hydrophobe adjacente. (*Inspiré de Gillingham et al., 2007*) (162)

### 1.3.1.2. La régulation de l'activité des ARFs

Il existe au moins 15 différents facteurs d'échange de nucléotides guanyliques (GEF) pour les ARFs. Ceux-ci jouent un rôle déterminant dans la quantité et la distribution spatiotemporelle des ARFs activées (165). Bien qu'exprimant une faible homologie de séquence, les différentes ARF GEFs possèdent une région centrale commune de 200 acides aminés connue comme le domaine Sec7 avec lequel elles interagissent avec les ARFs (166). L'interaction avec une ARF, via ce domaine Sec7, est nécessaire et suffisante pour permettre l'activité de la GEF (167). La brefeldine A, un antibiotique de type lactone, est



connue pour inhiber l'activité de certaines GEFs en interagissant avec celles-ci au niveau de leur domaine Sec7 (168). Ce mécanisme a pour effet l'inhibition du transport antérograde au profit du transport rétrograde, occasionnant une accumulation de protéines au niveau du RE et provoquant éventuellement la désintégration de l'appareil de Golgi (169). Les GEFs n'étant pas tous sensibles à la brefeldine A (170), plusieurs autres inhibiteurs d'ARF GEFs ont été développés dans le but d'étudier la fonction des ARFs ainsi que pour le développement de traitements ayant pour but la modulation de l'activité des ARFs. Parmi les plus connus, on retrouve le LM11 qui agit à titre d'inhibiteur non-compétitif du complexe formé par ARF1-GDP et d'une de ses GEFs cytohésine-2 (171). D'autres inhibiteurs, tel que la SecinH3, agissent de façon moins spécifique en liant les cytohésines 1 à 3 (172).

À l'opposé, plus de 15 gènes codent pour des protéines activatrices de GTPases (GAP) ciblant les ARFs ont été identifiées. Chacun de ces membres contient un domaine catalytique ARF GAP conservé formé d'un domaine doigts de zinc responsable de l'hydrolyse du GTP lié à la ARF (173). Bien qu'inactivant les ARFs, ces protéines peuvent également être perçues comme des régulateurs positifs de la fonction des ARFs en permettant leur cyclage, un processus essentiel la complétion de plusieurs fonctions des ARFs (156,174). Ainsi, il n'est pas étonnant que les ARF GAPs soient impliqués dans plusieurs fonctions des ARFs telles que l'adhésion cellulaire, la migration cellulaire et l'invasion cellulaire (175,176).

### **1.3.1.3. La GTPase ARF1**

ARF1 est une GTPase de 21 kDa ubiquitaire et hautement conservée chez les mammifères (177). Comme les autre membres de la classe I/II, cette isoforme possède un motif MXXE permettant sa localisation à l'appareil de Golgi où elle y exerce plusieurs fonctions (178). Classiquement, ARF1 permet de recruter des protéines effectrices essentielles aux voies de sécrétion golgiennes, telles que les coatomères, la protéine adaptatrice de clathrine 1 et les

protéines GGA (179). ARF1 contribue également au maintien de la morphologie et à l'orientation du Golgi en régulant le cytosquelette d'actine et en activant des enzymes de modification lipidiques au niveau des membranes (178). La forme active d'ARF1 a également été retrouvée localisée au niveau de la membrane plasmique (74,180-182), notamment via son activation par des facteurs de croissance.

Dans le contexte du cancer, la GTPase ARF1 a entre autre été retrouvée surexprimée dans les carcinomes gastriques (183) ainsi que dans les cellules de cancer du sein hautement invasifs. Dans les cellules mammaires cancéreuses, ARF1 contrôle l'activation de la PI3K, ce qui a pour effet de réguler la prolifération ainsi que la migration cellulaire (74). Plus précisément, ARF1 contrôle la prolifération en régulant l'association du suppresseur de tumeur pRB au facteur de transcription E2F1 (184). Le mécanisme permettant à ARF1 de contrôler la migration cellulaire demeure, quant à lui, incompris. Les études menées sur ARF6 suggèrent néanmoins une voie de signalisation impliquant des membres de la famille des Rho GTPases (185).

### **1.3.2. La famille des Rho**

Les membres de la famille des Rho sont des petites protéines G monomériques regroupant au moins 22 protéines (186). Chez l'humain, les membres de cette famille sont divisés en 6 classes: Rho (RhoA, RhoB et RhoC), Rac (Rac1, Rac2, Rac3 et RhoG), Cdc42 (Cdc42, Tc10, TCL, Chp/Wrch-2 et Wrch-1), RhoBTB, Rnd et RhoT (187). Les Rho GTPases jouent un rôle dans de nombreux processus cellulaires tels que la réorganisation du cytosquelette, la progression du cycle cellulaire, l'expression génique, la polarité cellulaire, la migration et la transformation cellulaire (188-192). Parmi les membres les plus étudiés, RhoA, Rac1 et Cdc42 sont surtout connus pour leur implication essentielle dans la régulation et l'organisation des filaments d'actine nécessaire à la morphogénèse et aux mouvements cellulaires (193). Classiquement, RhoA est associé aux fibres de stress, Rac1 à la formation de lamellipodes, et Cdc42 à la formation de filopodes (194). Pour être en

mesure d'être dirigés à la membrane plasmique, les Rho GTPases subissent des modifications post-traductionnelles telles que l'ajout d'un groupement farnesyl ou geranylgeranyl sur une séquence CAAX située en C-terminal (195). Un second signal immédiatement en amont de la séquence CAAX consiste en une région polybasique ou sur une cystéine servant de site pour la palmitoylation (196,197).

### **1.3.2.1. La régulation de l'activité des Rho**

Tel que décrit précédemment, les Rho GTPases sont sous le contrôle de GEFs et de GAPs permettant le cyclage entre leur état actif lié au GTP et leur état inactif lié au GDP. Toutefois, une troisième classe de protéines intervient dans le cyclage de la majorité des Rho GTPases, soit les inhibiteurs de la dissociation du GDP (Rho GDI).

Sous leur forme liée au GDP, les Rho GTPases sont principalement séquestrées dans le cytosol par les Rho GDIs, ce qui prévient l'échange GTP/GDP. Une dissociation de Rho GDI doit donc se produire pour que la GTPase soit activée. Lors d'une activation cellulaire, les Rho GTPases sont relâchées par les Rho GDI et peuvent donc être activées afin d'être transloquées aux membranes (198). En régulant leur activité, les Rho GDIs jouent donc un rôle important dans la régulation de la localisation des RhoGTPase entre les membranes et le cytoplasme et, par conséquent, influencent aussi leurs fonctions effectrices (199,200).

Les Rho GEFs, quant à elles, peuvent être regroupées en 2 sous-familles (201). La première, dont le génome humain a révélé 69 membres, regroupe les RhoGEFs partageant tous un domaine d'homologie à la protéine Dbl (domaine DH) nécessaire à leur activité catalytique (202). Ils possèdent également un domaine d'homologie à la pleckstrine régulant l'activité de ce domaine DH et leur permettant d'être localisées à la membrane plasmique par liaison aux lipides (203). Parallèlement, la seconde sous-famille regroupe 11 membres comprenant le domaine d'homologie à la région Dock et dont de nombreux membres sont spécifiques à Rac (204,205). Les RhoGEFs possèdent également d'autres domaines importants pour la signalisation tels que le domaine SH3 ou le domaine doigts de

zinc (206). La spécificité des RhoGEFs envers leur effecteur est déterminée par une poche formée par la région switch I, switchII et les régions formés par les brins  $\beta$ 1-3 des RhoGTPase (207). Par exemples, le résidu Trp58 de RhoA, le résidu Phe56 de Cdc42 et le résidu Trp56 de Rac1 sont considérés comme des discriminants importants dans la spécificité du domaine DH de plusieurs RhoGEFs envers les Rho GTPases (208). L'analyse de ces informations structurelles a permis la synthèse du NSC23766, un inhibiteur spécifique de l'interaction entre Rac1 et certaines de ses GEFs qui n'affecte pas les autres GTPases tel que RhoA ou Cdc42 (209).

De façon intéressante, la ARF GEF ARNO a été identifiée comme importante pour la régulation de Rac1 (185). De plus, plusieurs ARF GAPs telles que Git1 (210) ou les ARAPs (211) ont également démontré des fonctions similaires. Un lien semble donc exister entre la famille des ARF et des Rho et puisque cette dernière famille est reconnue pour son implication dans la migration cellulaire, il semblerait que les ARFs puissent exercer un contrôle sur l'activité des Rho dans le but de moduler la migration cellulaire.

#### **1.3.2.2. La GTPase Rac1**

La famille de Rac comprend les isoformes Rac1, Rac2, Rac3 et RhoG (212). Celles-ci ont un niveau d'homologie élevé alors que la plus grande divergence se retrouve dans la queue C-terminale, aussi connue comme la région hypervariable de Ras (213). L'isoforme Rac1 est exprimée de façon ubiquitaire, Rac2 est uniquement exprimée dans les cellules hématopoïétiques, et Rac3 est principalement exprimée dans le cerveau (186).

La délétion du gène RAC2 ou RAC3 permet le développement normal de souris, bien que des défauts soient observés dans l'érythropoïèse (214) et au niveau neuronal (215) respectivement. La délétion du gène RAC1 est, quant à elle, létale puisque Rac1 est essentielle à la motilité cellulaire nécessaire à la gastrulation, une étape précoce du développement embryonnaire (216). Ce fait démontre bien un des rôles les plus étudiés de Rac1, soit son implication essentielle dans la migration cellulaire (159,217-220).

En plus de ses fonctions de migration, Rac1 est impliquée dans plusieurs processus tels que la prolifération, la survie, la différenciation et l'adhésion cellulaire (221-224). Ainsi, il n'est pas étonnant que Rac1 soit un oncogène pour plusieurs types de cancers. En effet, une dérégulation de la signalisation de Rac1 peut survenir suite à la surexpression ou la suractivation de la GTPase, affectant ainsi le niveau d'expression ou d'activation de ses effecteurs en aval (225). Une dérégulation de la signalisation de Rac1 a d'ailleurs été observée dans le cancer des testicules (226), dans le carcinome gastrique (227), dans le carcinome à cellules squameuses (228) et dans le cancer du sein (229). De plus, un variant d'épissage de Rac1 faiblement exprimé dans les cellules normales, Rac1b, montre une expression significativement élevée dans les tumeurs colorectales (230) et le cancer du sein (231). D'un point de vue structurel, ce variant possède les propriétés biochimiques d'une GTPase constitutivement active (232). Finalement, alors que les mutations de Rac1 aient rarement été identifiées dans un contexte de cancer, une mutation somatique non-sens du codon 29 de Rac1 a récemment été découverte dans plus de 9% des mélanomes liés à l'exposition au soleil (233). L'expression protéique du mutant Rac1(P29S), qui possède une activité accrue envers les effecteurs de Rac1 (234), engendre une augmentation de la prolifération, de la migration cellulaire, et stimule l'ondulation membranaire ainsi que la signalisation via les MAPK (235). Cette découverte place Rac1 parmi les trois proto-oncogènes les plus communs dans le mélanome, évoquant par le fait même la possibilité qu'une inhibition des effecteurs de la signalisation de cette Rho GTPase puisse être bénéfique d'un point de vue thérapeutique.

#### **1.4. La migration cellulaire**

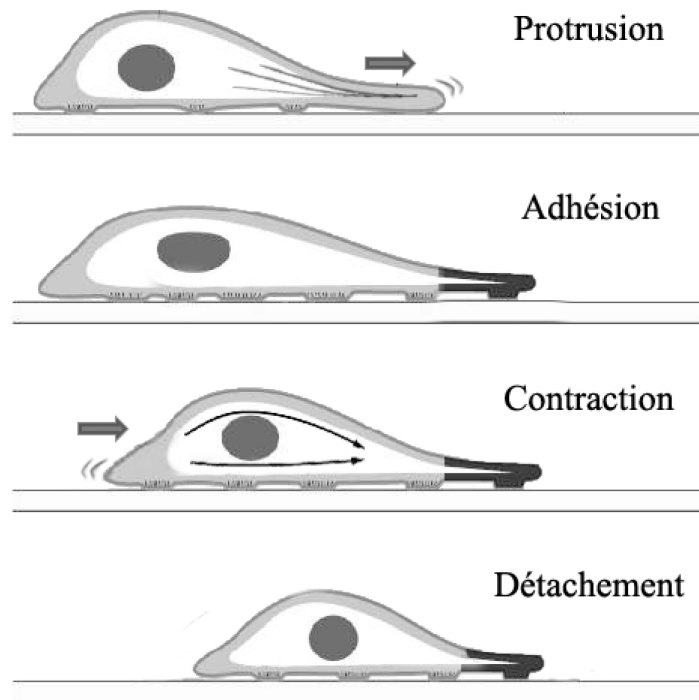
Tel qu'illustré à la **figure 7**, la migration cellulaire peut être divisée en 4 étapes: la formation d'une protrusion, l'adhésion, la contraction du corps cellulaire et le détachement de l'arrière. Dans le contexte du cancer du sein, la motilité cellulaire est nécessaire à la formation de métastases et constitue donc une cible intéressante pour freiner l'évolution de la tumorigenèse vers un caractère malin.

La migration cellulaire est habituellement initiée en réponse à un signal pouvant provenir de facteurs présents dans le milieu extracellulaire, de la matrice extracellulaire ou de cellules voisines (225). Ces signaux activent les récepteurs transmembranaires qui stimulent les voies de signalisation intracellulaires menant à l'initiation de la migration cellulaire.

La protéine du syndrome de Wiskott–Aldrich (WASP) et la protéine homologue à la verproline de la famille des protéines du syndrome Wiskott-Aldrich (WAVE) sont des facteurs contrôlant la polymérisation de l'actine (236). Au niveau moléculaire, ces protéines permettant l'assemblage des monomères d'actine via le complexe de la protéine reliée à l'actine 2/3 (Arp2/3). Ce complexe se lie aux filaments d'actine pré-existants et agit à titre de site de nucléation pour la formation d'un nouveau filament d'actine. De cette façon, Arp2/3 promeut la formation d'un réseau de filaments en branches, ce qui permet l'extension graduelle d'une protrusion membranaire du nom de lamellipode (237,238). La famille des protéines WASP/WAVE est régulée via de nombreuses protéines. D'une part, WASP peut être activée par la GTPase Cdc42, le PIP2, WIP/verproline et certaines protéines au domaine SH3 (239,240). Parallèlement, WAVE est connue pour être activée par la GTPase Rac1 sous sa forme GTP (241). Toutefois, puisque WAVE ne possède pas de domaine liant les GTPases (242), il a été démontré que le substrat p53 du récepteur tyrosine kinase à l'insuline (IRSp53) agit à titre de protéine adaptatrice pour permettre la liaison de Rac1 à WAVE2 (243-245).

Lors de la formation du lamellipode, la cellule forme des complexes d'adhésions permettant la stabilisation de cette protrusion en l'attachant à la matrice extracellulaire (246). Selon le mouvement du lamellipode, les complexes d'adhésions peuvent se défaire ou mûrir en adhésions focales larges et stables permettant l'ancrage solide du lamellipode à la matrice extracellulaire (247). Il a d'ailleurs été démontré que Rac1 est important pour l'assemblage de ces adhésions via le recrutement d'intégrines (248). Il est essentiel que ces complexes puissent être éventuellement désassemblés pour permettre à la cellule de poursuivre sa migration (249). Lorsque formés, les adhésions focales servent de points

d'ancrage sur lesquels la cellule peut se tirer pour avancer. Le processus par lequel la cellule rétracte son corps cellulaire vers l'avant de façon dépendante de l'actomyosine consiste en l'étape de contraction (250). À fur et à mesure que la cellule se propulse vers l'avant, le détachement des adhésions focaux libère la cellule qui pourra recommencer ces étapes de migration. Le cyclage entre l'attachement et le détachement de la cellule à la matrice contribue largement à déterminer la vitesse de migration (251).



**Figure 7. La migration cellulaire**

La migration cellulaire peut être décrite comme un processus cyclique. En réponse à un signal externe, la cellule se polarise et l'extension d'une protrusion se produit en direction du mouvement. La protrusion formée, des adhésions la fixe au substrat sur lequel la cellule migre. Ces adhésions servent, en partie, de points de traction pour la migration, et initient des signaux régulant la dynamique d'adhésion et l'activité des protrusions. Le corps cellulaire est ensuite déplacé à l'avant par contraction et les adhésions de la queue de la cellule sont relâchées pendant que la cellule se rétracte.

### 1.4.1. La protéine IRSp53

Le substrat p53 du récepteur tyrosine kinase à l'insuline (IRSp53) est une protéine adaptatrice possédant un domaine d'homologie IRSp53-MIM (IMD) en N-terminal, un domaine de liaison à Cdc42/Rac (CRIB) partiel en position centrale ainsi qu'un domaine SH3 en C-terminal (252).

Le domaine IMD, également connu comme le domaine I-BAR, permet la liaison aux lipides et peut induire des protrusions membranaires sur les membranes riches en PIP2 (253-255). Il a d'ailleurs été démontré que l'expression ectopique du domaine IMD d'IRSp53 permet d'induire des extensions en périphérie des cellules (256). Ainsi, grâce à son habileté à lier les lipides, on retrouve IRSp53 principalement localisée au niveau de la membrane plasmique et enrichie aux extrémités des lamellipodes (245,257). De façon intéressante, l'inhibition de l'expression endogène d'IRSp53 permet de réduire la formation de lamellipodes (257). Rac1 étant impliqué dans la formation de lamellipodes, ce dernier résultat suggère une implication synergique de ces deux protéines dans le processus migratoire.

