

Université de Montréal

**Rôle de la GTPase ARF1 dans la migration et l'invasion
des cellules du cancer du sein**

par
Sabrina Schlienger

Département de pharmacologie, Université de Montréal
Faculté de médecine

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

Mars 2016

© Sabrina Schlienger, 2016

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
**Rôle de la GTPase ARF1 dans la migration et l'invasion
des cellules du cancer du sein**

présentée par :
Sabrina Schlienger

évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-François Gauchat, président-rapporteur

Audrey Claing, directeur de recherche

Christian Beauséjour, membre du jury

Yves Saint Pierre, examinateur externe

Carréno Sébastien, représentant du doyen de la FES

Résumé

La capacité des cellules à être invasives et métastatiques est une caractéristique fondamentale de la malignité tumorale. Nous avons récemment montré que le facteur d'ADP-ribosylation 1 (ARF1) est surexprimé dans les lignées cellulaires hautement invasives du cancer du sein et que la stimulation du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) peut activer cette isoforme pour contrôler la migration ainsi que la prolifération. Cependant, le rôle de cette GTPase dans la régulation du processus d'invasion cellulaire et les mécanismes moléculaires associés demeure inconnu. Nous avons comme objectifs dans cette thèse, de définir les voies de signalisation sous le contrôle d'ARF1 dans les cellules de cancer du sein et démontrer que l'expression et l'activation de cette GTPase est associée à un phénotype hautement invasif.

Nos études démontrent que la modulation de l'expression et l'activité d'ARF1 affecte la capacité des cellules MDA-MB-231 (pour *M. D. Anderson-metastatic breast-231*), une ligne hautement invasive, à dégrader la matrice extracellulaire via l'activité de la métalloprotéinase MMP-9. ARF1 contrôle les deux principales structures impliquées dans l'invasion, en jouant sur la maturation d'invadopodes ainsi que la relâche de microvésicules membranaires. D'un point de vue mécanistique, l'axe de signalisation ARF1, RhoA-RhoC et la chaîne légère de la myosine (MLC) explique ces phénomènes.

De plus, nous démontrons que l'un des mécanismes par lequel ARF1 régule la migration est en contrôlant l'assemblage des points adhésions focaux et ce, dans plusieurs types de cellules cancéreuses du sein. ARF1, en étant un membre du complexe d'adhésion, régleme le recrutement et l'activité de protéines clés à la β 1-intégrine tels que la paxilline, la talin et la kinase d'adhésion focale (FAK).

Pour finir, nous rapportons que ARF1 et ARF6 ont un rôle majeur dans la transition épithélio-mésenchymateuse. ARF1 est retrouvé fortement exprimé dans les tissus de sous-types les plus agressifs et les plus avancés de cancer du sein. Dans un modèle murin, la modulation à la baisse de l'expression d'ARF1 dans les cellules MDA-MB-231 corrèle avec la diminution de croissance des tumeurs primaires et l'installation des métastases pulmonaires. De plus, nous rapportons que la surexpression des ARF dans des cellules non invasives, les MCF7 (pour *Michigan Cancer Foundation-7*), permet la

nidification de métastases. En effet, dans les MCF7, ARF1 contrôle l'adhésion intercellulaire via la β -caténine et l'E-cadhérine, promeut l'activation de l'oncogène Ras (pour *Rat Sarcoma/ Rat Fibrosarcoma virus*) et l'expression de plusieurs inducteurs de transition épithélio-mésenchymateuse comme snail et slug. De plus, ARF1 contrôle l'invasion, la prolifération cellulaire et même la résistance à certains agents chimiothérapeutiques.

Globalement, nos études identifient ARF1 comme un interrupteur moléculaire de la progression tumorale et suggèrent que la limitation de son expression/activité pourrait améliorer le devenir des patients atteints du cancer du sein.

Mots-clés : Facteurs d'ADP-ribosylation, récepteur au facteur de croissance épidermique, invasion, migration, transition-épithélio-mésenchymateuse, cancer du sein.

Abstract

Invasive and metastatic capacities are fundamental features for tumor malignancy. We have recently shown that the ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) is over-expressed in highly invasive breast cancer cell lines and stimulation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) may activate this isoform to regulate migration and proliferation. However, the role of this GTPase in regulating cell invasion process and related molecular mechanisms remain unknown. In this thesis, we had as objectives, to define the signaling pathways under the control ARF1 in breast cancer cells and show that the expression and activation of the GTPase is associated with highly invasive phenotype.

Our studies show that the modulation of the expression and activity of ARF1 affect the ability of MDA-MB-231 cells (*M. D. Anderson-metastatic breast-231*), a highly invasive line, to degrade the extracellular matrix via the activity of the metalloproteinase MMP-9. ARF1 controls the two main structures involved in the invasion, playing on invadopodia maturation and shedding of membrane microvesicles. The molecular mechanisms involve the regulation of RhoA and RhoC activity by ARF1 and the following downstream events associated with and the myosin light chain (MLC) phosphorylation.

Furthermore, we demonstrate that ARF1 also regulates migration by controlling the assembly of focal adhesion complexes in many types of breast cancer cells. ARF1, also present in adhesion complexes, regulates the recruitment and activity of key proteins such as paxillin, talin and *focal adhesion kinase* (FAK) to β 1 integrin.

Finally, we report that ARF1 and ARF6 play a major role in the epithelial-mesenchymal transition (EMT). ARF1 is found highly expressed in tumor tissue of the most aggressive and advanced subtypes of breast cancer. Lowered expression of ARF1 in vivo in the MDA-MB-231 cells impairs tumor growth in primary tumors and inhibits lung metastasis. We report that upregulation of the ARF in non-invasive cells, MCF7 (*Michigan Cancer Foundation-7*) induce metastasis nidification. Indeed, we show in MCF7 that ARF1 controls intercellular adhesion via the β -catenin and E-cadherin,

promotes Ras (*Rat Sarcoma/ Rat Fibrosarcoma virus*) oncogene activation, and controls expression of several epithelial-mesenchymal transition markers such as snail and slug. Moreover, we demonstrate that ARF1 controls invasion, proliferation and even resistance to certain chemo-therapeutic agents, in MCF7 cells.

Overall, our studies identify ARF1, as a molecular switch of tumor progression and suggest that limiting its expression / activity could improve the outcome of breast cancer patients.

Keywords: ADP-ribosylation Factor, epidermal growth factor receptor, invasion, migration, epithelio-mesenchymal transition, breast cancer.

Table des matières

I. CHAPITRE I : Introduction	1
I. 1. Le cancer	1
I.1.1. Découverte et origine	1
I.1.2. La carcinogenèse	2
I.1.2.1. Nomenclature	2
I.1.2.2. Le développement tumoral	3
I.1.2.3. La progression métastatique	4
I.1.2.4. Modifications géniques	7
I. 2. Le cancer du sein	11
I.2.1 Les différents types	12
I.2.1.1. Normal	12
I.2.1.2. Luminal type A et B	12
I.2.1.3. HER2	13
I.2.1.4. Basal/ triple négatif, la controverse	13
I.2.2 Le cancer du sein triple négatif et ses limitations de traitement	15
I.2.2.1. Les thérapies générales	15
I.2.2.2. Les thérapies ciblées	15
I. 3. Facteurs de croissance, récepteurs et cancer	18
I.3.1. Les récepteurs membranaires : à activité tyrosine kinase	18
I.3.2. L'EGFR	21
I.3.2.1. Les ligands associés au récepteur à l'EGF	21
I.3.2.2. Structure, activation et sites de phosphorylation de l'EGFR	22
I.3.2.3. Modes d'activation oncogénique de l'EGFR	25
I.3.3. Transduction du signal	27
I.3.3.1. La voie Ras/ MAPK (ERK1 / 2)	28
I.3.3.2. La voie PI3K/AKT	30
I. 4. Les GTPases monomériques, la superfamille des Ras	33
I.4.1 La famille des Rho GTPases	34
I.4.1.1. Les GTPases Rho	35
I.4.2 La famille des facteurs d'ADP-ribosylation	39
I.4.2.1. Classement et distribution	40
I.4.2.2. Structure	40
I.4.2.3. Activation et régulation	43
I.4.2.4. ARF1	49
I.4.2.5. ARF6	54
I.4.2.6. Les autres protéines ARF	57
I. 5. La migration	58
I.5.1 Les grandes étapes de la migration	58
I.5.2 L'adhésion	61

I. 6. L'invasion.....	65
I.6.1 La matrice extracellulaire	66
I.6.2 La transition épithélio-mésenchymateuse.....	68
I.6.2.1. Généralités.....	68
I.6.2.2. Induction et effecteurs de la TEM.....	70
I.6.2.3. Perte et acquisition de marqueurs.....	71
I.6.3 Les invadopodes	72
I.6.3.1. Structure et généralités	72
I.6.3.2. Initiation et maturation des invadopodes	74
I.6.3.3. Une cible thérapeutique.....	77
I.6.4 Les microvésicules, de type « shedding vesicles »	78
I.6.4.1. Structure et généralités	78
I.6.4.2. Biogénèse des microvésicules	81
I.6.4.3. Rôle de la GTPase ARF6	82
I.6.5 Les métalloprotéinases.....	82
I.6.5.1. Structure et activation des MMPs	83
I.6.5.2. Les MMPs et le cancer	84
Hypothèse de recherche.....	86
II. CHAPITRE II : ARF1 regulates the Rho/MLC pathway to control EGF-dependent breast cancer cell invasion.....	88
ABSTRACT	89
INTRODUCTION	90
RESULTS.....	92
DISCUSSION	98
MATERIALS AND METHODS	102
ACKNOWLEDGEMENTS.....	107
FIGURE LEGENDS	107
REFERENCES	130
III. CHAPITRE III : ARF1 regulates adhesion of MDA-MB-231 invasive breast cancer cells through formation of focal adhesions.....	135
ABSTRACT	136
INTRODUCTION.....	137
MATERIAL AND METHODS.....	140
RESULTS.....	143
DISCUSSION	148
CONCLUSION.....	150
ACKNOWLEDGEMENTS.....	150
FIGURE LEGENDS	151
REFERENCES.....	166
IV. CHAPITRE IV : ADP-ribosylation factor 1 expression regulates epithelial-mesenchymal transition and predicts poor clinical outcome in triple-negative breast cancer	170
ABSTRACT	171
INTRODUCTION	172
RESULTS.....	173

DISCUSSION	179
MATERIALS AND METHODS	182
FIGURE LEGENDS	190
REFERENCES.....	208
V. CHAPITRE V : Discussion et Conclusion	213
VI. CHAPITRE VI : Perspectives avec approches expérimentales.....	224
VI. 1. Effets des protéines ARF sur l'organisation des acini.....	224
VI. 2. Rôle des protéines ARF dans l'angiogenèse <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>.	229
VI. 3. Implication des protéines ARF sur le système immunitaire	234
VI. 4. Rôle des protéines ARF dans la relation cancer/adipocytes	240
VI. 5. Implication des protéines ARF dans le nichage des cellules souches	243
VI. 6. Les protéines ARF comme outils de pronostic:.....	245
Références.....	250

Liste des figures du corps de la thèse :

I. CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	1
FIGURE I-1: PROFIL DE CROISSANCE CELLULAIRE ANORMALE.....	4
FIGURE I-2: LA CASCADE INVASION/METASTASES.....	6
FIGURE I-3: CLASSIFICATION DES RECEPTEURS TYROSINE KINASES.....	20
FIGURE I-4: LES LIGANDS DES RECEPTEURS HER/ERBB.....	22
FIGURE I-5: STRUCTURE DE L'EGFR.....	24
FIGURE I-6: LA VOIE RAS/MAPK.....	30
FIGURE I-7: LA VOIE P13K/AKT.....	32
FIGURE I-8: ROCK1/2 EFFECTEURS DES RHO GTPASES.....	38
FIGURE I-9 : STRUCTURE DES PROTEINES ARFS.....	42
FIGURE I-10: ACTIVATION ET INACTIVATION DES PROTEINES ARF GTPASES.....	43
.....	
FIGURE I-11: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PROTEINES ARF GAPS.....	47
.....	
FIGURE I-12: MODELISATION D'UN DIMER ARF1-GTP.....	51
FIGURE I-13: LA MIGRATION CELLULAIRE.....	60
FIGURE I-14: LE COMPLEXE D'ADHERENCE FOCALE.....	62
FIGURE I-15: MODELE SCHEMATIQUE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE.....	67
.....	
FIGURE I-16: LES DIFFERENTS TYPES DE TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE.....	69
FIGURE I-17: DESCRIPTION SCHEMATIQUE DES INVADOPODES.....	73
FIGURE I-18: STRUCTURE ET COMPOSES MOLECULAIRES D'UN INVADOPODE.....	75
FIGURE I-19: FORMATION DE MICROVESICULES DE TYPE SHEDDING.....	80
II. CHAPITRE II : ARF1 REGULATES THE RHO/MLC PATHWAY TO CONTROL EGF-DEPENDENT BREAST CANCER CELL INVASION.....	88
FIGURE II-1: MODULATION OF ARF1 EXPRESSION AFFECTS CELL INVASION.....	114
.....	
FIGURE II-2: MODULATION OF ARF1 EXPRESSION AND MMP-9 ACTIVITY.....	115
FIGURE II-3: ARF1 DEPLETION BLOCKS INVADOPODIA MATURATION.....	116
FIGURE II-4: ARF1 IS FOUND IN SHEDDING MICROVESICLES AND CONTROLS THEIR RELEASE.....	117
FIGURE II-5: ARF1, RHOA/RHOC CONTROL THE PHOSPHORYLATION OF MLC UPON EGF.....	118
FIGURE II-6: ARF1 CONTROLS RHO GTPASES ACTIVATION AND LOCALIZATION.....	119
FIGURE II-7: RHOA AND RHOC CONTROL THE LATE PHASE OF ARF1 ACTIVATION.....	120
FIGURE II-8: EGF STIMULATION PROMOTES THE ASSOCIATION OF ARF1 AND RHO GTPASES.....	121
FIGURE II-9: MODULATION OF RHO/MLC BY ARF1 CONTROLS THE RELEASE OF MICROVESICLES.....	122

FIGURE II-10: SUPP. 1. ARF1 LEVELS IN THE DIFFERENT EXPERIMENTAL CONDITIONS.....	123
FIGURE II-11: SUPP 2. ARF1 IS PRESENT IN SHEDDING MICROVESICLES. ...	124
FIGURE II-12: SUPP 3. EXPRESSION OF ARF1 FOLLOWING SIRNA RESCUE RHO ACTIVATION.	125
FIGURE II-13: SUPP 4. ARF1 CONTROLS RHO ACTIVATION IN SKR3 AND HCC70 CELLS.	126
FIGURE II-14: SUPP 5. DEPLETION OF ARF1 IMPAIRS THE RECRUITMENT OF RHO GTPASES.....	127
FIGURE II-15: SUPP 6. ARF1 Q ⁷¹ L DECREASE RHOA AND RHOC ACTIVATION.	128
FIGURE II-16: SUPP 7. EXPRESSION LEVELS OF ARF1, RHOA AND RHOC MUTANTS.	129
III. CHAPITRE III : ARF1 REGULATES ADHESION OF MDA-MB-231 INVASIVE BREAST CANCER CELLS THROUGH FORMATION OF FOCAL ADHESIONS	135
FIGURE III-1: DEPLETION OF ARF1 BLOCKS THE RECRUITMENT OF PAXILLIN TO FA.....	156
FIGURE III-2: CONCENTRATION AND TIME-DEPENDENT EFFECTS OF INHIBITOR LM11.	157
FIGURE III-3: INHIBITION OF ARF1 ACTIVATION BLOCKS THE RECRUITMENT OF PAXILLIN TO FA.	158
FIGURE III-4: EFFECT OF ARF1 INHIBITOR LM11 IN MDA-MB-231 CELLS. ...	159
FIGURE III-5: DEPLETION OF ARF1 BLOCKS FA FORMATION IN TWO OTHER CANCER CELL LINES.	160
FIGURE III-6: ARF1 CONTROLS β 1-INTEGRIN INTERACTION WITH FOCAL ADHESION PARTNERS.....	161
FIGURE III-7: ARF1 CONTROLS THE EGF-MEDIATED INTERACTION OF PROTEINS IN FA.	162
FIGURE III-8: ARF1 EXPRESSION AND ACTIVATION CONTROL FAK PHOSPHORYLATION.....	163
FIGURE III-9: FAK CONTROLS ARF1 ACTIVATION THROUGH EGFR PHOSPHORYLATION.....	164
FIGURE III-10: EGF STIMULATION PROMOTES THE ASSOCIATION OF ARF1 WITH FA PROTEINS.....	165
IV. CHAPITRE IV : ADP-RIBOSYLATION FACTOR 1 EXPRESSION REGULATES EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION AND PREDICTS POOR CLINICAL OUTCOME IN TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER	170
FIGURE IV-1: ARF1 EXPRESSION CORRELATES WITH MOLECULAR SUBTYPES AND TUMOR GRADE.....	196
FIGURE IV-2: ARF1 REGULATES PRIMARY MOUSE INVASIVE BREAST CANCER TUMOR.....	197
FIGURE IV-3: ARF1 DEPLETION IMPAIRED BREAST MOUSE METASTASIS .	198
FIGURE IV-4: ARF1 IS IMPORTANT FOR THE MAINTENANCE OF ADHERENT JUNCTIONS.....	199
FIGURE IV-5: ARF PROTEINS CONTROL KEY FACTORS OF EMT	200

FIGURE IV-6: ARF CONTROLS MOTILITY, INVASION, PROLIFERATION, AND SURVIVAL OF MCF7.....	201
FIGURE IV-7: ARF1 AND ARF6 OVEREXPRESSION INCREASES METASTASIS <i>IN VIVO</i>	202
FIGURE IV-8: ARF6 EXPRESSION CORRELATES WITH MOLECULAR SUBTYPES AND TUMOR GRADE.....	203
FIGURE IV-9: VALIDATION OF ARF1 SHRNA IN MDA-MB-231 BREAST CANCER CELLS.....	204
FIGURE IV-10: ARF ACTIVATION IN MCF7 CELLS	205
FIGURE IV-11: OVEREXPRESSION OF ARF CONTROLS PROLIFERATION OF MCF7 CELLS.....	206
FIGURE IV-12: OVEREXPRESSION OF ARF POTENTIATES THE MAPK AND PI3K PATHWAYS.....	207
V. CHAPITRE V : DISCUSSION ET CONCLUSION.....	213
VI. CHAPITRE VI : PERSPECTIVES AVEC APPROCHES EXPÉRIMENTALES	224
FIGURE VI-1: UN ACINUS.....	227
FIGURE VI-2: LES PROTEINES ARF SONT IMPORTANTES POUR LA FORMATION DES ACINI.....	228
FIGURE VI-3: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ANGIOGENESE.....	233
FIGURE VI-4: TEST DE SPROUTING EN UTILISANT DES AORTES DE RATS.	234
FIGURE VI-5: ARF1 EST PRESENTE DANS LES GANGLIONS LYMPHATIQUES QUI ONT DES METASTASES.....	247

Liste des abréviations

AATYK : *Apoptose-associated tyrosine kinase receptor*
ACAP : *ARF GAP with Coiled-Coil domain, ANK repeat and PH domain*
ADAM : *A disintegrin and metalloproteinase*
ADN : Acide désoxyribonucléique
AGAP : *ARF GAP with GTP binding protein like, ANK repeat and PH domain*
AKT : Protéine kinase B
ALK : *Anaplastic lymphoma kinase receptor*
AR : Amphiréguline
ARAP : *ARF GAP with Rho GAP, ANK repeat and PH domain*
ARF : Facteur de ribosylation de l'ADP (*ADP ribosylation factor*)
ARL : *ADP ribosylation like factors*
ARNO : *ADP-ribosylation factor nucleotide-binding site opener*
Arp2/3 : *Actin-related proteins 2 and 3*
ASAP : *ARF GAP with SH3, ANK repeat and PH domain*
AT1R : *Angiotensin II Type I Receptor*
ATP : Adénosine triphosphate
AXL : *Tyro3 protein tyrosine kinase receptor*
AZAP : ARF GAPs avec des répétitions d'Ankyrine et des domaines d'homologie à la Pleckstrine
BFA : *Brefeldin A*
BIG : *BFA-inhibited GEF*
BRAG : *BFA-resistant ARF GEF*
BTC : β -celluline
Cdc42 : *Cell division cycle 42*
COP : *Coat protein*
CSK : *C terminal Src Kinase*
DDR : *Discoidin domain receptor*
E2F1 : *E2F Transcription Factor 1*
EFA6 : *Exchange factor for ARF6*
EGF : Facteur de croissance épidermique
EGFR : Récepteur associé aux facteurs de croissance épidermique (*epidermal growth factor*)
ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*
EPHR : *Ephrin receptor*
eNOS : Oxyde nitrique synthase endothéliale
EPR : Épiréguline
ER : Récepteur à l'œstrogène (*estrogen receptor*)
ERGIC : Compartiment intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et le Golgi
ERK : *Extracellular-regulated kinase*
FAK : Kinase d'adhésion focale (*focal adhesion kinase*)
FBS : *Fetal bovin serum*
FBX8 : *F-box only protein 8*
FGFR : *Fibroblast growth factor receptor*
FISH : *Five SH3 domain-containing protein (Tsk5)*

GAP : protéines régulatrices de l'activité GTPasique (*GTPase activating protein*)
 GBF1 : *Golgi BFA-resistance factor 1*
 GDI : Inhibiteur de dissociation du nucléotide
 GDP : Guanosine diphosphate
 GEF : Facteur d'échange de guanosine
 GGA3 : *Golgi-localized γ -ear containing ARF-binding proteins 3*
 GIT : *G protein-coupled receptor kinase-interactor*
 GM130 : *cis-Golgi matrix protein of 130 KD*
 GPCR : récepteurs couplés aux protéines G
 Grb2 : *Growth factor receptor-bound protein 2*
 GSK3 β : *Glycogen synthase kinase 3 beta*
 GTP : Guanosine triphosphate
 HB-EGF : Facteur de croissance épidermique liant l'héparine
 HCC70 : *Human breast cancer cell line 70*
 HER : *Human epidermal growth factor receptor*
 HGFR : *Hepathocyte growth factor receptor*
 HIF-1 α : *Hypoxia-inducible factor-1 alpha*
 HRG : Hérégulines
 HSL : Hormone sensible à la lipase
 HSPC : Cellules souches hématopoïétiques et cellules progénitrices
 HSP70 : *Heat shock protein 70*
 HUVEC : *Human umbilical vein endothelial cells*
 IGF-1R : *Insulin-like growth factor 1 receptor*
 IHC : Immunohistochimie
 IL : Interleukine
 ILK : *Integrin-linked kinase*
 IRR : *Insulin-related receptor*
 IRS1 : *Insulin receptor substrate 1*
 IRSp53 : *Insulin receptor substrate protein of 53 KDa*
 JAK : *Janus kinase*
 JNK : *c-Jun N-terminal kinase*
 KIT/SCFR : *Stem cell factor receptor*
 KLG/CCK : *Colon carcinoma kinase*
 LMR : *Lemur receptor*
 LPS : Lipopolysaccharide
 LTK : *Leucocyte tyrosine kinase*
 MAP : Mitogen-activated protein
 MCF7 : *Michigan Cancer Foundation-7*
 M-CFS : *Macrophage colony-stimulating factor*
 MDA-MB-231 : *M. D. Anderson-metastatic breast-231*
 MDCK : *Madin-Darby canine kidney*
 mDia1 : *Diaphanous-related formin 1*
 MEC : Matrice extracellulaire
 MECI : Matrice extracellulaire interstitielle
 MEK: MAP ERK kinase
 microARN : courts acides ribonucléiques

MLC : Chaîne légère de la myosine (*myosine light chain*)
 MMP : Metalloprotéase de la matrice (*metalloproteinase*)
 MT1-MMP : *Membrane type 1-matrix metalloproteinase 1*
 mTOR : *Mammalian target of rapamycin*
 MUSK : *Muscle-specific kinase*
 MYPT : *Myosin phosphatase targeting protein*
 NGFR : *Nerve growth factor receptor*
 NK1 : *Neurokinin 1*
 NO : monoxide d'azote
 NRG : Neurégulines
 PARP : Poly(ADP-ribose) polymérase
 PAI1 : *Plasminogen activator inhibitor 1*
 PDGFR : Récepteur associé au facteur de croissance dérivé des plaquettes (*platelet-derived growth factor receptor*)
 PDK1 : 3-phosphoinositidedependent kinase 1
 PE : Phosphatidyl-ethanolamine
 PH : Domaine homologue de la plekstrine (*pleckstrin homology domain*)
 PI3K : Phosphatidylinositol 3-OH kinase
 PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
 PIP3 : Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
 PKC : Protéine kinase C (*protein kinase C*)
 PLC : Phospholipase C
 PLD : Phospholipase D
 PMA : *Phorbol 12-myristate 13-acetate*
 PR : Récepteur à la progestérone
 PRK : Kinases associées à PKC
 PS : Phosphatidyl-sérine
 Rac1 : Substrat de Ras reliée à la C3 toxine botulique 1 (*Ras related C3 botulinum toxin substrate 1*)
 Ras : *Rat Sarcoma/ Rat Fibrosarcoma virus*
 Rb : Rétinoblastome
 RET : *Rearranged during transfection*
 ROK, ROCK : Kinase de Rho
 ROR : *Receptor orphan*
 ROS : *Receptor tyrosine kinase for some epithelial cells*
 RTK : Récepteur tyrosine kinase
 RYK : *Receptor like-tyrosine kinase*
 SH2/3 : *Src Homology 2/3*
 SKBR3 : *Sloan-Kettering breast cancer cell line 3*
 SMAP : *Stromal Membrane-Associated Protein*
 SNARE : *Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*
 SOS : *Son of Sevenless*
 STAT : *Signal transducer and activator of transcription*
 STAT : *signal transducer and activator of transcription*
 TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse
 TF : Facteur tissulaire

TGF : Facteur de croissance transformant

TGF : *Transforming growth factor*

TIER : *Tyrosine kinase receptor in endothelial cells*

TME : Transition mésenchymateuse-épithéliale

Tsk5 : *Tyrosine kinase substrate 5*

uPA : *urokinase-type plasminogen activator*

VEGF : Facteur de croissance endothéliale vasculaire (*vascular endothelial growth factor receptor*)

VSMC : *Vascular smooth muscle cell*

WASP : *Wiskott-Aldrich syndrome protein*

WAVE : Verproline de la famille des protéines du syndrome Wiskott-Aldrich

ZO : Zonula Occludens

Je dédie cette thèse à ma mère et ma grand-mère,
Barbara et Thérèse,
qui même avec la distance géographique ont toujours été à mes côtés.

Remerciements

Cette section, d'après l'Université est facultative, mais pourtant si importante. Le doctorat a été une étape majeure dans ma vie et cette partie ne pouvait pas être succincte.

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche Audrey Claing. Tu m'as accueillie au sein de ton laboratoire sans même ne m'avoir jamais vu. Tu m'as donné ma chance et ce n'est pas rien comme cadeau. Sans toi je ne serais pas là aujourd'hui. J'ai ainsi pu avec ton soutien, m'épanouir dans ce milieu. Tu m'as ensuite fait un autre très beau cadeau après celui de ta confiance, celui de la liberté. Tu m'as toujours laissé libre de faire ce que je voulais. Cette indépendance intellectuelle que tu as bien voulu me donner a alimenté mon enthousiasme scientifique. Chaque journée est devenue une exploration, construite de stratégies et d'idées farfelues.

Ensuite, je voudrais remercier ma mère, Barbara Schlienger et ma grand-mère, Thérèse Beaujeu, qui ont traversée de nombreuses fois l'Atlantique pour venir me voir. Merci mémé pour tes pulls et tes appels le matin à mon réveil pour me dire de me couvrir, car il allait faire très froid. Merci, maman d'avoir toujours été à mes côtés et dans tous les moments de ma vie. Je tiens à remercier également ma Marraine qui a veillé sur nous, telle une Marraine la Fée, quand nous sommes arrivés dans ce pays inconnu. Elle a été notre pillar familiale et je n'oublierais jamais tout l'amour que tu nous as donné. Merci à mon père pour m'avoir transmis sa volonté et sa rigueur. J'ai la chance de vous avoir ou de vous avoir eu à mes côtés. Je remercie également, toute ma famille et tous mes proches qui m'ont soutenue au long de mon cheminement.

Mes plus sincères remerciements sont adressés à Cyril Bignone, mon amour. Merci d'avoir été à mes côtés depuis mes 17 ans. Tu as pu voir l'accomplissement de toutes mes études universitaires et tu y as survécu ! Quand j'ai voulu aller au Canada, tu m'as suivie ! Quand j'ai travaillé tard le soir, les week-ends, et les jours fériés, tu es venue au laboratoire avec moi. Tu n'as jamais remis en question mon emploi de temps, au lieu de ça, tu es resté à mes côtés pour m'encourager. Avec le nombre d'heures que tu as passé là-bas, à l'époque, on aurait pu te prendre pour un étudiant d'Audrey ! Merci aussi d'avoir essuyé mes larmes pendant la première année où rien ne voulait marcher. Je sais qu'on s'appelle chercheur et pas trouveur (comme en Allemagne), mais on est ultra content quand ça fonctionne aussi. On a commencé ce doctorat, j'étais une « demoiselle », tu m'as fait devenir une épouse et une mère.

Je remercie ma collègue Shirley Campbell. Comme Robin le ferait avec Batman, merci Shirley pour avoir été la complice de mes manips et de m'avoir soutenue dans mes projets. Tel un agent secret, tu as usé de ton pouvoir de commande pour voir l'essor de nouveaux projets! Merci aussi d'avoir été la maman du labo en nous apportant bien trop souvent des gâteaux délicieux. Toutes deux mariées à des gars du monde de jeux vidéo et mamans de bébés de la science, on avait beaucoup de points communs en plus de la science pour bien s'entendre !

Merci à Ricardo Charles, mon acolyte de science depuis le début, qui m'a souvent rendu service. Tu as été là, dans n'importe quel moment pour moi, et nous savons que cette thèse a été pleine de péripéties ! En plus de nos superbes conversations de sciences,

on a eu la chance de partager bien plus de moments, car tu es devenu un très bon ami. Tu fais parti de ceux qui en plus de l'avoir vu toute la journée on les revoit le soir pour s'amuser ! Merci à toi pour nos soirées lab avec les courses de chaises, l'évaluation de ma dose tolérable d'ETOH, nos midis à la place laurentienne, les soirées d'impro et même de théâtre, les road trip à supporter mes milliers d'envies de faire pipi, les soirées de jeux d'évasion ou de sculptures de rice krispies, la récupération de miss maladroite en raquettes.... Merci Ric d'avoir été toujours à mes côtés et ce, sans jamais te poser de questions.

Je tiens à remercier mon petit Sebastian Lewis-Saravalli. Quand tu es parti du laboratoire, j'étais vraiment triste. Sauf que tu n'es jamais parti, tu es resté présent pour moi au quotidien et nos discussions n'ont jamais arrêtées. Seb/Sab la fine équipe ! Tu as rallumé ma fibre artistique que j'avais oubliée et qui me manquait, merci encore pour ça. On en a partagé des aventures tous les deux, et ça a débouché sur cette fabuleuse amitié. Tu fais maintenant partis des personnes les plus importantes de ma vie et je ne serais pas quoi rajouté de plus fort à ça.

Merci aussi à Suncica Kolev, Frédéric Paquin et Marc-André Saint-Laurent, pour tous ces bons moments bons moments qu'on a partagés pendant cette thèse.

Merci à Aurélie Tormo et Sarah Pasquin, les girls next door, avec qui j'ai partagé toutes mes pauses et mes potins.

Je remercie aussi à Pierre-Luc Boulay qui m'a montré les bases au laboratoire. Il faut se le dire quand je suis arrivée, j'en connaissais vraiment pas long en manip. Pierre-Luc tu m'as fait embarquer sur ton projet, et tu m'as expliqué de nombreuses choses qui m'ont énormément servies. J'ai retenue vraiment beaucoup de choses de cette expérience et j'ai adoré l'amour que tu avais pour ce projet que tu m'as bien transmis, alors merci pour ça.

Je remercie tous les amis de science que j'ai pu croiser et avec qui nous avons développé des liens. Merci aussi à tous les gens qui m'ont montré ce que je ne voudrais pas devenir en science. Les bonnes, comme les mauvaises expériences, sont toujours une source de réflexion, qui ont été très formatrices pour moi.

Avoir des personnes si proches de vous, c'est un cadeau de la vie, et d'avoir gagné autant d'amis au cours de cette thèse, et bien ça rend encore plus difficile la fin de cette aventure. En effet, il y a eu beaucoup d'expériences scientifiques au cours de cette thèse mais aussi beaucoup d'expériences humaines !

Enfin, je remercie les membres du jury d'avoir accepté de lire et corriger cette thèse qui me tient très à coeur.

I. CHAPITRE I : Introduction

I. 1. Le cancer

I.1.1. Découverte et origine

Le cancer touche les animaux comme les hommes, on retrouve ainsi des traces de celui-ci depuis l'époque antique. On commença à parler de lui environ 3000 ans avant Jésus Christ (JC). Bien entendu à cette époque le mot cancer n'avait pas été utilisé. C'est dans un ancien manuel égyptien, dit le « papyrus d'Edwin Smith » sur la chirurgie traumatologique, que l'on a découvert la plus ancienne description du cancer. Dans ce manuscrit, il est décrit huit cas de tumeurs ou ulcères du sein qui ont été retirés par la cautérisation. On nomma cette procédure « l'exercice contre l'incendie » et dit à propos de cette pathologie : "il n'y a pas de traitements". Des momies humaines en Égypte antique ont permis d'apporter d'autres preuves précoces sur le cancer, en découvrant des tumeurs osseuses fossilisées de plus de dix milles ans et des destructions osseuses de cranes (Hajdu, 2011a).

En l'an 460-370 avant JC, le médecin Grec Hippocrate nomme pour la première fois une tumeur *carcinoma* qui se réfère à un crabe en raison de la forme de propagation de la maladie. Le physicien romain Celsus (28-50 avant JC) le traduit *cancer*. Galen (130-200), un autre médecin Romain, fait référence à des gonflements, *oncos*, qui deviendra le mot de racine pour l'oncologie ou l'étude des cancers (Hajdu, 2008).

Au cours du 15e, 16e et 17e siècles, le mouvement de la Renaissance a mis fin aux interdits religieux et publics qui avaient empêché les progrès en médecine. En s'intéressant à l'anatomie, la physiologie et la chimie, les fondations pour la pathologie tumorale, oncologie chirurgicale, et l'oncologie médicale prennent naissance (Hajdu, 2011b). Au 19e siècle, l'Allemand Rudolf Virchow, le fondateur de la pathologie cellulaire, a établi la base de l'étude pathologique des cancers sous le microscope. Il suggère que toutes les cellules, y compris des cellules cancéreuses, sont dérivées d'autres cellules (Hajdu, 2012a, 2012b). En 1974, des études sur les marqueurs biochimiques et génétiques ont permis de déterminer que les tumeurs descendaient d'une cellule

ancestrale et non de différentes sous population de cellules (Fialkow, 1974). On parle enfin de monoclonalité des tumeurs.

I.1.2. La carcinogenèse

Les tumeurs prennent naissance des tissus normaux et se développent à partir de nombreux types cellulaires différents. L'origine cellulaire des cancers a permis de définir ces différents cancers. Dans notre étude, il a été important de savoir comment différencier, caractériser les multiples sortes et sous-types de cancers, car nous avons eu la chance grâce à la collaboration de Dr. Louis Gaboury, d'analyser des tissus humains cancéreux.

I.1.2.1. Nomenclature

Les tumeurs peuvent être bénignes (non cancéreuses, non invasives et localisées) ou malignes (cancéreuses, invasives, métastatiques). Les cellules tumorales bénignes demeurent à un seul endroit dans le corps et ne sont généralement pas dangereuses. Les cellules tumorales malignes peuvent envahir les tissus voisins et de se propager à d'autres parties du corps. Les cellules cancéreuses qui se propagent à d'autres parties du corps sont appelées métastases. Le premier signe qu'une tumeur maligne a métastasée est souvent l'enflure des ganglions lymphatiques avoisinants, mais le cancer peut métastaser dans presque toutes les parties du corps. La majorité des décès associés au cancer sont dus aux métastases engendrées par les tumeurs malignes. Il est important de trouver les tumeurs malignes le plus tôt possible. On classe et nomme ces différents cancers d'après leur origine cellulaire. Tout d'abord les cancers les plus fréquents, ceux dérivant des cellules épithéliales tel que les adénomes / papillomes (bénins) et les carcinomes (malins). Les tumeurs dérivant des tissus mésenchymateux (sarcomes), mais aussi des cellules immunitaires et qui constituent le sang (cancer hématopoïétique) ou dérivant du système nerveux (tumeur neuroectodermale).

Toutefois, certaines tumeurs défient la classification. Par exemple, les mélanomes sont des cellules pigmentées de la peau et de la rétine (mélanocytes), mais dérivent de la

crête neurale. Les carcinomes du poumon à petites cellules ont une origine endodermique, mais ils ont perdu leur caractère épithélial au profit d'un caractère neuroectodermique. Et pour finir, les tumeurs anaplasiques, dont les cellules ont dédifférenciées. Il n'est plus possible d'utiliser les critères histopathologiques pour définir de quelles cellules elles dérivent.

1.1.2.2. Le développement tumoral

Les cancers se développent progressivement (figure I-1).

- Lésion pré-envahissante : est une masse macroscopique bénigne, une croissance anormale qui ne pénètre pas la membrane basale et donc n'envahit pas de tissus voisins.
- Hyperplasie : est une augmentation du nombre de cellules qui restent morphologiquement normales. Un empilement de cellules avec projection endoluminale qui entraîne l'hypertrophie des cellules voisines. L'hyperplasie est réversible et bénigne.
- Dysplasie : est un état transitoire entre bénin et pré-malin. Il y a des anomalies cytologiques, polymorphisme nucléaire, un cytosol basophile, une augmentation du nombre de mitoses, une perte de polarité et suivit d'une perte de différenciation.
- Métaplasie : est caractérisée par un déplacement de cellules. Les cellules sont alors très bien différenciées mais sont remplacées par un autre type cellulaire. On parle ici de condition pré-maligne.
- Néoplasie : est caractérisée par des cellules envahissantes à morphologie anormale (noyaux hyperchromatique /pléomorphe), qui ont traversé la membrane basale et envahie le stroma. Les tumeurs sont dites malignes.

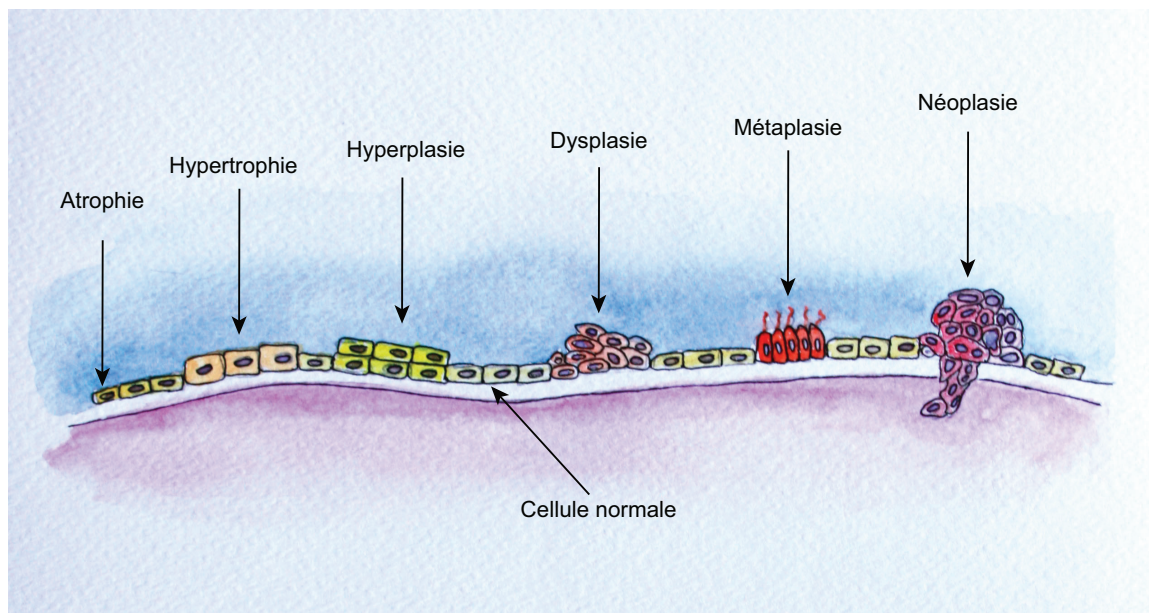


Figure I-1: Profil de croissance cellulaire anormale.

La progression commence par une mutation qui rend la cellule plus susceptible à se diviser. La cellule altérée et ses descendants peuvent avoir une taille diminuée *atrophie*, ou augmentée *hypertrophie*. Elles croissent et se divisent trop souvent, une condition appelée *hyperplasie*. À un certain point, une de ces cellules subit une autre mutation qui augmente encore sa tendance à diviser. Les descendants de cette cellule se divisent de façon excessive et semblent anormales, une condition appelée *dysplasie*. Comme le temps passe, l'une des cellules subit encore une autre mutation, provoquant une structure très anormale, perte de différenciation, et la perte de contact entre les cellules. Cependant, les cellules sont toujours confinées à la couche épithéliale dont elles sont issues. Elles forment un cancer *in situ* appelé *métaplasie*. Le cancer *in situ* peut rester contenu indéfiniment, mais les mutations supplémentaires peuvent se produire qui lui permettent d'envahir les tissus voisins et la circulation, la tumeur est dite invasive (maligne), on parle de *néoplasie*. Les cellules échappées peuvent alors établir de nouvelles tumeurs, des métastases, à d'autres endroits dans le corps (inspiré de Elsevier Inc 2006).

1.1.2.3. La progression métastatique

Le voyage des cellules tumorales du site primaire à un site métastatique potentiel dépend de nombreuses étapes. 90% des cas de décès liés au cancer sont dus aux métastases. Quand une personne trépassé, il y a plus de cellules tumorales qui ont

métastasé que de cellules dans la tumeur primaire. Malgré tout cela, il n'est pas si facile pour une cellule tumorale de devenir métastase...

La tumeur primaire formée de cellules néoplasiques croît progressivement, grâce aux nutriments initialement fournis par simple diffusion. La masse se développe et commence à dépasser 1-2 mm de diamètre, la tumeur est alors vascularisée grâce un réseau capillaire provenant des tissus hôte environnants. La synthèse et la sécrétion de facteurs angiogéniques permettent d'établir ce réseau capillaire (Folkman, 1986). Les cellules vont ensuite acquérir un caractère invasif et envahir la matrice extracellulaire. Tel qu'il le sera décrit à la section I.6.2 de ce présent manuscrit, les cellules vont subir une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). L'invasion du stroma de l'hôte est locale (Liotta & Rao, 1986). Les cellules tumorales vont ensuite pénétrer dans la circulation sanguine (intravasation) et envahir les tissus environnants et les vaisseaux sanguins où elles interagissent avec des plaquettes, lymphocytes et autres composants du sang (E. R. Fisher & Fisher, 1967). Les cellules se retrouvent aussi souvent dans les vaisseaux lymphatiques car leur paroi est mince (B. Fisher & Fisher, 1966). Les métastases dans la circulation veineuse vont tout d'abord arriver dans le ventricule droit du cœur, les poumons (presque toutes les cellules métastatiques restent piégées dans les capillaires des poumons), le ventricule gauche, puis les artères pour gagner la circulation générale. Les cellules tumorales devront survivre au transport dans le système circulatoire (Nicolson, 1988). Ensuite les cellules vont ressortir de la circulation sanguine (extravasation) afin de coloniser les organes distants, par des mécanismes similaires à ceux qui opèrent pendant l'invasion (Al-Mehdi et al., 2000). On parle ici de transition mésenchymateuse-épithéliale (TME). Les cellules vont former des micro-métastases (<2mm), qui seront dormantes (Morris, Schmidt, MacDonald, Groom, & Chambers, 1997). La dernière étape du processus métastatique est la plus critique, la colonisation (Chambers, Groom, & MacDonald, 2002). Pour poursuivre sa croissance, la micro-métastase doit en effet proliférer dans le parenchyme des organes touchés, développer un système vasculaire et échapper à la destruction par les défenses de l'hôte (E. R. Fisher & Fisher, 1967). On parle maintenant de macro-métastases. Les cellules peuvent alors envahir les vaisseaux sanguins, entrer dans la circulation et produire des métastases supplémentaires (Fidler, 2002) (figure I-2).

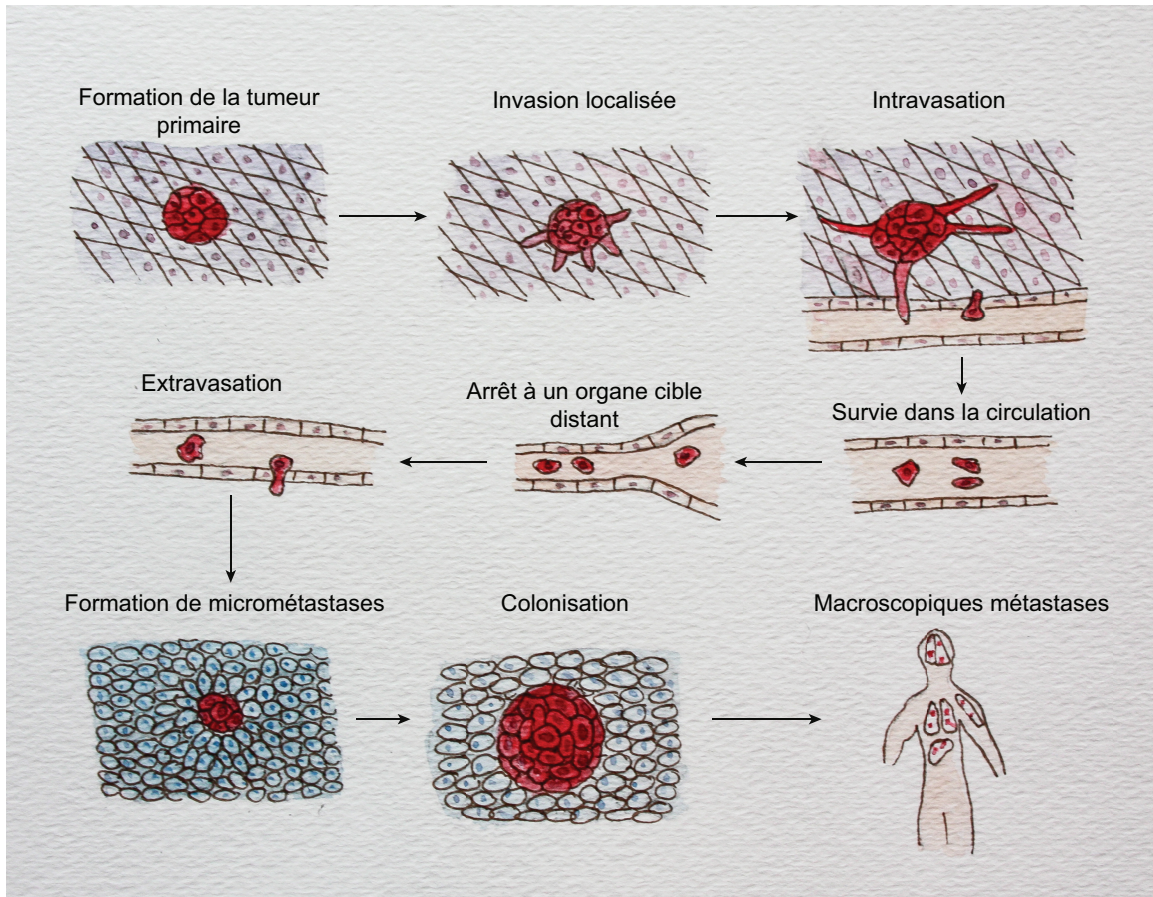


Figure I-2: La cascade invasion/métastases.

Les cellules tumorales quittent leur site primaire de croissance (invasion locale, intravasation), puis vient la translocation systémique (survie dans la circulation, arrêt à un site organe éloigné, extravasation), et l'adaptation pour survivre dans les tissus éloignés (formation de micro-métastases, la colonisation métastatique). Après cette étape clef, la nouvelle tumeur prolifère. On parle de macro-métastases. Inspiré de (Gupta & Massague, 2006; Valastyan & Weinberg, 2011).

Il faut garder à l'esprit que, même si majoritairement la taille de la tumeur corrèle à son agressivité, les métastases peuvent également se former au stade précoce (pro-maligne) du développement de la tumeur (Klein, 2009).

La formation de métastases est donc régulée par de multiples processus biologiques tels que la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, la migration, la transition épithéliale-mésenchymateuse et l'invasion. Notre étude s'intéresse plus particulièrement aux trois derniers processus qui seront donc expliqués ultérieurement en détails. En

conclusion, même si cette pathologie est complexe, tous les cancers partagent des propriétés similaires qui se caractérisent par une croissance cellulaire anormale et une capacité augmentée à envahir des tissus locaux et distants. D'un point de vue moléculaire, le cancer est provoqué par un dommage à l'acide désoxyribonucléique (ADN).

1.1.2.4. Modifications géniques et épigénétiques

La carcinogénèse peut être le fruit de modifications géniques mais aussi épigénétiques. En effet, les modifications épigénétiques jouent un rôle crucial dans la carcinogénèse, et en coopération avec d'autres altérations génétiques vont interagir pour favoriser le développement du cancer du sein.

1.1.2.4.1 Modification génique, oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs

Le cancer résulte de l'accumulation de plusieurs altérations géniques. Il existe deux grandes catégories de gènes touchés par ces modifications, on parle d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs. Tout d'abord les gènes qui induisent le cancer sont nommés les oncogènes. Ce sont des gènes cellulaires normaux impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire (proto-oncogènes) mais qui subiront des mutations et deviendront responsables de la prolifération cellulaire incontrôlée des cellules cancéreuses. De nombreux oncogènes sont exprimés dans les cellules normales, toutefois les patients cancéreux ont une augmentation anormale de l'activité ou l'expression de ces oncogènes.

L'activation des oncogènes se fait par diverses modifications géniques. La première se fait via la participation des virus, agents carcinogènes biologiques, qui vont agir par capture rétroviral ou par intégration d'un provirus (Coffin et al., 1981; Weinberg & Steffen, 1981). Dans le cas du lymphome aviaire, une mutagenèse insertionnelle dans la portion régulatrice du proto-oncogène myc, stimule son expression en le plaçant sous le contrôle d'un « enhancer » viral. La deuxième se fait par mutations de l'ADN : soit par

mutation ponctuelle, (mutations nucléotidiques simples), par délétion ou par insertion nucléotidique qui modifient la fonctionnalité ou l'expression des protéines codées. Un exemple de mutation ponctuelle est retrouvé dans le cancer de la vessie, où le gène RAS a subi une mutation glycine par valine sur le codon 12 de la séquence codante, qui permet son activation constitutive (Murray et al., 1981). Il en est de même dans le cancer du poumon, où la délétion de l'ectodomaine de l'EGFR a été étudiée (Ekstrand, Sugawa, James, & Collins, 1992). La troisième modification génique se fait par translocation chromosomique où deux régions chromosomiques distinctes deviennent anormalement fusionnées. Tel que la protéine de fusion BCR-ABL dans la leucémie myéloïde chronique (Kurzrock, Gutterman, & Talpaz, 1988). La dernière forme de modification se fait par amplification génomique. On retrouve une augmentation du nombre de copies d'un gène dans une cellule. Par exemple, le cas de l'amplification de l'oncogène HER2 (pour *human epidermal growth factor receptor 2*) dans le cancer du sein et de l'ovaire, est présent dans environ 20 à 30% des tumeurs (Slamon et al., 1989).

En effet, le caryotype des cellules peut influencer la carcinogénèse en induisant une instabilité génique. Les chromosomes sont les éléments de stockage de l'information génétique et on retrouve souvent une augmentation du nombre total de chromosomes dans les cellules cancéreuses, passant de 46 chromosomes à des fois plus de 200 chromosomes. C'est le cas des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 que nous utilisons qui contiennent plus de 82 chromosomes (R. Li, Hehlman, Sachs, & Duesberg, 2005; Watson et al., 2004). La perte de contrôle de la division cellulaire induit une aneuploïdie qui augmente l'instabilité génétique. Lorsque des chromosomes supplémentaires portant des oncogènes capitaux pour la progression tumorale sont gagnés, ces oncogènes sont surreprésentés dans la cellule et font progresser l'oncogénèse. À l'inverse une perte d'un ou plusieurs des 46 chromosomes, induit la perte de milliers de gènes et notamment la perte de gènes suppresseurs de tumeurs.

Les gènes suppresseurs de tumeurs font donc partis de la deuxième catégorie des gènes touchés dans les cancers, on retrouve ceux qui inhibent la division cellulaire et la survie des cellules ayant subi des dommages à l'ADN. Les gènes suppresseurs de tumeurs sont désactivés par délétion ou mutation génique chez les patients cancéreux, ce qui permet la croissance et la survie de cellules cancéreuses. Ce qui est le cas pour les

gènes BRCA1, BRCA2 et p53 dans les cancers du sein et de l'ovaire (Michalovitz, Halevy, & Oren, 1991; Struwing et al., 1997). Dans le cancer de la peau les gènes suppresseurs de tumeurs XP (*Xeroderma pigmentosum*) sont inactivés. En effet, les ultraviolets agissent en agents carcinogènes en induisant des dommages à l'ADN que les individus ne peuvent alors plus réparer.

Pour finir sur les modifications géniques il ne faut pas oublier les agents carcinogènes chimiques comme source potentielle dans les cancers. Par exemple, dans le cancer du sein les parabènes agissent comme des agonistes des œstrogènes et augmentent ainsi l'expression de nombreux gènes qui sont habituellement réglementées par l'oestradiol naturel (Darbre & Harvey, 2008; Routledge, Parker, Odum, Ashby, & Sumpter, 1998). En effet, ils activent la croissance et la prolifération de cellules cancéreuses du sein telles que les MCF-7 (Byford et al., 2002).

1.1.2.4.2 Régulation épigénétique

La carcinogénèse ne repose pas seulement sur les altérations génétiques, ce qui est le cas lorsque les gènes subissent une mutation ou sont anormalement activés, mais implique aussi des changements épigénétiques. Les mécanismes épigénétiques sont nécessaires pour le maintien de l'expression des gènes dans les différents organes. Cette régulation peut être altérée et l'expression des gènes modifiés ce qui peut conduire à des maladies telles que le cancer. On parle de modifications épigénétiques lorsqu'on fait référence à la méthylation de l'ADN, aux modifications des histones et à la présence de micro-ARN qui conduisent à une expression anormale des gènes induisant l'instabilité génomique. Ces altérations moléculaires conduisent à des changements permanents dans les profils d'expression des gènes qui régulent le phénotype néoplasique.

L'hypométhylation de l'ADN est fréquemment rapporté dans les tumeurs notamment celui du du sein, mais le nombre de gènes hypométhylés est relativement faible, à l'inverse du nombre de gènes hyperméthylés rapportés. Dans les cancer beaucoup de ces gènes sont hyperméthylés à leurs promoteurs ce qui inactive leur expression en changeant la structure d'uns chromatine ouverte à une hétérochromatine compacte. Par exemple dans le cancer du sein, ER α et PR qui sont essentiels dans la

régulation hormonale sont fréquemment méthylés, soit réprimés (Yan, Yang, & Davidson, 2001). C'est également le cas de APC qui joue un rôle majeur dans l'apoptose et de beaucoup d'autres gènes suppresseurs de tumeur tels que RASSF1A, PTEN et RAR- β (Dammann et al., 2000; Fackler et al., 2003; Swift-Scanlan, Vang, Blackford, Fackler, & Sukumar, 2011).

On retrouve dans les cancers, un nombre important de modifications des histones et des enzymes de modification des histones. Ce qui modifie directement les interactions entre les nucléosomes et la chromatine ou indirectement, par le recrutement de protéines effectrices. Les histones peuvent être acétylés, méthylés, ubiquitinilés et phosphorylés, sumoylés ce qui modifie ainsi l'état de compaction de la chromatine. Par exemple, l'acétylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9ac), la phosphorylation de la serine 10 de H3 (H3S10ph) et la triméthylation de la lysine 4 de H3 (H3K4me3) sont associées à l'activation de la transcription (Y. Li et al., 2011). À l'inverse, la triméthylation de la lysine 27 de H3K27me3 et l'hypoacétylation de H3 et H4 sont associées à la répression de la transcription.

Les microARN (miARN) sont des régulateurs post-transcriptionnels capables d'extinction de l'expression d'un gène en ciblant son ARNm. Ils induisent la répression traductionnelle ou à la dégradation de l'ARNm cible. Dans les cancers on retrouve une expression aberrante de miARN. Dans le cancer de la prostate plus de 50 miARN ont été rapportés dérégulés, y compris la régulation positive de plusieurs miARN oncogéniques tels que les miR-488, miR-21 et la régulation négative de divers miARN suppresseurs de tumeur tels que miR-101 et miR-205 (Sikand, Slaibi, Singh, Slane, & Shukla, 2011) (Majid et al., 2010). De larges approches génomiques ont révélé que dans le cancer du sein les miARN sont globalement régulés à la baisse et 15 candidats ont été identifiés. Par exemple, le miR-15/16 est régulé à la baisse, ce qui conduit à une expression aberrante de BCL 2 (Walter, Gomez-Macias, Valera, Sobel, & Merino, 2011). Pour finir, en plus des gènes codant pour des protéines, des recherches démontrent que les microARN qui possèdent une fonction suppresseur de tumeur pourraient être réduits au silence dans les cellules du cancer et notamment dans le cancer du sein par le biais de méthylation de l'ADN (Lehmann et al., 2007).

I. 2. Le cancer du sein

Un million de femmes dans le monde sont diagnostiquées avec un cancer du sein chaque année. Le cancer invasif du sein est le cancer le plus commun chez les femmes, ce qui représente 22% de tous les cancers féminins. On estime qu'en 2014, près de 24 000 nouveaux cas de cancer du sein ont été diagnostiqués au Canada. En fait, 1 femme sur 9 sera diagnostiquée avec le cancer du sein et 1 sur 30 en succombera. L'amélioration des diagnostics, et des techniques de dépistage et thérapeutique depuis les années 80, ont diminué le taux global de mortalité de près de 50%. Maintenant, environ 90% des patients atteints de cancer du sein survivent pendant au moins 5 ans (Canadian Breast Cancer Foundation, www.cancer.ca).

On note une variation de l'incidence des cancers dans les populations. Les secteurs à risque élevé sont les populations aisées de l'Amérique du Nord, Europe et Australie, où 6% des femmes développent un cancer du sein invasif avant leur 75 anniversaire. Grâce à des études menées par pays, cela a permis de démontrer que cette variation provient principalement de l'hérédité et de l'environnement (Novelli et al., 2003; Peto, 2001). De nombreux gènes de susceptibilité au cancer ont été identifiés. Dans le cas d'une prédisposition héréditaire au cancer, des mutations dans ces gènes peuvent être retrouvées au niveau des cellules germinales ou dans le cas de tumeurs sporadiques, dans les cellules somatiques. En 1975, le test Ames est développé pour caractériser les agents mutagènes (Ames, 1979). Ces cancers, nommés sporadiques, seraient causés par l'exposition à des carcinogènes environnementaux tels que les oestrogènes, les radiations, la cigarette et/ou des éléments de la diète (Barrett, 2000; Reynolds, 2013; Terry & Rohan, 2002; Weiderpass, Meo, & Vainio, 2011; Wogan, Hecht, Felton, Conney, & Loeb, 2004). L'étiologie du cancer du sein est donc multifactorielle car elle implique aussi, le genre (une femme à 400 fois plus de risques de développer un cancer du sein que l'homme), l'âge, le profil génétique (3 à 5% des cancers du sein), l'alimentation, et les déséquilibres hormonaux associés.

I.2.1 Les différents types

Le cancer du sein est une maladie hétérogène qui est divisée en deux grandes catégories sur la base des caractéristiques cyto-architecturales: c'est-à-dire que selon le site de formation du foyer primaire. Au niveau des conduits lactifères, nous parlerons de carcinomes ductal (80% de tous les cas) et à l'intérieur du conduit, nous parlerons de carcinoma lobulaire. De nombreuses variantes morphologiques de carcinome canalaire existent, elles comprennent les carcinomes : tubulaire, criblé, médullaire, mucineux, neuroendocrine, papillaire, micropapillaire, apocrines, métaplasique, riche en lipides, de sécrétion, oncocytaire, adénoïdes kystiques, cellules acineuses, riche en glycogène (à cellules claires), sébacée, et le carcinome inflammatoire. Comme son homologue canalaire, le carcinome lobulaire peut être précédé ou accompagné par un composant in situ. Il est histologiquement plus homogène que le carcinome canalaire, mais possède lui aussi des variantes morphologiques avec les cellules en bague pléomorphique ou en chevalière.

Cependant, nous pouvons classer ces types de cancer du sein en 5 sous-types selon leur statut d'expression protéique des récepteurs à l'oestrogène (ER), à la progestérone (PR) et au récepteur associé aux facteurs de croissance épidermique de type 2 (ErbB2, Her2). On parle des sous-types, normal, luminal A, luminal B, ErbB2 et basal (Sims, Howell, Howell, & Clarke, 2007).

I.2.1.1. Normal

Les cancers mammaires de type normaux sont les cancers qui ne cadrent pas avec les autres sous-types prédéfinis. Ce sous-type a un profil d'expression génique similaire à celui d'un tissu mammaire normal. Dans l'ensemble, ces tumeurs sont petite, et ont généralement un bon pronostic (Kao et al., 2009; Prat et al., 2014).

I.2.1.2. Luminal type A et B

Les tumeurs luminales sont caractérisées par une forte expression des récepteurs ER, PR et des cytokératines 8/18 (Carey et al., 2006). Le type luminal A retrouvé dans les carcinomes ductal et lobulaire représente 50-60% des cas de cancers du sein. Il est

associé à un bon pronostic, où le taux de survie est élevé, et le taux de récurrence est faible, car ils peuvent être traités avec les thérapies hormonales, y compris le tamoxifène. Le type luminal B, qui ne représente que 15-20% des cas, diffère du type luminal A par l'expression du récepteur HER2 et notamment par l'expression des marqueurs Ki-67 (Karn et al., 2011). Les tumeurs issues du type luminal B sont de petites tailles par rapport aux 4 autres types de cancer du sein. Les traitements hormonaux sont disponibles; cependant, en raison de la présence du récepteur HER2 et d'un indice de prolifération accrue, les tumeurs luminal B ont tendance à avoir un mauvais pronostic. Le grade est souvent plus élevé tout comme les récives et le taux de survie est plus faible (Z. Hu et al., 2006).

1.2.1.3. HER2

Les tumeurs ErbB2 qui représentent 15-20% des cancers du sein diagnostiqués quant à elles, sont généralement négatives pour ER et PR, alors qu'elles surexpriment le récepteur HER2 (Chanrion et al., 2007). Ce sous-type est présent dans la majorité des carcinomes ductal et entraîne des risques élevés de récives. La surexpression de HER2 a été liée à la tumorigenèse mammaire, l'agressivité de la tumeur et des métastases et tend donc à avoir un mauvais pronostic. Le taux de survie est faible lorsqu'il est laissé non traité ; toutefois, ces patients sont généralement sensibles à des thérapies dirigées contre HER2. Le trastuzumab (Herceptin®), et lapatinib sont deux traitements ciblés pour les tumeurs HER2-positives qui se sont avérés très efficaces. En fait, 75 à 80% des femmes atteintes d'un cancer du sein métastatique HER2-positif ont répondu au traitement lorsque celui-ci était administré en combinaison avec une chimiothérapie (Slamon et al., 2001).

1.2.1.4. Basal/ triple négatif, la controverse

Les tumeurs de type basal surexpriment souvent le récepteur du facteur de croissance épidermique et les cytokératines 5/6 et 17 (Burness, Grushko, & Olopade, 2010; Nielsen et al., 2004; Perou, 2011). Elles sont aussi généralement négatives pour ER, un profil rappelant les cellules myoépithéliales normales du sein (Nielsen et al., 2004). On estime que 5 à 45% des tumeurs sont de type basal ER-positif et que 14% sont HER2-positif. Les cancers dits triples négatifs sont dépourvus des récepteurs ER, PR et

HER2. Parmi tous les cancers du sein, environ 15-20% sont classés triples négatives (K. R. Bauer, Brown, Cress, Parise, & Caggiano, 2007). Bien que des phénotypes différents suggèrent une distinction entre le cancer du sein triple-négatif et basal, ces deux sous-types sont mis dans le même « panier » (Badve et al., 2011; Perou et al., 2000; Rakha et al., 2009). Le sous-type triple-négatif est considéré comme ayant un mauvais pronostic, avec une forte incidence de métastases, un haut indice de prolifération et d'agressivité et un faible taux de survie (Criscitiello, Azim, Schouten, Linn, & Sotiriou, 2012; Heitz et al., 2009; Rakha et al., 2009).

De plus en plus, on parle d'un cinquième sous-type, que l'on nomme « faible en claudine » (une protéine essentielle aux jonctions serrées) (Herschkowitz et al., 2007; Prat et al., 2010). À 71% triple-négatif, pour les trois récepteurs, ce sous-type contrairement au sous-type basal, possède peu de Ki-67, d'E-cadhérine, de claudine 3 et 4 et répond encore moins bien à la chimiothérapie (Prat et al., 2010; Prat & Perou, 2011). Ce sous-type partage des propriétés biologiques uniques liées aux cellules souches mammaires (E. Lim et al., 2009). Il possède une signature de la transition épithélio-mésenchymateuse et démontre des caractéristiques de cellules initiatrices de tumeurs (également connues comme les cellules souches du cancer) (Creighton et al., 2009; Hennessy et al., 2009; Taube et al., 2010). Ce sous-type de cancer triple-négatif est donc considéré comme non basal.

Il est intéressant de souligner que les cellules métastatiques d'adénocarcinome humain que nous utilisons dans notre étude, les MDA-MB-231 étaient anciennement caractérisées comme de sous-type basal B, en raison de leurs caractéristiques mésenchymateuses et de type cellules souches (Kao et al., 2009; Neve et al., 2006). Le sous-type basal B qui ne ressemble pas phénotypiquement, comme le basal A, aux tumeurs de type basal. Nous savons maintenant que ces cellules triples négatives appartiennent à un nouveau sous type spécifique, dit faible en claudine (Prat et al., 2010).

I.2.2 Le cancer du sein triple négatif et ses limitations de traitement

Les patients atteints de cancer du sein triple-négatif ne bénéficient pas de thérapies hormonales (ex : tamoxifène, antagonistes des récepteurs aux oestrogènes) en raison de la perte de récepteurs cibles tels que ER et PR. L'utilisation d'anticorps monoclonaux tel que le Trastuzumab (Herceptin®) qui reconnaît spécifiquement le récepteur HER2 n'est aussi d'aucune utilité (Huston & George, 2001).

1.2.2.1. Les thérapies générales

Les thérapies générales utilisées individuellement ou en combinaison semblent la seule modalité disponible. Celles-ci comprennent les traitements locaux tels que la chirurgie et la radiothérapie, mais aussi les traitements systémiques tels que la chimiothérapie (Burdak-Rothkamm & Prise, 2009; Karam, 2013; Malhotra & Perry, 2003). Les tumeurs présentant une forme mutée de BRCA1 sont fréquemment triples négatives. En revanche, les tumeurs présentant une mutation de BRCA2 ne démontrent aucune altération d'expression pour les récepteurs ER, PR et Her2 (Rakha et al., 2009). L'augmentation de l'incidence des mutations BRCA1 dans ce sous-type lui confère une sensibilité accrue à la chimiothérapie par rapport aux cancers du sein ER-positif. Toutefois, il reste difficile de cibler quels agents chimiothérapeutiques provoqueront la meilleure réponse chez ces patients et cela laisse souvent ces derniers à haut risque de rechute (Cleator, Heller, & Coombes, 2007). Des recherches sont encore nécessaires pour mieux définir les avantages thérapeutiques de chimiothérapies chez ces patients.

1.2.2.2. Les thérapies ciblées

Étant donné l'hétérogénéité du cancer du sein, les thérapies émergentes se concentrent sur une multitude d'agents thérapeutiques ciblant spécifiquement des voies oncogéniques.

1.2.2.2.1 Agents qui inhibent c-Kit

Des composés inhibiteurs ont été développés pour cibler des récepteurs de surface cellulaire tels que c-Kit. c-Kit ou CD117 est un récepteur de cytokines à activité tyrosine kinase. Il est exprimé à la surface des cellules souches hématopoïétiques ainsi que d'autres types de cellulaires et joue un rôle dans la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire. On le qualifie de proto-oncogène car sa surexpression ou sa mutation peut conduire à un cancer. Les composés inhibiteurs développés se sont révélés jouer un rôle majeur dans la diminution de la progression des tumeurs triples négatives (Nielsen et al., 2004). L'efficacité de l'inhibiteur tyrosine kinase imatinib reste difficile à évaluer car la détection immunohistochimique de la surexpression de c-Kit ne garantit pas une réponse positive à l'imatinib. La plupart des anticorps disponibles dans le commerce reconnaissent c-Kit sous forme actif et inactif mais ne distinguent pas uniquement la forme activée/ phosphorylée, qui est la vraie cible de l'imatinib (Nielsen et al., 2004).

1.2.2.2.2 Agents qui ciblent le VEGFR

Le manque de cibles thérapeutiques a poussé la recherche vers le développement de thérapies ciblant des molécules surexprimées dans les cellules tumorales telles que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR). Le VEGFR est responsable du développement et de la maintenance de la vascularisation tumorale, soit l'angiogenèse. Un processus vital pour les cellules tumorales. Plusieurs traitements sont disponibles et comprennent: des anticorps monoclonaux qui se lient spécifiquement au VEGF, tels que le bevacizumab, et les inhibiteurs de tyrosine kinase, tels que l'axitinib (Folkman, 2002). Cependant, actuellement, aucun des inhibiteurs de l'angiogenèse n'est approuvé pour le traitement du cancer du sein (Brufsky et al., 2011; Miles et al., 2010; Robert et al., 2011).

1.2.2.2.3 Agents qui ciblent les voies de transduction du signal

D'autres composés inhibiteurs ont été développés et le dasatinib qui cible la tyrosine kinase Src en est un exemple. Cependant celui-ci lorsque qu'utilisé seul n'a pas

encore démontré d'efficacité, tout comme la bicalutamide, un inhibiteur des récepteurs aux androgènes. Dans le cancer du sein, les voies PI3K (pour *phosphatidylinositol 3-OH kinase*) / protéine kinase B (AKT) et Ras / MAPK (pour *mitogen-activated protein kinase*) sont souvent affectées. Des composés tels que l'everolimus, un inhibiteur de mTOR (pour *mammalian target of rapamycin*) ont été développés mais ne montrent à ce jour, que des effets bénéfiques chez les femmes atteintes d'un cancer du sein positif pour HER2 (Adjei & Hidalgo, 2005).

1.2.2.2.4 Agents qui ciblent les enzymes PARPs

Les enzymes poly(ADP-ribose) polymérase (PARP), qui jouent un rôle majeur dans la réparation de l'ADN, ont été considérées comme une bonne cible thérapeutique contre le cancer et plusieurs études cliniques de phase III sont en cours (Mangerich & Burkle, 2011). Les inhibiteurs développés, compétitionnent avec le site actif de l'enzyme, empêchant les cellules cancéreuses de se réparer et induisent l'apoptose dans certains cancers en raison d'une forte accumulation de dommages à l'ADN. En combinaison avec la chimiothérapie, l'inhibiteur de PARP1 (BSI-201), potentialise les effets du premier traitement (Mangerich & Burkle, 2011).

1.2.2.2.5 Agents qui ciblent l'EGFR

Pour finir, environ 66% des cancers du sein triples négatifs surexpriment l'EGFR (Arteaga, 2002). Ce récepteur à activité tyrosine kinase est une cible intéressante, car il est associé aux processus de prolifération, de migration et de survie. Des essais cliniques ont donc été effectués en évaluant l'efficacité des anticorps monoclonaux humanisés anti-EGFR (cetuximab) qui ciblent l'expression de l'EGFR ou ses voies de signalisation, en empêchant le ligand de se lier à son récepteur (Cunningham et al., 2004). Malheureusement, ces anticorps monoclonaux contre l'EGFR ont montré des résultats décevants. Le traitement avec le cetuximab, avait pourtant démontré des effets prometteurs en inhibant la croissance sur deux lignées cellulaires de cancer du sein et de xénogreffes tumorales, mais quasi aucun effet n'a été obtenu dans le traitement des patients atteints de cancer du sein (Masui et al., 1984; Mendelsohn, 1997; Modi et al., 2006). Des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase (gefitinib) de l'EGFR, qui bloquent

l'activation du domaine de kinase de l'EGFR par compétition avec l'adénosine triphosphate (ATP), ont aussi été développés. Malheureusement, lors de l'utilisation continue de ces inhibiteurs, la plupart des patients développent une résistance, tout comme les patients qui ont des mutations sur l'EGFR (Jackman et al., 2010) (Mendelsohn & Baselga, 2006) (Yu et al., 2013). Comme notre recherche est axée sur les signaux en aval de l'EGFR, cette famille de récepteurs tyrosine kinase (RTK) sera décrite en détail ci-dessous.

En conclusion, peu de succès clinique a été démontré suite à l'utilisation de ces nouveaux composés. Les cancers du sein triples négatifs sont associés à un mauvais pronostic, notamment en raison du manque de thérapies ciblées (Engebraaten, Vollan, & Borresen-Dale, 2013; O'Shaughnessy, 2010). Par conséquent, nous avons focalisé notre recherche sur ce sous-type car un travail considérable est nécessaire pour améliorer les résultats thérapeutiques.

I. 3. Facteurs de croissance, récepteurs et cancer

I.3.1. Les récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase

On divise les récepteurs membranaires en trois familles : les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), les récepteurs canaux et les récepteurs catalytiques.

Notre étude se focalise sur les récepteurs catalytiques qui sont des récepteurs possèdent une activité enzymatique. Cette famille est impliquée dans le développement et la progression du cancer. Ce sont des récepteurs à domaine transmembranaire unique qui, une fois lié à leur ligand, agissent en tant qu'enzyme. Leur activité est de type kinase, phosphatase ou guanylate cyclase (Yarden & Ullrich, 1988).

La plupart d'entre eux sont des récepteurs tyrosine kinases, désignés habituellement par RTK. Il existe 58 récepteurs de type tyrosine kinases et 30 d'entre eux sont dits proto-oncogènes (Manning, Whyte, Martinez, Hunter, & Sudarsanam, 2002; Weinstein, 2000) (figure I-3). Les membres les mieux caractérisés des récepteurs catalytiques sont ceux de la famille des récepteurs ErbB et sont composés de quatre

membres: EGFR (ou ErbB1 ou HER1), HER2 (ErbB2 ou Neu), HER3 (ErbB3) et HER4 (ErbB4). Ces RTK sont exprimés de façon ubiquitaire et jouent un rôle dans la transduction des signaux extracellulaires, la prolifération cellulaire, la différenciation, la migration et la survie (Lemmon & Schlessinger, 2010). L'expression dérégulée de ces récepteurs peut conduire à des aberrations de processus cellulaires homéostatiques, résultant à la transformation maligne des cellules (Hynes & Lane, 2005).

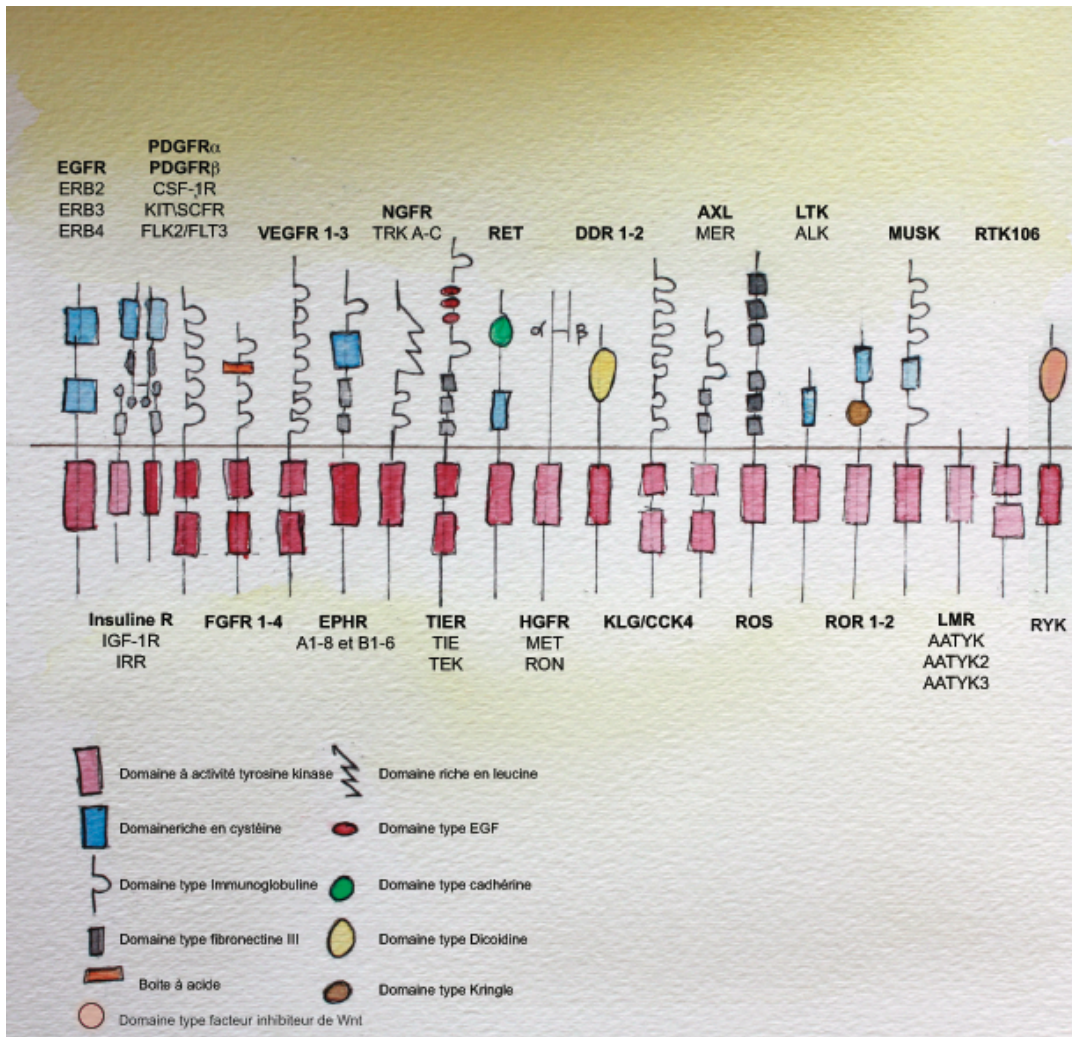


Figure I-3: Classification des récepteurs tyrosine kinases.