Bien que le domaine CRIB soit connu pour lier Cdc42 et Rac1, celui d'IRSp53 est atypique et ne lie que Cdc42 activé (258). En revanche, les acides aminés positivement chargés en N-terminal du domaine IMD sont responsables de la liaison à Rac1. Ainsi, IRSp53 possède deux sites de liaison distincts pour chacune de ces GTPases, suggérant que cette protéine adaptatrice puisse exercer des fonctions effectrices indépendantes propres à Cdc42 et Rac1 (252). De plus, IRSp53 possède un domaine SH3 permettant sa liaison aux séquences riches en proline de WAVE2 et N-WASP (244,253,259). Ainsi, IRSp53 constitue une protéine clé dans la liaison indirecte entre Rac1 et WAVE2. Ce complexe étant nécessaire afin que Rac1 exerce son rôle activateur sur WAVE2, IRSp53 joue un rôle important dans la polymérisation de l'actine. En somme, de par son habileté à interagir avec l'actine et les membranes, IRSp53 représente une protéine majeure dans la migration cellulaire en assurant le lien moléculaire entre la réorganisation du cytosquelette d'actine et la déformation de la membrane plasmique nécessaire à l'extension du pseudopode. Cette



protéine a d'ailleurs été reportée pour son implication dans la motilité cellulaire ainsi que dans le caractère invasif de cellules de cancer du sein (260).

### **1.5. Hypothèse de recherche**

Il a été démontré par notre laboratoire qu'ARF1 est surexprimée dans les cellules tumorales hautement invasives (74). Cette protéine contribue à la forte migration cellulaire observée suite à leur stimulation à l'EGF. La motilité cellulaire étant fortement associée aux fonctions de la GTPase Rac1, nous avons émis l'hypothèse qu'ARF1 exerce un contrôle sur cette dernière afin de moduler la migration cellulaire.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons recouru à la technique de l'interférence à l'ARN afin de diminuer l'expression d'ARF1 dans les MDA-MB-231, une lignée cellulaire très invasive de cancer du sein surexprimant ARF1 de façon endogène. Nous avons d'abord examiné l'importance de l'expression d'ARF1 sur la migration. Nous avons ensuite déterminé l'influence d'ARF1 sur l'activité de Rac1. Nous avons finalement analysés les mécanismes moléculaires par lesquels ARF1 module les fonctions de Rac1.

## CHAPITRE II. ARTICLE

### **ARF1 regulates cell migration of highly invasive cancer cells through interaction between Rac1 and IRSp53**

Sebastian Lewis-Saravalli, Shirley Campbell & Audrey Claing

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC,  
Canada H3C 3J7

Correspondence should be addressed to:

Audrey Claing,  
P.O. Box 6128, Downtown station,  
Montreal (QC)  
Canada  
H3C 3J7  
Telephone: (514) 343-6352  
Fax: (514) 343-2291

**Running title:** ARF1 regulates Rac1 and IRSp53 in MDA-MB-231

**Keywords:** Epidermal Growth Factor Receptor/ ADP-ribosylation Factor-1/ Rac1/ breast cancer/ cell migration/IRSp53.

[ARTICLE EN PRÉPARATION]

## Résumé

Les facteurs d'ADP-ribosylation sont des petites protéines G monomériques importantes pour la réorganisation du cytosquelette d'actine, le remodelage des lipides membranaires et la formation de vésicules. Notre laboratoire a précédemment montré qu'ARF1 est surexprimé dans les cellules hautement invasives du cancer du sein et contribue à leur forte prolifération ainsi qu'à leur phénotype migratoire. Dans cette étude, nous proposons de définir le rôle d'ARF1 sur l'activation de Rac1, un membre de la famille des GTPases Rho impliqué dans la formation de lamellipodes et la migration cellulaire. Globalement, nous avons évalué si l'activation d'ARF1 peut affecter l'activation de Rac1 et de la voie de signalisation nécessaire au processus de migration. Par une approche d'interférence à l'ARN dans les cellules MDA-MB-231, nous avons d'abord déterminé la contribution essentielle de Rac1 la migration dépendante d'ARF1. D'un point de vue mécanistique, nous avons montré que l'inhibition de l'expression endogène d'ARF1 altère l'activation de Rac1 dépendante de l'EGF. Nous avons ensuite examiné les conséquences d'un tel effet sur les partenaires d'interaction de Rac1. Nous avons découvert qu'ARF1 et Rac1 forment un complexe constitutif mais qu'ARF1 est nécessaire à l'association dépendante de l'EGF de Rac1 à IRSp53, une protéine importante dans la formation de lamellipodes. Lorsque dans l'impossibilité d'interagir, la translocation complexe Rac1/IRSp53 à la membrane plasmique était considérablement inhibée. En conclusion, cette étude fournit un nouveau mécanisme par lequel ARF1 régule la migration cellulaire et identifie cette GTPase en tant que cible pharmacologique prometteuse pour freiner le développement des métastases chez les patients atteints du cancer du sein.

**Abstract**

ADP-ribosylation factors (ARFs) are monomeric G proteins important for actin cytoskeleton reorganization, lipid membrane remodeling, and vesicle formation. Our laboratory has previously shown that ARF1 is overexpressed in highly invasive breast cancer cells and contribute to their enhanced proliferation and migration phenotype. In this study, we propose to define the role of ARF1 on the activation of Rac1, an important member of the Rho family of GTPases implicated in the formation of lamellipodia and in the migration process. Globally, we evaluated whether ARF1 activation could affect Rac1 activation and the signaling pathway necessary for cell migration. Using an RNAi approach in MDA-MB-231 breast cancer cells, we first determined the essential contribution of Rac1 in ARF1-dependant migration. Mechanistically, endogenous inhibition of ARF1 expression altered EGF-dependent Rac1 activation. We next investigated the consequences of such effect on Rac1 interaction partners. We showed that ARF1 and Rac1 are constitutively complexed but that ARF1 is necessary for EGF-dependent Rac1 association with IRSp53, an essential protein for lamellipodia formation. When unable to interact, Rac1/IRSp53 complex translocation to plasma membrane was considerably inhibited. In conclusion, this study provides a new mechanism by which ARF1 regulates cell migration and identifies this GTPase as a promising pharmacological target to reduce metastasis formation in breast cancer patients.

## Introduction

Breast cancer is the most common cancer among woman (1). Although considerable advances has been realized over the past years, patients with triple-negative breast cancer, which represents 15-20% of all breast cancers (2), still suffer from a limited choice of targeted therapies (3,4). In addition, the aggressive nature of this type of cancer is associated to a high risk of metastasis formation (5,6). Therefore, triple-negative breast cancer remains associated with a poor prognosis (7,8). In this regard, proteins involved in cell migration, which represent a key step in metastasis, has been considered as a promising pharmacological target in the development of new cancer treatment strategies.

The Rho GTPase family plays an important role in intracellular actin dynamics processes including cell adhesion, polarity, motility and cell-cycle progression (9-12). Among the family members, Ras related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) is known to regulate different signaling pathways to promote cytoskeleton remodeling, lamellipodia formation and cell migration (13-15). This GTPase cooperates with the Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin homologous protein (WAVE) complex to activate actin-related protein 2/3 (Arp2/3) complex, leading to actin nucleation of a network of *branched actin filaments* (16). Since WAVE proteins lack the GTPase-binding domain (17), it has been shown that the insulin receptor tyrosine kinase substrate p53 (IRSp53) acts as the adaptor protein linking Rac1 to WAVE2 to induce actin polymerization (18-20). In pathological conditions, Rac1 activation can induce invasion and metastasis of *in vitro* and *in vivo* breast cancer cell line models (21) by enhancing cell migration.

Invasiveness level of triple-negative breast cancer cells, which lack estrogen receptor, progesterone receptor and human epithelial growth factor receptor 2, is correlated with expression of the epithelial growth factor receptor (EGFR) (22). It has been shown that this receptor and its downstream proteins play a role in migration, invasion, and progression of the malignant phenotype of breast cancer cells (23). Our laboratory has previously shown that ADP-ribosylation factor 1 (ARF1), a determining GTPase implicated in actin cytoskeleton dynamics, is overexpressed in highly invasive breast tumor cell. This ARF isoform contributes to enhanced proliferation and migration phenotype following EGFR

stimulation (24).

In this study, we investigated the molecular mechanisms by which ARF1 regulates Rac1-dependent migration in MDA-MB-231, a highly invasive cell line. We opted for an RNAi approach to better define the effect of ARF1 overexpression in these cells. Our findings showed that depletion of ARF1 is associated with a reduced migratory phenotype, confirming the potential of ARF1 to inhibit cell motility. At the molecular level, we showed that the active state of ARF1 influence the EGF-dependent activation of Rac1. ARF1 was found constitutively bound to Rac1 in cells. Furthermore, depletion of ARF1 impaired the ability of Rac1 to interact with IRSp53, a key step for controlling actin nucleation. Finally, these two interaction partners lost the ability to translocate to the plasma membrane following stimulation when ARF1 expression was inhibited. The understanding by which ARF1 controls EGF-dependant cell migration is crucial for the development of future breast cancer therapies and could offer new options to patients suffering from triple-negative breast cancer.

## **Materials and Methods**

### *Reagents and Antibodies*

Polyclonal anti-ARF1 was purchased from Proteintech (Chicago, IL, USA), monoclonal anti-Rac1 from Millipore (Billerica, MA, USA) and polyclonal anti-IRSp53 from Abcam (Cambridge, MA, USA). Another polyclonal anti-IRSp53 was also purchased from Millipore for the immunocytochemistry experiments. EGF was obtained from Fitzgerald (Acton, MA, USA). Secondary antibodies coupled to an Alexa-Fluor were from Molecular Probes (Eugene, OR). All others products were from Sigma Aldrich Company (Oakville, ON, Canada).

### *DNA Plasmids and Small Interfering RNA*

Double-stranded small interfering RNA (siRNA) targeting human Rac1 (sequence: 5'-GAGGAAGAGAAAAUGCCUG-3'), human ARF1 siRNA and the non-targeting control

were purchased from Thermo Fisher Scientific (Nepean, ON, Canada). GST-Rac1( $\Delta$ CAAX) was a gift from J. D. Lambeth (Emory University, Atlanta, GA, USA). Rac1(Q<sup>61</sup>L)-myc, and GST-PAK(CRIB) were obtained from Dr. N. Lamarche-Vane (McGill University, Montreal, QC, Canada). GST-GGA3 was from Dr. J.-L. Parent (Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada).

#### *Cell Culture and Transfection*

MDA-MB-231 cells were obtained from Dr. Sylvie Mader (Université de Montréal, Montreal, QC, Canada). Cells were maintained at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and 10% penicillin/streptomycin. All cell culture reagents were purchased from Wisent Bioproducts (St-Bruno, QC, Canada). Transfection of DNA plasmids (48h) and siRNAs (72h) were conducted using Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 from Invitrogen (Burlington, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions.

#### *Wound Healing Assay*

MDA-MB-231 cells were transiently transfected in 10 cm dishes with 25  $\mu$ M of Rac1 siRNA, 50  $\mu$ M of ARF1 siRNA or 50  $\mu$ M of non-targeting siRNA. The next day, cells were seeded onto coverslips in 6-well plates. 72h post-transfection, confluent cells were serum-starved for 8h. Three scratches per well were then performed using a micropipette tip under an angle of approximately *30 degrees*. Cells were washed twice with serum deprived DMEM, treated with 10 ng/ml EGF, and left for 24h. Cells were fixed using a paraformaldehyde solution (4% in *phosphate buffered saline*, 20 min) and stained with a crystal violet solution (0.1% in 20% methanol, 16h). Images were acquired using a 10X objective on an Olympus IX81 inverted microscope. A violet pseudocolor was applied to the pictures with Adobe Photoshop CS5.1 to facilitate visualization.

### *Migration Assay*

MDA-MB-231 cells were transiently transfected with 25  $\mu$ M of Rac1 siRNA, 50  $\mu$ M of ARF1 siRNA or 50  $\mu$ M of non-targeting siRNA. 24h later, cells were transiently transfected with with 2  $\mu$ g of Rac1(Q<sup>61</sup>L)-myc DNA or the equal quantity of empty vector. 24h later, cells were trypsinized and 40,000 cells were seeded onto Transwell® permeable support of polycarbonate membrane with 8.0  $\mu$ m pore (Corning, NY, USA) coated on both sides with collagen (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). One hour later, cells were stimulated on the bottom chamber with 10 ng/ml EGF and incubated for 6h. A paraformaldehyde solution (4% in *phosphate buffered saline*, 20 min) was used to fix the cells and a violet crystal solution (0.1% in 20% methanol, 16h) for staining. Cells present in the upper chamber were removed with a cotton swab and migrated cells were quantified in the lower chamber by counting.

### *GTPase Activation Assay*

MDA-MB-231 cells were plated in 10 cm dishes and serum starved 16h. The cells were stimulated with EGF (10 ng/ml) at 37°C for the indicated times. Cells were lysed in 150  $\mu$ l of ice-cold MLB buffer (pH 7.5, 25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1% nonidet P-40, 0.3 mg/ml PMSF, 1.0 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and protease inhibitors). Samples were spun for 10 min at 12,000 g (4°C). Glutathione S-transferase-GGA3 ARF binding protein 3 (GST-GGA3) or *glutathione-S-transferase-p21-activated kinase-Cdc42/Rac interactive binding domain* (GST-PAK-CRIB) coupled to glutathione-sepharose 4B was added to each tube and incubated for 1h at 4°C. Samples were tumbled at 4 °C for 1 h. Beads were washed three times with lysis buffer and proteins were eluted in 20  $\mu$ l of SDS-sample buffer by heating to 65°C for 15 min. Detection of GTP-bound GTPases was performed by Western blot analysis using a specific anti-ARF1 or anti-Rac1 antibody.

### *Co-Immunoprecipitation Experiments*

MDA-MB-231 cells were plated in 10 cm dishes and serum starved 16h. The cells were



stimulated with EGF (10 ng/ml) at 37°C for the indicated times. Cells were lysed in 150 µl of ice-cold TGH buffer (pH 7.3, 50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100 and protease inhibitors). Samples were spun for 10 min at 12,000 g (4°C) and equal amounts of soluble protein were incubated with specific anti-ARF1 or anti-Rac1 antibodies for 1h (4°C). Protein G+ agarose beads (Santa Cruz Biotech Inc, Santa Cruz, CA, USA) were then added for 2h. Beads were washed three times with lysis buffer and proteins were eluted in 20 µl of SDS-sample buffer by heating to 65°C for 15 min. Detection of co-precipitated GTPases was performed by Western blot analysis using a specific anti-ARF1 or anti-Rac1 antibody.

#### *GST Pulldown Assay*

Purified non-myristoylated recombinant ARF1 was a gift from Dr. Nicolas Vitale. GST pulldown assays were described previously (25). Briefly, for the fusion protein loading experiments, equal amounts of GST and GST-Rac1( $\Delta$ CAAX) were incubated at 30°C with either GDP $\beta$ S (100 µM) or GTP $\gamma$ S (10 µM) for 30 min with an agitation of 900 rpm. Nucleotide loading was stopped by adding MgCl<sub>2</sub> (60 mM) at 4°C. Purified ARF1 was then added to the mixture and samples were incubated for 4h at 4°C. For ARF1 nucleotide loading experiments, the purified ARF1 was incubated with GDP $\beta$ S or GTP $\gamma$ S before being mixed with GST-Rac1( $\Delta$ CAAX) as described for the fusion protein loading experiments. Beads were then washed three times with lysis buffer. Proteins were eluted into 20 µl of SDS sample buffer by heating to 65°C for 15 min. Detection of interacting GTPases was performed by Western blot analysis using a specific anti-ARF1 or anti-Rac1 antibody.

#### *Western Blotting*

Proteins were run on polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blotted for relevant proteins using specific antibodies described in the following sections. For Rac1 detection, FITC-conjugated secondary antibody fluorescence was detected using a Typhoon 9410 scanner (Amersham Biosciences, Baie D'Urfé, QC, Canada) while the other proteins were detected by enhanced chemiluminescence of a

HRP-conjugated secondary antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

### *Immunofluorescence*

MDA-MB-231 cells were seeded onto coverslips in 6-well plates. The next day, cells were transiently transfected with 25  $\mu$ M of Rac1 siRNA, 50  $\mu$ M of ARF1 siRNA or 50  $\mu$ M of non-targeting siRNA. 48h post-transfection, cells were serum-starved for 24h. Cells were then stimulated with EGF (10 ng/ml) at 37°C for 30 min. Cells were fixed with a 4% paraformaldehyde solution for 10 min, permeabilized with a 0.1% Triton X-100 solution for 10 min and blocked with 2% BSA for 1h. The cells were subsequently incubated with the primary and secondary antibodies for 1h each. Endogenous Rac1 and IRSp53 were detected using a goat anti-mouse secondary antibody coupled to Alexa-Fluor 568 and a donkey anti-rabbit secondary antibody coupled to Alexa-Fluor 488 respectively. Images of cells after they were mounted were acquired using an epifluorescent inverted microscope (Carl Zeiss Axio Observer A1) with ZEN Pro 2011 software Blue edition. Images were finally treated using ImageJ 1.46o software (National Institutes of Health, USA).

### *Statistical Analysis*

Quantification of the digital images obtained by Western blot analysis was performed using ImageJ 1.46o software (National Institutes of Health, USA). Statistical analyses were calculated using a one-way analysis of variance followed by a Bonferroni's multiple comparison tests using GraphPad Prism Software (ver. 5.02; San Diego, CA, USA).

## **Results**

### *Depletion of ARF1 inhibits EGF-induced cell migration*

Inhibition of Rac GTPases has been shown to block the invasiveness of human breast cancer cells (26). We studied the impact of ARF1 on Rac1-dependent cell migration. Globally, we observed at least a twofold increase in the motility of MDA-MB-231 cells upon EGF stimulation (Fig. 1). In a wound healing assay, depletion of either GTPase

markedly impaired the ability of cancer cells to migrate (Fig. 1A). Similarly, depletion of Rac1 (Fig. 1C) or ARF1 (Fig. 1B) completely abrogated EGF-induced cell migration in a collagen-coated Boyden chamber assay. Furthermore, expression of a constitutively active mutant form of Rac1, Rac1(Q<sup>61</sup>L), spontaneously increased the basal level of migration to the level of control stimulated cells while resulting in a threefold increase in EGF-promoted migration. Rac1(Q<sup>61</sup>L)-myc mutant prevented EGF-induced migration without completely blocking the enhanced basal level of motility.

effect of ARF1 depletion on EGF-dependent cell migration. Taken together, these results suggest that ARF1 cooperates with Rac1 to modulate EGF-induced migration.

#### *Depletion of ARF1 inhibits EGF-dependent Rac1 activation*

We first examined the profile of ARF1 and Rac1 activation in MDA-MB-231 cells upon EGF stimulation. As shown in figure 2A, a rapid and transient activation of endogenous ARF1 was observed after 1 min stimulation whereas maximal levels of endogenous Rac1-GTP were detected after 5 min. To assess whether ARF1 and Rac1 could both act in the same signaling axis, we next investigated whether activation of one GTPase could regulate the function of the other using an RNAi approach. Depletion of ARF1 significantly inhibited EGF-dependent activation of Rac1 (Fig. 2B). However, depletion of Rac1 had no effect on ARF1 activation, suggesting that this ARF isoform acts upstream to control key processes mediating the activation of the Rho GTPase. Altogether, these results suggest that EGF-induced ARF1 activation modulates Rac1 activation in MDA-MB-231 cells.

#### *ARF1 interacts with Rac1*

We have previously shown that ARF6 can be found in complex with Rac1 upon Ang II stimulation of HEK 293 cells (25). To further address the role of ARF1 on Rac1, we examined whether these two GTPases could be found in complex in MDA-MB-231 cells. As depicted in figure 3A, endogenously expressed Rac1 was found in ARF1 co-immunoprecipitates. Interestingly, this association was not modulated by EGF stimulation.

We next examined if this interaction was direct. Using purified proteins preloaded with either GDP $\beta$ S or GTP $\gamma$ S, we observed that ARF1 can directly interact with Rac1 and that the nature of the nucleotide bound to the GTPases does not impact on their interaction (Fig. 3B). Taken together, these results suggest that in MDA-MB-231 cells, ARF1 and Rac1 are found constitutively associated independently of their activation state.

#### *ARF1 controls Rac1 interaction with IRSp53*

In renal cell carcinoma, proteins regulating the actin cytoskeleton like the Kank family of proteins have been shown to inhibit actin remodeling by preventing the interaction between Rac1 and IRSp53 (27). Since ARF1 also acts as a molecular switch to control cell migration, we investigated whether this GTPase could prevent cell motility in a similar way in breast cancer cells. As shown in figure 4A, EGF stimulation of the cells led to the formation of a complex including Rac1 and IRSp53. Maximal effect was observed after 15 min stimulation. As expected, this interaction was completely lost when Rac1 expression was knocked down in cells (Fig. 4B). Interestingly, it was also markedly reduced when cells were depleted of ARF1. In sum, these results suggest that ARF1 is required for EGF-dependent Rac1 interaction with IRSp53 and could therefore inhibit cell migration via this loss of function. Moreover, our observation that this key Rac1/IRSp53 complex is impaired could provide a mechanism by which ARF1 regulates cell migration.

#### *Depletion of ARF1 blocks the translocation of Rac1 and IRSp53 to the plasma membrane*

It has been shown that Rac1 can form an IRSp53-mediated complex with WAVE2 which translocates to the plasma membrane (18). Knowing that IRSp53 has the ability to interact with the activated form of Rac1, we next investigated the effect of ARF1 depletion on the localization of the two proteins. As depicted in figure 5, a significant pool of Rac1 and IRSp53 is found colocalized to the plasma membrane following 30 min EGF stimulation. When inhibiting the endogenous expression of ARF1, Rac1 and IRSp53 remained in the cytosol. Depletion of Rac1 was used as a negative control and drastically prevented IRSp53 targeting to the plasma membrane. Moreover, cells were unable to form EGF-induced

membrane protrusions. Altogether, these results suggest that ARF1 is necessary for membrane targeting of Rac1 and IRSp53 to the plasma membrane.

## **Discussion**

The ARF family of GTPase is known for its implication in the regulation of actin cytoskeleton. Notably, we previously showed that ARF6 (25) and ARF1 (24) are key regulators of the cell motility. In this study, we further investigated the molecular mechanism behind ARF1-dependent cell migration by establishing a role for this ARF isoform in the regulation of Rac function. These experiments were performed in highly invasive MDA-MB-231 cells which overexpress EGFR. As illustrated in figure 6, stimulation of this receptor leads to the rapid and transient activation of both ARF1 and Rac1, provoking cells to migrate. Depletion of either GTPase inhibited cell migration. Moreover, ARF1 depletion inhibited EGF-induced Rac1 activation while depletion of Rac1 did not affect ARF1 activation. Since Rac1 is known as a major regulator of actin remodeling, we investigated if an association between the two GTPases could occur. We found that ARF1 was constitutively bound to Rac1, suggesting a proximal regulation of Rac1 by ARF1. To explain the influence of ARF1 on Rac1-dependent cell migration, we looked at the interaction between Rac1 and IRSp53 and determined that the expression of ARF1 could modulate their association. This EGF-dependent interaction was correlated with relocalization of the complex to membrane protrusions when ARF1 was expressed.

Activation of Rac1 is necessary for the formation of lamellipodia, which represents a critical step in the cell migration process (28). The observation that ARF1 depletion could inhibit migration to the same extent than Rac1 evoked the possibility for a common pathway uniting the two GTPases. On neuronal cultures, it has been shown that the functional inactivation of ARF1 by ARFGAP1 could prevent Rac1 activation (29). Consistent with this result, we demonstrate that ARF1 is acting upstream of Rac1 since the inhibition of endogenous expression of ARF1 in breast cancer cells leads to a markedly reduced level of activated Rac1. Expression of ARF1 is therefore necessary for Rac1

activity, suggesting that ARF1 might influence a nucleotide loading event associated with Rac1 activation. A possible explanation would have been that ARF1 modulates Rac1 activity by physically interacting with it, since we found that the two proteins were able to interact directly. However, this association was not modulated by EGF stimulation, raising the possibility that ARF1 could rather influence Rac1 activity by forming a docking site for other proteins to complex and activate it.

It is generally believed that crosstalk between GTPases can regulate specific cellular functions in either a cooperative or antagonistic manner (30). To date, studies on ARF/Rac signaling pathway have mainly focused on ARF6 isoform (31), but a recent paper has also identified Arl4A (32), another ARF family member, as a modulator of Rac1 activity. In both cases, the GTPases are thought to crosstalk via a signaling bridge formed by the ARF GEF ARNO and the Rac GEF complex Dock180/ELMO (31,32). In a similar way, the close proximity of ARF1 and Rac1 in our model could prompt the formation of such a complex, leading to the recruitment of a Rac GEF allowing Rac1 activation. This would also explain the mechanism by which the depletion of ARF1 blocks Rac1 activity as we observed in our model, possibly by impairing the recruitment of a Rac GEF.

Rac1 is known to interact with the WAVE regulatory complex to promote actin nucleation of a network of branched actin filaments. *In vitro*, experiments have shown that the recruitment and activation of this complex by Rac1 is radically enhanced by the concomitant presence of ARF1 (33), supporting the idea that this ARF isoform acts as a cooperative modulator of Rac1 functions. According to this hypothesis, we found that ARF1 expression, in our model, is essential to the EGF-dependent Rac1 interaction with IRSp53 and to the translocation of this complex to the membrane protrusions. Interestingly, overexpression of the Rac GEF Tiam1 have also been shown to enhance IRSp53 binding to GTP-Rac1 and to promote the relocalization of IRSp53 to lamellipodia (36). Considering that MDA-MB-231 cells endogenously overexpress Tiam1, the similarity of these results would strengthen the theory by which Rac1 activation might be regulated by the ARF1. In this case, ARF1 would be considered as a major player in the activation of the WAVE regulatory complex by acting as the key modulator to the fully functional Rac1-

GTP/IRSp53/WAVE complex assembly. In addition, since it has been demonstrated that the membrane targeting of WAVE2 alone is not sufficient for WAVE2-dependent actin polymerization (18), it could be possible that ARF1, by controlling this multicomplex, induces a conformational change in WAVE2 making it available for further activation of Arp2/3 to active sites of actin assembly.

In conclusion, we have shown that ARF1 regulates cell migration of highly invasive cancer cells through Rac1 and IRSp53 interaction. Because ARF1 is highly expressed in MDA-MB-231 cells, our findings could provide new insights into the development of targeted therapies against triple-negative breast cancer.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research.

### **References**

1. Boyle, P. (2012) Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **23 Suppl 6**, vi7-vi12
2. Glenisson, M., Vacher, S., Callens, C., Susini, A., Cizeron-Clairac, G., Le Scodan, R., Meseure, D., Lerebours, F., Spyrtos, F., Lidereau, R., and Bieche, I. (2012) Identification of new candidate therapeutic target genes in triple-negative breast cancer. *Genes & cancer* **3**, 63-70
3. Andre, F., and Zielinski, C. C. (2012) Optimal strategies for the treatment of metastatic triple-negative breast cancer with currently approved agents. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **23 Suppl 6**, vi46-vi51
4. Liedtke, C., and Kiesel, L. (2012) Breast cancer molecular subtypes - Modern therapeutic concepts for targeted therapy of a heterogeneous entity. *Maturitas*

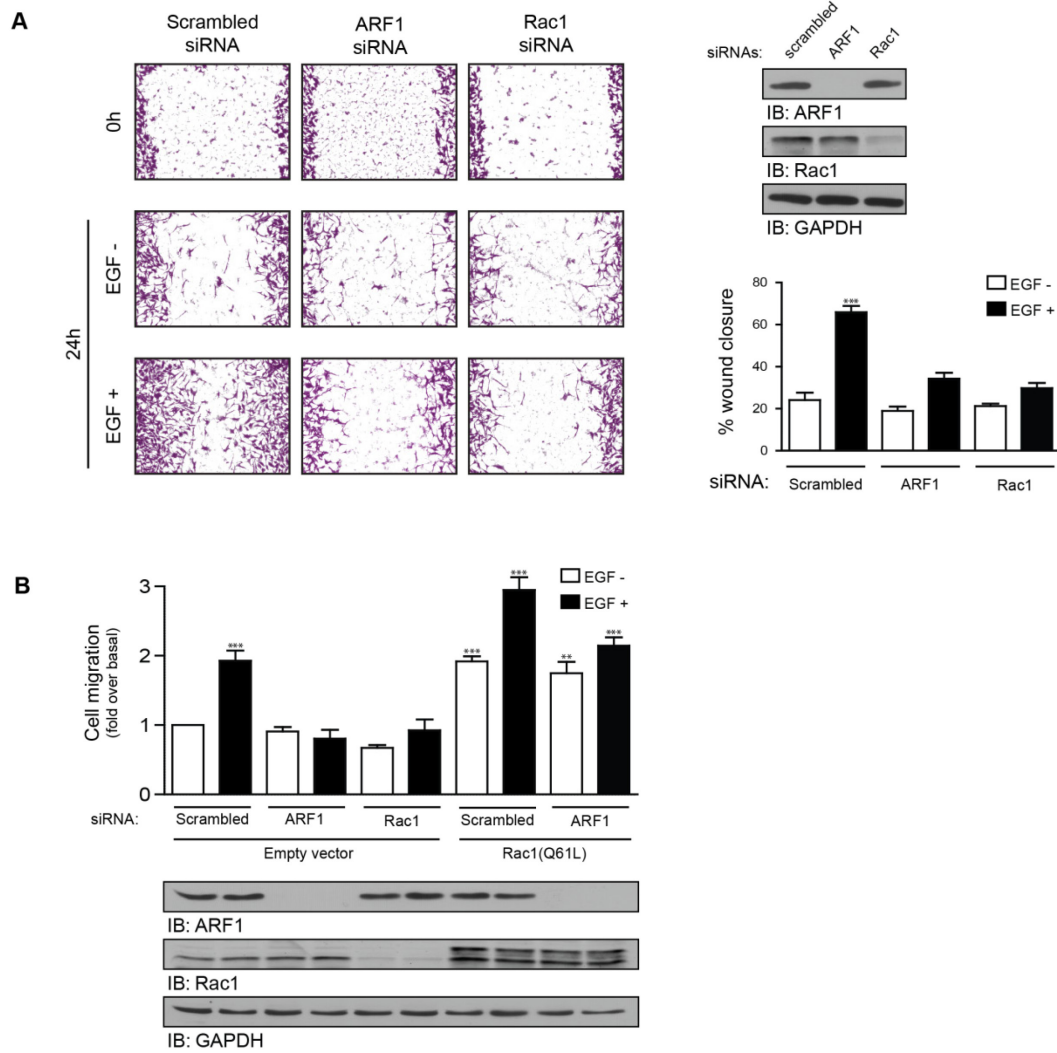
5. Kim, J. E., Ahn, H. J., Ahn, J. H., Yoon, D. H., Kim, S. B., Jung, K. H., Gong, G. Y., Kim, M. J., Son, B. H., and Ahn, S. H. (2012) Impact of triple-negative breast cancer phenotype on prognosis in patients with stage I breast cancer. *Journal of breast cancer* **15**, 197-202
6. Ossovskaya, V., Wang, Y., Budoff, A., Xu, Q., Lituev, A., Potapova, O., Vansant, G., Monforte, J., and Daraselia, N. (2011) Exploring molecular pathways of triple-negative breast cancer. *Genes & cancer* **2**, 870-879
7. Crown, J., O'Shaughnessy, J., and Gullo, G. (2012) Emerging targeted therapies in triple-negative breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **23 Suppl 6**, vi56-vi65
8. Podo, F., Buydens, L. M., Degani, H., Hilhorst, R., Klipp, E., Gribbestad, I. S., Van Huffel, S., van Laarhoven, H. W., Luts, J., Monleon, D., Postma, G. J., Schneiderhan-Marra, N., Santoro, F., Wouters, H., Russnes, H. G., Sorlie, T., Tagliabue, E., and Borresen-Dale, A. L. (2010) Triple-negative breast cancer: present challenges and new perspectives. *Molecular oncology* **4**, 209-229
9. Burbelo, P., Wellstein, A., and Pestell, R. G. (2004) Altered Rho GTPase signaling pathways in breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment* **84**, 43-48
10. Bouzahzah, B., Albanese, C., Ahmed, F., Pixley, F., Lisanti, M. P., Segall, J. D., Condeelis, J., Joyce, D., Minden, A., Der, C. J., Chan, A., Symons, M., and Pestell, R. G. (2001) Rho family GTPases regulate mammary epithelium cell growth and metastasis through distinguishable pathways. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* **7**, 816-830
11. Sahai, E., and Marshall, C. J. (2002) RHO-GTPases and cancer. *Nature reviews. Cancer* **2**, 133-142
12. Tang, Y., Olufemi, L., Wang, M. T., and Nie, D. (2008) Role of Rho GTPases in breast cancer. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **13**, 759-776
13. Jiang, P., Enomoto, A., and Takahashi, M. (2009) Cell biology of the movement of breast cancer cells: intracellular signalling and the actin cytoskeleton. *Cancer letters* **284**, 122-130



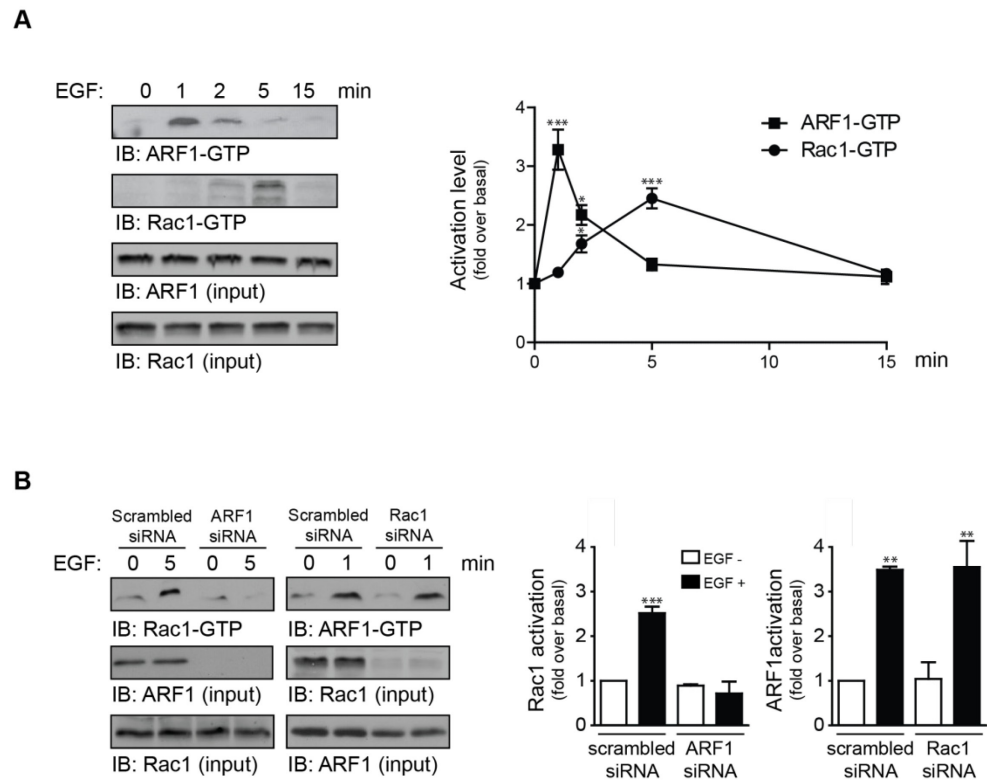
14. Nobes, C. D., and Hall, A. (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *The Journal of cell biology* **144**, 1235-1244
15. Small, J. V., Stradal, T., Vignat, E., and Rottner, K. (2002) The lamellipodium: where motility begins. *Trends in cell biology* **12**, 112-120
16. Takenawa, T., and Suetsugu, S. (2007) The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 37-48
17. Takenawa, T., and Miki, H. (2001) WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *Journal of cell science* **114**, 1801-1809
18. Abou-Kheir, W., Isaac, B., Yamaguchi, H., and Cox, D. (2008) Membrane targeting of WAVE2 is not sufficient for WAVE2-dependent actin polymerization: a role for IRSp53 in mediating the interaction between Rac and WAVE2. *Journal of cell science* **121**, 379-390
19. Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2000) IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature* **408**, 732-735
20. Nakagawa, H., Miki, H., Nozumi, M., Takenawa, T., Miyamoto, S., Wehland, J., and Small, J. V. (2003) IRSp53 is colocalised with WAVE2 at the tips of protruding lamellipodia and filopodia independently of Mena. *Journal of cell science* **116**, 2577-2583
21. Wertheimer, E., Gutierrez-Uzquiza, A., Rosemlit, C., Lopez-Haber, C., Sosa, M. S., and Kazanietz, M. G. (2012) Rac signaling in breast cancer: a tale of GEFs and GAPs. *Cellular signalling* **24**, 353-362
22. Gluz, O., Liedtke, C., Gottschalk, N., Pusztai, L., Nitz, U., and Harbeck, N. (2009) Triple-negative breast cancer--current status and future directions. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **20**, 1913-1927