Représentation schématique des récepteurs de type tyrosine kinase. EGFR (pour *epidermal growth factor receptor*), IGF-1R (pour *insulin-like growth factor 1 receptor*), IRR (pour *insulin-related receptor*), PDGFR (pour *platelet-derived growth factor receptor*), KIT/SCFR (pour *stem cell factor receptor*), FGFR (pour *fibroblast growth factor receptor*), VEGFR (pour *vascular endothelial growth factor receptor*), EPHR (pour *ephrin receptor*), NGFR (pour *nerve growth factor receptor*), TIER (pour *tyrosine kinase receptor in endothelial cells*), RET (pour *rearranged during transfection*), HGFR (pour *hepatoocyte growth factor receptor*), DDR (pour *discoidin domain receptor*), KLG/CCK (pour *colon carcinoma kinase*), AXL (pour *Tyros3 protein tyrosine kinase*), ROS (pour *receptor tyrosine kinase for some epithelial cells*), LTK (pour *leucocyte tyrosine kinase*), ALK (pour *anaplastic lymphoma kinase receptor*) ROR (pour *receptor orphan*), MUSK (pour *muscle-specific kinase*), LMR (pour *lemur receptor*), AATYK (pour *apoptose-associated tyrosine kinase receptor*), RTK106 (pour *receptor tyrosine kinase 106*), RYK (pour *receptor like-tyrosine kinase*). Inspiré de (Blume-Jensen & Hunter, 2001)

Un des récepteurs les plus connus dans les cancers triples négatifs est le récepteur au facteur de croissance épidermique EGFR (Bhargava et al., 2005; Corkery, Crown, Clynes, & O'Donovan, 2009).

I.3.2. L'EGFR

L'EGFR est exprimé dans 30% à 52% des cancers du sein triples négatifs et jusqu'à 60% des cancers du sein de type basal (Bhargava et al., 2005; Corkery et al., 2009). On le retrouve également surexprimé dans de nombreux autres cancers tels que ceux des voies aérodigestives supérieures (80-100 %) (Dassonville et al., 1993; Hitt et al., 2005), du colon (70-90 %) (Cunningham et al., 2004), du poumon non à petites cellules (40-80 %) (Brabender et al., 2001), de l'estomac (20-80 %) (Dragovich et al., 2006), du pancréas (30-90 %) (Burtness, 2007), de l'ovaire (35-70 %) (Rocha-Lima, Soares, Raez, & Singal, 2007), du rein (50-90 %) (D. Cohen et al., 2007), les gliomes (40-50 %) (Raizer, 2005), de la prostate (40-80%) (Edwards et al., 2006), du col de l'utérus (80-100 %) (Bellone et al., 2007). Il est associé à un mauvais pronostic et on se sert de lui comme biomarqueur de classe II, test dont le résultat autorise à lui seul une intervention auprès du patient. Il est utilisé comme facteur prédictif de la réponse thérapeutique.

I.3.2.1. Les ligands associés au récepteur à l'EGF

Actuellement, dix polypeptides ont été identifiés comme ligands de l'EGFR et comprennent: l'EGF, l'amphiréguline (AR), le facteur de croissance transformant- α (TGF- α), la β -celluline (BTC), le facteur de croissance épidermique liant l'héparine (HB-EGF), l'épiréguline (EPR) et les neurégulines 1-4 (NRG1-4) qui comprennent les hérégulines (HRG) (Roskoski, 2014a, 2014b) (figure I-4). Ces ligands sont d'abord synthétisés sous forme de précurseurs transmembranaires et requièrent un clivage protéolytique par des protéases zinc-dépendantes pour leur activation. Le ligand soluble peut alors lier et activer l'EGFR d'une manière autocrine ou paracrine.

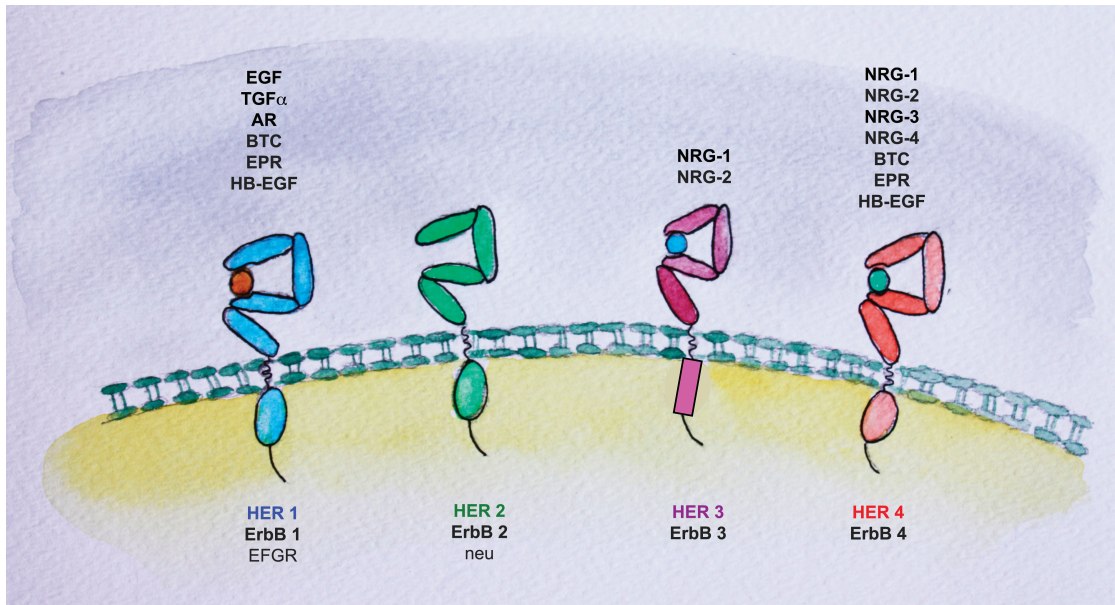


Figure I-4: Les ligands des récepteurs HER/ErbB.

La famille des récepteurs ErbB est composée de quatre membres: EGFR, HER2, HER3 et HER4. L'activation de cette famille de récepteurs est régie par l'homo- ou l'hétérodimérisation dépendante du ligand. HER2/ErbB2/neu est différent des autres membres car il n'a pas de domaine de liaison au ligand et son activation dépend de la formation d'hétérodimères. Le récepteur HER2, n'a pas de ligand connu à ce jour. Tous les récepteurs, sauf HER3, ont une activité kinase intracellulaire requise pour l'initiation de la cascade de signalisation en aval. Par conséquent, HER3 est également dépendant de l'hétérodimérisation afin de potentialiser ses signaux. Il y a actuellement 11 ligands identifiés qui ont chacun une spécificité pour certains membres de la famille. HER1/ErbB1/EGFR est lié par l'EGF, le TGF- α , et l'AR mais aussi comme HER4/ErbB4, il est lié par la BTC, l'EPR et l'HB-EGF. HER4 est lié également les NRG 1 à 4 et HER3/ErbB3 est lié par les NRG 1 et 2. Inspiré de (Hervent & De Keulenaer, 2012).

1.3.2.2. Structure, activation et sites de phosphorylation de l'EGFR

Les récepteurs de la famille des ErbBs partagent une grande homologie de structure primaire (40-45%). Ces récepteurs transmembranaires ont un domaine N-terminal extracellulaire portant le site de fixation du ligand, un domaine transmembranaire, un domaine juxtamembranaire et un domaine C-terminal

intracellulaire qui porte l'activité tyrosine kinase (Ullrich et al., 1984). Plus précisément, la région extracellulaire est glycosylée et se compose de quatre domaines: I à IV. Les domaines I et III médient la liaison du ligand, alors que les domaines II et IV contrôlent sa dimérisation (Roskoski, 2014a). Le domaine juxtamembranaire joue un rôle important dans la stabilisation de la dimérisation du récepteur et favorise son activation (Jura et al., 2009). Le domaine kinase est nécessaire à l'activité du récepteur et à l'activation d'effecteurs de signalisation en aval (Roskoski, 2014a). La queue C-terminale contient aussi des sites de phosphorylation essentiels qui recrutent des adaptateurs et des effecteurs de signalisation (Yarden & Sliwkowski, 2001). Le domaine C-terminal permet un rétrocontrôle négatif du récepteur (Gajiwala, 2013).

À la surface cellulaire, le récepteur est retrouvé sous forme monomérique. La liaison du ligand à son récepteur induit une homo ou hétérodimérisation du récepteur. Les partenaires d'hétérodimérisation de l'EGFR sont préférentiellement l'HER2 et HER3, très exceptionnellement l'HER4 (Schlessinger, 2002). Le domaine juxtamembranaire catalyse la phosphorylation du domaine kinase intrinsèque conduisant à son activation. Après cette autophosphorylation nécessaire à l'activité catalytique du récepteur, le récepteur phosphoryle des résidus tyrosines qui serviront de sites d'accueil pour le recrutement des adaptateurs et des effecteurs qui amorceront l'activation des cascades de signalisation (figure I-5).

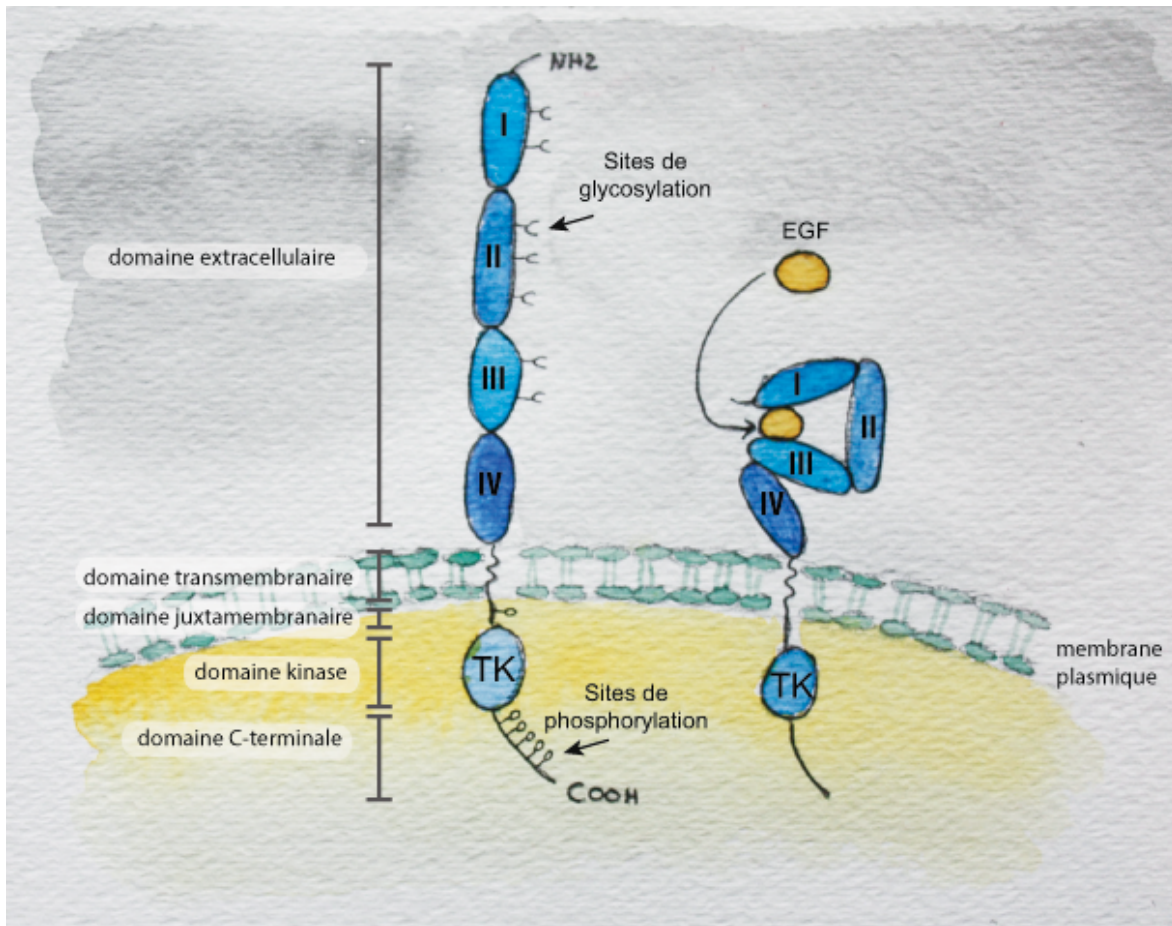


Figure I-5: Structure de l'EGFR.

L'EGFR est un récepteur transmembranaire composé d'un domaine extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire. La région extracellulaire glycosylée permet la liaison du ligand via ses domaines I et III. La liaison du ligand à son récepteur, induit une homo ou hétéro-dimérisation du récepteur qui se fait par l'intermédiaire de ses domaines II et IV. Le domaine intracellulaire est constitué d'un domaine juxtamembranaire qui permet l'activation du récepteur, sa dimérisation et son internalisation. Le domaine intracellulaire comprend aussi un domaine kinase et un domaine d'autophosphorylation en c-terminal qui comporte des résidus tyrosines servant de sites de recrutement des médiateurs de la cascade de signalisation. Inspiré de (Zandi, Larsen, Andersen, Stockhausen, & Poulsen, 2007)

1.3.2.3. Modes d'activation oncogénique de l'EGFR

Depuis les années 90, l'EGFR, une glycoprotéine transmembranaire, a été démontrée comme étant un élément clef de la biologie des tumeurs. Plusieurs modes d'activation oncogénique d'EGFR existent et sont souvent spécifiques à chaque type de cancer.

1.3.2.3.1. Augmentation de l'expression de l'EGFR

Tout d'abord, la surexpression et / ou l'amplification du gène d'EGFR sont courants dans de nombreux types de cancer et conduisent à une transduction anormale du signal de l'EGFR. De nombreuses mutations dans les cancers mammaires ont été retrouvées au niveau de l'ARNm de l'EGFR (Chan, Smith, Hannan, & Thomas, 2006). En outre, l'incapacité à atténuer la signalisation du récepteur par régulation négative. Soit via l'inhibition de son internalisation ou de sa dégradation qui entraîne une stabilisation du récepteur au niveau membranaire. En effet, la régulation négative de l'EGFR est fortement diminuée lorsque celui-ci s'hétérodimérise avec HER2 en empêchant son internalisation (Haslekas et al., 2005; Worthylake, Opresko, & Wiley, 1999). Dans certains cas, le récepteur est muté ou ne comporte pas de site de liaison à l'ubiquitine ligase c-Cbl, ce qui empêche sa dégradation. Dans d'autres cas, c'est l'ubiquitine elle-même qui est mutée prévenant également l'ubiquitination du récepteur (Peschard & Park, 2003; Thien & Langdon, 1997; Wells et al., 1990). Lors d'un stress oxydatif, par exemple causé suite à l'exposition à l'H₂O₂, le récepteur sera activé, mais cette fois-ci, il ne sera pas phosphorylé sur son site de liaison pour c-Cbl (Ravid, Sweeney, Gee, Carraway, & Goldkorn, 2002). Le type de ligand joue également un rôle sur la dégradation du récepteur ; celui-ci sera mieux dégradé quand stimulé avec de l'EGF qu'avec du TGF- α (Ouyang, Gulliford, Huang, & Epstein, 1999). Contrairement à l'EGF, le TGF- α ne reste pas lié au récepteur, l'EGFR n'est donc pas dégradé dans les lysosomes et recyclé vers la surface (French, Tadaki, Niyogi, & Lauffenburger, 1995; Futter, Pearse, Hewlett, & Hopkins, 1996).

1.3.2.3.2. L'EGFR et ses mutations activatrices

Ensuite viennent les mutations activatrices de l'EGFR. Ces modifications de l'EGFR sont également impliquées dans les phénomènes de résistance à la radiothérapie ainsi qu'à l'hormonothérapie (Learn et al., 2004). On retrouve des mutations dans des domaines codant la partie extracellulaire du récepteur. La mutation la plus fréquente est EGFRvIII, celle retrouvée dans le cancer du sein. EGFRvIII semble être piégé dans un état partiellement activé, ce qui est suffisant pour l'activation de certaines voies de signalisation oncogéniques (Chu et al., 1997). On retrouve aussi des mutations dans les domaines codant la partie intracellulaire, cela plus courant pour les glioblastomes (Frederick, Wang, Eley, & James, 2000). Des mutations activatrices de l'EGFR dans le domaine tyrosine kinases ont été signalées dans les cancers tels que dans le cancer bronchique pas à petites cellules. Ces mutations entraînent l'activation constitutive du récepteur (Lynch et al., 2004; Sordella, Bell, Haber, & Settleman, 2004).

1.3.2.3.3. L'EGFR cross-talk

Le "cross-talk" entre l'EGFR et les récepteurs hétérologues est un autre mécanisme de l'activation oncogénique de l'EGFR. En effet, l'hétérodimérisation de HER2 avec EGFR inhibe la régulation à la baisse de EGFR et prolonge ainsi la signalisation du facteur de croissance (Haslekas et al., 2005; Worthylake et al., 1999). L'EGFR peut également être activé en absence de ligand, par des molécules d'adhésion cellulaire telles que les intégrines. Les intégrines sont activées par l'interaction avec la matrice extracellulaire (MEC) et induisent l'activation de l'EGFR par des protéines tyrosines kinases (Moro et al., 2002). Les récepteurs couplés aux protéines G une fois activés par leur ligand, peuvent également activer des protéines kinases afin de stimuler le récepteur. Les GPCR peuvent finalement transactiver le récepteur en stimulant certaines métalloprotéinases, afin d'activer les ligands de l'EGFR (Daub, Wallasch, Lankenau, Herrlich, & Ullrich, 1997). Les glycoprotéines ADAM (pour *a disintegrin and metalloproteinase*) contrôlées par les GPCR, sont des régulateurs importants du clivage des ligands de l'EGFR (Gee & Knowlden, 2003; Ohtsu, Dempsey, & Eguchi, 2006). Les

récepteurs de cytokines et les canaux ioniques peuvent eux aussi activer l'EGFR (Gschwind, Fischer, & Ullrich, 2004).

I.3.2.3.4. L'augmentation d'expression du ligand

Le dernier mode d'activation s'accomplit par la surexpression de ligands tels que le TGF α ou l'EGF, ou la co-expression du ligand avec le récepteur. Ce mode est retrouvé dans plusieurs cancers et notamment dans celui du sein. Le récepteur s'autoactive par une boucle autocrine (Cohen et al., 1994; Umekita, Ohi, Sagara, & Yoshida, 2000).

Il existe de nombreux mécanismes d'activation permettant à l'EGFR d'induire les réponses cellulaires essentielles à la progression tumorale, tels que la prolifération, la migration, l'invasion et la survie. Il est maintenant important de comprendre les mécanismes moléculaires mises en jeu suite à l'activation de notre récepteur d'intérêt. Dans notre étude, nous nous focalisons principalement sur la signalisation EGF-dépendante.

I.3.3. Transduction du signal

Les voies de signalisation les mieux caractérisées sont : la voie des Ras /MAPK, la voie des PI3K/AKT, la voie PLC γ –PKC (pour *phospholipase C γ / protein kinase C*) et la voie des STAT (pour *signal transducer and activator of transcription*) (P. Chen, Xie, Sekar, Gupta, & Wells, 1994; Datta et al., 1997; Pages et al., 1993; Quesnelle, Boehm, & Grandis, 2007). Il existe des sous-types d'EGFR qui ont différente affinité pour le même ligand. Par exemple, la fixation des ligands sur les récepteurs à haute affinité active les voies des Ras/MAPK et PI3K/AKT, tandis que la fixation des ligands sur les récepteurs à faible affinité a pour conséquence l'activation des voies STAT et PLC γ /PKC (Krall, Beyer, & MacBeath, 2011). L'existence de récepteurs avec différentes sensibilités pour un même ligand permet d'avoir une variabilité encore plus grande quant à l'activation des voies de signalisation. C'est pourquoi dans notre étude, nous nous concentrons principalement sur les voies des Ras /MAPK et PI3K/AKT.

1.3.3.1. La voie Ras/ MAPK (ERK1 / 2)

Brièvement, les RTKs activés assurent l'activation des MAPKKKs (RAF, MLK3, MEKK1/4 (pour *MAP ERK kinase kinase*), MEKK2/3) qui phosphorylent ensuite les MAPKKs (MEK1/2, MKK3/6, MKK4/5, MEK5) qui elles aussi phosphorylent les MAPKs (ERK1/2, p38, JNK (pour *c-Jun N-terminal kinase*), ERK5). L'activation des MAPKs régule divers processus biologiques. Nous nous concentrerons principalement sur l'activation des kinases de type sérine/thréonine ERK1/2 (Extracellular-Regulated Kinases 1 and 2), car c'est l'une des voies signalétiques centrale de la cellule. Elle assure de multiples fonctions biologiques dont la différenciation et le développement mais on la retrouve aussi impliquée dans de nombreux processus oncogéniques, tels que la prolifération, la motilité, et la survie. En effet, l'inhibition de cette voie, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, atténue la croissance tumorale, réduit le pouvoir invasif cellulaire et induit l'apoptose (Wang, Boerner, Winkler, & LoRusso, 2007).

Plus précisément, lors de l'activation de l'EGFR, plusieurs cascades de signalisation sont activées, notamment la voie Ras / MAPK (ERK1 / 2) (R. J. Shaw & Cantley, 2006) (figure I-6). L'EGFR activé va recruter, au niveau de ses résidus tyrosines phosphorylés dans le domaine cytoplasmique, les protéines adaptatrices Grb2 et Shc via leur domaine SH2 (pour *Src Homology 2*). Le facteur d'échange de guanosine (GEF), SOS (pour *Son of Sevenless*) va ainsi être recrutée. SOS est un facteur d'échange de nucléotide qui va permettre de catalyser l'activation de la petite GTPase Ras (Downward, 2003). L'activation de Ras déclenche une cascade de phosphorylation de protéines. La première à être activée/phosphorylée est la MAPKKK Raf, qui à son tour phosphoryle les MAPKKs MEK1 et MEK2. Ces dernières phosphorylent les MAPKs ERK1 et ERK2, conduisant à leur translocation dans le noyau où elles favorisent la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la motilité, migration, la différenciation et le développement (Downward, 2003; Katz, Amit, & Yarden, 2007).

Cette voie de signalisation constamment activée dans les cancers, est donc une cible intéressante pour développer de nouvelles thérapies. Dans plusieurs cancers, mais rarement chez les patients atteints de cancer du sein, on retrouve des mutations de Raf et Ras qui induisent l'activation constitutive de la voie de signalisation (Davies et al., 2002;

Downward, 2003). Plusieurs inhibiteurs de MEK sont actuellement en développement et ont montré des effets prometteurs sur les cancers à mutations BRAf et KRas *in vivo* (Hatzivassiliou et al., 2013; Wang et al., 2007). Toutefois, en clinique, en raison de nombreux effets secondaires, les essais ont échoué (LoRusso et al., 2010; Rinehart et al., 2004).

Récemment, il a été démontré que le facteur d'ADP-ribosylation ARF6, petite protéine G monomérique faisant parti de la superfamille de Ras, est impliquée dans le contrôle de cette voie de signalisation (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006; Hashimoto, Hashimoto, et al., 2004). Plus de détails sera donné sur cette GTPase dans la partie VI.4. Au laboratoire, nous avons démontré que les protéines adaptatrices Grb2 et p66Shc régulent le recrutement, mais aussi l'activation d'ARF6 à l'EGFR dans les cellules MDA-MB-231 pour activer la voie MAPK (Haines, Saucier, & Claing, 2014). La petite GTPases ARF6 est donc un protagoniste important de la voie MAPK.

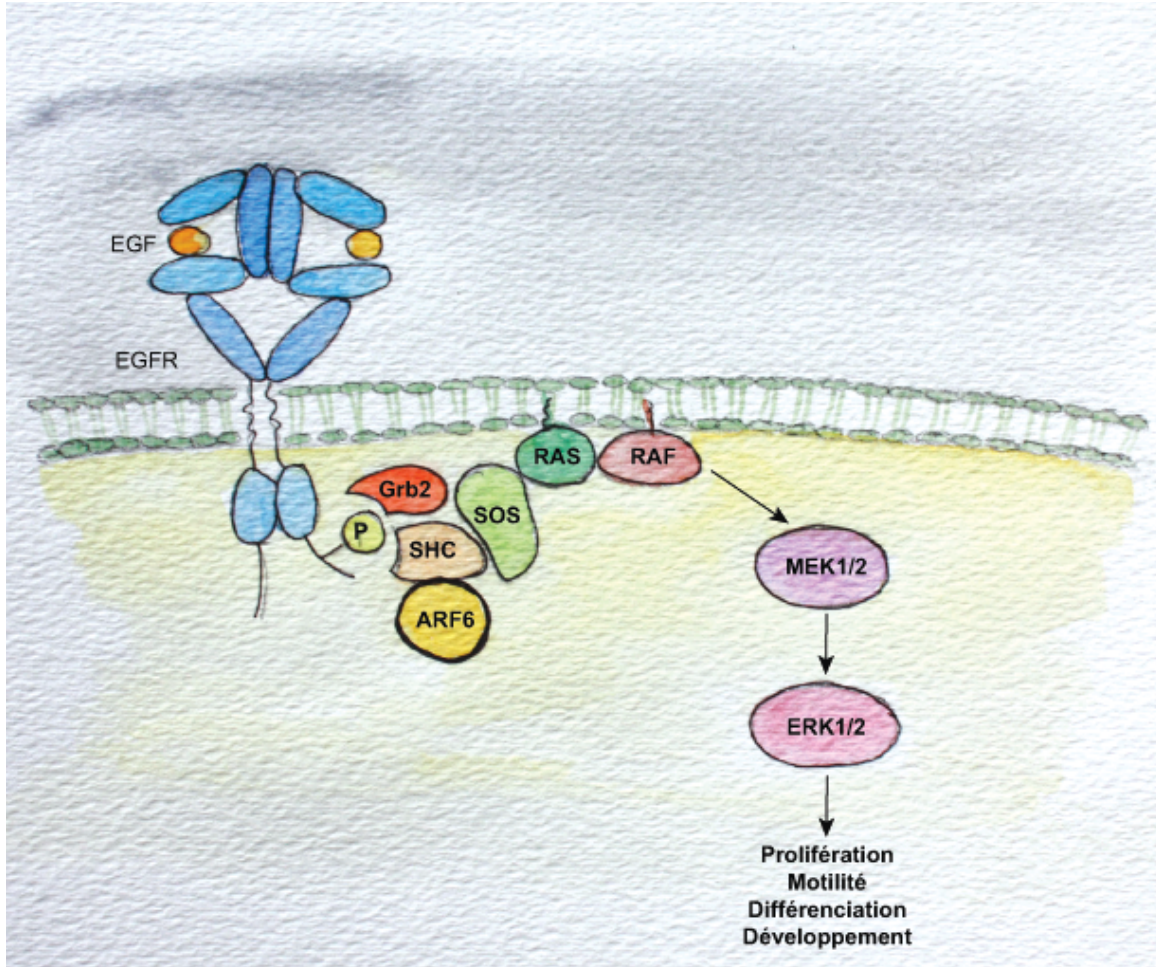


Figure I-6: La voie Ras/MAPK.

Suite à l'homo- ou l'hétérodimérisation du récepteur, l'EGFR activé va recruter, par leur domaine SH2, les protéines adaptatrices Shc, Grb2. La GTPase ARF6 va être recrutée pour y être activée. Grb2, via son domaine SH3, va recruter également la GEF SOS qui va activer RAS. La protéine RAS phosphoryle la MAPKKK Raf qui phosphoryle les MAPKKs MEK1/2, qui phosphorylent à leur tour les MAPKs ERK1/2. Cette voie va permettre l'activation de processus cellulaires tels que la prolifération, la motilité, la différenciation et le développement. Inspiré de (Zandi et al., 2007).

1.3.3.2. La voie PI3K/AKT

La voie PI3K / AKT est bien caractérisée pour son rôle dans l'oncogénèse ; elle est surtout connue pour son rôle dans la survie des cellules cancéreuses (Datta et al., 1997; Yuan & Cantley, 2008). En effet, dans les cancers du sein, on retrouve un quart des

patients avec une amplification ou une modification des gènes codants pour PI3K et AKT (P. Liu, Cheng, Roberts, & Zhao, 2009).

Brièvement, l'activation de l'EGFR va activer la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (figure I-7). Le domaine SH2 de la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K va se lier directement aux résidus tyrosines phosphorylés du récepteur ou via l'intermédiaire de protéines adaptatrices telles que Ras ou IRS1 (pour *Insulin receptor substrate 1*) (Castellano & Downward, 2010; Lam, Carpenter, Ruderman, Friel, & Kelly, 1994). Ceci active le domaine catalytique p110 de PI3K qui phosphoryle un des lipides membranaires constituant la bicouche lipidique de la membrane plasmique, le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2). Le PIP2 est converti en phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3). La phosphatase PTEN régule négativement la conversion de PIP2 en PIP3 (Cantley & Neel, 1999). Le PIP3 assure ainsi le recrutement de la sérine-thréonine kinase AKT à la membrane plasmique via son domaine PH (pour *pleckstrin homology domain*). La famille AKT / PKB est composée de trois gènes distincts (AKT1-3) qui codent des protéines de type sérine / thréonine kinases. Dans le cancer du sein, AKT1 aurait un rôle principalement dans la prolifération et AKT2 dans l'invasion (Arboleda et al., 2003; Hutchinson, Jin, Cardiff, Woodgett, & Muller, 2004). AKT est ensuite phosphorylée par la 3-phosphoinositidedependent kinase 1 (PDK1) et par le complexe 2 de la cible mammalienne de la rapamycine (mTORC2) (Courtney, Corcoran, & Engelman, 2010). AKT activée, va pouvoir phosphoryler de nombreuses protéines clefs telles que mTOR, GSK3, Bad, des facteurs de transcription comme p27, pour permettre la suppression de l'apoptose et inhiber l'arrêt du cycle cellulaire (Datta et al., 1997; R. J. Shaw & Cantley, 2006). Cela aura pour conséquence de promouvoir la survie et la prolifération cellulaire.

Le contrôle de ces voies de signalisation demeure actuellement un vrai challenge. Des essais cliniques avec des inhibiteurs de la PI3K, AKT et mTORC2 sont actuellement en cours, mais démontrent de nombreux effets secondaires. En effet, il semble très difficile de découvrir la dose requise minimisant la toxicité, mais permettant de moduler de façon significative cette voie chez les patients cancéreux (T. M. Bauer, Patel, & Infante, 2015). Il est donc urgent d'étudier de plus près cette voie de signalisation, si importante pour la tumorigénèse, afin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

Au laboratoire nous avons identifié une protéine clef de la voie de signalisation PI3K/AKT, la petite GTPase ARF1 (Boulay, Cotton, Melancon, & Claing, 2008). Nous avons démontré que la protéine adaptatrice Grb2 permet le recrutement et l'activation d'ARF1 à l'EGFR, à l'opposé de la protéine p66Shc (Haines et al., 2014). Une fois activée par l'EGF, ARF1 contrôle l'activation d'AKT et ce, via son action directe sur la PI3K (Boulay et al., 2008). C'est pourquoi, dans cette thèse, nous avons cherché à mieux détailler le rôle d'ARF1 dans la carcinogénèse.

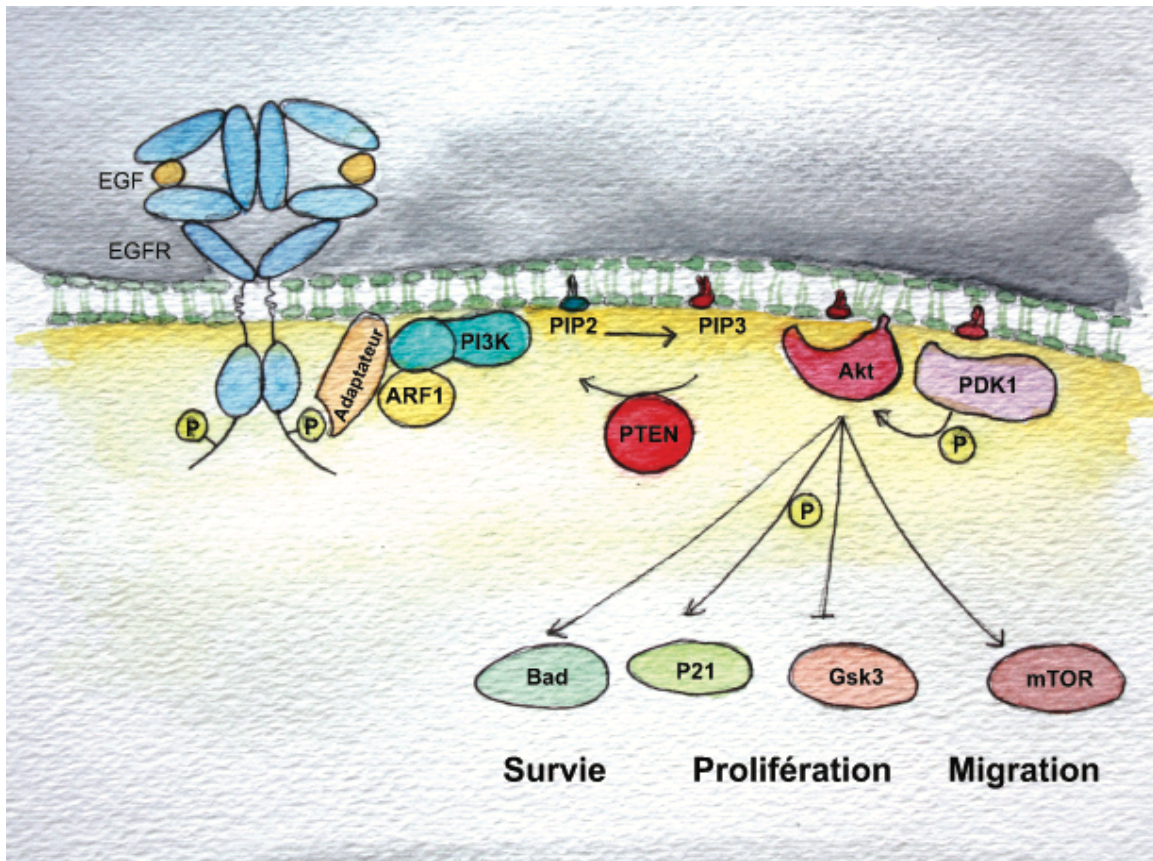


Figure I-7: La voie PI3K/AKT.

Suite à l' homo- ou l'hétérodimérisation du récepteur, l'EGFR activé va recruter les protéines adaptatrices. La PI3K est recrutée en interagissant par sa sous unité p85, ce qui active son domaine catalytique p110. La PI3K activée phosphoryle le PI (3, 4) P (PIP2) pour produire le PI (3, 4, 5) P (PIP3). Le PIP3 recrute PDK1 à la membrane plasmique. La PDK1 peut ensuite phosphoryler et activer AKT, qui à son tour phosphoryle de nombreuses protéines pour contrôler plusieurs processus cellulaires, dont la survie, la prolifération et la migration cellulaire. L'activité phosphatase de PTEN permet de déphosphoryler le PIP3, entraînant une diminution concomitante de l'activité d'AKT. Inspiré de (Garcia-Echeverria & Sellers, 2008)

I. 4. Les GTPases monomériques, la superfamille des Ras

La superfamille des petites GTPases Ras sont des protéines monomériques d'environ 21kDa. Ils partagent également beaucoup de similitudes structurales et propriétés biochimiques. Cette famille de protéines est composée de plus de 150 membres, et a été divisée en cinq groupes en fonction de leur homologie de séquence et de leurs rôles dans la cellule. On parle de la famille des Ras, Rho, Rab, Ran et ARF.

Ces GTPases contrôlent de nombreuses fonctions cellulaires telles que, la réorganisation du cytosquelette, les mécanismes de transport vésiculaire et la transduction du signal (Jaffe & Hall, 2005). Une modification lipidique post-traductionnelle présente en N-terminal ou en C-terminal de leur structure leur permette de se localiser spécifiquement dans certains compartiments intracellulaires. Les Ras sont farnésylées et/ou palmitoylées, les Rab et Rho sont géranyl-géranylées, les protéines ARF sont majoritairement myristoylées et les Ran n'ont pas de modifications lipidiques (D'Souza-Schorey & Stahl, 1995; Wennerberg, Rossman, & Der, 2005). Leurs fonctions à l'intérieur de la cellule sont principalement médiées par cette modification lipidique. Brièvement, les GTPases Ras contrôlent le développement de l'organisme, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Haigis et al., 2008). Les GTPases Rho sont importantes pour l'organisation du cytosquelette d'actine, la polarité cellulaire, la progression du cycle cellulaire et l'expression des gènes (Heasman & Ridley, 2008). Les GTPases Rab sont impliquées dans la régulation du transport vésiculaire intracellulaire et du trafic des protéines (Zerial & McBride, 2001). Les GTPases ARF régulent le trafic vésiculaire intracellulaire et l'organisation du cytosquelette (Donaldson & Jackson, 2011). Les GTPases Ran contrôlent le transport nucléo-cytoplasmique de l'ARN et des protéines (Moore, 1998).

Les GTPases agissent comme des commutateurs moléculaires, activés par la liaison au guanosine triphosphate (GTP) et désactivés par l'hydrolyse du GTP en guanosine diphosphate (GDP). Ayant une faible activité intrinsèque, ces protéines nécessitent l'intervention de facteurs d'échange de nucléotide de type guanine (GEF)

pour assurer la conversion du GDP en GTP ou de protéines régulatrices de l'activité GTPasique (GAP) pour hydrolyse du GTP en GDP. Les inhibiteurs de la dissociation du nucléotide (GDI) maintiennent en conformation inactive les GTPases en les séquestrant lorsqu'elles sont liées au GDP (Olofsson, 1999). Ces protéines peuvent passer à l'état inactif de manière spontanée, à l'exception des protéines ARF qui ont toujours besoin des GAP. Ces protéines jouent de multiples rôles et sont des régulateurs clés de processus cellulaires fondamentaux. Leur dysfonctionnement joue un rôle crucial dans la pathogenèse des maladies humaines graves, y compris le cancer (Williams & Rottner, 2010).

Seulement la famille des GTPases ARF, qui sont l'objet d'étude principal de cette thèse, et des GTPases Rho, également étudiées dans ce projet, seront exposées dans les sections suivantes.

I.4.1 La famille des Rho GTPases

Cette famille regroupe 22 protéines et se divise 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. Les Rho GTPases jouent un rôle dans de nombreux processus cellulaires tels que, la progression du cycle cellulaire, la réorganisation du cytosquelette, la polarité cellulaire, la migration, l'expression génique et la différenciation cellulaire. Brièvement, RhoA est associée aux fibres de stress, Rac1 à la formation de lamellipodes et Cdc42 à la formation de filopodes (Ridley, 2006). Ce sont les trois protéines les plus étudiées en raison de leur rôle majeur sur la régulation et l'organisation des filaments d'actine. Nous nous intéressons principalement aux GTPases RhoA et RhoC qui inversement à RhoB, sont connues pour être hautement activées et exprimées dans plusieurs types de cancer, notamment celui du sein (Vega & Ridley, 2008) (M. Huang & Prendergast, 2006).

1.4.1.1. Les GTPases Rho

Les GTPases de la famille Rho, RhoA et RhoC, jouent un rôle majeur dans plusieurs étapes clés de la progression du cancer, notamment la progression du cycle cellulaire, la cytokinèse, la migration et l'invasion (Karlsson, Pedersen, Wang, & Brakebusch, 2009; Simpson, Dugan, & Mercurio, 2004; Vega & Ridley, 2008).

1.4.1.1.1. RhoA et RhoC dans le cancer

L'expression des GTPases RhoA et RhoC est régulée à la hausse dans une variété de cancers humains. L'expression des Rho dans les cancers est contrôlée entre autre par des courts acides ribonucléiques, microARN (M. Liu, Bi, Zhou, & Zheng, 2012). Dans les cancers du sein, le miARN miR-31 est supprimé, ce qui a pour conséquence d'augmenter l'expression basale de RhoA et ultimement la formation de métastases *in vivo* (Valastyan, Reinhardt, et al., 2009). L'expression de RhoC est contrôlée négativement par deux miARN : miR-493 et miR-138, qui ont pour effet de réduire la migration des cellules cancéreuses (Jiang et al., 2010; Ueno et al., 2012). On ne retrouve aucune mutation de Rho associée aux cancers du sein.

Une corrélation positive a été signalée entre le niveau d'expression de RhoA et la progression de la maladie dans les tumeurs du cancer du sein (Fritz, Brachetti, Bahlmann, Schmidt, & Kaina, 2002; Fritz, Just, & Kaina, 1999). L'expression de RhoC corrèle avec la formation de métastases dans un certain nombre de cancers (Karlsson et al., 2009). Plusieurs études *in vivo* ont montré que RhoC est importante pour la formation de métastases. En effet, RhoC a été signalé comme un gène positivement associé à la formation des métastases et non au développement des tumeurs primaires comme RhoA (E. A. Clark, Golub, Lander, & Hynes, 2000; Hakem et al., 2005).

Il a également été démontré que les Rho GTPases pouvaient jouer sur plusieurs types d'invasion. Les GTPases Rho vont jouer sur l'invasion associée à la migration mésenchymateuse (Sahai & Marshall, 2003). Elles contrôlent la formation de structures majeures pour l'invasion telles que les invadopodia. Ces structures seront détaillées dans les sections suivantes. Le rôle joué par les isoformes RhoA et C est distinct. Il a été démontré que RhoC contrôle l'activité de la cofiline au niveau des invadopodes dans les

cellules MTLn3, une lignée cellulaire d'adénocarcinome mammaire de rat hautement métastatique (Bravo-Cordero et al., 2011). Les Rho GTPases vont également jouer sur la protéolyse de la matrice extracellulaire en contrôlant la production des métalloprotéinases (Poincloux, Lizarraga, & Chavrier, 2009). Il a été démontré que RhoA régule la MT1-MMP (pour *membrane type 1-matrix metalloproteinase 1*) au niveau des invadopodes des MDA-MB-231 cellules afin de réguler l'invasion (Sakurai-Yageta et al., 2008). Dans les cellules cancéreuses du sein les MDA-MB-231, la déplétion de RhoA ou RhoC inhibe la potentiel invasif des cellules métastatiques *in vitro* (Fingleton, 2008; Jura et al., 2009; Pille et al., 2005; Valastyan, Benaich, Chang, Reinhardt, & Weinberg, 2009). Rac1 a été impliquée dans l'induction de l'expression et de la sécrétion de métalloprotéinases (Parri & Chiarugi, 2010). À l'opposé de Rac1, RhoA dire en général inhibe l'invasion en supprimant la production de protéases qui dégradent la matrice extracellulaire (Lozano, Betson, & Braga, 2003). Étonnamment, dans un autre type de cancer du sein, les cellules SUM-159, la déplétion de RhoA augmente l'invasion (Simpson et al., 2004). Cela est sûrement dû aux différentes méthodes utilisées pour regarder l'invasion.

Les GTPases Rho sont aussi impliquées dans l'invasion associée la migration amoéboïde. C'est à dire que les cellules n'ont pas besoin de dégrader la matrice extracellulaire par protéolyse. Elles migrent individuellement grâce à l'activation de la voie RhoA/ROCK (kinase de Rho) /myosine II (décrite ci-dessous) pour jouer sur la contractilité de la cellule (Wilkinson, Paterson, & Marshall, 2005; Wyckoff, Pinner, Gschmeissner, Condeelis, & Sahai, 2006).

1.4.1.1.2. Effecteurs des GTPases Rho

RhoA et RhoC utilisent une grande variété d'effecteurs pour réguler plusieurs fonctions cellulaires en réponse à des stimuli intracellulaires et extracellulaires (figure I-8). Elles ont toutes deux des fonctions différentes dans le cancer, en raison de leurs différentes affinités pour les effecteurs en aval. Deux des protéines effectrices les mieux caractérisées en aval de RhoA sont les protéines kinases Rho-associés, ROCK1 et ROCK2 (également connues sous le nom Rho-kinases) (Amano, Nakayama, & Kaibuchi, 2010). La voie de signalisation RhoA/ROCK est connue pour induire la contraction des fibres d'actine-myosine à l'arrière de la cellule, les uropodes. Ce sont des sérines /

thréonines kinases qui phosphorylent des cibles multiples. Elles régulent la contractilité actin-myosin dans les cellules en augmentant la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC). La MLC à son tour stimule la myosine II, lui permettant d'interagir et de se déplacer le long des filaments d'actine (Roberts et al., 2008). Les ROCKs phosphorylent et activent également les LIM kinases LIMK1 et LMK2, qui à leur tour phosphorylent et l'inactivent la cofiline qui dépoliarise l'actine (Bernard, 2007).

Plusieurs membres de la famille des formines interagissent avec les GTPases Rho (Schonichen & Geyer, 2010). mDia1 a été la première formine identifiée comme un effecteur de RhoA, et se lie aussi RhoB et RhoC (Watanabe, Kato, Fujita, Ishizaki, & Narumiya, 1999; Watanabe et al., 1997). La liaison de protéines Rho à mDia1 stimule l'activité de nucléation de l'actine. mDia1 semble interagir spécifiquement avec les protéines Rho, tandis que sa famille et mDia2 mDia3 lient plusieurs autres GTPases Rho telles que Rac1 et Cdc42 (Waller & Alberts, 2003). Une variété d'autres effecteurs Rho ont été identifiés y compris des kinases associées à PKC (PRK), mais leur rôle dans la réorganisation de l'actine n'est pas entièrement élucidé (Cameron & Parker, 2010).

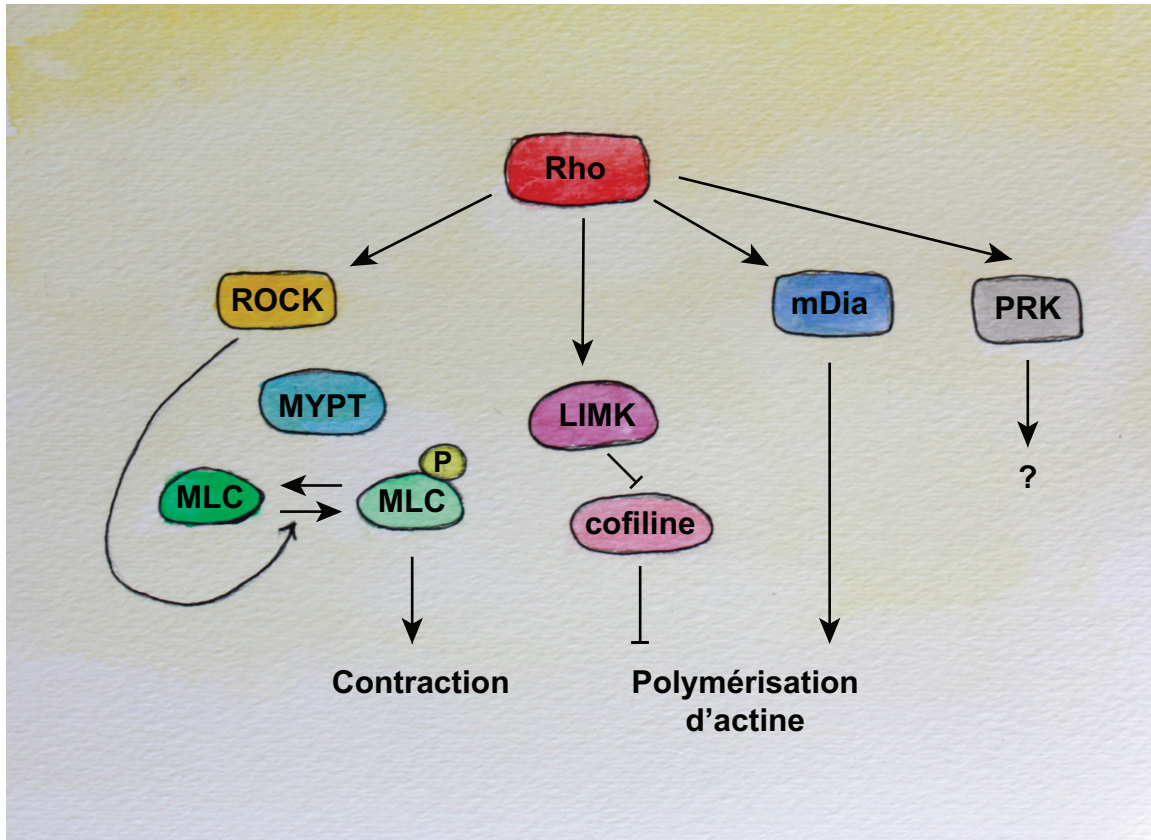


Figure I-8: ROCK1/2 effecteurs des Rho GTPases.

Les protéines Rho activent les ROCK, qui induisent une augmentation de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC). ROCK1/2 phosphorylent directement la MLC et inhibent en même temps la phosphatase MYPT (pour *myosin phosphatase targeting protein*), ce qui induit une augmentation de la contractilité. Les ROCK phosphorylent et activent également la LIMK, qui à son tour phosphoryle et inactive la cofiline. Cela entraîne une augmentation de la polymérisation d'actine. Les Rho peuvent également interagir avec mDia pour stimuler la polymérisation de l'actine. Elles peuvent également interagir avec d'autres effecteurs dont les trois kinases associées à PKC (PRK), mais leur rôle dans la réorganisation de l'actine n'est pas encore totalement élucidé. Inspiré de (Ridley, 2001).

I.4.1.1.3. Les thérapies associées

L'activité aberrante des Rho GTPases a été largement associée au cancer. Les mutations activatrices constitutives des Rho GTPases sont rares, contrairement à l'oncogène Ras. En effet, l'activité des Rho GTPases est souvent affectée par un dérèglement de l'expression ou de l'activité des Rho GEFs, GAPs ou GDIs ; ce qui en fait des cibles considérées comme "undruggable" par de petites molécules (Baker & Der, 2013). Les composants clés de leur signalisation sont des cibles thérapeutiques intéressantes pour la découverte de médicaments contre le cancer. Plusieurs approches qui ciblent directement la voie de signalisation ont été explorées ; on y retrouve les méthodes qui inhibent l'activation des Rho par les GEFs, qui inhibent l'activité des effecteurs ou qui altèrent la localisation des Rho GTPases. L'approche la plus prometteuse à ce jour est celle qui cible les kinases effectrices. Les inhibiteurs de ROCK sont actuellement dans plusieurs essais cliniques, bien que seul l'AT13148 soit développé pour le traitement du cancer (R. Li et al., 2012; Yap et al., 2012).

I.4.2 La famille des facteurs d'ADP-ribosylation

Les protéines ARF ont été découvertes il y a environ 20 ans pour leur rôle comme activateur allostérique sur l'activité ADP-ribosyltransférase de la toxine du Choléra (Kahn & Gilman, 1984). Or maintenant, nous attribuons d'autres rôles aux ARFs dont la régulation du transport vésiculaire et le changement structural du cytosquelette d'actine. Les facteurs d'ADP-ribosylation (ARF) sont des petites protéines G monomériques ayant une activité GTPasique, cyclant entre une forme inactive (liée au GDP) et une forme active (liée au GTP). Chez les mammifères, il existe 6 isoformes de ARF et toutes les isoformes sont présentes chez l'humain à l'exception de l'isoforme 2 (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006). Les isoformes ARF1 à ARF5 sont principalement localisées dans l'appareil de Golgi, alors que ARF6 est connue pour être principalement localisée à la membrane plasmique (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006).

1.4.2.1. Classement et distribution

Alors que ces GTPases sont exprimées de manière ubiquitaire, leur distribution cellulaire est spécifique (membrane plasmique versus appareil de Golgi). La modification post-traductionnelle de ces protéines conduit à leur association à la membrane et détermine leur distribution (Antonny, Beraud-Dufour, Chardin, & Chabre, 1997). Dans la cellule, les interactions avec les molécules effectrices jouent un rôle important dans la définition de la fonction de chaque protéine ARF (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006). Nous divisons les protéines ARF en 3 classes qui incluent 6 isoformes différentes en fonction de leur homologie de séquence soient : les isoformes 1 à 3 (classe I), 4 et 5 (classe II) et 6 (classe III) (Donaldson et Jackson, 2000)(D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006). La classe I, qui comprend ARF1, ARF2 et ARF3, est impliquée dans le contrôle de la formation de vésicules lors du transport intracellulaire et la transformation des lipides membranaires (Bonifacino et Glick, 2004). La classe II, composée de ARF4 et ARF5, est connue aussi pour assurer le transport intracellulaire (Kahn & Gilman, 1984). Cependant, les fonctions des protéines ARF de classe II, n'ont pas encore complètement été élucidées. À ce jour, ARF5 peut contrôler le transport de Golgi précoce et le recrutement de composants de manteau aux membranes trans-Golgiennes (Claude et al., 1999; Takatsu, Yoshino, Toda, & Nakayama, 2002). La classe III, composée uniquement de ARF6, localisée à la membrane plasmique et aux membranes endosomales, est impliquée dans l'endocytose des récepteurs membranaires et dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Donaldson, Radhakrishna, & Peters, 1995; Peters et al., 1995; Radhakrishna, Al-Awar, Khachikian, & Donaldson, 1999). La fonction biologique des protéines ARF est par ce fait dictée par leur localisation.

1.4.2.2. Structure

Les protéines ARF sont constituées de deux régions principales appelées switch I (acides aminés 45 à 54) et switch II (acides aminés 70 à 80) reliées toutes deux par une boucle β -hairpin nommée région inter-switch (Donaldson & Jackson, 2011). La structure des protéines ARF comporte également un domaine amphipathique en N-terminal (figure I-9A).

L'hélice alpha en N-terminale est une modification lipidique post-traductionnelle. Cette hélice est myristoylée et sert, en premier lieu, de verrou d'activation en s'intercalant dans la région inter-switch (Chavrier & Menetrey, 2010; Randazzo et al., 1995; L. Zhao et al., 1997). Elle est nécessaire à l'activité biologique de ces GTPases, car elle joue un rôle important dans la médiation de la liaison du GTP aux protéines ARF. En effet, lorsque la ARF est en conformation inactive, la région inter-switch est rétractée à l'intérieur de la protéine. Une fois la GTPase activée, le déploiement de l'hélice amphipatique dégage la région inter-switch, et prépare le site de liaison pour le GTP pour le passage vers la forme active (Randazzo et al., 1995) (figure I-9B).

L'hélice alpha, en deuxième lieu, suite à la liaison du GTP, sert d'ancrage dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique (Antonny et al., 1997; Pasqualato, Renault, & Cherfils, 2002; Randazzo et al., 1995). Suite à la liaison du GTP, la libération de l'hélice N-terminale permet à ses résidus hydrophobes d'interagir avec les phospholipides membranaires (Antonny et al., 1997). Par conséquent, la liaison du GTP favorise le recrutement d'effecteurs de signalisation, mais aussi le passage d'une localisation cytosolique à une localisation membranaire (Antonny et al., 1997; Donaldson & Jackson, 2011) (figure I-9C).

Le switch 1 montre un changement de conformation de longueur et d'amplitude plus ou moins variable selon les petites protéines G ainsi que le partenaire qui lui est associé. On retrouve deux types de conformation pour le switch 1 : la conformation avec les ARF-GDP est de type « ouverte » correspondant un switch 1 ordonné, éloigné du site nucléotidique et la conformation pour les formes GTP, proche de la conformation « fermée » (Cherfils et al., 1998; Milburn et al., 1990). De plus, la signature moléculaire W/GG/R augmente la stabilité de la conformation active de la GTPase (Pasqualato et al., 2002). L'activation des protéines ARF est de ce fait un processus complexe qui dépend de plusieurs paramètres.

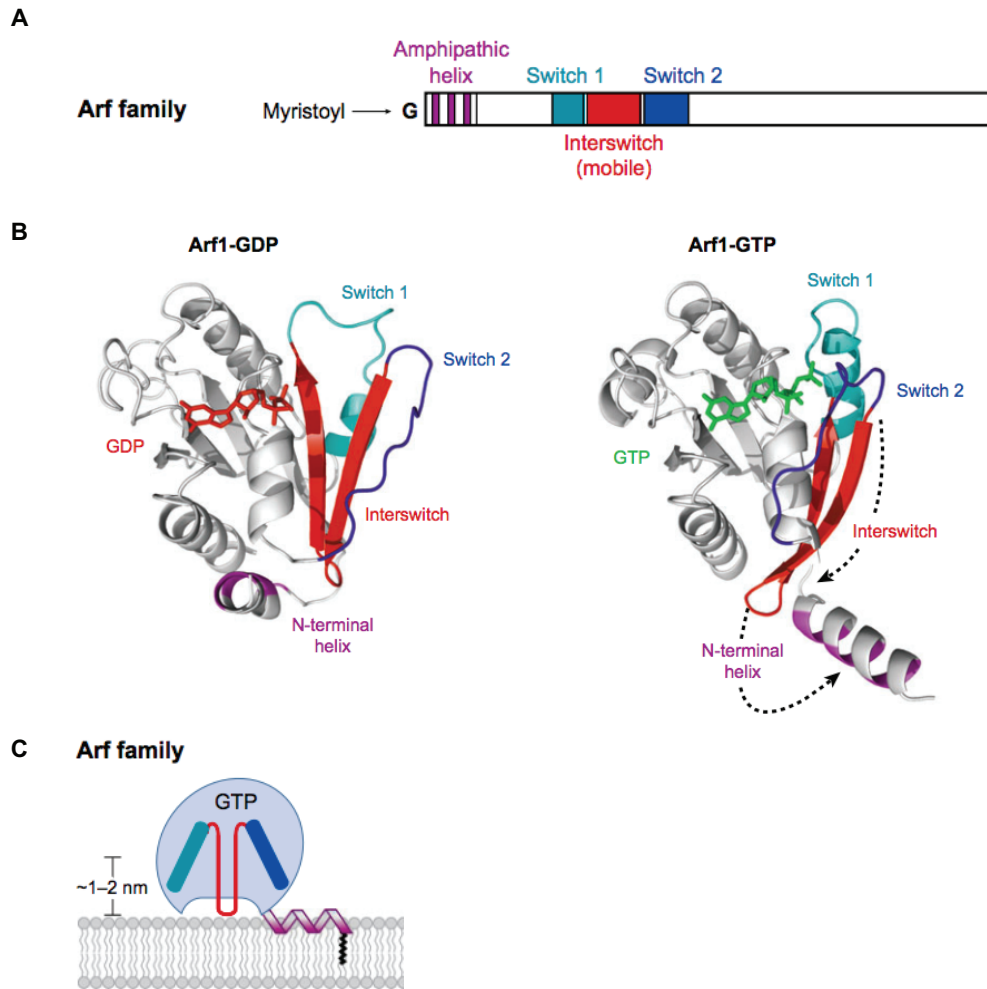


Figure I-9 : Structure des protéines ARFs.

(A) Représentation schématique d'une protéine ARF. Les ARF contiennent une hélice amphipathique en N-terminal, qui est souvent myristoylée. Les protéines ARF ont des régions « switch » qui changent de conformation lors de la liaison de GTP, et la région interswitch est également mobile. (B) Structure tri-dimensionnelle d'une protéine ARF, modélisée ici pour ARF1. Suite à la liaison du GTP, la région interswitch se déplace à l'écart des régions switch et déplace l'hélice N-terminale de la poche hydrophobe qu'elle occupe dans l'état lié au GDP. L'hélice bipolaire, pour la ARF-GTP peut ainsi interagir avec une bicouche lipidique adjacente, permettant à la protéine ARF de s'ancrer à la membrane. La liaison de la protéine ARF à la membrane est renforcée par l'insertion de myristate dans la bicouche lipidique. (C) Représentation d'une protéine ARF localisée dans la cellule à la membrane. Adapté de (Gillingham & Munro, 2007).

I.4.2.3. Activation et régulation

Tout comme les Rho GTPases, les ARFs cyclent entre une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP. Ce mécanisme est contrôlé par des facteurs d'échange de nucléotides guanine (GEF) qui catalysent l'échange du GDP en GTP et par des protéines activatrices du GTP (GAP) qui accélèrent l'hydrolyse du GTP lié (Gillingham & Munro, 2007) (figure I-10). La myristoylation en N-terminal, le changement de conformation dans l'inter-domaine et leur localisation à la membrane sont des étapes nécessaires à leur activation. Lorsqu'une protéine ARF est activée, elle fonctionne comme un interrupteur moléculaire et régule le trafic membranaire, l'exocytose et le remodelage du cytosquelette d'actine, plusieurs processus impliqués dans l'acquisition d'un phénotype invasif. *In vitro*, il a été démontré que plusieurs ARF GEFs et ARF GAPs peuvent interagir avec une ou plusieurs protéines ARF (C. L. Jackson & Casanova, 2000). Alors qu'*in vivo*, il en est autrement. Il a été démontré que des GEFs et GAPs distinctes régulaient la transition GDP / GTP de chaque GTPases ARF (Randazzo & Hirsch, 2004).

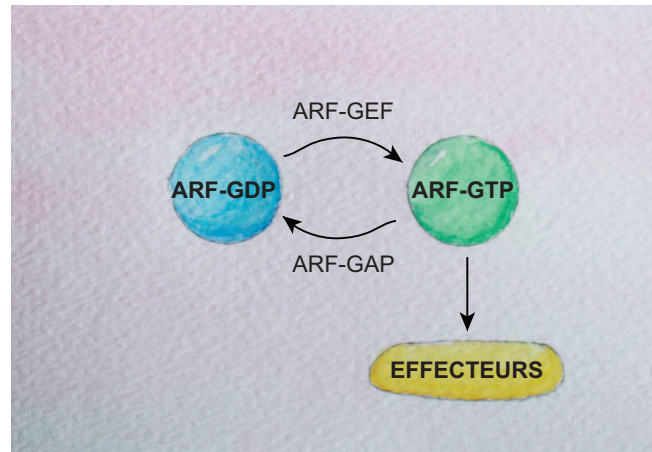


Figure I-10: Activation et inactivation des protéines ARF GTPases.

Suite à signal extracellulaire, les facteurs d'échange (GEF) sont recrutés à leur GTPases spécifiques afin de permettre la dissociation du GDP et la liaison de GTP. La GTPase liée au GTP est alors sous forme active et peut activer plusieurs effecteurs. La régulation de son activation se fait par le recrutement de protéines activatrices du GTP (GAP) qui vont permettre l'hydrolyse du GTP en GDP. Inspiré de (Cherfils & Zeghouf, 2013).

I.4.2.3.1. Les protéines ARF GEF

Chez l'humain, il existe au moins 15 différents facteurs d'échange de nucléotides guanyliques (GEF) pour les protéines ARF. Les GEFs constituent une famille variée de protéines allant de 47 à 200kDa. Toutes les ARF GEFs identifiées sont des protéines cytosoliques qui sont associées à la périphérie des membranes. Les différentes ARF GEFs possèdent une faible homologie de séquence mais partagent une région centrale commune de 200 acides aminés connue comme le domaine Sec7 avec lequel elles interagissent avec les protéines ARF. Il porte le nom de Sec7 en raison de son homologie avec la protéine de levure Sec7p (C. L. Jackson & Casanova, 2000). Les protéines contenant le domaine Sec7 sont présentes dans différents types d'organismes vivants incluant les plantes, les levures, les insectes et les mammifères. Le domaine Sec7 catalyse la libération du GDP et la liaison du GTP sur les protéines ARF concernées (C. L. Jackson & Casanova, 2000). Les GEFs peuvent activer un ou plusieurs ARF. Il a été démontré que le domaine Sec7 suffit à lui seul à catalyser l'échange du GDP in vitro. En effet, l'interaction d'une protéine ARF avec le domaine Sec7 est nécessaire et suffisante pour permettre l'activité de la GEF (Chardin et al., 1996; Mossessova, Gulbis, & Goldberg, 1998). Les ARF GEFs jouent un rôle majeur dans la distribution et la quantité spatiotemporelle des ARFs activées (Donaldson & Jackson, 2011).

Les ARF GEFs sont classées en sous-familles selon l'homologie de séquence de leurs domaines non catalytiques et de leurs fonctions (Cox, Mason-Gamer, Jackson, & Segev, 2004; C. L. Jackson & Casanova, 2000).

- La famille ARNO (pour *ARF nucleotide binding site opener*) / Cytohésine : La famille comprend ARNO, ARNO 3, cytohésine-1 et cytohésine-4. Elles se localisent principalement à la membrane plasmique et à l'appareil de Golgi. Des études biochimiques ont montré une activité plus importante de ces GEFs envers ARF1 par rapport à ARF6 (Franco et al., 1998; Macia, Chabre, & Franco, 2001).

- La famille EFA6 (pour *Exchange factor for ARF6*): Elle comprend cinq protéines chez les mammifères (EFA6A-D). EFA6A et EFA6B sont exprimées de

manière prédominante au niveau du cerveau et EFA6C et EFA6D de façon plus ubiquitaire. Ces GEFs présentent une spécificité d'activité envers ARF6 (Franco et al., 1999).

- La famille BRAG (pour *Brefeldin A (BFA)-resistant ARF GEF*) : La famille comprend IQSEC1-3 pour BRAG1, BRAG2/GEP100 et BRAG3. BRAG1 active préférentiellement ARF6 et est localisée au niveau des endosomes (Someya et al., 2001). GEF100 active spécifiquement ARF6 lors d'essais in vitro et est résistant à la BFA (Kahn & Gilman, 1986). Cette GEF permet l'activation d'ARF6 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 et contribue à leur phénotype invasif (Mishima, Tsuchiya, Nightingale, Moss, & Vaughan, 1993).

- La famille GBF1 (pour *Golgi BFA-resistance factor 1*)/ BIG (pour *BFA-inhibited GEF*) : Les GEFs GBF et BIG semblent être localisées au niveau de l'appareil de Golgi et ont un rôle prédominant dans la formation des manteaux à des sites spécifiques. Elles régulent l'activité des protéines ARF de classe I et II (Togawa, Morinaga, Ogasawara, Moss, & Vaughan, 1999).

- La famille FBX8 (pour *F-box only protein 8*): Fbx8 a été caractérisée pour sa capacité à entraîner l'ubiquitination et la perte de fonction d'ARF6 sans promouvoir sa dégradation (Ding et al., 1996). De plus, sa surexpression inhibe le processus d'invasion médiée par ARF6 dans les cellules MDA-MB-231 (Mishima et al., 1993).

En catalysant la réaction d'échange, les GEFs permettent l'activation des ARF et de ce fait, l'interaction avec leurs effecteurs. Ils ont donc un rôle crucial dans l'implication des protéines ARF au niveau de nombreux processus cellulaires.

1.4.2.3.2. Les protéines ARF GAPs

Au moins 24 ARF GAPs ont été identifiées chez l'humain. Ces protéines, à l'inverse des GEF, catalysent l'hydrolyse du GTP lié à la ARF. Toutes les ARF GAPs renferment un domaine conservé d'environ 70 acides aminés contenant un motif en doigts de zinc de type C4 (CxxCx(16-17)CxxC) qui est responsable de l'activité catalytique (Donaldson & Jackson, 2000; Randazzo & Hirsch, 2004).

Les ARF GAPs sont subdivisées en 2 familles selon leur organisation structurelle générale:

- La famille de type ARF GAP1

Cette famille est divisée en trois sous-types, comprenant:

- **ARF GAP1/2/3**, qui régulent l'activité de ARF1. Elles interviennent dans les fonctions de l'appareil de Golgi (Cukierman, Huber, Rotman, & Cassel, 1995; Tanigawa et al., 1993).

- Les protéines **SMAP** (pour *Stromal Membrane-Associated Protein*) qui contrôlent ARF1 et ARF6, sont importante dans les mécanismes d'endocytose liés à ARF6 (Natsume et al., 2006; Tanabe et al., 2005).

- Les protéines **GIT** (pour *G protein-coupled receptor kinase-interactor*), qui peuvent agir sur les trois classes des ARF in vitro (Premont et al., 1998). GIT1 est exprimée dans les poumons, le cerveau et le foie, alors que GIT2 est exprimée de manière ubiquitaire (Premont, Claing, Vitale, Perry, & Lefkowitz, 2000; Schmalzigaug, Phee, Davidson, Weiss, & Premont, 2007). La forme courte de GIT2 est distribuée au niveau de l'appareil de Golgi et assure spécifiquement l'inactivation d'ARF1 (Mazaki et al., 2001). GIT régule l'activité de ARF6, et par conséquence, le trafic membranaire et les points d'adhésions primordiaux (Hoefen & Berk, 2006; Ikenouchi & Umeda, 2010).

- La famille de type AZAP (ARF GAPs avec des répétitions d'Ankyrine et des domaines d'homologie à la Pleckstrine) :

Cette famille est divisée en quatre sous-types contenant chacune 3 gènes:

-**ASAP** (pour *ARF GAP with SH3, ANK repeat and PH domain*) qui intervient dans l'activité de la protéine ARF1, adhésions focales, invadopodes et podosomes (Randazzo et al., 2000).

-**ACAP** (pour *ARF GAP with Coiled-Coil domain, ANK repeat and PH domain*) présente une spécificité d'activité envers ARF6. Elles sont impliquées dans la cytokinèse, la migration et le remodelage du cytosquelette d'actine (T. R. Jackson et al., 2000).

- **ARAP** (pour *ARF GAP with Rho GAP, ANK repeat and PH domain*) caractérisée pour son rôle dans la médiation de l'activité ARF1, 5 et 6, ainsi que des protubérances membranaires (Krugmann et al., 2002; Yoon et al., 2006).

- **AGAP** (pour *ARF GAP with GTP binding protein like, ANK repeat and PH domain*) qui régule l'activité de la protéine ARF1 et peut servir de lien entre la voie d'endocytose et le cytosquelette d'actine (Nie et al., 2002).

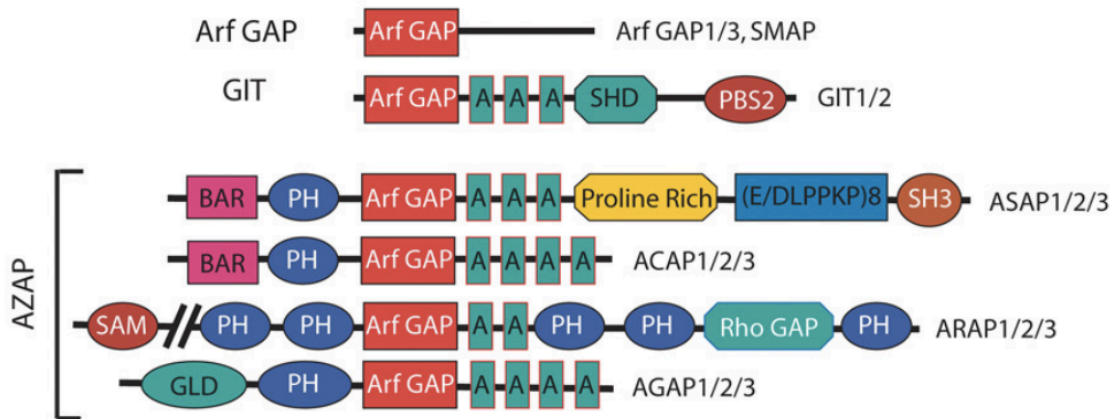


Figure I-11: Représentation schématique des protéines ARF GAPs.

Les deux grandes familles de ARF GAPs sont subdivisées selon leur organisation structurelle générale. A, ankyrin repeat; BAR, Bin, amphiphysin and Rvs 167 and Rvs 161; GLD, GTP-binding protein-like domain; PBS, paxillin-binding sequence; PH, pleckstrin homology; SAM, sterile α motif; SH3, src homology 3; SHD, spa-homology domain (Randazzo, Inoue, & Bharti, 2007).

En inactivant les protéines ARF, ces protéines permettent le cyclage des protéines ARF, un processus essentiel la complétion de plusieurs de leurs fonctions. Les ARF GAPs sont impliquées dans plusieurs fonctions des protéines ARF telles que l'adhésion cellulaire, la migration cellulaire et l'invasion cellulaire (Randazzo & Hirsch, 2004; Sabe, Onodera, Mazaki, & Hashimoto, 2006). Elles peuvent donc également être perçues comme des régulateurs positifs de la fonction des protéines ARF (Tanigawa et al., 1993).

1.4.2.3.3. Les inhibiteurs

La Brefeldine A inhibe l'activité de certaines GEFs en interagissant avec celles-ci au niveau de leur domaine Sec7 ; il s'agit d'un antibiotique de type lactone (Peyroche et al., 1999) (Chardin & McCormick, 1999). Le transport antérograde est donc inhibé au profit du transport rétrograde. Au niveau du réticulum endoplasmique, les protéines s'accumulent ce qui engendre éventuellement la désintégration de l'appareil de Golgi (Fujiwara, Oda, Yokota, Takatsuki, & Ikehara, 1988). Le principal mécanisme d'action de la Brefeldin A est l'inhibition de la protéine ARF1. Les essais pharmacologiques avec la BFA sur ARF1 ont montré plusieurs effets cytotoxiques sur maints types de cellules cancéreuses. Toutefois, la faible biodisponibilité de cet inhibiteur a restreint sa progression dans les essais cliniques (Ohashi et al., 2012).

Plusieurs autres inhibiteurs d'ARF GEFs ont été développés, car toutes les GEFs ne sont pas sensibles à la Brefeldine A (Sata, Moss, & Vaughan, 1999). Ces inhibiteurs non-compétitifs ont été mis au point dans le but d'étudier la fonction des protéines ARF ainsi que pour le développement de traitements ayant pour but la modulation de leur activité. Par exemple, le LM11 est un inhibiteur qui s'intercale entre ARF1-GDP et la GEF ARNO (ARF GEF spécifique d'ARF6 et ARF1) pour empêcher son activation (Viaud et al., 2007). En effet, le LM11 bloque la migration des cellules MDCK (Madin-Darby canine kidney) de façon ARNO-dépendante et affecte la localisation d'ARF1 dans l'appareil de Golgi (Viaud et al., 2007). Il existe déjà d'autres inhibiteurs des protéines ARF que la BFA et le LM11, tels que la SecinH3, qui agit de façon moins spécifique en liant les cytohésines 1 à 3, l'AG1478 qui lie la GEF GBF1 ou l'AMF-26. Cependant, à long terme, ces composés entraînent le morcellement du golgi et la mort cellulaire (Hafner et al., 2006; Morinaga, Tsai, Moss, & Vaughan, 1996; Ohashi et al., 2012; Pan et al., 2008; Viaud et al., 2007; Zeghouf, Guibert, Zeeh, & Cherfils, 2005).

Ces derniers résultats suggèrent donc qu'il existe un potentiel thérapeutique intéressant en vue de la création de composés inhibiteurs des protéines ARF. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires par lesquels les protéines ARF régulent le cancer du sein permettra un jour de développer de nouvelles approches thérapeutiques anti-cancer. La famille des facteurs d'ADP-ribosylation est un autre

groupe de GTPases jouant un rôle important dans le développement des cancers invasifs. Dans cette thèse, nous nous intéressons principalement à ARF1 et ARF6 qui sont les mieux caractérisées et qui ont été associées à la progression tumorale.

I.4.2.4. ARF1

I.4.2.4.1. La distribution d'ARF1

Longue de 181 acides aminés, ARF1 est exprimée de façon ubiquitaire dans les diverses cellules de l'organisme. ARF1-GDP est généralement localisée dans le cytosol, tandis qu'ARF1-GTP activée se trouve principalement dans l'appareil de Golgi. Le passage d'ARF1 du cytosol vers les membranes golgiennes est favorisé par son interaction avec p23 et p24, des protéines transmembranaires agissant comme récepteurs des protéines-cargos. ARF1 possède, au milieu de sa séquence, un motif MXXE de localisation à l'appareil de Golgi et aussi un groupement myristoylé qui permet son association avec les phospholipides membranaires (Donaldson & Honda, 2005). Cette transition cytosol-membrane d'ARF1 est également modulée par une protéine SNARE (pour *soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*) présente à l'interface réticulum endoplasmique/Golgi, la Membrane (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006).