23. Hsieh, C. Y., Tsai, P. C., Tseng, C. H., Chen, Y. L., Chang, L. S., and Lin, S. R. (2012) Inhibition of EGF/EGFR activation with naphtho[1,2-b]furan-4,5-dione blocks migration and invasion of MDA-MB-231 cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*
24. Boulay, P. L., Cotton, M., Melancon, P., and 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. *The Journal of biological chemistry* **283**, 36425-36434
25. Cotton, M., Boulay, P. L., Houndolo, T., Vitale, N., Pitcher, J. A., and Claing, A. (2007) Endogenous ARF6 interacts with Rac1 upon angiotensin II stimulation to regulate membrane ruffling and cell migration. *Molecular biology of the cell* **18**, 501-511
26. Katz, E., Sims, A. H., Sproul, D., Caldwell, H., Dixon, M. J., Meehan, R. R., and Harrison, D. J. (2012) Targeting of Rac GTPases blocks the spread of intact human breast cancer. *Oncotarget* **3**, 608-619
27. Roy, B. C., Kakinuma, N., and Kiyama, R. (2009) Kank attenuates actin remodeling by preventing interaction between IRSp53 and Rac1. *The Journal of cell biology* **184**, 253-267
28. Price, L. S., Leng, J., Schwartz, M. A., and Bokoch, G. M. (1998) Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Molecular biology of the cell* **9**, 1863-1871
29. Siu, K. Y., Yu, M. K., Wu, X., Zong, M., Roth, M. G., Chan, H. C., and Yu, S. (2011) The non-catalytic carboxyl-terminal domain of ARFGAP1 regulates actin cytoskeleton reorganization by antagonizing the activation of Rac1. *PloS one* **6**, e18458
30. Matozaki, T., Nakanishi, H., and Takai, Y. (2000) Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades. *Cellular signalling* **12**, 515-524
31. White, D. T., McShea, K. M., Attar, M. A., and Santy, L. C. (2010) GRASP and IPCEF promote ARF-to-Rac signaling and cell migration by coordinating the

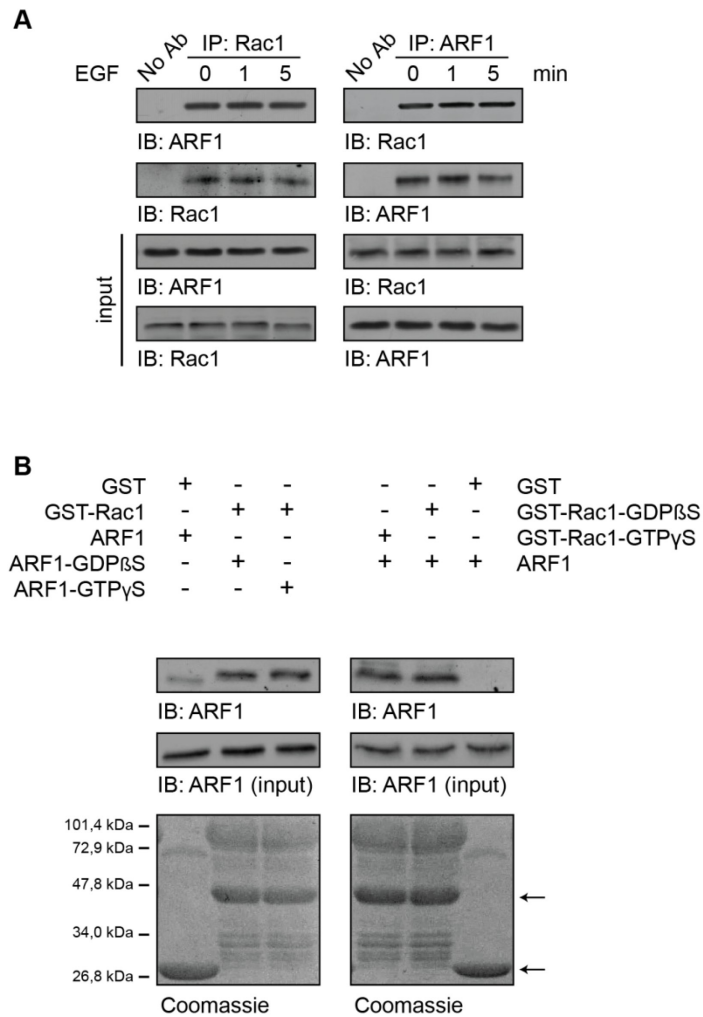
- association of ARNO/cytohesin 2 with Dock180. *Molecular biology of the cell* **21**, 562-571
32. Patel, M., Chiang, T. C., Tran, V., Lee, F. J., and Cote, J. F. (2011) The Arf family GTPase Arl4A complexes with ELMO proteins to promote actin cytoskeleton remodeling and reveals a versatile Ras-binding domain in the ELMO proteins family. *The Journal of biological chemistry* **286**, 38969-38979
  33. Koronakis, V., Hume, P. J., Humphreys, D., Liu, T., Horning, O., Jensen, O. N., and McGhie, E. J. (2011) WAVE regulatory complex activation by cooperating GTPases Arf and Rac1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 14449-14454
  34. Adams, H. C., 3rd, Chen, R., Liu, Z., and Whitehead, I. P. (2010) Regulation of breast cancer cell motility by T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein. *Breast cancer research : BCR* **12**, R69
  35. Minard, M. E., Kim, L. S., Price, J. E., and Gallick, G. E. (2004) The role of the guanine nucleotide exchange factor Tiam1 in cellular migration, invasion, adhesion and tumor progression. *Breast cancer research and treatment* **84**, 21-32
  36. Connolly, B. A., Rice, J., Feig, L. A., and Buchsbaum, R. J. (2005) Tiam1-IRSp53 complex formation directs specificity of rac-mediated actin cytoskeleton regulation. *Molecular and cellular biology* **25**, 4602-4614



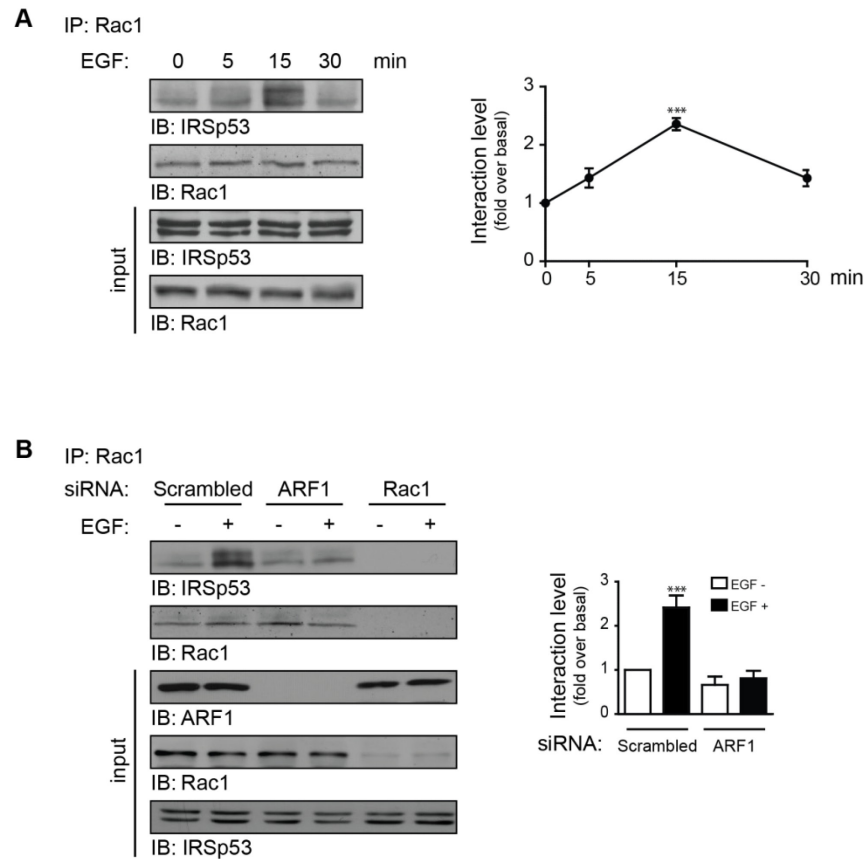
**FIGURE 1. Depletion of ARF1 inhibits EGF-induced Rac1 cell migration.** A) MDA-MB-231 cells were transfected with a scrambled, ARF1 or Rac1 siRNA. Scratches were performed on confluent cells stimulated or not with EGF (10 ng/ml). Wound healing was assessed after 24h. Images are representative of 5 independent experiments. \*\*\* $P < 0.001$  are values compared with the basal level of migration. B) MDA-MB-231 cells were transfected with ARF1 or Rac1 siRNA, constitutively active Rac1(Q<sup>61</sup>L)-myc mutant plasmid, or the appropriate amount of control (scrambled siRNA + empty vector). Cells were seeded on Boyden chambers and stimulated or not with EGF (10 ng/ml). Migration was assessed after 6h. These results are the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  are values compared with the unstimulated control condition.



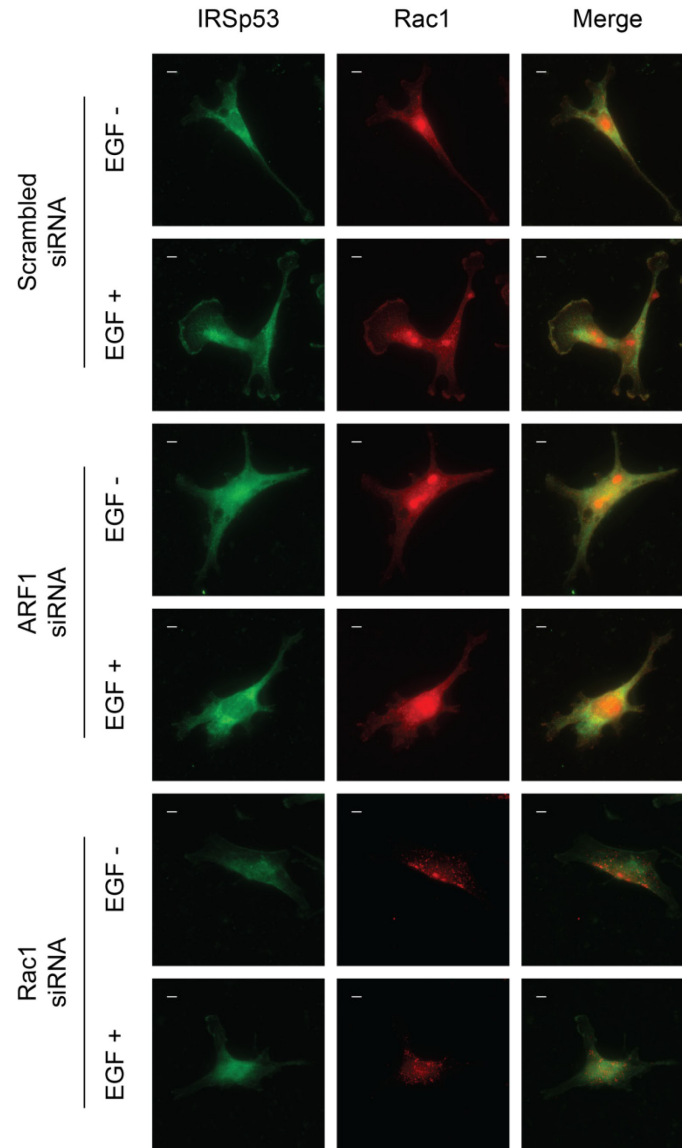
**FIGURE 2. Depletion of ARF1 inhibits EGF-dependent Rac1 activation.** A) MDA-MB-231 cells were treated with EGF (10 ng/ml) for the indicated times. Endogenous levels of activated ARF1 and Rac1 were analyzed by a GST pulldown assay and visualized by Western blotting. These results are the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  are values compared with the basal level of activation. B) MDA-MB-231 cells were transfected with a scrambled, ARF1 or Rac1 siRNA. Endogenous levels of activated GTPase were assessed as in A. These results are the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  are values compared with the basal level of activation.



**FIGURE 3. ARF1 interacts with Rac1.** A) MDA-MB-231 cells were treated with EGF (10 ng/ml) for the indicated times. Endogenous Rac1 or ARF1 was immunoprecipitated using a specific antibody and associated GTPase was examined by Western blotting. These results are representative of 3 independent experiments. B) GST-Rac1 was incubated with purified ARF1 preloaded or not with either GDP or GTP. Interacting proteins were precipitated by a GST pulldown assay and visualized by Western blotting. Inverse protocol was also performed. These results are representative of 3 independent experiments.

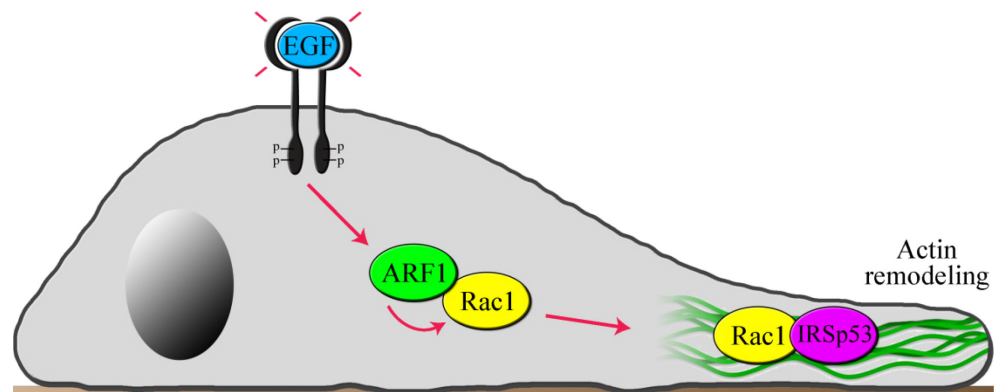


**FIGURE 4. ARF1 controls Rac1 interaction with IRSp53.** A) MDA-MB-231 cells were treated with EGF (10 ng/ml) for the indicated times. Endogenous Rac1 was immunoprecipitated using a specific anti-Rac1 antibody and associated IRSp53 was examined by Western blotting using a IRSp53 antibody. These results are the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments.  $**P < 0.01$  are values compared with the basal level of interaction. B) MDA-MB-231 cells transfected with a scrambled, ARF1 or Rac1 siRNA were stimulated or not with EGF 10 ng/ml for 15 min. These results are the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments.  $***P < 0.001$  are values compared with the basal level of interaction.



**FIGURE 5. Depletion of ARF1 blocks the recruitment of IRSp53 to cell membrane.** MDA-MB-231 cells were transfected with a scrambled, ARF1 or Rac1 siRNA. Cells stimulated or not with EGF 10 ng/ml for 30 min were fixed, permeabilized and incubated with specific anti-Rac1 and anti-IRSp53 antibodies. Labeling of Rac1 and IRSp53 was performed using a secondary antibody coupled to Alexa-Fluor 568 (red) or Alexa-Fluor 488 (green) respectively. Images are representative of at least 20 cells observed in five independent experiments.





**FIGURE 6. Model illustrating the role of ARF1 in cell migration.** EGFR stimulation promotes ARF1 activation, which in turn activates Rac1. This later activation allows Rac1 to interact with IRSp53, resulting in a complex that translocates to the membrane protrusions to stimulate actin remodeling. This process is necessary for the EGF-dependant migration of breast cancer cells.

## CHAPITRE III. DISCUSSION

La famille des ARFs est connue pour son implication dans le remodelage du cytosquelette d'actine. Nous avons précédemment démontré qu'ARF6 (159) et ARF1 (74) sont des régulateurs importants de la motilité cellulaire. Dans la présente étude, nous avons étudié les mécanismes moléculaires contrôlant la migration cellulaire dépendante d'ARF1 en décrivant une nouvelle voie de signalisation liant cette protéine à la GTPase Rac1. Ces expériences ont été réalisées dans les MDA-MB-231, une lignée cellulaire hautement invasive du cancer du sein surexprimant l'EGFR. La stimulation de ce récepteur conduit à l'activation rapide et transitoire d'ARF1 et de Rac1, stimulant la cellule à migrer. La déplétion de ces deux GTPases inhibe la migration cellulaire. De plus, la déplétion d'ARF1 inhibe l'activation de Rac1 dépendante de l'EGF alors que la déplétion de Rac1 n'affecte pas l'activation d'ARF1. Puisque Rac1 est connu comme un régulateur majeur du remodelage du cytosquelette d'actine, nous avons étudié si les deux GTPases pouvaient interagir. Nous avons démontré qu'ARF1 est constitutivement complexé à Rac1, ce qui suggère une régulation directe et proximale de Rac1 par ARF1. De façon à expliquer l'influence d'ARF1 sur la migration cellulaire dépendante de Rac1, nous avons regardé l'interaction entre Rac1 et IRSp53 et nous avons déterminé que l'expression d'ARF1 pouvait moduler leur association. Cette interaction, dépendante de l'EGF, est corrélée avec la translocation du complexe à la membrane plasmique lorsqu'ARF1 est exprimé.

### 3.1. ARF1 dans la migration cellulaire

Il a été démontré que la surexpression de régulateurs de l'activité des ARFs peut influencer des fonctions associées à Rac1. L'expression de la ARF GAP Git1, par exemple, induit le remodelage des adhésions focales, permettant ainsi d'augmenter la motilité cellulaire (261). À l'opposé, la surexpression de Git2 diminue la migration dans les cellules épithéliales mammaires en inhibant le remodelage des adhésions focales (262). Ainsi, il semble qu'un lien soit déjà établi entre la régulation des ARFs et des événements essentiels à la migration cellulaire. L'inhibition de la migration observée suite à la déplétion d'ARF1 dans

la présente étude abonde également en ce sens. De plus, le fait que cette inhibition soit équivalente à celle observée suite à la déplétion de Rac1 évoque la possibilité d'une voie de signalisation commune à ces deux GTPases. Notre laboratoire a notamment démontré qu'ARF1 contrôle la voie PI3K afin de réguler la migration cellulaire stimulée par l'EGF (74). On peut donc penser que les deux GTPases puissent emprunter cette voie pour exercer leur effet d'inhibition sur la migration.

Il a été démontré sur des cultures neuronales que l'inactivation d'ARF1 par ARFGAP1, une autre ARF GAP, permet de prévenir l'activation de Rac1 (263). Puisque l'activité de Rac1 est nécessaire à la migration cellulaire, il était donc possible d'envisager que l'inhibition de la migration cellulaire observée suite à la déplétion d'ARF1 soit le résultat d'une inhibition de l'activation de Rac1. Tel qu'attendu, l'inhibition de l'expression endogène d'ARF1 dans les cellules de cancer du sein conduit à une réduction marquée des niveaux d'activation de Rac1. La déplétion de Rac1, quant à elle, n'a eu aucun effet sur l'activation d'ARF1, ce qui place ARF1 en amont de Rac1. Dans notre modèle, l'expression d'ARF1 est donc nécessaire à l'activité de Rac1, ce qui suggère qu'ARF1 puisse contrôler une étape impliquée dans l'échange nucléotidique essentielle à l'activation de Rac1.

### **3.2. La communication entre ARF1 et Rac1**

Sachant qu'un lien existe entre ARF1 et Rac1, nous nous sommes intéressés au mécanisme moléculaire régissant cette régulation. Considérant qu'ARF1 exerce une influence sur l'activation de Rac1, on peut penser qu'ARF1 puisse réguler Rac1 de deux manières : directement, ou via des protéines intermédiaires influençant l'activité de Rac1.

Afin de vérifier la première hypothèse, nous avons étudié l'interaction entre ces 2 protéines. La dimérisation entre GTPases a précédemment été reportée, notamment au niveau des homodimères d'ARF1 (147) et de Rac1 (264). Dans notre modèle, ARF1 et Rac1 ont montré la capacité de former un hétérodimère en interagissant de manière directe, évoquant la possibilité d'ARF1 de réguler Rac1 via une interaction physique modifiant la conformation de cette dernière. Toutefois, cette association n'était pas modulable par la stimulation à

l'EGF, supportant la seconde hypothèse stipulant qu'ARF1 pourrait plutôt réguler l'activité de Rac1 en influençant des protéines intermédiaires responsables de son activation. Dans cette optique, le complexe ARF1/Rac1 pourrait permettre le recrutement de protéines nécessaires à l'activité de Rac1 en un multi-complexe.

La collaboration entre GTPases peut réguler les fonctions cellulaires de manière coopérative ou antagoniste (265). À ce jour, les études des voies de signalisation impliquant un lien fonctionnel entre les ARF et Rac1 ont principalement été menées sur ARF6 (266). Un article récent sur Arl4A, un autre membre de la famille des ARF, identifie également cette protéine en tant que modulateur de l'activité de Rac1 (267). Dans ces deux cas, la collaboration entre les GTPases semble être réalisée par le biais d'un pont signalétique formé par ARNO, une ARF GEF, ainsi que par le complexe Dock180/ELMO, une Rac GEF (266,267). Par analogie, la proximité d'ARF1 et Rac1 observée dans la présente étude pourrait promouvoir la formation d'un tel complexe permettant le recrutement d'une Rac GEF activant Rac1. Cette théorie expliquerait également le mécanisme par lequel la déplétion d'ARF1 bloque l'activité de Rac1, en empêchant l'activation de Rac1 par sa Rac GEF.

### **3.3. ARF1 dans le remodelage du cytosquelette d'actine**

IRSp53 est connue comme une protéine chaperonne permettant l'interaction indirecte entre Rac1 et WAVE2 nécessaire à la formation d'un réseau de filaments d'actine. Dans ce contexte, des expériences *in vitro* ont montré que le recrutement et l'activation de WAVE par Rac1 sont significativement augmentés en présence d'ARF1 (268). Il semblerait donc qu'ARF1 agisse en tant que modulateur coopératif des fonctions de Rac1. En accord avec cette idée, l'expression d'ARF1, dans notre modèle d'étude, est essentielle à l'interaction entre Rac1 et IRSp53 ainsi qu'à la translocation de ce complexe vers les protrusions membranaires. De façon intéressante, la surexpression de la Rac GEF Tiam1 dans les fibroblastes de souris provoque elle aussi une augmentation de l'interaction IRSp53/Rac1 ainsi qu'une relocalisation d'IRSp53 aux lamellipodes (269). Considérant que les MDA-

MB-231 surexpriment Tiam1 de façon endogène (270,271), la similitude de ces résultats renforce la théorie où l'activation de Rac1 pourrait être régulée par le recrutement ARF1-dépendant d'une Rac GEF.

Les études réalisées sur IRSp53 suggèrent que des interactions intramoléculaires entre le domaine IMD et le domaine SH3 de la protéine la place dans un état d'auto-inhibition intrinsèque. Il a de plus été démontré que la liaison de Cdc42-GTP à IRSp53 libère cette dernière de cet état d'inhibition, lui permettant ainsi de former un complexe avec Mena, une protéine importante dans la formation de filopodes (272). Par analogie, on peut penser que la liaison de Rac1 à IRSp53 soit également nécessaire au bon repliement d'IRSp53, exposant ainsi ses domaines importants pour ses fonctions effectrices. Considérant que le domaine IMD d'IRSp53 est à la fois important pour sa liaison aux membranes tout comme sa liaison à Rac1, on peut supposer que Rac1-GTP, en se fixant au domaine IMD, le rende disponible pour sa liaison aux lipides. Conformément à cette théorie, nous remarquons dans la présente étude que la déplétion ou l'inactivation de Rac1 empêche IRSp53 de transloquer aux protrusions membranaires.

Il est intéressant de noter que l'habileté d'IRSp53 à lier Rac1, naturellement faible, est significativement augmentée lors de l'interaction préalable d'IRSp53 à WAVE2 (273). Puisqu'une interaction EGF-dépendante entre Rac1 et IRSp53 est observée dans notre étude et que la déplétion d'ARF1 bloque la formation de ce complexe, il est donc fort possible que l'expression d'ARF1 soit nécessaire à la formation du complexe IRSp53/WAVE2 préalable à l'interaction avec Rac1. Ainsi, ARF1 serait responsable de l'assemblage du complexe Rac1-GTP/IRSp53/WAVE. De plus, considérant qu'une translocation de WAVE2 à la membrane, alors qu'elle n'est pas complexée aux autres protéines, n'active pas la polymérisation de l'actine (243), il pourrait être suggéré que le complexe induit un changement conformationnel dans WAVE2 la rendant plus accessible pour l'activation de Arp2/3 aux sites de nucléation d'actine. Dans cette optique, ARF1 serait ainsi considérée comme un modulateur important de l'activation de WAVE2 en permettant un assemblage séquentiel et fonctionnel du complexe Rac1-GTP/IRSp53/WAVE2.

### **3.4. Conclusion**

En conclusion, nous avons démontré qu'ARF1 régule la migration des cellules hautement cancéreuses du cancer du sein. De par son contrôle exercé sur Rac1, ARF1 permet la migration cellulaire dépendante de l'EGF. Puisqu'ARF1 est surexprimée dans plusieurs lignées cellulaires du cancer du sein, ces découvertes pourraient offrir une nouvelle cible thérapeutique dans le développement de thérapies ciblées contre le cancer du sein triple-négatif.

### **3.5. Perspectives**

Les résultats de recherche discutés dans ce mémoire ont permis de mettre en lumière le rôle d'ARF1 dans la migration cellulaire. Cette connaissance évoque de nouvelles questions de recherche qui pourraient être exploitées dans le futur.

#### **3.5.1. La modulation de l'état d'activation d'ARF1 et Rac1**

En conditions physiologique, on retrouve principalement ARF1 sous sa forme liée au GTP dans les MDA-MB-231 (184). Par une approche d'ARNi, nous avons démontré que l'expression protéique d'ARF1 est nécessaire à l'activation de Rac1 par une stimulation à l'EGF. Toutefois, cette méthode seule ne permet pas de distinguer si l'effet d'inhibition de la migration est dû à l'absence de la GTPase ou à la diminution des niveaux d'ARF1-GTP. Ainsi, il serait intéressant de déterminer si la simple inactivation d'ARF1 permet de reproduire les résultats obtenus dans la présente étude. L'utilisation d'un mutant dominant négatif d'ARF1 pourrait permettre de vérifier si les effets obtenus par déplétion sont le résultat de l'inactivation d'ARF1 ou si la présence physique d'ARF1 joue également un rôle dans la signalisation de Rac1 en servant de site de recrutement protéique, par exemple, pour une ARF GEF.

### **3.5.2. La modulation de l'interaction ARF1/Rac1**

La présente étude a permis de mettre évidence la coopération d'ARF1 et Rac1 dans la régulation de la migration cellulaire. Le résultat concernant l'interaction directe entre ARF1 et Rac1 suggère une modulation potentielle de la fonction de ces protéines via l'inhibition de cette interaction. La caractérisation des domaines d'interaction serait donc une perspective intéressante à ce projet puisqu'elle pourrait permettre le développement d'inhibiteurs, tels que de petits peptides, empêchant l'interaction des deux GTPases et donc des fonctions qui en dépendent.

L'Arfaptine est une protéine exprimée de façon ubiquitaire et connue pour sa capacité de lier spécifiquement certaines ARFs et Rac1 avec des affinités similaires. Sa liaison aux ARF est dépendante de leur forme liée au GTP et l'affinité pour ARF1 est 10 fois supérieure à ARF6 (274). L'Arfaptine possède toutefois la possibilité de lier Rac1 peu importe sa forme liée au GDP ou au GTP, et celle-ci semble spécifique aux autres membres de la famille des Rho GTPases. Des études de compétition ont montré que la liaison de Rac1 ou des ARFs à l'Arfaptine était mutuellement exclusive, démontrant que les deux GTPases possèdent, au moins en partie, le même site de liaison à l'Arfaptine (275). Ainsi, en séquestrant à la fois ARF1-GTP et Rac1 de façon spécifique, l'Arfaptine semble être un outil intéressant quant à la caractérisation des domaines d'interaction ou pour l'inhibition de la formation du complexe ARF1/Rac1. Une surexpression de cette protéine dans les cellules NIH 3T3 a déjà permis de démontrer une inhibition d'une fonction d'ARF1 en inhibant le transport vésiculaire (276). Il est donc fort possible que la surexpression de l'Arfaptine dans notre modèle puisse également supprimer des fonctions d'ARF1, telle que la migration cellulaire.

### **3.5.3. L'implication des GEFs**

En permettant l'activation d'ARF1 et de Rac1, toutes deux nécessaires à la migration cellulaire, les GEFs sont d'une importance capitale dans notre modèle d'étude. Il a d'ailleurs

été démontré que la surexpression de GEP100, une ARF GEF, permet à des cellules dérivées d'adénocarcinomes mammaires non-invasifs d'acquérir un phénotype invasif. Ainsi, il serait important d'étudier le profil d'expression des différentes ARF GEFs et des Rac GEFs dans les MDA-MB-231 afin de déterminer lesquelles pourraient être impliquées dans la voie de signalisation permettant à ARF1 de contrôler la migration cellulaire. La déplétion ou l'utilisation de mutants de GEFs, tant pour ARF1 que Rac1, pourrait permettre de déterminer les GEFs importantes dans ce processus et d'ainsi établir de nouvelles cibles pour moduler l'activité des GTPases.

Il est intéressant de noter que les inhibiteurs actuellement disponibles en laboratoire agissent souvent en empêchant l'interaction des ARFs avec une ou plusieurs de ses GEFs. Considérant que certaines GEFs sont redondantes pour plusieurs ARFs, la découverte des GEFs impliqués dans le processus de migration permettrait de développer des petits peptides bloquant l'interaction spécifique des ces GEFs envers leur effecteur, ce qui limiterait les effets secondaires liés à l'inactivation de certaines ARFs. De plus, puisque plusieurs ARFs peuvent être impliqués de façon synergique dans la migration cellulaire, l'inhibition d'une GEF jouant sur plusieurs isoformes pourrait permettre d'obtenir des effets plus puissants que ceux obtenus par l'inhibition d'une seule isoforme.

#### **3.5.4. L'implication des isoformes d'ARF1**

Les isoformes ARF1 et ARF3 possèdent plus de 96% d'homologie et présentent plusieurs fonctions redondantes. Notamment, ces isoformes partagent plusieurs effecteurs communs impliqués dans la motilité cellulaire (274,277,278) et sont activées par les mêmes GEFs au niveau du Golgi. Considérant ce fait, il est possible qu'ARF3 exerce également un contrôle sur la voie de signalisation régulant la migration cellulaire. Pour cette raison, il serait pertinent d'étudier le profil d'expression des différentes isoformes des ARFs dans les MDA-MB-231 dans le but d'étudier leurs fonctions dans le contexte de la présente étude. L'implication d'ARF6 dans cette lignée cellulaire, par exemple, a déjà été reportée pour



son importance dans la migration cellulaire suite à une stimulation à l'EGF (279). Ainsi, il serait important de vérifier la contribution d'ARF6 sur les protéines en aval d'ARF1 de façon à déterminer si les deux isoformes s'influencent via une voie de signalisation commune.

### **3.5.5. La régulation de l'activité de WAVE**

Nous avons démontré que la liaison d'IRSp53 à Rac1 est nécessaire à la translocation de ce complexe. Cela laisse penser que l'inhibition de la migration observée dans cette étude est due à l'impossibilité des protéines du complexe Rac1-GTP/IRSp53/WAVE2 d'agir au site de polymérisation de l'actine. Il serait cependant intéressant d'étudier si cette inhibition provient réellement d'un défaut de localisation, ou si l'assemblage du complexe en tant que tel est nécessaire à l'activité des protéines qui y sont impliquées.

Une controverse existe quant au mode de régulation de l'activité de WAVE. Certains auteurs proposent que WAVE existe sous une forme constitutivement active et que la fonction de celle-ci est régulée de façon spatiale (280,281). D'autres études suggèrent plutôt que l'activation de WAVE se fait suite à la liaison de Rac1 sous sa forme GTP (243,282). Afin de vérifier la situation s'appliquant à notre modèle, des essais de polymérisation de l'actine pourraient être réalisés à partir de lysats cellulaires de MDA-MB-231. Cette technique permettrait d'examiner l'activité de Arp2/3, ce qui témoignerait de façon indirecte de l'activité de WAVE2. Cette expérience servirait à déterminer si l'inhibition de l'expression endogène d'ARF1 permet d'empêcher l'activation de WAVE2 ou si cette dernière est constitutivement activée. Ces effets pourraient être comparés aux effets d'inhibition de l'expression endogène de Rac1, ou d'IRSp53 dont la déplétion est connue pour bloquer l'activation d'Arp2/3 dans une souche cellulaire A431 dérivée du carcinome épidermoïde humain (257).

### 3.5.6. ARF1 dans la formation de métastases

Nous avons démontré l'implication essentielle d'ARF1 dans la migration cellulaire. Ce processus constituant une étape limitante dans la formation de métastases, une perspective intéressante de ce projet serait d'évaluer l'implication d'ARF1 dans la dissémination tumorale en évaluant d'autres caractéristiques importantes du processus de carcinogénèse telles que l'angiogénèse, l'adhésion, l'EMT et l'invasion. Par exemple, des essais de dégradation de matrigel, en présence ou non d'ARF1, pourraient permettre d'évaluer la capacité des cellules à envahir les tissus environnant via leur sécrétion de MMP. Des études de survie cellulaire, tant au niveau des mécanismes leur permettant d'échapper à l'apoptose ou de résister à l'anoïkose, pourraient quant à elles nous renseigner sur la capacité des cellules à se propager dans l'organisme via le système circulatoire.

En ce qui a trait aux modèles animales, des études ont déjà permis de démontrer l'importance d'ARF6 dans la croissance tumorale et la formation de métastases *in vivo* (283). Par une approche similaire, la production de cellules exprimant de manière stable un shRNA inductible d'ARF1 pourrait permettre l'étude de l'implication d'ARF1 dans la formation de métastases *in vivo*. L'injection ces cellules dans la veine latérale de la queue de souris athymiques, par exemple, permettrait d'induire la formation de tumeurs et d'évaluer l'effet de l'inhibition de l'expression d'ARF1 dans la formation de métastases au poumon.

Finalement, afin de valider ARF1 en tant que cible pharmacologique impliquée dans le caractère malin de certains cancers du sein hautement invasifs, la surexpression protéique d'ARF1 pourrait être étudiée dans des cellules épithéliales mammaires normales, telles que les MCF10a par exemple. Ainsi, les expériences suggérées dans la présente section pourraient tous être répétées de façon à vérifier si la surexpression d'ARF1 chez les MCF10a permet à ces cellules non-cancéreuses d'acquérir un phénotype ressemblant à celui des MDA-MB-231.