ARF1 fut premièrement décrit comme étant localisée au golgi afin de réguler le trafic vésiculaire, mais de nouvelles études démontrent qu'elle peut aussi être associée à la membrane plasmique pour transmettre le signal de protéines transmembranaires (Boulay et al., 2008; L. A. Cohen et al., 2007; Galas et al., 1997; Mitchell et al., 2003; Stearns, Willingham, Botstein, & Kahn, 1990).

I.4.2.4.2. Activation d'ARF1, mutations et outils

Des mutants d'ARF1 ont été développés comme nouveaux outils pour caractériser l'importance de l'état d'activation d'ARF1 dans des processus physiopathologiques.

Tout d'abord, il faut savoir que suite à la liaison avec le GDP ou le GTP, ARF1 subit des changements structuraux dans le segment localisé entre le 38e et le 83e résidu (Amor, Harrison, Kahn, & Ringe, 1994). Il y a alors un réarrangement de la structure en feuillet β d'ARF1 accompagné du déplacement de deux résidus. En conformation active, les deux régions switch sont rétractées et sont déplacées vers le site actif de liaison, le phosphate- γ du GTP se place ainsi à l'intérieur des résidus 57 à 63. Dans la région switch 2, on retrouve le résidu glutamine en position 71 qui est important pour la réaction de la catalyse par une GAP, en orientant une molécule d'eau. Le mutant ARF1Q⁷¹L (glutamine en position 71 pour une leucine), est une forme active constitutive, car celui-ci a perdu toute activité GTPasique.

La conformation d'ARF1-GDP consiste en un réarrangement de brins β localisés entre le 42e et 51e résidu (Amor et al., 1994). Les résidus thréonine 31 et 48, grâce à leur groupement -OH, coordonnent les ions magnésium, pour l'échange du GDP en GTP. Cette étude a permis de donner naissance au mutant dominant négatif ARF1T³¹N (substitution de la thréonine en position 31 pour une asparagine). Cette mutation va entraîner la formation d'un complexe ARF1/GDP et la séquestration des ARF GEFs nécessaires à son activation.

Le mutant ARF1K³⁸A qui réagit différemment selon les inhibiteurs de GEFs. En tant qu'outil, ARF1K³⁸A est insensible au LM11 mais reste à la BFA. Ce mutant de GTPase avec des réponses différentes à deux classes d'inhibiteurs, permet ainsi d'analyser la spécificité et la fonction de ARF1 et de certaines de ses GEFs (Flisiak, Zeeh, Guibert, Cherfils, & Zeghouf, 2008).

ARF1 peut également former des homodimères via deux interfaces, soient les acides aminés 31 à 36 et 152 à 178, dans un système de levure *Saccharomyces cerevisiae* (Beck et al., 2008) (figure I-12). Il a été démontré que le mutant ARF1Y³⁵A (tyrosine en position 35 pour une alanine), bloque l'homodimérisation et l'activation d'ARF1. Cette mutation bloque la formation de bourgeonnement de vésicule au Golgi sans toutefois freiner le recrutement de coatomères aux membranes golgiennes. Le résidu 35 est important pour la survie des levures, mais il demeure à déterminer si c'est également le cas dans les cellules de mammifères.

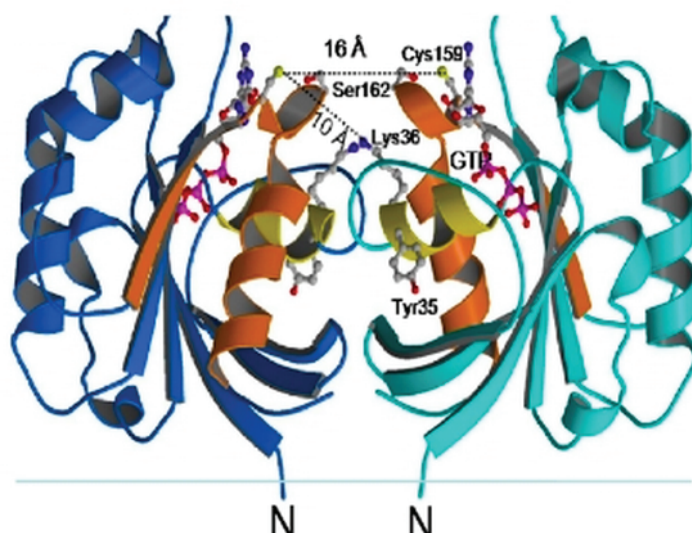


Figure I-12: Modélisation d'un dimère ARF1-GTP.

Ce modèle est basé sur la structure cristalline de monomère Arf1-GTP (Code PDB ID 1O3Y). Il représente un dimère vue de côté, par rapport au plan de la bicouche lipidique. Ici, on retrouve le résidu tyrosine en position 35, dont la mutation en alanine entraîne un phénotype de dimérisation. Les résidus reliés sont marqués par des lignes en pointillés, et leurs distances sont indiquées. L'interface coïncide avec le site de liaison de l'hélice N-terminal dans la poche hydrophobe et inclut un feuillet- β formé par les régions exposées de l'interswitch. Adapté de (Beck et al., 2008).

Dans ce manuscrit, nous avons principalement utilisé les mutants ARF1Q⁷¹L et ARF1T³¹N pour approfondir l'étude de l'importance de l'état d'activation d'ARF1, dans notre modèle. En s'ajoutant aux techniques de déplétion d'ARF1 par interférence à l'ARN, de criblages, d'inhibition par inhibiteurs, ces techniques ont permis de découvrir de nombreuses propriétés à la protéine ARF1. Les rôles les mieux caractérisés pour ARF 1 sont associés au trafic vésiculaire et au cancer.

1.4.2.4.3. ARF1 et le trafic vésiculaire

ARF1 est connue pour son rôle de régulateur du transport vésiculaire via l'enrobage des vésicules COPI (pour *coat protein*). ARF1 régule la sécrétion entre l'appareil de golgi et le réticulum endoplasmique (Pepperkok, Whitney, Gomez, & Kreis,

2000). Il existe deux types de vésicules qui interviennent dans le transport entre l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique, COPI et COPII et ARF1 est spécifique aux COPI. Localisée à la région *cisternae* de l'appareil de Golgi, elle régule le transport vésiculaire antérograde des protéines cargos sortant du réticulum endoplasmique en aidant l'enrobage des vésicules COPI (Pepperkok et al., 2000).

Dans les cellules normales, ARF1 joue un rôle important dans le fonctionnement et l'organisation Golgi. Lorsqu'ARF1-GTP est localisée aux membranes golgiennes, celle-ci stimule la production de PI(4,5)P2 par l'activation des PIPkinases, où ces dernières recrutent la Spectrine impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine (Fucini et al., 2000; Godi et al., 1998; D. H. Jones et al., 2000). De plus, ARF1 régule le recrutement de la cortactine qui va assurer l'assemblage du cytosquelette d'actine via les complexes Arp2/3 (pour *actin-related proteins 2 and 3*) impliquant les protéines WASP (pour *Wiskott-Aldrich syndrome protein*) et Cdc42 (pour *cell division cycle 42*) (J. L. Chen, Lacomis, Erdjument-Bromage, Tempst, & Stamnes, 2004; Matas, Martinez-Menarguez, & Egea, 2004). ARF1 régule également le recrutement de la dynamine-2 nécessaire à la fission des vésicules nouvellement sécrétées (J. L. Chen et al., 2004; Fucini, Chen, Sharma, Kessels, & Stamnes, 2002; Fucini et al., 2000).

ARF1 régule également le recrutement de clathrines dans la région *trans* du Golgi et des endosomes tardifs en recrutant les protéines adaptatrices AP1, AP3 et AP4, et la protéine d'enveloppe ubiquitaire GGA3 (pour *Golgi-localized γ -ear containing ARF-binding proteins 3*) (Bonifacino, 2004). AP1 et AP4 sont importantes pour le transport bidirectionnel entre le trans-Golgi et les endosomes et AP3 contrôle le transport entre les endosomes et les lysosomes (Bonifacino & Traub, 2003; Dell'Angelica, 2009; Hirst, Irving, & Borner, 2013). La protéine GGA3, en plus du recrutement de clathrines, contrôle le transport intra-cellulaire et le trafic à la membrane plasmique (Puertollano & Bonifacino, 2004). De plus, la GGA3 a été impliquée dans l'internalisation et le recyclage de certains récepteurs tyrosine kinase (Parachoniak, Luo, Abella, Keen, & Park, 2011).

Fait important seul la combinaison de la suppression d'ARF1 et d'ARF4 déclenche le désassemblage de l'appareil de Golgi, inhibant tout transport vésiculaire. En

effet, la suppression d'ARF1 avec ARF3 ou ARF5 n'entraîne pas la fragmentation du Golgi, mais l'inhibition du transport rétrograde dirigé vers le réticulum endoplasmique (Volpicelli-Daley, Li, Zhang, & Kahn, 2005). La suppression unique d'ARF1 dans les cellules, n'induit donc aucun effet sur le transport vésiculaire en raison de l'effet compensatoire maintenu entre les ARF de classe I et II (Volpicelli-Daley et al., 2005).

I.4.2.4.4. ARF1 et le cancer

Dans les cellules cancéreuses du sein (MDA-MB-231, SKBR3 (pour *Sloan-Kettering breast cancer cell line 3*), HCC70 (pour *human breast cancer cell line 70*), nous avons démontré que l'EGFR active ARF1 afin de réguler la prolifération et la migration cellulaire en affectant la voie PI3K (Boulay et al., 2008). De plus, nos résultats ont mis en évidence un rôle central pour les protéines adaptatrices p66Shc et Grb2 dans la régulation de l'activation d'ARF1 et d'ARF6 dans les cellules de cancer du sein invasif (Haines et al., 2014). Nous avons également montré qu'ARF1 régule la migration cellulaire des cellules cancéreuses du sein à travers l'interaction de Rac1 et IRSp53 (pour *insulin receptor substrate protein of 53 KDa*). En effet, ARF1 est responsable de l'adressage à la membrane plasmique de Rac1 et IRSp53, une étape essentielle à la formation de lamellipodes (Lewis-Saravalli, Campbell, & Claing, 2013). Nous avons apporté, de surcroît, la preuve physiologique et moléculaire directe pour le rôle de la protéine ARF1 dans le contrôle de la prolifération cellulaire. ARF1 régule la prolifération en induisant l'arrêt de la croissance et de la sénescence cellulaire par l'intermédiaire d'un mécanisme dépendant de la protéine du rétinoblastome (Rb). En effet, ARF1, grâce à sa capacité à réguler l'activité du complexe pRB / E2F1 (pour *E2F Transcription Factor 1*) ainsi que l'expression des gènes, augmente la prolifération et la progression du cancer du sein (Boulay et al., 2011). Pour finir, au laboratoire, nous avons montré un nouveau rôle pour ARF1 dans la médiation de la sensibilité à l'inhibition de l'EGFR. Nos données démontrent que la diminution de l'activation de cette GTPase pourrait améliorer l'efficacité thérapeutique des inhibiteurs de l'EGFR dans les cancers du sein (Haines, Schlienger, & Claing, 2015).

En plus des cancers du sein, l'expression d'ARF1 a été également associée à d'autres cancers. Des études réalisées dans les carcinomes ovariens humains *in vivo*, ont

montré que l'expression d'ARF1 était affectée par le traitement avec le composé antinéoplasique paclitaxel (Bani et al., 2004). De plus, dans un carcinome gastrique, en utilisant un anticorps non-spécifique uniquement à ARF1, soit reconnaissant ARF1, ARF3 et ARF6 (Epitomics, Burlingame, CA, USA) une corrélation de l'expression de ces 3 protéines avec la formation de métastases a été démontrée (Tsai et al., 2012). Toutefois, la présence d'ARF1 dans le cancer gastrique reste à reconfirmer avec un anticorps spécifique. Pour finir, des études ont montré qu'ARF1 pouvait également jouer un rôle potentiel sur l'invasion des cellules cancéreuses du pancréas. Suite à son activation par un autre récepteur de type tyrosine kinase, le ephrin-B1, ARF1 contrôle le transport de la collagénase MMP-8 du golgi à la membrane plasmique. L'ajout de BFA ou la surexpression du mutant dominant négatif ARF1T³¹N, suite à la stimulation du récepteur ephrin-B1, diminue la quantité de MMP-8 dans le milieu extracellulaire, sans affecter son expression. (Tanaka, Sasaki, Kamata, & Sakai, 2007).

1.4.2.5. ARF6

1.4.2.5.1. La distribution d'ARF6

ARF6 est localisée à la membrane plasmique et dans des compartiments de la région péricentriolaire, contrairement aux autres isoformes qui sont majoritairement distribuées au niveau de l'appareil de Golgi (Al-Awar, Radhakrishna, Powell, & Donaldson, 2000; F. D. Brown, Rozelle, Yin, Balla, & Donaldson, 2001; D'Souza-Schorey et al., 1998; C. Z. Yang, Heimberg, D'Souza-Schorey, Mueckler, & Stahl, 1998). ARF6 contrôle la synthèse de lipides ce qui explique sa présence à la périphérie de la cellule. ARF6 active la phospholipase D (PLD), produisant l'acide phosphatidique qui permet d'activer la phosphatidylinositol 4- phosphate 5-kinase (PIP5Kinase) (Honda et al., 1999). La PIP5Kinase effectue la synthèse de PI(4,5)P₂, un substrat universel et essentiel au maintien de la polarité cellulaire (Santy & Casanova, 2001).

ARF6 est impliquée dans plusieurs processus tels que la sécrétion des protéines membranaires, l'endocytose dépendante ou non des vésicules tapissées des puits de

clathrine, l'organisation du cytosquelette d'actine et la migration cellulaire (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006).

I.4.2.5.2. Rôle d'ARF6 dans l'endocytose

Grâce à son implication sur la synthèse des lipides, ARF6 joue un rôle sur l'endocytose de macromolécules provenant de l'environnement des cellules ou de la membrane plasmique. Les macromolécules internalisées sont transportées dans les endosomes puis au lysosome pour être dégradées ou recyclées vers la membrane plasmique ou le trans-Golgi (Besterman & Low, 1983; Soldati & Schliwa, 2006). ARF6 facilite l'internalisation de ligands dans les vésicules tapissées ou non de clathrine. En fait, ARF6 promeut l'endocytose par la voie des vésicules tapissées de clathrine en recrutant les protéines Nm23-H1 et/ou de la protéine adaptatrice AP-2. ARF6 permet également la dissociation des Arrestines pour faciliter l'internalisation des récepteurs. ARF6 est aussi importante pour la voie non-dépendante de clathrine et favorisée par l'inactivation de cette GTPase (F. D. Brown et al., 2001; Donaldson, 2003). Les RCPGs sont connus pour emprunter la voie des vésicules tapissées de clathrines (Claing et al., 2001; Garcia-Ranea & Valencia, 1998). Par exemple, il a été démontré que ARF6 joue sur l'endocytose du récepteur β 2-adrénergique. De plus, au laboratoire, nous avons établi que suivant l'activation des récepteurs, la forme active d'ARF6 favorise l'internalisation du récepteur AT1R (pour *Angiotensin II Type I Receptor*) et ce, autant de manière dépendante qu'indépendante de la voie des CCVs (Cotton et al., 2007). Il faut aussi savoir qu'ARF6 est présente dans les caveolae et permet l'internalisation de certains récepteurs tel que le récepteur muscarinique M2 (Ikeda et al., 2005). Ces vésicules convergent vers des compartiments communs et ARF6 contrôle recyclage endosomal (D'Souza-Schorey et al., 1998,).

I.4.2.5.3. Rôle d'ARF6 dans le remodelage du cytosquelette d'actine et l'adhésion

ARF6, grâce à son contrôle sur le trafic des endosomes et son rôle sur l'organisation du cytosquelette d'actine module plusieurs processus à la surface cellulaire. Elle est notamment impliquée dans la phagocytose, la formation des « *comet-tails* » sur

les endosomes, mais aussi la formation des pseudopodes et des ondulations membranaires, structures responsables du mouvement et de l'étalement (*spreading*) cellulaire participant à la migration cellulaire (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006). Ces processus dépendent de l'activation de la GTPase Rac1 par ARF6 (Boshans, Szanto, van Aelst, & D'Souza-Schorey, 2000; Cotton et al., 2007; Radhakrishna et al., 1999). Comme mentionné plus haut, les protéines ARF ont toutes la capacité d'activer la PIP5-kinase pour produire du PIP2, un phosphoinositide impliqué dans la polymérisation de l'actine et la formation des ruffles ou des fibres de stress, grâce à son interaction avec de nombreux partenaires de l'actine. Bien que toutes les protéines ARF peuvent activer la PIP5 kinase seule ARF6 se retrouve être colocalisée avec celle-ci.

ARF6 est impliquée dans le renouvellement de jonctions d'adhérence lors de la migration. Celles-ci permettent l'ancrage à de nouveaux points de contact et le détachement de l'arrière de la cellule. Il a été démontré qu'ARF6 contrôle l'adhésion, entre les cellules en régulant le trafic et la distribution spatiale de la E-cadhérine et à la matrice extracellulaire en régulant la distribution des intégrines $\beta 1$ (F. D. Brown et al., 2001; Palacios, Price, Schweitzer, Collard, & D'Souza-Schorey, 2001). De plus, au laboratoire, nous avons démontré qu'ARF6 module aussi la formation de points d'adhésions focaux en régulant la dynamique d'interaction FAK /GIT dans les cellules endothéliales (Daher, Noel, & Claing, 2008).

1.4.2.5.4. ARF6 et le cancer

Alors que le rôle d'ARF1 dans le développement du cancer du sein commence à être étudié, le rôle d'ARF6 dans la capacité invasive des cellules du cancer du sein est par contre mieux caractérisé. ARF6, l'isoforme classiquement associée à la membrane plasmique, régule la migration et l'invasion cellulaire en activant la voie des protéines kinases activatrice du mitogène (MAPK) (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006; Hashimoto, Hashimoto, et al., 2004). Des études récentes démontrent que l'alternance d'ARF6 entre sa forme active et inactive permet de réguler le potentiel invasif des cellules et que son expression corrèle avec leur capacité invasive (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006; Hashimoto, Hashimoto, et al., 2004; B. Hu et al., 2009; Muralidharan-Chari, Clancy, et al., 2009; Muralidharan-Chari, Hoover, et al., 2009; Tague,

Muralidharan, & D'Souza-Schorey, 2004). En effet, l'injection de cellules invasives de mélanome exprimant de manière stable la forme active d'ARF6, dans un modèle de souris athymique, diminue la capacité des cellules à métastaser ainsi que la taille des tumeurs primaires formées en sous-cutané (Muralidharan-Chari, Hoover, et al., 2009). D'autres études démontrent que GEP100, une GEF de ARF6, est exprimée dans 70% des carcinomes ductaux primaires et préférentiellement co-exprimée dans les tumeurs malignes EGFR positives (Morishige et al., 2008). De plus, il a été démontré que la GAP de ARF6, AMAP 1, est importante pour le développement métastatique *in vivo* (Onodera et al., 2005). ARF6 agit en régulateur clef, car il régule deux éléments majeurs associés à l'invasion soit, la formation d'invadopodes et la libération de microvésicules spécifiques appelées « shedding vesicles » (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006; Muralidharan-Chari, Clancy, et al., 2009). Plusieurs lignées cellulaires cancéreuses du côlon (SW480), du sein (MDA-MB-231) et d'adénocarcinome de la prostate (PC3) expriment ARF6 dans les microvésicules sécrétées (Muralidharan-Chari, Hoover, et al., 2009). Pour finir, ARF6 a également été associé à la récurrence du cancer du sein après une chirurgie d'ablation partielle de la région touchée du sein (Kinoshita et al., 2013).

Dans le cancer du sein, les isoformes ARF1 et ARF6 sont localisées à la membrane plasmique et contrôlent des processus majeurs associés au développement des cancers tels que la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire.

1.4.2.6. Les autres protéines ARF

Les autres isoformes des protéines ARF sont moins bien définies dans la littérature, mais certains éléments se rapprochent des fonctions de ARF1 et ARF6. En effet, ARF3 localisée au trans-Golgi et ARF4 localisée au niveau du compartiment intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et le Golgi (ERGIC), sont aussi importants pour l'intégrité et le recyclage des endosomes (Kondo et al., 2012; Manolea et al., 2010; Nakai et al., 2013). De plus, ARF4 et ARF5 localisées également au ERGIC, contrôlent la formation des mêmes vésicules dont ARF 1 contrôle le transport, soit la formation des vésicules COPI (Chun, Shapovalova, Dejgaard, Presley, & Melancon, 2008; Popoff et al., 2011).

ARF4 est l'isoforme la plus intéressante par rapport à la recherche sur le cancer. En effet, une étude a démontré qu'ARF4 peut directement interagir avec le récepteur à l'EGF suite à son activation (S. W. Kim et al., 2003). De plus, elle régule AP-1, une protéine essentielle des réponses génomiques induites par l'EGF dans les cellules 293T (Jang, Jang, & Ko, 2012). Dans les cellules de cancer du sein invasif, la déplétion d'ARF4 bloque la migration cellulaire induite par le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, un agent activateur de la protéine kinase C (PKC) et NF-κB) (Jang et al., 2012). Pour finir, dans les cellules de glioblastome, cette isoforme peut interagir avec Bax pour agir comme un anti-apoptotique et promouvoir la survie cellulaire (Woo et al., 2009).

I. 5. La migration

La migration cellulaire est un processus physiologique retrouvé lors de la morphogénèse des tissus pendant le développement embryonnaire. On la retrouve également impliquée dans d'autres processus physiologiques tels que, l'inflammation et la cicatrisation de plaie pour maintenir l'homéostasie (Schneider & Haugh, 2006) (Dormann & Weijer, 2003). Durant la réponse immunitaire, certains types cellulaires tels que les lymphocytes, les macrophages et les fibroblastes continueront à se déplacer. Malheureusement, un dérèglement de ce mécanisme peut être source de pathologies et jouer de façon majeure sur la progression des cancers (Condeelis, Singer, & Segall, 2005). Les cellules peuvent donc effectuer leur migration avec ou sans substrat d'attachement, en milieu solide ou en milieu liquide respectivement. Nous nous intéressons principalement à la migration associée à l'adhésion à la matrice extracellulaire, utilisés par les cellules cancéreuses pour migrer d'un site primaire vers un site secondaire (Condeelis et al., 2005). Elles avancent grâce à des cycles d'extension et de contraction du cytoplasme qui déforme la membrane plasmique, en voici les grandes lignes.

I.5.1 Les grandes étapes de la migration

La migration cellulaire est un mécanisme cyclique, qui fait appel à la réorganisation du cytosquelette d'actine. Il peut être divisé en plusieurs étapes (figure I-13).

Tout d'abord, suite à un stimulus, la cellule va se polariser. Le gradient de concentration de chimio-attractant présent dans le milieu extracellulaire, va moduler la polarité de la cellule pour définir ainsi son orientation. La polarité de la cellule est régulée principalement par PTEN située à l'arrière et sur les faces latérales de la cellule et par Cdc42 distribuée à l'avant (Devreotes & Janetopoulos, 2003; Merlot & Firtel, 2003). Il n'est pas étonnant que la voie PI3K joue une grande importance dans ce mécanisme. Située au front de migration à l'avant de la cellule dans la région d'extension, elle permet la synthèse des phospholipides membranaires. Les phospholipides PIP2 et PIP3, en réponse à un agent chimio-attractant vont se polariser pour activer la polarisation et la formation des protrusions, dites lamellipodes, en régulant l'activité des Rho GTPases (Cain & Ridley, 2009).

La famille des Rho GTPases joue un rôle important dans la dynamique du cytosquelette d'actine. Les Rho GTPases sont impliquées dans la migration et dans les processus tels que l'adhésion cellulaire, la polarité et la motilité (Bouzahzah et al., 2001; Burbelo, Wellstein, & Pestell, 2004; Sahai & Marshall, 2002). En effet, le substrat de Ras relié à la C3 toxine botulique 1 (Rac1) est connu pour réguler différentes voies de signalisation qui affectent la formation des lamellipodes, et la migration cellulaire (Nobes & Hall, 1999; Small, Stradal, Vignal, & Rottner, 2002). Rac1 coopère avec la verproline de la famille des protéines du syndrome Wiskott-Aldrich (WAVE) pour activer le substrat p53 du récepteur tyrosine kinase à l'insuline (IRSp53). Ce complexe se lie aux filaments d'actine préexistants et agit à titre de site de nucléation pour la formation d'un nouveau réseau de filaments d'actine ramifiés (Goley & Welch, 2006; Takenawa & Suetsugu, 2007). La formation des lamellipodes se fait donc via l'axe signalétique RAC/WAVE/ARP2/3 (Cain & Ridley, 2009). Au laboratoire, nous avons découvert que suite à la stimulation à l'EGF, la petite GTPase ARF1 est nécessaire à la formation de ces structures en contrôlant la voie PI3K, mais aussi en contrôlant la formation du complexe Rac1/IRSp53 (Boulay et al., 2008; Lewis-Saravalli et al., 2013).

Suite à la formation du lamellipode, la cellule va mettre en place des points d'adhésion à l'avant de la cellule, pour permettre sa liaison aux protéines de la matrice extracellulaire (Lauffenburger & Horwitz, 1996). Ces points d'adhésion vont stabiliser la liaison à la matrice extracellulaire, tout en jouant de point d'ancrage pour les forces

contractiles qui vont ramener en avant le reste du corps cellulaire (Lauffenburger & Horwitz, 1996). Les points d'adhésions focaux sont dynamiques et mûrissent en complexes plus stables et étendus, au fur et à mesure que le mouvement en avant de la cellule progresse.

Lors de l'étape suivante, le corps cellulaire va se contracter et l'ensemble du corps cellulaire pourra se déplacer vers l'avant. Le processus par lequel la cellule rétracte son corps cellulaire vers l'avant est dépendant de l'actomyosine (Balaban et al., 2001). Il va s'en suivre le détachement de l'arrière de la cellule (Ridley et al., 2003). Le détachement des adhésions focales libère la cellule qui pourra recommencer les étapes de migration.

La migration est un processus cyclique, qui fait appel à un recyclage constant des protéines d'adhésion (Ridley et al., 2003). Dans notre étude, nous nous intéressons donc tout particulièrement à l'adhésion, l'un des trois processus biologiques majeurs liés à la migration cellulaire.

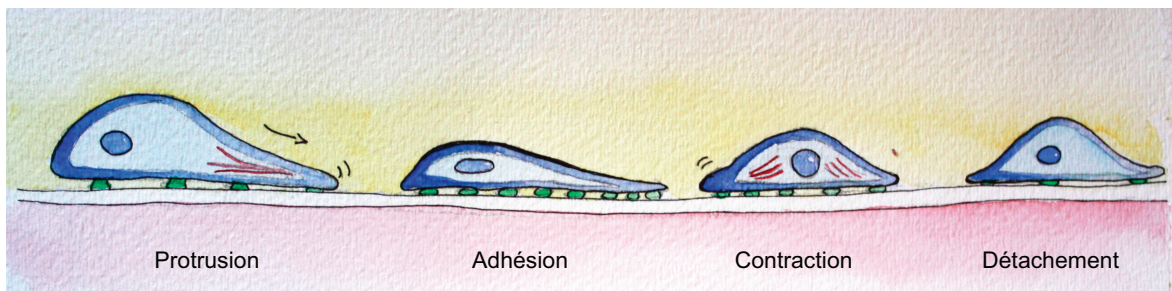


Figure I-13: La migration cellulaire.

La migration cellulaire est un processus cyclique. Suite à un stimulus externe, la cellule se polarise et génère la formation d'une protrusion en direction de l'agent chimio-attractant. La cellule formera plusieurs points d'adhésion tout le long du corps cellulaire, qui serviront de points de traction. La cellule va ensuite se déplacer à l'avant en se contractant. Cela permet aux points d'adhésion en arrière de la cellule de se désassembler et ainsi de créer un mouvement. Inspiré de (Ridley et al., 2003)

I.5.2 L'adhésion

I.5.1.2.1. Formation des complexes d'adhésion focale

La migration cellulaire nécessite l'interaction dynamique entre la cellule et la matrice extracellulaire sur laquelle elle est fixée. Les points focaux d'adhésion se forment principalement dans la zone de formation du lamellipode, aux extrémités des fibres d'actinomyosine. Les points d'adhésion naissent de l'agrégation de protéines transmembranaires, les intégrines. Une fois activées, les intégrines induisent le recrutement des protéines adaptatrices qui assurent la transduction signalétique nécessaire au maintien des interactions cellule-matrice extracellulaire.

Les intégrines constituent les principaux récepteurs transmembranaires qui assurent les interactions dynamiques entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette de la cellule en mouvement (Huttenlocher & Horwitz, 2011). Des études dans des cellules de cancer du sein humain ont révélé le rôle clef de l'intégrine $\beta 1$ dans la régulation des fonctions cellulaires associées à la progression tumorales (Desgrosellier & Cheresch, 2010). Une étape nécessaire pour former les sites d'adhésion est le recyclage de l'intégrine $\beta 1$. Ce recyclage est notamment sous le contrôle de deux GTPases, ARF6 et Rab 11 (Powelka et al., 2004). C'est pourquoi dans nos travaux, nous nous intéressons spécifiquement à cette intégrine.

Au sein du complexe d'adhérence, on retrouve la kinase d'adhésion focales FAK (focal adhesion kinase), une protéine cytoplasmique ubiquitaire. Elle est initialement activée par l'intermédiaire des récepteurs intégrines et/ou de facteurs de croissance, cytokines et hormones. Cette activation va permettre la liaison et l'activation de plusieurs protéines. Plus de 150 protéines ont été associées avec les points d'adhésion (Huttenlocher & Horwitz, 2011). On retrouve parmi les protéines de ces complexes, les protéines du cytosquelette telles que l'actine, la paxilline, la taline, et des protéines participant au remaniement du cytosquelette telles que la PI3-kinase. L'ensemble de ces protéines forme ainsi de larges structures sous-membranaires permettant l'adhésion (figure I-14). La protéine FAK se retrouve donc au cœur du système régulateur

impliquant l'adhérence à la matrice extracellulaire, indispensable pour la migration, la survie et la prolifération cellulaire.

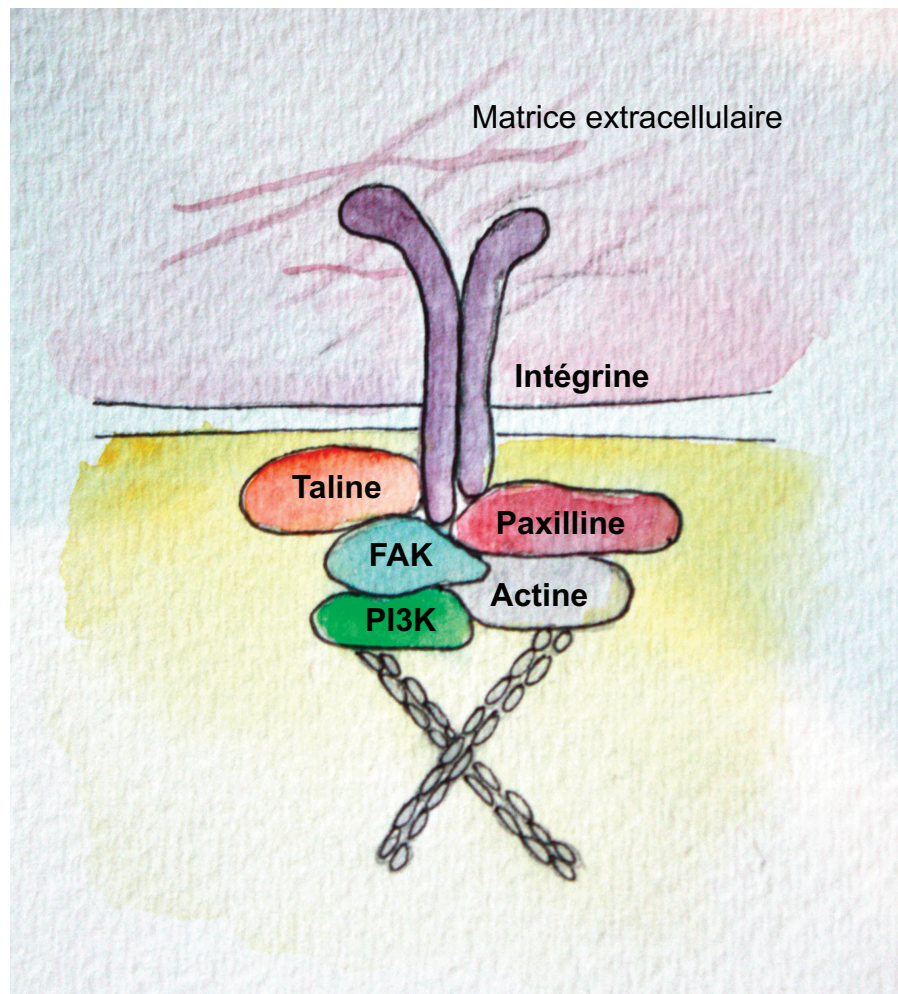


Figure I-14: Le complexe d'adhérence focale.

La protéine FAK est l'un des points centraux du complexe d'adhérence. Elle permet la connexion des intégrines ou des récepteurs aux facteurs de croissances avec les autres protéines du complexe comme la taline, la paxilline. Cela permet la liaison et l'activation de plusieurs protéines comme la PI3K, qui participe au remaniement du cytosquelette d'actine. Il se produira une restructuration et déstructuration des complexes d'adhérences permettant un cycle de migration et d'adhérence cellulaire. Inspiré de (Cornillon, Campos, & Guyotat, 2003).

1.5.1.2.2. La protéine FAK

La protéine FAK est retrouvée dans de nombreuses lignées cellulaires ainsi que dans la plupart des tissus. Elle est également surexprimée dans différentes lignées cancéreuses et participe ainsi aux processus de cancérogenèse (Nakagawa, Sogo, Hioki, Tokunaga, & Taketani, 1998). C'est une protéine de haut poids moléculaire dont la structure est très conservée au sein des espèces (Cornillon et al., 2003; Kume, Nishiura, Suda, & Suda, 1997).

- Structure et activation de la protéine FAK

La protéine FAK est composée de trois domaines, dont un domaine amino-terminal, un domaine carboxy-terminal et un domaine catalytique. La partie amino-terminale est faite d'un domaine FERM (pour protéine 4.1, ezrine, radixine et moésine), homologue à celui présent dans les protéines ERM (ezrine, radixine, moésine) qui permet l'association de FAK avec les récepteurs de facteurs de croissance. Suite à l'activation de l'EGFR, et/ou des intégrines, FAK est recrutée aux intégrines, indirectement par l'interaction de son domaine C-terminal via les protéines paxillin et talin (Sieg et al., 2000). La région FAT, en carboxy-terminal, sera donc nécessaire à la localisation de FAK dans le complexe d'adhérence (H. C. Chen et al., 1995). Pour finir, on retrouve de domaine catalytique kinase, qui contrôlera l'activation et l'activité de la protéine (Lal et al., 2009). L'activation de FAK va permettre tout d'abord son autophosphorylation sur le résidu tyrosine 397 libérant un site de liaison pour la protéine c-Src (Polte & Hanks, 1997). Une mutation au niveau de ce résidu entraîne l'incapacité pour FAK d'avoir une activité biologique. Les autres résidus tyrosines de FAK, dont la Tyrosine 861, vont être transphosphorylés par les membres de la famille de c-Src (Schlaepfer & Hunter, 1997) (Sieg, Hauck, & Schlaepfer, 1999). FAK devient alors le point d'ancrage principal des points d'adhésions focaux (Sieg et al., 2000). Suite à la phosphorylation de ces sites, plusieurs protéines comprenant des motifs SH2 et SH3 interagiront avec FAK et transmettront ses signaux pour activer les voies de signalisation telle que Erk/MAPK et PI3K (Polte & Hanks, 1997; Reiske et al., 1999; Schlaepfer & Hunter, 1997).

- FAK et les Rho GTPases.

FAK module l'assemblage et le désassemblage des points d'adhésion focaux (Ilic et al., 1995). La kinase FAK semble moduler l'activation de plusieurs Rho GEF et Rho GAP. En effet, FAK module la formation des lamellipodes en contrôlant l'activation de RhoA via p190RhoGAP, qui module la contractilité des filaments d'actine (Tomar, Lim, Lim, & Schlaepfer, 2009). De plus, grâce au recrutement du régulateur de GTPases Graf (GTPase regulator associated with FAK), FAK peut inhiber l'activité des Rho GTPases pour réguler le turnover des point d'adhésions focaux (Schaller, 2001). FAK activée permet également la liaison également de protéines GAP pour des ARF telles que GIT et ASAP1 qui réduisent l'adhérence et la formation des complexes d'adhérence (Y. Liu, Loijens, Martin, Karginov, & Parsons, 2002; Randazzo et al., 2000; Z. S. Zhao, Manser, Loo, & Lim, 2000).

De plus, FAK peut à son tour être régulée par des GTPases. En effet, nous avons démontré que la réduction de l'expression la GTPase ARF6 verrouille FAK dans un état d'activation constitutive. ARF6 régule à la fois la phosphorylation de FAK et son association avec Src. Cela conduit à une augmentation de la phosphorylation de FAK et à son association constitutive avec Src. Dans ces conditions, l'ARF GAP GIT1 ne peut plus être recrutée à FAK, ce qui entraîne le désassemblage des complexes d'adhésion focaux et affecte la motilité des cellules endothéliales (Daher et al., 2008). Pour la GTPase ARF1, seul un rôle sur le recrutement de la paxillin aux complexes d'adhésion focaux a été démontré dans les fibroblastes suisses 3T3 (Norman et al., 1998). Le mécanisme détaillé par lequel ARF1 régleme l'adhésion reste inconnu et nous nous intéresserons dans notre étude à son rôle physiologique dans les cellules de cancer du sein invasif.

Grâce à une étude approfondie des mécanismes régulant l'adhésion, nous obtiendrons de nouvelles informations sur le fonctionnement des cellules tumorales. Cela aidera à comprendre comment elles deviennent mobiles et contribuent ainsi à la progression et à l'invasion des tissus environnants.

I. 6. L'invasion

Les cellules cancéreuses qui deviennent envahissantes peuvent diffuser à des sites secondaires et former des métastases. L'invasion cellulaire définit la capacité des cellules à devenir mobiles pour traverser la matrice extracellulaire et s'infiltrer dans un tissu ou dans les tissus environnants. C'est un processus clef pour la progression tumorale et il est lié à la migration cellulaire. Les cellules peuvent se déplacer de façon isolé, en chaîne ou en groupe. Si les mécanismes cellulaires et moléculaires de migration en chaîne et en groupe ne sont pas encore connus en détail, on en sait davantage sur la migration des cellules isolées (Friedl & Brocker, 2000; Hegerfeldt, Tusch, Brocker, & Friedl, 2002). Il existe plusieurs modes d'invasion, soit l'invasion associée à la migration mésenchymale et l'invasion associée la migration amiboïde. Tout d'abord, l'invasion associée à la migration mésenchymale fait appel à la formation de structures spécifiques telles que les invadopodes et certaines microvésicules libérant des enzymes de dégradation de la MEC et provoquant la protéolyse de la matrice péri-cellulaire (Murphy & Gavrilovic, 1999). Si ces protéases matricielles sont inhibées, les cellules tumorales évoluent, par un processus d'adaptation significatif, vers un mouvement amiboïde non protéolytique. On parle de transition mésenchymateuse-amiboïde (Coussens, Fingleton, & Matrisian, 2002; Wolf et al., 2003). Les cellules n'ont pas besoin de dégrader la matrice extracellulaire par protéolyse et la traversent grâce à la contraction de leur cytosquelette d'actine. Les cellules stromales à migration lente, comme les fibroblastes ou les cellules des tumeurs solides, développent une morphologie allongée en forme de fuseau et nécessitent un haut degré d'adhérence par les intégrines et de génération de force (Wilkinson et al., 2005; Wolf et al., 2003; Wyckoff et al., 2006). Nous nous intéressons principalement au premier type d'invasion qui implique la dégradation de la matrice extracellulaire. C'est pourquoi seul les acteurs de ce premier type d'invasion seront présentés dans la section qui suit, mais tout d'abord, il est important de comprendre brièvement de quoi se compose la matrice extracellulaire (MEC) et comment les cellules deviennent invasives.

I.6.1 La matrice extracellulaire

Dans de nombreux tissus tels que les tissus de type glandulaire, stratifié ou certains épithéliums, la MEC est formée par une membrane basale reliée aux cellules épithéliales et une matrice extracellulaire interstitielle (MECI) (Barber, Esteban-Pretel, Marin, & Timoneda, 2014; Timpl & Brown, 1996).

La membrane basale permet de séparer les cellules épithéliales de la matrice extracellulaire (figure I-15). C'est une structure hautement spécialisée, composée de glycoprotéines de type laminines ou fibronectine, de collagène de type IV, VII et XVII, de protéoglycans perlecan, agrine et de nidogène-1 et 2 (Timpl & Brown, 1996). Les cellules adoptent une polarité apico-basale et interagissent avec les composants de la membrane basale par le biais de récepteurs de surface cellulaire spécifiques, les intégrines. Les intégrines peuvent s'associer à divers ligands grâce à leur motif RGD (Arg-Gly-Asp). Ces interactions permettent ainsi d'établir une stabilité de contact entre la cellule et la membrane basale. Les intégrines $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha6\beta4$ et $\alpha v\beta3$ 47 constituent des récepteurs aux laminines, tandis que les intégrines $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha10\beta1$ et $\alpha11\beta1$ constituent des récepteurs au collagène (Margadant, Monsuur, Norman, & Sonnenberg, 2011). Cette association ligands-intégrines induit l'activation d'autres récepteurs cellulaires tels que les récepteurs de types tyrosine kinase comme l'EGFR. La transduction du signal est activée par ces récepteurs et déclenche des réponses biologiques telles que l'adhésion, la migration, la protéolyse, et l'angiogenèse. L'agrine et le perlecan fournissent des connexions supplémentaires entre la membrane basale et la surface de la cellule. Les collagènes VII, XV et XVIII, quant à eux, vont permettre la liaison avec la MECI adjacente. La MECI, qui représente la plus grande partie de la matrice, se compose de protéines structurelles telles que de collagène fibrillaire de type I, II, III et V, d'élastine, de polysaccharides hyaluronan et de protéoglycan aggrecan (Barber et al., 2014).

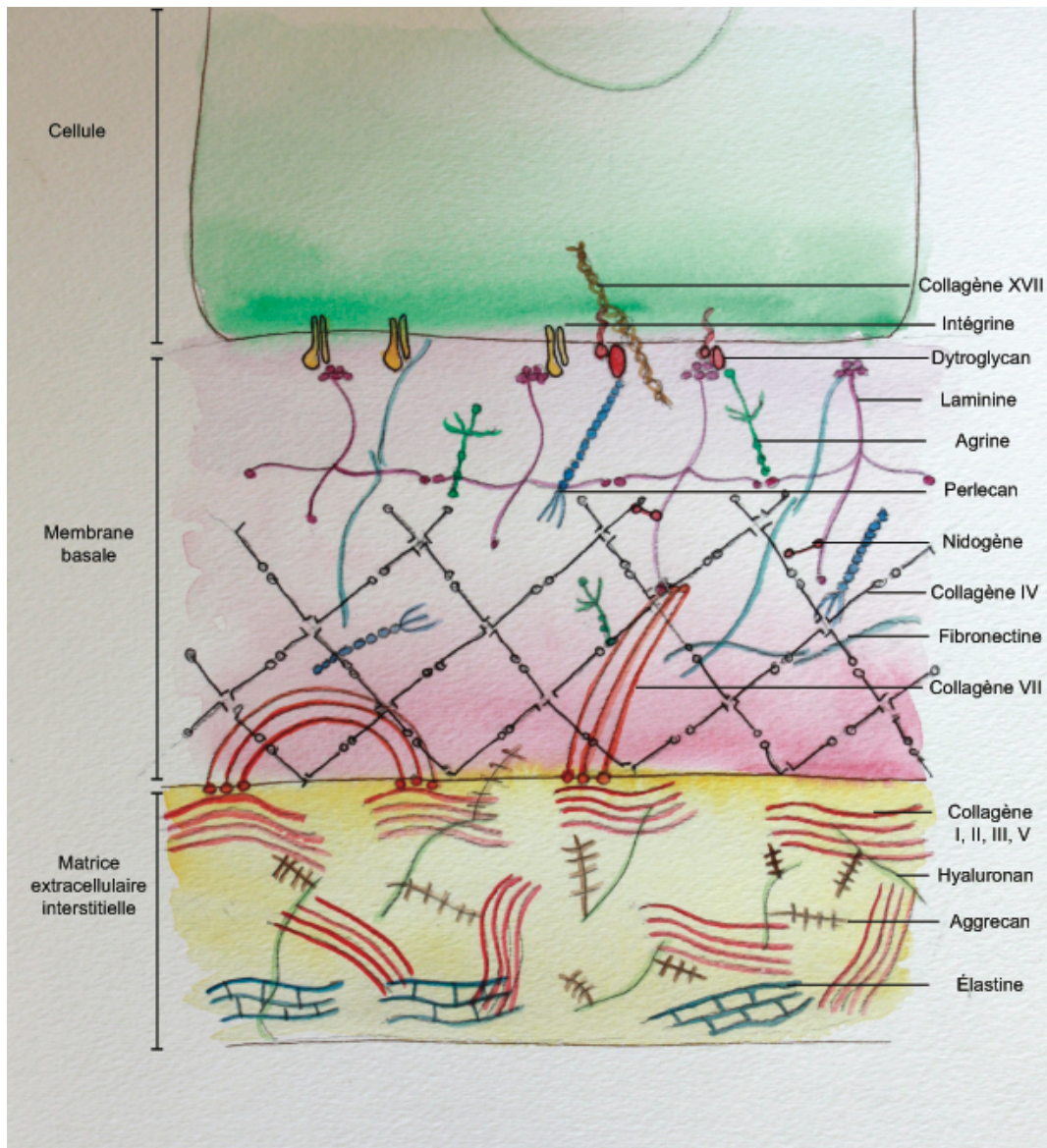


Figure I-15: Modèle schématique de la matrice extracellulaire.

La matrice extracellulaire, dans de nombreux tissus, est formée par une membrane basale et une matrice extracellulaire interstitielle. La membrane basale se compose d'un réseau de glycoprotéines de type laminines ou fibronectine, de collagène de type IV, VII et XVII, de protéoglycans perlecan, agrine et de nidogène-1 et 2. La matrice extracellulaire interstitielle, qui représente la plus grande partie de la matrice, se compose de protéines structurales telles que de collagène fibrillaire de type I, II, III et V, d'élastine, de polysaccharides hyaluronan et de protéoglycan aggrecan. Pour des raisons de clarté, seul le collagène VII qui peut interagir avec la fibronectine, la laminine, le collagène I et le collagène IV, et former des fibrilles d'ancrage, est représenté dans la figure. Le contact cellule-membrane basale est assuré par le biais de récepteurs de surface cellulaire spécifiques, les intégrines. Inspiré de (Barber et al., 2014).

I.6.2 La transition épithélio-mésenchymateuse

I.6.2.1. Généralités

La transition épithéliale-mésenchymateuse ou TEM est un processus biologique nécessaire lors du développement embryonnaire pour la gastrulation, la formation des crêtes neurales et la formation des valves cardiaques (J. Lim & Thiery, 2012; Rivera-Feliciano et al., 2006). Elle est également importante pour le remodelage tissulaire lors du processus de réparation des tissus. Lors de ce processus, les cellules épithéliales subissent une perte de leur polarité entraînant un changement morphologique vers un type mésenchymateux ou fibroblastoïde. Cependant, un dérèglement de la TEM peut déclencher des processus pathologiques et est impliqué dans le développement de fibroses et de cancers (Kalluri & Weinberg, 2009; Zeisberg & Kalluri, 2013). La TEM est donc divisée en trois types, en fonction du contexte physiologique des tissus (Kalluri & Weinberg, 2009) (figure I-16). Le type 1 se produit dans l'embryogenèse et le développement des organes, le type 2 est important pour la régénération des tissus et la fibrose et le type 3 est associée aux propriétés des cellules souches et à la progression du cancer (Chaffer, Thompson, & Williams, 2007; J. Lim & Thiery, 2012; Zeisberg & Kalluri, 2013). Dans les cancers, la transition épithélio-mésenchymateuse permet le passage d'un carcinome in situ à un carcinome invasif. À l'opposé des cellules normales, les cellules tumorales se détachent et dégradent aisément la membrane basale, en plus de poursuivre le processus de dégradation jusqu'à la néo-vascularisation. Les cellules qui ont subi la TEM acquièrent également une résistance à la sénescence et l'apoptose (Childs, Baker, Kirkland, Campisi, & van Deursen, 2014).

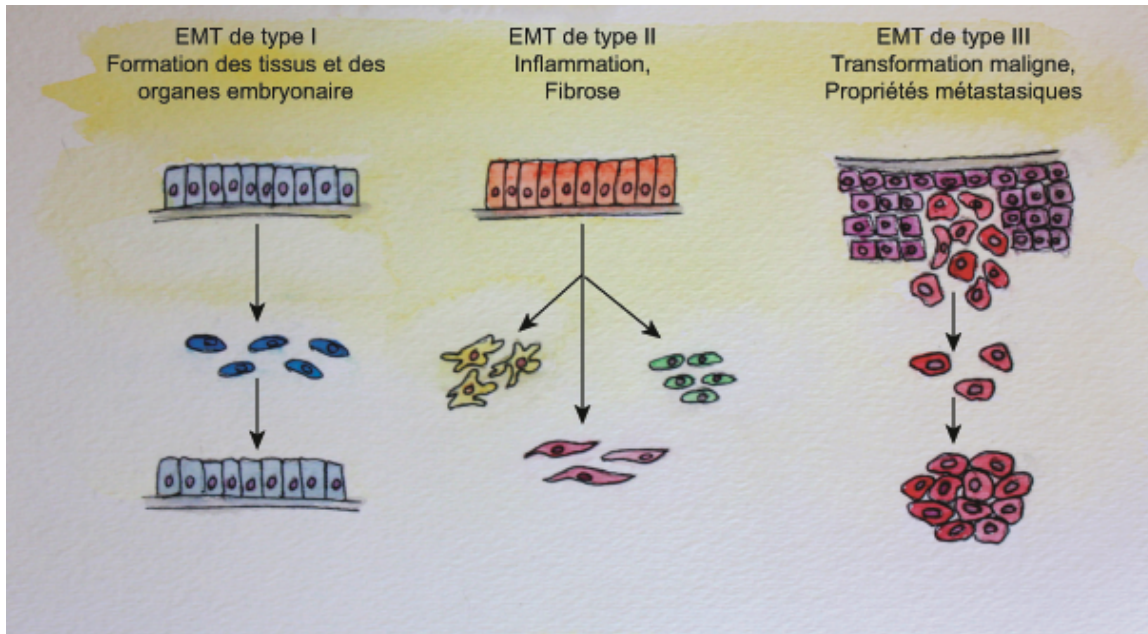


Figure I-16: Les différents types de transition épithélio-mésenchymateuse.

La TEM de type 1 est associée à l'implantation embryonnaire et la formation des organes. Elle peut être subdivisée en plusieurs vagues successives de TEM-TME (transition mésenchymateuses à épithéliale) (primaire, secondaire, tertiaire) conduisant à la formation de l'organe définitif. La TEM de type 1 suit un programme de restriction spatiale et temporel. La TEM de type 2 est associée à l'inflammation et à la fibrose. La TEM de type 3 est impliquée dans la transformation maligne des cellules et l'acquisition de propriétés cellulaires métastatiques. Inspiré de (Kovacic, Mercader, Torres, Boehm, & Fuster, 2012).

Ce point ne sera pas détaillé, mais il faut également savoir que, suite à la diffusion des cellules cancéreuses vers un site voisin, elles peuvent regagner un état épithélial, grâce à la transition mésenchymateuse-épithéliale (TME) (Hanahan & Weinberg, 2011). Les mécanismes mis en action lors de la TME sont très semblables à la TEM et se produisent de manière inversée. Cela conduira ultimement à la formation de cancers secondaires avec des phénotypes similaires aux tumeurs primaires (Hanahan & Weinberg, 2011). Des cycles de TEM/TME sont aussi présents au cours du développement (Chaffer et al., 2007; J. Lim & Thiery, 2012).

1.6.2.2. Induction et effecteurs de la TEM

La TEM est sous le contrôle de divers facteurs, notamment du microenvironnement et des signaux hétérotopiques provenant du stroma remanié. Elle est également sous le contrôle de nombreux facteurs de transcriptions embryonnaires. On parle des facteurs Snail, Slug, Twist, gooseoid, SIP-1, ZEB1, FOXC2, 2EB1 et E47/EA2 (De Craene & Berx, 2013).

De nombreux effecteurs influencent la TEM tels que la matrice extracellulaire, les cytokines et les facteurs de croissance. La matrice extracellulaire via les intégrines, peut activer la TEM. En effet, les intégrines activent la voie ILK (pour *integrin-linked kinase*) /AKT pour inhiber la GSK3 β (pour *glycogen synthase kinase 3 beta*) qui inhibe certains facteurs de transcriptions de la TEM. Dans un même ordre d'idée, on retrouve les cytokines telles que l'interleukine-6 (IL-6). Au cours de l'inflammation et le cancer, l'IL-6 active la voie JAK (pour *Janus kinase*) / STAT3 (pour *signal transducer and activator of transcription 3*) pour induire l'expression du facteurs de transcription Snail1 (Sullivan et al., 2009). L'hypoxie générée dans l'environnement de la tumeur active le facteur hypoxique HIF1 α (pour *hypoxia-inducible factor-1 alpha*) pour activer, cette fois-ci, l'expression du facteurs de transcription Twist (M. H. Yang et al., 2008). Plusieurs facteurs de croissance qui agissent par l'intermédiaire des récepteurs tyrosine kinases (RTK) peuvent induire la TEM, notamment le facteur de croissance épidermique EGF, le facteur de croissance des fibroblastes FGF, le facteur de croissance des hépatocytes HGF et facteur de croissance vasculaire endothélial VEGF (Ahmed et al., 2006; Billottet et al., 2008; Wanami, Chen, Peiro, Garcia de Herreros, & Bachelder, 2008). La cascade de signalisation RAS-RAF-MEK (pour *MAP ERK kinase*)-ERK (pour *extracellular-regulated kinase*) MAPK représente une voie majeure activée par les RTK en réponse à des facteurs de croissance. Une fois actives, ERK1 et ERK2 MAPK peuvent faciliter TEM en augmentant l'expression de facteurs de transcription et des régulateurs de la motilité et l'invasion cellulaire. Les facteurs de croissance TGF (pour *transforming growth factor*) induisent aussi la TEM. Tout spécialement le TGF β , qui active les voies PI3K/AKT, ERK MAPK, p38 MAPK et JNK (pour *c-Jun N-terminal kinase*). D'autres voies de signalisation telles que la voie Wnt, Notch et Hedgehog (HH) participent

également à la TEM (Briscoe & Therond, 2013; Timmerman et al., 2004; Yook et al., 2006).

Pour que les cellules puissent passer d'un phénotype épithélial à mésenchymateux, elles doivent subir la réorganisation de nombreux marqueurs.

1.6.2.3. Perte et acquisition de marqueurs

La TEM commence par une perte de la polarité apico-basale des cellules épithéliales. Ce, en raison du désassemblage des jonctions serrées par la perte des claudines et des occludines. Puis la TEM s'accompagne du désassemblage des jonctions d'adhésion, des jonctions gap et des desmosomes.

Brièvement, les jonctions serrées sont des complexes de protéines d'adhérence formées entre l'épithélium adjacent ou entre les cellules endothéliales. Elles sont composées de protéines membranaires comprenant les claudines et occludine, et les protéines cytoplasmiques zonula occludens 1 (ZO1), ZO2, ZO3 qui lient les protéines transmembranaires au cytosquelette d'actine et aux protéines de signalisation (R. Y. Huang, Guilford, & Thiery, 2012). Les jonctions d'adhérence lient les cellules entre elles, en fournissant des interactions homophiles entre les molécules de cadhérine épithéliale (E-cadhérine) (Yilmaz & Christofori, 2009). Les protéines cytoplasmique β -caténine et p120 caténine s'associent avec la E-cadhérine pour lier le cytosquelette d'actine grâce à l' α -caténine (Kourtidis, Ngok, & Anastasiadis, 2013; Niehrs, 2012). Les desmosomes maintiennent les cellules entre elles via leur côté latéral. La cadhérine desmosomale, les desmoglénines et les desmocollines s'associent avec les plakoglobins et plakophilins en dessous de la membrane plasmique pour se connecter aux filaments intermédiaires via la desmoplakine (R. Y. Huang et al., 2012; Yilmaz & Christofori, 2009). Pour finir, les jonctions gap, sont des complexes de protéines qui relient les cellules voisines entre elles et permettent le passage d'ions et de petites molécules par des héli-canaux formés par des hexamères de connexine (Bax et al., 2011).

Au cours du passage de carcinome in situ à carcinome invasif, il se produit donc un remplacement des marqueurs épithéliaux par des marqueurs mésenchymateux, ce qui engendre une restructuration de la membrane basale. Les protéines de surface qui sont

importantes pour contrôler les interactions intercellulaires, telles que la cadhérine-E, les et les intégrines, sont remplacées par d'autres protéines telles que la cadhérine-N (Cavallaro & Christofori, 2004). La cadhérine-E localisée à la membrane plasmique des cellules endothéliales est retrouvée en complexe avec la β -caténine et l' α -caténine. Cependant, suite à la perte de la cadhérine-E, la β -caténine est libérée et transloque au noyau pour activer les facteurs de transcriptions de la TEM (Kourtidis et al., 2013; Niehrs, 2012).

Subséquentement, contrairement aux cellules normales qui expriment des hauts niveaux d'intégrines $\alpha 6\beta 4$, $\alpha v\beta 6$, et $\alpha v\beta 3$, les tumeurs expriment plutôt les intégrines d' $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$ où ces dernières favorisent l'invasion et la prolifération (Keely, 2011; Maschler et al., 2005). Le cytosquelette d'actine se réorganise, l'actine en périphérie est remplacée par les fibres de stress et les filaments intermédiaires de cytokératines sont remplacés par la vimentine à la périphérie du noyau (Micalizzi, Farabaugh, & Ford, 2010).

L'architecture des cellules s'étant réorganisée, celles-ci ont ainsi acquis de la motilité en formant des lamellipodes et des filopodes. De plus, elles ont acquis des capacités invasives et peuvent maintenant former des invadopodes et des microvésicules, tout en exprimant les métalloprotéinases matricielles pour dégrader la matrice extracellulaire.

I.6.3 Les invadopodes

I.6.3.1. Structure et généralités

L'invasion des cellules cancéreuses dans les tissus dépend de leur capacité à franchir la membrane basale et à migrer à travers la MEC. La formation d'invadopodes est une étape clef du processus d'invasion des cellules cancéreuses. Ces protubérances de la membrane plasmique sont riches en actine, cortactine, dynamine et phosphotyrosine. Elles sont localisées à proximité de l'appareil de Golgi et s'étendent dans la MEC (figure I-17). Doté d'une forte activité protéolytique, ce type de structure est fréquemment observé dans les cellules cancéreuses métastatiques qui envahissent les tissus environnants (Buccione, Orth, & McNiven, 2004). Le clivage protéolytique de la MEC

implique de nombreuses protéases, notamment les métalloprotéinases. Les substrats ciblés de la MEC sont principalement la gélatine, le collagène de type I et IV et la laminine (T. Kelly et al., 1998).

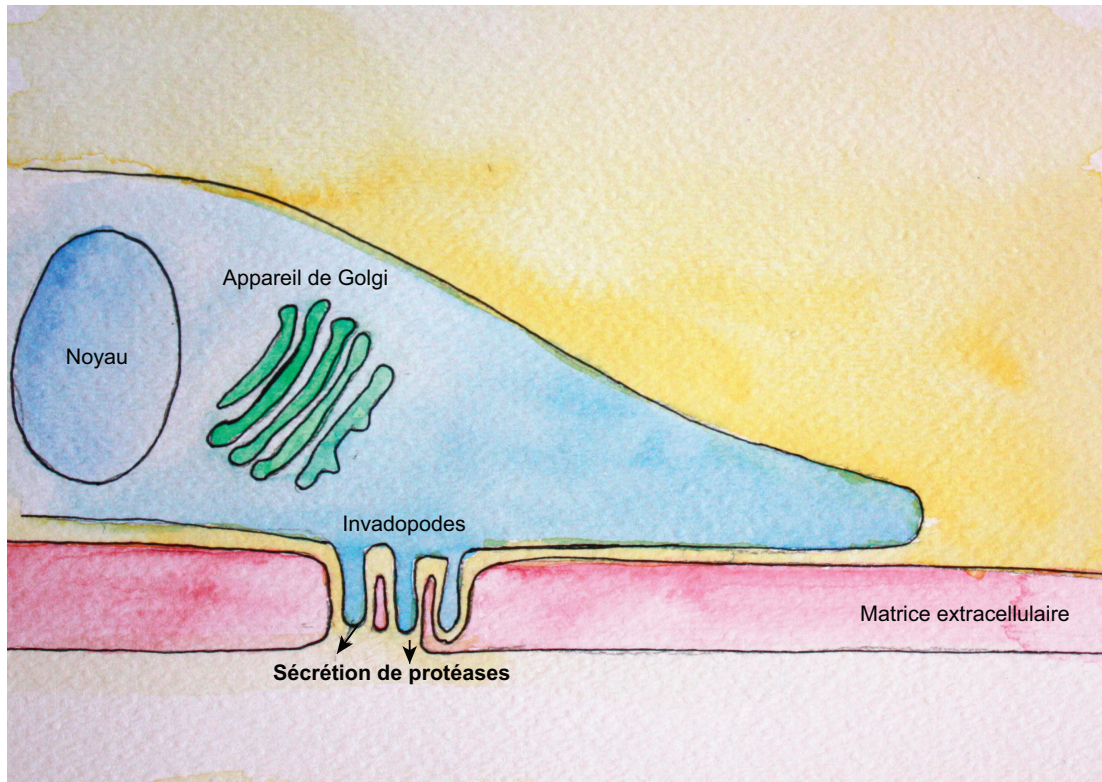


Figure I-17: Description schématique des invadopodes.

Les invadopodes sont des invaginations profondes de la surface ventrale de la membrane plasmique. Ils sont en relations spatiales avec le noyau et l'appareil de Golgi. Grâce aux métalloprotéinases qu'ils sécrètent, ils dégradent la matrice extracellulaire. Inspiré de (Buccione et al., 2004)

On associe les invadopodes aux cellules cancéreuses, mais on en retrouve également dans les fibroblastes transformés pour la protéine src (Linder, 2007). Ces invaginations ventrales de la membrane plasmique oscillent entre 8 μM de largeur et 5 μM de hauteur. On en retrouve en moyenne entre 1 à 10 par cellule et leur durée de vie est d'un peu plus de deux heures (Yamaguchi, Pixley, & Condeelis, 2006).

1.6.3.2. Initiation et maturation des invadopodes

1.6.3.2.1. La biogénese des invadopodes

La formation d'invadopodes ou de podosomes se fait suivant un mécanisme séquentiel (figure I-18). Au début du processus d'adhésion, des intégrines telles que $\alpha3\beta1$, $\alpha5\beta1$ et des récepteurs comme l'EGFR (epidermal growth factor receptor), le VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) vont lier la MEC (Yamaguchi et al., 2006). Cette étape conduit à l'enrichissement de ces récepteurs dans les régions riches en PtdIns(4,5)P₂ de la membrane plasmique. Les protéines taline, paxiline et vinculine sont recrutées permettant la formation des points d'adhésion (Linder, 2007). Suite à cela, la protéine tyrosine kinase Src est recrutée aux sites d'adhésion où elle est nécessaire à la formation des pré-invadopodes et à leur maturation. Src va être activée directement par les récepteurs activés ou par des protéines régulatrices (Albiges-Rizo, Destaing, Fourcade, Planus, & Block, 2009). Une fois phosphorylée, Src active diverses protéines en les phosphorylant telles que, la cortactine, WASP, FAK et des régulateurs des petites GTPases. Src phosphoryle la cortactine ; son activation libère la cofiline ce qui augmente la population d'actine intracellulaire. En parallèle, la protéine cortactine recrute NK1 (Neurokinin 1) qui permet à son tour de recruter la protéine N-WASP suivit d'une forte activation du complexe Arp2/3. L'accumulation du complexe N-WASP/Arp 2/3 au point d'adhésion focaux est renforcée par la formation du complexe Tsk5 (nommé FISH pour *five SH3 domain-containing protein*) / Grb2 (pour *growth factor receptor-bound protein 2*) suite à l'activation de Src (Oikawa, Itoh, & Takenawa, 2008). Le complexe Arp2/3, déclenche la phase dite de nucléation, pendant laquelle des dimères (ou trimères) d'actine s'assemblent et permettent la formation des pré-invadopodes (T. Kelly et al., 1998). DRF/mDia1 (pour *diaphanous-related formin 1*) se chargent ensuite de l'élongation des filaments d'actine. Lorsque l'assemblage des pré-invadopodes est complet, Src est inactivée par la protéine CSK (pour *C terminal Src Kinase*). La cortactine libère le complexe NK1/N-WASP et la polymérisation d'actine est stoppée, permettant la stabilisation et la maturation des invadopodes. Les protéines Src et cortactine sont donc deux protéines cruciales au renouvellement et à la stabilité des invadopodes.

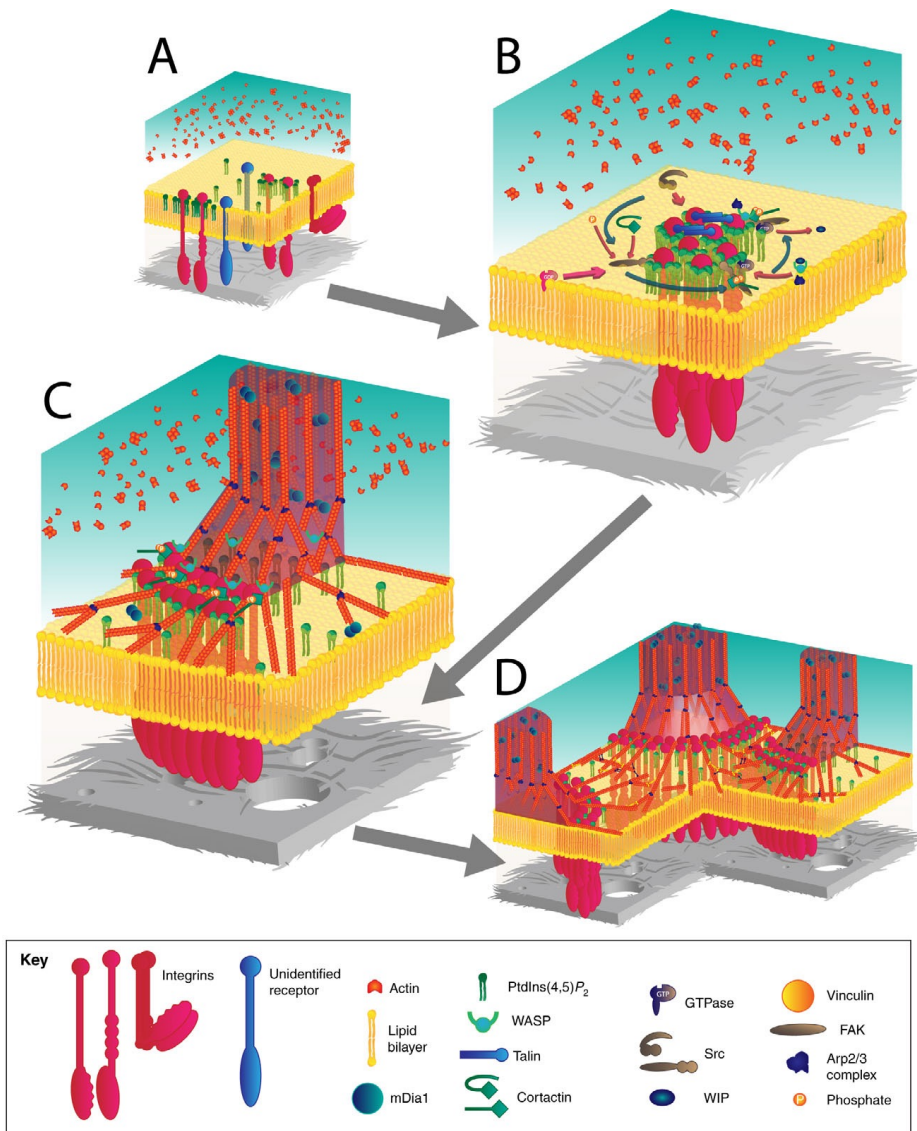


Figure I-18: Structure et composés moléculaires d'un invadopode.

L'invadopode est une structure dynamique qui comprend de nombreuses protéines. (A) Étape d'initiation. Adhésion de la cellule, les intégrines ou d'autres récepteurs se lient à des composants de la matrice et se regroupent dans les zones riches en PtdIns (4,5)P₂. (B) Progression des adhérences avec accumulation du complexe N-WASP/Arp 2/3 au point d'adhésion focaux. Les flèches bleues représentent la séquence d'événements spatio-temporelle et les flèches roses indiquent le recrutement de protéines. (C) Autophosphorylation de FAK à Tyr397, le complexe Arp2/3, déclenche la phase dite de nucléation, pendant laquelle des dimères (ou trimères) d'actine s'assemblent et permettent la formation des pré-invadopodes. DRF/mDia1 se charge de l'élongation. (D) La dernière étape est dite de stabilisation et la maturation des invadopodes. La cortactine libère le complexe NK1/N-WASP et la polymérisation d'actine est stoppée. Extrait de (Albiges-Rizo et al., 2009).

D'autres molécules de signalisation jouent un rôle dans la formation d'invadopodes notamment les petites GTPases, les serine/thréonine kinases.

1.6.3.2.2. Rôle des petites GTPases

La famille des Rho GTPases comprenant, Rho, Rac et Cdc42 sont des petites GTPases connues pour être impliquées dans la mobilité, l'invasion et la polarité cellulaire. Le rôle de Rho dans les invadopodes a été démontré par le fait que, la phosphorylation de sa GAP, p190Rho-GAP, est nécessaire à la propulsion de la membrane plasmique (Nakahara et al., 1998). Rac ne se localise pas dans les invadopodes, mais active toutefois Arp2/3 via son effecteur Sra-1. Le rôle crucial de Cdc42 dans la formation des invadopodes a été démontré dans des cellules du cancer du sein (MTLn3) (Yamaguchi et al., 2005). Cdc42 est impliquée dans l'activation de l'assemblage des filaments d'actine, en activant Arp2/3 via son effecteur N-WASP. De même que l'une de ses GEF, Fgd1. Fgd1 est un composé transitoire des invadopodes ; il présente uniquement à l'état précoce avant l'apparition de l'actine et nécessaire pour l'activation de cdc42 (Ayala, Baldassarre, Caldieri, & Buccione, 2006).

Les facteurs d'ADP-ribosylation sont des petites GTPases connues pour jouer un rôle dans le trafic membranaire et le remodelage du cytosquelette d'actine : deux procédés liés à la formation des invadopodes. En effet, ARF6 est localisée dans les invadopodes et semble agir de façon ERK (extracellular signal-regulated kinase)-dépendante sur leur formation, mais aussi leur activité (Hashimoto, Onodera, et al., 2004; Tague et al., 2004). De plus, le taux d'expression d'ARF6 est proportionnellement égal au phénotype invasif de la tumeur. Lorsque l'on parle de GTPases, on ne peut s'empêcher de parler de GAPs ou de GEFs. En effet, il a été démontré que la ARF GAP AMAP1 lie la cortactine et la paxiline, deux protéines impliquées dans la fonction des invadopodes. En bloquant cette interaction, la dégradation de la matrice est inhibée, ainsi que le pouvoir invasif des cellules. Le rôle d'ARF1 sur la biogénèse de ses structures sera décrit dans le chapitre II.

1.6.3.3. Une cible thérapeutique

Les stratégies d'inhibition de la néo-angiogenèse avec les inhibiteurs de MMPs à spectre large ont été très décevants (Sparano, Fazzari, & Childs, 2005). Toutefois, une autre avenue thérapeutique prometteuse contre l'invasion des cellules tumorales qui cible les invadopodes commence à voir le jour.

La biogénèse des invadopodes repose sur des mécanismes connus qui peuvent être ciblés par des médicaments existants. En effet, l'assemblage des invadopodes consiste en un transport coordonné de vésicules (via la kinesine), une polymérisation et un branchement d'actine (via Arp2/3/cofilin/cortactin/Tks5), l'adhésion à la matrice (via les intégrines) et une dégradation localisée de la matrice (contrôlée par Tks4/MMPs/ADAM10). L'inhibition de plusieurs de ses composés (cortactin, Tks4, Tks5) a démontré une inhibition de la progression métastatique (Leong et al., 2014). Ce qui est également le cas le l'inhibiteur de Src le Saracatinib, qui bloque la formation de invadopodes dans les cellules cancéreuses, et les empêchent ainsi d'échapper au système vasculaire pulmonaire pour former des métastases à distance (Zhang & Yu, 2012).

Récemment, des essais d'imagerie sur des animaux entiers on même permit la visualisation en temps réel des invadopodes dans les cellules tumorales envahissantes à travers les tissus (Yamaguchi et al., 2005). En effet, de nombreux types de cellules tumorales, y compris les cellules du cancer du côlon, du sein, les cellules épidermoïdes du cancer de la tête et du cou, sont capable de faire des invadopodes (M. Hollister, ES Clark, et AM Weaver, non publié). La formation d'invadopodes est fréquente dans les cellules cancéreuses invasives, y compris les cellules primaires de tumeurs humaines. Les invadopodes représentent une organelle universelle pour l'invasion des cellules cancéreuses, quel que soit le type de tumeur; ce qui les rend une excellente cible thérapeutique dans la prévention de l'invasion des cellules tumorales. En effet, comme les invadopodes ne sont pas importants pour la viabilité cellulaire, un traitement dirigé contre ces structures devrait avoir moins d'effets secondaires que les thérapies actuelles. La compréhension de cette technique d'invasion permettra peut-être un jour d'expliquer pourquoi certains cancers provoquent davantage de métastases que d'autres.

Beaucoup d'études sont encore nécessaires à ce sujet. C'est pourquoi dans cette thèse, nous nous intéressons à ce type de structures. Nous nous intéressons également à un autre type de structures souvent oubliées ou méconnues, nommées les « shedding vesicles ».

I.6.4 Les microvésicules, de type « shedding vesicles »

I.6.4.1. Structure et généralités

Les microvésicules type « shedding vesicles » sont différentes des exosomes, car elles prennent naissance directement de la membrane plasmique et sont sécrétées dans le milieu extracellulaire (figure I-19). Ce sont une population hétérogène de vésicules spécifiques ayant une taille comprise entre 300 et 900 nm. Ces microvésicules proviennent d'un grand nombre de types cellulaires incluant, les fibroblastes, les thrombocytes, les macrophages, les cellules endothéliales et bien entendu les cellules tumorales (Cocucci, Racchetti, & Meldolesi, 2009). Elles sont composées et libèrent un large spectre de molécules spécifiques, propres à leur origine parentale (Freyssinet, 2003). Elles sont importantes pour de nombreux processus tels que la coagulation, l'inflammation et la progression tumorale. En effet, les microvésicules dérivées de tumeurs influencent de nombreux aspects de la progression du cancer. Grâce à leur capacité à exporter des molécules bioactives et de propager leur transfert, elles peuvent affecter une variété d'événements cellulaires qui ont un énorme impact sur la progression tumorale. Les microvésicules servent à faciliter l'invasion cellulaire en libérant des protéases importantes pour la dégradation de la matrice extracellulaire telles que les caspases et les métalloprotéinases (Dolo et al., 1998; Taraboletti et al., 2002). En effet, des études rapportent la présence de la MMP-2, MMP9, MT1-MMP dans les microvésicules dérivées de tumeurs (Ginestra et al., 1998; Hotary, Li, Allen, Stevens, & Weiss, 2006). Les microvésicules peuvent également transporter plusieurs types de protéines importantes pour l'angiogenèse, dont des microARN, de la sphingomyeline, des récepteurs au facteur de croissance tels que l'EGFR ou des facteurs de croissance comme le VEGF (Al-Nedawi, Meehan, Kerbel, Allison, & Rak, 2009; Baj-Krzyworzeka et al., 2006; Dolo et al., 1998; C. W. Kim et al., 2002). Les transferts de ces facteurs pro-

angiogéniques activent les cellules endothéliales qui promeuvent l'angiogenèse en apportant de l'oxygène et des nutriments nécessaires aux cellules cancéreuses (Wysoczynski & Ratajczak, 2009). Les microvésicules, en transportant des facteurs tel que le facteur tissulaire (TF), sont également impliquées dans la coagulation du sang en augmentant les risques de thromboses, processus associé à la mortalité liée aux cancers (Zwicker et al., 2009). De surcroît, les microvésicules, par le transfert de récepteur oncogéniques (EGFRvIII) et d'autres signaux paracrine, vont permettre l'acquisition de phénotypes cancéreux agressifs (Al-Nedawi et al., 2008). Elles vont notamment avoir un impact sur le microenvironnement de la tumeur afin de faciliter la croissance et la survie en jouant sur le stroma (Di Vizio et al., 2009; Wysoczynski & Ratajczak, 2009). De plus, les microvésicules contribuent à l'évasion de la surveillance immunitaire. En se liant aux cellules immunitaires via les ligands qu'elles transportent tels que FasL (CD95L), elles altèrent leur fonction en faveur de la progression tumorale (J. W. Kim et al., 2005; Valenti et al., 2006; Valenti et al., 2007). Pour finir, les microvésicules jouent un rôle dans la résistance aux traitements anti-cancéreux. L'exemple a été fait avec la doxorubicine, dont les concentrations dans la cellule sont diminuées en raison de son excrétion active par des microvésicules (Shedden, Xie, Chandaroy, Chang, & Rosania, 2003).

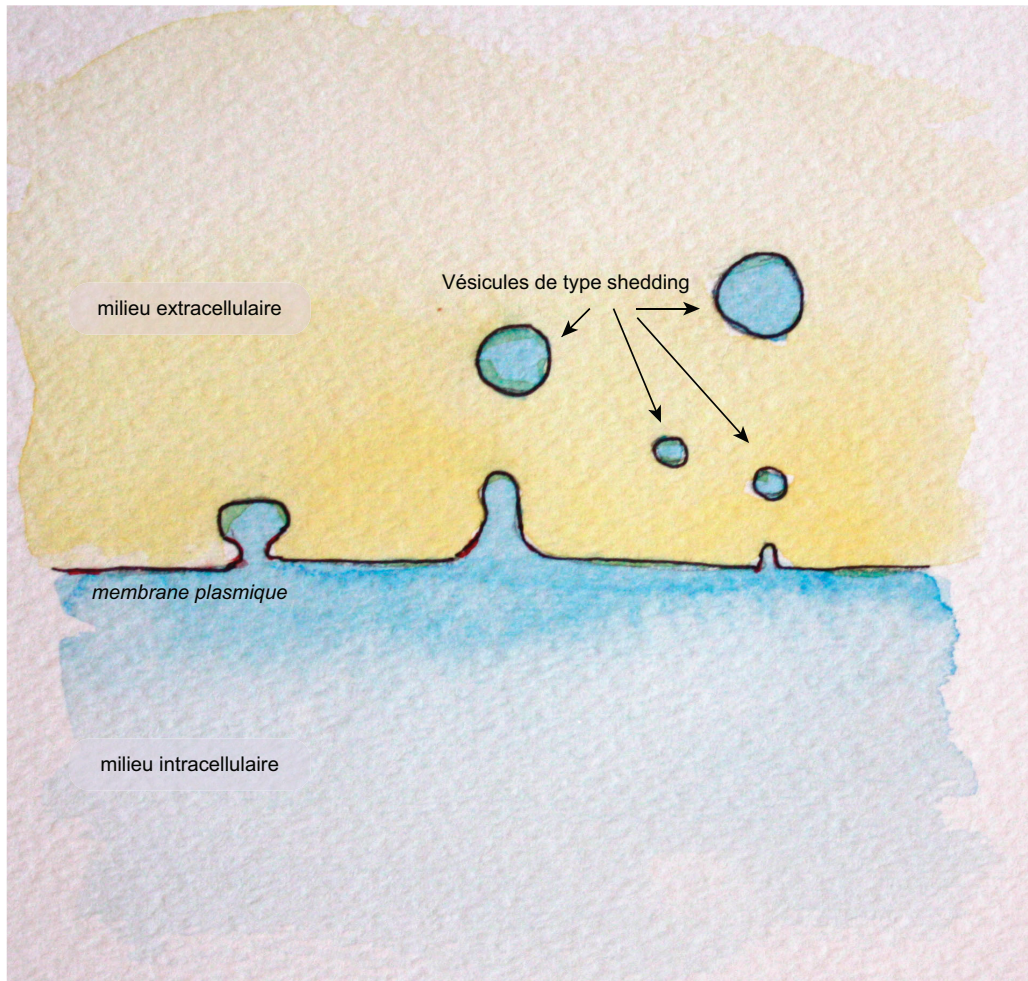


Figure I-19: Formation de microvésicules de type shedding.

Ces vésicules hétérogènes sont comprises entre 300 et 900 nm, prennent naissance directement de la membrane plasmique et sont sécrétées dans le milieu extracellulaire. Inspiré de (Cocucci et al., 2009)

1.6.4.1.1 Futur outil thérapeutique

Les microvésicules peuvent être détectées dans plusieurs fluides biologiques tels que le sang, l'urine et l'ascite ; ils pourraient donc potentiellement servir de biomarqueurs pronostiques. Ils donneraient ainsi des indices sur la progression du cancer. La composition en protéines des microvésicules pourrait refléter les modifications moléculaires des cellules tumorales dont elles sont issues. Elles donneraient peut être des

indications sur le stade de la maladie et l'efficacité du traitement. Ce sont des médiateurs majeurs pour la communication des cellules tumorales avec leur microenvironnement.

Toutefois, en raison de leur découverte récente, les mécanismes moléculaires menant à la formation de ces vésicules sont encore très mal connus.

1.6.4.2. Biogénèse des microvésicules

La formation de microvésicules est sous la gouverne de plusieurs facteurs. En effet, la libération du calcium intracellulaire induit la sécrétion de ces microvésicules. Les microvésicules contiennent beaucoup de phosphatidyl-sérine (PS) dans leur membrane du côté externe permettant de lier plusieurs composés, tels que l'annexine V (Pap, Pallinger, Pasztoi, & Falus, 2009). Le calcium permet de réguler le cytosquelette d'actine en activant la calpaïne ou en inhibant la synthèse du PIP2, qui participent à l'ancrage de la membrane au cytosquelette. Le calcium altère la distribution asymétrique des phospholipides du côté intérieur de la membrane plasmique, soit le PS et le phosphatidylethanolamine (PE) (Pap et al., 2009). L'augmentation du calcium cytoplasmique entraîne l'inhibition de la translocase et l'activation de la scramblase, pour empêcher PS et PE de retourner à l'intérieur de la membrane (Distler et al., 2005; Piccin, Murphy, & Smith, 2007). La formation des microvésicules dépendante du calcium est retrouvée chez les monocytes, les plaquettes, les macrophages, les globules rouges, les cellules dendritiques ou de la microglie (Bianco et al., 2005; Pap et al., 2009; Pizzirani et al., 2007). L'activation de l'ester de phorbol de la protéine kinase C (PKC) est un autre mécanisme qui induit la sécrétion de ses microvésicules. C'est le cas dans les cellules PC12 et les plaquettes à travers l'activation du récepteur P2Y couplé avec la protéine Gq (Cocucci, Racchetti, Podini, & Meldolesi, 2007; Kahner, Dorsam, & Kunapuli, 2008). Contrairement à beaucoup d'autres réponses d'exocytose, la génération de vésicules se produit avec un certain retard, allant de quelques dizaines de secondes à 1-2 min et ce, quel que soit le type de stimulation (Cocucci et al., 2009; MacKenzie et al., 2001; Pilzer, Gasser, Moskovich, Schifferli, & Fishelson, 2005; Pizzirani et al., 2007).

Ce processus de formation de microvésicules à la surface des cellules peut être à la fois normal et/ou pathologique. Une GTPase se démarque quant à la formation de ces vésicules.

1.6.4.3. Rôle de la GTPase ARF6

ARF6 régule deux éléments majeurs associés à l'invasion ; en plus de réguler la formation d'invadopodes, ARF6 régule la libération de microvésicules (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006; Muralidharan-Chari, Clancy, et al., 2009). L'activation d'ARF6 promeut l'activation d'ERK1/2 et subséquentement l'activation de la kinase de la MLC (pour *myosine light chain*), requise pour la sécrétion des microvésicules. Tout comme les invadopodes, les microvésicules ont besoin de la phosphorylation de la MLC (Alexander et al., 2008; Muralidharan-Chari, Clancy, et al., 2009). L'inhibition d'ARF6 bloque la MLC en activant la PKC, empêchant la formation de microvésicules. ARF6, en régulant la machinerie moléculaire modulant l'activité actine/myosine du cytosquelette, régule la sécrétion des microvésicules. La forme active d'ARF6 a été retrouvée dans des microvésicules retrouvées dans le sérum de patients atteints de divers cancers (Alexander et al., 2008; Muralidharan-Chari, Clancy, et al., 2009).

En conclusion les microvésicules tous comme les invadopodes, sont des éléments structuraux clefs de l'invasion. Ils ne pourraient pas être si cruciaux, si ils n'agissaient pas en combinaison avec les enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire.

1.6.5 Les métalloprotéinases matricielles

De nombreuses pathologies sont associées à une perturbation de la dégradation de la matrice extracellulaire. Parmi les nombreuses protéases extracellulaires exprimées par les cellules humaines, les métalloprotéinases ont été identifiées comme les enzymes les plus importantes engagées par les cellules tumorales pour la dégradation de la MEC (Egeblad & Werb, 2002). Précisément, les métalloprotéinases sont des enzymes à zinc ayant une activité endopeptidique leur permettant de digérer la MEC. Il en existe 25 chez l'humain. Les MMPs diffèrent par leur type de substrats, leur localisation et leur structure.

1.6.5.1. Structure et activation des MMPs

Le système de classification est basé sur la structure des MMPs plutôt que sur leur spécificité de substrat. Ces enzymes sont composées, d'un peptide signal induisant la sécrétion extracellulaire et d'un pro-domaine permettant de garder le statut latent de l'enzyme par l'interaction d'un résidu cystéine avec l'atome de zinc du domaine catalytique. En C-terminal, on retrouve un domaine de type hémopexine pour la spécificité des substrats liés et à l'interaction avec les inhibiteurs endogènes (Nagase, Visse, & Murphy, 2006; Overall, 2002). Selon les MMPs, on retrouve, un site de clivage pour la furine permettant une activation de la molécule lors de sa maturation dans le Golgi. Dans la sous-famille des gélatinases, le domaine catalytique contient un domaine d'homologie avec la fibronectine qui assure la liaison de ces enzymes avec leur substrat. Les MMPs membranaires, MT-MMP de type 1, 2, 3 et 5, possèdent un domaine transmembranaire et les MT-MMP de type 4 et 6 possèdent une attache glycosylphosphatidylinositol (GPI) pour leur localisation à la surface cellulaire (Noel et al., 2004; Sounni & Noel, 2005). En résumé, toutes sont synthétisées sous forme de pro-enzymes ou pro-MMP inactives et sont activées par hydrolyses post-traductionnelles soit à l'intérieur de la cellule, par exemple sous l'influence de la furine, soit à l'extérieur, par exemple sous l'action de la plasmine ou d'autres MMPs. En effet, les MMPs ne sont pas nécessairement activées une fois sécrétées. En fait, plusieurs MMPs ne sont pas sécrétées et sont exprimées sous forme membranaire (e.g. MT-MMP). D'autres, incluant MMP-2, sont activées lorsqu'elles sont encore intracellulaires ou encore elles sont activées dans leur forme membranaire (liées aux intégrines) avant d'être relâchées dans le surnageant.

On étudie souvent la présence, soit l'expression des différentes MMPs à l'aide d'essais de zymographie (Lombard, Saulnier, & Wallach, 2005). Comme beaucoup de MMPs sont capables de dégrader le même substrat leur identification est difficile. Il faut aussi garder à l'esprit que la forme active est très instable et peut se dégrader rapidement. C'est pourquoi il faut s'assurer de l'état de conformation des MMPs (actif ou inactif), comme dans le cas de MMP-9 où l'on peut utiliser en guise de contrôle du milieu de culture de fibroblastes HT 1080 qui contient des MMPs bien définies. On complète souvent les essais de zymographie, en faisant des zymographies inversées, pour vérifier

la présence d'inhibiteurs de MMPs tel que les Timp. Pour finir, l'activité MMP *per se* ne peut cependant être démontrée que par des tests de clivage protéolytique.

1.6.5.2. Les MMPs et le cancer

Ces enzymes ont un rôle central lors de l'invasion des cellules dans des processus physiologiques et pathologiques tels que la morphogenèse, la différenciation, la migration cellulaire, l'apoptose, la réparation des tissus, l'invasion tumorale et la néo-angiogenèse (Cauwe, Van den Steen, & Opdenakker, 2007; Deryugina & Quigley, 2006; Gutierrez-Fernandez et al., 2007; Hashimoto, Hashimoto, et al., 2004; Van Lint & Libert, 2007 {Vu, 2000 #4260; Vu & Werb, 2000). Les activités protéolytiques des MMPs contribuent à la transformation maligne de la tumeur par la libération de molécule actives qui induisent un microenvironnement favorable au développement tumoral (Deryugina & Quigley, 2006). En effet, les metalloprotéinases de la matrice MMP-2, -9, -13, les MT1 et MT4-MMPs ont été associées à la progression tumorale et la formation de métastases de différents types de cancers (Chabottaux et al., 2006; Hofmann et al., 2000; Y. Itoh & Nagase, 2002).

Les invadopodes transportent vers leur extrémité des vésicules provenant de l'intérieur de la cellule et contenant les protéases qui perceront la membrane basale. Une fois ces vésicules parvenues à l'extrémité de l'invadopode, la membrane qui les entoure fusionne avec celle de la cellule et leur contenu est déversé à l'extérieur au contact de la membrane basale. Les protéases peuvent alors jouer leur rôle en digérant la MEC. La cellule tumorale n'a plus qu'à se glisser dans l'orifice et s'enfuir. On retrouve deux types de protéases associées à l'activités enzymatique des invadopodes. Tout d'abord, les protéases sécrétées et activée sur les invadopodes qui comprennent les gélatinases MMP-2 et MMP-9. Puis, les protéases transmembranaires qui comprennent la MT1-MMP, la sérine protéase seprase, la dipeptidyl dipeptidase IV, et les metalloprotéinases de la famille ADAM (Monsky et al., 1994; Nakahara et al., 1998). La MT1-MMP et la seprase ciblent plutôt les macromolécules telles que le collagène, la fibronectine et les laminines pour la digestion de la MEC.

Les microvésicules de tumeurs sont enrichies de metalloprotéinases et d'autres enzymes protéolytiques afin de faciliter la digestion de la MEC nécessaire pour la

progression du cancer. Les microvésicules contiennent principalement des gélatinases, soit MMP-2 et MMP-9 et des protéases transmembranaires telles que la MT1-MMP (Dolo et al., 1998). Grâce aux métalloprotéinases, les microvésicules serviront donc à une dégradation de la matrice extracellulaire périphérique, contrairement aux invadopodes qui serviront à une dégradation plus localisée.

Selon les cas, les MMPs peuvent promouvoir mais aussi inhiber la progression du cancer en jouant sur l'invasion cellulaire (Gutierrez-Fernandez et al., 2007; McCawley, Crawford, King, Mudgett, & Matrisian, 2004; Md & Leipzig, 2007). Par exemple, les cellules du cancer du sein possédant des propriétés métastatiques ont un taux très faible de MMP-8 comparativement aux cellules non métastatiques. À l'inverse, les souris déficientes pour le gène de la MMP-8 ont une susceptibilité accrue de développer des mélanomes (Balbin et al., 2003; Gutierrez-Fernandez et al., 2007; Van Lint & Libert, 2006). La MMP-12 produite principalement par les macrophages, et la MMP-19 agissent comme régulateur négatif de la progression tumorale (Gorin-Rivas et al., 2000; Jost et al., 2006).

Hypothèse de recherche

Pour reprendre notre confrère égyptien, il y a 3000 ans avant JC, de ça, pour les cancers du sein triple négatif « il n'y a pas de traitements » connus efficaces. En effet, une forte proportion des patients ayant un cancer dit triple négatifs ont une augmentation de l'expression de l'EGFR. Seulement, à ce jour, le ciblage de ce récepteur n'a eu que peu de succès. Tout nous pousse donc vers une recherche de nouvelles cibles thérapeutiques pour les cancers du sein hautement invasifs. Les protéines ARF et les régulateurs de leur fonction, effecteurs en aval du récepteur à l'EGF sont des candidats à considérer. ARF1 et ARF6 sont des protéines importantes pour le contrôle de la migration et de la prolifération des cellules invasives du cancer du sein (Boulay et al., 2008; Boulay et al., 2011; D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006; Hashimoto, Hashimoto, et al., 2004). De plus, nous savons que ARF6 est impliquée dans le processus d'invasion (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006; Hashimoto, Hashimoto, et al., 2004; B. Hu et al., 2009; Muralidharan-Chari, Clancy, et al., 2009; Muralidharan-Chari, Hoover, et al., 2009; Tague et al., 2004). Nous avons donc émis l'hypothèse, dans notre première étude (Chapitre II), qu'ARF1 module l'invasion des cellules cancéreuses du sein. Tout d'abord, afin d'étudier le rôle physiologique d'ARF1 dans ces phénomènes biologiques, nous examinerons l'importance de l'expression et de l'état d'activation de la GTPase, dans les cellules hautement invasives, les MDA-MB-231. Par la suite, nous déterminerons le rôle d'ARF1 dans l'invasion cellulaire médiée par l'activation du récepteur à l'EGF, en élucidant les voies de signalisation impliquées.

Dans notre deuxième étude (Chapitre III), nous tenterons de définir le rôle d'ARF1 dans la migration cellulaire. En dépit de toutes les études déjà réalisées sur la migration cellulaire avec ARF1, aucune n'identifie le mécanisme par lequel cet isoforme régule l'adhésion, un des processus majeur de la migration. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'ARF1 pourrait être impliquée dans la formation des complexes d'adhésion focaux. Ainsi, nous éluciderons le rôle d'ARF1 dans la migration des MDA-MB-231, notamment en étudiant le rôle de cette GTPase sur la régulation de l'activité de la protéine FAK dans la formation du complexe d'adhésion.

Pour finir dans notre troisième étude (Chapitre IV), nous définirons le rôle d'ARF1 dans la transition épithéliale-mésenchymateuse et ce, au delà de nos modèles cellulaires usuels, en faisant appel à des modèles xéno greffes *in vivo* et des tissus mammaires cancéreux de patients. Nos travaux antérieurs démontrent l'importance d'ARF1 dans les processus pro-tumoraux, mais ce, uniquement dans des modèles cellulaires. Nous avons émis l'hypothèse que cette isoforme d'ARF pourrait jouer un rôle important dans le processus de dissémination systémique des cellules cancéreuses en contrôlant la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) de cellules de cancer du sein. Tout d'abord, nous déterminerons l'importance de l'expression d'ARF1 associée aux grades mais aussi aux différents sous-types de cancers du sein. Ensuite, nous démontrerons, dans un modèle murin, le rôle d'ARF1 dans la formation des tumeurs primaires et mais aussi secondaires. Puis pour finir, nous définirons, dans un modèle cellulaire non invasif, les MCF7, comment ARF1 contrôle la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) en déterminant les voies signalétiques mises en jeux.

L'élucidation des mécanismes moléculaires impliqués dans la genèse et la propagation des tumeurs dans l'organisme constitue un point déterminant dans la compréhension de cette pathologie complexe. De plus, l'identification et la caractérisation de nouvelles cibles moléculaires permettent d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-cancer dans le but d'offrir de nouvelles approches thérapeutiques pour les patients souffrant de cette maladie mortelle.

II. CHAPITRE II : ARF1 regulates the Rho/MLC pathway to control EGF-dependent breast cancer cell invasion

Published in the journal: Molecular Biology of the Cell. 2014 Jan;25(1):17-29.

Sabrina Schlienger, Shirley Campbell, and Audrey Claing

From the Department of Pharmacology and Membrane Proteins Research Group (GEPROM), Faculty of Medicine, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Downtown station, Montreal, QC, Canada H3C 3J7

Running Head: ARF1 controls invasiveness

Abbreviations: ADP-ribosylation factor (ARF), epidermal growth factor (EGF), epidermal growth factor receptor (EGFR), guanosine triphosphate (GTP), metalloproteinase (MMP), M.D. Anderson - metastatic breast-231 (MDA-MB-231), major histocompatibility complex-class I (MHC-class I), myosin light chain (MLC), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), standard error of the mean (SEM), small interfering ribonucleic acid (siRNA).

Address correspondence to: Audrey Claing (audrey.claing@umontreal.ca)

Author contributions:

SS: experimental conception, experimental execution, data analysis and writing

SC: experimental execution (some activation n)

AC: experimental conception and writing

ABSTRACT

Invasion of tumour cells is a key step in metastasis, which depends largely on the ability of these cells to degrade the extracellular matrix. Although we have recently shown that the GTPase ARF1 is overexpressed in highly invasive breast cancer cell lines and that EGF stimulation can activate this ARF isoform to regulate migration as well as proliferation, the role of this small GTP-binding protein has never been addressed in the context of invasiveness. Here, we report that modulation of ARF1 expression and activity markedly impaired the ability of MDA-MB-231 cells, a prototypical highly invasive breast cancer cell line, to degrade the extracellular matrix by controlling MMP-9 activity. In addition, we demonstrate that this occurs through an inhibition of invadopodia maturation as well as shedding of membrane-derived microvesicles, the two key structures involved in invasion. To further define the molecular mechanisms by which ARF1 controls invasiveness, we show that ARF1 acts to modulate RhoA and RhoC activity, which in turn impacts MLC phosphorylation. Together, our findings underscore for the first time a key role for ARF1 in invasion of breast cancer cells and suggest that targeting the ARF/Rho/MLC signalling axis might be a promising strategy to inhibit invasiveness, and metastasis.

Key words: ADP-ribosylation factor, Rho GTPases, Myosin light chain, Metalloproteinase, Invadopodia, Shedding microvesicle, Invasion, Breast cancer.

INTRODUCTION

Cell invasion is a process tightly regulated by multiple signalling proteins such as plasma membrane receptors, adaptors and small GTP-binding proteins. During cancer progression, transformed cells migrate and invade surrounding tissues to form metastasis. Expression of small GTPases and their regulatory factors is frequently modulated in human cancers (Karnoub & Weinberg, 2008; Mardilovich, Olson, & Baugh, 2012; Vigil, Cherfils, Rossman, & Der, 2010). Recently, the ADP-ribosylation factor (ARF) family of proteins has been associated with cancer progression (Sabe et al., 2009). We have shown that the GTPase ARF1 is overexpressed in highly invasive cancer cells and that EGF stimulation can activate this ARF isoform to regulate migration (Boulay, Cotton, Melancon, & Claing, 2008; Lewis-Saravalli, Campbell, & Claing, 2013).

Like all GTPases, ARFs cycle between their inactive (GDP-bound) and active (GTP-bound) form. This process is controlled by guanine nucleotide exchange factors (GEFs), which catalyzes the exchange of GDP to GTP and GTPase-activating proteins (GAPs) that accelerates the hydrolysis of bound GTP. Six ARF genes have been identified, and ARF1 and ARF6 are the best characterized. In invasive breast cancer cells, we reported that stimulation of the EGF (epidermal growth factor) receptor activates ARF1 in order to regulate cell proliferation and migration by affecting the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway (Boulay et al., 2008). In contrast, ARF6 was shown to regulate migration and invasion by activating the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway (Boulay et al., 2008; D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006; Hashimoto et al., 2004). GTPases of the Rho family, RhoA and RhoC, were reported to play a major role in several key steps of cancer progression, such as invasion (Simpson, Dugan, & Mercurio, 2004). It was shown that depletion of RhoA or RhoC inhibits the invasiveness of MDA-MB-231 cells (Pille et al., 2005; Wu, Wu, Rosenthal, Rhee, & Merajver, 2010). A positive correlation was reported between the expression level of RhoA and disease progression in breast cancer tumours (Fritz, Brachetti, Bahlmann, Schmidt, & Kaina, 2002). RhoC was also reported as a gene positively associated with metastasis (Clark, Golub, Lander, & Hynes, 2000; Suwa et al., 1998).

Breaching of the basement membrane is classically associated with invadopodia. These are actin and cortactin-rich protrusions of the cell membrane that extend into the

extracellular matrix (Weaver, 2006). Invadopodia contain metalloproteinases (MMPs) essential for proteolytic degradation of the matrix (Monsky et al., 1994; Nakahara et al., 1997). Cells can also invade their surrounding by releasing shedding microvesicles. These are now recognized as specific structures different from exosomes as they bud directly from the plasma membrane into the extracellular space (Cocucci, Racchetti, & Meldolesi, 2009; Muralidharan-Chari, Clancy, Sedgwick, & D'Souza-Schorey, 2010). These plasma membrane-derived microvesicles are released from a large number of cell types including, fibroblasts, platelets, macrophages, endothelial and tumor cells (Cocucci et al., 2009). They display a variable spectrum of molecules, specific to the parental cell that secretes them. They are thought to facilitate cell invasion by releasing proteases important for matrix degradation, such as MMPs (Dolo et al., 1999; Taraboletti et al., 2002). MDA-MB-231 cells express 26 MMP genes, and several of these have been associated with increased invasiveness (Hegedus, Cho, Xie, & Eliceiri, 2008).

Although we have demonstrated that ARF1 is overexpressed in invasive breast cancer cells (Boulay et al., 2008), the role of this ARF isoform in the invasion process remains unknown. Because ARF1 controls migration and proliferation (Boulay et al., 2008; Boulay et al., 2011), we have reasoned that this ARF isoform is also a key signalling effector, regulating invasion. Here, we demonstrate that modulation of ARF1 expression levels and activity led to impaired invasive capacities of MDA-MB-231 cells through invadopodia maturation and shedding of microvesicles. We define the molecular circuit that governs the invasion process by showing that ARF1 plays a critical role in modulating Rho-dependent signalling events leading to regulation of myosin light chain (MLC). Furthermore, we report that knock down of ARF1 markedly inhibits the maturation of invadopodia, the release of shedding microvesicles and MMP-9 activity. Our findings reveal, for the first time, the central role of ARF1 in breast cancer cell invasion, and identify a putative new target for the development of anti-breast cancer therapies.

RESULTS

ARF1 controls invasion of MDA-MB-231 breast cancer cells

Using the prototypical highly invasive triple negative breast cell line, the MDA-MB-231 cells, we first investigated the extent to which ARF1 controls invasiveness by examining gelatin degradation. Scrambled and ARF1-depleted cells were seeded onto fluorescently-labelled gelatin-coated coverslips. After 16 hours, cells were fixed and actin stained using rhodamine-phalloidin. In control condition, gelatin degradation was observed by the decrease of green fluorescence under and around the cells. ARF1 knock down, by two different siRNA, reduced the ability of the cells to degrade the matrix by 56% (Fig. 1A, Supp. Fig 1A and video 1). Gelatin degradation observed in ARF1 siRNA transfected cells was rescued by expression of the siRNA-resistant HA-tagged ARF1 (Supp. Fig 1A). Alternatively, increasing ARF1 levels did not significantly affect gelatin degradation. However, expression of a dominant negative mutant, ARF1 T³¹N or a constitutively active mutant, ARF1 Q⁷¹L, inhibited this response by 50% suggesting that cycling of the small GTPase is important for downstream signalling leading to this response (Fig. 1A and Supp. Fig 1B). Cellular invasion is also classically assessed by transwell migration through Matrigel. This laminin-, type IV collagen- and growth factor-enriched matrix is widely used as a mimic of basement membrane. In such assay, a 20-hour EGF stimulation increased cell invasion by 2.1-fold. Depletion of ARF1, by RNA interference, significantly reduced basal as well as EGF-stimulated invasion (Fig. 1B). In this context, proliferation and migration was also inhibited by the depletion of ARF1 contributing to the overall effect observed (Supp. Fig 1C and D). As malignant breast cells can be cultured within a 3D-matrix to mimic the *in vivo* microenvironment (Lee, Kenny, Lee, & Bissell, 2007), we therefore also assessed the role of ARF1 on cellular phenotype when in a more complex setting. Similar amounts of MDA-MB-231 cells transfected with scrambled or ARF1 siRNA were first suspended in Matrigel (Supp. Fig 1E). After 5 days, control cells formed complex stellate structures that invaded into the extracellular matrix (Fig. 1C, left panel). In contrast, cells depleted of ARF1 formed spheroid-shaped colonies similar to normal mammary epithelial cells (Fig. 1C, right panel). Altogether, these data provide evidence that ARF1 may be a key factor regulating the invasive properties of breast cancer cells.

Depletion of ARF1 inhibits MMP-9 activity

Because invasion is characterized by the proteolytic degradation of the extracellular matrix, we quantified the enzymatic activity released in the extracellular media since most MMPs are secreted and subsequently activated. Here, we focused on MMP-9 and MMP-2, two gelatinases expressed in MDA-MB-231 cells. First, extracellular media from control (scrambled siRNA) and ARF-depleted cells were collected and MMP activity was assessed by zymography assay. In conditions where MDA-MB-231 cells were transfected with a scrambled siRNA, EGF stimulation resulted in an increase of MMP-9 activity without affecting MMP-2 (Fig. 2A). When ARF1 expression was knocked down, both basal and EGF-stimulated MMP-9 activity were markedly reduced. Furthermore, in these conditions, we observed the apparition of the proform of MMP-9 (here activated biochemically) suggesting that ARF1 can regulate MMP-9 cleavage (Fig. 2A). To verify that the degradation observed is due specifically to MMPs, we used Batimastat (BB-94), a broad-spectrum inhibitor known to reduce invasion of MDA-MB-231 (Brown, 1995; Kelly et al., 1998). After treatment of the cells with this compound, all enzymatic activity was lost, confirming the specific effect of MMPs in this experiment (Fig. 2A). In cell lysates, MMP-9 is found as the proform and depletion of ARF1 did not affect its expression assessed by Western blot analysis (Fig. 2B). However, we observed that pro-MMP-9 was strongly ubiquitinated in ARF1-depleted conditions compared to control (Fig. 2B). In addition, mRNA levels were increased in cell transfected with the ARF1 siRNA (Fig. 2C). These data suggest that in ARF1-depleted conditions, pro-MMP-9 expression levels remain the same because, although mRNA levels are increased, degradation of pro-MMP9 through the ubiquitin-proteasomal pathway is also increased.

ARF1 regulates invadopodia maturation and microvesicle shedding

To further understand how ARF1 controlled MMP-9 activity to mediate matrix proteolysis, we examined the two main structures associated with cellular invasion: invadopodia formation and release of microvesicles. First, ARF1 was not found to localize into invadopodia of MDA-MB-231 cells (data not shown). This observation

corroborates previous report (Hashimoto et al., 2004). Furthermore, when plated onto gelatin, similar number of actin and cortactin-rich invadopodia were found in control and ARF1-depleted cells (Fig. 3A) suggesting that ARF1 does not regulate the initial step of invadopodia formation. However, further analysis of the invadopodia, through Z-stack reconstructions, revealed that the structures present at the ventral surface of the cells transfected with the ARF1 siRNA were smaller than the controls suggesting that ARF1 may be essential for the final assembly and maturation steps of invadopodia (Fig. 3A). To further address this issue, we examined the amount of Tks5 in invadopodia since this adaptor protein is associated with the formation and maturation of these structures (Murphy & Courtneidge, 2011; Seals et al., 2005; Stylli et al., 2009). As illustrated in figure 3B, Tks5 was enriched in control cells co-localizing with actin at invadopodia. However, in ARF1-depleted cells, the presence of Tks5 was reduced by 36%. These findings suggest an important role for ARF1 in the maturation of these structures (Fig. 3B).

Shedding microvesicles released by MDA-MB-231 cells can be isolated by differential centrifugations of the culture media. It was previously reported that these vesicles ranging from 300 to 900 nm are present in the 10,000 g fraction (Muralidharan-Chari et al., 2009). As illustrated in figure 4, Western blot analysis revealed that ARF1 was present in that 10,000 g fraction of MDA-MB-231 culture media. Ultrastructural analysis, by electron microscopy, confirmed the previously reported heterogeneity of these microvesicles (Suppl. Fig. 2). Furthermore, immunolabeling of the whole mount preparations confirmed that ARF1 was present within these structures and mainly associated with the membranes (Fig. 4A and Suppl. Fig. 2). Depletion of ARF1 inhibited the release of plasma-derived microvesicles by 32 % as assessed by total amount of proteins present in the 10,000 g fraction (Fig. 4B). Treatment with inhibitors of MLC pathway such as ML-7, a myosin light chain kinase inhibitor, or (-)-Blebbistatin, a myosin II inhibitor, also inhibited the release of plasma-derived microvesicles (Fig. 4B). We next examined the proteolytic activity associated with these microvesicles. We observed that MMP-9 activity was diminished in ARF1-depleted conditions (Fig. 4C, left panels). However, we found no significant effect of ARF1 depletion on the amount of MMP-9, nor MMP-2, in vesicle lysates (Fig. 4C, right panels).

Together, these data suggest that ARF1 may regulate matrix degradation by directly acting on the structures associated with invasiveness; invadopodia maturation and the shedding of membrane-derived microvesicles.

ARF1 is necessary for the activation of MLC, which is dependent upon the activation of RhoA and RhoC

Invadopodia activity as well as microvesicle shedding requires the phosphorylation of MLC (Alexander et al., 2008; Muralidharan-Chari et al., 2009). Inhibition of MLCK or myosin II by ML-7 and (-)-Blebbistatin, respectively, has been shown to eliminate invadopodia-associated degradation (Alexander et al., 2008). Furthermore, phosphorylation of MLC on Thr¹⁸/Ser¹⁹ residues is a step known to promote contraction of the actin-based cytoskeleton and generate the force required for microvesicle fission (Muralidharan-Chari et al., 2009). We therefore next sought to investigate whether ARF1 could regulate MLC phosphorylation. As illustrated in figure 5A, EGF stimulation of MDA-MD-231 cells transfected with a scrambled siRNA led to sustained phosphorylation of MLC on Thr¹⁸/Ser¹⁹ residues. After 60 minutes of stimulation, phosphorylation of MLC was 2.5 fold greater than the baseline, reflecting a potent activity of the protein. ARF1 knockdown completely abolished EGF-induced activation of MLC to the baseline level (Fig. 5A). Interestingly, ARF1 was not found in complex with MLC (data not shown). As MLC phosphorylation is regulated by the Rho and Rho-associated kinase signaling axis (Amano et al., 1996; Kimura et al., 1996), we examined if, in invasive breast cancer cells, RhoA and RhoC controlled the activation of MLC. As illustrated in figure 5B and C, depletion of either RhoA or RhoC completely abrogated phosphorylation of MLC. Interestingly, knockdown of RhoC, but not of RhoA, inhibited MLC expression, suggesting that this isoform may regulate the function of MLC at the transcriptional level.

Because we have previously reported that ARF proteins can directly interact and modulate the activity of the small GTP-binding protein Rac1 (Cotton et al., 2007; Lewis-Saravalli et al., 2013), we hypothesized that ARF1 might act to control the activation of other GTPases such as RhoA and RhoC, thereby modulating MLC phosphorylation. First, RhoA and RhoC activation was assessed upon EGF treatment of MDA-MB-231 cells. A rapid activation of both Rho isoforms was observed after 1 minute of stimulation (Fig.

6A and Suppl. Fig. 3) followed by a sustained second phase of activation at 15 minutes (Fig. 6B). This second peak remained elevated after 1 hour of stimulation as previously reported by other groups (Gilcrease et al., 2009; Molli, Adam, & Kumar, 2008). Depletion of ARF1 markedly reduced the activation of both small G proteins at the early and sustained time points (Fig. 6A, Suppl. Fig. 3, and Fig. 6B). To exclude the possibility of off-target effects of the ARF1 siRNA, we realized rescue experiments. As shown in supplemental figure 3, when expressed in ARF1-depleted cells, a siRNA-resistant HA-tagged ARF1 construct was able to rescue RhoA and RhoC activity. Importantly, the effect of ARF1 depletion on RhoA/C activity was also observed in two other invasive breast cancer cell lines, SKBR3 and HCC70 (Suppl. Fig. 4). Rho activation is also characterized by the translocation of these GTPases to the plasma membrane (Huvneers & Danen, 2009; Yonemura, Hirao-Minakuchi, & Nishimura, 2004). In EGF-stimulated conditions, both RhoA and RhoC were found enriched in membrane fractions at the corresponding maximal time points of their activation. In cells transfected with ARF1 siRNA, this biological response was dampened (Fig. 6C and Suppl. Fig. 5).

Alternatively, we assessed whether Rho GTPases could regulate the activation of ARF1. Our data show that neither the depletion of RhoA or RhoC significantly affected the early activation phase of ARF1 (Fig. 7A). Longer exposure to the growth factor promoted a second phase of GTP-loading on ARF1, which appeared at 5 minutes and remained sustained for more than 30 minutes (Fig. 7B). Depletion of RhoA or RhoC however markedly reduced this second burst of ARF1 activation suggesting that Rho GTPases have the potential to regulate ARF1 activation. To further determine whether EGF stimulation is required for Rho to modulate ARF1 activity, we overexpressed Rho mutants mimicking the active form of the GTPases, and examined ARF1-GTP levels. As depicted in supplemental figure 6A, overexpression of RhoA Q⁶³L or RhoC G¹⁴V did not enhanced levels of active ARF1 demonstrating that EGF-dependent signalling events are necessary for activation of this small G protein. We also found that overexpression of constitutively active ARF1 Q⁷¹L decreases RhoA and RhoC activation (Suppl Fig. 6B) further supporting evidences for the role of ARF1 Q⁷¹L in gelatin degradation. The exact role of both phases of ARF1 and RhoA/C activation still remains to be elucidated. In sum, our data therefore support a role for ARF1 as an upstream regulator of RhoA and

RhoC.

To further investigate how ARF1 controlled Rho proteins, we sought to define whether these two classes of GTPases could be found in complex. Using co-immunoprecipitation assays, ARF1 was found associated with both RhoA and RhoC following EGF stimulation of MDA-MB-231 cells. The interaction was rapid and transient with an early peak (1 minute) and a later more sustained phase (Fig. 8A), similar to what we observed for their maximal activation times. Furthermore, we assessed whether RhoA and RhoC could also be present in shedding microvesicles. Western blot analysis showed that both GTPases were enriched in the 10,000 g fraction (Fig. 8B). Interestingly, when RhoA and RhoC were immunoprecipitated from microvesicle lysates, they were found interacting with ARF1 (Fig. 8C). As ARF1 is not present in invadopodia, we did not investigate the ability of ARF1 and Rho GTPases to interact in these structures.

To demonstrate that the effects observed in ARF1 depleted cells were dependent of Rho GTPases, we attempted to rescue the phenotypes with the active Rho mutants. It was previously reported that RhoA activation was important for microvesicles formation in human cancer cells stimulated by EGF (B. Li, Antonyak, Zhang, & Cerione, 2012). As illustrated in figure 9A, the expression of either RhoA Q⁶³L or RhoC G¹⁴V alone or in combination was able to rescue the effect of ARF1 depletion on microvesicles shedding. Furthermore, expression of dominant negative Rho mutants reduced microvesicle shedding (Fig. 9B). Similar conditions were used to examine invasion. Overexpression of dominant negative RhoA and RhoC mutants, independently or together, significantly inhibited invasion in the Matrigel-coated Boyden chamber assay. In contrast, expression of the constitutively active mutants had the opposite effect. In conditions where ARF1 expression was knocked down, overexpression of RhoA and RhoC active mutants rescued invasion (Fig. 9C, Suppl. Fig.7).

Altogether, our findings suggest that ARF1 is the first upstream GTPase activated by EGFR and that this event is necessary for RhoA/RhoC activation and the subsequent phosphorylation of MLC.

DISCUSSION

In recent years, the role of ARF proteins in controlling key physiological responses of breast cancer cells has come to light. We have shown that ARF1 and ARF6 are overexpressed in highly invasive tumour cell lines (Boulay et al., 2008). Although much focus has been put on ARF6, the importance of the role of ARF1 in tumorigenesis is now beginning to be recognized. The findings presented here demonstrate that ARF1 is a key player of breast cancer cell invasiveness, and provide a mechanism by which this small GTPase controls this process.

ARF1 is mostly known for its role in the regulation of the secretory pathway. However, the demonstration that this ARF isoform is present at the plasma membrane and activated following receptor stimulation has provided new rationales for its role in different receptor-mediated biological function (Boulay et al., 2008; Cohen et al., 2007). We have shown that ARF1 controls breast cancer cell migration through the regulation of the PI3K pathway and proliferation via regulating the function of pRB (Boulay et al., 2008; Boulay et al., 2011). Here, we further provide evidences that these two key physiological responses are inhibited by ARF1 knock down. Most importantly, we now provide new evidences that ARF1 also controls invasiveness. A role for ARF proteins in regulating MMP activity has previously been suggested. Increasing concentrations of brefeldin A (BFA) were reported to inhibit PMA-induced secretion of MMP-9 from HT 1080 fibrosarcoma cells (Ho, Exton, & Williger, 2003). Further analysis revealed that expression of a dominant negative mutant form of ARF1 inhibited MMP-9 secretion by 22%. Our findings demonstrate that another BFA sensitive ARF isoform, ARF1, also regulates MMP-9 activity in tumor cells. Analysis of pro-MMP-9 expression was similar in control and ARF1-depleted conditions. However, the level of active MMP-9 in both the basal and EGF-stimulated conditions was markedly reduced in ARF1 knocked down cells, suggesting a key role of this ARF in the activation process. In contrast to other approaches that resulted in both MMP-9 and MMP-2 inhibition (L. Li et al., 2011), ARF1 depletion selectively blocked MMP-9, demonstrating specificity of this GTPase toward a particular MMP. Whether ARF1 regulates the activity of other proteases remains to be examined.

Proteolytic degradation of the basement membrane by MMP is dependent on the formation of membrane protrusions and/or release of membrane-derived microvesicles, the two key structures associated with proteolytic degradation of the extracellular matrix. In this study, we demonstrate that depletion of ARF1 markedly impaired maturation of invadopodia as well as shedding of microvesicles. Although ARF1 does not localize to invadopodia, our data suggest that this ARF isoform might act as a molecular switch to coordinate the downstream signalling events important for this process by acting on the recruitment or function of key proteins involved in invadopodia maturation and stabilization. In contrast, we report that ARF1 can be found in shedding microvesicles. Over the years, numerous bioactive molecules, similar to the ones present in plasma membrane, have been found in microvesicles (Ratajczak, Wysoczynski, Hayek, Janowska-Wieczorek, & Ratajczak, 2006). These structures are known to carry signalling complexes and considered as constituents of the tumour environment. Their role in carcinogenesis is therefore pivotal. In MDA-MB-231 cells, silencing of ARF1 reduced by 32% the amount of shedding microvesicles suggesting that this GTPase acts, in part, to control microvesicle fission. Our data therefore indicate that ARF1 modulates breast cancer cell invasiveness by affecting the cellular structures formed to breach the matrix, and associated MMP-9 activity.

Our analysis of the signalling pathway by which ARF1 controlled invasion of cancer cells revealed that this particular GTPase modulates the activity of another family of small GTP-binding proteins, the Rho family. This family includes three isoforms, RhoA, RhoB, and RhoC. RhoA and RhoC are oncogenic and associated with enhanced cell proliferation and invasion, whereas RhoB has tumor suppressor properties (Sahai & Marshall, 2002; Wheeler & Ridley, 2004). The roles played by RhoA and C isoforms are believed to be distinct. RhoA regulates invasion through its ability to target MT1-MMP at the invadopodia of MDA-MB-231 cells (Sakurai-Yageta et al., 2008). Alternatively, RhoC was reported to control cofilin activity at invadopodia of MTLn3 cells, a highly metastatic rat mammary adenocarcinoma cell line (Bravo-Cordero et al., 2011). In MDA-MB-231 cells, ARF1, RhoA and RhoC are highly expressed and activated upon EGF stimulation. In our cell model, we confirm that RhoA/C is also a key factor of invasion. Our results show that ARF1 controls the activity of both GTPases, thereby affecting the

specific function of these two isoforms during the invasion process. This effect was further supported by the use of two other cell lines: the HCC70, another triple negative breast cancer cell line and the SKBR-3, a HER2+ breast cancer cell line, suggesting that the effect of ARF1 on RhoA/C is not cell type specific, but could represent a general mechanism. It was previously suggested that ARF1 could act upstream of Rho in the context of stress fiber formation (Norman et al., 1998). By demonstrating here that ARF1 and Rho GTPases can be found in complex and that depletion of this ARF abolished the ability of an extracellular stimulus to activate Rho, we clearly show that ARF1 is an upstream regulator of Rho activity. Interestingly, we have observed a rapid and transient initial phase of activation as well as a second sustained phase of activation for both families of GTPases. The exact role of those two rounds of activation remains to be determined. Moreover, the association of the two GTPases occurs at time points where both ARF1 and RhoA/C are maximally activated. As many signalling events, including EGFR internalization, occur after ligand binding, the localization of the pools of activated GTPases might differ. The second phase of ARF1 activation appears to be regulated in part by Rho activation suggesting a feed back regulatory mechanism. Interestingly, we have observed the presence of RhoA/C in shedding microvesicles and demonstrated that in these structures, ARF1 and RhoA/C can be found in complex. In a previous report, RhoA was not detected in microvesicles of MDA-MB-231 cell line (B. Li et al., 2012). Our findings may be explained by a higher sensitivity of our approach.

Recently, we have reported that ARF1 also acts to control Rac1 activation in MDA-MB-231 cells (Lewis-Saravalli et al., 2013). This GTPase is a member of the Rho-family of small GTP-binding proteins, and is well known for its role in cell migration. Together with the data we report here, our findings further support a central role for ARF1 in the regulation of this family of GTPases. First, depletion of ARF1 greatly impairs Rac1 activation thereby limiting membrane targeting of IRSp53, cytoskeletal reorganization and cell migration. Second, this ARF isoform controls Rho activity to regulate MLC phosphorylation, proteolytic activity and invasiveness. By modulating Rac1 and RhoA/C activity, ARF1 acts as a central regulator of the two key features conferring the invasive phenotype of cancer cells. Furthermore, our previous work has demonstrated that depletion of ARF1 leads to the inactivation of the PI3K pathway in MDA-MB-231 cells

(Boulay et al., 2008). It is well documented that Rac1 activation can be dependent upon PI3K activation (for review, see (Welch, Coadwell, Stephens, & Hawkins, 2003)). Similarly, different groups have reported that RhoA and RhoC activation can be regulated by the PI3K/Akt signaling axis (Kakinuma, Roy, Zhu, Wang, & Kiyama, 2008; Qiang, Yao, Tosato, & Rudikoff, 2004; Ruth et al., 2006). Together, these observations suggest that ARF1 might control Rac1 and RhoA\C activation by a mechanism involving the PI3K/Akt pathway.

Altogether, our findings demonstrate that ARF proteins are key regulators of invasion. The demonstration that ARF1 regulates invasiveness complements previous reports that have highlighted the role of ARF6 in this process (Hashimoto et al., 2004; Tague, Muralidharan, & D'Souza-Schorey, 2004). This ARF isoform was reported to regulate both invadopodia formation and microvesicle shedding, although through different mechanisms (Hashimoto et al., 2004; Muralidharan-Chari et al., 2009; Tague et al., 2004). We have previously demonstrated that in MDA-MB-231 cells, EGF stimulation activates ARF1 and ARF6 to modulate, respectively, the PI3K and Erk pathway (Boulay et al., 2008). This illustrates that, although the physiological endpoint might be similar, in that case cell migration, the means by which proteins regulate the events leading to that response can be different.

Our findings uncover an unsuspected new role for ARF1 in regulating key events important for cellular invasion, revealing a new potential therapeutic target for treatment of invasive breast cancers. Gaining an understanding of the molecular mechanisms by which intracellular signalling proteins control key feature of cancer cells is crucial for the development of novel therapies.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and antibodies

BD Matrigel matrix was purchased from BD Bioscience (Bedford, MA, USA). Lipofectamine 2000, FITC-gelatin (G13187), Alexa Fluor 488-phalloidin, Rhodamine-phalloidin and Hoechst were purchased from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Anti-ARF1 was obtained from ProteinTech (Chicago, IL, USA). Anti-cortactin, anti-myosin light chain 2 (MLC), anti-myosin light chain 2 Thr¹⁸/Ser¹⁹, anti-pan-actin, anti-cortactin and anti-RhoC were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Anti-pro-MMP-9 (IM09L) antibody was obtained from Calbiochem (Gibbstown, NJ, USA) and anti-MMP9 from Abcam (Cambridge, MA, USA). Anti-MHC class I (H300), anti-RhoA (26C4), anti-MMP-2 (H-76), anti-Ub (P4D1) and anti-Tks5 (M-300) were purchased from Santa Cruz Biotech Inc. (Santa Cruz, CA, USA). All others products were from Sigma Aldrich Company (Oakville, ON, Canada).

Cell culture and transfection

MDA-MB-231, SKBR3, and HCC70 cells were obtained from Dr. Sylvie Mader (University of Montreal, Quebec, Canada). MDA-MB-231 and SKBR3 cells were maintained in Dulbecco's modied Eagle's medium and HCC70 in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin (Wisent, St-Bruno, CAN). Cells were maintained at 37°C in 5% CO₂. Cells were transfected with DNA and/or siRNA using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions. ARF1 siRNA used throughout this paper was designed against part of the 3' UTR and coding region of ARF1, ARF1 siRNA 2 used in supplemental figure 1 and 3 was designed against the C-terminal coding region. ARF1 and scrambled siRNA were synthesized by Thermo Science Dharmacon (Lafayette, CO, USA). DNA used were pRK5, pcDNA 3.1, RhoA T¹⁹N-myc (gift from S. Offermanns, University of Heidelberg, Germany), RhoC T¹⁹N-HA (Missouri S&T cDNA Research Center, USA), ARF1-HA (gift from N. Vitale, Université de Strasbourg, France), ARF1 T³¹N and ARF1 Q⁷¹L (gift from J. Presley, McGill University, Canada). For rescue experiments, ARF1-HA was transfected 24 hours after introduction of the ARF1 siRNA 1.

Invasion and Migration Assays

Cells were transfected with siRNA (72 hours) and serum starved before the assay. Briefly, cells were trypsinized and seeded into Boyden chambers (24-well inserts with 8µm pore, pre-coated with Matrigel). One hour after plating, cells were stimulated with EGF (30 ng/ml). After 20 hours, cells were fixed using 4% paraformaldehyde and incubated with 0.1% crystal violet. Membranes were washed with PBS and cells present in the upper chamber were removed using a cotton swab. The number of cells, in the lower chamber, was counted manually under a phase contrast microscope. Pictures were taken using an inverted Leica microscope. Relative migration was quantified using ImageJ (NIH, MD, USA). For the migration assays, the experiments were done as described above using uncoated Boyden chambers.

Three-dimensional morphogenesis

Cells were plated into Matrigel-coated 48-well plate, 48 hours after transfection with scrambled or ARF1 siRNAs. Cultures were overlaid with media containing 2.5% Matrigel and grown for 5 days as previously done (Debnath et al., 2002; Lee et al., 2007). Cell colonies were defined as being either stellate or spheroidal. A colony was deemed stellate if one or more projections from the central sphere of cells were observed. Images were taken on an inverted microscope (Leica).

Gelatin degradation

Coverslips were coated with Poly-L-Lysine and fixed with glutaraldehyde. The slides were then covered with 500 µl of Alexa Fluor 488-coupled gelatin (0.02% porcine gelatin Alexa Fluor 488, 0.1% porcine gelatin, 0.2% sucrose) (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) for 3 hours at 37°C, in the dark. Slide were sterilized with ethanol, rinsed with PBS and left in media. Cells were added and left to adhere for 16 hours. The cells were then labeled with rhodamine-phalloidin and immunofluorescence observed using a confocal microscope (LSM510META, Carl Zeiss). For real time imaging, cells were seeded onto a glass-bottom petri dish (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) in Leibovitz's 15 media (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Pictures were taken after 1 hour to give them time to spread. The ambient temperature was maintained at 37°C with a thermostated sealed chamber around the confocal microscope. Pictures were taken using a confocal microscope (LSM510META, Carl Zeiss).

Microscopy

The cells were fixed with a phosphate buffer saline (PBS) solution containing 4% paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature and then permeabilized with a solution of DMEM containing 0.05% saponin. The slides were incubated for 1 hour with a primary antibody. After several washes, the plates were incubated for 1 hour in the dark in the presence of an anti-mouse or anti-rabbit Alexa Fluor 488-antibody (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). They were then mounted on slides using a solution of Aquamount (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) and observed using a confocal microscope (LSM510META, Carl Zeiss).

Microvesicle isolation

Cells were first seeded in 15cm dishes. After three days, media was carefully removed and subjected to differential centrifugations (800 g, 10 minutes; 10,000 g, 30 minutes, 100,000 g, 60 minutes) as previously described (Muralidharan-Chari et al., 2009). Isolated microvesicles were washed in PBS and lysed in TGH buffer (Boulay et al., 2008). Protein content was assessed using BCA protein assay and normalized from total cell lysate (Fisher, Ottawa, ON, Canada).

Electron Microscopy

The 10,000 g pellet from the cell culture supernatant was fixed by immersion in 1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for 2 hours and embedded in Epon (K4M CANEMCO; St-Laurent, QC, Canada). Thin sections (70–100 nm) of pellets were mounted on Nickel-coated grids. Samples were processed as previously described (Bendayan, 1995). First, the samples were incubated with 1% ovalbumin, then with the anti-ARF1 antibody for 2 hours and finally with the protein A-gold complex (10 nm) for 30 minutes at room temperature. Control experiments to assess the specificity of the immunogold were performed by omitting the anti-ARF1 antibody. Sections were thoroughly washed with PBS/H₂O. Samples were counterstained with uranyl acetate and examined using a transmission electron microscope (CM 100, Philips /FEI Corporation).

Rho activation

Cells were transfected with scrambled or ARF1 siRNAs (50 nM) and activation of Rho was performed as previously described (Piekny & Glotzer, 2008). Briefly, cells were washed with TBS and lysed in 300 µl of ice-cold MLB lysis buffer (25 mM Hepes, 150

mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.3 mg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride complemented with protease inhibitors and 1 nM sodium orthovanadate). Samples were vortexed for 10 seconds and spun for 10 minutes at 10,000 g. GST-Rhotekin coupled to glutathione sepharose 4B were added to each tube and samples were rotated at 4°C for 90 minutes. Beads were washed and proteins were eluted in 25 µl SDS sample buffer by heating to 65°C for 15 minutes. Detection of Rho-GTP was performed by immunoblot analysis using a specific anti-RhoA or anti-RhoC antibody.

ARF1 activation

Cells transfected with scrambled, RhoA or RhoC (50 nM) siRNAs were washed with TBS and lysed in 300 µl of ice-cold MLB lysis buffer. Samples were vortexed for 10 seconds and spun for 10 minutes at 10,000 g. GST-GGA3 coupled to glutathione sepharose 4B were added to each tube and samples were rotated at 4°C for 45 minutes. Beads were washed and proteins were eluted in 25 µl SDS sample buffer by heating to 65°C for 15 minutes. Detection of ARF1-GTP was performed by immunoblot analysis using a specific anti-ARF1 antibody.

Co-immunoprecipitation

MDA-MB-231 cells were serum starved overnight and stimulated with EGF (100 ng/ml) for the indicated times. Co-immunoprecipitation experiments were described previously (Cotton et al., 2007). Briefly, cells were lysed into TGH buffer and RhoA or RhoC were immunoprecipitated using the anti-RhoA or anti-RhoC antibody. Interacting ARF1 was assessed by Western blot analysis.

Western Blotting

Cells were harvested and total soluble proteins were run on polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blotted for relevant proteins using specific primary antibodies (as described for each experiment). Secondary antibodies were FITC or HRP-conjugated and fluorescence was detected using a Typhoon 9410 scanner (GE Healthcare, life Sciences) or with ECL detection reagent. Quantification of the digital images obtained was performed using ImageQuant 5.2 software.

Gelatin zymography

Zymography assays were performed as previously described (Chavey et al., 2003). To assess MMP activity present in cell supernatant, cells were first serum-starved for 12h. The supernatant was recovered and concentrated using Microcon tube (Cedarlane, Burlington, ON, Canada). Samples were mixed with non-denaturing SDS-sample buffer and migrated on a 10% polyacrylamide gel containing 0.1% gelatin. To assess MMP activity present in the microvesicles, microvesicle lysates (described above) were directly incubated with non-denaturing SDS-sample buffer and migrated on a 10% polyacrylamide gel containing 0.1% gelatin as for the whole supernatant experiments. The gel was then incubated twice for 30 minutes in a 3.5% Triton solution. Once the enzymes partially renatured, the gels were incubated overnight in a solution of Brij (0.02% Polyoxyethylene 20 cetyl ether, 5 mM CaCl₂, 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4) containing or not a broad-spectrum inhibitor, Batimastat (BB-94, 10µM). Gels were stained for 10 minutes with Coomassie blue and then washed several hours (5% acetic acid, 10% Methanol). Enzymatic activities appear as cleared bands on a dark background.

RNA extraction

Total RNA was extracted from MDA-MB-231 with TRIzol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RT-PCR was performed by the IRIC's genomic platform (IRIC's Genomics Core Facility, Université de Montréal, Montréal, Canada).

MTT assay

The number of proliferative cells was measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Briefly, cells were cultured in DMEM in 96-well plates (1×10^4 cells/well), left untreated (non-stimulated; n.s.) or stimulated with EGF. After 20 hours, cells were incubated with 20µl of MTT (5 mg/ml) for an additional 4 h at 37°C, after which the crystals were dissolved using a dissolving buffer (50% Sodium dodecyl sulfate (SDS) and 50% dimethyl foramide (DMF)). After complete dissolution of the crystals, the absorbance at 570 nm was immediately measured on a microplate reader (Wallac Victor, Perkin Elmer, MA, USA).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using a one-way analysis of variance followed by Bonferroni's multiple comparison tests or T test using GraphPad Prism (ver. 4.0a; San Diego, CA, USA).

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank D. Gingras (Université de Montréal, Montreal, Canada) from the electron microscopy facility. The authors are grateful to Cyril Bignone (Level Designer, Montreal, Canada) for conception of the synthesis video and to Eric Haines (Université de Montréal, Montreal, Canada) for voice narration. We thank Dr Stéphane A Laporte (McGill University, Montreal, Canada) for the use of his confocal microscope. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (grant number: MOP-106596 to AC). AC is the recipient of a Senior Scientist Award from the Fonds de Recherche du Québec- Santé.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Modulation of ARF1 expression affects cell invasion. (A) Cells were transfected with a scrambled or ARF1 siRNA, empty vector (control), ARF1, ARF1 T³¹N or ARF1 Q⁷¹L and seeded onto Alexa Fluor 488-coupled gelatin. After 16 hours, cells were fixed and actin stained using Alexa Fluor 568-phalloidin. Images are representative of three independent experiments with over 100 cells examined per condition. Quantification of data is the mean \pm standard error of the mean (SEM) of three experiments. * P <0.05, ** P <0.01, values are compared with control conditions. Scale bars are 20 μ m. (B) MDA-MB-231 cells were transfected with a scrambled or ARF1 siRNA, and seeded into Matrigel-coated Boyden chambers. Cells were left untreated (non-stimulated; n.s.) or stimulated with EGF (30 ng/ml) for 20 hours. Images are from the lower part of the Boyden chambers and are representative of three images taken per condition. Quantifications are the mean \pm SEM of five independent experiments. *** P <0.001 are values compared to the indicated condition. ARF1 level was assessed by Western blotting. (C) Cells were transfected as in A, and 48 hours after transfection, they were seeded into Matrigel and allowed to proliferate for five days. Upper left magnifications are showing 4 and 3 cells, respectively. Images are representative of three

independent experiments with over 100 cells examined per condition. Scale bars are 100 μm .

Fig. 2. Modulation of ARF1 expression and MMP-9 activity. (A) MDA-MB-231 cells seeded in 6-well plates were transfected with either scrambled or ARF1 siRNA. 72 hours later, cells were deprived of serum. Cells were stimulated or not for 12 hours, with EGF (100 ng/ml). Supernatants were collected and analyzed by zymography. A broad-spectrum inhibitor, Batimastat (BB-94, 10 μM) was used to confirm the specific effect of MMPs. This experiment is representative of five others. Quantification is the mean \pm SEM of five independent experiments. $*P < 0.05$, $*** P < 0.001$. (B) Cells were transfected with control siRNA or siRNA against ARF1 and pro-MMP9 was immunoprecipitated using a specific antibody. Level of pro-MMP-9, ARF1, actin and ubiquitinylation was detected using specific antibodies. Middle panels represent quantification of the level of pro-MMP-9 and the level of pro-MMP-9 ubiquitinylation as determined by Western blot analysis of whole cell extracts. Quantifications are the mean \pm SEM of five experiments. $*** P < 0.001$. (C) Cells were transfected as in A and total RNA was extracted from MDA-MB-231 with TRIzol reagent. Right panel represents pro-MMP-9 mRNA and is representative of three experiments performed in triplicates. $**P < 0.01$.

Fig. 3. ARF1 depletion blocks invadopodia maturation. (A) Cells were transfected with scrambled or ARF1 siRNA and seeded onto non-fluorescent gelatin. After 16 hours, cells were fixed and stained for actin and cortactin to visualize invadopodia. Cross sections were further analyzed through Z-stack. Images are representative of three independent experiments with over 50 cells examined per condition, scale bars: 10 μm . Quantification of invadopodia number is representative of 30 cells from three independent experiments. Quantification of invadopodia width is representative of 8 invadopodia in 5 cells per condition, from three independent experiments. $*** P < 0.001$. (B) Cells were prepared as in A and stained for actin and Tks5 to assess invadopodia maturation. Scale bars: 10 μm . Quantification of Tks5 amount in invadopodia is representative of 5 invadopodia in 5 cells per condition, from three independent experiments. $*** P < 0.001$.

Fig. 4. ARF1 is found in shedding microvesicles and controls their release. (A) Cell culture media was collected and centrifuged to isolate shedding vesicles. Samples of each fraction were analyzed by Western blot and the presence of endogenous ARF1 protein was observed in the 10,000 g fraction. This experiment is representative of three others (left panel). Shedding microvesicles isolated by differential centrifugations were embedded in Epon and examined by electron microscopy (right side). The electron microscopy image on the left shows vesicles positive for ARF1, and the image on the right is the negative control (no ARF1 antibody). Scale bars are 250 nm. These images are representative of 30 others taken from three independent experiments (10 images per experiment). (B) Cells were transfected with a scrambled or ARF1 siRNA or treated with a vehicle, ML-7 (10 μ M) or (-)-Blebbistatin (100 μ M) overnight and shedding microvesicles isolated as in (A). Quantification of shedding microvesicles was performed by measuring protein content in both conditions (left panel). Depletion of ARF1 and level of endogenous cortactin and major histocompatibility complex-class (MHC-class I) was confirmed by Western blot. Results are the mean \pm SEM of five independent experiments. $**P<0.01$ and $***P<0.001$, are values compared to the control or vehicle condition. (C) Microvesicle lysates were prepared from cells transfected with a scrambled or ARF1 siRNA and subjected to zymography (left panel) or Western blot (right panel). The level of MMP-9, MMP-2, cortactin and MHC-class I was determined by Western blot using specific antibodies. Lower panels represent the level of ARF1 and actin in the whole cell extracts detected by Western blot. Results are the mean \pm SEM of five experiments. $*P<0.05$ are values compared to the control condition.

Fig. 5. ARF1, RhoA and RhoC control the phosphorylation of MLC upon EGF treatment. (A) MDA-MB-231 cells transfected with a scrambled or ARF1 siRNA were stimulated with EGF (100 ng/ml) for the indicated times. Endogenously expressed MLC (phosphorylated and total) and ARF1 were detected by Western immunoblotting using specific antibodies. Quantifications are the mean \pm SEM of four independent experiments. (B and C) Cells were transfected with a scrambled, RhoA or RhoC siRNA. As in (A), P-MLC, MLC, and ARF1 were detected by Western blotting. Data are the mean \pm SEM of three experiments. $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ are values compared to the control siRNA condition.

Fig. 6. ARF1 controls Rho GTPases activation and localization. (A, B) Cells transfected with scrambled or ARF1 siRNA were stimulated with EGF (100 ng/ml) for the indicated times. Rho-GTP levels were assessed by Western blot analysis. Levels of ARF1, RhoA, RhoC and actin protein were also determined by Western blot. (A) Early time points of EGF stimulation; Data are the mean \pm SEM of three experiments. (B) Longer time points of EGF stimulation; Data are the mean \pm SEM of three to five experiments. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 are values compared with non-stimulated control siRNA conditions. (C) Control (scrambled siRNA) and ARF1-depleted cells were stimulated with EGF (100 ng/ml) for the indicated times. Membrane fractions were prepared as described in Methods and associated RhoA and RhoC were assessed by Western blotting. These experiments are representative of three and five others. β 1-integrin was used as a marker of plasma membrane and Bcl-2 as a marker of cytosol.

Fig. 7. RhoA and RhoC control the late phase of ARF1 activation. MDA-MB-231 cells were transfected with a scrambled, RhoA or RhoC siRNA and stimulated with EGF (100 ng/ml) for the indicated time. The active forms of ARF1, as well as endogenous level of ARF1, RhoA, RhoC, and actin were analyzed by Western blot. (A) Early time points of EGF stimulation; Quantifications are the mean \pm SEM of three independent experiments. (B) Longer time points of EGF stimulation; Results are the mean \pm SEM of three to four independent experiments. * P <0.05, ** P <0.01 are values compared with the non-stimulated scrambled siRNA condition.

Fig. 8. EGF stimulation promotes the association of ARF1 and Rho GTPases. (A) MDA-MB-231 cells were stimulated with EGF (100 ng/ml) for the indicated time. RhoA and RhoC were immunoprecipitated and associated ARF1 detected by Western blotting. Data are the mean \pm SEM of three and four experiments. * P <0.05, ** P <0.01 are values compared with the non-stimulated scrambled siRNA condition. (B) Shedding microvesicles were isolated by differential centrifugations and RhoA/C detected by Western blotting. These experiments are representative of three others. (C) RhoA and RhoC were immunoprecipitated from shedding microvesicle lysates and associated ARF1 detected by Western blotting. Control (ctl) refers to conditions where pre-immune serum was used instead of the anti-RhoA/C. MHC-class 1 was used as a marker of shedding

microvesicle and cortactin as a cellular marker. Results are the mean \pm SEM of three to four independent experiments. *** P <0.001 are values compared with control conditions.

Fig. 9. Modulation of the Rho/MLC pathway by ARF1 controls the release of shedding microvesicles. (A) Cells were transfected with constitutively active forms of RhoA and/or RhoC (RhoA Q⁶³L; RhoC G¹⁴V) and a scrambled or ARF1 siRNA. The release of shedding microvesicles was quantified by assessing protein contents in all conditions. Results are mean \pm SEM of three independent experiments. ** P <0.01, *** P <0.001 are values compared to the empty vector or scrambled siRNA (dotted line). (B) Cells were transfected with the dominant negative mutants of RhoA and/or RhoC (T¹⁹N) and the release of shedding microvesicles was performed as in (A) Results are the mean \pm SEM of five independent experiments. ** P <0.01, *** P <0.001 are values compared to the empty vector control condition (dotted line). (C) Cells were transfected as in (A and B) and seeded into Matrigel-coated Boyden chambers. EGF (100 ng/ml) was added for a period of 20 hours. Data are the mean \pm SEM of three experiments * P <0.05, ** P <0.01 are values compared to the control condition (dotted line).

Supplemental Fig. 1. ARF1 levels in the different experimental conditions. (A) Cells were transfected with a scrambled, two different sequences of ARF1 siRNA, empty vector or ARF1 and seeded onto Alexa 488-coupled gelatin. After 16 hours, cells were fixed and actin stained using Alexa Fluor 568-phalloidin. Images are representative of three independent experiments. Cells were harvested for each condition and ARF1 level determined by Western blotting. (B) MDA-MB-231 cells were transfected with a control vector, ARF1, ARF1 T³¹N or ARF1 Q⁷¹L. Cells were harvested for each condition and ARF1 levels determined by Western blotting. This experiment is representatives of five others. (C) Cells were transfected with a scrambled or ARF1 siRNA and seeded into 96 wells. Cells were left untreated (non-stimulated; n.s.) or stimulated with EGF for 20 hours and proliferation using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Quantifications are the mean \pm SEM of three independent experiments. * P <0.05 and ** P <0.01 are values compared to the indicated condition. (D) MDA-MB-231 cells were transfected as in C, and seeded into uncoated Boyden chambers. Cells were left untreated or stimulated with EGF for 20 hours. Quantifications

are the mean \pm SEM of three independent experiments. $*P<0.05$ and $**P<0.01$ are values compared to the indicated condition. (E) Cells were transfected as in C, and 48 hours after transfection, they were seeded into Matrigel and stained with the fluorophore Hoechst, to show that the same quantity of cell was added in each well. Scale bars are 100 μm .

Supplemental Fig. 2. ARF1 is present in shedding microvesicles. Shedding microvesicles isolated by differential centrifugations were embedded in Epon and examined by electron microscopy. The image on the left shows vesicles positive for ARF1, and the image on the right is the negative control (no ARF1 antibody). Scale bars are 250 nm. This image is representative of 30 other images obtained in 3 independent experiments.

Supplemental Fig. 3. Expression of ARF1-HA following ARF1 siRNA transfection can rescue Rho activation. Cells were transfected with scrambled, two different sequences of ARF1 siRNA and control vector or ARF1. Cells were left untreated or stimulated with EGF (100 ng/ml) for the indicated times. Activated ARF1, as well as endogenous level of ARF1, RhoA, RhoC, and actin were analyzed by Western blot. Quantifications are the mean \pm SEM of four independent experiments. $*P<0.05$, $**P<0.01$ and $***P<0.001$ are values compared to the indicated condition.

Supplemental Fig. 4. ARF1 controls Rho GTPases activation in SKR3 and HCC70 cells. (A, B) Cells transfected with scrambled or ARF1 siRNA were stimulated with EGF (100 ng/ml) for the indicated times. Rho-GTP levels were assessed by Western blot analysis. Levels of ARF1, RhoA, RhoC and actin protein were also determined by Western blot. Quantifications are the mean \pm SEM of three independent experiments. $*P<0.05$, $**P<0.01$ and $***P<0.001$ are values compared to the indicated condition.

Supplemental Fig. 5. Depletion of ARF1 impairs the recruitment of Rho GTPases to the plasma membrane. (A) Control and ARF1-depleted cells were stimulated with EGF (100 ng/ml) for the indicated times. Membrane fractions were prepared as described in the Method section and associated RhoA and RhoC were assessed by Western blotting. Quantifications are the mean \pm SEM of three to five experiments. $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ are values compared to the unstimulated control siRNA condition. (B) Cells

were processed as in A, detection of RhoA and RhoC in the cytosolic fraction and total cell lysates are presented. This experiment is representative of three to five others.

Supplemental Fig. 6. Overexpression of constitutively active RhoA Q⁶³L or RhoC G¹⁴V does not significantly affect ARF1 activation in cells but overexpression of constitutively active ARF1 Q⁷¹L decrease RhoA and RhoC activation. (A) MDA-MB-231 cells were transfected with control vector or constitutively active mutant forms of RhoA and RhoC. Activated ARF1 was assessed by Western blotting. Results are the mean \pm SEM of three independent experiments. (B) MDA-MB-231 cells were transfected with empty vector or constitutively active mutant forms of ARF1. Activated RhoA or RhoC were assessed by Western blotting. Results are the mean \pm SEM of three independent experiments. ** P <0.01, *** P <0.001 are values compared to the control siRNA condition.

Supplemental Fig. 7. Expression levels of ARF1, RhoA and RhoC mutants in MDA-MB-231 cells. (A) Cells were transfected with scrambled or ARF1 siRNA, control vector, RhoA T¹⁹N or RhoC T¹⁹N. Protein levels for each condition were examined by Western blot analysis of the cell lysates. This figure is representative of three independent experiments. (B) Cells were transfected with scrambled or ARF1 siRNA, control vector, RhoA Q⁶³L and/or RhoC G¹⁴V. Protein levels for each condition were examined by Western blot analysis of the cell lysates. This figure is representative of three independent experiments.

Movie 1. Model illustrating the role of ARF1 in cell invasion. Three dimensional modeling, materials and render were created with Autodesk 3dsMax software. Assembling video was realized with Adobe Premiere CS6.

Figure 1
Schlienger et al.

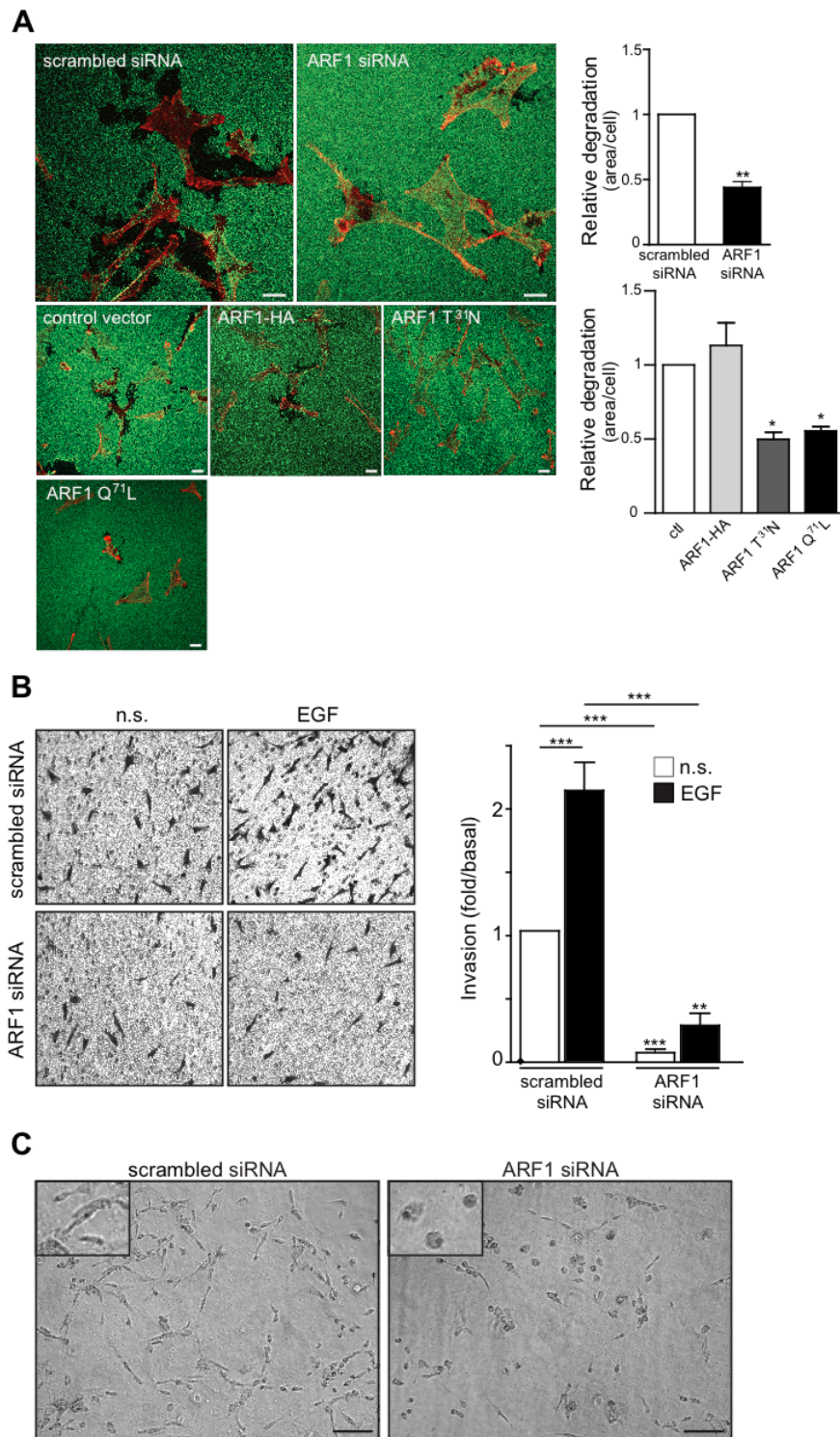


Figure II-1: Modulation of ARF1 expression affects cell invasion.

Figure 2
Schlienger et al.

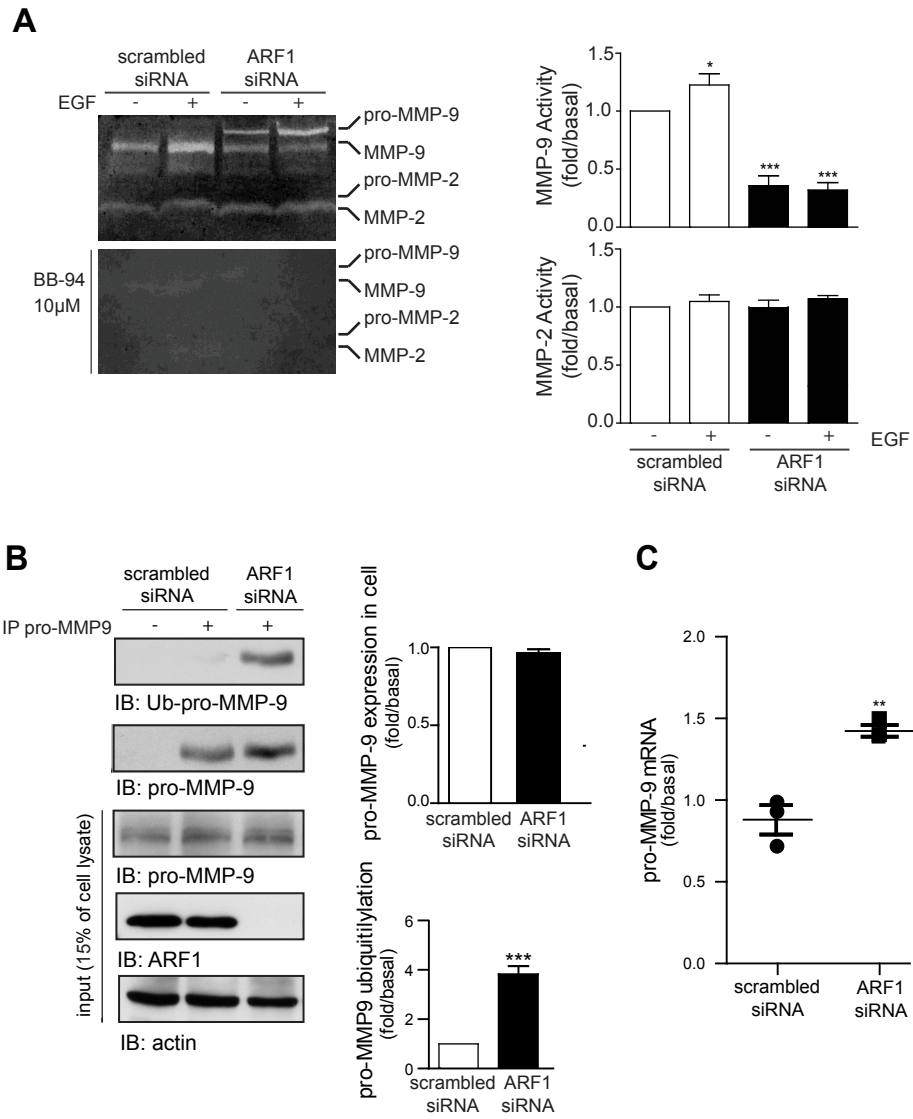


Figure II-2: Modulation of ARF1 expression and MMP-9 activity.