### **3.5.7. ARF1 dans les autres types de cancer**

La recherche scientifique analysant l'implication d'ARF1 dans le cancer a surtout été axée envers le cancer du sein. Toutefois, une récente étude a reporté la surexpression d'ARF1 dans le carcinome gastrique humain, ayant pour conséquence une augmentation de la prolifération cellulaire, de la migration et de l'invasion (183). Bien qu'il s'agisse d'un tout autre type de cancer, il est possible que les conclusions tirées dans ce présent mémoire puissent être, au moins en partie, généralisables à certains autres types de cancer surexprimant ARF1, comme il est le cas dans le cancer gastrique. Afin de vérifier l'implication de cette GTPase dans plusieurs types de cancer, il serait intéressant de caractériser son expression dans des échantillons tissulaires provenant de différents types de cancer, à l'aide de micromatrices tissulaires par exemple. Sachant cela, il serait alors possible de comparer les voies de signalisation empruntées par ARF1 selon le type de cancer et d'ainsi déterminer si le développement d'une thérapie pharmacologique ciblant ARF1 puisse être bénéfique pour plusieurs indications.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine* **10**, 789-799
2. Narod, S. A., and Foulkes, W. D. (2004) BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature reviews. Cancer* **4**, 665-676
3. Wooster, R., and Weber, B. L. (2003) Breast and ovarian cancer. *The New England journal of medicine* **348**, 2339-2347
4. Tutt, A., and Ashworth, A. (2002) The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition. *Trends in molecular medicine* **8**, 571-576
5. Walsh, T., and King, M. C. (2007) Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer cell* **11**, 103-105
6. Ripperger, T., Gadzicki, D., Meindl, A., and Schlegelberger, B. (2009) Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. *European journal of human genetics : EJHG* **17**, 722-731
7. De Greve, J., Sermijn, E., De Brakeleer, S., Ren, Z., and Teugels, E. (2008) Hereditary breast cancer: from bench to bedside. *Current opinion in oncology* **20**, 605-613
8. Lacroix, M., and Leclercq, G. (2005) The "portrait" of hereditary breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **89**, 297-304
9. Barrett, J. C. (2000) Molecular and environmental causes of cancer. *Drug metabolism reviews* **32**, 139-142
10. Weiderpass, E., Meo, M., and Vainio, H. (2011) Risk factors for breast cancer, including occupational exposures. *Safety and health at work* **2**, 1-8
11. Reynolds, P. (2012) Smoking and Breast Cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*
12. Terry, P. D., and Rohan, T. E. (2002) Cigarette smoking and the risk of breast cancer in women: a review of the literature. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **11**, 953-971
13. Wogan, G. N., Hecht, S. S., Felton, J. S., Conney, A. H., and Loeb, L. A. (2004) Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in cancer biology* **14**, 473-486
14. Duesberg, P., and Li, R. (2003) Multistep carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidizations. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **2**, 202-210
15. Pitot, H. C., Goldsworthy, T., and Moran, S. (1981) The natural history of carcinogenesis: implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer. *Journal of supramolecular structure and cellular biochemistry* **17**, 133-146
16. Nowell, P. C. (2002) Tumor progression: a brief historical perspective. *Seminars in cancer biology* **12**, 261-266

17. Beckmann, M. W., Niederacher, D., Schnurch, H. G., Gusterson, B. A., and Bender, H. G. (1997) Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **75**, 429-439
18. Kenemans, P., Verstraeten, R. A., and Verheijen, R. H. (2004) Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas* **49**, 34-43
19. Fidler, I. J. (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature reviews. Cancer* **3**, 453-458
20. Chambers, A. F., Groom, A. C., and MacDonald, I. C. (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature reviews. Cancer* **2**, 563-572
21. Nguyen, D. X., Bos, P. D., and Massague, J. (2009) Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature reviews. Cancer* **9**, 274-284
22. Christofori, G. (2006) New signals from the invasive front. *Nature* **441**, 444-450
23. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70
24. Jeschke, U., Mylonas, I., Kuhn, C., Shabani, N., Kunert-Keil, C., Schindlbeck, C., Gerber, B., and Friese, K. (2007) Expression of E-cadherin in human ductal breast cancer carcinoma in situ, invasive carcinomas, their lymph node metastases, their distant metastases, carcinomas with recurrence and in recurrence. *Anticancer research* **27**, 1969-1974
25. Sossey-Alaoui, K., Ranalli, T. A., Li, X., Bakin, A. V., and Cowell, J. K. (2005) WAVE3 promotes cell motility and invasion through the regulation of MMP-1, MMP-3, and MMP-9 expression. *Experimental cell research* **308**, 135-145
26. Yokotsuka, M., Iwaya, K., Saito, T., Pandiella, A., Tsuboi, R., Kohno, N., Matsubara, O., and Mukai, K. (2011) Overexpression of HER2 signaling to WAVE2-Arp2/3 complex activates MMP-independent migration in breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **126**, 311-318
27. Fu, X. D., Goglia, L., Sanchez, A. M., Flamini, M., Giretti, M. S., Tosi, V., Genazzani, A. R., and Simoncini, T. (2010) Progesterone receptor enhances breast cancer cell motility and invasion via extranuclear activation of focal adhesion kinase. *Endocrine-related cancer* **17**, 431-443
28. Yana, I., and Seiki, M. (2002) MT-MMPs play pivotal roles in cancer dissemination. *Clinical & experimental metastasis* **19**, 209-215
29. Kousidou, O. C., Roussidis, A. E., Theocharis, A. D., and Karamanos, N. K. (2004) Expression of MMPs and TIMPs genes in human breast cancer epithelial cells depends on cell culture conditions and is associated with their invasive potential. *Anticancer research* **24**, 4025-4030
30. Zijlstra, A., Lewis, J., Degryse, B., Stuhlmann, H., and Quigley, J. P. (2008) The inhibition of tumor cell intravasation and subsequent metastasis via regulation of in vivo tumor cell motility by the tetraspanin CD151. *Cancer cell* **13**, 221-234
31. Kim, Y. N., Koo, K. H., Sung, J. Y., Yun, U. J., and Kim, H. (2012) Anoikis resistance: an essential prerequisite for tumor metastasis. *International journal of cell biology* **2012**, 306879
32. Zhang, Y., Rivera Rosado, L. A., Moon, S. Y., and Zhang, B. (2009) Silencing of D4-GDI inhibits growth and invasive behavior in MDA-MB-231 cells by activation

- of Rac-dependent p38 and JNK signaling. *The Journal of biological chemistry* **284**, 12956-12965
33. Gupta, G. P., and Massague, J. (2006) Cancer metastasis: building a framework. *Cell* **127**, 679-695
  34. Paget, S. (1889) The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer metastasis reviews* **8**, 98-101
  35. Beaumont, T., and Leadbeater, M. (2011) Treatment and care of patients with metastatic breast cancer. *Nursing standard (Royal College of Nursing (Great Britain) : 1987)* **25**, 49-56
  36. Chanrion, M., Fontaine, H., Rodriguez, C., Negre, V., Bibeau, F., Theillet, C., Henaut, A., and Darbon, J. M. (2007) A new molecular breast cancer subclass defined from a large scale real-time quantitative RT-PCR study. *BMC cancer* **7**, 39
  37. Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A. L., Brown, P. O., and Botstein, D. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747-752
  38. Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lonning, P. E., and Borresen-Dale, A. L. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10869-10874
  39. Colombo, P. E., Milanezi, F., Weigelt, B., and Reis-Filho, J. S. (2011) Microarrays in the 2010s: the contribution of microarray-based gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction. *Breast cancer research : BCR* **13**, 212
  40. Hu, Z., Fan, C., Oh, D. S., Marron, J. S., He, X., Qaqish, B. F., Livasy, C., Carey, L. A., Reynolds, E., Dressler, L., Nobel, A., Parker, J., Ewend, M. G., Sawyer, L. R., Wu, J., Liu, Y., Nanda, R., Tretiakova, M., Ruiz Orrico, A., Dreher, D., Palazzo, J. P., Perreard, L., Nelson, E., Mone, M., Hansen, H., Mullins, M., Quackenbush, J. F., Ellis, M. J., Olopade, O. I., Bernard, P. S., and Perou, C. M. (2006) The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC genomics* **7**, 96
  41. Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L., Akslen, L. A., Ragaz, J., Gown, A. M., Gilks, C. B., van de Rijn, M., and Perou, C. M. (2004) Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**, 5367-5374
  42. Perou, C. M. (2011) Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *The oncologist* **16 Suppl 1**, 61-70

43. Burness, M. L., Grushko, T. A., and Olopade, O. I. (2010) Epidermal growth factor receptor in triple-negative and basal-like breast cancer: promising clinical target or only a marker? *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* **16**, 23-32
44. Bauer, K. R., Brown, M., Cress, R. D., Parise, C. A., and Caggiano, V. (2007) Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer* **109**, 1721-1728
45. Badve, S., Dabbs, D. J., Schnitt, S. J., Baehner, F. L., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S. B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S. R., Palacios, J., Rakha, E. A., Richardson, A. L., Schmitt, F. C., Tan, P. H., Tse, G. M., Weigelt, B., Ellis, I. O., and Reis-Filho, J. S. (2011) Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **24**, 157-167
46. Carey, L. A. (2011) Directed therapy of subtypes of triple-negative breast cancer. *The oncologist* **16 Suppl 1**, 71-78
47. Kim, J. Y., Chang, S. K., Park, H., Lee, B. M., and Shin, H. S. (2012) Treatment outcome in patients with triple negative early stage breast cancers compared with other molecular subtypes. *Radiation oncology journal* **30**, 124-131
48. Beslija, S., Bonneterre, J., Burstein, H., Cocquyt, V., Gnant, M., Goodwin, P., Heinemann, V., Jassem, J., Kostler, W. J., Krainer, M., Menard, S., Petit, T., Petruzelka, L., Possinger, K., Schmid, P., Stadtmayer, E., Stockler, M., Van Belle, S., Vogel, C., Wilcken, N., Wiltschke, C., Zielinski, C. C., and Zwierzina, H. (2007) Second consensus on medical treatment of metastatic breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **18**, 215-225
49. Karam, A. (2012) Update on breast cancer surgery approaches. *Current opinion in obstetrics & gynecology*
50. Burdak-Rothkamm, S., and Prise, K. M. (2009) New molecular targets in radiotherapy: DNA damage signalling and repair in targeted and non-targeted cells. *European journal of pharmacology* **625**, 151-155
51. Connell, P. P., Kron, S. J., and Weichselbaum, R. R. (2004) Relevance and irrelevance of DNA damage response to radiotherapy. *DNA repair* **3**, 1245-1251
52. Amadori, D., Volpi, A., Maltoni, R., Nanni, O., Amaducci, L., Amadori, A., Giunchi, D. C., Vio, A., Saragoni, A., and Silvestrini, R. (1997) Cell proliferation as a predictor of response to chemotherapy in metastatic breast cancer: a prospective study. *Breast cancer research and treatment* **43**, 7-14
53. Malhotra, V., and Perry, M. C. (2003) Classical chemotherapy: mechanisms, toxicities and the therapeutic window. *Cancer biology & therapy* **2**, S2-4
54. Anderson, E., Clarke, R. B., and Howell, A. (1998) Estrogen responsiveness and control of normal human breast proliferation. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **3**, 23-35

55. Fanelli, M. A., Vargas-Roig, L. M., Gago, F. E., Tello, O., Lucero De Angelis, R., and Ciocca, D. R. (1996) Estrogen receptors, progesterone receptors, and cell proliferation in human breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **37**, 217-228
56. Saha Roy, S., and Vadlamudi, R. K. (2012) Role of estrogen receptor signaling in breast cancer metastasis. *International journal of breast cancer* **2012**, 654698
57. Metro, G., Mottolese, M., and Fabi, A. (2008) HER-2-positive metastatic breast cancer: trastuzumab and beyond. *Expert opinion on pharmacotherapy* **9**, 2583-2601
58. Joensuu, H. (2011) HERA crosses over. *The lancet oncology* **12**, 203-204
59. Brouckaert, O., Wildiers, H., Floris, G., and Neven, P. (2012) Update on triple-negative breast cancer: prognosis and management strategies. *International journal of women's health* **4**, 511-520
60. Liang, Y., Brekken, R. A., and Hyder, S. M. (2006) Vascular endothelial growth factor induces proliferation of breast cancer cells and inhibits the anti-proliferative activity of anti-hormones. *Endocrine-related cancer* **13**, 905-919
61. Foekens, J. A., Peters, H. A., Grebenchtchikov, N., Look, M. P., Meijer-van Gelder, M. E., Geurts-Moespot, A., van der Kwast, T. H., Sweep, C. G., and Klijn, J. G. (2001) High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. *Cancer research* **61**, 5407-5414
62. Miles, D. W., Chan, A., Dirix, L. Y., Cortes, J., Pivot, X., Tomczak, P., Delozier, T., Sohn, J. H., Provencher, L., Puglisi, F., Harbeck, N., Steger, G. G., Schneeweiss, A., Wardley, A. M., Chlistalla, A., and Romieu, G. (2010) Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**, 3239-3247
63. Robert, N. J., Dieras, V., Glaspy, J., Brufsky, A. M., Bondarenko, I., Lipatov, O. N., Perez, E. A., Yardley, D. A., Chan, S. Y., Zhou, X., Phan, S. C., and O'Shaughnessy, J. (2011) RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 1252-1260
64. Brufsky, A. M., Hurvitz, S., Perez, E., Swamy, R., Valero, V., O'Neill, V., and Rugo, H. S. (2011) RIBBON-2: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating the efficacy and safety of bevacizumab in combination with chemotherapy for second-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 4286-4293
65. Liu, J. F., and Silver, D. P. (2010) Poly ADP-ribose polymerase inhibitors: science and current clinical development. *Current opinion in oncology* **22**, 567-572



66. Fauzee, N. J., Pan, J., and Wang, Y. L. (2010) PARP and PARG inhibitors--new therapeutic targets in cancer treatment. *Pathology oncology research : POR* **16**, 469-478
67. Mangerich, A., and Burkle, A. (2011) How to kill tumor cells with inhibitors of poly(ADP-ribosyl)ation. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **128**, 251-265
68. Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Kempf, R. C., Long, J., Laidler, P., Mijatovic, S., Maksimovic-Ivanic, D., Stivala, F., Mazzarino, M. C., Donia, M., Fagone, P., Malaponte, G., Nicoletti, F., Libra, M., Milella, M., Tafuri, A., Bonati, A., Basecke, J., Cocco, L., Evangelisti, C., Martelli, A. M., Montalto, G., Cervello, M., and McCubrey, J. A. (2011) Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging* **3**, 192-222
69. Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and Gonzalez-Baron, M. (2004) PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer treatment reviews* **30**, 193-204
70. Barnett, C. M. (2012) Everolimus: targeted therapy on the horizon for the treatment of breast cancer. *Pharmacotherapy* **32**, 383-396
71. Herold, C. I., Chadaram, V., Peterson, B. L., Marcom, P. K., Hopkins, J., Kimmick, G. G., Favaro, J., Hamilton, E., Welch, R. A., Bacus, S., and Blackwell, K. L. (2011) Phase II trial of dasatinib in patients with metastatic breast cancer using real-time pharmacodynamic tissue biomarkers of Src inhibition to escalate dosing. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 6061-6070
72. Hudis, C. A., and Gianni, L. (2011) Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. *The oncologist* **16 Suppl 1**, 1-11
73. Anders, C., and Carey, L. A. (2008) Understanding and treating triple-negative breast cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* **22**, 1233-1239; discussion 1239-1240, 1243
74. Boulay, P. L., Cotton, M., Melancon, P., and 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. *The Journal of biological chemistry* **283**, 36425-36434
75. Price, J. T., Tiganis, T., Agarwal, A., Djakiew, D., and Thompson, E. W. (1999) Epidermal growth factor promotes MDA-MB-231 breast cancer cell migration through a phosphatidylinositol 3'-kinase and phospholipase C-dependent mechanism. *Cancer research* **59**, 5475-5478
76. Arteaga, C. L. (2002) Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *The oncologist* **7 Suppl 4**, 31-39
77. Chaudhuri, A., Xie, M. H., Yang, B., Mahapatra, K., Liu, J., Marsters, S., Bodepudi, S., and Ashkenazi, A. (2011) Distinct involvement of the Gab1 and Grb2 adaptor proteins in signal transduction by the related receptor tyrosine kinases RON and MET. *The Journal of biological chemistry* **286**, 32762-32774

78. Robinson, D. R., Wu, Y. M., and Lin, S. F. (2000) The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* **19**, 5548-5557
79. White, M. F., and Kahn, C. R. (1994) The insulin signaling system. *The Journal of biological chemistry* **269**, 1-4
80. Cymer, F., and Schneider, D. (2010) Transmembrane helix-helix interactions involved in ErbB receptor signaling. *Cell adhesion & migration* **4**, 299-312
81. Wu, J. J., and Guidotti, G. (2002) Construction and characterization of a monomeric insulin receptor. *The Journal of biological chemistry* **277**, 27809-27817
82. van der Geer, P., Hunter, T., and Lindberg, R. A. (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annual review of cell biology* **10**, 251-337
83. Zwick, E., Bange, J., and Ullrich, A. (2001) Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocrine-related cancer* **8**, 161-173
84. Nahta, R., Hortobagyi, G. N., and Esteva, F. J. (2003) Growth factor receptors in breast cancer: potential for therapeutic intervention. *The oncologist* **8**, 5-17
85. Meric, F., Lee, W. P., Sahin, A., Zhang, H., Kung, H. J., and Hung, M. C. (2002) Expression profile of tyrosine kinases in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **8**, 361-367
86. Yarden, Y., and Sliwkowski, M. X. (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 127-137
87. Citri, A., and Yarden, Y. (2006) EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 505-516
88. Yarden, Y. (2001) The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **37 Suppl 4**, S3-8
89. Harris, R. C., Chung, E., and Coffey, R. J. (2003) EGF receptor ligands. *Experimental cell research* **284**, 2-13
90. Schneider, M. R., and Wolf, E. (2009) The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *Journal of cellular physiology* **218**, 460-466
91. Massague, J., and Pandiella, A. (1993) Membrane-anchored growth factors. *Annual review of biochemistry* **62**, 515-541
92. Dong, J., Opresko, L. K., Chrisler, W., Orr, G., Quesenberry, R. D., Lauffenburger, D. A., and Wiley, H. S. (2005) The membrane-anchoring domain of epidermal growth factor receptor ligands dictates their ability to operate in juxtacrine mode. *Molecular biology of the cell* **16**, 2984-2998
93. Gschwind, A., Zwick, E., Prenzel, N., Leserer, M., and Ullrich, A. (2001) Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene* **20**, 1594-1600
94. Hynes, N. E., and Lane, H. A. (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature reviews. Cancer* **5**, 341-354
95. Lemmon, M. A., and Schlessinger, J. (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117-1134