Figure 3
Schlienger et al.

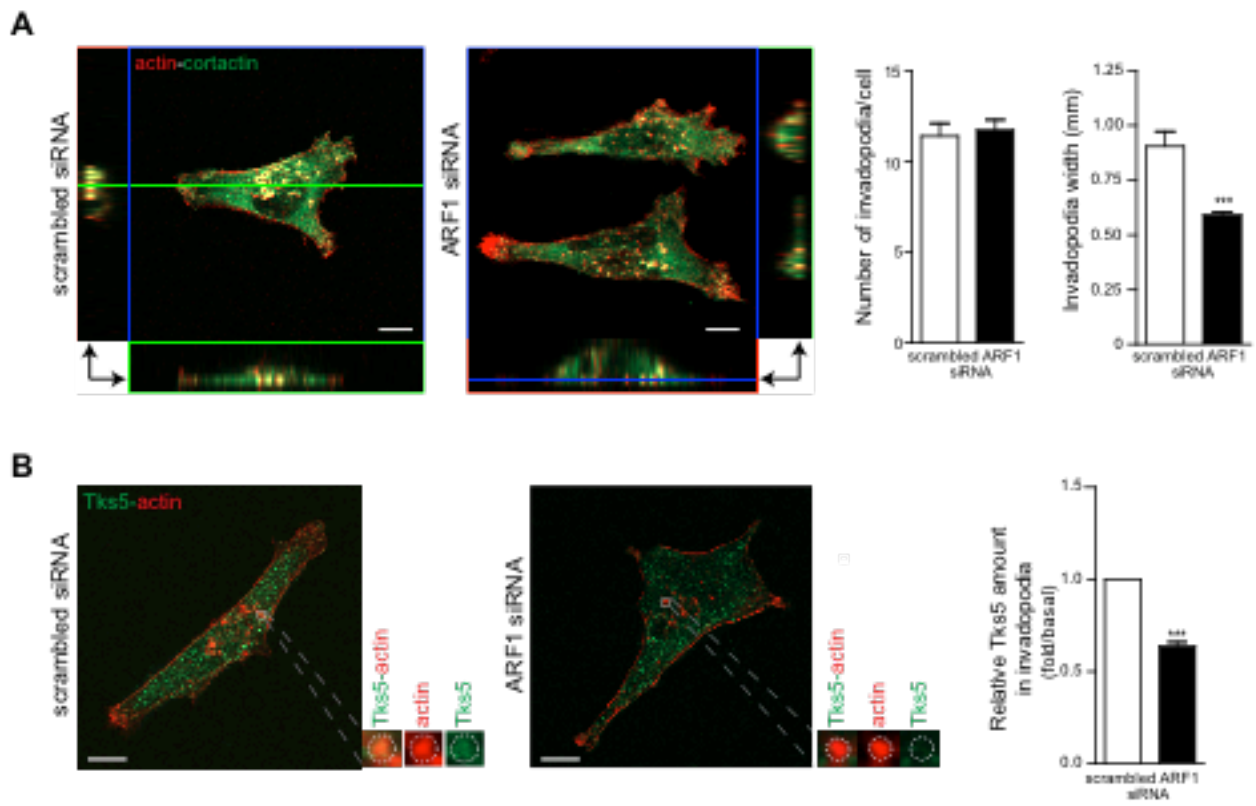


Figure II-3: ARF1 depletion blocks invadopodia maturation.

Figure 4
Schlienger et al.

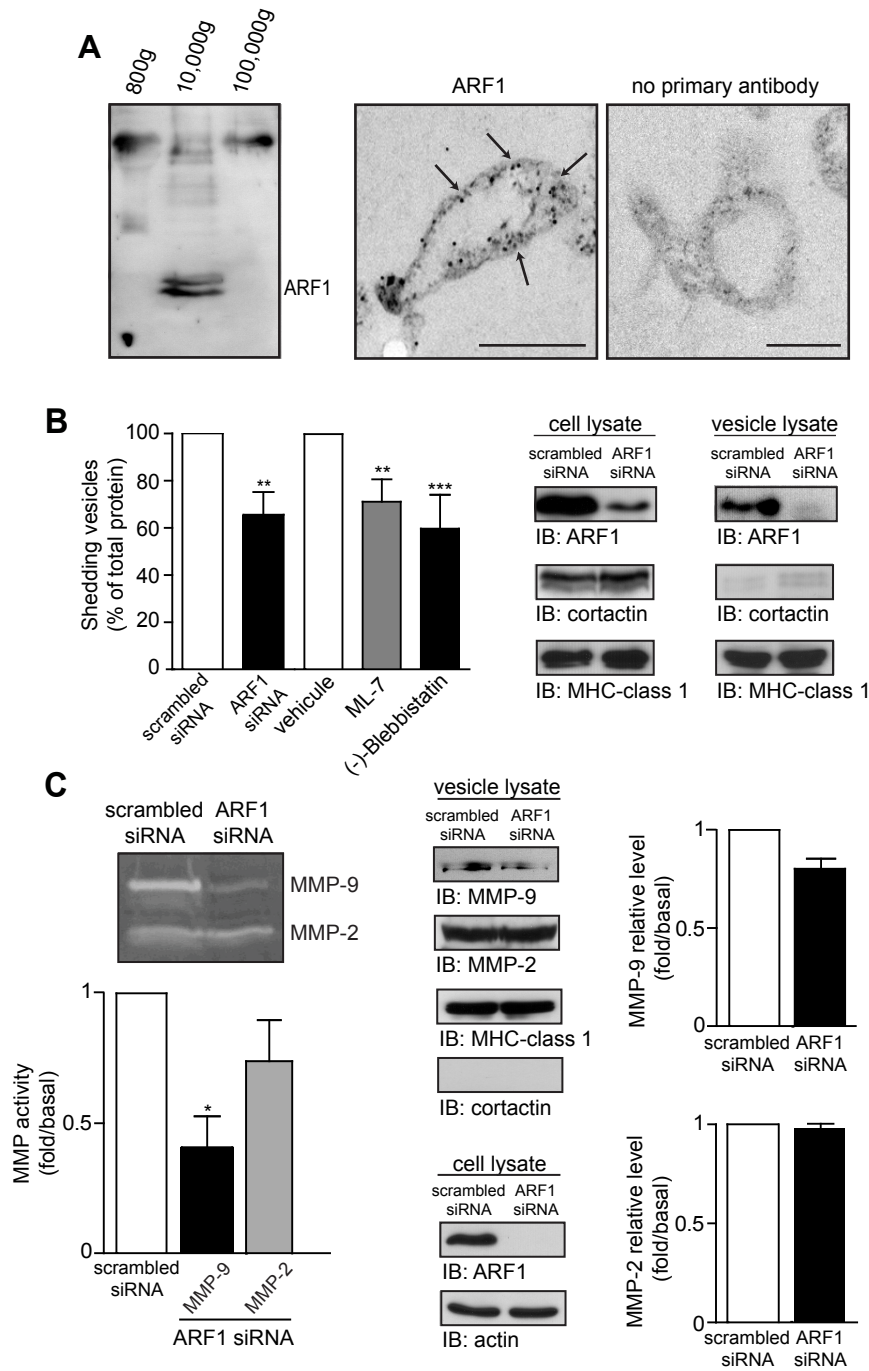


Figure II-4: ARF1 is found in shedding microvesicles and controls their release.

Figure 5
Schlienger et al.

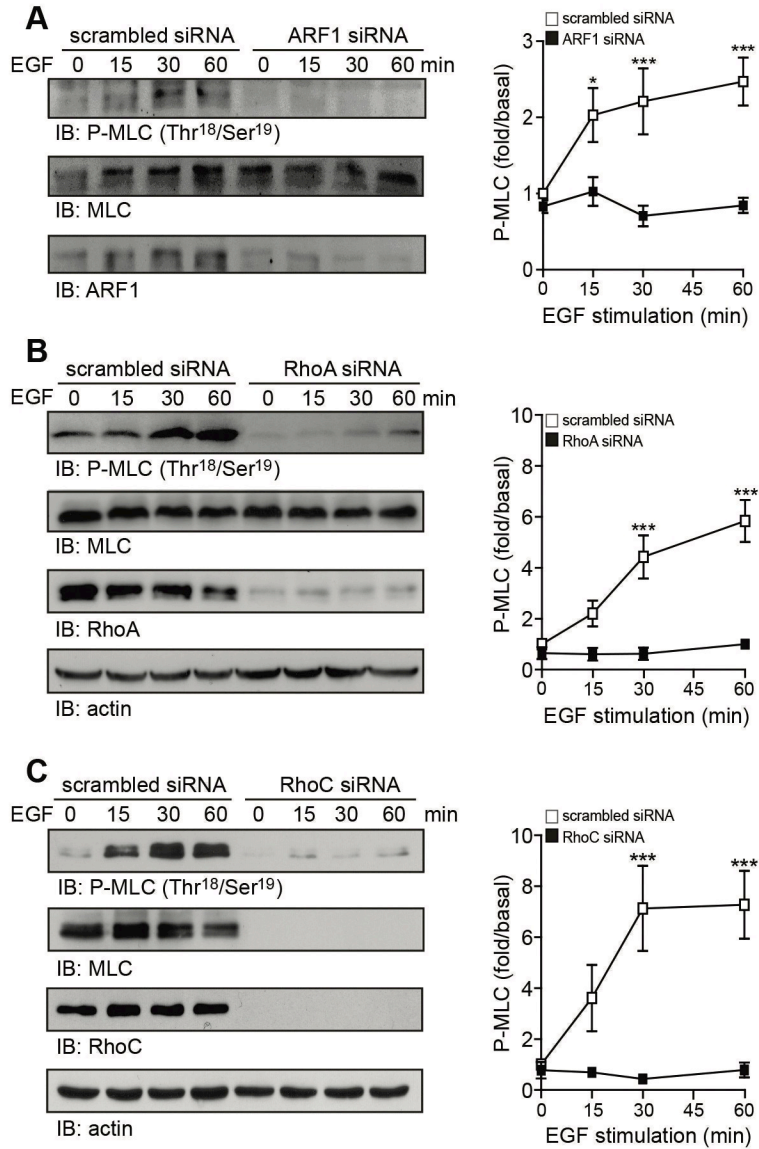


Figure II-5: ARF1, RhoA/RhoC control the phosphorylation of MLC upon EGF.

Figure 6
Schlienger et al.

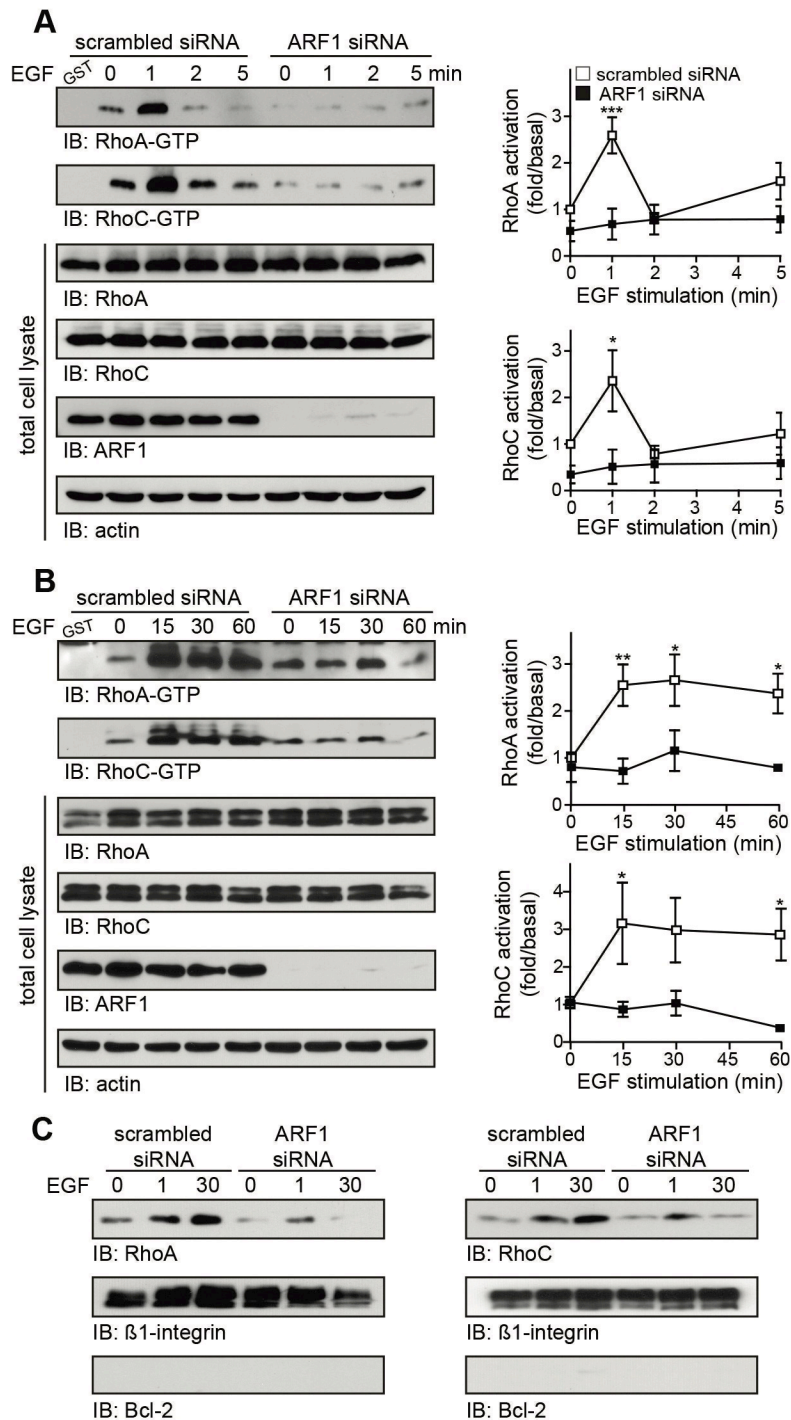


Figure II-6: ARF1 controls Rho GTPases activation and localization.

Figure 7
Schlienger et al.

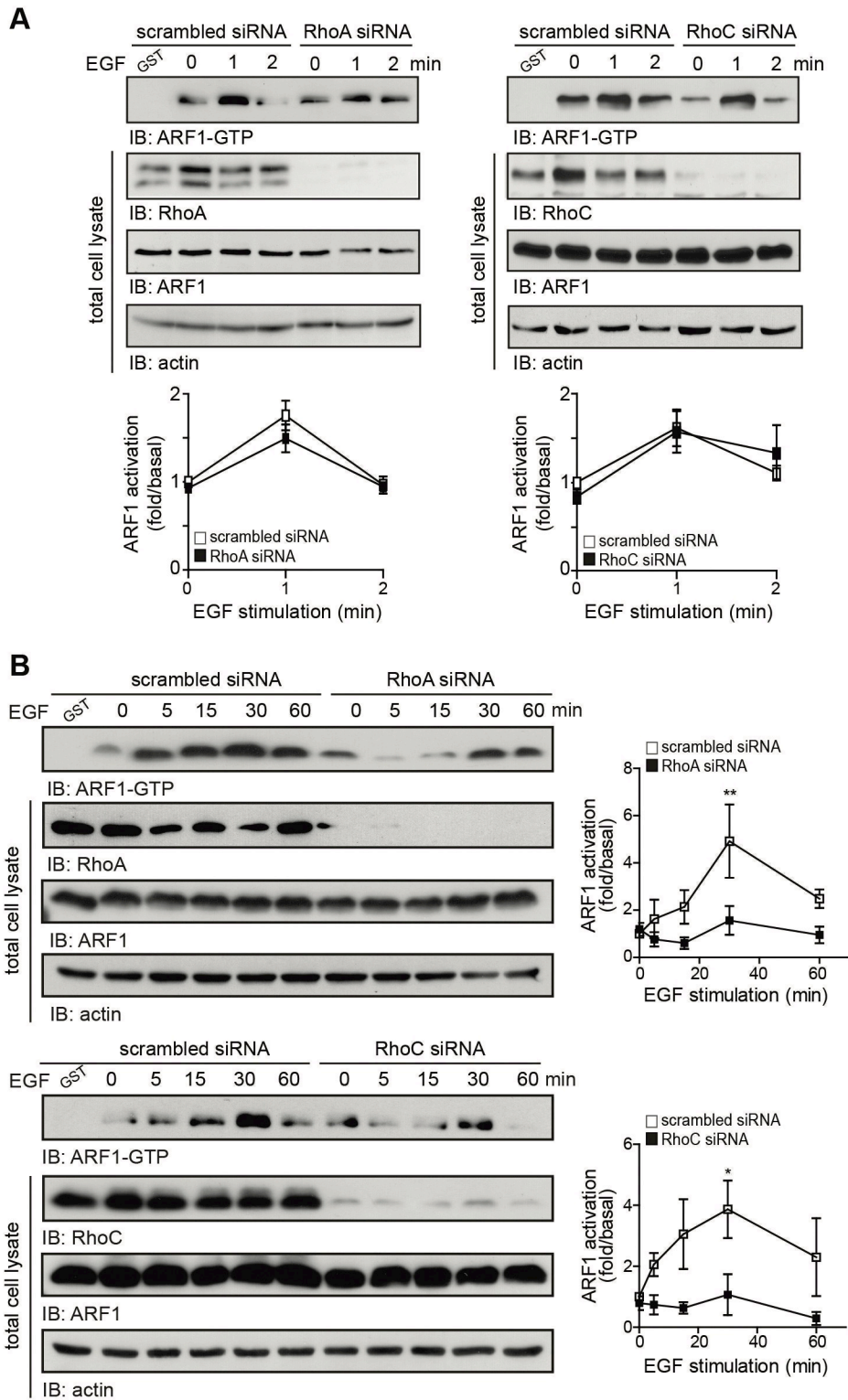


Figure II-7: RhoA and RhoC control the late phase of ARF1 activation.

Figure 8
Schlienger et al.

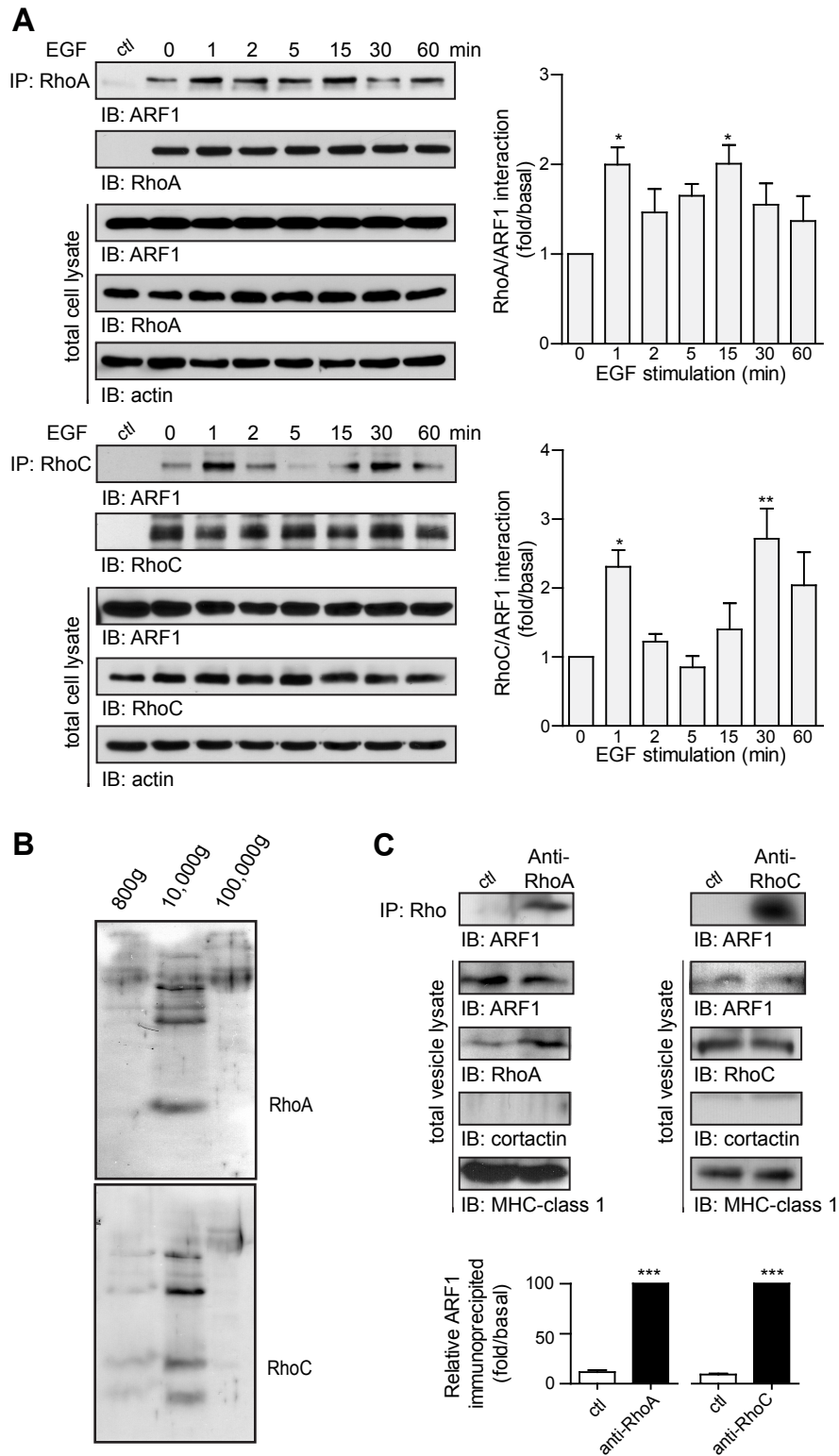


Figure II-8: EGF stimulation promotes the association of ARF1 and Rho GTPases.

Figure 9
Schlienger et al.

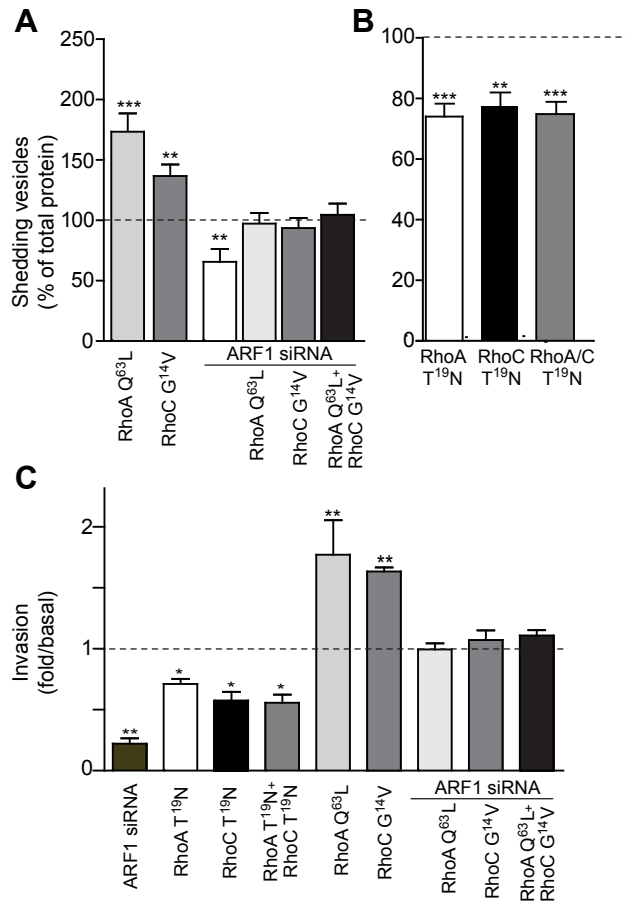


Figure II-9: Modulation of Rho/MLC by ARF1 controls the release of microvesicles.

Supplemental Figure 1
Schlienger et al.

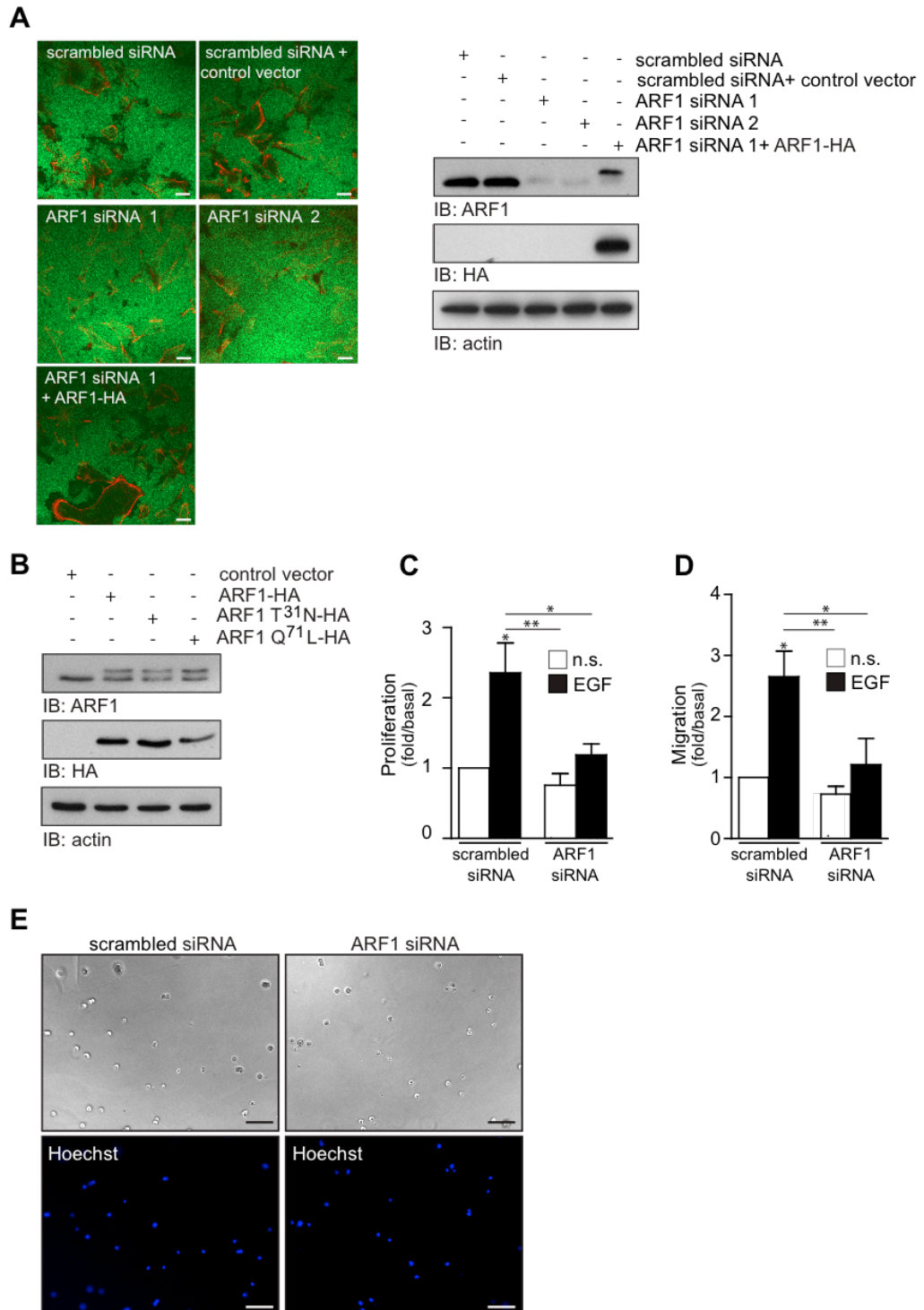


Figure II-10: Supp. 1. ARF1 levels in the different experimental conditions.

Supplemental Figure 2
Schlienger et al.

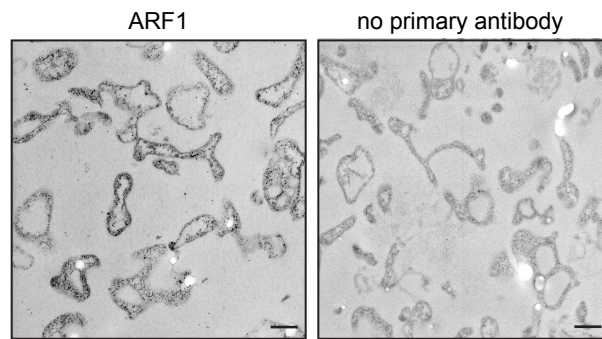


Figure II-11: Supp 2. ARF1 is present in shedding microvesicles.

Supplemental Figure 3
Schlienger et al.

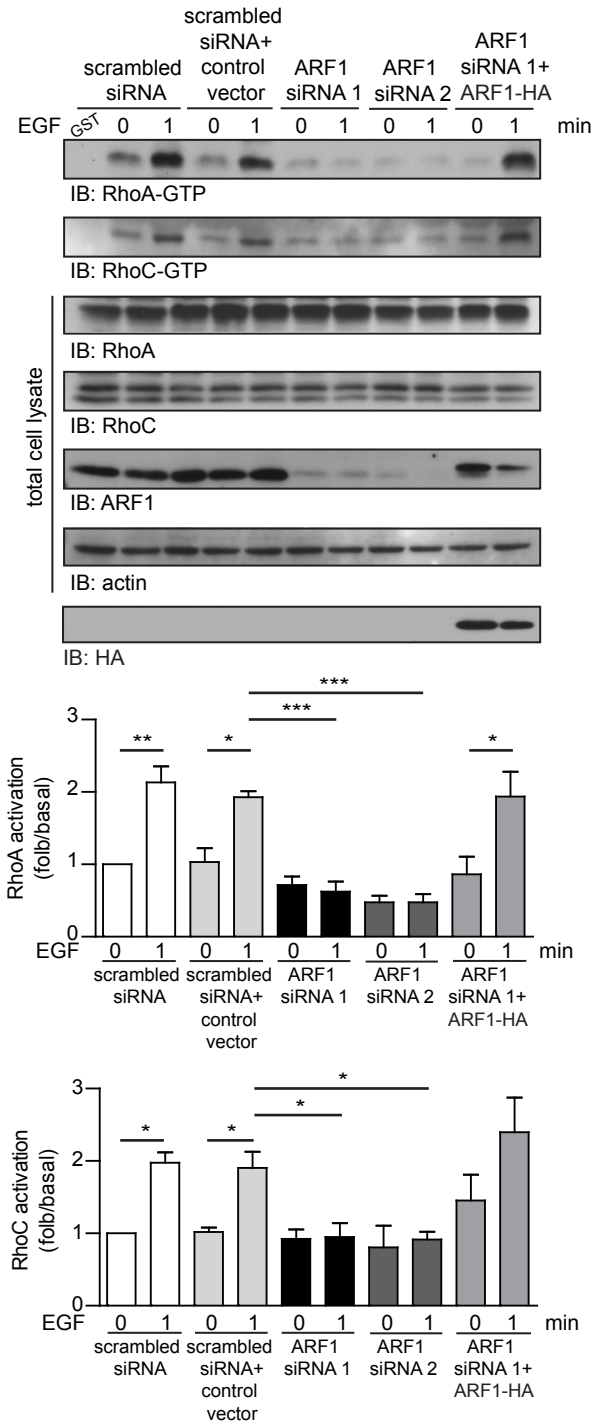


Figure II-12: Supp 3. Expression of ARF1 following siRNA rescue Rho activation.

Supplemental Figure 4
Schlienger et al.

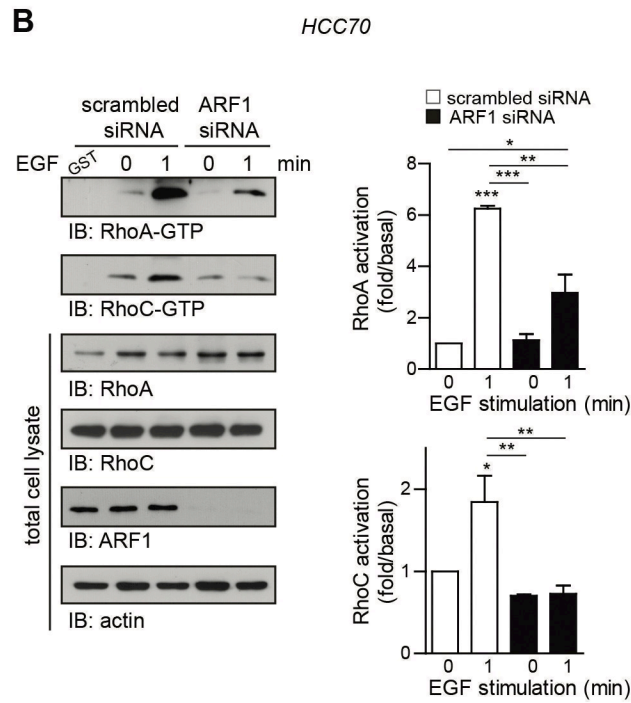
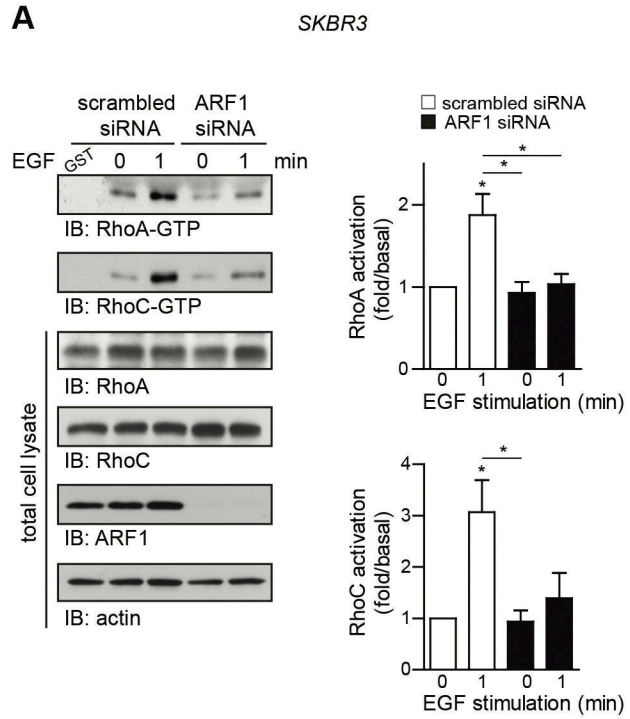


Figure II-13: Supp 4. ARF1 controls Rho activation in SKR3 and HCC70 cells.

Supplemental Figure 5
Schlienger et al.

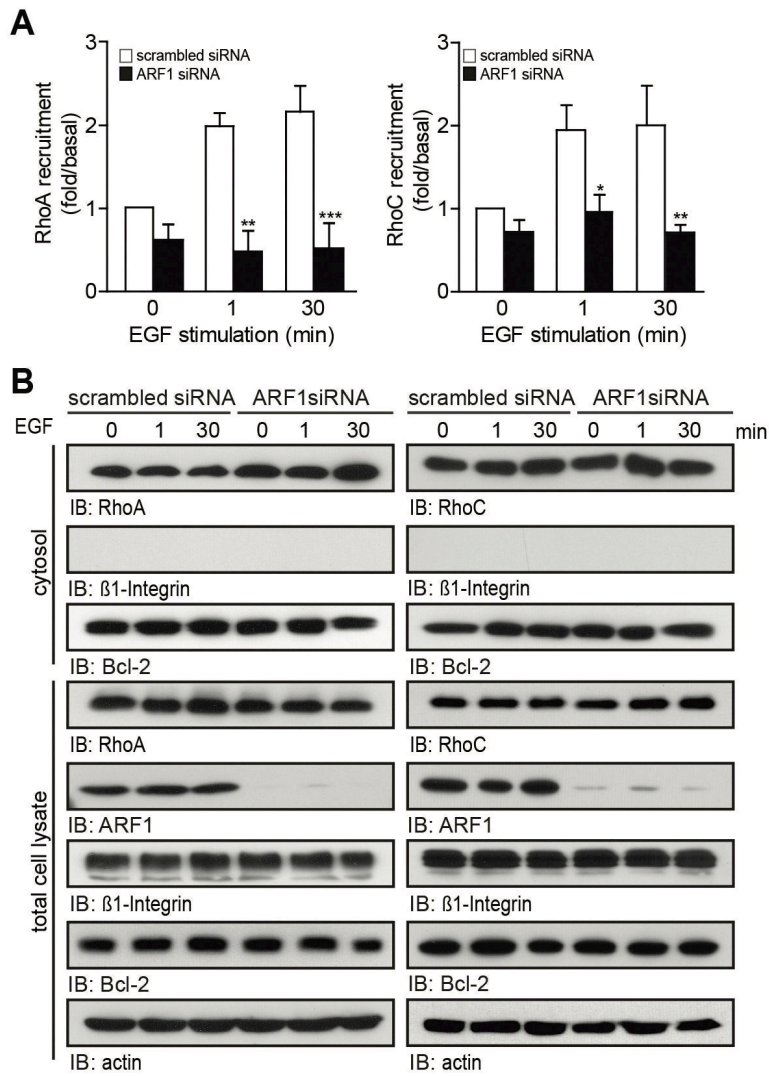


Figure II-14: Supp 5. Depletion of ARF1 impairs the recruitment of Rho GTPases.

Supplemental Figure 6
Schlienger et al.

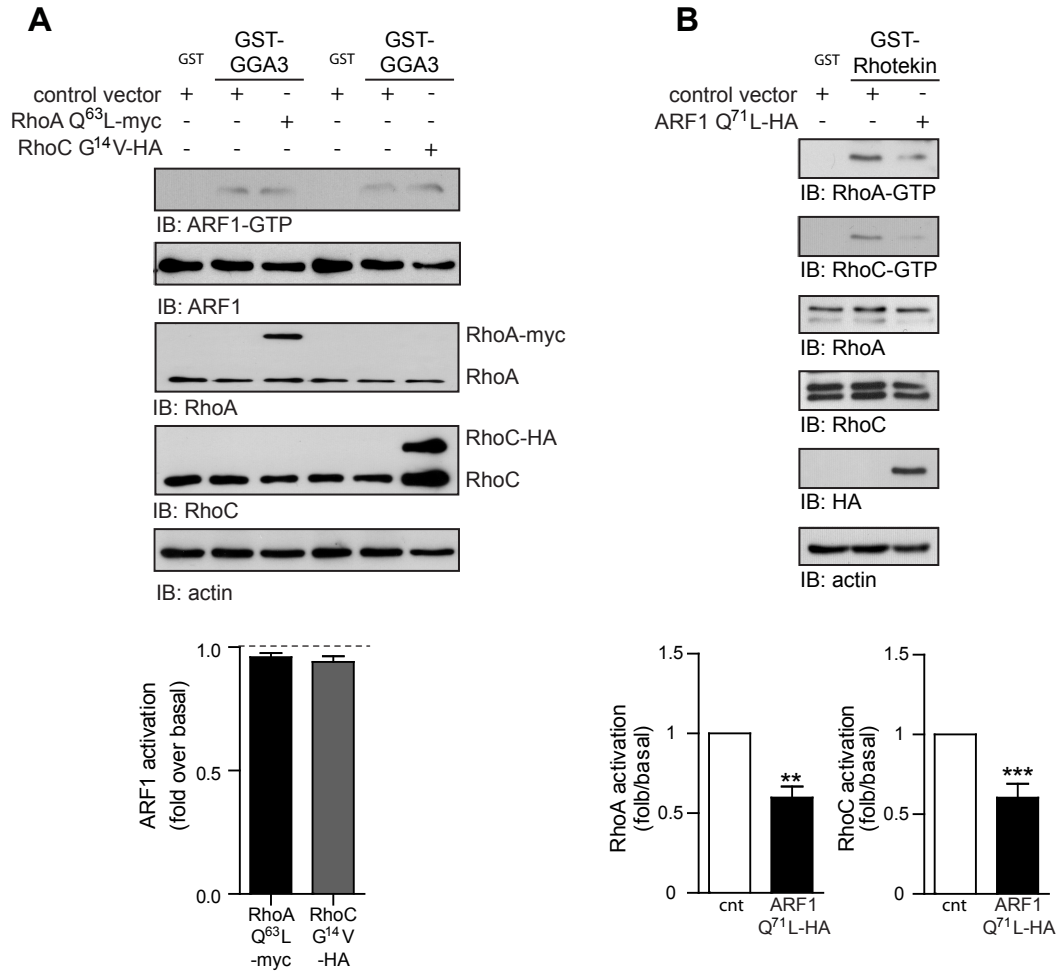


Figure II-15: Supp 6. ARF1 Q⁷¹L decrease RhoA and RhoC activation.

Supplemental Figure 7
Schlienger et al.

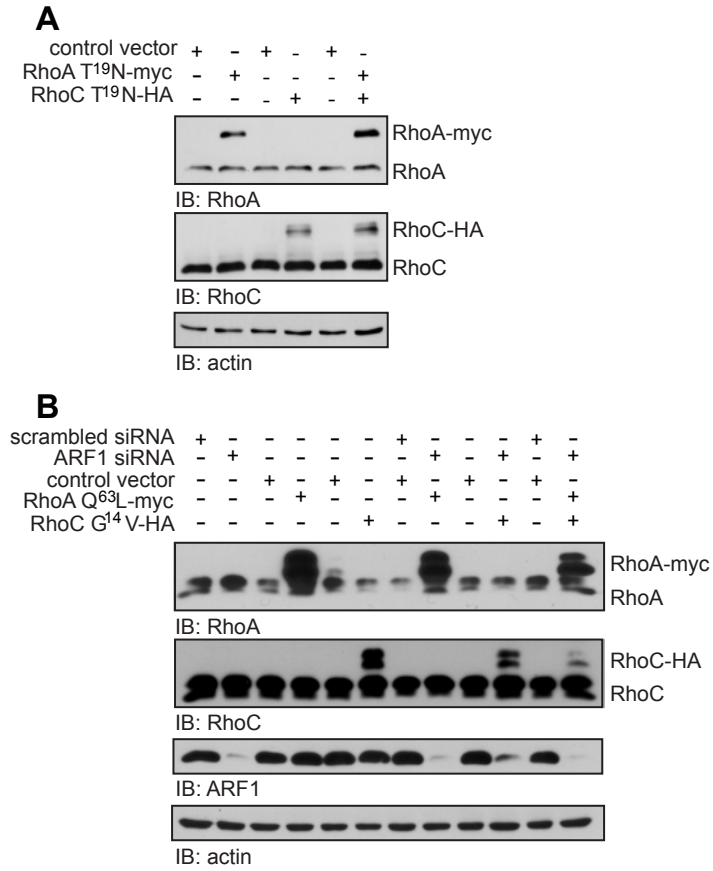


Figure II-16: Supp 7. Expression levels of ARF1, RhoA and RhoC mutants.

REFERENCES

- Alexander, N. R., Branch, K. M., Parekh, A., Clark, E. S., Iwueke, I. C., Guelcher, S. A., & Weaver, A. M. (2008). Extracellular matrix rigidity promotes invadopodia activity. *Curr Biol*, *18*(17), 1295-1299. doi:10.1016/j.cub.2008.07.090
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., . . . Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem*, *271*(34), 20246-20249. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8702756>
- Bendayan, M. (1995). Colloidal gold post-embedding immunocytochemistry. *Prog Histochem Cytochem*, *29*(4), 1-159. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7480783>
- Boulay, P. L., Cotton, M., Melancon, P., & Claing, A. (2008). ADP-ribosylation factor 1 controls the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway to regulate epidermal growth factor-dependent growth and migration of breast cancer cells. *J Biol Chem*, *283*(52), 36425-36434. doi:10.1074/jbc.M803603200
- Boulay, P. L., Schlienger, S., Lewis-Saravalli, S., Vitale, N., Ferbeyre, G., & Claing, A. (2011). ARF1 controls proliferation of breast cancer cells by regulating the retinoblastoma protein. *Oncogene*, *30*(36), 3846-3861. doi:10.1038/onc.2011.100
- Bravo-Cordero, J. J., Oser, M., Chen, X., Eddy, R., Hodgson, L., & Condeelis, J. (2011). A novel spatiotemporal RhoC activation pathway locally regulates cofilin activity at invadopodia. *Curr Biol*, *21*(8), 635-644. doi:10.1016/j.cub.2011.03.039
- Brown, P. D. (1995). Matrix metalloproteinase inhibitors: a novel class of anticancer agents. *Adv Enzyme Regul*, *35*, 293-301. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7572350>
- Chavey, C., Mari, B., Monthouel, M. N., Bonnafous, S., Anglard, P., Van Obberghen, E., & Tartare-Deckert, S. (2003). Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, *278*(14), 11888-11896. doi:10.1074/jbc.M209196200
- Clark, E. A., Golub, T. R., Lander, E. S., & Hynes, R. O. (2000). Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature*, *406*(6795), 532-535. doi:10.1038/35020106
- Cocucci, E., Racchetti, G., & Meldolesi, J. (2009). Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*, *19*(2), 43-51. doi:10.1016/j.tcb.2008.11.003
- Cohen, L. A., Honda, A., Varnai, P., Brown, F. D., Balla, T., & Donaldson, J. G. (2007). Active Arf6 recruits ARNO/cytohesin GEFs to the PM by binding their PH domains. *Mol Biol Cell*, *18*(6), 2244-2253. doi:10.1091/mbc.E06-11-0998
- Cotton, M., Boulay, P. L., Houndolo, T., Vitale, N., Pitcher, J. A., & Claing, A. (2007). Endogenous ARF6 interacts with Rac1 upon angiotensin II stimulation to regulate membrane ruffling and cell migration. *Mol Biol Cell*, *18*(2), 501-511. doi:10.1091/mbc.E06-06-0567
- D'Souza-Schorey, C., & Chavrier, P. (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *7*(5), 347-358. doi:10.1038/nrm1910
- Debnath, J., Mills, K. R., Collins, N. L., Reginato, M. J., Muthuswamy, S. K., & Brugge, J. S. (2002). The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. *Cell*, *111*(1), 29-40. doi:S0092867402010012 [pii]

- Dolo, V., D'Ascenzo, S., Violini, S., Pompucci, L., Festuccia, C., Ginestra, A., . . . Pavan, A. (1999). Matrix-degrading proteinases are shed in membrane vesicles by ovarian cancer cells in vivo and in vitro. *Clin Exp Metastasis*, 17(2), 131-140. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10411105>
- Fritz, G., Brchetti, C., Bahlmann, F., Schmidt, M., & Kaina, B. (2002). Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer*, 87(6), 635-644. doi:10.1038/sj.bjc.6600510
- Gilcrease, M. Z., Zhou, X., Lu, X., Woodward, W. A., Hall, B. E., & Morrissey, P. J. (2009). Alpha6beta4 integrin crosslinking induces EGFR clustering and promotes EGF-mediated Rho activation in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 28, 67. doi:10.1186/1756-9966-28-67
- Hashimoto, S., Onodera, Y., Hashimoto, A., Tanaka, M., Hamaguchi, M., Yamada, A., & Sabe, H. (2004). Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(17), 6647-6652. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15087504
- Hegedus, L., Cho, H., Xie, X., & Eliceiri, G. L. (2008). Additional MDA-MB-231 breast cancer cell matrix metalloproteinases promote invasiveness. *J Cell Physiol*, 216(2), 480-485. doi:10.1002/jcp.21417
- Ho, W. T., Exton, J. H., & Williger, B. T. (2003). Arfaptin 1 inhibits ADP-ribosylation factor-dependent matrix metalloproteinase-9 secretion induced by phorbol ester in HT 1080 fibrosarcoma cells. *FEBS Lett*, 537(1-3), 91-95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12606037>
- Huvencers, S., & Danen, E. H. (2009). Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci*, 122(Pt 8), 1059-1069. doi:10.1242/jcs.039446
- Kakinuma, N., Roy, B. C., Zhu, Y., Wang, Y., & Kiyama, R. (2008). Kank regulates RhoA-dependent formation of actin stress fibers and cell migration via 14-3-3 in PI3K-Akt signaling. *J Cell Biol*, 181(3), 537-549. doi:10.1083/jcb.200707022
- Karnoub, A. E., & Weinberg, R. A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(7), 517-531. doi:10.1038/nrm2438
- Kelly, T., Yan, Y., Osborne, R. L., Athota, A. B., Rozypal, T. L., Colclasure, J. C., & Chu, W. S. (1998). Proteolysis of extracellular matrix by invadopodia facilitates human breast cancer cell invasion and is mediated by matrix metalloproteinases. *Clin Exp Metastasis*, 16(6), 501-512. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9872598>
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., . . . Kaibuchi, K. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, 273(5272), 245-248. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8662509>
- Lee, G. Y., Kenny, P. A., Lee, E. H., & Bissell, M. J. (2007). Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat Methods*, 4(4), 359-365. doi:10.1038/nmeth1015
- Lewis-Saravalli, S., Campbell, S., & Claing, A. (2013). ARF1 controls Rac1 signaling to regulate migration of MDA-MB-231 invasive breast cancer cells. *Cell Signal*, 25(9), 1813-1819. doi:10.1016/j.cellsig.2013.05.011

- Li, B., Antonyak, M. A., Zhang, J., & Cerione, R. A. (2012). RhoA triggers a specific signaling pathway that generates transforming microvesicles in cancer cells. *Oncogene*, *31*(45), 4740-4749. doi:10.1038/onc.2011.636
- Li, L., Chen, P., Ling, Y., Song, X., Lu, Z., He, Q., . . . Guo, Q. (2011). Inhibitory effects of GL-V9 on the invasion of human breast carcinoma cells by downregulating the expression and activity of matrix metalloproteinase-2/9. *Eur J Pharm Sci*, *43*(5), 393-399. doi:10.1016/j.ejps.2011.06.001
- Mardilovich, K., Olson, M. F., & Baugh, M. (2012). Targeting Rho GTPase signaling for cancer therapy. *Future Oncol*, *8*(2), 165-177. doi:10.2217/fon.11.143
- Molli, P. R., Adam, L., & Kumar, R. (2008). Therapeutic IMC-C225 antibody inhibits breast cancer cell invasiveness via Vav2-dependent activation of RhoA GTPase. *Clin Cancer Res*, *14*(19), 6161-6170. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-5288
- Monsky, W. L., Lin, C. Y., Aoyama, A., Kelly, T., Akiyama, S. K., Mueller, S. C., & Chen, W. T. (1994). A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells. *Cancer Res*, *54*(21), 5702-5710. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7923219
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G., & D'Souza-Schorey, C. (2009). ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol*, *19*(22), 1875-1885. doi:10.1016/j.cub.2009.09.059
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J. W., Sedgwick, A., & D'Souza-Schorey, C. (2010). Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci*, *123*(Pt 10), 1603-1611. doi:10.1242/jcs.064386
- Murphy, D. A., & Courtneidge, S. A. (2011). The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *12*(7), 413-426. doi:10.1038/nrm3141
- Nakahara, H., Howard, L., Thompson, E. W., Sato, H., Seiki, M., Yeh, Y., & Chen, W. T. (1997). Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(15), 7959-7964. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9223295>
- Norman, J. C., Jones, D., Barry, S. T., Holt, M. R., Cockcroft, S., & Critchley, D. R. (1998). ARF1 mediates paxillin recruitment to focal adhesions and potentiates Rho-stimulated stress fiber formation in intact and permeabilized Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol*, *143*(7), 1981-1995. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9864369
- Piekny, A. J., & Glotzer, M. (2008). Anillin is a scaffold protein that links RhoA, actin, and myosin during cytokinesis. *Curr Biol*, *18*(1), 30-36. doi:10.1016/j.cub.2007.11.068
- Pille, J. Y., Denoyelle, C., Varet, J., Bertrand, J. R., Soria, J., Opolon, P., . . . Li, H. (2005). Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro and in vivo. *Mol Ther*, *11*(2), 267-274. Retrieved from

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15668138
- Qiang, Y. W., Yao, L., Tosato, G., & Rudikoff, S. (2004). Insulin-like growth factor I induces migration and invasion of human multiple myeloma cells. *Blood*, *103*(1), 301-308. doi:10.1182/blood-2003-06-2066
- Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A., & Ratajczak, M. Z. (2006). Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*, *20*(9), 1487-1495. doi:10.1038/sj.leu.2404296
- Ruth, M. C., Xu, Y., Maxwell, I. H., Ahn, N. G., Norris, D. A., & Shellman, Y. G. (2006). RhoC promotes human melanoma invasion in a PI3K/Akt-dependent pathway. *J Invest Dermatol*, *126*(4), 862-868. doi:10.1038/sj.jid.5700211
- Sabe, H., Hashimoto, S., Morishige, M., Ogawa, E., Hashimoto, A., Nam, J. M., . . . Onodera, Y. (2009). The EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 signaling pathway specific to breast cancer invasion and metastasis. *Traffic*, *10*(8), 982-993. doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00917.x
- Sahai, E., & Marshall, C. J. (2002). RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer*, *2*(2), 133-142. doi:10.1038/nrc725
- Sakurai-Yageta, M., Recchi, C., Le Dez, G., Sibarita, J. B., Daviet, L., Camonis, J., . . . Chavrier, P. (2008). The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is required for tumor cell invasion downstream of Cdc42 and RhoA. *J Cell Biol*, *181*(6), 985-998. doi:jcb.200709076 [pii] 10.1083/jcb.200709076
- Seals, D. F., Azucena, E. F., Jr., Pass, I., Tesfay, L., Gordon, R., Woodrow, M., . . . Courtneidge, S. A. (2005). The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer Cell*, *7*(2), 155-165. doi:10.1016/j.ccr.2005.01.006
- Simpson, K. J., Dugan, A. S., & Mercurio, A. M. (2004). Functional analysis of the contribution of RhoA and RhoC GTPases to invasive breast carcinoma. *Cancer Res*, *64*(23), 8694-8701. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2247
- Stylli, S. S., Stacey, T. T., Verhagen, A. M., Xu, S. S., Pass, I., Courtneidge, S. A., & Lock, P. (2009). Nck adaptor proteins link Tks5 to invadopodia actin regulation and ECM degradation. *J Cell Sci*, *122*(Pt 15), 2727-2740. doi:10.1242/jcs.046680
- Suwa, H., Ohshio, G., Imamura, T., Watanabe, G., Arii, S., Imamura, M., . . . Fukumoto, M. (1998). Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Br J Cancer*, *77*(1), 147-152. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9459160>
- Tague, S. E., Muralidharan, V., & D'Souza-Schorey, C. (2004). ADP-ribosylation factor 6 regulates tumor cell invasion through the activation of the MEK/ERK signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(26), 9671-9676. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15210957
- Taraboletti, G., D'Ascenzo, S., Borsotti, P., Giavazzi, R., Pavan, A., & Dolo, V. (2002). Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol*, *160*(2), 673-680. doi:10.1016/S0002-9440(10)64887-0

- Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K. L., & Der, C. J. (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer*, *10*(12), 842-857. doi:10.1038/nrc2960
- Weaver, A. M. (2006). Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. *Clin Exp Metastasis*, *23*(2), 97-105. doi:10.1007/s10585-006-9014-1
- Welch, H. C., Coadwell, W. J., Stephens, L. R., & Hawkins, P. T. (2003). Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Lett*, *546*(1), 93-97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12829242>
- Wheeler, A. P., & Ridley, A. J. (2004). Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res*, *301*(1), 43-49. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15501444
- Wu, M., Wu, Z. F., Rosenthal, D. T., Rhee, E. M., & Merajver, S. D. (2010). Characterization of the roles of RHOC and RHOA GTPases in invasion, motility, and matrix adhesion in inflammatory and aggressive breast cancers. *Cancer*, *116*(11 Suppl), 2768-2782. doi:10.1002/cncr.25181
- Yonemura, S., Hirao-Minakuchi, K., & Nishimura, Y. (2004). Rho localization in cells and tissues. *Exp Cell Res*, *295*(2), 300-314. doi:10.1016/j.yexcr.2004.01.005

III. CHAPITRE III : ARF1 regulates adhesion of MDA-MB-231 invasive breast cancer cells through formation of focal adhesions

Published in the journal: Cellular Signalling. 2015 Mar; 27(3):403-15.

Sabrina Schlienger, Rodrigo Alain Migueles Ramirez & 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

email: audrey.claing@umontreal.ca

Author contributions:

SS: experimental conception, experimental execution, data analysis and writing

RAM: experimental execution (figure 7B)

AC: experimental conception and writing

Keywords: Epidermal Growth Factor Receptor/ ADP-ribosylation Factor-1/ Focal Adhesion Kinase/ breast cancer/ focal adhesion.

ABSTRACT

Adhesion complex formation and disassembly is crucial for maintaining efficient cell movement. During migration, several proteins act in concert to promote remodeling of the actin cytoskeleton and we have previously shown that in highly invasive breast cancer cells, this process is highly regulated by small GTP-binding proteins of the ADP-ribosylation factor (ARF) family. These are overexpressed and highly activated in these cells. Here, we report that one mechanism by which ARF1 regulates migration is by controlling assembly of focal adhesions. In cells depleted of ARF1, paxillin is no longer colocalized with actin at focal adhesion sites. In addition, we demonstrate that this occurs through the ability of ARF1 to regulate the recruitment of key proteins such as paxillin, talin and FAK to β 1-integrin. Furthermore, we show that the interactions between paxillin and talin together and with FAK are significantly impaired in ARF1 knocked down cells. Our findings also indicate that ARF1 is essential for EGF-mediated phosphorylation of FAK and Src. Finally, we report that ARF1 can be found in complex with key focal adhesion proteins such as β 1-integrin, paxillin, talin and FAK. Together our findings uncover a new mechanism by which ARF1 regulates cell migration and provide this GTPase as a target for the development of new therapeutics in triple negative breast cancer.

Abbreviations: ARF, ADP-Ribosylation Factor/ DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium / DMSO, Dimethyl Sulfoxide/ EGF, Epidermal Growth Factor / EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor/ FAK, Focal Adhesion Kinase / GAP, GTP Activating Protein/ HCC70, Human Breast Cancer Cell Line 70/ MDA-MB-231, MD Anderson-Mammary Breast cancer cell line -231/ MDCK, Madin-Darby Canine Kidney/ PBS, Phosphate Buffer Saline/ PI3K, Phosphatidylinositol 3 Kinase/ PTK, Protein-Tyrosine Kinase / RTK, Receptor Tyrosine Kinase/ SKBR3, Sloan-Kettering human Breast cancer cell line 3/ siRNA, Small Interfering Ribonucleic Acids.

INTRODUCTION

Progression of cancer from primary tumors to metastatic carcinomas requires that cancer cells detach from the initial tumor to invade their surrounding. Through the lymphatic or circulatory systems, cells can attain distant organs and tissues to initiate the formation of metastasis. The ability of a cell to migrate is therefore essential for that process. Cell migration requires the dynamic interaction between the cell and the extracellular matrix onto which it is attached and migrates. Adhesion is mediated by membrane-proximal protein complexes associated with integrins. These are transmembrane proteins that function to link the intracellular cytoskeletal components of the cells to the substratum on which cells are anchored. The intracellular domain of integrins acts as a scaffold for focal adhesion proteins, which formation and disassembly is controlled by more than 180 protein-protein interactions. These include cytoskeletal proteins such as paxillin and talin as well as enzymes such as FAK (Focal adhesion kinase) and small GTP-binding proteins (Huttenlocher & Horwitz, 2011; Zaidel-Bar, Itzkovitz, Ma'ayan, Iyengar, & Geiger, 2007). Cell migration and invasiveness can be enhanced by numerous growth factors. For example, high expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) is a major cause of cancer development, progression, and is associated with a poor prognosis (Klijn, Berns, Schmitz, & Foekens, 1992). Basal or triple negative breast cancer cells, like MD Anderson-Mammary Breast cancer cell line - 231 (MDA-MB-231), often express high EGFR levels, which is associated with a loss of sensitivity to hormonal therapies and/or a high probability of metastasis (Nicholson et al., 1994). Increased activation of this receptor tyrosine kinase (RTK) has been correlated with, namely, enhanced survival, migration and invasiveness (Price, Tiganis, Agarwal, Djakiew, & Thompson, 1999). These three processes are mediated by intracellular signalling proteins of the Ras GTPase family (Malaney & Daly, 2001). Others and we have demonstrated that ADP-ribosylation factors (ARFs) are involved in the regulation of the biological effects induced by epidermal growth factor (EGF) (Boulay, Cotton, Melancon, & Claing, 2008; Kim et al., 2003; Morishige et al., 2008). Like all GTPases, ARFs are considered active when bound to GTP and inactive when bound to GDP. ARF1 and ARF6 are the best characterized from the six identified isoforms. ARF6 has been

shown to localize to the plasma membrane, while ARF1 is classically associated with the Golgi and in some cell types can also be found associated with the plasma membrane (Boulay et al., 2008; Cohen et al., 2007; Donaldson & Honda, 2005). These small GTP-binding proteins act as molecular switches to turn on signalling cascades associated with remodeling of the actin cytoskeleton, transformation of membrane lipids and vesicle formation (Boulay et al., 2008; Casanova, 2007; Cohen et al., 2007; Galas et al., 1997).

During migration, dynamic adhesion involves the coordinated action of various classes of molecules. The protein tyrosine kinase, focal adhesion kinase (FAK) is a non-receptor protein-tyrosine kinase (PTK), ubiquitously expressed in cytoplasm and involved in the formation of the adhesions complex (Cornillon, Campos, & Guyotat, 2003). FAK plays a role in the assembly and disassembly of the focal adhesion point (Ilic et al., 1995). It is involved in signal transduction and in the regulation of cell survival and motility triggered by the binding of integrins to the extracellular matrix (Calalb, Polte, & Hanks, 1995; Schaller, 2001a). Following the activation of EGFR and/or integrins, FAK is recruited to these receptors indirectly through C-terminal domain-mediated interactions with integrin-associated proteins such as paxillin and talin (Sieg et al., 2000). FAK activation leads to the autophosphorylation of Tyr397, which binds to the Src family kinases. In turn, Src phosphorylates FAK on Tyr 861 (Sieg, Hauck, & Schlaepfer, 1999). FAK then becomes the main anchoring point from which focal adhesions complex are formed (Sieg et al., 2000). Certain ARF GAPs, such as GIT and ASAP1 have been shown to interact with FAK and paxillin (Liu, Loijens, Martin, Karginov, & Parsons, 2002; Zhao, Manser, Loo, & Lim, 2000). Furthermore, in Swiss 3T3 Fibroblasts, ARF1 has been reported to mediate the recruitment of paxillin to focal adhesion (Norman et al., 1998). In addition, we showed that another ARF isoform, ARF6, is required for remodeling of the focal adhesion complex in endothelial cells (Daher, Noel, & Claing, 2008). Despite the studies conducted, the detailed mechanism through which ARF1 regulates adhesion in highly invasive breast cancer cells remains unknown. In this study, we report that ARF1 controls formation of focal adhesions complex. Using RNAi and a chemical inhibitor targeted to inhibit the expression or activation of this ARF isoform, we provide evidence that ARF1 acts to regulate key protein-protein interactions between β 1-integrin, paxillin, talin, and FAK. Furthermore, ARF1 expression and activation impacts

the ability of FAK, as well as Src, to become phosphorylated. Finally, we show that ARF1 is an integral part of focal adhesion complex by demonstrating that this GTPase can also be found interacting with these key molecules.

By defining the key signaling proteins regulating adhesion, we will gain further insights into the mechanism by which tumor cells become motile and contribute to the progression and aggressiveness of breast cancer. The identification of proteins that orchestrate fundamental cellular responses such as migration will help us identify new molecular therapeutic targets for the treatment of highly invasive breast cancers for which therapeutical options remain limited.

MATERIAL AND METHODS

Reagents and Antibodies

Anti-paxillin, anti-FAK pY397 and anti-CD29 were purchased from BD Bioscience (Bedford, MA, USA). Anti-FAK pY861 polyclonal antibody, lipofectamine 2000, Alexa Fluor 488-phalloidin and Rhodamine-phalloidin were purchased from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Anti-ARF1 was obtained from ProteinTech (Chicago, IL, USA). Anti-pan-actin, anti-EGFR, anti-Src pY416 and anti-giantin were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Anti-FAK (A-17), anti-ARF6 (3A1) and anti-talin were purchased from Santa Cruz Biotech Inc. (Santa Cruz, CA, USA). All others products were from Sigma Aldrich Company (Oakville, ON, Canada). LM11 compound was synthesized by Dr Pierre Lavallée (Combinatory chemistry laboratory, Université de Montréal, QC, Canada). GST-GGA3 was a gift from Dr. Jean-Luc Parent (Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada).

Cell Culture and Transfection

MDA-MB-231, Human Breast Cancer Cell Line 70 (HCC70) and Sloan-Kettering human Breast cancer cell line 3 (SKBR3) cells were obtained from Dr. Sylvie Mader (Université de Montréal, Montreal, QC, Canada). Cells were maintained at 37°C, 5% CO₂, 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 small interfering ribonucleic acids (siRNAs), (72h) were conducted using Lipofectamine 2000 from Invitrogen (Burlington, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. siRNA corresponding to human ARF1 (-GAACCAGAAGUGAACGCGA- was used in all experiments and -CGGCCGAGATCACAGACAAG- a second sequence, was used to confirm specificity of the effects of the siRNA), to a scrambled ARF1 siRNA sequence and human FAK (-GGACAUUAUUGGCCACUGU-) were synthesized by Thermo Science Dharmacon (Lafayette, CO, USA). ARF1-HA was a generous gift from Nicolas Vitale (Université de Strasbourg, Strasbourg, France). For rescue experiments, ARF1-HA was transfected 24 h after introduction of the ARF1 siRNA sequence #1.

Immunofluorescence

The cells were fixed with a phosphate buffer saline (PBS) solution containing 4% paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature and then permeabilized with a solution of DMEM containing 0.05% saponin. The slides were incubated for 1 hour with a primary antibody. After several washes, the plates were incubated for 1 hour in the dark in the presence of an anti-mouse or anti-rabbit Alexa Fluor 488-antibody or Alexa-Fluor 568 (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). They were then mounted onto slides using a solution of Aqua-mount (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) and observed using a confocal microscope (LSM510META, Carl Zeiss).

Migration Assay

MDA-MB-231 cells were seeded onto collagen-coated (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) Boyden Chambers (8 μ m) (Corning, NY, USA) and treated with different doses of LM11 or vehicle. One hour later, cells were stimulated with 10 ng/ml EGF and incubated for 6h. Cells were fixed using paraformaldehyde (4%) and stained with crystal violet (0.1% in 20% methanol, 16h). Cells present in the upper chamber were removed with a cotton swab and cells that migrated were quantified in the lower chamber by counting.

Co-Immunoprecipitation Experiments

MDA-MB-231 cells were serum starved overnight and stimulated with EGF (100 ng/ml, 37°C) for the indicated times. Co-immunoprecipitation experiments were described previously (Cotton et al., 2007). Briefly, cells were lysed into ice-cold TGH buffer (pH 7.3, 50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10% glycerol, 1% triton and protease inhibitors) and β 1-integrin, talin, paxillin, ARF1 or EGFR were immunoprecipitated using the anti- β 1-integrin, anti-talin, anti-paxillin, anti-ARF1 or anti-EGFR antibodies. Interacting proteins were assessed by Western blot analysis.

GTPase Activation Assay

MDA-MB-231 cells transfected with scrambled siRNA or an siRNA targeting FAK (50 nM) were stimulated with EGF (10 ng/ml) for the indicated times and then

washed with TBS and lysed in 200 μ l of ice-cold MLB lysis buffer (pH 7.5, 25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1% nonidet P-40, 0.3 mg/ml PMSF, 1.0 mM Na₃VO₄ and protease inhibitors). Samples were vortexed for 10 seconds and spun for 10 minutes at 10,000 g. GST-GGA3 coupled to glutathione sepharose 4B were added to each tube and samples were rotated at 4°C for 45 minutes. Beads were washed and proteins were eluted in 25 μ l SDS sample buffer by heating to 65°C for 15 minutes. Detection of ARF1-GTP was performed by immunoblot analysis using a specific anti-ARF1 antibody. A similar methodology was used for the detection of activated ARF1 in conditions where cells were treated with the ARF1 biochemical inhibitor LM11. For those experiments, MDA-MB-231 cells were simply first treated with vehicle (dimethyl sulfoxide (DMSO) 1%) or LM11 (indicated concentration) before being stimulated.

Western Blotting

Cells were harvested and total soluble proteins were run on polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blotted for relevant proteins using specific primary antibodies (as described for each experiment). Secondary antibodies were HRP-conjugated (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and fluorescence was detected using ECL detection reagent. Quantification of the digital images obtained was performed using ImageQuant 5.2 software.

Survival Assay

MDA-MB-231 cells were treated with various concentrations of LM11 or DMSO and after 16 h cell viability was determined by Trypan blue assay.

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 or two-ways analysis of variance followed by a Tukey's or Bonferroni's multiple comparison tests, using GraphPad Prism Software (ver. 5.02; San Diego, CA, USA).

RESULTS

ARF1 expression and activation controls formation of focal adhesion complex in different invasive breast cancer cells lines

To further define how ARF1 regulates cell migration, we examined the ability of invasive breast cancer cells to dynamically interact with substratum. We first examined focal adhesions by staining for paxillin and F-actin. Paxillin is a key focal adhesion-associated phosphotyrosine-containing protein and is required for regulating cell spreading and motility (Schaller, 2001b). Because of its numerous protein-protein binding domains, it acts as a scaffold for cytoskeletal proteins, tyrosine and serine/threonine kinases, GTPases regulatory factors as well as other adaptors (Schaller, 2001b). In this first series of experiments, we examined the role of ARF1 in 3 types of invasive breast cancer cell lines: MDA-MB-231, HCC 70 and SKBR3. Here, control and ARF1 knocked down cells were plated onto collagen for 15 minutes to first assess kinetics. As illustrated in figure 1, paxillin was displayed as a punctate peripheral staining in MDA-MB-231 cells transfected with a scrambled siRNA, colocalizing with F-actin. In conditions where cells were depleted of ARF1 (with two different siRNA), paxillin remained in the cytosol, while actin was mainly organized in ruffles at the cell periphery (Fig. 1).

In order to further define the role played by the activation of ARF1 in focal complex, we used a biochemical inhibitor, LM11 (Viaud et al., 2007). This compound has been shown to block migration of Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells (Viaud et al., 2007). First, we examined the integrity of the Golgi following LM11 treatment of our cells by assessing localization of Giantin, a conserved membrane protein of the Golgi (Linstedt & Hauri, 1993). As illustrated in figure 2A and B, Golgi organization remained unaffected when cells were treated with 10 μ M of LM11 for 8 hours or 100 μ M for 30 minutes. However, defaults in Golgi were observed when cells were treated for longer periods of time with low concentration (18h; 10 μ M) or with high concentration (1 h; 100 μ M) (Fig. 2A, B). LM11 treatment was effective in inhibiting migration of MDA-MB-231 cells in a dose-dependent fashion (Fig. 2C). However, when used for 16 hours, cell viability was compromised (Fig. 2D). To avoid any effect on the

integrity of the Golgi, we therefore treated cell with LM11 for 30 minutes and examined the effect of a low and high dose (10 μM and 100 μM). In control conditions and when cells were allowed to attach to the matrix for 15 minutes, paxillin was observed in punctate, at the cell periphery (Fig. 3). However, when cells were pretreated with LM11 (10 μM), those focal points of adhesion assessed by paxillin distribution, were partially inhibited. Interestingly, using higher concentrations of this biochemical agent (100 μM), paxillin remained cytosolic (Fig. 3). We next investigated the effect of LM11 on cell migration. Upon treatment of the MDA-MB-231 cells with this biochemical inhibitor (10 μM ; 30 min), EGF-dependent migration was completely inhibited (Fig. 4A). Furthermore, in those conditions, activation of ARF1 was blocked by LM11 (Fig. 4B). To confirm these data, we examined the importance of ARF1 in two other invasive breast cancer cell lines. In HCC70 and SKBR3 cells, knock down of this ARF isoform also prevented localization of paxillin to focal adhesions (Fig. 5).

Together, these results demonstrate that ARF1 is a key regulator of focal adhesion assembly and that it is the ability of this GTPase to become activated that regulates, namely, localization of paxillin to the plasma membrane. Because the localization of proteins to focal adhesion sites is consistent with the ability of key proteins to physically interact, we next investigated whether ARF could act to modulate interactions of proteins present in this complex.

ARF1 controls the association of β 1-integrin with its binding partners

Integrins constitute the major transmembrane receptors that mediate dynamic interactions between the extracellular matrix and the cell cytoskeleton during motility (Huttenlocher & Horwitz, 2011). Studies in human breast cancer cells have revealed key roles for β 1-integrin in the regulation of cancer cell functions that promote malignant progression and metastasis (Desgrosellier & Cheresch, 2010). Interestingly, recycling of β 1-integrin, needed to form new adhesion sites, has been shown to be regulate by two GTPases, ARF6 and Rab 11 (Powelka et al., 2004). We therefore focused on this specific integrin. We first examined whether EGF stimulation of MDA-MB-231 cells, our prototypical cellular model, led to the association of endogenously expressed β 1-integrin and paxillin. As illustrated in figure 6A, EGF stimulation promoted a rapid association of

β 1-integrin and paxillin that was maximal at 1 minute and remained sustained after 15 minutes of stimulation. Knock down of ARF1 expression totally inhibited the ability of β 1-integrin to interact with its partner. β 1-integrins have also been shown to form a complex with talin, a cytoskeletal protein highly localized to cell-substratum contact sites (Burrige & Connell, 1983). In MDA-MB-231 cells, the interaction between the two proteins was rapid and transient where maximal effects were observed after 1 minute of EGF treatment (Fig. 6B). Similar to what we previously observed, depletion of ARF1 markedly reduced the ability of β 1-integrin to interact with talin, this other key partner. We next examined the ability of β 1-integrin to interact with a regulator of focal adhesions, the Focal Adhesion Kinase (FAK). FAK is a cytoplasmic tyrosine kinase that has long been recognized as a regulator of cell migration (Mitra, Hanson, & Schlaepfer, 2005). EGF stimulation rapidly and transiently promoted the recruitment of FAK to β 1-integrin. Again, this interaction was completely abolished in cells that expressed very low levels of ARF1 (Fig. 6C).

Altogether, these data suggest that ARF1 is required for EGF-dependent β 1-integrin interaction with focal adhesion proteins.

Depletion of ARF1 controls the association of proteins present in focal adhesion complex

We next investigated the role of ARF1 in regulating some of the interactions between other components of the adhesion complex. More than 150 proteins have been shown to associate with adhesion sites (Huttenlocher & Horwitz, 2011). We first examined the ability of paxillin to form a complex with talin (Turner, 2000). As illustrated in figure 7A, EGF stimulation promoted the association of paxillin with talin where maximal interaction was observed after 5 minutes. In cells depleted of ARF1, the ability of these two proteins to form a complex was abrogated. Similar results were observed when we examined the ability of paxillin and talin to interact with FAK. This tyrosine kinase is a central component of focal adhesion sites and acts as a structural and signalling protein. Through its C-terminal domain, FAK can directly interact with paxillin and talin (Mierke, 2013). In MDA-MB-231 cells, increased association of paxillin and FAK, as well as talin and FAK, was observed in EGF stimulated control

conditions. These interactions were rapid and transient and maximal association was observed after 5 min (Fig. 7B and C). Knock down of ARF1 blocked the ability of FAK to interact with both paxillin and talin.

These evidences therefore provide a molecular basis for the role of ARF1 in the formation of focal complex.

Phosphorylation of FAK is regulated by the expression and activation of ARF1

FAK was reported to have over 30 phosphorylation sites (Grigera et al., 2005). Phosphorylation of specific tyrosine residues has been demonstrated to be a key step regulating cell motility, proliferation and apoptosis (Grigera et al., 2005). The inability of FAK to interact with one of its focal adhesion binding partner could result from a change in FAK phosphorylation at the autophosphorylation site Y397, or at the major Src phosphorylation site Y861. Phosphorylation of both tyrosines have been reported to be required for cell motility induced by integrin (Sieg et al., 2000). Here, we therefore next investigated whether ARF1 could control FAK phosphorylation. As illustrated in figure 8, EGF stimulation promoted an increase in FAK phosphorylation of Y397 and Y861. For both tyrosine residues, phosphorylation was rapid and transient. In ARF1 depleted cells, EGF-dependent phosphorylation at both residues was abolished (Fig. 8A). This effect was reversed by re-expressing ARF1-HA (Fig. 8B).