96. Leahy, D. J. (2004) Structure and function of the epidermal growth factor (EGF/ErbB) family of receptors. *Advances in protein chemistry* **68**, 1-27
97. Hubbard, S. R., and Miller, W. T. (2007) Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Current opinion in cell biology* **19**, 117-123
98. Jura, N., Endres, N. F., Engel, K., Deindl, S., Das, R., Lamers, M. H., Wemmer, D. E., Zhang, X., and Kuriyan, J. (2009) Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell* **137**, 1293-1307
99. Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A., and Kuriyan, J. (2006) An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* **125**, 1137-1149
100. Carraway, K. L., and Kozloski, G. A. (2009) Conformational changes in receptor tyrosine kinase signaling: an ErbB garden of delights. *F1000 biology reports* **1**, 72
101. Yamaguchi, H., and Wang, H. G. (2001) The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene* **20**, 7779-7786
102. Brader, S., and Eccles, S. A. (2004) Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways in tumor progression, invasion and angiogenesis. *Tumori* **90**, 2-8
103. Giubellino, A., Burke, T. R., Jr., and Bottaro, D. P. (2008) Grb2 signaling in cell motility and cancer. *Expert opinion on therapeutic targets* **12**, 1021-1033
104. Hollenhorst, P. C. (2012) RAS/ERK pathway transcriptional regulation through ETS/AP-1 binding sites. *Small GTPases* **3**, 154-158
105. Johnson, D. G., Schwarz, J. K., Cress, W. D., and Nevins, J. R. (1993) Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* **365**, 349-352
106. Metz, H. E., and Houghton, A. M. (2011) Insulin receptor substrate regulation of phosphoinositide 3-kinase. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 206-211
107. Castellano, E., and Downward, J. (2010) Role of RAS in the regulation of PI 3-kinase. *Current topics in microbiology and immunology* **346**, 143-169
108. Toker, A., and Yoeli-Lerner, M. (2006) Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer research* **66**, 3963-3966
109. Quesnelle, K. M., Boehm, A. L., and Grandis, J. R. (2007) STAT-mediated EGFR signaling in cancer. *Journal of cellular biochemistry* **102**, 311-319
110. Eccles, S. A. (2011) The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *The International journal of developmental biology* **55**, 685-696
111. Rimawi, M. F., Shetty, P. B., Weiss, H. L., Schiff, R., Osborne, C. K., Chamness, G. C., and Elledge, R. M. (2010) Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer association with biologic phenotype and clinical outcomes. *Cancer* **116**, 1234-1242
112. McIntyre, E., Blackburn, E., Brown, P. J., Johnson, C. G., and Gullick, W. J. (2010) The complete family of epidermal growth factor receptors and their ligands are co-

- ordinately expressed in breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **122**, 105-110
113. Stern, D. F. (2000) Tyrosine kinase signalling in breast cancer: ErbB family receptor tyrosine kinases. *Breast cancer research : BCR* **2**, 176-183
  114. Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes, R. L., and Wong, A. J. (1995) Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer research* **55**, 5536-5539
  115. Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Batra, S. K., Hill, M. L., Humphrey, P. A., Kurpad, S. N., McLendon, R. E., Moscatello, D., Pegram, C. N., Reist, C. J., and et al. (1995) Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer research* **55**, 3140-3148
  116. Voldborg, B. R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., and Poulsen, H. S. (1997) Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **8**, 1197-1206
  117. Rae, J. M., Scheys, J. O., Clark, K. M., Chadwick, R. B., Kiefer, M. C., and Lippman, M. E. (2004) EGFR and EGFRvIII expression in primary breast cancer and cell lines. *Breast cancer research and treatment* **87**, 87-95
  118. Rakha, E. A., El-Sayed, M. E., Green, A. R., Lee, A. H., Robertson, J. F., and Ellis, I. O. (2007) Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* **109**, 25-32
  119. Masuda, H., Zhang, D., Bartholomeusz, C., Doihara, H., Hortobagyi, G. N., and Ueno, N. T. (2012) Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **136**, 331-345
  120. Sainsbury, J. R., Farndon, J. R., Needham, G. K., Malcolm, A. J., and Harris, A. L. (1987) Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet* **1**, 1398-1402
  121. Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical reviews in oncology/hematology* **19**, 183-232
  122. Foulkes, W. D., Stefansson, I. M., Chappuis, P. O., Begin, L. R., Goffin, J. R., Wong, N., Trudel, M., and Akslen, L. A. (2003) Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **95**, 1482-1485
  123. Arnes, J. B., Begin, L. R., Stefansson, I., Brunet, J. S., Nielsen, T. O., Foulkes, W. D., and Akslen, L. A. (2009) Expression of epidermal growth factor receptor in relation to BRCA1 status, basal-like markers and prognosis in breast cancer. *Journal of clinical pathology* **62**, 139-146
  124. Burga, L. N., Hu, H., Juvekar, A., Tung, N. M., Troyan, S. L., Hofstatter, E. W., and Wulf, G. M. (2011) Loss of BRCA1 leads to an increase in epidermal growth factor receptor expression in mammary epithelial cells, and epidermal growth factor receptor inhibition prevents estrogen receptor-negative cancers in BRCA1-mutant mice. *Breast cancer research : BCR* **13**, R30

125. Ueno, N. T., and Zhang, D. (2011) Targeting EGFR in Triple Negative Breast Cancer. *Journal of Cancer* **2**, 324-328
126. Crown, J., O'Shaughnessy, J., and Gullo, G. (2012) Emerging targeted therapies in triple-negative breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **23 Suppl 6**, vi56-vi65
127. Uberall, I., Krizova, K., and Steigerova, J. (2011) Cetuximab enhances the anti-proliferative effect of trastuzumab in ERBB2 over-expressing breast cancer cells--preliminary study. *Klinicka onkologie : casopis Ceske a Slovenske onkologicke spolocnosti* **24**, 356-360
128. Li, T., and Sparano, J. A. (2003) Inhibiting Ras signaling in the therapy of breast cancer. *Clinical breast cancer* **3**, 405-416; discussion 417-420
129. Purcell, W. T., and Donehower, R. C. (2002) Evolving therapies: farnesyltransferase inhibitors. *Current oncology reports* **4**, 29-36
130. Taylor, G. A., Feng, C. G., and Sher, A. (2004) p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nature reviews. Immunology* **4**, 100-109
131. Paduch, M., Jelen, F., and Otlewski, J. (2001) Structure of small G proteins and their regulators. *Acta biochimica Polonica* **48**, 829-850
132. Goodsell, D. S. (1999) The molecular perspective: the ras oncogene. *The oncologist* **4**, 263-264
133. Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiological reviews* **81**, 153-208
134. Dent, P., Haser, W., Haystead, T. A., Vincent, L. A., Roberts, T. M., and Sturgill, T. W. (1992) Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro. *Science (New York, N.Y.)* **257**, 1404-1407
135. Huang, W., Alessandrini, A., Crews, C. M., and Erikson, R. L. (1993) Raf-1 forms a stable complex with Mek1 and activates Mek1 by serine phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 10947-10951
136. Macdonald, S. G., Crews, C. M., Wu, L., Driller, J., Clark, R., Erikson, R. L., and McCormick, F. (1993) Reconstitution of the Raf-1-MEK-ERK signal transduction pathway in vitro. *Molecular and cellular biology* **13**, 6615-6620
137. Coso, O. A., Chiariello, M., Yu, J. C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T., and Gutkind, J. S. (1995) The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**, 1137-1146
138. Hill, C. S., Wynne, J., and Treisman, R. (1995) The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* **81**, 1159-1170
139. Westwick, J. K., Lambert, Q. T., Clark, G. J., Symons, M., Van Aelst, L., Pestell, R. G., and Der, C. J. (1997) Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Molecular and cellular biology* **17**, 1324-1335
140. Kaibuchi, K., Kuroda, S., and Amano, M. (1999) Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annual review of biochemistry* **68**, 459-486

141. Kahn, R. A., Volpicelli-Daley, L., Bowzard, B., Shrivastava-Ranjan, P., Li, Y., Zhou, C., and Cunningham, L. (2005) Arf family GTPases: roles in membrane traffic and microtubule dynamics. *Biochemical Society transactions* **33**, 1269-1272
142. Novick, P., and Zerial, M. (1997) The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Current opinion in cell biology* **9**, 496-504
143. Olkkonen, V. M., and Stenmark, H. (1997) Role of Rab GTPases in membrane traffic. *International review of cytology* **176**, 1-85
144. Schimmoller, F., Simon, I., and Pfeffer, S. R. (1998) Rab GTPases, directors of vesicle docking. *The Journal of biological chemistry* **273**, 22161-22164
145. Radhakrishna, H., and Donaldson, J. G. (1997) ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *The Journal of cell biology* **139**, 49-61
146. D'Souza-Schorey, C., van Donselaar, E., Hsu, V. W., Yang, C., Stahl, P. D., and Peters, P. J. (1998) ARF6 targets recycling vesicles to the plasma membrane: insights from an ultrastructural investigation. *The Journal of cell biology* **140**, 603-616
147. Beck, R., Sun, Z., Adolf, F., Rutz, C., Bassler, J., Wild, K., Sinning, I., Hurt, E., Brugger, B., Bethune, J., and Wieland, F. (2008) Membrane curvature induced by Arf1-GTP is essential for vesicle formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 11731-11736
148. Pepperkok, R., Whitney, J. A., Gomez, M., and Kreis, T. E. (2000) COPI vesicles accumulating in the presence of a GTP restricted arf1 mutant are depleted of anterograde and retrograde cargo. *Journal of cell science* **113 ( Pt 1)**, 135-144
149. Kuersten, S., Ohno, M., and Mattaj, I. W. (2001) Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *Trends in cell biology* **11**, 497-503
150. Yoneda, Y. (2000) Nucleocytoplasmic protein traffic and its significance to cell function. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **5**, 777-787
151. Kahana, J. A., and Cleveland, D. W. (1999) Beyond nuclear transport. Ran-GTP as a determinant of spindle assembly. *The Journal of cell biology* **146**, 1205-1210
152. Kalab, P., Pu, R. T., and Dasso, M. (1999) The ran GTPase regulates mitotic spindle assembly. *Current biology : CB* **9**, 481-484
153. Kahn, R. A., Cherfils, J., Elias, M., Lovering, R. C., Munro, S., and Schurmann, A. (2006) Nomenclature for the human Arf family of GTP-binding proteins: ARF, ARL, and SAR proteins. *The Journal of cell biology* **172**, 645-650
154. Volpicelli-Daley, L. A., Li, Y., Zhang, C. J., and Kahn, R. A. (2005) Isoform-selective effects of the depletion of ADP-ribosylation factors 1-5 on membrane traffic. *Molecular biology of the cell* **16**, 4495-4508
155. D'Souza-Schorey, C., and Chavrier, P. (2006) ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 347-358
156. Peters, P. J., Hsu, V. W., Ooi, C. E., Finazzi, D., Teal, S. B., Oorschot, V., Donaldson, J. G., and Klausner, R. D. (1995) Overexpression of wild-type and mutant ARF1 and ARF6: distinct perturbations of nonoverlapping membrane compartments. *The Journal of cell biology* **128**, 1003-1017

157. Donaldson, J. G. (2003) Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* **278**, 41573-41576
158. Hunzicker-Dunn, M., Gurevich, V. V., Casanova, J. E., and Mukherjee, S. (2002) ARF6: a newly appreciated player in G protein-coupled receptor desensitization. *FEBS letters* **521**, 3-8
159. Cotton, M., Boulay, P. L., Houndolo, T., Vitale, N., Pitcher, J. A., and Claing, A. (2007) Endogenous ARF6 interacts with Rac1 upon angiotensin II stimulation to regulate membrane ruffling and cell migration. *Molecular biology of the cell* **18**, 501-511
160. Boshans, R. L., Szanto, S., van Aelst, L., and D'Souza-Schorey, C. (2000) ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA. *Molecular and cellular biology* **20**, 3685-3694
161. Lundmark, R., Doherty, G. J., Vallis, Y., Peter, B. J., and McMahon, H. T. (2008) Arf family GTP loading is activated by, and generates, positive membrane curvature. *The Biochemical journal* **414**, 189-194
162. Gillingham, A. K., and Munro, S. (2007) The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annual review of cell and developmental biology* **23**, 579-611
163. McMahon, H. T., and Gallop, J. L. (2005) Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* **438**, 590-596
164. Amor, J. C., Harrison, D. H., Kahn, R. A., and Ringe, D. (1994) Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. *Nature* **372**, 704-708
165. Donaldson, J. G., and Jackson, C. L. (2011) ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 362-375
166. Jackson, C. L., and Casanova, J. E. (2000) Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends in cell biology* **10**, 60-67
167. Chardin, P., Paris, S., Antonny, B., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Jackson, C. L., and Chabre, M. (1996) A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* **384**, 481-484
168. Peyroche, A., Antonny, B., Robineau, S., Acker, J., Cherfils, J., and Jackson, C. L. (1999) Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Molecular cell* **3**, 275-285
169. Fujiwara, T., Oda, K., Yokota, S., Takatsuki, A., and Ikehara, Y. (1988) Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* **263**, 18545-18552
170. Sata, M., Moss, J., and Vaughan, M. (1999) Structural basis for the inhibitory effect of brefeldin A on guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 2752-2757
171. Viaud, J., Zeghouf, M., Barelli, H., Zeeh, J. C., Padilla, A., Guibert, B., Chardin, P., Royer, C. A., Cherfils, J., and Chavanieu, A. (2007) Structure-based discovery of an inhibitor of Arf activation by Sec7 domains through targeting of protein-protein

- complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 10370-10375
172. Hafner, M., Schmitz, A., Grune, I., Srivatsan, S. G., Paul, B., Kolanus, W., Quast, T., Kremmer, E., Bauer, I., and Famulok, M. (2006) Inhibition of cytohesins by SecinH3 leads to hepatic insulin resistance. *Nature* **444**, 941-944
  173. Cukierman, E., Huber, I., Rotman, M., and Cassel, D. (1995) The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. *Science (New York, N.Y.)* **270**, 1999-2002
  174. Tanigawa, G., Orci, L., Amherdt, M., Ravazzola, M., Helms, J. B., and Rothman, J. E. (1993) Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *The Journal of cell biology* **123**, 1365-1371
  175. Randazzo, P. A., and Hirsch, D. S. (2004) Arf GAPs: multifunctional proteins that regulate membrane traffic and actin remodelling. *Cellular signalling* **16**, 401-413
  176. Sabe, H., Onodera, Y., Mazaki, Y., and Hashimoto, S. (2006) ArfGAP family proteins in cell adhesion, migration and tumor invasion. *Current opinion in cell biology* **18**, 558-564
  177. Stearns, T., Willingham, M. C., Botstein, D., and Kahn, R. A. (1990) ADP-ribosylation factor is functionally and physically associated with the Golgi complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 1238-1242
  178. Donaldson, J. G., and Honda, A. (2005) Localization and function of Arf family GTPases. *Biochemical Society transactions* **33**, 639-642
  179. Bonifacino, J. S., and Glick, B. S. (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**, 153-166
  180. Kumari, S., and Mayor, S. (2008) ARF1 is directly involved in dynamin-independent endocytosis. *Nature cell biology* **10**, 30-41
  181. Li, H. S., Shome, K., Rojas, R., Rizzo, M. A., Vasudevan, C., Fluharty, E., Santy, L. C., Casanova, J. E., and Romero, G. (2003) The guanine nucleotide exchange factor ARNO mediates the activation of ARF and phospholipase D by insulin. *BMC cell biology* **4**, 13
  182. Lim, J., Zhou, M., Veenstra, T. D., and Morrison, D. K. (2010) The CNK1 scaffold binds cytohesins and promotes insulin pathway signaling. *Genes & development* **24**, 1496-1506
  183. Tsai, M. M., Lin, P. Y., Cheng, W. L., Tsai, C. Y., Chi, H. C., Chen, C. Y., Tseng, Y. H., Cheng, Y. F., Chen, C. D., Liang, Y., Liao, C. J., Wu, S. M., Lin, Y. H., Chung, I. H., Wang, C. S., and Lin, K. H. (2012) Overexpression of ADP-ribosylation factor 1 in human gastric carcinoma and its clinicopathological significance. *Cancer science* **103**, 1136-1144
  184. Boulay, P. L., Schlienger, S., Lewis-Saravalli, S., Vitale, N., Ferbeyre, G., and Claing, A. (2011) ARF1 controls proliferation of breast cancer cells by regulating the retinoblastoma protein. *Oncogene* **30**, 3846-3861



185. Santy, L. C., Ravichandran, K. S., and Casanova, J. E. (2005) The DOCK180/Elmo complex couples ARNO-mediated Arf6 activation to the downstream activation of Rac1. *Current biology : CB* **15**, 1749-1754
186. Wennerberg, K., and Der, C. J. (2004) Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *Journal of cell science* **117**, 1301-1312
187. Bustelo, X. R., Sauzeau, V., and Berenjano, I. M. (2007) GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **29**, 356-370
188. Manser, E. (2002) Small GTPases take the stage. *Developmental cell* **3**, 323-328
189. Narumiya, S. (1996) The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *Journal of biochemistry* **120**, 215-228
190. Villalonga, P., and Ridley, A. J. (2006) Rho GTPases and cell cycle control. *Growth factors (Chur, Switzerland)* **24**, 159-164
191. Georgiou, M., and Baum, B. (2010) Polarity proteins and Rho GTPases cooperate to spatially organise epithelial actin-based protrusions. *Journal of cell science* **123**, 1089-1098
192. Jaffe, A. B., and Hall, A. (2002) Rho GTPases in transformation and metastasis. *Advances in cancer research* **84**, 57-80
193. Tang, Y., Olufemi, L., Wang, M. T., and Nie, D. (2008) Role of Rho GTPases in breast cancer. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **13**, 759-776
194. Nobes, C. D., and Hall, A. (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62
195. Wright, L. P., and Philips, M. R. (2006) Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *Journal of lipid research* **47**, 883-891
196. Choy, E., Chiu, V. K., Silletti, J., Feoktistov, M., Morimoto, T., Michaelson, D., Ivanov, I. E., and Philips, M. R. (1999) Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* **98**, 69-80
197. Roberts, P. J., Mitin, N., Keller, P. J., Chenette, E. J., Madigan, J. P., Currin, R. O., Cox, A. D., Wilson, O., Kirschmeier, P., and Der, C. J. (2008) Rho Family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification. *The Journal of biological chemistry* **283**, 25150-25163
198. Garcia-Mata, R., Boulter, E., and Burridge, K. (2011) The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 493-504
199. Scheffzek, K., Stephan, I., Jensen, O. N., Illenberger, D., and Gierschik, P. (2000) The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI. *Nature structural biology* **7**, 122-126
200. Dovas, A., and Couchman, J. R. (2005) RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *The Biochemical journal* **390**, 1-9
201. Cote, J. F., and Vuori, K. (2007) GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends in cell biology* **17**, 383-393

202. Rossman, K. L., Der, C. J., and Sondek, J. (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 167-180
203. Karnoub, A. E., Worthylake, D. K., Rossman, K. L., Pruitt, W. M., Campbell, S. L., Sondek, J., and Der, C. J. (2001) Molecular basis for Rac1 recognition by guanine nucleotide exchange factors. *Nature structural biology* **8**, 1037-1041
204. Cote, J. F., and Vuori, K. (2002) Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *Journal of cell science* **115**, 4901-4913
205. Meller, N., Merlot, S., and Guda, C. (2005) CZH proteins: a new family of Rho-GEFs. *Journal of cell science* **118**, 4937-4946
206. Cerione, R. A., and Zheng, Y. (1996) The Dbl family of oncogenes. *Current opinion in cell biology* **8**, 216-222
207. Gao, Y., Dickerson, J. B., Guo, F., Zheng, J., and Zheng, Y. (2004) Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 7618-7623
208. Gao, Y., Xing, J., Streuli, M., Leto, T. L., and Zheng, Y. (2001) Trp(56) of rac1 specifies interaction with a subset of guanine nucleotide exchange factors. *The Journal of biological chemistry* **276**, 47530-47541
209. Nassar, N., Cancelas, J., Zheng, J., Williams, D. A., and Zheng, Y. (2006) Structure-function based design of small molecule inhibitors targeting Rho family GTPases. *Current topics in medicinal chemistry* **6**, 1109-1116
210. Premont, R. T., Perry, S. J., Schmalzigaug, R., Roseman, J. T., Xing, Y., and Claing, A. (2004) The GIT/PIX complex: an oligomeric assembly of GIT family ARF GTPase-activating proteins and PIX family Rac1/Cdc42 guanine nucleotide exchange factors. *Cellular signalling* **16**, 1001-1011
211. Santy, L. C., and Casanova, J. E. (2002) GTPase signaling: bridging the GAP between ARF and Rho. *Current biology : CB* **12**, R360-362
212. Aspenstrom, P., Fransson, A., and Saras, J. (2004) Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *The Biochemical journal* **377**, 327-337
213. Didsbury, J., Weber, R. F., Bokoch, G. M., Evans, T., and Snyderman, R. (1989) rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *The Journal of biological chemistry* **264**, 16378-16382
214. Kalfa, T. A., Pushkaran, S., Zhang, X., Johnson, J. F., Pan, D., Daria, D., Geiger, H., Cancelas, J. A., Williams, D. A., and Zheng, Y. (2010) Rac1 and Rac2 GTPases are necessary for early erythropoietic expansion in the bone marrow but not in the spleen. *Haematologica* **95**, 27-35
215. Corbetta, S., Gualdoni, S., Albertinazzi, C., Paris, S., Croci, L., Consalez, G. G., and de Curtis, I. (2005) Generation and characterization of Rac3 knockout mice. *Molecular and cellular biology* **25**, 5763-5776

216. Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A., and Katsuki, M. (1998) Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* **17**, 3427-3433
217. Parrini, M. C., and Camonis, J. (2011) Cell motility: The necessity of Rac1 GDP/GTP flux. *Communicative & integrative biology* **4**, 772-774
218. Filic, V., Marinovic, M., Faix, J., and Weber, I. (2012) A dual role for Rac1 GTPases in the regulation of cell motility. *Journal of cell science* **125**, 387-398
219. Keely, P. J., Westwick, J. K., Whitehead, I. P., Der, C. J., and Parise, L. V. (1997) Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* **390**, 632-636
220. Nobes, C. D., and Hall, A. (1995) Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochemical Society transactions* **23**, 456-459
221. Moore, K. A., Sethi, R., Doanes, A. M., Johnson, T. M., Pracyk, J. B., Kirby, M., Irani, K., Goldschmidt-Clermont, P. J., and Finkel, T. (1997) Rac1 is required for cell proliferation and G2/M progression. *The Biochemical journal* **326 ( Pt 1)**, 17-20
222. Murga, C., Zohar, M., Teramoto, H., and Gutkind, J. S. (2002) Rac1 and RhoG promote cell survival by the activation of PI3K and Akt, independently of their ability to stimulate JNK and NF-kappaB. *Oncogene* **21**, 207-216
223. Akhtar, N., and Streuli, C. H. (2006) Rac1 links integrin-mediated adhesion to the control of lactational differentiation in mammary epithelia. *The Journal of cell biology* **173**, 781-793
224. Boulter, E., Grall, D., Cagnol, S., and Van Obberghen-Schilling, E. (2006) Regulation of cell-matrix adhesion dynamics and Rac-1 by integrin linked kinase. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**, 1489-1491
225. Parri, M., and Chiarugi, P. (2010) Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell communication and signaling : CCS* **8**, 23
226. Kamai, T., Yamanishi, T., Shirataki, H., Takagi, K., Asami, H., Ito, Y., and Yoshida, K. (2004) Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**, 4799-4805
227. Pan, Y., Bi, F., Liu, N., Xue, Y., Yao, X., Zheng, Y., and Fan, D. (2004) Expression of seven main Rho family members in gastric carcinoma. *Biochemical and biophysical research communications* **315**, 686-691
228. Liu, S. Y., Yen, C. Y., Yang, S. C., Chiang, W. F., and Chang, K. W. (2004) Overexpression of Rac-1 small GTPase binding protein in oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* **62**, 702-707
229. Citterio, C., Menacho-Marquez, M., Garcia-Escudero, R., Larive, R. M., Barreiro, O., Sanchez-Madrid, F., Paramio, J. M., and Bustelo, X. R. (2012) The rho

- exchange factors vav2 and vav3 control a lung metastasis-specific transcriptional program in breast cancer cells. *Science signaling* **5**, ra71
230. Jordan, P., Brazao, R., Boavida, M. G., Gespach, C., and Chastre, E. (1999) Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. *Oncogene* **18**, 6835-6839
  231. Schnelzer, A., Prechtel, D., Knaus, U., Dehne, K., Gerhard, M., Graeff, H., Harbeck, N., Schmitt, M., and Lengyel, E. (2000) Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. *Oncogene* **19**, 3013-3020
  232. Fiegen, D., Haeusler, L. C., Blumenstein, L., Herbrand, U., Dvorsky, R., Vetter, I. R., and Ahmadian, M. R. (2004) Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase. *The Journal of biological chemistry* **279**, 4743-4749
  233. Hodis, E., Watson, I. R., Kryukov, G. V., Arold, S. T., Imielinski, M., Theurillat, J. P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., Dicara, D., Ramos, A. H., Lawrence, M. S., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Voet, D., Saksena, G., Stransky, N., Onofrio, R. C., Winckler, W., Ardlie, K., Wagle, N., Wargo, J., Chong, K., Morton, D. L., Stemke-Hale, K., Chen, G., Noble, M., Meyerson, M., Ladbury, J. E., Davies, M. A., Gershenwald, J. E., Wagner, S. N., Hoon, D. S., Schadendorf, D., Lander, E. S., Gabriel, S. B., Getz, G., Garraway, L. A., and Chin, L. (2012) A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* **150**, 251-263
  234. Davis, M. J., Ha, B. H., Holman, E. C., Halaban, R., Schlessinger, J., and Boggon, T. J. (2013) RAC1P29S is a spontaneously activating cancer-associated GTPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 912-917
  235. Krauthammer, M., Kong, Y., Ha, B. H., Evans, P., Bacchiocchi, A., McCusker, J. P., Cheng, E., Davis, M. J., Goh, G., Choi, M., Ariyan, S., Narayan, D., Dutton-Regester, K., Capatana, A., Holman, E. C., Bosenberg, M., Sznol, M., Kluger, H. M., Brash, D. E., Stern, D. F., Materin, M. A., Lo, R. S., Mane, S., Ma, S., Kidd, K. K., Hayward, N. K., Lifton, R. P., Schlessinger, J., Boggon, T. J., and Halaban, R. (2012) Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nature genetics* **44**, 1006-1014
  236. Takenawa, T., and Suetsugu, S. (2007) The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 37-48
  237. Mullins, R. D., Heuser, J. A., and Pollard, T. D. (1998) The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 6181-6186
  238. Goley, E. D., and Welch, M. D. (2006) The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 713-726
  239. Campellone, K. G., and Welch, M. D. (2010) A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 237-251

240. Pollitt, A. Y., and Insall, R. H. (2009) WASP and SCAR/WAVE proteins: the drivers of actin assembly. *Journal of cell science* **122**, 2575-2578
241. Miki, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (1998) WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *The EMBO journal* **17**, 6932-6941
242. Takenawa, T., and Miki, H. (2001) WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *Journal of cell science* **114**, 1801-1809
243. Abou-Kheir, W., Isaac, B., Yamaguchi, H., and Cox, D. (2008) Membrane targeting of WAVE2 is not sufficient for WAVE2-dependent actin polymerization: a role for IRSp53 in mediating the interaction between Rac and WAVE2. *Journal of cell science* **121**, 379-390
244. Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2000) IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature* **408**, 732-735
245. Nakagawa, H., Miki, H., Nozumi, M., Takenawa, T., Miyamoto, S., Wehland, J., and Small, J. V. (2003) IRSp53 is colocalised with WAVE2 at the tips of protruding lamellipodia and filopodia independently of Mena. *Journal of cell science* **116**, 2577-2583
246. Lauffenburger, D. A., and Horwitz, A. F. (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**, 359-369
247. Huttenlocher, A., and Horwitz, A. R. (2011) Integrins in cell migration. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**, a005074
248. Kiosses, W. B., Shattil, S. J., Pampori, N., and Schwartz, M. A. (2001) Rac recruits high-affinity integrin alphavbeta3 to lamellipodia in endothelial cell migration. *Nature cell biology* **3**, 316-320
249. Webb, D. J., Parsons, J. T., and Horwitz, A. F. (2002) Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nature cell biology* **4**, E97-100
250. Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Rivelino, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L., and Geiger, B. (2001) Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nature cell biology* **3**, 466-472
251. Palecek, S. P., Loftus, J. C., Ginsberg, M. H., Lauffenburger, D. A., and Horwitz, A. F. (1997) Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* **385**, 537-540
252. Scita, G., Confalonieri, S., Lappalainen, P., and Suetsugu, S. (2008) IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions. *Trends in cell biology* **18**, 52-60
253. Suetsugu, S., Murayama, K., Sakamoto, A., Hanawa-Suetsugu, K., Seto, A., Oikawa, T., Mishima, C., Shirouzu, M., Takenawa, T., and Yokoyama, S. (2006) The RAC binding domain/IRSp53-MIM homology domain of IRSp53 induces

- RAC-dependent membrane deformation. *The Journal of biological chemistry* **281**, 35347-35358
254. Mattila, P. K., Pykalainen, A., Saarikangas, J., Paavilainen, V. O., Vihinen, H., Jokitalo, E., and Lappalainen, P. (2007) Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P2-rich membranes by an inverse BAR domain-like mechanism. *The Journal of cell biology* **176**, 953-964
  255. Yamagishi, A., Masuda, M., Ohki, T., Onishi, H., and Mochizuki, N. (2004) A novel actin bundling/filopodium-forming domain conserved in insulin receptor tyrosine kinase substrate p53 and missing in metastasis protein. *The Journal of biological chemistry* **279**, 14929-14936
  256. Yang, C., Hoelzle, M., Disanza, A., Scita, G., and Svitkina, T. (2009) Coordination of membrane and actin cytoskeleton dynamics during filopodia protrusion. *PloS one* **4**, e5678
  257. Suetsugu, S., Kurisu, S., Oikawa, T., Yamazaki, D., Oda, A., and Takenawa, T. (2006) Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac. *The Journal of cell biology* **173**, 571-585
  258. Govind, S., Kozma, R., Monfries, C., Lim, L., and Ahmed, S. (2001) Cdc42Hs facilitates cytoskeletal reorganization and neurite outgrowth by localizing the 58-kD insulin receptor substrate to filamentous actin. *The Journal of cell biology* **152**, 579-594
  259. Lim, K. B., Bu, W., Goh, W. I., Koh, E., Ong, S. H., Pawson, T., Sudhakaran, T., and Ahmed, S. (2008) The Cdc42 effector IRSp53 generates filopodia by coupling membrane protrusion with actin dynamics. *The Journal of biological chemistry* **283**, 20454-20472
  260. Funato, Y., Terabayashi, T., Suenaga, N., Seiki, M., Takenawa, T., and Miki, H. (2004) IRSp53/Eps8 complex is important for positive regulation of Rac and cancer cell motility/invasiveness. *Cancer research* **64**, 5237-5244
  261. Manabe, R., Kovalenko, M., Webb, D. J., and Horwitz, A. R. (2002) GIT1 functions in a motile, multi-molecular signaling complex that regulates protrusive activity and cell migration. *Journal of cell science* **115**, 1497-1510
  262. Frank, S. R., Adelstein, M. R., and Hansen, S. H. (2006) GIT2 represses Crk- and Rac1-regulated cell spreading and Cdc42-mediated focal adhesion turnover. *The EMBO journal* **25**, 1848-1859
  263. Siu, K. Y., Yu, M. K., Wu, X., Zong, M., Roth, M. G., Chan, H. C., and Yu, S. (2011) The non-catalytic carboxyl-terminal domain of ARFGAP1 regulates actin cytoskeleton reorganization by antagonizing the activation of Rac1. *PloS one* **6**, e18458
  264. Zhang, B., and Zheng, Y. (1998) Negative regulation of Rho family GTPases Cdc42 and Rac2 by homodimer formation. *The Journal of biological chemistry* **273**, 25728-25733
  265. Matozaki, T., Nakanishi, H., and Takai, Y. (2000) Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades. *Cellular signalling* **12**, 515-524

266. White, D. T., McShea, K. M., Attar, M. A., and Santy, L. C. (2010) GRASP and IPCEF promote ARF-to-Rac signaling and cell migration by coordinating the association of ARNO/cytohesin 2 with Dock180. *Molecular biology of the cell* **21**, 562-571
267. Patel, M., Chiang, T. C., Tran, V., Lee, F. J., and Cote, J. F. (2011) The Arf family GTPase Arl4A complexes with ELMO proteins to promote actin cytoskeleton remodeling and reveals a versatile Ras-binding domain in the ELMO proteins family. *The Journal of biological chemistry* **286**, 38969-38979
268. Koronakis, V., Hume, P. J., Humphreys, D., Liu, T., Horning, O., Jensen, O. N., and McGhie, E. J. (2011) WAVE regulatory complex activation by cooperating GTPases Arf and Rac1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 14449-14454
269. Connolly, B. A., Rice, J., Feig, L. A., and Buchsbaum, R. J. (2005) Tiam1-IRSp53 complex formation directs specificity of rac-mediated actin cytoskeleton regulation. *Molecular and cellular biology* **25**, 4602-4614
270. Adams, H. C., 3rd, Chen, R., Liu, Z., and Whitehead, I. P. (2010) Regulation of breast cancer cell motility by T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein. *Breast cancer research : BCR* **12**, R69
271. Minard, M. E., Kim, L. S., Price, J. E., and Gallick, G. E. (2004) The role of the guanine nucleotide exchange factor Tiam1 in cellular migration, invasion, adhesion and tumor progression. *Breast cancer research and treatment* **84**, 21-32
272. Krugmann, S., Jordens, I., Gevaert, K., Driessens, M., Vandekerckhove, J., and Hall, A. (2001) Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Current biology : CB* **11**, 1645-1655
273. Miki, H., and Takenawa, T. (2002) WAVE2 serves a functional partner of IRSp53 by regulating its interaction with Rac. *Biochemical and biophysical research communications* **293**, 93-99
274. Kanoh, H., Williger, B. T., and Exton, J. H. (1997) Arfaptin 1, a putative cytosolic target protein of ADP-ribosylation factor, is recruited to Golgi membranes. *The Journal of biological chemistry* **272**, 5421-5429
275. Tarricone, C., Xiao, B., Justin, N., Walker, P. A., Rittinger, K., Gamblin, S. J., and Smerdon, S. J. (2001) The structural basis of Arfaptin-mediated cross-talk between Rac and Arf signalling pathways. *Nature* **411**, 215-219
276. Williger, B. T., Ostermann, J., and Exton, J. H. (1999) Arfaptin 1, an ARF-binding protein, inhibits phospholipase D and endoplasmic reticulum/Golgi protein transport. *FEBS letters* **443**, 197-200
277. Boman, A. L., Kuai, J., Zhu, X., Chen, J., Kuriyama, R., and Kahn, R. A. (1999) Arf proteins bind to mitotic kinesin-like protein 1 (MKLP1) in a GTP-dependent fashion. *Cell motility and the cytoskeleton* **44**, 119-132
278. Cockcroft, S., Thomas, G. M., Fensome, A., Geny, B., Cunningham, E., Gout, I., Hiles, I., Totty, N. F., Truong, O., and Hsuan, J. J. (1994) Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes. *Science (New York, N.Y.)* **263**, 523-526

279. 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) GEP100 links epidermal growth factor receptor signalling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion. *Nature cell biology* **10**, 85-92
280. Kim, Y., Sung, J. Y., Ceglia, I., Lee, K. W., Ahn, J. H., Halford, J. M., Kim, A. M., Kwak, S. P., Park, J. B., Ho Ryu, S., Schenck, A., Bardoni, B., Scott, J. D., Nairn, A. C., and Greengard, P. (2006) Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology. *Nature* **442**, 814-817
281. Innocenti, M., Zucconi, A., Disanza, A., Frittoli, E., Areces, L. B., Steffen, A., Stradal, T. E., Di Fiore, P. P., Carrier, M. F., and Scita, G. (2004) Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nature cell biology* **6**, 319-327
282. Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., and Kirschner, M. W. (2002) Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* **418**, 790-793
283. Muralidharan-Chari, V., Hoover, H., Clancy, J., Schweitzer, J., Suckow, M. A., Schroeder, V., Castellino, F. J., Schorey, J. S., and D'Souza-Schorey, C. (2009) ADP-ribosylation factor 6 regulates tumorigenic and invasive properties in vivo. *Cancer research* **69**, 2201-2209