Next, to further examine whether the effects observed in ARF1 depleted cells depended on the lack of ARF1 activity, we used the ARF1 inhibitor LM11. MDA-MB-231 cells were pretreated for 30 minutes with the vehicle or the inhibitor (10 μ M) before being stimulated with EGF. As presented in figure 8C, LM11 was highly effective in preventing auto-phosphorylation of FAK at Y397 and Src-mediated phosphorylation of this key enzyme on residue Y861.

To further investigate the role of ARF1 in regulating phosphorylation of Y861, we next examined the effect of ARF1 depletion on Src activation by assessing the ability of this enzyme to become phosphorylated. We focused on assessing phosphorylation of Y416 present in the kinase domain, recognized as the major autophosphorylation site, and associated Src activation. In MDA-MB-231 cells, EGF induced a rapid phosphorylation of Src, peaking at 2 minutes (Fig. 8D). Depletion of ARF1 drastically impaired Src

phosphorylation upon EGF stimulation. Altogether, these findings suggest that ARF1 controls EGF-dependent Src activation, which in turn, regulates FAK phosphorylation.

EGF mediated activation of ARF1 is dependent upon FAK and the ability of this enzyme to control EGF receptor phosphorylation

Because FAK regulates the activation of so many key proteins, in focal adhesions but also in other parts of the cells, we next assessed whether it could modulate ARF1 activity. As reported previously, EGF stimulation of MDA-MB-231 cells led to the activation of this ARF isoform (Fig. 9) (Boulay et al., 2008). In conditions where FAK expression was knocked down, activation of ARF1 was markedly impaired. These results demonstrate that FAK has the potential to regulate activation of this small GTPase. To further investigate how FAK acts to control ARF1 activation, we examined whether FAK could modulate EGFR phosphorylation. As previously reported and illustrated in figure 9B, exposure of the cells to EGF rapidly promoted phosphorylation of its receptor. Interestingly, knock down of FAK expression had a major impact on this event. Because it is generally recognized that ligand binding promotes direct autophosphorylation of the intracellular tyrosine kinase domains, we propose that FAK may be part of a feedback mechanism controlling levels of phosphorylated receptors. This would result in the subsequent impairment of ARF1 activation.

ARF1 is a component of the Focal Adhesion complex

Because ARF1 appears to be such an important regulator of focal adhesion protein interactions and activity, we finally examined the possibility that ARF1 could be an integral component of the focal adhesion complex by interacting with key proteins. We therefore assessed whether ARF1 could be found in complex with β 1-integrin, paxillin, talin, and FAK in MDA-MB-231 cells. As shown in figure 10, EGF stimulation of the cells promoted the association of ARF1 with all the above mentioned proteins. The most rapid association we found was with talin and FAK, which peaked at 1-2 minutes. Although the association of ARF1 with β 1-integrin and FAK was also significantly enhanced after such short times of EGF stimulation, it continued to increase and maximal interactions were observed at 5 minutes.

Altogether, these data show that ARF1 is a regulator of focal adhesion signaling and is an integral part of these structures.

DISCUSSION

We have previously shown that ARF1 plays a major role in breast cancer tumorigenesis by controlling proliferation, migration and invasion of MDA-MB-231 cells (Boulay et al., 2008; Boulay et al., 2011; Schlienger, Campbell, & Claing, 2014). We have partially delineated the mechanism by which ARF1 regulates migration by demonstrating that this ARF isoform overexpressed in highly invasive cells control the ability of the EGFR to signal through the phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) pathway, but also that this GTPase regulates Rac1, a member of the Rho family of small GTP-binding proteins, that actively regulate lamellipodia formation (Boulay et al., 2008; Lewis-Saravalli, Campbell, & Claing, 2013). In the present study, we demonstrate a role for ARF1 in the regulation of focal adhesion. Using the siRNA strategy, we show that the presence of ARF1 is required for EGF-dependent focal adhesion formation. When ARF1 is depleted, no signal integration from growth factor receptors is made. FAK cannot bind the cytoskeletal proteins paxillin and talin, which normally mediate FAK localization to integrin-enriched focal adhesions. These observations may explain why in ARF1-depleted conditions, FAK no longer interacts with β 1-integrin. Furthermore, we report that ARF1 plays a key role in regulating the processes mediating FAK phosphorylation. Phosphorylation of Tyr-397 serves to create a high-affinity binding site for Src-family PTKs and the adaptor protein Shc, whereas Tyr-925 phosphorylation mediates binding of Grb2, another adaptor protein. We have previously shown that p66Shc and Grb2 can be found interacting with ARF1, thereby playing an adaptor role for the recruitment of this ARF isoform to the activated EGFR (Haines, Saucier, & Claing, 2014). As partners, we can speculate that depletion of ARF1 can ultimately affect signalling through both adaptors and therefore FAK activation. In addition, Src binding to FAK promotes increased Src kinase activity and in turn, Src-mediated phosphorylation of FAK C-terminal domain residues Tyr-861. This site of FAK phosphorylation acts to modulate FAK localization within cells and promotes the association of FAK with integrin. Our data show that, in absence or inactivation of ARF1, phosphorylation of both tyrosine

residues is affected, and FAK cannot interact with β 1-integrin to promote adhesion. Overall, our data indicate that ARF1 is a central regulator of FAK activation.

Conversely, we found a role for FAK on ARF1 activation. It was proposed that activated FAK recruits ARF GTPase-Activating Proteins (ARF GAPs), like ASAP1. By modulating the activation state of ARFs, ARF GAPs could reduce adhesion and the formation of adhesions complex (Randazzo et al., 2000). In MDA-MB-231 cells, FAK may therefore coordinate processes leading to ARF inactivation. Furthermore, it was shown that inhibition of FAK expression or activity, in human carcinoma cells, disrupted EGF-stimulated signalling (Hauck et al., 2001), which may involve the activation of ARF GTPases. All these data suggest a mechanism, by which FAK expression can regulate indirectly ARF1 activation by affecting EGFR activation.

The demonstration that ARF1 regulates focal adhesion complements previous reports that highlighted the role of another ARF isoform, ARF6, in this process (Daher et al., 2008). This ARF isoform was reported to regulate both FAK phosphorylation and its association with Src. ARF6 is a central regulator of focal adhesion turnover. Depletion of this GTPase led to increased FAK phosphorylation and constitutive association with Src. In these conditions, the ARF GAP GIT1 can no longer be recruited to FAK and contribute to focal adhesion disassembly, which ultimately impairs endothelial cells motility. We previously demonstrated that in MDA-MB-231 cells, EGF stimulation activates both ARF1 and ARF6 to modulate, respectively, the PI3K and Erk pathways essential for migration (Boulay et al., 2008; Tague, Muralidharan, & D'Souza-Schorey, 2004). Although the physiological endpoint might be similar; in that case, cell migration via focal adhesion formation, the mechanism may be different. Indeed, both depletion of ARF1 and ARF6 block cell migration. ARF1 depletion results in decreased FAK activation, while ARF6 depletion locked FAK in a constitutive activation state.

Although ARF1 has been reported to influence the recruitment of paxillin to focal adhesion on Swiss 3T3 Fibroblasts, we demonstrate for the first time its physiological role in invasive breast cancer cells (Norman et al., 1998). We show by using RNAi-based approaches, that knock down of ARF1 significantly attenuates actin dynamics of MDA-MB-231 cells by activating focal adhesion formation. This observation was further supported by the use of two other cell lines HCC70, another triple-negative breast cancer

cell line, and SKBR3, a HER2+ breast cancer cell line, suggesting that the effect of ARF1 on focal adhesion is not cell type specific, but could represent a general mechanism. Interestingly, it has been previously reported that depletion of ARF1 in MDA-MB-231 cells led to cell invasion arrest by controlling the RhoA/RhoC pathway (Schlienger et al., 2014). These two other GTPases are known to also be important in the assembly of focal adhesions in other cell types (Barry & Critchley, 1994; Barry, Flinn, Humphries, Critchley, & Ridley, 1997). All this data support the mechanism through which ARF1 acts as a key mediator of breast cancer progression.

We demonstrated that phosphorylation of the membrane-associated non-receptor tyrosine kinase Src was regulated by ARF1. Src has been shown to induce the migration, proliferation, adhesion, and growth of cancer cells and has been reported to be overexpressed or activated in many cancers including breast cancer (Frame, 2002; Wheeler, Iida, & Dunn, 2009). There are a number of anti-Src therapeutics developed or in development for use as cancer therapies (Morgan, Nicholson, & Hiscox, 2008). Together, our findings demonstrate that ARF1 is a key regulator of breast cancer cell progression and could also be a potential target for the development of new therapies.

CONCLUSION

In conclusion, we have shown that ARF1 regulates cellular migration of highly invasive triple-negative breast cancer cells, through the regulation of the focal adhesions complex. Gaining an understanding of the molecular mechanisms by which ARF1 controls key features of cancer cells will provide new insights into the development of new therapeutic tools.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (grant number: MOP-106596 to AC). AC is the recipient of a Senior Scientist Award from the Fonds de Recherche du Québec- Santé.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. **Depletion of ARF1 blocks the recruitment of paxillin to focal adhesions.**

MDA-MB-231 cells were transfected with a scrambled, or two different sequences of ARF1 siRNA. Cells were seeded onto collagen coverslips. After 15 minutes, cells were fixed, permeabilized and incubated with specific anti-paxillin antibody. Labeling of paxillin was performed using a secondary antibody coupled to Alexa-Fluor 488 and actin stained using Alexa Fluor 568-phalloidin. Images are representative of at least 20 cells observed in three independent experiments. Scale bar, 10 μ m.

FIGURE 2. **Concentration and time-dependent effects of the ARF1 inhibitor LM11 in MDA-MB-231.**

(A, B) MDA-MB-231 cells were treated with vehicle or LM11 (10 or 100 μ M) for the indicated times. Cells were fixed, permeabilized, and labeled using an anti-Giantin antibody, a secondary antibody coupled to Alexa-Fluor 633, and Alexa Fluor 488-phalloidin. Golgi distribution was assessed by confocal microscopy. These images are representative of at least 100 cells observed in three independent experiments. Scale bar, 10 μ m. (C) MDA-MB-231 cells were reseeded into Boyden chambers, treated with different concentrations of LM11 or DMSO. Cell migration was assessed after 6 h of stimulation with EGF. Results are the mean \pm S.E.M of three independent experiments. **P< 0.01; *** P< 0.001 are values compared to the vehicle condition. Statistical analyses were calculated using a one-way analysis of variance followed by a Bonferroni's multiple comparison tests. (D) MDA-MB-231 cells were treated with various concentrations of LM11 or DMSO and after 16 h cell viability was assessed by Trypan blue assay. Results are the mean \pm S.E.M of three independent experiments. ***P< 0.001 are values compared to the vehicle condition.

FIGURE 3. **Inhibition of ARF1 activation blocks the recruitment of paxillin to focal adhesions.**

MDA-MB-231 cells were treated with vehicle or LM11 (10 or 100 μ M) for 30 minutes. Cells were seeded onto collagen coverslips. After 15 minutes, they were fixed and labeled as in figure 1. Top right, magnifications showing presence or not of

focal adhesions. Images are representative of at least 20 cells observed in three independent experiments. Scale bar, 10 μ m.

FIGURE 4. Effect of ARF1 inhibitor LM11 in MDA-MB-231 cells. (A) Cells were treated with DMSO or LM11 (10 μ M) and stimulated or not with EGF. Migration was assessed after 6h using the Boyden chamber assay. Results are the mean \pm S.E.M of two other independent experiments. ***P< 0.001 are values compared to the vehicle condition. Statistical analyses were calculated using a one-way analysis of variance followed by a Bonferroni's multiple comparison tests. (B) MDA-MB-231 cells treated with DMSO or LM11 (10 or 100 μ M) for 30 minutes, were stimulated with EGF (100 ng/ml) for the indicated time. The active forms of ARF1 and ARF6 as well as endogenous level of ARF1, ARF6 and actin were analyzed by Western blot. Data are representative of four independent experiments. Statistical analyses were calculated using a two-ways analysis of variance followed by a Bonferroni's multiple comparison tests. ** P< 0.01; **** P< 0.0001 are values compared to each vehicle condition.

FIGURE 5. Depletion of ARF1 blocks the recruitment of paxillin to focal adhesions in two other invasive breast cancer cell lines. HCC 70 (A) or SKBR3 (B) cells were transfected with a scrambled, or ARF1 siRNA. Cells were seeded onto collagen coverslips. After 20 and 30 minutes respectively, cells were fixed, permeabilized and incubated with specific anti-paxillin antibody. Labeling of paxillin was performed using a secondary antibody coupled to Alexa-Fluor 488 and actin stained using Alexa Fluor 568-phalloidin. Top right, magnifications showing presence or not of focal adhesions. Images are representative of at least 20 cells observed in three independent experiments. Scale bar, 10 μ m.

FIGURE 6. ARF1 controls β 1-integrin interaction with focal adhesion partners. MDA-MB-231 cells transfected with a scrambled or ARF1 siRNA were stimulated with EGF (100 ng/ml) for the indicated time. β 1-integrin was immunoprecipitated and associated paxillin (A), talin (B) or FAK (C) were detected by Western blotting. Data are the mean \pm SEM of three to four experiments. Statistical analyses were calculated using a

two-ways analysis of variance followed by a Bonferroni's multiple comparison tests. *P< 0.05, **P< 0.01, ****P< 0.0001 are values compared with the scrambled siRNA condition at each time point.

FIGURE 7. ARF1 controls the EGF-mediated interaction of proteins present in focal adhesion complex. MDA-MB-231 cells transfected with a scrambled or ARF1 siRNA were stimulated with EGF (100 ng/ml) for the indicated time. Talin was immunoprecipitated and associated paxillin (A) or FAK (C) was detected by Western blotting. Data are the mean \pm SEM of four experiments. Statistical analyses were calculated using a two-ways analysis of variance followed by a Bonferroni's multiple comparison tests. *P< 0.05, ****P< 0.0001 are values compared with the scrambled siRNA condition at each time point. (B) Cells were used as in (A), paxillin was immunoprecipitated and associated FAK was detected by Western blotting. Data are the mean \pm SEM of three experiments. Statistical analyses were calculated using a two ways analysis of variance followed by a Bonferroni's multiple comparison tests. *P< 0.05, **P< 0.01 are values compared with the scrambled siRNA condition at each time point.

FIGURE 8. ARF1 expression and activation control FAK phosphorylation. (A) MDA-MB-231 cells transfected with a scrambled or ARF1 siRNA were stimulated with EGF (100 ng/ml) for the indicated time. Endogenously expressed FAK (phosphorylated and total), actin and ARF1 were detected by Western immunoblotting using specific antibodies. Quantifications are the mean \pm SEM of five independent experiments. Statistical analyses were calculated using a two-ways analysis of variance followed by a Bonferroni's multiple comparison tests. *P< 0.05, **P< 0.01 are values compared with the scrambled siRNA condition at each time point. (B) ARF1-HA was transfected 24 h after introduction of the ARF1 siRNA 1. MDA-MB-231 cells were stimulated with EGF (100 ng/ml) for the indicated time. Endogenously expressed FAK (phosphorylated and total), actin and ARF1 were detected by Western immunoblotting using specific antibodies. This result is representative of four independent experiments. (C) MDA-MB-231 cells treated vehicle or LM11 (10 μ M) for 30 minutes, and were then stimulated with EGF (100 ng/ml) for the indicated time. Endogenously expressed FAK (phosphorylated

and total), actin and ARF1 were detected by Western immunoblotting using specific antibodies. Quantifications are the mean \pm SEM of four independent experiments. Statistical analyses were calculated using a two-ways analysis of variance followed by a Bonferroni's multiple comparison tests. * $P < 0.05$, are values compared with the control condition at each time points. (D) Cells were used in the same conditions as in (A). Endogenously expressed Src (phosphorylated and total), actin and ARF1 were detected by Western immunoblotting using specific antibodies. Quantifications are the mean \pm SEM of six independent experiments. Statistical analyses were calculated using a two-ways analysis of variance followed by a Bonferroni's multiple comparison tests. * $P < 0.05$ are values compared with the scrambled siRNA condition at each time points.

FIGURE 9. FAK controls ARF1 activation through EGFR phosphorylation. (A) MDA-MB-231 cells were transfected with a scrambled, or FAK siRNA and were stimulated with EGF (100 ng/ml) for the indicated time. The active forms of ARF1 as well as endogenous level of ARF1, FAK and actin were analyzed by Western blot. Data are the mean \pm SEM of six experiments. Statistical analyses were calculated using a two-ways analysis of variance followed by a Bonferroni's multiple comparison tests. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ are values compared with the scrambled siRNA condition at each time point. (B) MDA-MB-231 cells were transfected and stimulated as in (A). EGFR was immunoprecipitated and associated phospho-tyrosines were detected by Western blotting. Data are the mean \pm SEM of four experiments respectively. Statistical analyses were performed using a two-ways analysis of variance followed by a Bonferroni's multiple comparison tests. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ are values compared with the scrambled siRNA condition for each time point.

FIGURE 10. EGF stimulation promotes the association of ARF1 with focal adhesion proteins. MDA-MB-231 cells were stimulated with EGF (100 ng/ml) for the indicated time. ARF1 was immunoprecipitated and associated talin, FAK, paxillin, and β 1-integrin were detected by Western blotting. Data are the mean \pm SEM of four to seven experiments. Statistical analyses were performed using a one-way Anova analysis of

variance followed by a Tukey's multiple comparison tests. *P< 0.05, **P< 0.01 are values compared with the basal level of interaction.

Figure 1
Schlienger et al.

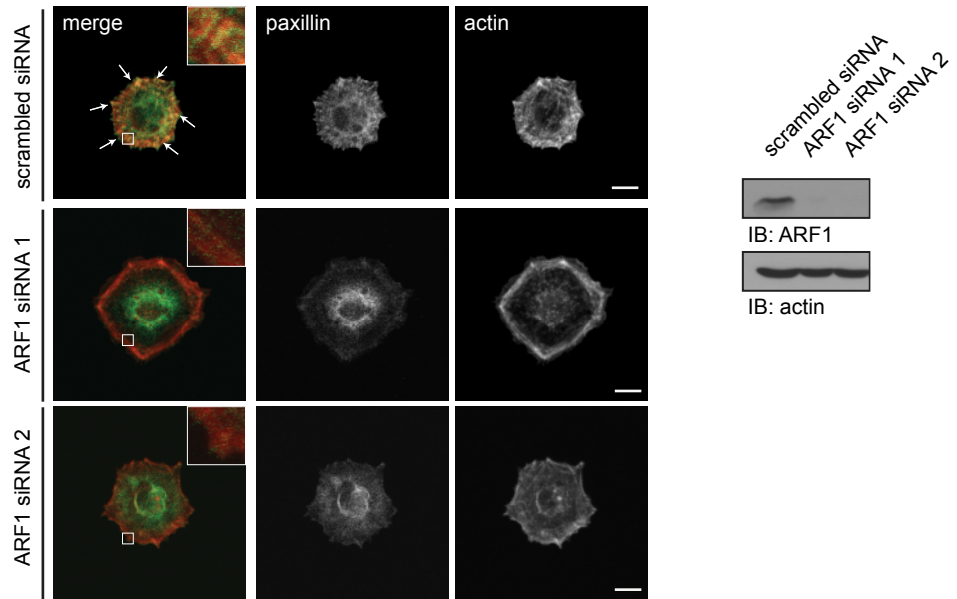


Figure III-1: Depletion of ARF1 blocks the recruitment of paxillin to FA.

Figure 2
Schlienger et al.

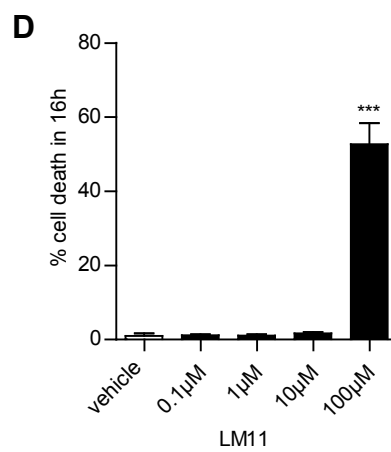
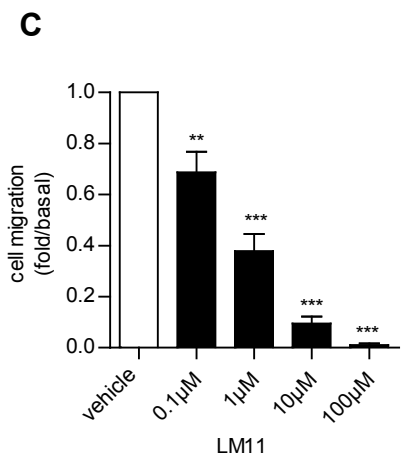
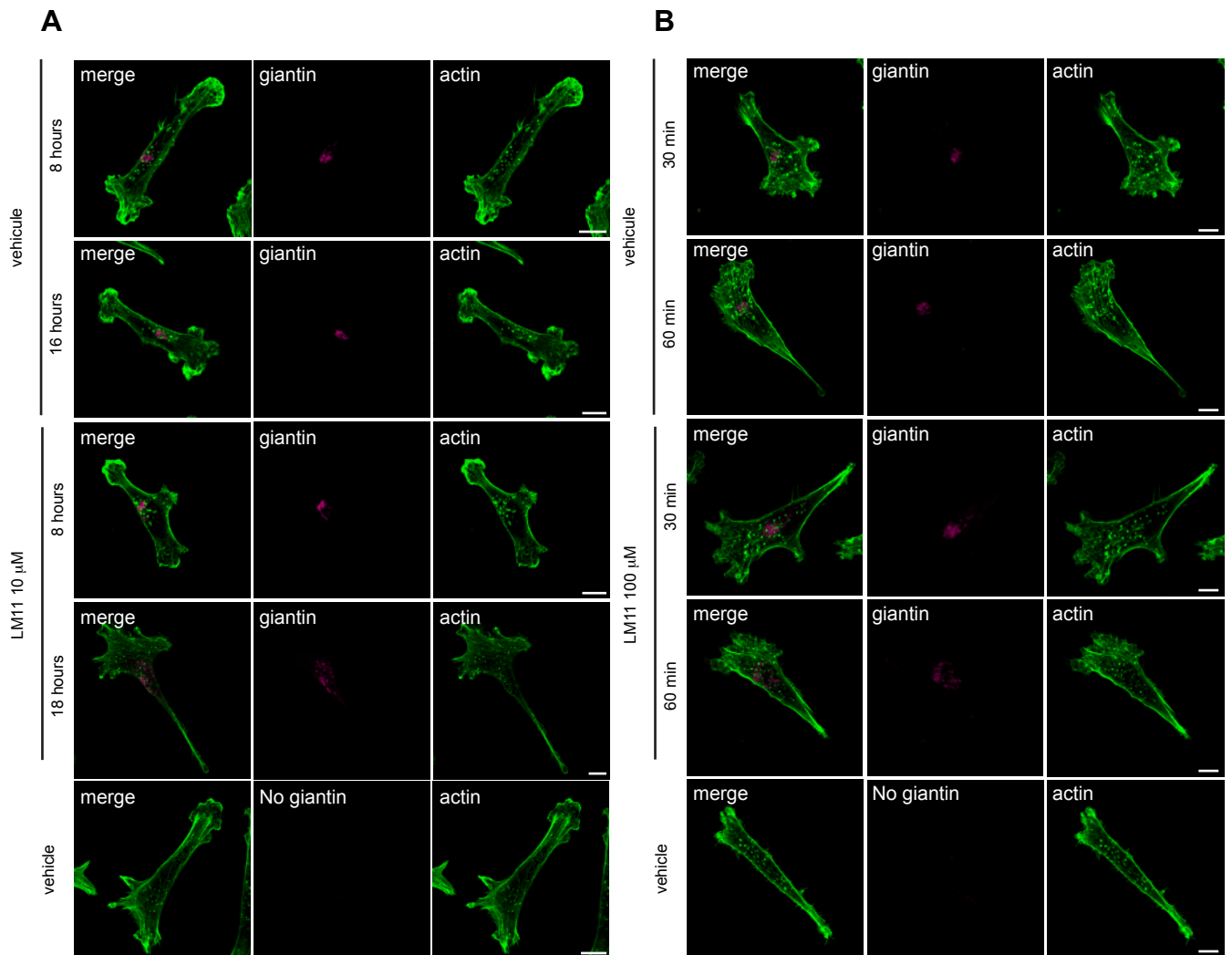


Figure III-2: Concentration and time-dependent effects of inhibitor LM11.

Figure 3
Schlienger et al.

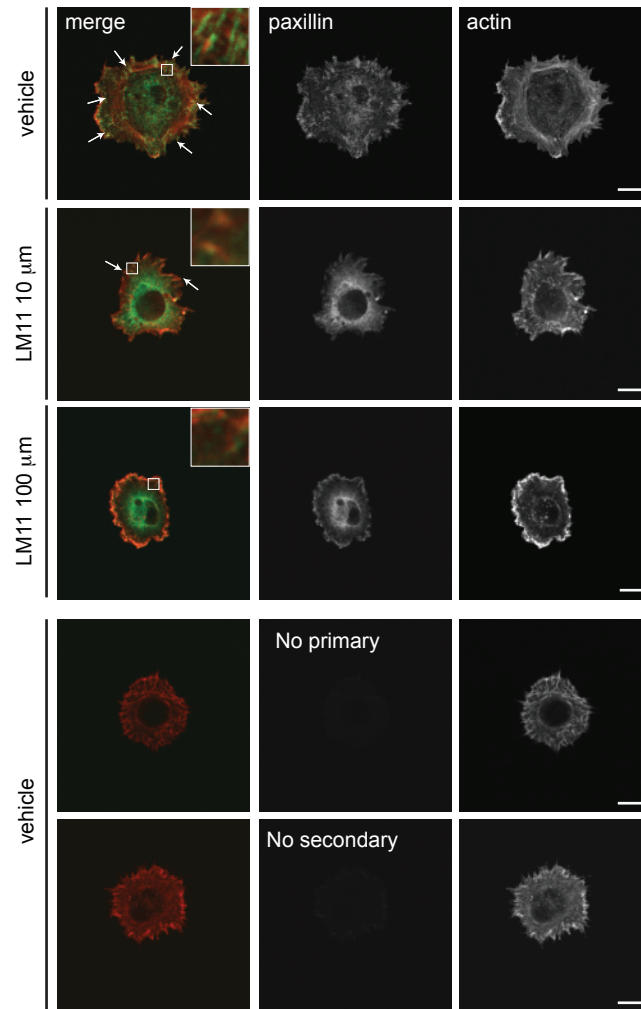
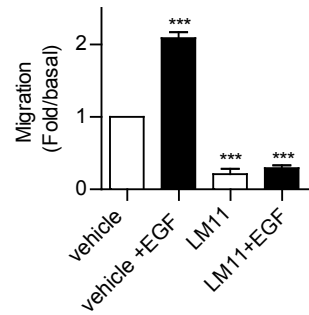


Figure III-3: Inhibition of ARF1 activation blocks the recruitment of paxillin to FA.

Figure 4
Schlienger et al.

A



B

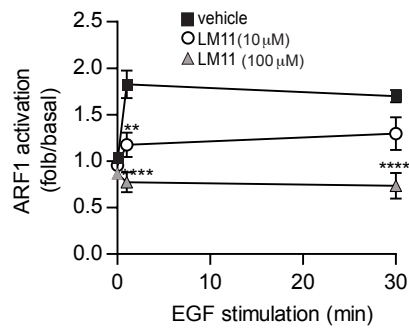
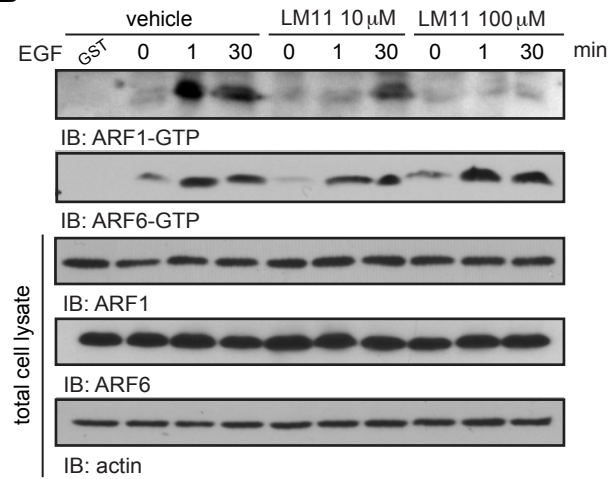


Figure III-4: Effect of ARF1 inhibitor LM11 in MDA-MB-231 cells.

Figure 5
Schlienger et al.

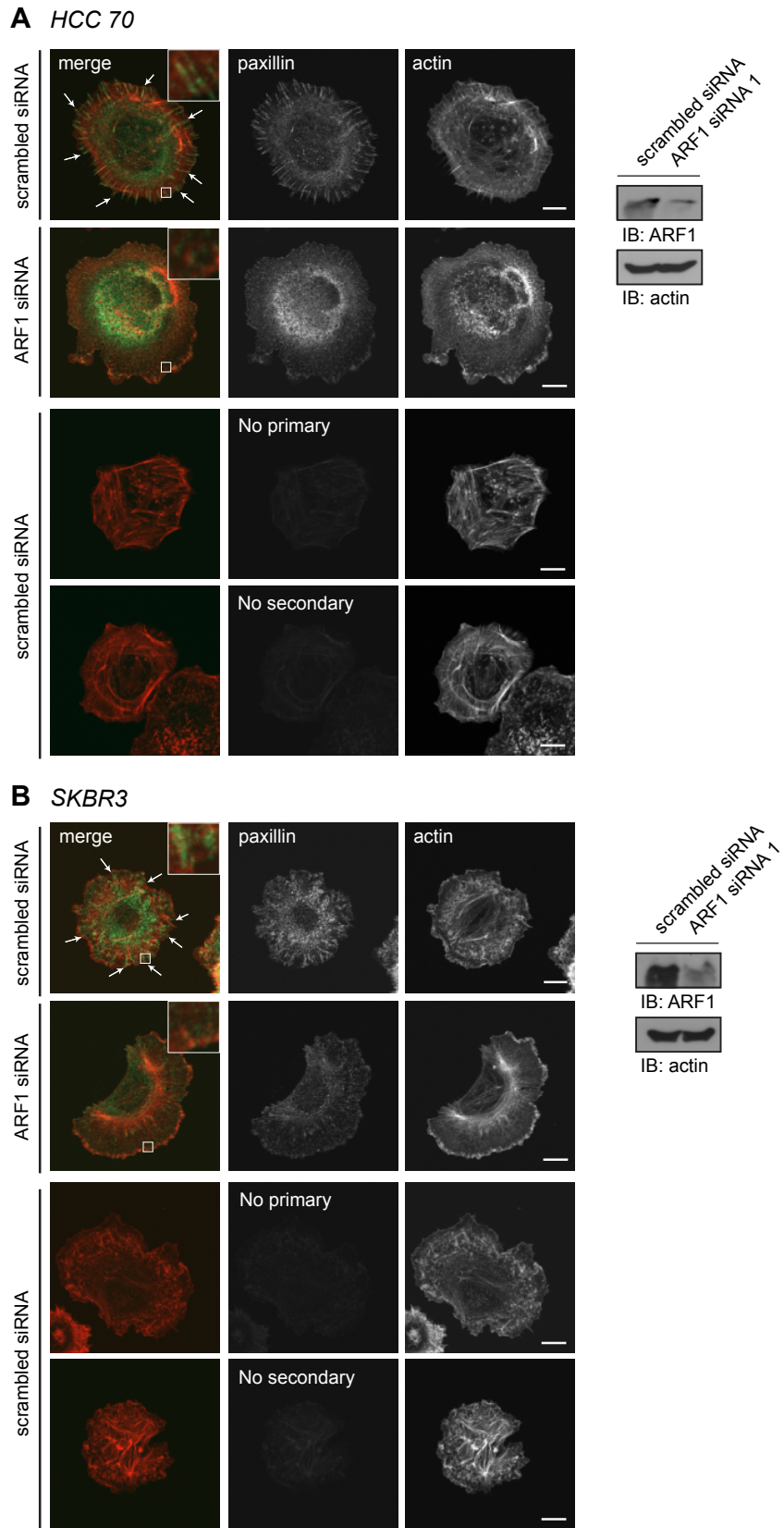


Figure III-5: Depletion of ARF1 blocks FA formation in two other cancer cell lines.

Figure 6
Schlienger et al.

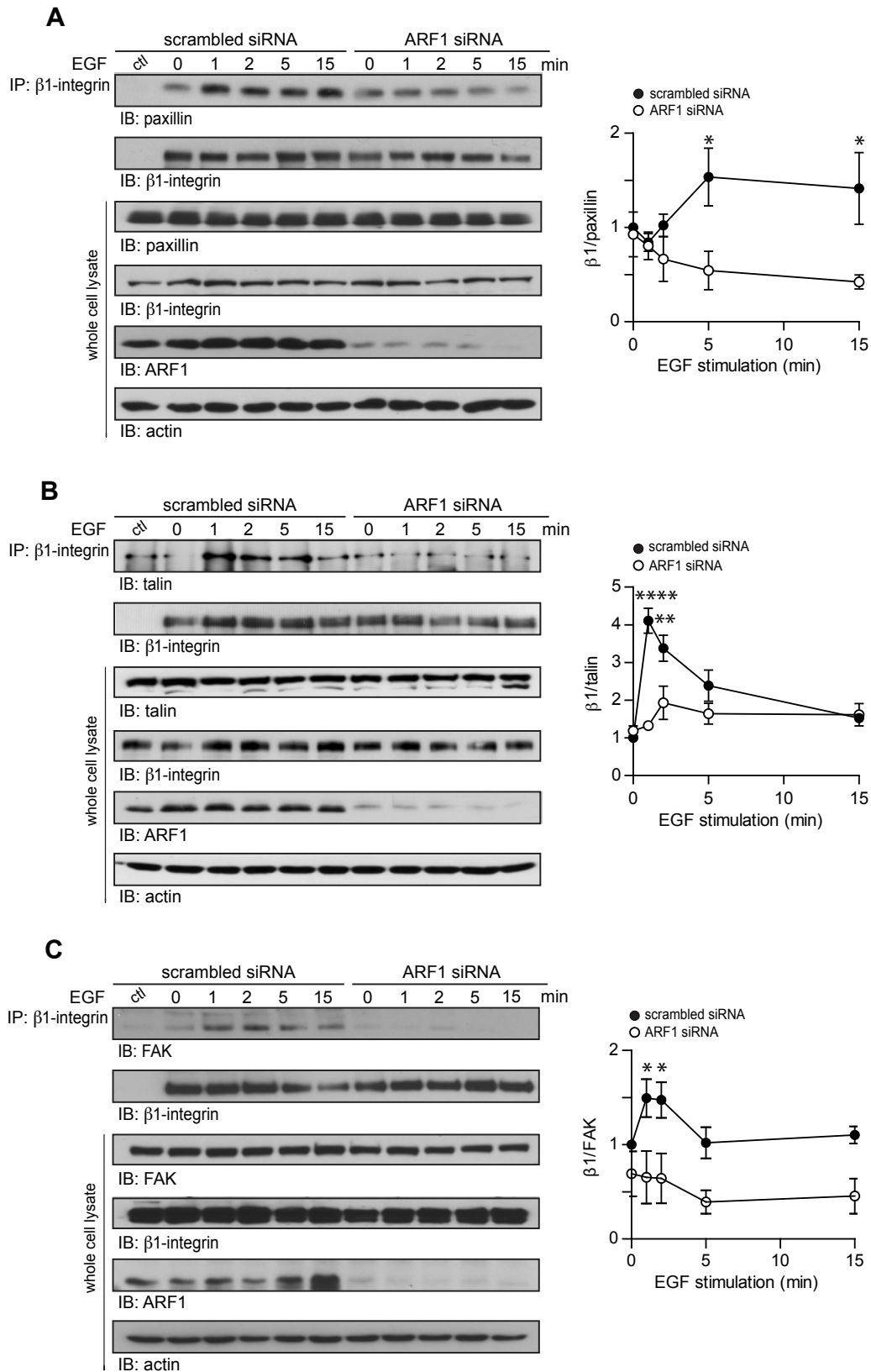


Figure III-6: ARF1 controls β 1-integrin interaction with focal adhesion partners.

Figure 7
Schlienger et al.

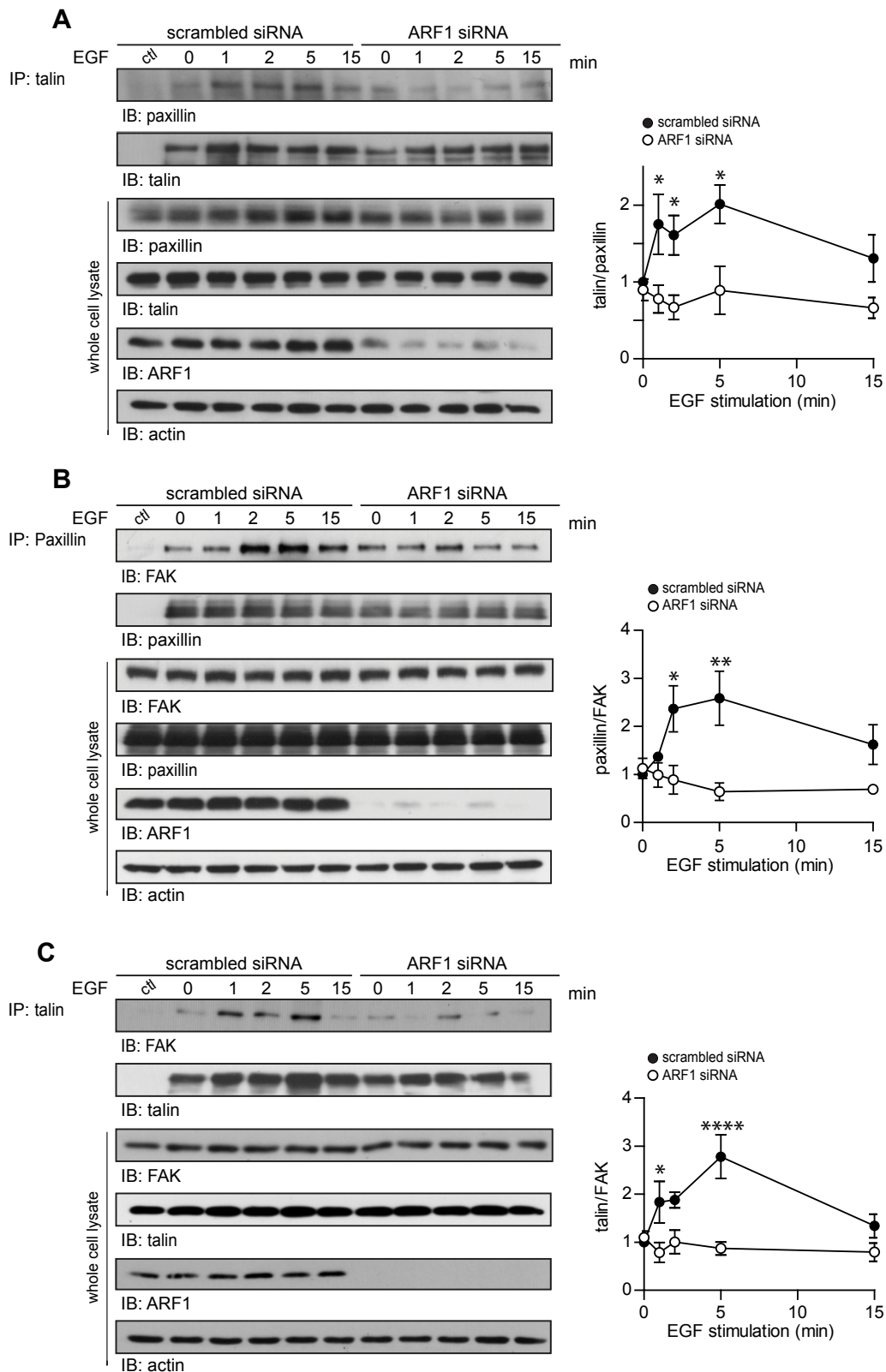


Figure III-7: ARF1 controls the EGF-mediated interaction of proteins in FA.

Figure 8
Schlienger et al.

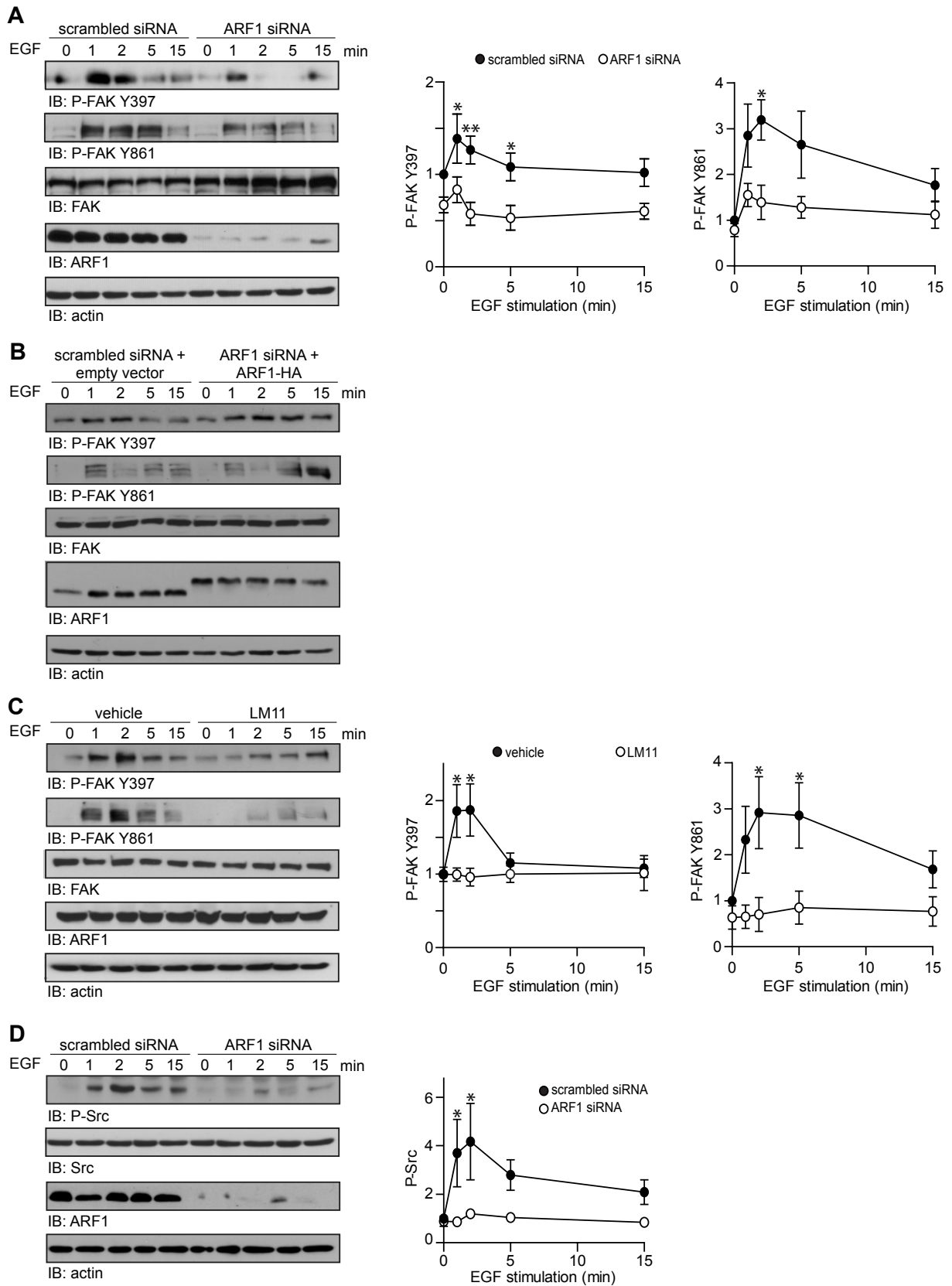


Figure III-8: ARF1 expression and activation control FAK phosphorylation.

Figure 9
Schlienger et al.

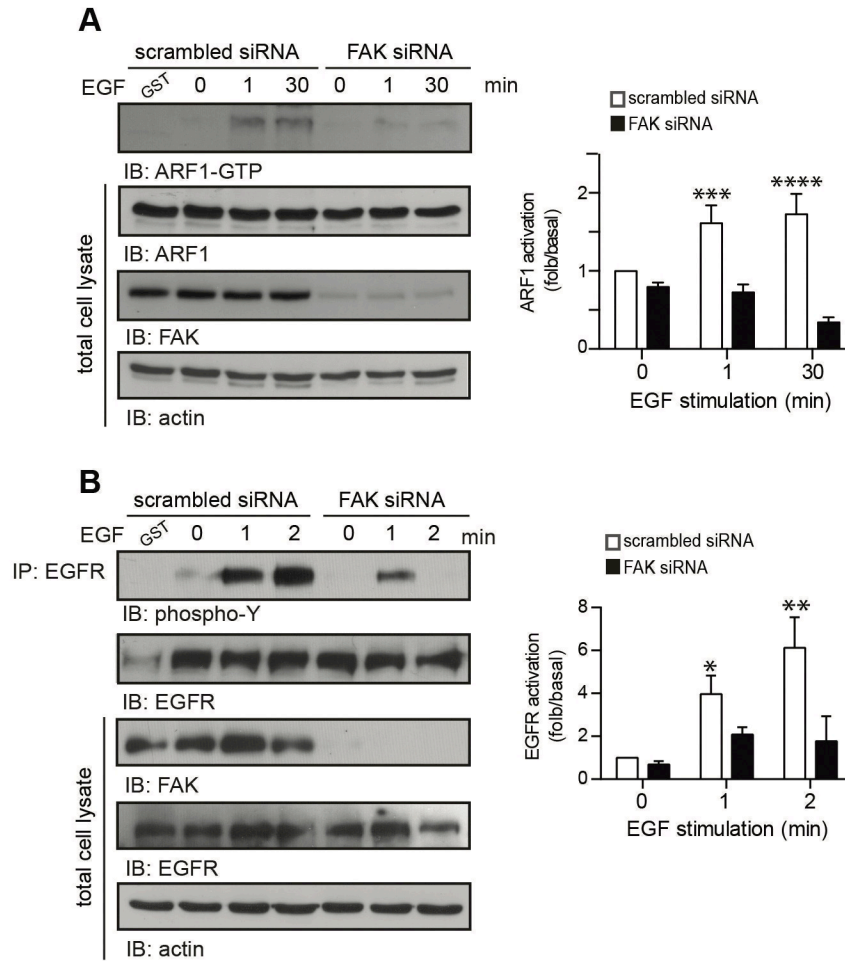


Figure III-9: FAK controls ARF1 activation through EGFR phosphorylation.

Figure 10
Schlienger et al.

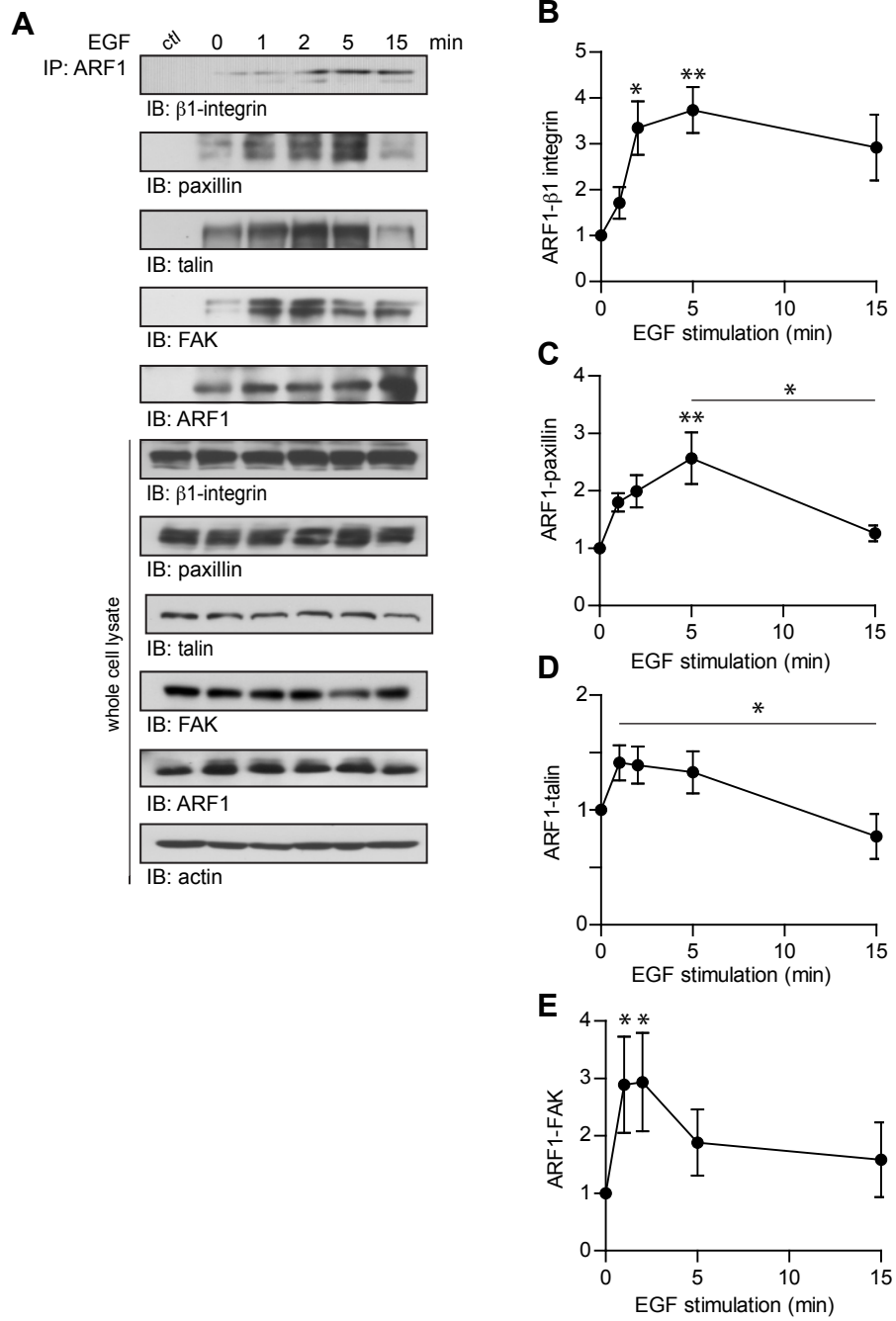


Figure III-10: EGF stimulation promotes the association of ARF1 with FA proteins.

REFERENCES

- Barry, S. T., & Critchley, D. R. (1994). The RhoA-dependent assembly of focal adhesions in Swiss 3T3 cells is associated with increased tyrosine phosphorylation and the recruitment of both pp125FAK and protein kinase C-delta to focal adhesions. *J Cell Sci*, *107* (Pt 7), 2033-2045. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7527052>
- Barry, S. T., Flinn, H. M., Humphries, M. J., Critchley, D. R., & Ridley, A. J. (1997). Requirement for Rho in integrin signalling. *Cell Adhes Commun*, *4*(6), 387-398. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9177901>
- Boulay, P. L., Cotton, M., Melancon, P., & Claing, A. (2008). ADP-ribosylation factor 1 controls the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway to regulate epidermal growth factor-dependent growth and migration of breast cancer cells. *J Biol Chem*, *283*(52), 36425-36434. doi:10.1074/jbc.M803603200
- Boulay, P. L., Schlienger, S., Lewis-Saravalli, S., Vitale, N., Ferbeyre, G., & Claing, A. (2011). ARF1 controls proliferation of breast cancer cells by regulating the retinoblastoma protein. *Oncogene*, *30*(36), 3846-3861. doi:10.1038/onc.2011.100
- Burridge, K., & Connell, L. (1983). A new protein of adhesion plaques and ruffling membranes. *J Cell Biol*, *97*(2), 359-367. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6684120>
- Calalb, M. B., Polte, T. R., & Hanks, S. K. (1995). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol*, *15*(2), 954-963. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7529876>
- Casanova, J. E. (2007). Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors. *Traffic*, *8*(11), 1476-1485. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00634.x
- Cohen, L. A., Honda, A., Varnai, P., Brown, F. D., Balla, T., & Donaldson, J. G. (2007). Active Arf6 recruits ARNO/cytohesin GEFs to the PM by binding their PH domains. *Mol Biol Cell*, *18*(6), 2244-2253. doi:10.1091/mbc.E06-11-0998
- Cornillon, J., Campos, L., & Guyotat, D. (2003). [Focal adhesion kinase (FAK), a multifunctional protein]. *Med Sci (Paris)*, *19*(6-7), 743-752. doi:10.1051/medsci/20031967743
- Cotton, M., Boulay, P. L., Houndolo, T., Vitale, N., Pitcher, J. A., & Claing, A. (2007). Endogenous ARF6 interacts with Rac1 upon angiotensin II stimulation to regulate membrane ruffling and cell migration. *Mol Biol Cell*, *18*(2), 501-511. doi:10.1091/mbc.E06-06-0567
- Daher, Z., Noel, J., & Claing, A. (2008). Endothelin-1 promotes migration of endothelial cells through the activation of ARF6 and the regulation of FAK activity. *Cell Signal*, *20*(12), 2256-2265. doi:10.1016/j.cellsig.2008.08.021
- Desgrosellier, J. S., & Cheresch, D. A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*, *10*(1), 9-22. doi:10.1038/nrc2748
- Donaldson, J. G., & Honda, A. (2005). Localization and function of Arf family GTPases. *Biochem Soc Trans*, *33*(Pt 4), 639-642. doi:10.1042/BST0330639

- Frame, M. C. (2002). Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta*, 1602(2), 114-130. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12020799>
- Galas, M. C., Helms, J. B., Vitale, N., Thierse, D., Aunis, D., & Bader, M. F. (1997). Regulated exocytosis in chromaffin cells. A potential role for a secretory granule-associated ARF6 protein. *J Biol Chem*, 272(5), 2788-2793. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9006918>
- Grigera, P. R., Jeffery, E. D., Martin, K. H., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., & Parsons, J. T. (2005). FAK phosphorylation sites mapped by mass spectrometry. *J Cell Sci*, 118(Pt 21), 4931-4935. doi:10.1242/jcs.02696
- Haines, E., Saucier, C., & Claing, A. (2014). The adaptor proteins p66Shc and Grb2 regulate the activation of the GTPases ARF1 and ARF6 in invasive breast cancer cells. *J Biol Chem*, 289(9), 5687-5703. doi:10.1074/jbc.M113.516047
- Hauck, C. R., Sieg, D. J., Hsia, D. A., Loftus, J. C., Gaarde, W. A., Monia, B. P., & Schlaepfer, D. D. (2001). Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupts epidermal growth factor-stimulated signaling promoting the migration of invasive human carcinoma cells. *Cancer Res*, 61(19), 7079-7090. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11585739>
- Huttenlocher, A., & Horwitz, A. R. (2011). Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(9), a005074. doi:10.1101/cshperspect.a005074
- Ilic, D., Furuta, Y., Suda, T., Atsumi, T., Fujimoto, J., Ikawa, Y., . . . Aizawa, S. (1995). Focal adhesion kinase is not essential for in vitro and in vivo differentiation of ES cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 209(1), 300-309. doi:10.1006/bbrc.1995.1503
- Kim, S. W., Hayashi, M., Lo, J. F., Yang, Y., Yoo, J. S., & Lee, J. D. (2003). ADP-ribosylation factor 4 small GTPase mediates epidermal growth factor receptor-dependent phospholipase D2 activation. *J Biol Chem*, 278(4), 2661-2668. doi:10.1074/jbc.M205819200
- Klijn, J. G., Berns, P. M., Schmitz, P. I., & Foekens, J. A. (1992). The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr Rev*, 13(1), 3-17. doi:10.1210/edrv-13-1-3
- Lewis-Saravalli, S., Campbell, S., & Claing, A. (2013). ARF1 controls Rac1 signaling to regulate migration of MDA-MB-231 invasive breast cancer cells. *Cell Signal*, 25(9), 1813-1819. doi:10.1016/j.cellsig.2013.05.011
- Linstedt, A. D., & Hauri, H. P. (1993). Giantin, a novel conserved Golgi membrane protein containing a cytoplasmic domain of at least 350 kDa. *Mol Biol Cell*, 4(7), 679-693. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7691276>
- Liu, Y., Loijens, J. C., Martin, K. H., Karginov, A. V., & Parsons, J. T. (2002). The association of ASAP1, an ADP ribosylation factor-GTPase activating protein, with focal adhesion kinase contributes to the process of focal adhesion assembly. *Mol Biol Cell*, 13(6), 2147-2156. doi:10.1091/mbc.E02-01-0018
- Malaney, S., & Daly, R. J. (2001). The ras signaling pathway in mammary tumorigenesis and metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 6(1), 101-113. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11467446>

- Mierke, C. T. (2013). The role of focal adhesion kinase in the regulation of cellular mechanical properties. *Phys Biol*, 10(6), 065005. doi:10.1088/1478-3975/10/6/065005
- Mitra, S. K., Hanson, D. A., & Schlaepfer, D. D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(1), 56-68. doi:10.1038/nrm1549
- Morgan, L., Nicholson, R. I., & Hiscox, S. (2008). SRC as a therapeutic target in breast cancer. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 8(4), 273-278. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19075780>
- Morishige, M., Hashimoto, S., Ogawa, E., Toda, Y., Kotani, H., Hirose, M., . . . Sabe, H. (2008). GEP100 links epidermal growth factor receptor signalling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion. *Nat Cell Biol*, 10(1), 85-92. doi:10.1038/ncb1672
- Nicholson, R. I., McClelland, R. A., Gee, J. M., Manning, D. L., Cannon, P., Robertson, J. F., . . . Blamey, R. W. (1994). Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer: association with response to endocrine therapy. *Breast Cancer Res Treat*, 29(1), 117-125. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7912565>
- Norman, J. C., Jones, D., Barry, S. T., Holt, M. R., Cockcroft, S., & Critchley, D. R. (1998). ARF1 mediates paxillin recruitment to focal adhesions and potentiates Rho-stimulated stress fiber formation in intact and permeabilized Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol*, 143(7), 1981-1995. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9864369>
- Powelka, A. M., Sun, J., Li, J., Gao, M., Shaw, L. M., Sonnenberg, A., & Hsu, V. W. (2004). Stimulation-dependent recycling of integrin beta1 regulated by ARF6 and Rab11. *Traffic*, 5(1), 20-36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14675422>
- Price, J. T., Tiganis, T., Agarwal, A., Djakiew, D., & 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 Res*, 59(21), 5475-5478. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10554021>
- Randazzo, P. A., Andrade, J., Miura, K., Brown, M. T., Long, Y. Q., Stauffer, S., . . . Cooper, J. A. (2000). The Arf GTPase-activating protein ASAP1 regulates the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(8), 4011-4016. doi:10.1073/pnas.070552297
- Schaller, M. D. (2001a). Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta*, 1540(1), 1-21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11476890>
- Schaller, M. D. (2001b). Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene*, 20(44), 6459-6472. doi:10.1038/sj.onc.1204786
- Schlienger, S., Campbell, S., & Claing, A. (2014). ARF1 regulates the Rho/MLC pathway to control EGF-dependent breast cancer cell invasion. *Mol Biol Cell*, 25(1), 17-29. doi:10.1091/mbc.E13-06-0335

- Sieg, D. J., Hauck, C. R., Ilic, D., Klingbeil, C. K., Schaefer, E., Damsky, C. H., & Schlaepfer, D. D. (2000). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol*, 2(5), 249-256. doi:10.1038/35010517
- Sieg, D. J., Hauck, C. R., & Schlaepfer, D. D. (1999). Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J Cell Sci*, 112 (Pt 16), 2677-2691. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10413676>
- Tague, S. E., Muralidharan, V., & D'Souza-Schorey, C. (2004). ADP-ribosylation factor 6 regulates tumor cell invasion through the activation of the MEK/ERK signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(26), 9671-9676. doi:10.1073/pnas.0403531101
- Turner, C. E. (2000). Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol*, 2(12), E231-236. doi:10.1038/35046659
- Viaud, J., Zeghouf, M., Barelli, H., Zeeh, J. C., Padilla, A., Guibert, B., . . . Chavanieu, A. (2007). Structure-based discovery of an inhibitor of Arf activation by Sec7 domains through targeting of protein-protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(25), 10370-10375. doi:10.1073/pnas.0700773104
- Wheeler, D. L., Iida, M., & Dunn, E. F. (2009). The role of Src in solid tumors. *Oncologist*, 14(7), 667-678. doi:10.1634/theoncologist.2009-0009
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., & Geiger, B. (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol*, 9(8), 858-867. doi:10.1038/ncb0807-858
- Zhao, Z. S., Manser, E., Loo, T. H., & Lim, L. (2000). Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. *Mol Cell Biol*, 20(17), 6354-6363. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10938112>

IV. CHAPITRE IV : ADP-ribosylation factor 1 expression regulates epithelial-mesenchymal transition and predicts poor clinical outcome in triple-negative breast cancer

Published in the journal: Oncotarget

Sabrina Schlienger ¹, Shirley Campbell ¹, Sarah Pasquin ¹, Louis Gaboury ² and Audrey Claing ¹

1 Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Canada

2 Department of Pathology and Cell Biology, Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montreal, Canada

Contact information:

Audrey Claing, PO Box 6128, Downtown station, Montreal, QC, Canada H3C 3J7 ;
Phone: (514) 343-6352, email: audrey.claing@umontreal.ca

Keys words: ADP-ribosylation factor (ARF), breast cancer, EMT, metastasis, invasion

Author contributions:

SS: experimental conception, experimental execution, data analysis and writing

SC: experimental conception and experimental execution (shRNA construction, MFP and lungs metastasis with MDA-MB-231 cells)

SP: experimental execution (FACS)

LG: experimental execution (TMA and IHC)

AC: experimental conception and writing

ABSTRACT

Metastatic capacities are fundamental features of tumor malignancy. ADP-ribosylation factor (ARF) 1 has emerged as a key regulator of invasion in breast cancer cells. However, the importance of this GTPase, *in vivo*, remains to be demonstrated. We report that ARF1 is highly expressed in breast tumors of the most aggressive and advanced subtypes. Furthermore, we show that lowered expression of ARF1 impairs growth of primary tumors and inhibits lung metastasis in a murine xenograft model. To understand how ARF1 contributes to invasiveness, we used a poorly invasive breast cancer cell line, MCF7 (ER⁺), and examined the effects of overexpressing ARF1 to levels similar to that found in invasive cell lines. We demonstrate that ARF1 overexpression leads to the epithelial-mesenchymal transition (EMT). Mechanistically, ARF1 controls cell–cell adhesion through β -catenin and E-cadherin, oncogenic Ras activation and expression of EMT inducers. We further show that ARF1 overexpression enhances invasion, proliferation and resistance to a chemotherapeutic agent. *In vivo*, ARF1 overexpressing MCF7 cells are able to form more metastases to the lung. Overall, our findings demonstrate that ARF1 is a molecular switch for cancer progression and thus suggest that limiting the expression/activation of this GTPase could help improve outcome for breast cancer patients.

INTRODUCTION

To this day, there is no effective targeted therapy for triple-negative breast cancers (TNBC). This breast cancer subtype typically possesses several characteristics features including a basal-like phenotype, lack of expression of ER, PR and HER2 and a poor clinical outcome due to visceral metastasis. TNBC are highly heterogeneous, numerous key genes and proteins have been identified as potential molecular targets. For example, expression of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is increased in more than 50% of TNBC and is associated with proliferation and invasion engaging mitogenic and survival pathways (Burness, Grushko, & Olopade, 2010; Guillomo et al., 2009; Nielsen et al., 2004). Although EGFR inhibitors have been developed, they have shown limited effects when used alone, mainly due to the development of resistance. Because TNBC show an aggressive pattern of progression with a high rate of early-occurring metastasis, the need for an effective and targeted therapy is therefore urgent.

The important role of small GTP-binding proteins, in the progression of cancer, has been first demonstrated by the discovery of the Ras oncogene and the signaling pathways it engages (Der, Krontiris, & Cooper, 1982; Parada, Tabin, Shih, & Weinberg, 1982; Santos, Tronick, Aaronson, Pulciani, & Barbacid, 1982). We and others have shown that the Ras-related ADP-ribosylation factors (ARF) are another class of small GTPases regulating key features of cancer cells (Boulay, Cotton, Melancon, & Claing, 2008; Boulay et al., 2011; D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006; Schlienger, Campbell, & Claing, 2014; Schlienger, Ramirez, & Claing, 2015). Two of the six identified isoforms, ARF1 and ARF6, are the best characterized. ARF6 has been shown to localize to the plasma membrane, regulating receptor endocytosis, membrane lipid transformation and remodeling of the actin cytoskeleton (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006; Hashimoto et al., 2004). In contrast, ARF1 has been classically associated with the Golgi apparatus and first identified as a key molecular switch responsible for vesicular transport through early compartments of the secretory pathway (Kahn et al., 1992). However, in some cell types, this isoform can also be found at the plasma membrane (Boulay et al., 2008; Cohen et al., 2007; Galas et al., 1997; Mitchell et al., 2003). Activation of ARF proteins requires guanine nucleotide exchange factors (ARF GEF), while inactivation is facilitated by GTPase-activating proteins (ARF GAP). The expression of both ARF1 and ARF6 is up-

regulated in the most invasive breast cancer cell lines (Boulay et al., 2008; Hashimoto et al., 2004). Using mutants mimicking the active and inactive forms, as well as RNA interference to knockdown expression of these ARF isoform, ARF6 was first identified as a key regulator of invasiveness (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006). Furthermore, silencing of the ARF GEF, GEP100, was found to be an effective strategy to inhibit lung metastasis in mice suggesting that *in vivo*, ARF GTPases may contribute to the progression of breast cancer (Morishige et al., 2008).

We have previously shown that ARF1 activation, following EGFR stimulation, plays a key role in TNBC cell invasion (Schlienger et al., 2014). However, whether ARF1 is important for tumor progression *in vivo* has never been examined. Our findings reveal the importance of ARF1 in the most lethal forms of breast cancer and identify this GTPase as a potential new target for the design of next generation breast cancer treatments.

RESULTS

Enhanced ARF1 expression in breast cancer tissue samples correlates with poor patient prognostic

To study the relevance of ARF1 in breast cancer, we aimed to examine whether expression of this GTPase was modulated in tissue samples from breast cancer patients. First, we validated the specificity of the IHC reaction with ARF1 antibody. MDA-MB-231 cells were used because we have previously shown that they strongly labeled with the ARF1 antibody. As illustrated in figure 1A, cells were left intact, or transfected with either a scrambled or ARF1 siRNA. Strong labeling was observed in intact and siRNA scrambled conditions. However, ARF1 depletion led to an almost complete loss of immune reactivity. An adjacent section from the same untransfected cells was incubated with a non-immune serum that contained IgG (same isotype/same species) showing complete lack of expression of ARF1. These data confirmed the specificity and sensitivity of our approach before TMA experiments were undertaken.

To examine levels of ARF1 expression in human cancer, we first used negative (spleen and ovary) and positive (stomach and colon) controls as predicted by the literature, and in accordance with the Human Protein Atlas [<http://www.proteinatlas.org>]

(Tsai et al., 2012). As illustrated in figure 1B, immunostaining conditions were satisfactorily established. Then, we controlled the labeling of ARF1 in normal breast tissue (Fig. 1C). We next investigated ARF1 expression in human breast cancer tissue of various histological grades. We found a positive correlation between elevated levels of ARF1 and breast cancer of higher histological grades (Fig. 1D). Finally, we examined the presence of ARF1 in a TMA comprising a variety of breast cancer tissues. Variations in the levels of ARF1 expression according to molecular subtypes of breast cancer were assessed. Although all subtypes were found to be positive for ARF1, samples collected from patients with luminal A and luminal B breast cancer had the lowest level of this ARF isoform. In sharp contrast, both HER2-positive and TNBC subtypes demonstrated higher levels of ARF1, even though only TNBC showed to be significantly different from luminal breast tissue (Fig. 1E). We also examined levels of ARF6 proteins. First, expression of this ARF isoform was assessed in negative (heart muscle and skin dermis) and positive (colon and pancreas) controls in accordance with the Human Protein Atlas [<http://www.proteinatlas.org>] (Suppl fig. 1A). Next, we controlled the labeling of ARF1 in normal breast tissue (Suppl fig. 1B). As expected, we found a positive correlation between elevated levels of ARF6 and breast cancer of higher histological grades (Suppl fig. 1C). Surprisingly, we found that patients with HER2-positive breast cancer had the lowest level of this ARF isoform (Suppl fig. 1D). Luminal A, luminal B and TNBC subtypes demonstrated higher levels of ARF6. Interestingly, level of this ARF isoform was less pronounced than ARF1 in TNBC (Fig. 1E and Suppl fig. 1D).

Altogether, our results indicate that overexpression of ARF1 is closely associated with the most lethal and advanced forms of breast cancers.

ARF1 expression controls the formation of primary tumors and metastases *in vivo*

To investigate the role of ARF1 in tumor formation and metastasis, we generated a human TNBC cell line expressing an inducible control (scrambled) or ARF1 shRNA to trigger the knockdown of this ARF isoform. MDA-MB-231 cells, were first infected with lentiviruses containing scrambled or ARF1 shRNA sequences. A 3-day treatment of the cells with doxycycline (dox) blocked the ability of an EGF stimulation to engage signaling via the PI3K pathway without affecting the ability of the receptor itself to become phosphorylated or signal through the Erk1/2 pathway (Suppl fig. 2A). These

observations correlate with our previous findings where, depletion of ARF1 using siRNA, only reduced EGFR signaling to the survival pathway (Boulay et al., 2008). Furthermore, we examined whether our shRNA was effective in suppressing expression of the GTPase over a long period of time. As illustrated in supplemental figure 2B, induction of the shRNA with dox was effective in inhibiting expression of ARF1 well over a month.

Cells were injected orthotopically into the fourth mammary fat pads of severe combined immunodeficiency mice (SCID)/beige female mice and tumor growth was monitored weekly (Fig. 2). Once development of primary tumor masses became visible, mice were randomly separated to receive food, which contained or not dox. Eight weeks after implantation and in conditions where ARF1 expression was inhibited, primary tumors were smaller than the controls (scrambled shRNA +/- dox and ARF1 shRNA - dox) (Fig. 2A). Knockdown of ARF1 affected tumor growth by reducing tumor weight and volume (Fig. 2B, C). Lungs and brain were also analyzed by gross examination and no metastatic lesions were found.

The effect of ARF1 depletion on the metastatic potential was next investigated by injecting the cells into the mouse lateral tail vein. Metastatic colonization was evaluated after two months by gross examination and microscopic inspection of tissue sections. As illustrated in figure 3A, multiple metastatic lung lesions were observed in mice injected with control MDA-MB-231 cells. However, when expression of ARF1 was suppressed, only a few metastases were noticed at the lung surface. The lungs from each group were then removed and processed for histological examination. The number of metastatic clusters, present in the lungs of mice injected with scrambled shRNA cells was significantly higher than that in the ARF1 group injected with ARF1-shRNA cells (Fig. 3B). Microscopic examination of lung tissue sections revealed a sharp decrease in the number of metastatic foci of the lung when ARF1 expression was knocked down (Fig. 3C). In each group, all metastases were found outside of the vessels. A visual inspection of other organs was made and showed no evidence of metastasis.

Taken together these data demonstrate that inhibition of ARF1 expression, in highly invasive breast cancer cells, decreased both primary breast tumor formation and metastatic breast tumors within the lung.

ARF1 overexpression promotes EMT of human breast cancer cells

To address whether overexpression of ARF1 is sufficient to confer enhanced invasive capacities of breast cancer cells, we next used the ER⁺ MCF7 cells characterized as highly proliferative, but non-invasive tumor cells. These cells have low metastatic potential *in vivo* (Nagaraja et al., 2006) and express low levels of both ARF1 and ARF6 when compared to MDA-MB-231 cells (Suppl Fig. 3A). First, we confirmed that both ARF isoforms could be activated in MCF7 cells. As expected, FBS treatment enhanced ARF1 activation by a 2.1-fold and ARF6 by 3-fold compared to control conditions (Suppl fig. 3B). It was previously suggested that, in HeLa cells, activation of ARF1 was under the control of ARF6 (Cohen et al., 2007). To determine whether, in our model, ARF6 had any influence on ARF1 activity, we first overexpressed the different ARF isoforms and looked at their activation (Suppl fig. 3C). We found that the activation of each ARF, in MCF7 cells, is not affected by the overexpression of the other isoform. We confirmed these data by depleting ARF6 and assessing ARF1 activity. Under unstimulated or stimulated FBS conditions, ARF1 activation was not affected by ARF6 knock down (Suppl fig. 3D).

MCF7 cells characteristically proliferate maintaining tight cell-cell junctions. As illustrated in figure 4, β -catenin and E-cadherin localization to the cell membrane serves to maintain this non-invasive phenotype observed in various carcinomas. In conditions where ARF1 was overexpressed, MCF7 cells exhibited a spindle-like mesenchymal morphology and membrane localization of β -catenin and E-cadherin was lost (Fig. 4A). ARF6-overexpressing cells maintained their epithelial morphology, but less β -catenin and E-cadherin were present at the cell-cell junctions (Fig. 4A). Plasma membrane, cytosolic and nuclear fractions were isolated biochemically to compare the amount of ARF1 in each cellular fraction. Overexpression of the GTPases caused their relocalization to different cellular compartments, but increased strongly their localization to the plasma membrane supporting additional roles, when overexpressed (Fig. 4B). Western blot analysis revealed that total expression of β -catenin and E-cadherin was not affected by ARF overexpression (Fig. 4B). However, both β -catenin and E-cadherin levels were diminished in ARF1-overexpressing MCF7 cellular membrane fractions, but found enhanced in cytosolic and nuclear fractions. Similarly, overexpression of ARF6 also

resulted in increased cytosolic β -catenin, and diminished E-cadherin in membrane fractions (Fig. 4B). Because localization of β -catenin is associated with its activity, we next examined its phosphorylation state. Expression of ARF1 spontaneously decreased the basal level of β -catenin phosphorylation (Ser³³, Ser³⁷, Thr⁴¹) by 1.7 fold compared to control cells. However, when cells were in the presence of FBS, phosphorylation of β -catenin was markedly decreased reflecting an activation of this signaling protein (Fig. 4C). In contrast, ARF6 expression did not have a significant effect. These results therefore provide evidences that ARF1 is a crucial regulator of cell-cell adhesion by repressing adherent junctions formation through a β -catenin-dependent pathway and epithelial tight junctions through E-cadherin.

Alternatively, activation of Ras can induce EMT by enhancing the expression of a panel of transcription factors such as snail (*SNAI1*) and slug (*SNAI2*) (Peinado, Olmeda, & Cano, 2007). We next determined whether the overexpression of ARF1 could directly impact Ras signaling since MCF7 cells do not exhibit activating mutation of this well-characterized oncogene. As depicted in figure 5A, overexpression of ARF1 enhanced basal expression and activation of this prototypical GTPase. Similar findings were obtained following expression of ARF6. Furthermore, overexpression of either ARF proteins enhanced mRNA and protein levels of SNAI1/snail (Fig. 5B and C). In contrast, mRNA levels of SNAI2 was unaffected by overexpression of ARF1 or ARF6, but higher protein levels of slug was found in both conditions. These results therefore suggest that high expression of ARF proteins can contribute to EMT by controlling activation of classic inducers such as oncogenic Ras, snail and slug.

ARF1 overexpression promotes cellular motility, invasiveness, proliferation and survival

We next studied cellular responses associated with EMT. Using time-lapse microscopy, we quantitatively assessed motility of control and ARF1-overexpressing cells using a wounding assay. After 16h in high serum media (10% FBS), when ARF1 was expressed, total and net displacements were enhanced compared to control conditions (Fig. 6A). Similar results were found for ARF6-overexpressing cells. However, net displacement was found more enhanced than ARF1 (Fig. 6A). To complement these findings, we examined cell invasion using Matrigel-coated Boyden

chambers. As illustrated in figure 6B, FBS stimulation did not significantly increase the ability of MCF7 cells to migrate in this transwell assay. However, when ARF1 was overexpressed and cells stimulated by FBS, the invasive capacity was enhanced by 6-fold. In contrast, overexpression of ARF6 did not have a significant effect in this assay. In these conditions, zymography assay revealed that overexpression of ARF1 could activate a specific metalloproteinase, MMP-2, by controlling its expression via focal adhesion kinase (FAK) (Fig. 6C, D and E). These findings further confirm that expression of ARF1 can enhance the invasive capacity of MCF7 cells.

Since we noticed that cellular proliferation was enhanced in ARF1-overexpressing cells, we performed MTT assays to examine proliferation over a 7-day period. Basal proliferation of control, ARF1 and ARF6-overexpressing MCF7 cells was similar. FBS treatment had no marked effect in control condition. Interestingly, this effect was greatly enhanced by FBS treatment when cells overexpressed ARF1 or ARF6 proteins (Fig. 6F). In this context, expression of Ki-67, a proliferative marker, was also increased, contributing to the overall effect observed (Fig. 6G). We confirmed our results by qualitatively assessing proliferation of control, ARF1 and ARF6-overexpressing cells using a 5 days wounding assay. When control MCF7 cells were left in low serum media (1% FBS), there was no significant closure of the wound, and FBS treatment had no marked effect. When ARF1 was overexpressed, FBS stimulation had a more potent effect and wound healing was observed (Suppl fig. 4). Similar results were found for ARF6-overexpressing cells (Suppl fig. 4).

In order to understand how ARF proteins control these processes, we next looked at signaling pathways regulating motility, invasion and proliferation of cancer cells. Supplemental figure 5 shows that overexpression of ARF1 potentiated activation of the MAPK and PI3K pathways assessed respectively by the phosphorylation of Erk 1/2 and Akt. In contrast, ARF6 overexpression only resulted in the activation of the MAPK pathway.

It has been previously reported that cells with increased invasive phenotypes exhibit decreased sensitivity to apoptotic stimuli (de Jong, van Diest, Michalides, & Baak, 1999). We therefore examined whether ARF1 overexpression may protect against a treatment with the cell death inducer, etoposide. Analysis of apoptosis using the

Annexin V/ PI assay revealed that treatment of control cells with this topoisomerase inhibitor decreased by 25% cell survival (Fig. 6H). Overexpression of ARF1 protected MCF7 cells from etoposide-induced death. Similar results were obtained when ARF6 was overexpressed (Fig. 6H). To induce its effect, etoposide is known to promote activation of caspase proteases 9 and 3. As illustrated in figure 6I, induction of caspase-9 and caspase-3 protease activity, in cells exposed to etoposide, was abolished when cells overexpressed ARF1 or ARF6.

Altogether, these results suggest that overexpression of ARF proteins not only enhances the invasive capacity of MCF7 cells, but also their ability to proliferate and survive.

Overexpression of ARF is effective to promote metastasis *in vivo*

Because our results suggest that high expression of ARF1 is associated with cancer cell invasiveness, we finally examined whether overexpression of this small GTP-binding protein could confer the ability of non-invasive cancer cells to form metastasis *in vivo*. Control or ARF-overexpressing MCF-7 cells were injected into the tail vein of SCID/beige mice (Fig. 7A). Lung metastases were examined after six weeks. Injection of control cancer cells did not form external metastatic nodules to the lungs (Fig. 7B). However, when ARF1 was overexpressed, the appearance of tumors was noticed. Microscopic examination of lung tissue sections, by H&E staining, revealed that overexpression of ARF1 led to the formation of internal extravasated metastatic nodules in contrast to the control condition (Fig. 7C). An increase of metastatic potential was also found when ARF6 was overexpressed. These results suggest that overexpression of ARF proteins can promote the colonization process of breast cancer cells into the lung and therefore contribute to breast cancer metastasis formation in mice.

DISCUSSION

In this report, we describe the molecular mechanism by which ARF1 confers an invasive phenotype to breast cancer cells and show that *in vivo*, this key molecular switch greatly contributes to tumorigenesis. We have previously reported that ARF1 plays a

major role in controlling the proliferation, migration and invasion of TNBC cells (Boulay et al., 2008; Schlienger et al., 2014). However, whether in an *in vivo* setting, elevated ARF1 expression, in certain types of breast cancer cells, indeed contributes to tumor invasiveness was unknown. Tumor progression, in animal models and human, is greatly influenced by the stroma through various types of heterotypic signaling capable of altering the aggressive behaviors of carcinoma cells (Mao, Keller, Garfield, Shen, & Wang, 2013). Therefore, the way tumor cells behave in 2D or 3D-tissue culture doesn't necessarily reflect the way they behave *in vivo*. It is thus important to define the role of the proteins we identify in cellular models as key regulators of cancer cell behaviors in their natural environment in order to validate their key roles and identify them as potential therapeutic targets or new biological markers (Poondru et al., 2002; Williams et al., 2000). In the present study, we provide strong evidences that ARF1 is a key protein of breast cancer invasiveness in a murine model and further demonstrate that it could be a potential prognostic factor for patients.

We have chosen to perform this study with MDA-MB-231 and MFC7 cells, which express high and moderate levels of ARF1, respectively. Using these two well-characterized cell lines, we have examined molecular alterations and *in vivo* tumor progression. Using orthotopic injection of ARF1 knockdown tumor cells into the mammary fat pads of SCID/beige mice, we show that ARF1 is required for primary tumor growth. We also show, using injection in mouse-tail veins, that ARF1 knockdown affects the later steps of the metastasis cascade. Although the stroma contributes to tumor progression, depletion of ARF1, in invasive breast cancer cells, is associated with a significant decrease of malignant potential. Conversely, non-invasive MCF7 cells formed metastases to the lung when levels of ARF1 were enhanced. The demonstration that ARF1 regulates tumorigenesis complements previous reports that highlighted the implication of another ARF isoform in this process. By modulating the activity of ARF6 through knockdown of a nucleotide exchange factor, GEP100, tumor metastasis to the lung was impaired (Morishige et al., 2008). Furthermore, inhibition of the ARF6 GAP AMAP1 was also reported to limit metastatic activities *in vivo* (Onodera et al., 2005). Using similar experimental models, our findings directly demonstrate the key role of ARF1 in metastasis. To support this, we show here that in tissue samples from breast

cancer patients, overall expression level of ARF1 is correlated with the most aggressive subtypes of tumor and high-grade breast cancer. We have found similar results for ARF6 when examining tumor grade. However, overexpression of this isoform differed from ARF1 according to the molecular subtypes. Our IHC data for ARF6 are supported by previous studies performed on a breast cancer TMA that showed an increase of ARF6 level in breast tumor metastasis cores and up-regulation, at the plasma membrane, in high-grade triple-negative breast cancers (Eades et al., 2015; Marchesin et al., 2015).

To better understand how ARF1 may contribute to invasiveness, we overexpressed the GTPase into a cell model known to be poorly invasive. MCF7 cells have conserved several characteristics of differentiated mammary epithelium, namely the ability to form tight cellular junction similar to those occurring in normal epithelial cells and therefore to grow as interconnected colonies in 2D tissue culture. Our findings demonstrate that overexpressing ARF1 leads to major phenotypical changes. First, cells lose their epithelial characteristics and acquire a mesenchymal phenotype with the hallmarks of EMT. We show that key inducers such as the transcription factors snail and slug are also upregulated. Furthermore, membrane E-cadherin is lost and β -catenin is activated. This process was previously shown to impact E-cadherin localization. When phosphorylated on specific residues, β -catenin is largely defective in E-cadherin binding (Faux, Coates, Kershaw, Layton, & Burgess, 2010; Lee, Koria, Qu, & Andreadis, 2009; Maher, Mo, Flozak, Peled, & Gottardi, 2010; Sadot et al., 2002). It was previously reported that changes in β -catenin localization are not always associated with changes in its expression, further supporting the importance of examining β -catenin localization and phosphorylation state (Wang et al., 2013). ARF1 overexpression also led to activation of several signaling events also known to contribute to EMT (Ras, Erk 1/2, PI3K/Akt pathway). Together, our findings demonstrate that ARF1 controls β -catenin and E-cadherin function, possibly by inhibiting β -catenin phosphorylation through its ability to potentiate Ras signaling. Although ARF6 can promote Ras activation, this isoform only modulate β -catenin localization. Furthermore, when ARF1 is overexpressed in MCF7, it has the potential to activate, not only the MAPK pathway, like ARF6, but both the MAPK and PI3K pathways. These results support our previous work in invasive cell models where ARF1 acts to control Rho signaling, well known for its role in EMT

(Gimond et al., 1999; Price & Collard, 2001). Furthermore, we recently reported that ARF1 controls activation of metalloproteinases, key proteins of EMT (Radisky & Radisky, 2010; Schlienger et al., 2014). We also demonstrated that ARF1 controls FAK activity, a key protein for MMP expression (Hauck, Hsia, Ilic, & Schlaepfer, 2002; Lim et al., 2004; Schlienger et al., 2015; Zhang et al., 2002). Here, we show that overexpression of ARF1 in MCF7 could activate MMP-2 by controlling its expression via FAK, a process which may contribute to the newly acquired invasive phenotype. We also demonstrate that ARF1 and ARF6 control major processes that increase tumor metastasis *in vivo* such as cell motility, migration, proliferation, and resistance to apoptosis.

In summary, we provide evidence that ARF1 is a key regulator of cancer progression. For the first time, we demonstrate that elevated level of ARF1 is associated with a higher incidence of metastases and that its expression is elevated in high-grade cancers and triple-negative basal-like breast cancers. These results support the use of ARF1 as a potential pharmacological target for invasive breast cancer therapy.

MATERIALS AND METHODS

Patients, tissue samples and Tissue microarray (TMA)

A retrospective study was carried out using a cohort of 198 female breast cancer patients comprising tumors of different histological grades (Yousef, Tahir, St-Pierre, & Gaboury, 2014). Archived formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples containing tumor tissues were collected for the study. Tumor grades from each breast cancer (FFPE) samples were confirmed using the Modified Scarff-Bloom-Richardson-Elston-Ellis grading system (SBR-EE) (Bocker, 2002). In addition, extraneous tissues such as spleen, ovary, stomach and colon were included in this study as control. All samples were obtained from Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) after granting the approval of the research ethical committee (Approval No. SL 05.019). Tissue microarray were next constructed as previously described (Yousef et al., 2014). Sections (4 µm) from each paraffin block were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and examined by two independent pathologists. Core punches, 1 mm in diameter, were drilled from representative areas contained within each FFPE tumor blocks. Each core was realigned

in duplicate or triplicate into recipient blocks according to the intended design of the map using a Manual Tissue Arrayer I (Beecher Instruments). Blocks were next inverted and incubated overnight in the oven over a glass slide. TMA blocks were allowed to cool until they could easily detach from the glass slide. Tissue sections from each TMA were prepared and one slide from each block was stained with H&E to review the diagnosis and histological grades on all tissue samples. Additional representative sections from each block were submitted to automated immunohistochemical (IHC) staining.

Immunohistochemistry (IHC)

IHC was performed on TMA containing representative FFPE tumor tissue samples. Anti-ARF1 antibody (dilution 1/350) was applied to every section for 2 hours at room temperature. Sections were then incubated with a specific secondary biotinylated antibody. Streptavidin horseradish peroxidase, and 3,3-diaminobenzidine were used according to the manufacturer's instructions (DABmap detection kit, Ventana Medical Systems). Sections were next counterstained with Gill's hematoxylin and sodium bicarbonate. Finally, each slide was coverslipped and scanned at high resolution (40X) using the Nanozoomer Digital Pathology equipment (Hamamatsu, Bridgewater, NJ). Two independent pathologists reviewed all stained sections on two separate occasions.

To assure that labeling conditions with the anti-ARF1 rabbit polyclonal antibody were optimal, assessment of ARF1 expression was made on cell lines first. These assays were carried out according to the manufacturer recommendations on an automated immunostainer (Discovery XT system, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA). Heat-induced epitope retrieval was performed with proprietary reagents. Blockers were applied for 8 minutes before the primary antibody to block the endogenous peroxidase activity. Anti-ARF1 antibody (Proteintech) was applied for 2 hours at room temperature. ARF6 antigen recovery was conducted using heat retrieval (Heat-Induced Epitope Retrieval) with standard CC2 (Ventana Medical Systems) using a low pH citrate buffer. Slides were incubated with 1/50 of anti-ARF6 antibody for 3 hours at room temperature. In addition, immunohistochemical analysis of estrogen receptor (ER; monoclonal, clone SP1, RTU, sCC1, Ventana Medical Systems), progesterone receptor (PR; monoclonal, clone 1E2, RTU, sCC1, Ventana Medical Systems), HER2 (monoclonal, clone 4B5,

RTU, sCC1, Ventana Medical Systems), Ki-67 (monoclonal, clone SP6, pretreated sCC1, BioCare medical) were used as surrogate markers of breast cancer molecular subtypes. (Caldarella et al., 2013). Antigen retrieval was performed with proprietary reagents followed by incubation with the primary antibody then secondary biotinylated antibody was applied. Streptavidin horseradish peroxidase, and 3,3-diaminobenzidine were used according to the manufacturer's instructions (DABmap detection kit, Ventana Medical Systems). Sections were next counterstained with Gill's hematoxylin and sodium bicarbonate. Finally, each slide was coverslipped and scanned at high resolution (40X) using the Nanozoomer Digital Pathology equipment (Hamamatsu, Bridgewater, NJ).

Scoring of ARF1 and ARF6 expression on each core was carried out using a two tier scoring system as previously described (Yousef et al., 2014). The first parameter corresponds to the percentage of immunoreactive cells also known as the quantity score (QS). QS was estimated as follows: no staining was scored as 0, 1-10% of cells with positive staining were scored as 1, >10- 50% as 2, >50-70% as 3, and >70-100% as 4. We next assessed the second parameter (staining intensity score), which was rated as follows: No staining → 0, weak staining → 1, moderate staining → 2, and strong staining → 3. The product of the quantity and the staining intensity scores represents the total IHC score that ranges from 0 to 12 (Bai et al., 2004; Wolff et al., 2013). IHC staining according to the College of American Pathologists (CAP)-approved scoring system for ER, PR, HER2 and Ki-67 were used as surrogate markers to classify breast cancer tumors into luminal A, luminal B, HER-2 positive and triple-negative breast cancer (Caldarella et al., 2013; Yousef et al., 2014).

Cell culture

MDA-MB-231 cells were obtained from ATCC and maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin/streptomycin (Wisent, St-Bruno, Canada). MCF7 were obtained from Sylvie Mader (University of Montreal, Canada). Cells were maintained at 37°C in 5% CO₂. Cells were transfected with DNA and/or siRNA using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions. ARF1 siRNA was designed against part of the 3' untranslated region and coding region of ARF1. siRNA corresponding to human FAK (J-003164-16) siFAK1 or (J-003164-14)

siFAK2 were used in our experiments. ARF1, FAK and scrambled siRNA were synthesized by Thermo Science Dharmacon (Lafayette, CO) and used in previous studies (Schlienger et al., 2014; Schlienger et al., 2015).

Antibodies

Anti-ARF1 and anti-ARF6 was from Proteintech (Chicago, IL). Anti-pan-actin, anti-phospho-AKT, anti-AKT, anti-pro-caspase 9, anti-pro-caspase 3, anti-EGFR, anti-phospho-ERK and anti-pro-MMP2 were all from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Anti-ARF6, Anti-ERK, anti-FAK, anti-snail, anti-slug and anti-p-tyrosine were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-HA was from Abcam (Cambridge, MA). Anti-TurboGFP was from Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL) and anti-Ki-67 was from BD Bioscience (Bedford, MA). HRP-conjugated secondary antibodies were from R & D Systems (Minneapolis, MN).

Lentiviral constructs and virus production

MISSION ARF1 shRNA plasmids were purchased from Sigma Aldrich (ARF1: TRCN0000039873, TRCN0000039874, TRCN0000039875, TRCN0000039876 and TRCN0000039877, ARF6: TRCN0000381410, TRCN0000286788, TRCN0000380270, TRCN0000294067 and TRCN0000294069 and scrambled (SHC016)). The ARF1 TRCN0000039876 and ARF6 TRCN0000380270 target sequence was chosen as it showed the highest level of knockdown in MDA-MB-231 cells (data not shown). ARF1 shRNA oligo duplex sequence and scrambled duplex were from Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, Iowa) and annealed in the doxycycline-inducible pLKO-TET-ON vector (Addgene plasmid #21915) according to Wiederschain protocols (Wee et al., 2008) (Wiederschain et al., 2009). Positive bacterial clones were selected with carbenicillin and sequenced to confirm the identity of shRNA constructs (Genomic platform at the Institut of Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montreal, Canada). Lentivirus containing the shRNA were generated using 293T cells transfected with pLKO-TET-ON-ARF1 or scrambled shRNA constructs and the psPax.2 and pMD2.G packaging plasmids. MDA-MB-231 cells were infected in the presence of polybrene (8 µg/ml) and stable clones were selected in the presence of 0.75 µg/ml of

puromycin. pLKO-TET-ON-ARF1-shRNA or scrambled-infected MDA-MB-231 cells were maintained in 0.75 µg/ml of puromycin in a tetracyclin-free media. For the generation of MCF7-overexpressing cells, the ARF1, ARF6 or scramble sequence was cloned into the pLenti vector (Addgene plasmid 17448) and lentivirus were generated as described above. Cells were infected and stable clones were selected using 1 µg/ml puromycin.

Animal protocols

The local institutional animal ethics committee approved all animal studies. For xenograft studies, 6-wk-old SCID/beige female mice were obtained from Charles River Inc. (St. Constant, Quebec, Canada). Before inoculation, pLKO-TET-ON-scrambled-shRNA or pLKO-TET-ON-ARF1-shRNA MDA-MB-231-infected MDA-MB-231 cells grown in serum containing culture medium were washed with PBS buffer. Cell pellets (2×10^6 cells) were resuspended in 50 µl of 1:1 Matrigel (BD Bioscience) plus PBS and injected into the fourth mammary fat pads (MFP) of both flank of the anesthetized mice, using a 27mm gauge needle (Liao et al., 2012). All animals were numbered and kept separately in a temperature-controlled room on a 12 hours light/12 hours dark schedule. After the injection of the cells, mice were monitored twice weekly for the development of primary tumor masses. Once the tumors became visible (2 weeks post-injection), mice were randomly separated so that each experimental group was homogeneous to start. Mice received food, which contained or not doxycycline (2018, 625 Doxycycline, Harlan Laboratories, Madison, WI) for shRNA induction (Cawthorne, Swindell, Stratford, Dive, & Welman, 2007). They were weighted and measured two times a week using a caliper. The tumor volume was estimated using the equation $\text{volume} = \pi (\text{length}) (\text{width}^2)/6$ (Tomayko & Reynolds, 1989). Two month after the injection, mice were euthanized with CO₂. A visual examination of the brain and lung found no metastasis. For the experimental metastasis assay, 3×10^6 stable MCF7 or 2×10^6 scrambled or ARF1 shRNA MDA-MB-231 tumor cells were suspended in 200 µl of PBS and were injected into the tail vein of SCID/beige mice (Liao et al., 2012; Zhang et al., 2007). Cell pellets were suspended in 200 µl of PBS. They were weighted twice a week. After 6- to 8-weeks, mice were euthanized and lungs were excised. A visual examination of other organs

showed no other metastasis. The lungs were dissected from the mice and stored in formalin (10%) solution prior to the counting of visible tumors on all surfaces of the lungs. For metastatic nodules observation, all dissected lungs were paraffin-embedded, sectioned, stained with H&E, and metastatic nodules were microscopically examined. Each slide was scanned at high resolution (40X) using the Nanozoomer Digital Pathology equipment (Hamamatsu, Bridgewater, NJ, USA).

Microscopy

Cells were fixed with PBS solution containing 4% paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature and then permeabilized with a solution of DMEM containing 0.05% saponin. The slides were incubated for 1 hour with a primary antibody. After several washes, the plates were incubated for 1 hour in the dark in the presence of an anti-mouse or anti-rabbit Alexa Fluor 488 antibody (Invitrogen). Cells were then mounted on slides using a solution of Aqua-mount (Fisher Scientific, Ottawa, Canada) and observed using a confocal microscope (LSM510META).

Western blotting

Cells were harvested, and total soluble proteins were run on poly-acrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blotted for relevant proteins using specific primary antibodies (as described for each experiment). Secondary antibodies were horseradish peroxidase conjugated (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) or with enhanced chemiluminescence detection reagent. Quantification of the digital images obtained was performed using ImageQuant 5.2 software (GE Healthcare Life Sciences).

Membrane Recruitment

MCF7 cells were transfected with GFP, ARF1 or ARF6, serum-starved overnight and stimulated with FBS (10%). Cells were then harvested in 200 μ l of phosphate-buffered saline buffer containing protease inhibitors. Cell membranes were disrupted by passing three times through a 27G1/2 syringe. Cell lysates were then centrifuged for 10 minutes at 500 g to discard the nucleus and cellular debris, and the supernatants were ultracentrifuged at 100,000 g (30 minutes, 4°C) to isolate cytosolic and membrane

fractions. Membrane pellets were then lysed for 10 minutes in 100 μ l of ice-cold TGH buffer. Samples were run on a 10% polyacrylamide gel. Proteins were detected by immunoblot analysis using specific antibodies.

Wound healing assays

MCF7 cells were transfected separately with GFP, ARF1, ARF6 (48h) and seeded onto coverslips. Forty-eight hours post-transfection, confluent cells were serum-starved or not for 8 hours. Three scratches per well were then performed using a micropipette tip. Cells were treated with 1% or 10% FBS, and left for 16 hours or 5 days. Cells were live tracked or fixed and stained as in (Boulay et al., 2008). Image analysis was performed using Fiji (National Institutes of Health, USA) and Icy softwares (Institut Pasteur, Paris, France).

Invasion assays

Cells were transfected with GFP, ARF1 or ARF6 (48 hours) and serum-starved overnight before the assay. Briefly, cells were trypsinized and seeded into Boyden chambers (24-well inserts with 8- μ m pore, precoated with Matrigel), and one hour after plating, cells were stimulated with FBS. After 20 hours, cells were fixed using 4% paraformaldehyde and incubated with 0.1% crystal violet. The number of cells in the lower chamber was assessed as in (Schlienger et al., 2014).

RNA extraction

Total RNA was extracted from MDA-MB-231 with TRIzol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Real time-PCR was performed by the genomic platform at the IRIC's Genomics Core Facility (Université de Montréal, Montreal, Canada).

Apoptosis analysis

Following transfection (24 hours), cells were treated for 48 hours with vehicle or etoposide (100 μ M). Apoptosis induction was determined by Annexin V-FITC (Bd bioscience, 556419) and propidium iodide (PI) (MBL, Nakaku, Nagoya, JP) double staining, following the manufacturer's instructions. Briefly, 10^6 cells were washed in

PBS, resuspended in 500 μ l of binding buffer (10 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂) and stained with 2 μ l of Annexin V-FITC and 1 μ l of PI (1mg/mL) for 10 minutes on ice. Analysis was performed using a FACS Canto (BD Biosciences, Bedford,MA, USA) flow cytometer and data were analyzed using the FlowJo software.

Co-immunoprecipitation

MDA-MB-231 cells were kept in serum-free medium overnight and stimulated with EGF (100 ng/ml) for the indicated times. Co-immunoprecipitation experiments were conducted as previously described (Cotton et al., 2007). Briefly, cells were lysed into TGH buffer, and EGFR was immunoprecipitated using an anti-EGFR antibody. To ensure the specificity of the interaction we have included a control condition where immunoprecipitations were performed in the absence of EGFR antibody. Interacting pan tyrosine was assessed by Western blot analysis.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Prism (GraphPad, (ver. 4.0a; San Diego, CA, USA). As indicated in the figure legends, either a one-way or two-way analysis of variance followed by either a Tukey's, Bonferroni's or Dunnett's multiple comparison tests were used.

Disclosure of Potential Conflicts of interest: none

Grant support: This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (MOP-106596) to AC. AC is the recipient of a Senior Scientist Award from the Fonds de Recherche du Québec-Santé.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. ARF1 expression correlates with molecular subtypes of breast cancer and is associated with tumor grade. (A) MDA-MB-231 cells were transfected or not with scrambled or ARF1 siRNA. Each pellet of cells was incubated in the presence or the absence of the anti-ARF1 antibody. Scale bar, 50 μ m. Endogenous level of ARF1 and actin were analyzed by Western blot (right panel). (B) Representative IHC labeling with ARF1 in normal human tissue. Spleen and ovary were chosen as negative controls while, stomach and colon served as positive controls. Each sample was incubated with anti-ARF1 antibody as shown in A. Scale bar, 100 μ m. (C) Expression of ARF1 in normal breast tissues. Samples correspond to individual breast tissue from the same TMA and incubated with anti-ARF1 antibody. Scale bars, 100 μ m. (D) ARF1 expression in breast cancers tissue samples according to histological grades. Samples are from the same TMA described as in A. Scale bars, 100 μ m. Graph showing ARF1 labeling intensity in breast cancer tissue samples according to histological grade. Grade I n=34, II n=64 and III n=100, dataset including 198 patients. (E) Expression of ARF1 in different molecular subtypes of breast cancer. Samples correspond to individual breast cancer tissue from the same TMA and incubated with anti-ARF1 antibody. Scale bars, 100 μ m. Graph depicting ARF1 labeling intensity of breast cancer tissue samples according to molecular subtype. Luminal A n=60, luminal B n=13, HER2+ n=14 and triple-negative n=37, dataset including 124 patients. In D and E, significance was measured by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

FIGURE 2. ARF1 regulates primary invasive breast cancer tumor in a mouse model. (A) Primary tumour growth was measured upon orthotopic injection of MDA-MB-231 cells with control (scrambled) or ARF1 shRNA in SCIB/beige mice, +/- doxycycline (dox). Representative tumors are shown in different panel, n=8, 14, 14, 14 tumors per group, respectively. (B) Graph showing quantitative tumor weight of each group. (C) Quantitative results of tumor volume. (B and C) Significance was measured by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

FIGURE 3. ARF1 depletion impaired breast mouse metastasis. (A) Gross images of SCID/beige lungs, two months after tail vein injection of MDA-MB-231 cells with control (scrambled) or ARF1 knockdown, +/- doxycycline. n=4, 7, 6 and 7 mice per group respectively. Scale bars, 1 cm. Graph on the right show quantitative results of gross surface lung metastases. Significance was measured by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (B) Histological section of lungs from SCID/beige mice bearing metastatic foci. Scale bars, 5 mm. (C) Higher magnification from (B) of H&E stained sections of the lungs. Scale bars, 500 μm .

FIGURE 4. ARF1 is important for the maintenance of adherent junctions. (A) MCF7 cells were transfected with empty vector, ARF1 or ARF6 and fixed after 48 hours. Cells were stained for β -catenin, E-cadherin and nuclei with Hoechst. Images are from three independent experiments, with more than 100 cells per condition. Scale bars, 10 μm . (B) Cells transfected as in (A) were used to prepare membrane fractions. Associated β -catenin, E-cadherin, ARF1 and ARF6 were assessed by Western blotting. These experiments are representative of three others. β 1-Integrin was used as a plasma membrane marker, GAPDH as a cytosol marker and Histone 3 as nuclei marker. (C) Cells transfected as in (A) were stimulated with FBS (10%) for four hours. Endogenously expressed β -catenin, HA-tagged (hemagglutinin) proteins and actin were detected by Western blotting. Data are the mean \pm SEM of four experiments. Statistical analysis was performed using a two-ways ANOVA followed by a Bonferroni's multiple comparison test. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

FIGURE 5. ARF proteins control key factors of EMT. (A, B, C) Cells transfected with empty vector, ARF1 or ARF6. (A) Cells were stimulated with FBS (10%) for four hours. Ras-GTP levels were assessed by Western blot analysis. Levels of Ras, actin and HA tagged proteins were determined by Western blot. Left graph is representative of Ras activation. Data are the mean \pm SEM of four experiments. Statistical analysis was performed using a two-ways ANOVA followed by a Bonferroni's multiple comparison test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Right graph is representative of Ras expression level. Data are the mean \pm SEM of five experiments. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA followed by a Dunnett's multiple comparison test. * $P < 0.05$. (B) Total

RNA was extracted from MCF7 and SNAI1, SNAI2 mRNA were analyzed. Experiments are representative of three experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. (C) Levels of snail and slug protein were determined by Western blot. Data are the mean \pm SEM of three experiments. Statistical analyses were performed using a one-way ANOVA followed by a Bonferroni's multiple comparison tests. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

FIGURE 6. Overexpression of ARF controls motility, invasion, proliferation, and survival of MCF7 cells. (A) MCF7 were transfected with empty vector, or ARF1 or ARF6. After 48h, confluent cells were scratch and wound healing was monitored over 16h in the presence FBS. Hoechst-stained nuclei were tracked using Fiji software. Representative pictures of cells tracking over 16h are shown. Scale bars, 50 μ m. Quantification of cell motility: right graphs represent the mean total and net displacement. $n = 120-150$ cells. ** $p < 0.001$, **** $p < 0.0005$. (B) Cells transfected as in A, were seeded into Matrigel-coated Boyden chambers. Cells were left untreated or stimulated with FBS 10% for 16 hours. Graph is representative of three images taken, per condition, of three independent experiments. (C) Protein expression of pro-MMP2, HA-tagged protein and actin were detected by Western immunoblotting. (D) Transfected cells were stimulated or not for 12 hours with 10% FBS. Supernatants were collected and analyzed by zymography. Data are the mean \pm SEM of three experiments. (E) Cells were transfected with either empty vector, HA-ARF1, scrambled or two different FAK siRNA. Protein expression of pro-MMP2, FAK, HA-tagged protein and actin were detected by Western immunoblotting. Graph represents the mean \pm SEM of five experiments. Significance was measured by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison tests. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (F) MCF7 cells transfected as in A, were seeded in 96-well plates. Proliferation was measured by MTT (Thiazolyl blue-tetrazolium-bromide) over 7 days. These experiments are representative of four performed in triplicate. (G) Endogenous expression of Ki-67, ARF6 and actin was detected by Western immunoblotting, after 5 and 4 days. (H) Cells were transfected as in (A) and 24 hours after the transfection, they were treated with vehicle or etoposide. After 48 hours, surviving cells were analyzed by FACS, using Annexin-V binding and PI permeability assays. Data are the mean \pm SEM of three experiments respectively. (I) Transfected cells

treated as in (H) and level of pro-caspase 9, pro-caspase 3, actin and HA-tagged protein were detected by Western immunoblotting. Data are the mean \pm SEM of three experiments. In (D, H and I), significance was assessed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

FIGURE 7. ARF1 and ARF6 overexpression increases metastasis *in vivo*. (A) MCF7 cells stably expressing GFP, ARF1 or ARF6 used for tail vein injection, were lysate and protein expression of GFP, ARF1, ARF6 and actin was detected by Western immunoblotting. (B) Images of SCID/beige lungs, after tail vein injections of MCF7 cells stably expressing GFP, ARF1 or ARF6. $n=10$, 9 and 10 mice per group, respectively. Arrows indicate metastatic tumor. Scale bars, 1 cm. (C) H&E stained sections of lungs from mice bearing the indicated tumors; representing metastatic foci. Scale bars, 500 μm .

Supplemental figure legends

SUPPLEMENTAL FIGURE 1. ARF6 expression correlates with molecular subtypes of breast cancer and is associated with tumor grade. (A) Representative IHC labeling with ARF6 in normal human tissue. Heart muscle and skin dermis were chosen as negative controls, while colon and pancreas served as positive controls. Each sample was incubated with anti-ARF6 antibody. Scale bars, 100 μm . (B) Expression of ARF6 in normal breast tissues. Samples correspond to individual breast tissue from the same TMA and incubated with anti-ARF6 antibody. Scale bar, 100 μm . (C) ARF6 expression in breast cancers tissue samples according to histological grades. Samples are from the same TMA described as in A. Scale bars, 100 μm . Graph showing ARF6 labeling intensity in breast cancer tissue samples according to histological grade. Grade I $n=54$, II $n=84$ and III $n=83$, dataset including 231 patients. (D) Expression of ARF1 in different molecular subtypes of breast cancer. Samples correspond to individual breast cancer tissue from the same TMA and incubated with anti-ARF1 antibody. Scale bars, 100 μm . Graph depicting ARF1 labeling intensity of breast cancer tissue samples according to molecular subtype. Luminal A $n=60$, luminal B $n=39$, HER2+ $n=61$ and triple-negative $n=35$, dataset including 195 patients. In C and D, significance was measured by one-way ANOVA

followed by Tukey's multiple comparison tests. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

SUPPLEMENTAL FIGURE. 2. Validation of ARF1 shRNA in MDA-MB-231 breast cancer cells. (A) Control or ARF1 knockdown MDA-MB-231 cells treated with +/- doxycycline for 3 days were stimulated with EGF (100 ng/ml) for 2 minutes. EGFR was immunoprecipitated and associated phospho-tyrosines were detected by Western blotting. Endogenously expressed ERK, AKT, actin and ARF1 were detected by Western blot. (B) ARF1 shRNA transfected MDA-MB-231 cells were treated or not with doxycycline for 33 days. ARF1 and actin were detected as in (A). Data are representative of three experiments (A and B).

SUPPLEMENTAL FIGURE. 3. ARF activation and localization in MCF7 cells. (A) Endogenous ARF1, ARF6 and actin were detected by Western blotting. (B) Cells were stimulated with 10% FBS for 4 hours. Activated ARF1 or ARF6 was detected by GST pulldown assay. These experiments are representative of three others. *** $p < 0.001$ compared to unstimulated conditions. (C) MCF7 cells were transfected with empty vector, ARF1 or ARF6 and left in high serum media (10% FBS). Activated ARF1 or ARF6 was assessed as in A. Data are the mean \pm SEM of three experiments. Statistical analyses were performed using a one-way ANOVA followed by a Bonferroni's multiple comparison tests. ** $p < 0.01$. (D) Activation of ARF1 was assessed as in A in cells transfected with either scrambled or ARF6 shRNA. For each condition, cells were stimulated or not with 10% FBS for 1 minute. Activated ARF1 was assessed as in A. Data are the mean \pm SEM of four experiments. Statistical analysis were calculated using a two-ways ANOVA followed by a Bonferroni's multiple comparison test. ** $p < 0.01$.

SUPPLEMENTAL FIGURE 4. Overexpression of ARF controls proliferation of MCF7 cells. Cells were transfected with an empty vector, ARF1 or ARF6, and wound healing assays were performed after 5 days in restricted medium or not. Images are representative of three other experiments performed in triplicate.

SUPPLEMENTAL FIGURE. 5. Overexpression of ARF in MCF7 cells potentiates activation of the MAPK and PI3K pathways. MCF7 cells were transfected with empty

vector, ARF1 or ARF6. Cells were stimulated with 10% FBS for 4 hours. Activation of ERK and AKT was assessed using phospho-specific antibodies. Levels of ERK, AKT, ARF1, ARF6, actin and HA-tagged protein were detected by Western blotting. Data are the mean \pm SEM of three experiments. Significance was determined by two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison tests. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Figure 1
Schlienger et al.

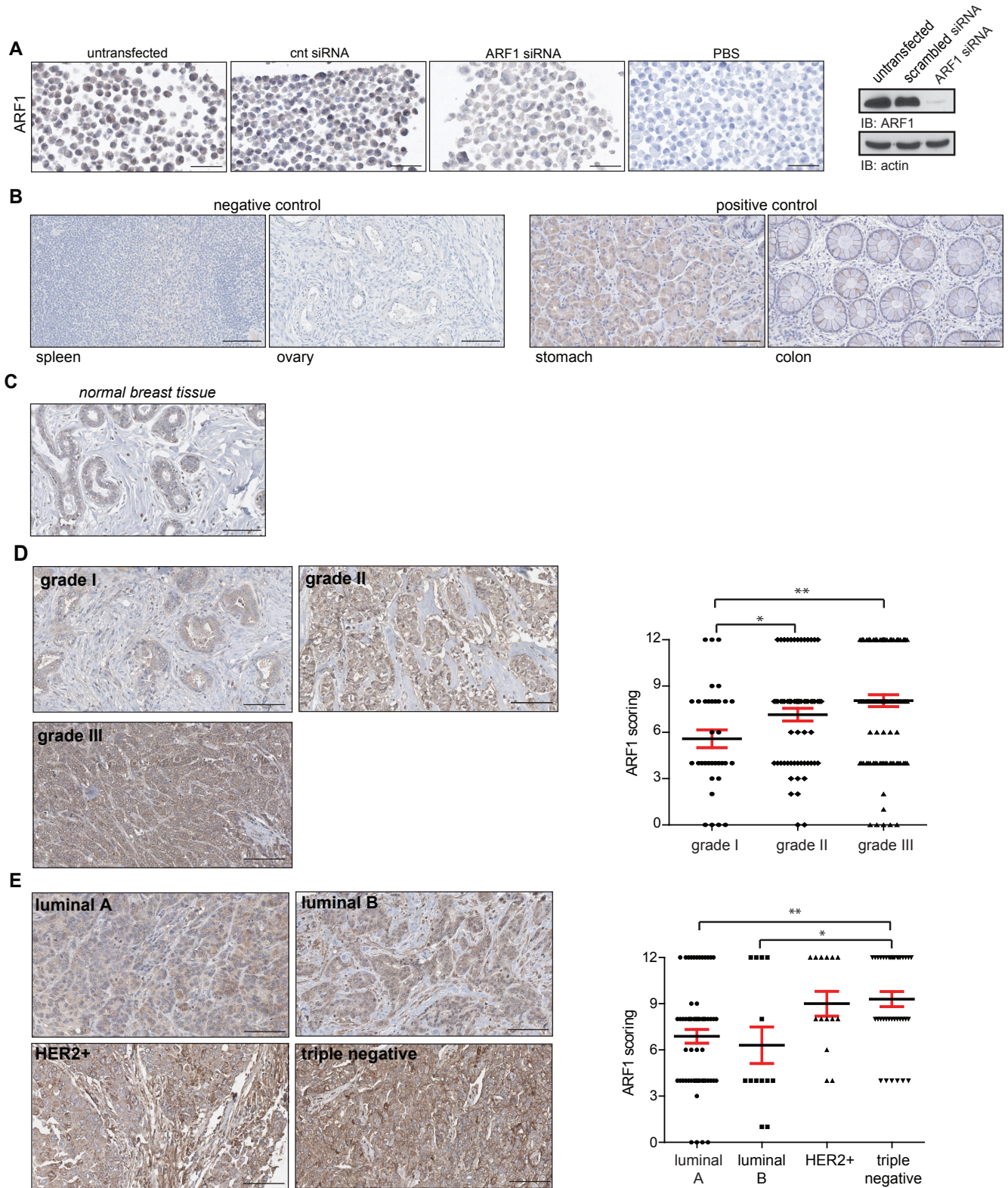


Figure IV-1: ARF1 expression correlates with molecular subtypes and tumor grade

Figure 2
Schlienger et al.

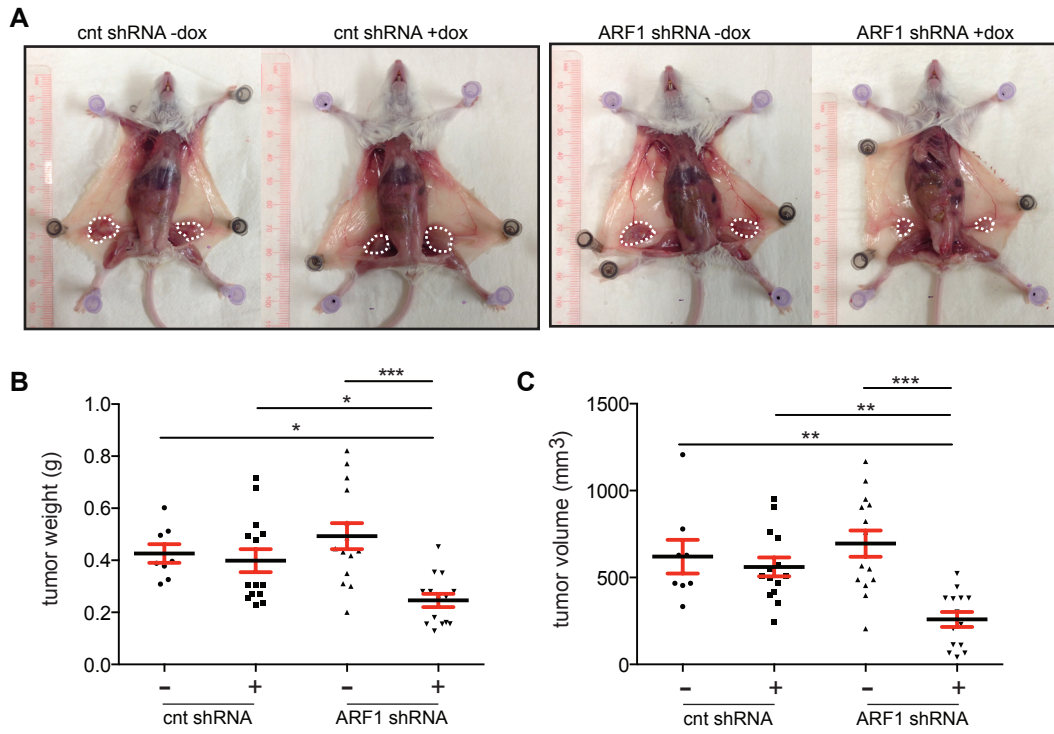


Figure IV-2: ARF1 regulates primary mouse invasive breast cancer tumor

Figure 3
Schlienger et al.

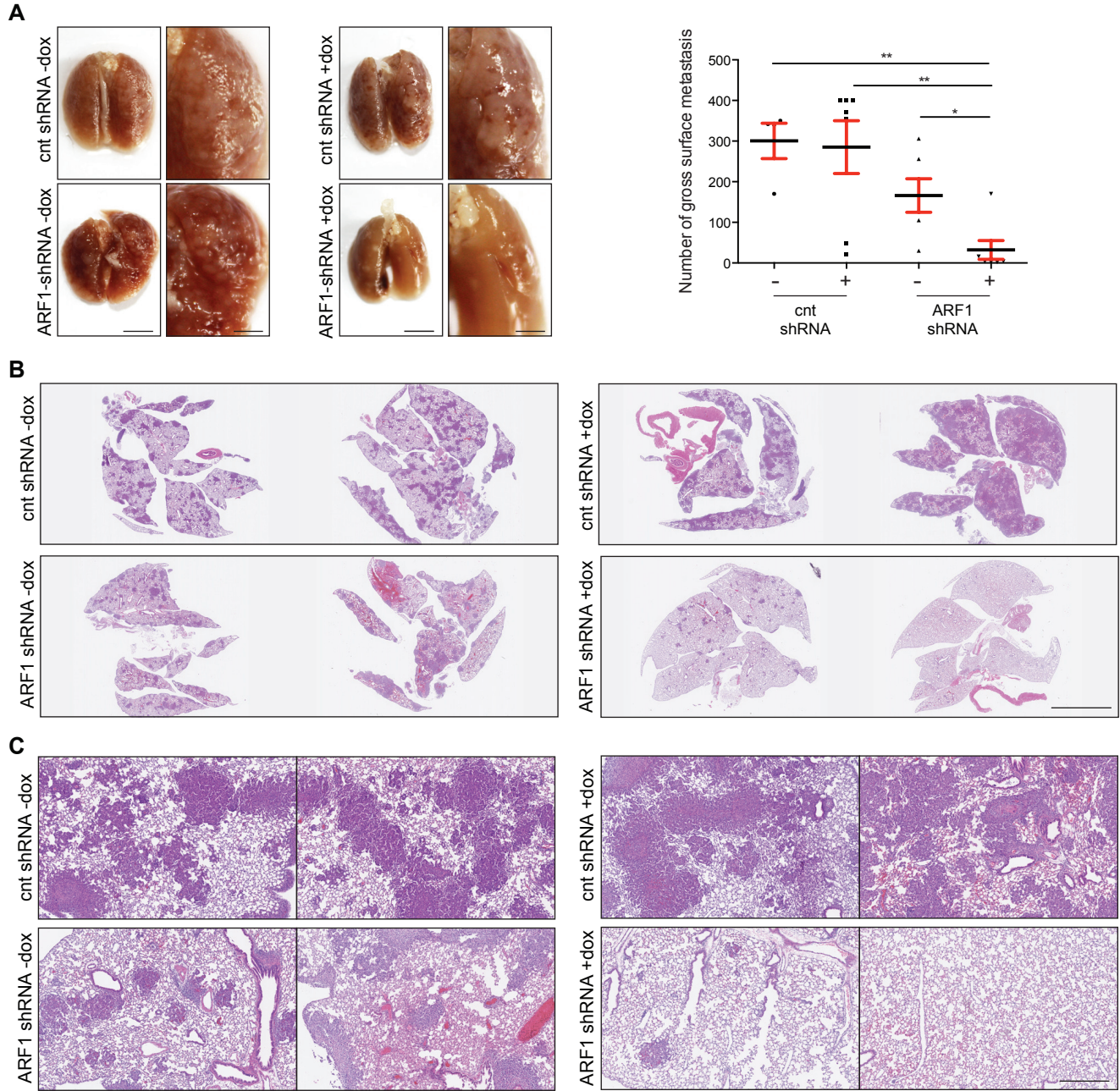


Figure IV-3: ARF1 depletion impaired breast mouse metastasis

Figure 4
Schlienger et al.

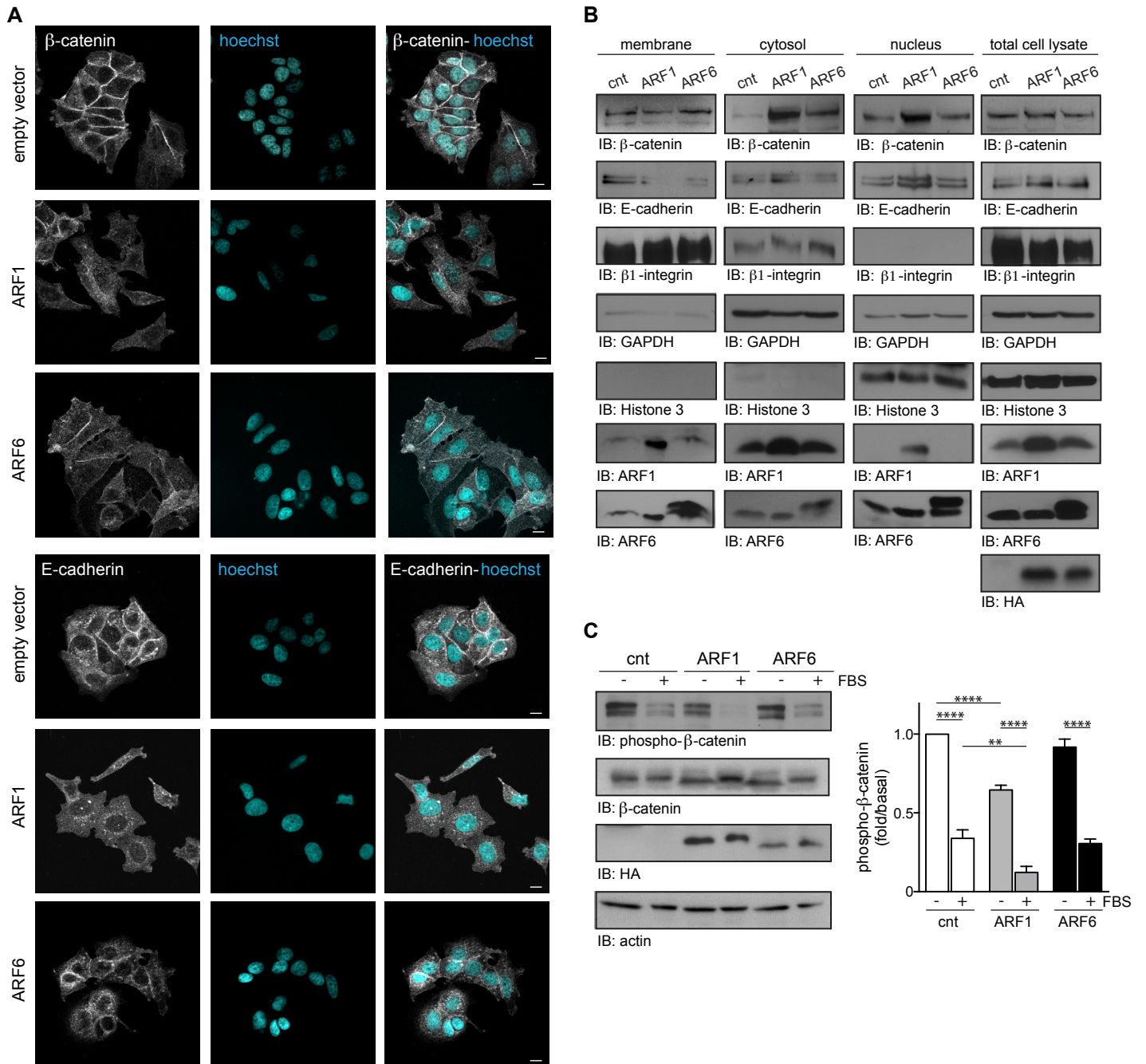


Figure IV-4: ARF1 is important for the maintenance of adherent junctions

Figure 5
Schlienger et al.

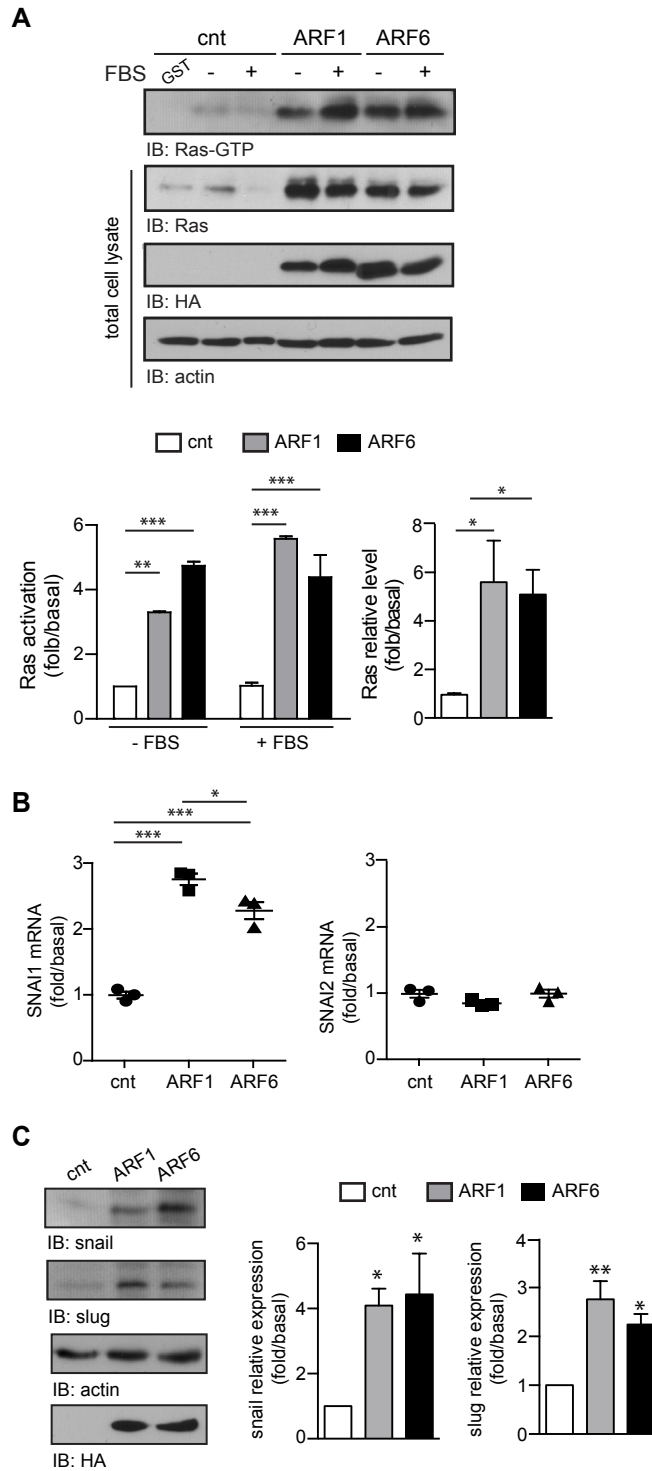


Figure IV-5: ARF proteins control key factors of EMT

Figure 6
Schlienger et al.

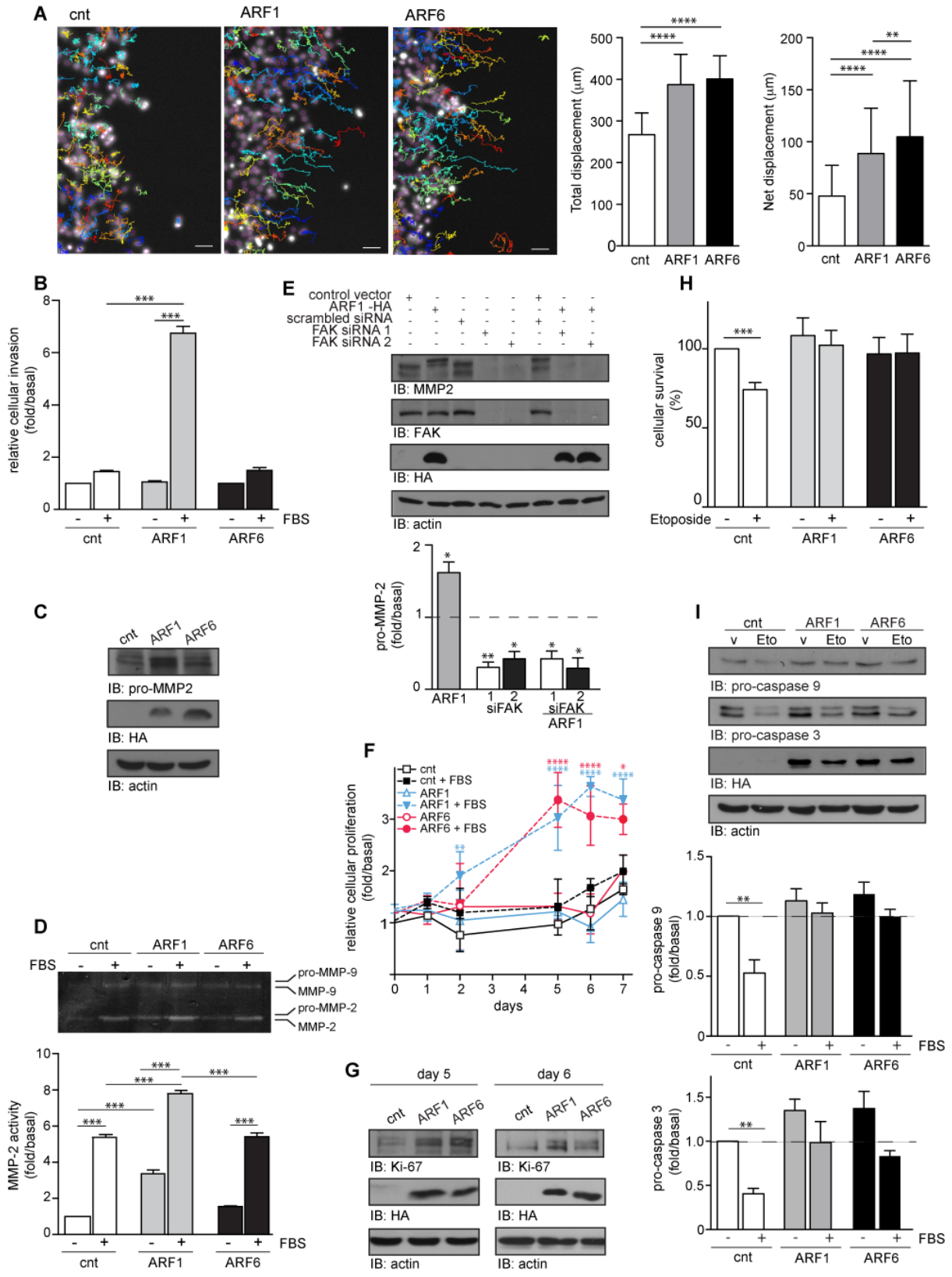


Figure IV-6: ARF controls motility, invasion, proliferation, and survival of MCF7

Figure 7
Schlienger et al.

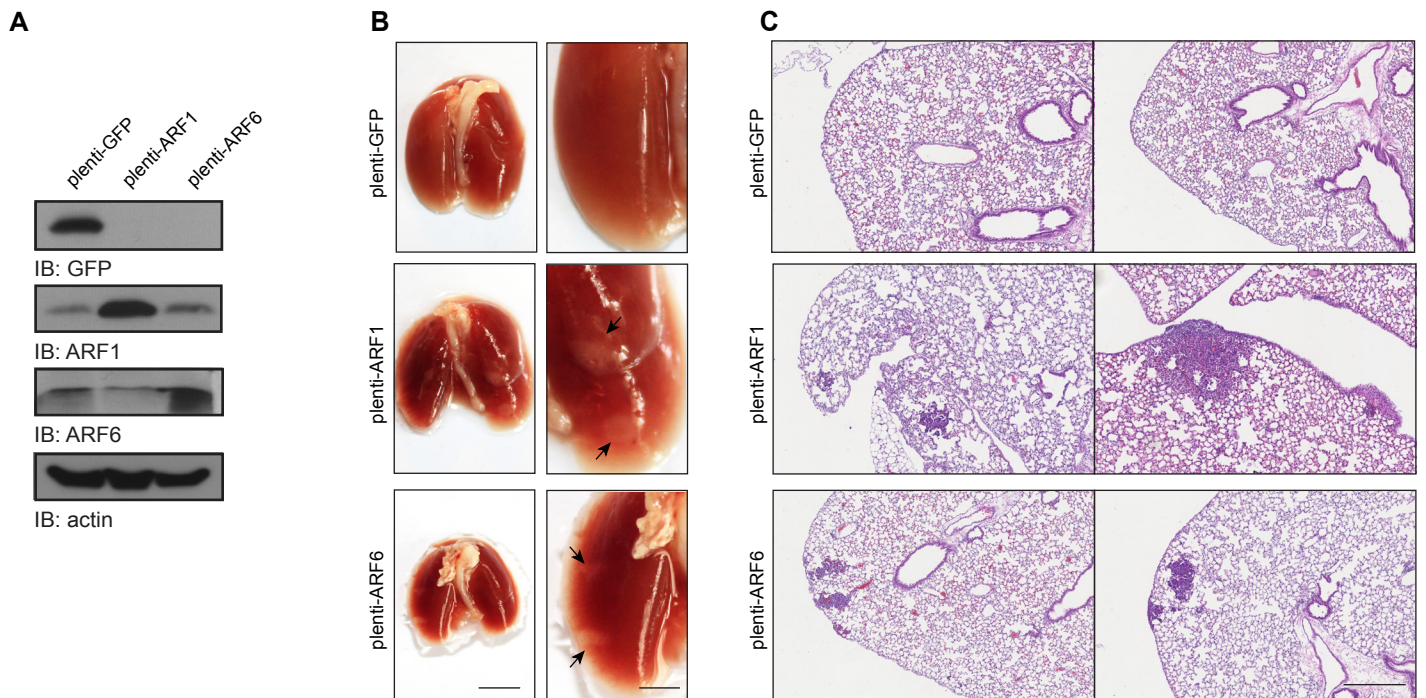


Figure IV-7: ARF1 and ARF6 overexpression increases metastasis *in vivo*

Supplemental Figure 1
Schlienger et al.

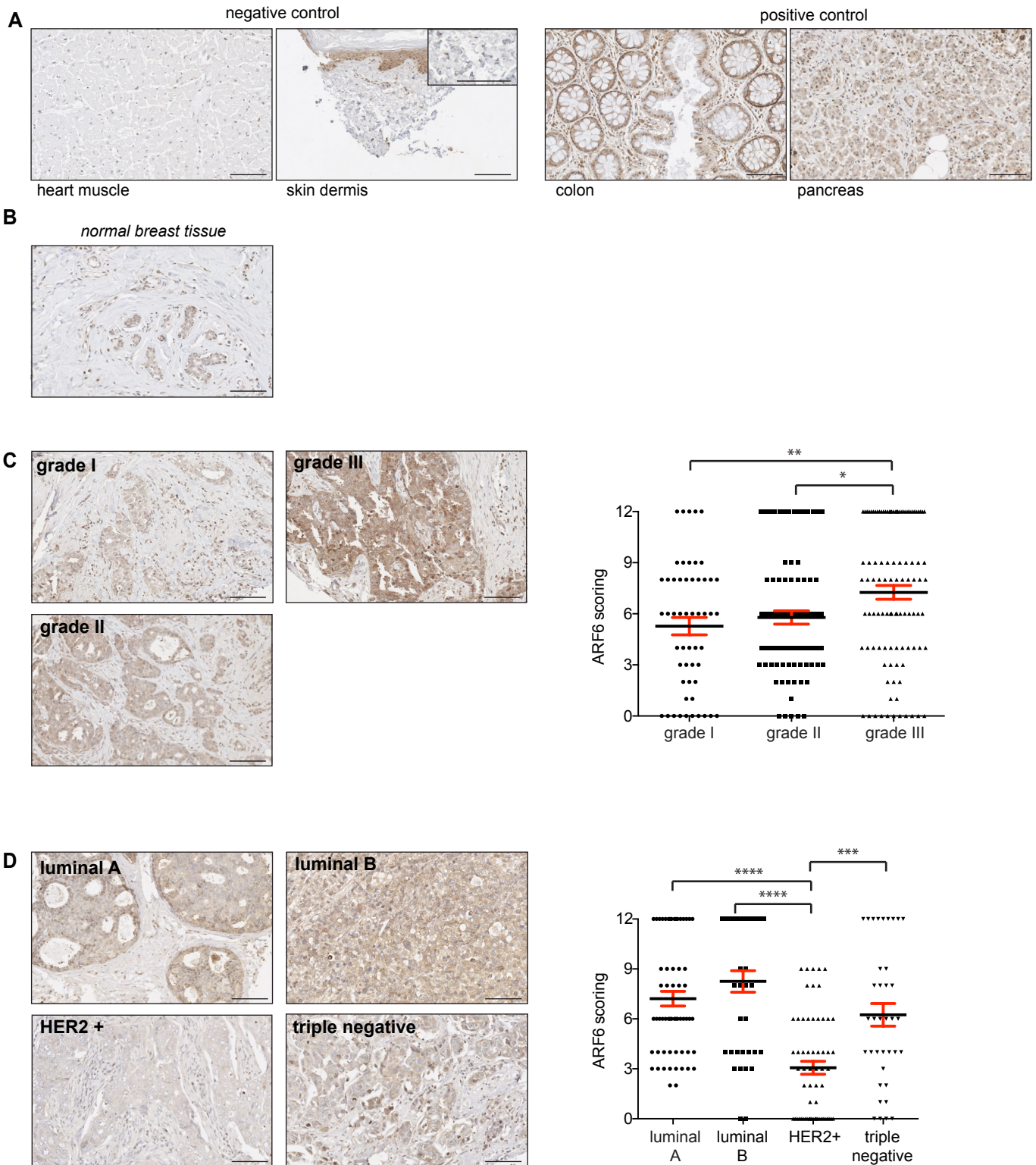


Figure IV-8: ARF6 expression correlates with molecular subtypes and tumor grade

Supplemental Figure 2
Schlienger et al.

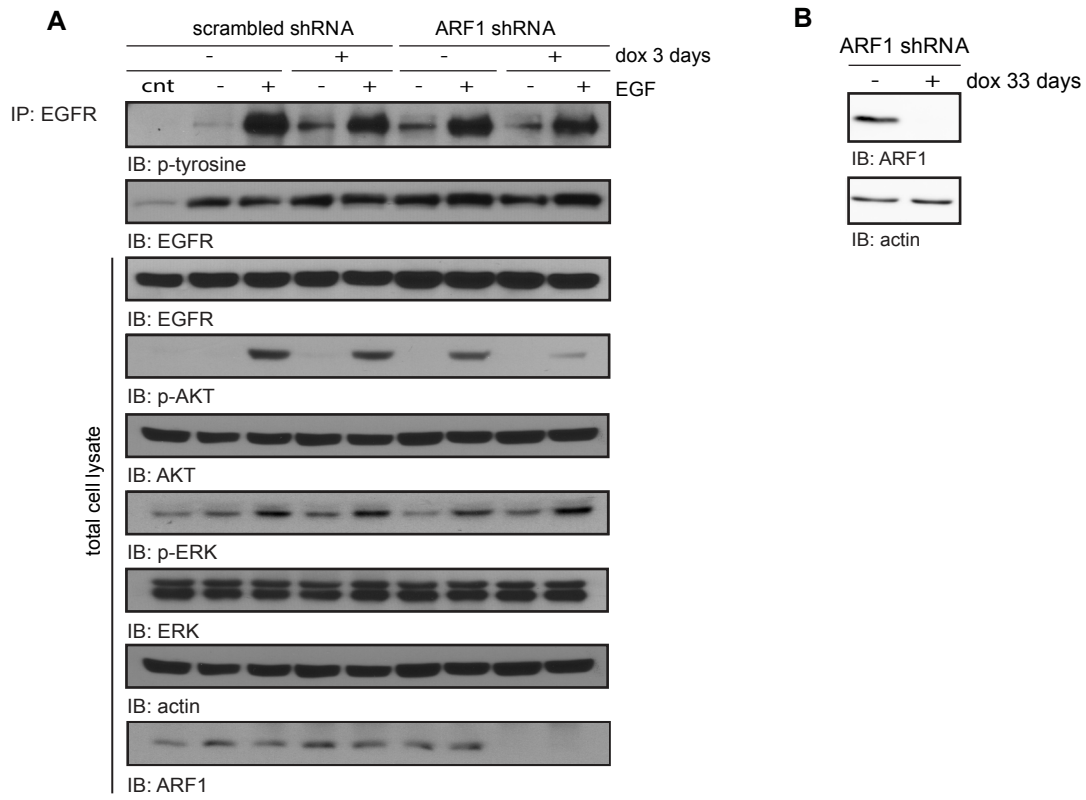


Figure IV-9: Validation of ARF1 shRNA in MDA-MB-231 breast cancer cells

Supplemental Figure 3
Schlienger et al.

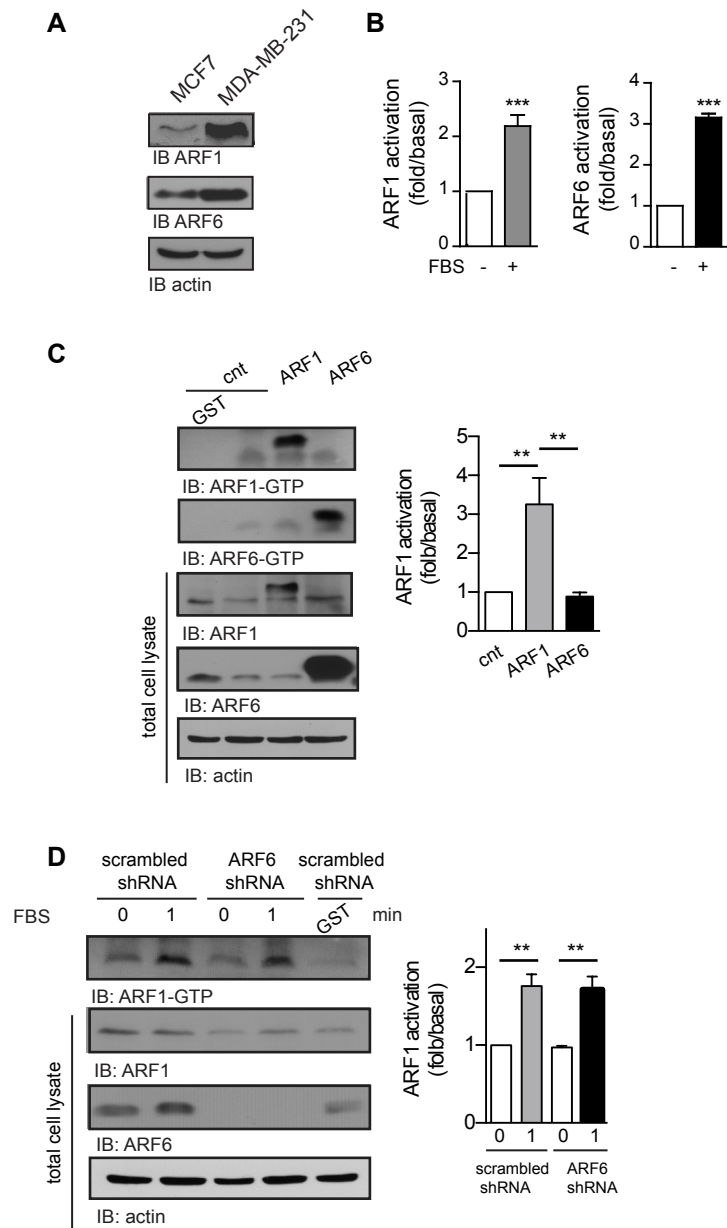


Figure IV-10: ARF activation in MCF7 cells

Supplemental Figure 4
Schlienger et al.

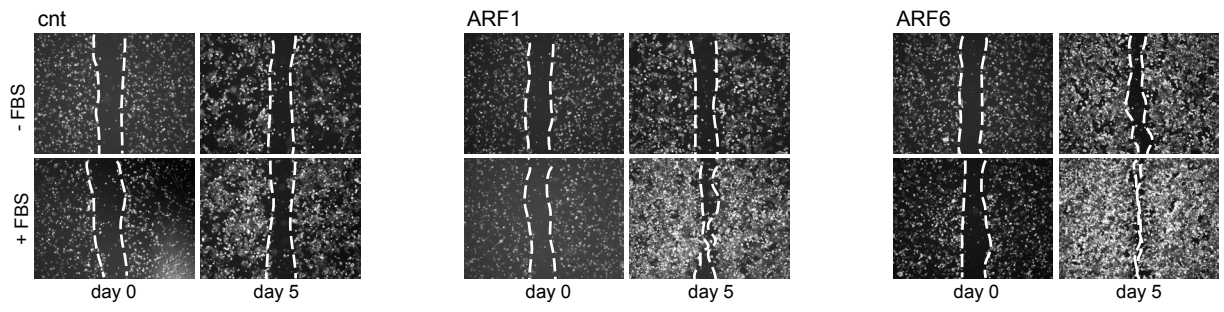


Figure IV-11: Overexpression of ARF controls proliferation of MCF7 cells

Supplemental Figure 5
Schlienger et al.

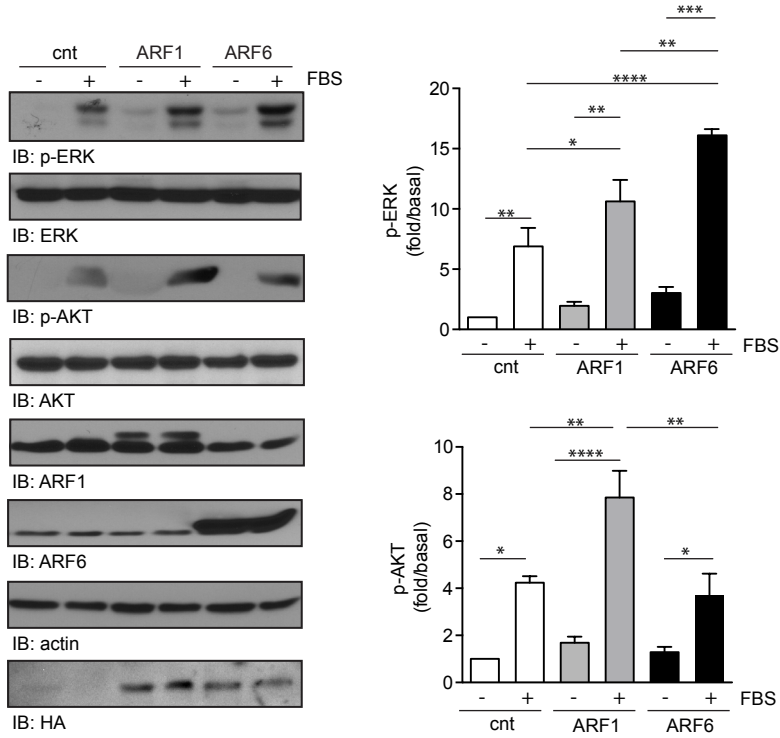


Figure IV-12: Overexpression of ARF potentiates the MAPK and PI3K pathways

REFERENCES

- Bai, X. F., Ni, X. G., Zhao, P., Liu, S. M., Wang, H. X., Guo, B., . . . Zhao, X. H. (2004). Overexpression of annexin 1 in pancreatic cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol*, *10*(10), 1466-1470. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15133855>
- Bocker, W. (2002). [WHO classification of breast tumors and tumors of the female genital organs: pathology and genetics]. *Verh Dtsch Ges Pathol*, *86*, 116-119. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12647359>
- Boulay, P. L., Cotton, M., Melancon, P., & Claing, A. (2008). ADP-ribosylation factor 1 controls the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway to regulate epidermal growth factor-dependent growth and migration of breast cancer cells. *J Biol Chem*, *283*(52), 36425-36434. doi:10.1074/jbc.M803603200
- Boulay, P. L., Schlienger, S., Lewis-Saravalli, S., Vitale, N., Ferbeyre, G., & Claing, A. (2011). ARF1 controls proliferation of breast cancer cells by regulating the retinoblastoma protein. *Oncogene*, *30*(36), 3846-3861. doi:10.1038/onc.2011.100
- Burness, M. L., Grushko, T. A., & Olopade, O. I. (2010). Epidermal growth factor receptor in triple-negative and basal-like breast cancer: promising clinical target or only a marker? *Cancer J*, *16*(1), 23-32. doi:10.1097/PPO.0b013e3181d24fc1
- Caldarella, A., Puliti, D., Crocetti, E., Bianchi, S., Vezzosi, V., Apicella, P., . . . Paci, E. (2013). Biological characteristics of interval cancers: a role for biomarkers in the breast cancer screening. *J Cancer Res Clin Oncol*, *139*(2), 181-185. doi:10.1007/s00432-012-1304-1
- Cawthorne, C., Swindell, R., Stratford, I. J., Dive, C., & Welman, A. (2007). Comparison of doxycycline delivery methods for Tet-inducible gene expression in a subcutaneous xenograft model. *J Biomol Tech*, *18*(2), 120-123. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17496224>
- Cohen, L. A., Honda, A., Varnai, P., Brown, F. D., Balla, T., & Donaldson, J. G. (2007). Active Arf6 recruits ARNO/cytohesin GEFs to the PM by binding their PH domains. *Mol Biol Cell*, *18*(6), 2244-2253. doi:10.1091/mbc.E06-11-0998
- Cotton, M., Boulay, P. L., Houndolo, T., Vitale, N., Pitcher, J. A., & Claing, A. (2007). Endogenous ARF6 interacts with Rac1 upon angiotensin II stimulation to regulate membrane ruffling and cell migration. *Mol Biol Cell*, *18*(2), 501-511. doi:10.1091/mbc.E06-06-0567
- D'Souza-Schorey, C., & Chavrier, P. (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *7*(5), 347-358. doi:10.1038/nrm1910
- de Jong, J. S., van Diest, P. J., Michalides, R. J., & Baak, J. P. (1999). Concerted overexpression of the genes encoding p21 and cyclin D1 is associated with growth inhibition and differentiation in various carcinomas. *Mol Pathol*, *52*(2), 78-83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10474686>
- Der, C. J., Krontiris, T. G., & Cooper, G. M. (1982). Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *79*(11), 3637-3640. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6285355>

- Eades, G., Wolfson, B., Zhang, Y., Li, Q., Yao, Y., & Zhou, Q. (2015). lincRNA-RoR and miR-145 regulate invasion in triple-negative breast cancer via targeting ARF6. *Mol Cancer Res*, *13*(2), 330-338. doi:10.1158/1541-7786.MCR-14-0251
- Faux, M. C., Coates, J. L., Kershaw, N. J., Layton, M. J., & Burgess, A. W. (2010). Independent interactions of phosphorylated beta-catenin with E-cadherin at cell-cell contacts and APC at cell protrusions. *PLoS One*, *5*(11), e14127. doi:10.1371/journal.pone.0014127
- Galas, M. C., Helms, J. B., Vitale, N., Thierse, D., Aunis, D., & Bader, M. F. (1997). Regulated exocytosis in chromaffin cells. A potential role for a secretory granule-associated ARF6 protein. *J Biol Chem*, *272*(5), 2788-2793. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9006918>
- Gimond, C., van Der Flier, A., van Delft, S., Brakebusch, C., Kuikman, I., Collard, J. G., . . . Sonnenberg, A. (1999). Induction of cell scattering by expression of beta1 integrins in beta1-deficient epithelial cells requires activation of members of the rho family of GTPases and downregulation of cadherin and catenin function. *J Cell Biol*, *147*(6), 1325-1340. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10601344>
- Guillamo, J. S., de Bouard, S., Valable, S., Marteau, L., Leuraud, P., Marie, Y., . . . Peschanski, M. (2009). Molecular mechanisms underlying effects of epidermal growth factor receptor inhibition on invasion, proliferation, and angiogenesis in experimental glioma. *Clin Cancer Res*, *15*(11), 3697-3704. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2042
- Hashimoto, S., Onodera, Y., Hashimoto, A., Tanaka, M., Hamaguchi, M., Yamada, A., & Sabe, H. (2004). Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(17), 6647-6652. doi:10.1073/pnas.0401753101
- Hauck, C. R., Hsia, D. A., Ilic, D., & Schlaepfer, D. D. (2002). v-Src SH3-enhanced interaction with focal adhesion kinase at beta 1 integrin-containing invadopodia promotes cell invasion. *J Biol Chem*, *277*(15), 12487-12490. doi:10.1074/jbc.C100760200
- Kahn, R. A., Randazzo, P., Serafini, T., Weiss, O., Rulka, C., Clark, J., . . . Rothman, J. E. (1992). The amino terminus of ADP-ribosylation factor (ARF) is a critical determinant of ARF activities and is a potent and specific inhibitor of protein transport. *J Biol Chem*, *267*(18), 13039-13046. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1618801>
- Lee, M. H., Koria, P., Qu, J., & Andreadis, S. T. (2009). JNK phosphorylates beta-catenin and regulates adherens junctions. *FASEB J*, *23*(11), 3874-3883. doi:10.1096/fj.08-117804
- Liao, Y. C., Ruan, J. W., Lua, I., Li, M. H., Chen, W. L., Wang, J. R., . . . Chen, J. H. (2012). Overexpressed hPTTG1 promotes breast cancer cell invasion and metastasis by regulating GEF-H1/RhoA signalling. *Oncogene*, *31*(25), 3086-3097. doi:10.1038/onc.2011.476
- Lim, Y., Han, I., Jeon, J., Park, H., Bahk, Y. Y., & Oh, E. S. (2004). Phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861 is crucial for Ras transformation of fibroblasts. *J Biol Chem*, *279*(28), 29060-29065. doi:10.1074/jbc.M401183200
- Maher, M. T., Mo, R., Flozak, A. S., Peled, O. N., & Gottardi, C. J. (2010). Beta-catenin phosphorylated at serine 45 is spatially uncoupled from beta-catenin

- phosphorylated in the GSK3 domain: implications for signaling. *PLoS One*, 5(4), e10184. doi:10.1371/journal.pone.0010184
- Mao, Y., Keller, E. T., Garfield, D. H., Shen, K., & Wang, J. (2013). Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 32(1-2), 303-315. doi:10.1007/s10555-012-9415-3
- Marchesin, V., Castro-Castro, A., Lodillinsky, C., Castagnino, A., Cyrta, J., Bonsang-Kitzis, H., . . . Chavrier, P. (2015). ARF6-JIP3/4 regulate endosomal tubules for MT1-MMP exocytosis in cancer invasion. *J Cell Biol*, 211(2), 339-358. doi:10.1083/jcb.201506002
- Mitchell, R., Robertson, D. N., Holland, P. J., Collins, D., Lutz, E. M., & Johnson, M. S. (2003). ADP-ribosylation factor-dependent phospholipase D activation by the M3 muscarinic receptor. *J Biol Chem*, 278(36), 33818-33830. doi:10.1074/jbc.M305825200
- Morishige, M., Hashimoto, S., Ogawa, E., Toda, Y., Kotani, H., Hirose, M., . . . Sabe, H. (2008). GEP100 links epidermal growth factor receptor signalling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion. *Nat Cell Biol*, 10(1), 85-92. doi:10.1038/ncb1672
- Nagaraja, G. M., Othman, M., Fox, B. P., Alsaber, R., Pellegrino, C. M., Zeng, Y., . . . Kandpal, R. P. (2006). Gene expression signatures and biomarkers of noninvasive and invasive breast cancer cells: comprehensive profiles by representational difference analysis, microarrays and proteomics. *Oncogene*, 25(16), 2328-2338. doi:10.1038/sj.onc.1209265
- Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., . . . Perou, C. M. (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*, 10(16), 5367-5374. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0220
- Onodera, Y., Hashimoto, S., Hashimoto, A., Morishige, M., Mazaki, Y., Yamada, A., . . . Sabe, H. (2005). Expression of AMAP1, an ArfGAP, provides novel targets to inhibit breast cancer invasive activities. *EMBO J*, 24(5), 963-973. doi:10.1038/sj.emboj.7600588
- Parada, L. F., Tabin, C. J., Shih, C., & Weinberg, R. A. (1982). Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature*, 297(5866), 474-478. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6283357>
- Peinado, H., Olmeda, D., & Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*, 7(6), 415-428. doi:10.1038/nrc2131
- Poondru, S., Parchment, R. E., Purohit, V., LoRusso, P., Horwitz, J. P., Hazeldine, S. T., . . . Jasti, B. R. (2002). Lack of in vitro-in vivo correlation of a novel investigational anticancer agent, SH 30. *Invest New Drugs*, 20(1), 23-33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12003192>
- Price, L. S., & Collard, J. G. (2001). Regulation of the cytoskeleton by Rho-family GTPases: implications for tumour cell invasion. *Semin Cancer Biol*, 11(2), 167-173. doi:10.1006/scbi.2000.0367

- Radisky, E. S., & Radisky, D. C. (2010). Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, *15*(2), 201-212. doi:10.1007/s10911-010-9177-x
- Sadot, E., Conacci-Sorrell, M., Zhurinsky, J., Shnizer, D., Lando, Z., Zharhary, D., . . . Geiger, B. (2002). Regulation of S33/S37 phosphorylated beta-catenin in normal and transformed cells. *J Cell Sci*, *115*(Pt 13), 2771-2780. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077367>
- Santos, E., Tronick, S. R., Aaronson, S. A., Pulciani, S., & Barbacid, M. (1982). T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature*, *298*(5872), 343-347. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6283384>
- Schlienger, S., Campbell, S., & Claing, A. (2014). ARF1 regulates the Rho/MLC pathway to control EGF-dependent breast cancer cell invasion. *Mol Biol Cell*, *25*(1), 17-29. doi:10.1091/mbc.E13-06-0335
- Schlienger, S., Ramirez, R. A., & Claing, A. (2015). ARF1 regulates adhesion of MDA-MB-231 invasive breast cancer cells through formation of focal adhesions. *Cell Signal*, *27*(3), 403-415. doi:10.1016/j.cellsig.2014.11.032
- Tomayko, M. M., & Reynolds, C. P. (1989). Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol*, *24*(3), 148-154. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2544306>
- Tsai, M. M., Lin, P. Y., Cheng, W. L., Tsai, C. Y., Chi, H. C., Chen, C. Y., . . . Lin, K. H. (2012). Overexpression of ADP-ribosylation factor 1 in human gastric carcinoma and its clinicopathological significance. *Cancer Sci*, *103*(6), 1136-1144. doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02243.x
- Wang, Y., Godin-Heymann, N., Dan Wang, X., Bergamaschi, D., Llanos, S., & Lu, X. (2013). ASPP1 and ASPP2 bind active RAS, potentiate RAS signalling and enhance p53 activity in cancer cells. *Cell Death Differ*, *20*(4), 525-534. doi:10.1038/cdd.2013.3
- Wee, S., Wiederschain, D., Maira, S. M., Loo, A., Miller, C., deBeaumont, R., . . . Lengauer, C. (2008). PTEN-deficient cancers depend on PIK3CB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(35), 13057-13062. doi:10.1073/pnas.0802655105
- Wiederschain, D., Wee, S., Chen, L., Loo, A., Yang, G., Huang, A., . . . Benson, J. D. (2009). Single-vector inducible lentiviral RNAi system for oncology target validation. *Cell Cycle*, *8*(3), 498-504. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19177017>
- Williams, C. S., Watson, A. J., Sheng, H., Helou, R., Shao, J., & DuBois, R. N. (2000). Celecoxib prevents tumor growth in vivo without toxicity to normal gut: lack of correlation between in vitro and in vivo models. *Cancer Res*, *60*(21), 6045-6051. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11085526>
- Wolff, A. C., Hammond, M. E., Hicks, D. G., Dowsett, M., McShane, L. M., Allison, K. H., . . . College of American, P. (2013). Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*, *31*(31), 3997-4013. doi:10.1200/JCO.2013.50.9984

- Yousef, E. M., Tahir, M. R., St-Pierre, Y., & Gaboury, L. A. (2014). MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer. *BMC Cancer*, *14*, 609. doi:10.1186/1471-2407-14-609
- Zhang, Y., Pu, X., Shi, M., Chen, L., Song, Y., Qian, L., . . . Guo, N. (2007). Critical role of c-Jun overexpression in liver metastasis of human breast cancer xenograft model. *BMC Cancer*, *7*, 145. doi:10.1186/1471-2407-7-145
- Zhang, Y., Thant, A. A., Hiraiwa, Y., Naito, Y., Sein, T. T., Sohara, Y., . . . Hamaguchi, M. (2002). A role for focal adhesion kinase in hyluronan-dependent MMP-2 secretion in a human small-cell lung carcinoma cell line, QG90. *Biochem Biophys Res Commun*, *290*(3), 1123-1127. doi:10.1006/bbrc.2001.6321

V. CHAPITRE V : Discussion et Conclusion

Dans nos papiers présentés dans les chapitres II, III, et IV, les résultats ont déjà été discutés. C'est pourquoi dans cette section, afin de rendre cette thèse plus stimulante au lecteur, ne seront énoncés que des points non traités ultérieurement.

ARF1 un pivot signalétique

ARF1 est un organisateur principal du remodelage du cytosquelette et de la dynamique membranaire. En effet, ARF1 est importante pour la formation des structures telles que les invadopodes, les lamellipodes, les microvésicules de type shedding et les jonctions inter-cellulaires. Nous avons démontré que la protéine ARF1 est essentielle aux dernières étapes d'assemblage et de maturation des invadopodes, dans les cellules MDA-MB-231 (Schlienger, Campbell, & Claing, 2014). Nous savons aussi que la GTPase Rac1 est importante pour la dynamique de formation des invadopodes (Moshfegh, Bravo-Cordero, Miskolci, Condeelis, & Hodgson, 2014). Nous avons démontré, au laboratoire, que la GTPase ARF1 contrôle l'activation EGF-dépendante de cette autre GTPase, dans le même modèle cellulaire (Lewis-Saravalli et al., 2013). Un défaut de maturation des invadopodes est observé lorsque ARF1 est déplétée, ce qui suggère qu'ARF1, en affectant l'activation de la protéine Rac1, contribue au défaut du turnover engendré. En effet, en déplaçant ARF1 dans les MDA-MB-231, les invadopodes sont de taille réduite et présentent moins de protéine d'échafaudage Tsk5 (Schlienger et al., 2014). En ce qui concerne la formation des invadopodes, il a été démontré que la protéine FAK est présente dans ces structures et que l'augmentation de son expression favorise leur formation (Alexander et al., 2008; Hauck, Hsia, Ilic, & Schlaepfer, 2002). Dans les fibroblastes transformés par Src, la formation des invadopodes est initiée au voisinage des complexes d'adhésions focaux et ce, en réponse à la génération du phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate (PIP2) (Oikawa et al., 2008). Ce lipide présent dans les points d'adhésions focaux, recrute la protéine d'échafaudage Tsk5 (pour *tyrosine kinase substrate 5*), permettant ainsi de recruter la cortactine pour former l'invadopode (Abram et al., 2003). Ces données corroborent nos autres résultats qui démontrent qu'ARF1 contrôle les points d'adhésion focaux en affectant l'activation de la

protéine FAK via Src (Schlienger, Ramirez, & Claing, 2015). Nous pouvons donc suggérer que la déplétion d'ARF1 perturbe la formation des invadopodes, en partie, en affectant la formation des complexes d'adhésions focaux. Nous savons également qu'aux points d'adhésion focaux, la kinase FAK contrôle les protéines Rho, qui régulent l'activation de la MLC pour la polymérisation de l'actine (Mitra, Hanson, & Schlaepfer, 2005). Nous avons démontré qu'ARF1 contrôle l'activation des Rho GTPases RhoA et RhoC dans les cellules MDA-MB-231 pour jouer sur l'activation de la MLC. Ces données sont donc cohérentes avec le fait que la déplétion d'ARF1 affecte la formation des structures d'adhésion. Elles suggèrent qu'ARF1, en jouant sur la phosphorylation de MLC via la voie Rho, contrôle la formation des points d'adhésion.

Une autre protéine que nous pouvons citer comme pivot signalétique est la protéine tyrosine kinase Src. Nous avons démontré que la protéine ARF1, suite à une stimulation à l'EGF dans les cellules MDA-MB-231, contrôle l'activation de la protéine Src (Schlienger et al., 2015). Elle est fortement exprimée dans plusieurs cancers notamment celui du sein et sa déplétion inhibe la progression tumorale (Irby & Yeatman, 2000; Ottenhoff-Kalff et al., 1992; Trevino et al., 2006). En effet, des cellules MDA-MB-231 surexprimant Src, vont former d'avantage de métastases osseuses que des cellules contrôles (Myoui et al., 2003). À l'inverse, des cellules MCF7 exprimant le mutant dominant négatif de Src ont une progression tumorale ralentie lorsqu'injectées dans des souris *nude* (Gonzalez et al., 2006). Nous avons démontré, *in vivo*, que la déplétion d'ARF1 dans les MDA-MB-231 affecte la progression des tumeurs mammaire primaires et la nidification de métastases. De plus, nous avons démontré la réciproque ; lorsqu'ARF1 est surexprimée dans les MCF7, la nidification des métastases est augmentée (Schlienger, Campbell, Pasquin, Gaboury, & Claing, 2016). Nous savons également que Src est un médiateur majeur de la signalisation, connu pour contrôler des oncogènes comme RAS, des facteurs de la TEM comme snail et slug, la voie PI3K, qui sont responsables de mécanismes tels que la migration, la prolifération et l'invasion (Bjorge et al., 2011; Gonzalez et al., 2006; Ishizawar & Parsons, 2004; Thomas & Brugge, 1997). Nous savons que ces voies sont affectées lorsque nous modulons l'expression d'ARF 1 et ce, dans plusieurs types cellulaires (Schlienger et al., 2014; Schlienger et al., 2016; Schlienger et al., 2015). Ces données suggèrent donc qu'ARF1

contrôle la progression tumorale possiblement via son action sur l'activation de la kinase Src.

Dans l'ensemble, nous avons démontré, en premier lieu, dans les cellules MDA-MB-231, que la protéine ARF1 contrôle, via les Rho GTPases, la MLC pour induire la sécrétion des microvésicules nécessaires à l'invasion (Schlienger et al., 2014). En deuxième lieu, nous avons démontré que la GTPase ARF1 contrôle FAK via la protéine Src, FAK étant un pilier des points d'adhésions focaux, un acteurs majeurs de la migration (Schlienger et al., 2015). Puis pour finir, nous avons démontré qu'ARF1, dans les cellules MCF7, contrôle la TEM, qui régule le développement métastatique (Schlienger et al., 2016). Il est intéressant de souligner qu'il a été démontré, dans les cellules cancéreuses de colon, que FAK via Src contrôle la MLC pour induire la TEM (Avizienyte, Fincham, Brunton, & Frame, 2004). Nous savons maintenant qu'ARF1 contrôle chacun de ses protagonistes. Cette étude soutient donc la cohérence de nos trois projets.

Localisation d'ARF1

Classiquement, ARF1 est connue pour être associée à l'appareil de Golgi en cisternae grâce à son motif de MXXE (Donaldson & Honda, 2005). ARF1 participe au trafic vésiculaire en contribuant à l'assemblage et au bourgeonnement des vésicules enrobées des coatomères COPI. Nous avons démontré dans les cellules cancéreuses, qui surexpriment naturellement ARF1, que sa distribution était altérée (Boulay et al., 2008). En présence d'EGF, ARF1 dans les MDA-MB-231 est distribuée à l'appareil de Golgi mais aussi à la membrane plasmique. D'autres groupes ont également rapporté la présence d'ARF1 à la membrane plasmique. Par exemple, dans les cellules cancéreuses Hela, la surexpression de la Cytohésine-2/ARNO induit le recrutement d'ARF 1 à la membrane dans les régions d'ondulation des membranes (L. A. Cohen et al., 2007). Aussi, suite à la stimulation par l'agoniste du récepteur muscarinique M3, ARF1 peut se retrouver à la membrane en association avec celui-ci (Mitchell et al., 2003). Nos études réalisées au cours de cette thèse appuient ces faits. Dans les tissus mammaires normaux ARF1 est retrouvée dans le cytoplasme des cellules luminales et myoépithéliales. Pour la première fois, nous avons constatée la localisation d'ARF1 à la membrane plasmique dans

plusieurs coupes de tissus cancéreux de patients. Notamment dans des tumeurs de patients triple négatifs, on voit clairement ARF1 localisée à la membrane plasmique (Schlienger et al., 2016). Dans les MDA-MB-231, nous avons démontré qu'ARF1 n'est pas localisée aux invadopodes, mais il est localisé à proximité, dans le complexe d'adhésion focale (Schlienger et al., 2014; Schlienger et al., 2015). Son rôle de coordinateur moléculaire pour les événements de signalisation en aval, qui sont importants pour la maturation et la stabilisation des invadopodes, pourrait donc se faire non loin de là ; et ce, en agissant sur le recrutement ou la fonction des protéines clés impliquées. De plus, par une technique d'imagerie à balayage électronique, nous avons localisé ARF1 pour la première fois à la membrane des microvésicules membranaires de type shedding (Schlienger et al., 2014). Dans les cellules MCF7, des cellules cancéreuses non invasives qui expriment faiblement ARF1, nous avons démontré par un essai d'isolation membranaires que lorsque surexprimée, la localisation d'ARF1 est affectée. En effet, ARF1 est retrouvée à la membrane plasmique, mais également aux noyaux (Schlienger et al., 2016). Dans le passé, nous avons également démontré que ARF1-GDP transloque au noyau pour induire la senescence des cellules MDA-MB-231 (Boulay et al., 2011). Nous avons observé dans les MCF7, que la surexpression d'ARF1 induit l'expression de plusieurs facteurs de transcription et oncogènes tels que snail, slug et Ras. Nous pouvons donc penser que la nouvelle localisation d'ARF1 au noyau, induite par sa surexpression, lui confère la possibilité de moduler directement l'expression des gènes. Il est intéressant de souligner que nous avons démontré que la protéine ARF6 est naturellement retrouvée au noyau dans les cellules MCF7. Tout nous laisse penser que les protéines ARF ont sûrement un rôle important dans ce compartiment, mais celui-ci est encore très peu connu. Il serait donc à l'avenir très intéressant d'étudier et d'approfondir nos recherches sur le rôle que jouent les ARF dans le compartiment nucléaire.

L'activation d'ARF1

Étant une GTPases, notre protéine d'intérêt ARF1 existe sous différentes conformations dites active ou inactive. Nos études ont permis de mettre en valeur l'importance de son état d'activation dans des processus tumorigéniques. Au laboratoire, nous avons précédemment démontré que la GTPase ARF1 est activée suite à la stimulation de l'EGFR par son ligand (Boulay et al., 2008). Partant de cette prémisse,

nous avons démontré que son activation, tout comme son expression, est très importante pour plusieurs processus comme l'invasion, la migration, l'adhésion. En effet, la surexpression du dominant négatif T³¹N d'ARF1 diminue le pouvoir de dégradation sur la gélatine des cellules MDA-MB-231 (Schlienger et al., 2014). De plus, pour étudier l'importance de l'état d'activation d'ARF1, nous avons également utilisé un inhibiteur biochimique d'ARF1, le LM 11 qui séquestre la ARF1- GDP avec sa GEF. Utilisé à des concentrations efficaces et non cytotoxiques, nous avons démontré que le LM11 bloque la migration et la formation des point d'adhésions focaux en empêchant le recrutement de la paxilline au complexe d'adhésion (Schlienger et al., 2015).

Nous avons ensuite démontré, pour la première fois, que cette activation ne se résume pas à un seul événement d'activation. En effet, suite à la stimulation à l'EGF, nous avons observé une phase initiale rapide et transitoire d'activation, suivie d'une deuxième phase d'activation prolongée (Schlienger et al., 2014). Ce mode d'activation est aussi vrai pour les GTPases avec RhoA et RhoC. Les deux phases d'activation sont régies de façons différentes. En effet, uniquement la deuxième phase d'activation d'ARF1 est régulée en partie par l'activation des Rho. Il est intéressant de remarquer que dans les cellules MCF7, nous avons démontré que l'état d'activation d'ARF1 n'était pas sous le contrôle de la GTPase ARF6 et ne suivait donc pas un modèle séquentiel (Schlienger et al., 2016). Le rôle exact de ces deux séries d'activation reste encore à déterminer. L'activation de cette GTPase est donc un phénomène complexe. Étant donné les nombreux événements de signalisation, y compris l'internalisation du récepteur EGFR qui se produit après la liaison du ligand, la localisation des GTPases activées peut différer. Ces faits sous entendent qu'il y a l'implication probable de plusieurs GEF et GAP dans un même modèle.

À la membrane plasmique, dans les MDA-MB-231, si l'on cherche à identifier les GEF potentiellement impliquées, on pense inévitablement aux cytohesines, PSD, et IQSEC qui possèdent toutes un domaine PH pour l'adressage à la membrane. Les familles PSD, IQSEC ont une affinité supérieure pour la GTPase ARF6 que pour ARF1 (Gillingham & Munro, 2007). Les cytohesines sont donc de bons candidats. En effet, dans les MDA-MB-231, l'utilisation d'un siRNA non spécifique à une cytohesine uniquement mais qui cible en combinaison la cytohesine 1 et 2, diminue l'activation de la

MMP-9 dans l'essai de zymographie (données non présentées). De plus, nous savons que le LM11, un composé qui séquestre la cytohesine 2, a les mêmes effets que la déplétion d'ARF1 sur l'activation de FAK et la formation des complexes d'adhésion (Schlienger et al., 2015). Il avait été démontré qu'ils agissent comme activateurs cytoplasmiques de l'EGFR (Bill et al., 2010). Il était donc difficile de démontrer l'effet d'une cytohesine sur l'activation d'ARF1 comme étant une résultante directe et non une conséquence de la modulation de l'activation de l'EGFR. Cependant, ce papier a tout récemment été rétracté ce qui fait des cytohésines nos meilleurs candidats.

En ce qui concerne les protéines GAP, elles sont déjà bien caractérisées (Randazzo & Hirsch, 2004; Sabe et al., 2006). Chez la souris, dans des fibroblastes NIH 3T3, il a été démontré que la GAP de ARF1, ASAP1, contrôle l'adhésion via son action sur les complexes d'adhésion focaux. Ce qui corrobore avec nos résultats sur ARF1 obtenus dans les cellules cancéreuses MDA-MB-231 (Schlienger et al., 2015). L'expression de son homologue chez l'humain, la GAP AMAP1, a été corrélée avec les phénotypes invasifs et malins des tumeurs primaires du sein (Onodera et al., 2005). De plus, il a été démontré que AMAP1 contrôle les propriétés invasives des MDA-MB-231, en jouant sur la formation des invadopodes. Dans cette étude, les auteurs assument qu'il s'agit de la GAP d'ARF6 en raison de sa localisation aux invadopodes et de sa surexpression corrélée à l'expression d'ARF6. Cependant, cette GAP n'est pas spécifique à ARF6. AMAP1 a été initialement décrite comme une GAP de haute affinité pour ARF1 et ARF5 et de très faible activité pour ARF6 (M. T. Brown et al., 1998; Furman, Short, Subramanian, Zetter, & Roberts, 2002). Sachant qu'elle contrôle la migration et l'invasion des MDA-MB-231 et qu'il a été démontré que cette GAP a plus d'affinité pour ARF1, elle pourrait très bien être une GAP d'ARF1 dans notre modèle. Pour finir, comme ARF1 contrôle les points focaux d'adhésions dans notre modèle, on ne peut s'empêcher de penser aux GAP APAP/GIT connues pour jouer sur l'adhésion (M. C. Brown, Cary, Jamieson, Cooper, & Turner, 2005). On retrouve également ces protéines exprimées dans les tissus de patient atteints de cancers du sein [The Human Protein Atlas]. Il serait donc très intéressant d'étudier de plus près ces modulateurs de la fonction GTPasique dans le but de mieux comprendre la régulation même de la protéine ARF1.

Une GTPase comme cible thérapeutique

Nos résultats démontrent que cette GTPase est essentielle à de nombreux processus pro-tumoraux notamment, la migration, la prolifération, et l'invasion. Les protéines ARF jouent un rôle crucial dans les étapes initiales menant à la transformation maligne. Ceci fournit en soit une justification suffisante pour le ciblage de ces protéines afin de bloquer non seulement la diffusion de la tumeur, mais aussi sa croissance initiale.

Dans l'optique de développer un outil thérapeutique, nous pouvons suggérer deux types d'approches qui vont moduler soit l'expression, soit à l'activation de la protéine. Cependant, comme les protéines ARF ne sont pas qu'importantes pour la formation tumorale, la suppression totale de ces protéines aura forcément des répercussions sur la stabilité du génome. En raison de leurs rôle dans le trafic vésiculaire, si celui-ci est perturbé de nombreuses modifications post-traductionnelles de protéines n'aura pas lieux. Cette déstabilisation entraînera le gain ou la perte de fonctions et d'expression de nombreuses protéines dans la cellule. Le contenu protéique étant totalement chamboulé il sera impossible à la cellule de maintenir une information génétique stable, en la laissant vulnérable à l'acquisition de mutations. Diminuer l'expression des protéines ARF avec des antagonistes pour inhiber spécifiquement un miRNA modulant l'expression d'ARF1, n'est donc pas une bonne solution.

En ce qui concerne la fonction de la protéine, nous avons quatre approches possibles. Tout d'abord, l'approche qui va permettre de prévenir l'adressage de la protéine à la membrane et son activation (Selvakumar et al., 2007). C'est à dire, un inhibiteur de myristoyltransférase empêchant la modification lipidique des protéines ARF. En effet, il a été démontré, dans un modèle de *Trypanosoma brucei*, une espèce de protiste parasite, que le pyrazole sulphonamide (DDD85646), un inhibiteur de N- myristoyltransférase empêche la myristoylation de ARF1 et bloque ainsi son activité (Frearson et al., 2010). Le DDD85646 a déjà été testé sur la croissance des cellules de fibroblastes de poumon humain ; une sélectivité pour les myristoylations humaines est donc possible, mais n'a encore jamais été testée sur les cellules cancéreuses (Brand et al., 2014). Cependant, cette approche n'est pas spécifique aux protéines ARF mais touche toutes les protéines qui ont besoins de myristoylation comme RAB5, une protéine ARL (pour *ADP ribosylation like factors*) (Frearson et al., 2010). Une deuxième approche consiste à inhiber les facteurs d'échange de nucléotides guanine (GEF), en

généralisant un composé inhibiteur de la liaison du GTP spécifique à la protéine ARF. Cela permettrait de réduire l'activité endogène des ARF, en interférant avec l'activité des GEF. Ce composé viendrait inhiber son interaction avec sa GEF et non séquestrer la ARF et la GEF, comme le LM11 avec ARF1-GDP et Cytohésine-2, par exemple (Viaud et al., 2007). Cette approche démontrerait nettement moins d'effets indésirables, car elle n'affecterait que les protéines ARF. Un mutant des ARF qui ne lie que le GDP, comme ARF1-T³¹N, serait également une approche qui perturberait l'action de la GEF. Cependant, cela ne fonctionnerait pas, la GEF reste liée à la ARF-GDP en essayant en vain à charger le GTP, elle est donc séquestrée, elle aussi, et cela perturberait le golgi à long terme (Dascher & Balch, 1994). Une troisième approche consisterait à perturber les complexes ARF et ses protéines effectrices. La surexpression du domaine de liaison des protéines effectrices aux protéines ARF-GTP, permettrait d'empêcher l'activation des effecteurs par compétition. Cette stratégie serait encore spécifique aux protéines ARF-GTP et bloquerait ainsi leur activité. Pour finir une approche indirecte pourrait être réalisée en ciblant l'activité des protéines effectrices via leurs fonctions enzymatiques. Cependant, cette approche ne serait plus uniquement spécifique aux protéines ARF.

En conclusion, la stratégie la plus prometteuse serait de cibler, à l'aide de petits peptides spécifiques à la protéine ARF, les sites de liaison avec ses GEF ou ses effecteurs. En collaboration avec le docteur Sylvain Martel du Laboratoire de NanoRobotique de Polytechnique de Montréal à l'aide des nanotechnologies, nous pourrions ultimement libérer ces peptides inhibiteurs aux sites spécifiques de développement tumorale (Martel, 2014). Ces nanoparticules permettant un adressage spécifique du traitement, permettraient ainsi d'éviter la toxicité systémique et ainsi d'augmenter significativement l'index thérapeutique de nos peptides inhibiteurs anticancéreux.

L'activation des GTPases ARF fait appel à plusieurs voies de signalisation associées au cancer impliquant de nombreuses protéines telles que l'EGFR, le VEGFR, les récepteurs couplés aux protéines G, les intégrines, les Rho GTPases, la kinase FAK, l'oncogène Ras, Src... Toutes ces protéines constituent un réseau complexe qui comprend de multiples rétroactions et mécanismes compensatoires. De plus, la constitution génétique de chaque individu est unique, l'architecture biomoléculaire des

tumeurs cancéreuses n'est donc pas simple. Ce casse-tête biologique signifie qu'une approche thérapeutique basée sur un modèle unique de traitement est une impasse. Il est maintenant généralement admis que le ciblage spécifique d'une voie de signalisation particulière peut montrer moins d'efficacité et rencontrer de la résistance rapide, mais les combinaisons de médicaments qui touchent de multiples cibles sont plus susceptibles de montrer un bénéfice clinique important. Les traitements futurs du cancer impliqueront sûrement des traitements personnalisés basés sur la sélection de plusieurs cibles. Même si les inhibiteurs de signalisation des protéines ARF ne se montraient pas suffisants par eux-mêmes pour induire la suppression des cellules cancéreuses, ils pourront fournir une option dans la thérapie combinatoire pour atteindre une meilleure efficacité de traitement. Les protéines ARF constituent donc des candidats prometteurs pour la thérapie combinatoire des cancers du sein.

Conclusion

Le cancer invasif du sein est le cancer le plus commun chez les femmes et représente ainsi 22% de tous les cancers féminins. Un million de femmes dans le monde sont diagnostiquées avec un cancer du sein chaque année, soit 1 femme sur 9. Malheureusement, 1 femme sur 30 diagnostiquée avec le cancer du sein en succombera (Canadian Breast Cancer Foundation, www.cancer.ca). Parce que les sous types de cancers dits triple-négatifs suivent un modèle agressif de progression tumorale accompagné d'un taux élevé de métastases précoce, la nécessité de trouver de nouvelle cible thérapeutique est urgente. Les données présentées dans ces études informent les compagnies pharmaceutiques et laboratoires, qu'il existe de nouvelles cibles pharmacologiques à considérer pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques dans le cancer du sein triple négatif à haute fatalité. Ceci avise donc les patients atteints de cancer du sein triple négatifs, qu'il y a de l'espoir pour le développement de nouveau traitements prometteurs. Nous sommes donc convaincu que les données présentées ont une grande originalité et importance scientifique.

L'ensemble de nos résultats souligne, pour la première fois, un rôle clé pour la GTPase ARF1 dans l'invasion des cellules cancéreuses du sein et suggère que le ciblage de l'axe de signalisation ARF / Rho / MLC pourrait être une stratégie prometteuse pour inhiber le caractère invasif et métastatique de ces cancers du sein invasifs. En plus d'avoir défini le circuit moléculaire qui régit le processus d'invasion, nous avons démontré l'implication des structures importantes dans ce mécanisme. En effet, nous avons démontré que la déplétion de ARF1 inhibe fortement la maturation des invadopodes et la libération de microvésicules de type shedding. Nous avons démontré également l'implication d'ARF1 sur l'activité d'une MMP spécifique, la MMP-9. Nos résultats démontrent, pour la première fois, le rôle central d'ARF1 dans l'invasion des cellules du cancer du sein et soulignent une nouvelle cible potentielle pour le développement de thérapies contre le cancer du sein.

De plus, nos résultats démontrent un nouveau mécanisme par lequel ARF1 régule la migration cellulaire en contrôlant l'assemblage des adhésions focales. En effet, l'expression et l'activation de la protéine ARF1 sont essentielles pour la phosphorylation EGF-dépendante de Src et FAK. De plus, ARF1, retrouvée en complexe avec les protéines d'adhésion focale, régleme le recrutement de protéines clés telles que paxillin, Talin et FAK à la β 1-intégrine. Nous avons donc défini pour la première fois ARF1 comme une protéine clé de signalisation qui régule l'adhésion. Ce projet a ainsi permis l'identification d'une protéine qui orchestre une des réponses cellulaires fondamentales; tel que la migration. Ces nouvelles informations nous en disent donc plus sur le mécanisme par lequel les cellules tumorales deviennent mobiles et contribuent à la progression et de l'agressivité du cancer du sein.

Nos résultats ont aussi dévoilé que l'expression de la protéine ARF1 dans un modèle de xéno greffe murin est importante pour la croissance des tumeurs primaires, mais aussi pour le nichage des métastases pulmonaires. Pour la première fois, nous démontrons qu'un niveau élevé d'ARF1 est associé à une incidence plus élevée de métastases. En effet, ARF1 contrôle la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) en agissant sur l'adhésion inter-cellule par la β -caténine et l'E-cadhérine, l'activation de l'oncogène Ras et l'expression des inducteurs de l'EMT. ARF1 contrôle ainsi l'invasion,

la prolifération et la résistance à un agent chimio-thérapeutique. Pour finir, nos données ont permis de caractériser ARF 1, pour la première fois, dans les tissus cancéreux mammaire humain. Notamment, ARF1 est fortement exprimée dans les tumeurs du sein des sous-types les plus agressifs, mais aussi les plus avancés. Dans l'ensemble, nos résultats ont permis d'identifier ARF1 comme un interrupteur moléculaire de la progression tumorale. Ces données novatrices révèlent l'importance d'ARF1 dans les formes les plus mortelles de cancer du sein et identifient cette GTPase comme une nouvelle cible potentielle pour la conception de traitements contre le cancer du sein. En effet, ils suggèrent que la limitation de l'expression / activation de cette GTPase pourrait aider à améliorer les résultats pour les patients. Ces résultats appuient donc l'utilisation de la GTPase ARF1 comme une cible pharmacologique potentielle pour le traitement du cancer du sein invasif, dont les options thérapeutiques restent encore limitées.

Nous avons démontré qu'ARF1 est importante pour l'invasion et l'adhésion, en plus de son rôle dans la migration et la prolifération, il est donc cohérent d'avoir observé un impact au niveau de la progression tumorale dans un modèle murin. Cependant, ce n'était pas garanti, car l'environnement tumoral joue un rôle majeur dans le développement des cancers, grâce à un partenariat étroit avec celui-ci. Nous nous pencherons donc spécifiquement sur ce sujet dans la prochaine partie de cette thèse, afin de tenter d'approfondir nos connaissances sur le rôle des protéines ARF dans le développement tumoral.

VI. CHAPITRE VI : Perspectives avec approches expérimentales

Dans cette section, en s'appuyant sur nos résultats précédant, je présente ma vision selon laquelle j'aurais continué mon étude des protéines ARF. J'aurais réalisé 6 projets différents portant sur les thèmes suivants : implication des protéines ARF dans l'organisation des acini, l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*, le système immunitaire, la relation cancer/adipocytes, le nichage des cellules souches et comme outils de pronostics.

VI. 1. Effets des protéines ARF sur l'organisation des acini.

- *Contexte, raisonnement et résultats préliminaires :*

Un acinus est une cavité épithéliale arrondie bordée par des cellules sécrétrices qui débouche dans le canal excréteur d'une glande. Beaucoup de cancers du sein débutent dans la région terminale des conduits mammaires suite à une perte d'organisation des acini. En effet, la désorganisation de ces structures initie la formation tumorale. L'étude du dérèglement de ses structures apporte donc des informations sur l'étape d'initiation de la formation tumorale. Dans la culture de tissu en 3D, les cellules épithéliales mammaires forment des structures sphériques de taille identique aux acini trouvés *in vivo*. Après plusieurs jours en culture au centre de la sphère, une cavité commence à apparaître, grâce au mécanisme d'apoptose mis en place. Cette lumière est l'endroit où le lait doit être sécrété. Les cellules de cancer du sein, en revanche, ne parviennent pas à former ces structures dans le Matrigel, car elles continuent à proliférer et forment des structures irrégulières (Figure VI-1) (Bissell et al., 1999; Debnath et al., 2002; K. R. Shaw, Wrobel, & Brugge, 2004). Pour éviter cela, il est crucial de maintenir la polarité apico-basale et l'induction de l'apoptose. Des études démontrent que la surexpression de l'EGFR induit une désorganisation des acini (Dimri et al., 2007; Muthuswamy, Li, Lelievre, Bissell, & Brugge, 2001).

Le rôle de plusieurs GTPases a été également caractérisé sur la formation de ces structures. En effet, il a été rapporté que l'expression d'un mutant dominant négatif de la petite GTPase Rap1 induit la réversion phénotypique des cellules tumorales, en jouant sur la formation d'acini pour réduire l'incidence des tumeurs (M. Itoh, Nelson, Myers, & Bissell, 2007). De plus, nous savons que la protéine Rac1 joue plus sur la polarisation basale et baso-latérale alors que RhoA est plus impliquée dans la polarité apicale et apico-latérale. Leur effet opposé sur la polarité est également retrouvé sur l'organisation des acini. Rac aiderait à potentialiser la désorganisation des acini contrairement à RhoA (Duan et al., 2010). Nous savons qu'ARF1 joue sur l'activation de RhoA et RhoC dans les MDA-MB-231 mais également sur l'activation Rac1 (Lewis-Saravalli et al., 2013; Schlienger et al., 2014). D'autres données démontrent qu'ARF1 a un rôle à jouer dans l'apoptose cellulaire. Dans les MCF7, lorsqu'on surexprime ARF1 ou ARF6, les cellules survivent beaucoup mieux à des inducteurs de l'apoptose, tels que l'etoposide (Schlienger et al., 2016). Tout récemment, une étude réalisée dans les MCF10a a démontrée que l'expression d'ARF6 jouait un rôle sur la morphologie des acini en affectant l'E-cadhérine (Eades et al., 2015).

Nos données préliminaires indiquent que les cellules MCF10A s'organisent efficacement en acini dans le Matrigel (Figure VI-2). Les MCF10a contiennent des niveaux très faibles d'ARF1 en comparaison aux cellules MDA-MB-231 (Boulay et al., 2008). Ce fait n'est pas étonnant car c'est une lignée de cellules épithéliales mammaire humaine non cancéreuse. Lorsque les protéines ARF sont exprimées constitutivement dans les cellules grâce à des lentivirus, elles croissent et prolifèrent en formant des masses sans lumière (Figure VI-2). Les résultats obtenus sur ARF6 corrélaient avec l'étude de Eades et al (Eades et al., 2015). Ces données suggèrent que l'initiation de l'apoptose, qui se produit normalement une fois que les cellules sont organisées en acini, ne se produit plus lorsque l'on dérègle l'expression de ces GTPases. La protéine ARF1 pourrait donc contrôler l'architecture des acini. Il serait donc intéressant d'examiner en détail le rôle d'ARF1 sur la formation et la perturbation de ces structures. Puis, d'élucider les mécanismes moléculaires associés aux GTPases ARF1 et ARF6.

- *conception expérimentale :*

Pour vérifier cette hypothèse, nous continuerons à utiliser les MCF10a, cette lignée de cellules épithéliales mammaire humaine qui, en tri-dimension, forme spontanément des acini. En raison de la durée prolongée des expériences en milieu tridimensionnel, nous avons créé une lignée stable de MCF10a qui surexprime ARF1 ou ARF6. Ces lignées stables ont été construites grâce à des lentivirus et la lignée contrôle exprime le vecteur parental. Les cellules MCF10A sont connues pour dériver génétiquement, nous ne dépasserons donc pas plus de vingt passages (Ordinario et al., 2012).

Nous commencerons donc parensemencer des MCF10a qui surexpriment ou non ces différentes GTPases dans du Matrigel et nous confirmerons nos résultats préliminaires. Les cellules seront comparées pour leur capacité à former des acini sur une période de six semaines et la taille, la forme, et la présence de la lumière seront analysées.

Nous regarderons ensuite, en microscopie confocale, l'état des acini. Les cellules seront marquées au Dapi pour permettre leur visualisation. Pour vérifier si ARF1 et/ou ARF6 affecte la polarité des cellules, nous les marquerons au GM130 (pour *cis-Golgi matrix protein of 130 KD*) (polarité apicale), à l'intégrine $\alpha 6$ (basale), à l'actine (apico-latérale) et à la β -caténine (baso-latérale) et visualiserons leur localisation en immunofluorescence (Duan et al., 2010; M. Itoh et al., 2007).

Nous vérifierons également l'état prolifératif des cellules en regardant le marqueur Ki-67 et la voie AKT. Puis, pour vérifier si la surexpression d'ARF1 et/ou d'ARF6 affecte l'apoptose des MCF10a, nous les marquerons pour les protéines Bax (pro-apoptotique) et Bcl2 (anti-apoptotique).

Suite à la surexpression des GTPases, les niveaux d'expression des protéines étudiées en immunofluorescence seront également vérifiés par Western blot (Debnath et al., 2002). De plus, d'autres marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse tels que, snail 1, snail 2 et twist seront étudiés en évaluant leur niveau d'ARNm et leur expression protéique.

Nous nous attendons donc à ce que la surexpression d'ARF1 et/ou d'ARF6 dans les MCF10a inhibe l'apoptose et induise la désorganisation de l'acinus. Compte tenu

qu'ARF1 régule l'activation aussi bien de Rac1 que de RhoA dans les MDA-MB-231 (Lewis-Saravalli et al., 2013; Schlienger et al., 2014), l'effet d'ARF1 dans les MCF10a sur la polarité des cellules est difficile à prévoir. Toutefois, comme l'expression d'ARF1 joue sur la localisation de la β -caténine dans les MDA-MB-231 et les MCF7, nous croyons que la polarité basolatérale puisse être affectée (Schlienger et al., 2016). Nous nous attendons également à ce que les marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse soient régulés à la hausse.

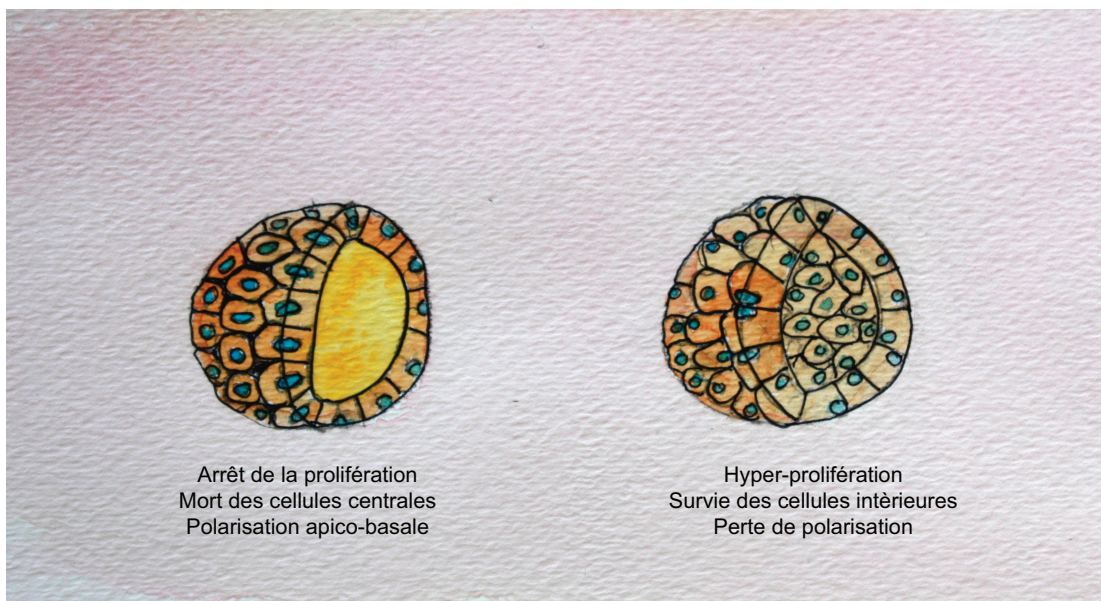


Figure VI-1: Un acinus.

Dans un cas normal les cellules ont arrêtées de proliférer, les cellules centrales sont mortes par apoptose et l'acinus à une polarité apico-basal. Dans un cas cancéreux, les cellules ont survécus à l'intérieur de l'acinus ce qui est associé à une hyper-prolifération et une perte de polarité. Inspiré de (Keely, 2011).

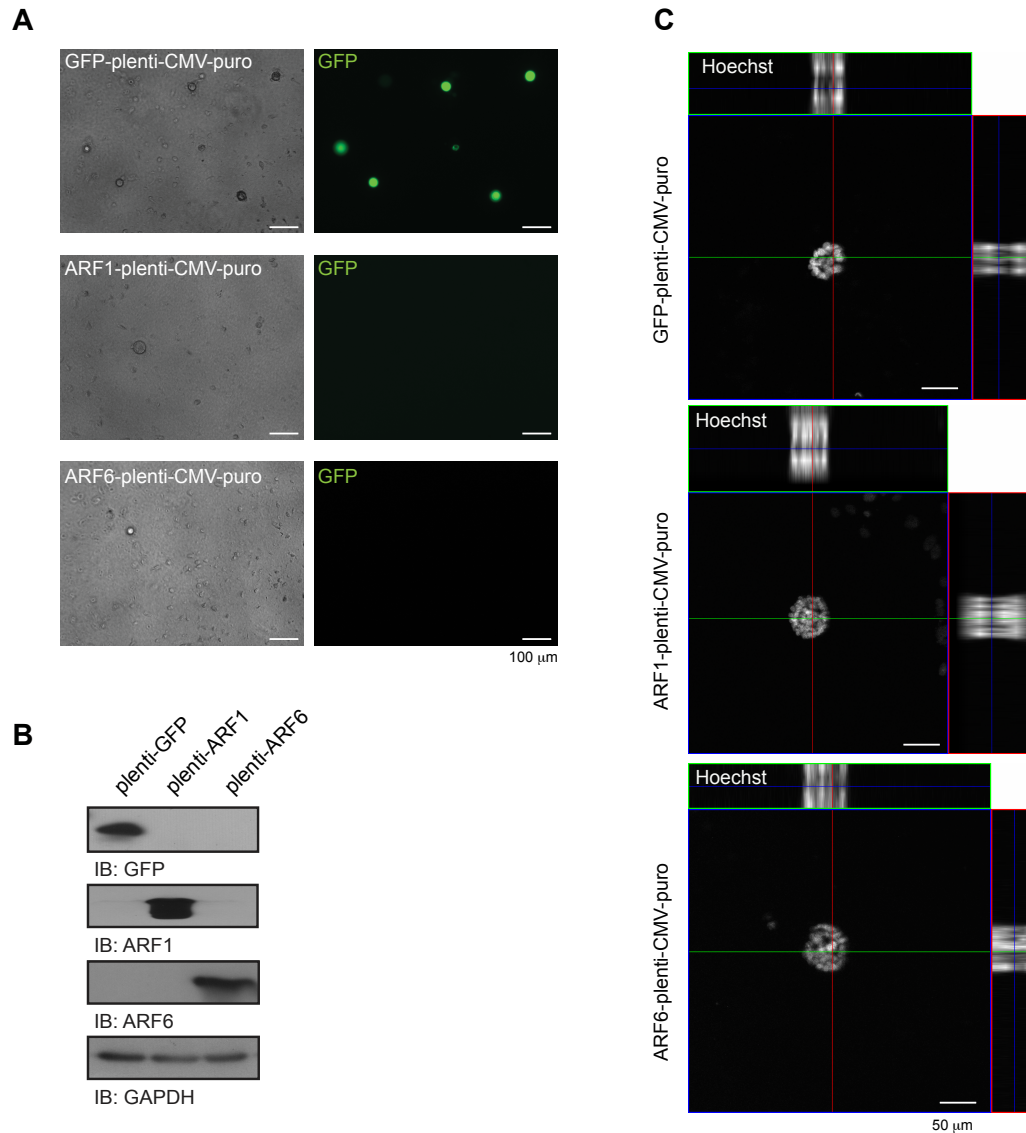


Figure VI-2: Les protéines ARF sont importantes pour la formation des acini.

(A) Les cellules MCF10A expriment de manière stable la GFP, ARF1 ou ARF6 et ont été ensemencées dans du Matrigel et autorisées à proliférer pendant 30 jours. Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope inversé à épifluorescence. Les images sont représentatives de deux expériences réalisées en duplicata. Barres d'échelle, 100 μ m. (B) Les cellules MCF10A exprimant de manière stable la GFP, ARF1 ou ARF6 pendant 60 jours ont été lysées et l'expression de GFP, ARF1, ARF6 et GAPDH a été détectée par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques. (C) Les cellules MCF10A exprimant de manière stable la GFP, ARF1 ou ARF6 ont été ensemencées dans Matrigel et autorisées à proliférer pendant 60 jours. Les acini formés sont fixés et colorés avec le Hoechst pour localiser les cellules. Les sections transversales ont été analysées par Z-stack. Les images ont été prises avec un microscope confocal Zeiss LSM510. Les images sont représentatives d'une expérience réalisée en duplicata. Barres d'échelle, 50 μ m.

Au cours des quatre dernières décennies, de nombreux chercheurs se sont concentrés principalement sur les cellules tumorales. Toutefois, de nouvelles données indiquent que les tumeurs sont composées de parenchyme et de stroma, deux parties distinctes mais interactives qui contribuent à la croissance tumorale (Gangadhara, Barrett-Lee, Nicholson, & Hiscox, 2012; Oza & Boyd, 1993). De nombreuses études démontrent maintenant que les cellules du stroma de la tumeur jouent un rôle important dans l'initiation de la tumeur, sa progression et la formation de métastases (Mao, Keller, Garfield, Shen, & Wang, 2013). Dans le stroma, en plus des fibroblastes associés au cancer, on retrouve aussi d'autres types cellulaires qui jouent un rôle central dans le cancer du sein, tels que les cellules endothéliales, les macrophages, les leucocytes et les adipocytes (Andreu et al., 2010; Bergers & Benjamin, 2003; Brouty-Boye, 2005; Calle & Kaaks, 2004). Il serait donc très intéressant de pousser dans cette voie afin de mieux comprendre le rôle des protéines ARF dans la relation tumeur/stroma. En voici donc quelques perspectives qui en découlent.

VI. 2. Rôle des protéines ARF dans l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*.

- *Contexte, raisonnement et résultats préliminaires :*

L'angiogenèse est une étape clé pour la progression tumorale. Elle permet la mise en place d'une néo-vascularisation pour l'apport de nutriments et d'oxygène au site primaire tumoral (Figure VI-3). De plus, cela permet aux cellules tumorales la mise en place de nouvelles voies d'échappement pour aller métastaser. Afin de stimuler le processus d'angiogenèse, les cellules tumorales, en partenariat avec les cellules stromales, sécréteront des facteurs solubles pro-inflammatoires et pro-angiogéniques tels que la cytokine $TNF\alpha$, le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), l'angiotensine II et l'interleukine IL8 (Ager, Neo, & Christophi, 2008; Hunyady & Catt, 2006; Milkiewicz, Ispanovic, Doyle, & Haas, 2006; Pennacchietti et al., 2003). La liaison de VEGF à ses récepteurs à activité tyrosine kinase induit l'activation des voies de

signalisation en aval, y compris la voie MAPK ERK, PI3K/Akt, et la voie de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS). Akt joue donc un rôle crucial dans l'angiogenèse, tant dans les cellules endothéliales qui permettent la formation de nouveaux vaisseaux que dans les cellules cancéreuses qui sécrètent les facteurs pro-angiogéniques. Akt phosphoryle directement eNOS qui assure la production de protoxyde d'azote (N₂O) ou NO qui induit au niveau vasculaire, une vasodilatation et la néo-vascularisation. De plus, Akt permet l'augmentation du facteur hypoxique inductible HIF-1 par l'activation du complexe mTORC1/4E-BP1.

Nous avons des preuves de l'implication des petites GTPases dans ce processus. Au laboratoire, nous avons démontré d'une part que la GTPase ARF1 peut contrôler la voie PI3K/Akt dans des cellules cancéreuses, mais également que la GTPase ARF1 module l'angiogenèse en contrôlant les cellules endothéliales (Boulay et al., 2008; Daher, Boulay, Desjardins, Gratton, & Claing, 2010). En effet, dans les cellules endothéliales, nous avons démontré qu'ARF1 contrôle l'activation d'eNOS et la libération du monoxyde d'azote (NO) induit par le VEGF via l'activation de la voie PI3K /Akt (Daher et al., 2010). Des études ont également démontré que la GTPase ARF6 pouvait être impliquée dans l'angiogenèse. En plus d'être connue pour réguler la voie ERK dans les cellules cancéreuses, l'expression de la GTPase ARF6 est augmentée dans l'ischémie des membres postérieurs (Hindlimb), un modèle de souris visant à étudier les mécanismes impliqués dans l'angiogenèse (Ikeda et al., 2005). Des résultats préliminaires démontrent également l'implication d'ARF6 sur la voie mTOR/4E-BP1 (Bourmoun et al. en préparation). Nous savons également que les protéines ARF1 et ARF6 peuvent réguler la sécrétion des microvésicules tumorales (Muralidharan-Chari, Clancy, et al., 2009; Schlienger et al., 2014). Des microvésicules spécifiques qui vont stimuler les cellules endothéliales afin qu'elles libèrent de la sphingomyéline et du VEGF, pour favoriser l'angiogenèse (C. W. Kim et al., 2002). Pour finir, nous avons démontré *in vivo* via un modèle de xénogreffes chez la souris SCID/beige, que la déplétion d'ARF1 dans les cellules invasives du cancer du sein, les MDA-MB-231, contribue à réduire la croissance des tumeurs primaires (Schlienger et al., 2016). Il serait donc intéressant de vérifier *in vivo* l'implication de la GTPase ARF1 sur l'angiogenèse, contribuant au développement de cancers du sein invasifs.

- *conception expérimentale* :

En utilisant des modèles stables de cellules invasives (MDA-MB-231) ou non-invasives (MCF7) qui respectivement sont déplétées ou surexpriment ARF1 ou ARF6, nous réaliserons des essais d'angiogénèse *in vivo*. Des souris SCID/beige femelle de 6-8 semaines seront utilisées, comme dans nos expériences antérieures, pour éviter le rejet de greffes et assurer la constance de nos données. Les cellules en combinaison avec du Matrigel seront injectées de façon sous-cutanée sur la face dorsale des souris (Margheri et al., 2012). Dans le cas des modèle inductibles, les souris recevront ou non de la nourriture contenant de la doxycycline. Chaque souris sera porteuse de deux greffes. Après un mois les animaux seront sacrifiés, la taille des tumeurs générées dans le tissu matriciel sera évaluée et la matrice sera extraite. La première tumeur extraite sera fixée dans de la formaldéhyde pour ensuite être analysée en IHC. Grâce au marquage en IHC de H&E ou de l'anti-CD31 pour identifier les cellules endothéliales, nous serons en mesure de compter les vaisseaux et ainsi déterminer plus précisément la densité et le pourcentage de la néo-vascularisation. Nous avons démontré qu'ARF1 et ARF6 jouaient tous deux sur les marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse (Schlienger et al., 2016). L'induction du gène HIF-1 constitue un événement clé dans le déclenchement de l'angiogénèse tumorale et il est impliqué dans l'induction de la TEM. Il sera donc également intéressant de regarder les niveaux protéiques de HIF-1 aux sites primaires des tumeurs néoformées (Stroka et al., 2001). La deuxième tumeur sera broyée, diluée dans l'eau et la quantité d'hémoglobine provenant de la néo-vascularisation présente dans la matrice sera analysée avec le kit Drabkin (Sigma) (Margheri et al., 2012).

L'angiogénèse est définie par la formation en premier lieu de nouveaux vaisseaux sanguins germinant de vaisseaux préexistants. Pour déterminer si les protéines ARF jouent sur les mécanismes précoces de l'angiogénèse, nous pourrions également regarder ce mécanisme de « sprouting » (Pyun et al., 2008). Nous prélèverons des anneaux aortiques de rats dénudés d'endothélium, comme le montre la figure VI-4, que nous submergerons dans du Matrigel réduit en facteurs de croissance. Ils seront ensuite incubés avec les milieux de culture de nos cellules cancéreuses propre à chacune de nos conditions. Après 7 jours, les VSMC (pour *vascular smooth muscle cell*) formeront l'esquisse de nouveaux vaisseaux et les réseaux capillaires seront mesurés et comparés.

Dans le cas présenté, le FBS (pour *fetal bovin serum*) et l'angiotensine II ont été utilisés comme contrôles positifs (figure VI-4) (Escobar, Rodriguez-Reyna, Arrieta, & Sotelo, 2004).

Les cellules cancéreuses sécrètent donc plusieurs facteurs pro-angiogéniques, permettant le développement de l'angiogenèse par les cellules endothéliales (Milkiewicz et al., 2006). Nous effectuerons, pour finir, des essais d'angiogenèse *in vitro* de façon paracrine (Margheri et al., 2012). Nousensemencerons sur du Matrigel des cellules endothéliales (HUVEC pour human umbilical vein endothelial cells) et nous les exposerons à leur milieu de culture ou à du milieu de culture de cellules cancéreuses mammaires (MCF7 ou MDA-MB-231) transfectées afin de moduler l'expression des GTPases à la hausse ou à la baisse. Ce modèle de co-culture indirect permettra de distinguer les effets des cellules cancéreuses sur les cellules endothéliales, qui sont strictement fondés sur des facteurs solubles et non sur le contact physique entre celles-ci. Cette expérience nous permettra d'observer l'impact des ARF sur la formation des néo-vaisseaux tubulaires et sur la sécrétion des facteurs associés. La morphogenèse capillaire sera évaluée après 6 et 18 heures en utilisant un microscope inversé. À la fin de l'expérience, pour déterminer les facteurs spécifiques qui sont sous le contrôle des GTPases, nous analyserons par Elisa et Western blot le milieu de cultures des cellules cancéreuses mis en contact ou non avec les cellules endothéliales. Nous examinerons tout particulièrement les quantité des facteurs VEGF, angiotensine II et HIF-1. En parallèle, nous vérifierons également le contenu du sérum utilisé pour s'assurer de l'interprétation des résultats. En effet la présence de MMP-2 retrouvée dans les milieux de MDA-MB-231, sur lequel la modulation de l'expression d'ARF1 n'a aucun effet, pourrait peut être provenir du sérum (Schlienger et al., 2014).

Nous nous attendons donc à ce que la modulation de l'expression d'ARF1 et/ou d'ARF6 affecte le développement de la néo-vascularisation, ce qui influencera la taille des greffes. De plus, on retrouve déjà des variations dans le milieu extracellulaire des MDA-MB-231 déplétées en ARF1 pour certains facteurs de l'invasion dont une augmentation de sécrétion de la forme inactive de MMP-9 (proMMP-9) au détriment de la forme active (Schlienger et al., 2014). Nous nous attendons à ce qui ne soient pas les seuls facteurs affectés. Nous pensons ainsi que lorsque nous modulerons l'expression des

ARF, nous observerons une corrélation positive avec l'expression de VEGF et de HIF-1 en adéquation avec la morphogénèse capillaire observée.

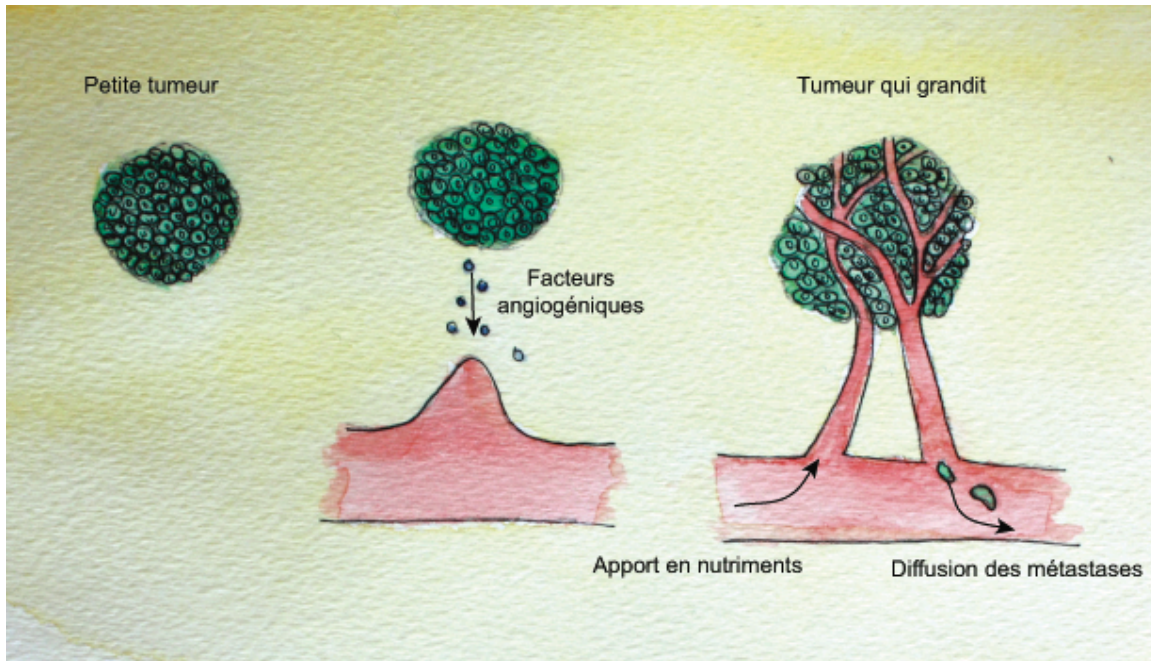


Figure VI-3: Représentation schématique de l'angiogenèse.

L'angiogenèse est une fonction physiologique naturelle qui peut être détournée par les cellules cancéreuses pour satisfaire leur besoin accru de nutriments et d'oxygène. Ce processus permet la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Une cellule activée par un manque d'oxygène (ou une mutation) sécrète des facteurs angiogéniques pour attirer les cellules inflammatoires et endothéliales et favorisent leur prolifération. Au cours de leur migration, les cellules inflammatoires sécrètent des substances supplémentaires qui intensifient l'appel angiogénique. Les cellules endothéliales provenant des vaisseaux sanguins existants répondent aux signaux angiogéniques dans leur voisinage. Elles se mettent à proliférer et sécréter des protéases pour digérer la paroi des vaisseaux sanguins pour migrer vers le site des stimuli angiogéniques. Les capillaires émanant des artérioles et les veinules se rejoignent pour fournir un afflux sanguin continu aux cellules tumorales. Inspiré de (Siemann, Mercer, Lepler, & Rojiani, 2002).

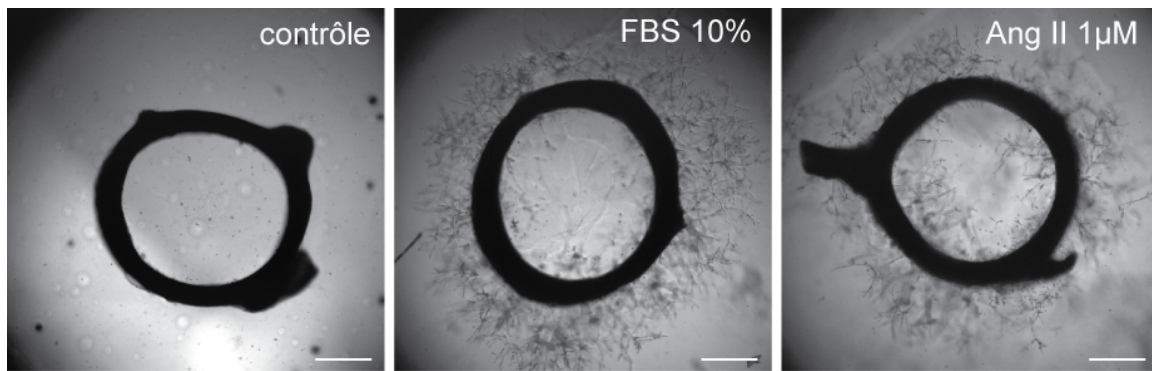


Figure VI-4: Test de Sprouting en utilisant des aortes de rats.

Des anneaux aortiques (1 mm) ont été récoltées à partir de rats Sprague-Dawley, immergés dans du Matrigel réduit en facteurs de croissance et traités ou non avec du FBS (10%) ou de l'angitensine II (1 μ m), sur une période de 7 jours. Cette expérience est représentative de 3 autres expériences, réalisées en duplicatas. Les photographies sont prises à l'aide d'un microscope inversé. Barre d'erreur, 500 μ m.

VI. 3. Implication des protéines ARF sur le système immunitaire

- Contexte et raisonnement :

Les cellules tumorales échappent au contrôle intrinsèque ; elles sont alors soumises à des mécanismes suppresseurs de tumeurs extrinsèques appelés « immunoediting » (Dunn, Bruce, Ikeda, Old, & Schreiber, 2002). Le système immunitaire détecte et élimine les tumeurs en développement avant qu'elles ne deviennent cliniquement apparentes. Il faut toutefois tenir compte que le système immunitaire protège à la fois l'hôte contre le développement des tumeurs et favorise la croissance de celles-ci. L'immunoediting se divise en 3 phases. La première consiste en la phase d'élimination ou surveillance immunitaire du cancer. La deuxième est associée à une phase de dormance tumorale, où les cellules tumorales et l'immunité entrent dans un équilibre dynamique qui maintient l'expansion de la tumeur en échec. La dernière phase est celle où les cellules tumorales réussissent à s'échapper. Elles engagent de nombreux mécanismes immunosuppresseurs pour atténuer les réponses immunitaires anti-tumorales en faveur de leur croissance et de leur développement (Dunn et al., 2002).

De plus en plus d'études démontrent que le microenvironnement de la tumeur est immunosuppresseur (Elgert, Alleva, & Mullins, 1998; Ohm & Carbone, 2001). En effet, il a été démontré que la croissance de tumeurs solides est associée, par inadvertance des cellules immunitaires, à une aberration du processus normal de cicatrisation de la plaie ; ce qui a pour conséquence de favoriser la croissance tumorale (Brigati, Noonan, Albini, & Benelli, 2002; Coussens & Werb, 2002; Lin, Gouon-Evans, Nguyen, & Pollard, 2002). Ce microenvironnement contient souvent un grand nombre de cellules hématopoïétiques, de monocytes et de macrophages qui sont associés à l'inflammation liée aux tumeurs (Lwin, Zuccarini, Sloane, & Beverley, 1985). Les macrophages différenciés sont les cellules sentinelles de la réponse immunitaire innée et contribuent à la réponse immunitaire adaptative. Ils ont de nombreuses fonctions impliquées dans une variété de maladies telles que les cancers (Leek & Harris, 2002; Swallow, Murray, & Guillem, 1996). Les macrophages proviennent de monocytes circulants et sont recrutés du sang vers les tissus par des signaux spécifiques provenant du microenvironnement local (Gordon & Taylor, 2005). Le phénotype et la fonction des macrophages matures est donc dépendant de l'environnement auquel ils ont été soumis (Cavaillon, 1994). Une lignée cellulaire couramment utilisée pour la différenciation des monocytes en macrophages, est la lignée cellulaire promyéloïde THP-1 (Tsuchiya et al., 1982).

Nous savons que le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) influence la différenciation des monocytes THP-1 en macrophages (Daigneault, Preston, Marriott, Whyte, & Dockrell, 2010; Rovera, O'Brien, & Diamond, 1979). Un rôle des protéines ARF sur la signalisation découlant du PMA a été suggéré. En effet, suite à des concentrations croissantes de brefeldin A (BFA), la sécrétion de MMP-9 induite par le PMA est inhibée, dans les cellules de fibrosarcome HT 1080 (Ho, Exton, & Williger, 2003). De plus, l'acide rétinoïque induit la différenciation des THP-1 en macrophages (Hemmi & Breitman, 1985). Lorsque les cellules THP-1 sont traitées, il y a moins de catalyse d'ADP-ribosylation (de Cremoux et al., 1991). L'ADP-ribosylation est donc importante pour cette différenciation et les protéines ARF ont assurément un rôle important dans ce mécanisme. Nous savons également que les cellules tumorales utilisent les microvésicules comme mécanisme d'évasion du système immunitaire (Muralidharan-Chari, Clancy, Sedgwick, & D'Souza-Schorey, 2010; Valenti et al., 2006). En effet, la

fusion directe des microvésicules, provenant de mélanome ou de carcinome humain, avec des monocytes, inhibe leur différenciation *in vitro* et *in vivo* (Valenti et al., 2007). Nos données démontrent que la déplétion d'ARF1 dans les MDA-MB-231 diminue le nombre de microvésicules sécrétées (Schlienger et al., 2014). Ces résultats suggèrent donc une implication des protéines ARF dans la relation de la tumeur avec son environnement : cependant aucunes preuves directes n'existent à ce jour. Il serait donc intéressant d'étudier le rôle des GTPases ARF sur les interactions des cellules cancéreuses avec leur voisinage, en commençant par la différenciation des monocytes en macrophages.

- *conception expérimentale* :

Il a été suggéré que la présence des cellules immunitaire influence le potentiel métastatique de certaines tumeurs (Lauder, Aherne, Stewart, & Sainsbury, 1977; McBride, 1986). Il existe donc une corrélation positive entre le degré d'infiltration des cellules immunitaires et la croissance tumorale (P. M. Kelly, Davison, Bliss, & McGee, 1988; Lauder et al., 1977). La présence de monocytes et de macrophages associés aux tumeurs du sein, démontre une fonction de régulation de la croissance tumorale de façon paracrine. Les cellules cancéreuses MCF7 et MDA-MB-231 sur-exprimeront ou seront déplétées en protéines ARF1 et ARF6 respectivement. Le milieu de culture sera ensuite laissé deux jours sur les cellules et concentré en utilisant les filtres Amicon Ultra-4 pour centrifugeuses avec une limite de poids moléculaire de 10 kDa (Millipore, Bedford, MA, USA). Les THP-1ensemencées dans des plaques à 24 puits recevront des quantités 3 fois plus concentrées de milieu de cellules cancéreuses. Deux jours après, par des analyses en cytométrie de flux, nous comparerons la quantité, pour chacune des conditions, de macrophages formés. Du M-CFS (pour *macrophage colony-stimulating factor*) et du phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) seront utilisés comme contrôles positifs, pour induire la différenciation de façon naturelle ou chimique des monocytes en macrophages (Motoyoshi, 1998, 1999; Murao, Gemmell, Callahan, Anderson, & Huberman, 1983). Nous étudierons par la même approche le type de macrophages ainsi formés, anti-tumoraux (M1) ou pro-tumoraux (M2) (Italiani & Boraschi, 2014). Nous utiliserons du LPS (lipopolysaccharide) et de l'IL-10 comme contrôle positif de la différenciation en macrophages de types M1 et M2 respectivement (Mantovani et al., 2004). Pour différencier correctement ces différentes populations nous utiliserons plusieurs

marqueurs, notamment CD11b, CD11c, CD14, CD33, CD34, CD36, CD64 et CMH-II. Les cellules qui seront marquées CD11b+/ CD11c-/CD14 low/CD33+/ CD34-/ CD36-/CD64+/ CMH-II- seront désignées comme les THP-1, CD11b^{low}/ CD11c+/CD14 high/CD33-/ CD34+/ CD36^{low}/CD64+/ CMH-II+ comme les macrophages M1 et CD11b^{low}/ CD11c+/CD14 high/CD33-/ CD34-/ CD36^{high}/CD64-/ CMH-II+ comme les macrophages M2 (Daigneault et al., 2010; Murdoch, Muthana, Coffelt, & Lewis, 2008; Ostuni, Kratochvill, Murray, & Natoli, 2015). Dans l'exemple où les cellules invasives MDA-MB-231 sont déplétées en protéines ARF1 ou ARF6, on s'attend à ce qu'il y ait plus de THP-1 transformés en macrophages. *In vivo*, les tumeurs primaires sont plus petites, les cellules sont moins agressives, et devraient donc moins être aptes à détourner le système immunitaire. Toutefois, si la quantité de macrophages reste la même, nous nous attendons à ce qu'il y ait plus de macrophages anti-tumoraux de type M1 que de macrophages de type M2.

Nous savons que les ARF sont impliquées dans l'invasion et l'agressivité de ces cellules cancéreuses (Schlienger et al., 2014; Schlienger et al., 2016). De plus, la présence de milieu de monocyte THP-1, sur des cellules MCF7 et MDA-MB-231, augmente l'agressivité de celles-ci en jouant sur la sécrétion de certaines MMP (Szabo & Singh, 2005). Il serait donc intéressant de déterminer l'implication des protéines ARF dans ce modèle paracrine inverse. Cette fois-ci du milieu de THP-1 serait ajouté aux cellules cancéreuses, dont l'expression protéique des ARF a été modifiée comme-ci dessus. Les protéines ARF peuvent être activées par l'EGFR. De plus, les THP-1 sécrètent certains ligands de l'EGFR tels que, le TNF α , l'amphiregulin et l'heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) (Chatenay-Rivauday et al., 2000; Mograbi et al., 1997). Nous étudierons également si les THP-1 peuvent activer l'EGFR en sécrétant des facteurs et par conséquent activer les ARF. Nous évaluerons ainsi si les monocytes peuvent potentialiser les effets des protéines ARF sur les cellules cancéreuses. Dans le cas où les protéines ARF seront surexprimées dans les MCF7, nous pensons donc que l'ajout de milieu THP-1 aura un effet additif sur l'effet de ces protéines, car celles-ci seront dans un état actif.

Il se pourrait également qu'il n'y ait aucun changement du nombre et du type de macrophages. Les tumeurs infiltrant souvent en parallèle avec des lymphocytes T ou des NK (pour natural killer) qui est le plus souvent signe de bon pronostic (W. H. Clark, Jr. et al., 1989; Clemente et al., 1996). Toutefois, la tumeur peut encore déjouer ces systèmes de protection. Il a été montré que le milieu de MDA-MB-231 inhibe l'activité des cellules NK humaines (Arteaga et al., 1993). En effet, l'injection intra-péritonéale de cellules MDA-MB-231, chez des souris athymiques diminue l'activité cellulaire des NK dans la rate. *In vitro*, le milieu sans sérum de culture des cellules MDA-MB-231 inhibe l'activité des cellules NK de lymphocytes de sang humain (Arteaga et al., 1993). Nous savons également que les microvésicules sécrétées par les cellules invasives, contiennent le complexe majeur d'histocompatibilité CMH-I (Dolo et al., 1998; Muralidharan-Chari, Clancy, et al., 2009). Aucun rôle à ce jour n'est attribué à ce phénomène. Le CMH-I permet la présentation de l'antigène aux lymphocytes T cytotoxiques, qui reconnaissent ainsi et détruisent les cellules cancéreuses. Serait-il possible que les cellules utilisent les microvésicules pour déjouer le système immunitaire en diminuant la présence de CMH-I à la membrane plasmique et qu'ARF1 soit la clef de ce mécanisme ? Il serait donc intéressant d'étudier l'effet des protéines ARF dans ce contexte. De plus, les Rho GTPases sont connues comme étant importantes pour la migration des leucocytes et des macrophages, de même que les protéines ARF sont connues pour contrôler l'activation des Rho GTPases (Biro, Munoz, & Weninger, 2014; G. E. Jones, Allen, & Ridley, 1998; Lewis-Saravalli et al., 2013; Schlienger et al., 2014). ARF6 est exprimée dans les monocytes et les lymphocytes (C. Z. Yang et al., 1998). En jouant sur l'expression des protéines ARF dans ces modèles cellulaires, on pourrait mieux comprendre le rôle direct de celles-ci dans le système immunitaire et les voies de signalisation mises en jeu.

Pour finir, afin d'approfondir le rôle des protéines ARF sur le système immunitaire, nous utiliserons deux approches *in vivo*. Nous commencerons en utilisant des cellules de souris 4T1 qui mime un cancer du sein humain de stade IV lorsqu'injectées dans un modèle murin classique de BALB/c. Ces cellules seront modulées à la baisse pour l'expression des ARF et on comparera la formation de tumeur primaire et le développement de métastases par rapport à l'injection de cellules 4T1 non modifiée. Ensuite, la deuxième approche consistera à refaire les mêmes expériences que

dans l'article de Oncotarget, mais cette fois-ci en injectant les cellules humaines cancéreuses dans un système immunitaire humain autologue (Manz, 2007; Schlienger et al., 2016). Pour nos expériences, nous avons besoin des cellules hématopoïétiques et progénitrices HSCP et nous effectuerons une demande éthique au CHU de l'hôpital Sainte-Justine (Montréal, Québec) de sang de cordon. Après avoir lysé les globules rouges contenu dans le sang (pour éviter les interférences au FACS), nous trierons les cellules. *In vivo*, les cellules seront isolées en les marquant à l'aide d'anticorps anti-CD34 couplé à des billes magnétiques. Nous confirmerons l'isolation de la population de cellules HSPC par FACS. Nous marquerons nos cellules pour CD34, CD38 et les cellules CD34+CD38- seront isolées et définies comme nos HSCP (Baum, Weissman, Tsukamoto, Buckle, & Peault, 1992; Hao, Thiemann, Petersen, Smogorzewska, & Crooks, 1996). La vitalité sera mesurée par bleu de trypan. Les souris NSG seront utilisées car celles-ci sont génétiquement très stables et complètement dépourvues de lymphocytes murins T, B et NK). Les souris NSG seront donc irradiées puis transplantées avec nos HSCP obtenu de sang de cordon humain. Les cellules souches hématopoïétiques et cellules progénitrices HSCP seront injectées dans la veine de la queue et donneront ainsi naissance à toutes les cellules de la lignée de sang humain et ce pour toute la durée de vie de la souris (Legrand et al., 2009; Manz, 2007). Après 16 semaines, un échantillon de sang sera prélevé et analysé par FACS pour vérifier la présence de HSPC dans le sang des souris. On inoculera ensuite nos cellules tumorales humaines, modifiées pour l'expression des ARF dans la veine de la queue ou dans la quatrième glande mammaire. Plusieurs semaines après, nous analyserons cette fois ci les tumeurs primaires et secondaire en présence d'un système immunitaire humain. Ainsi, nous aurons une représentation plus fidèle du rôle des ARF dans la relation tumeur/système immunitaire. Mieux comprendre le rôle exact des protéines ARF dans tous les aspects de l'immunité nous aidera dans le futur à créer de meilleurs outils thérapeutiques anti-cancer.

VI. 4. Rôle des protéines ARF dans la relation cancer/adipocytes

- Contexte et raisonnement :

Afin de poursuivre notre désir de compréhension sur les différents aspects de la relation tumeur/stroma, nous poursuivrons notre étude sur les adipocytes. Le tissu adipeux est le composant le plus abondant aux alentours des cellules cancéreuses mammaires (Carmichael, 2006). Il contient des adipocytes matures et des progéniteurs (des pré-adipocytes et des cellules souches du tissu adipeux). Jusqu'à récemment, ils ont été longtemps considérés comme un dépôt de stockage d'énergie. Maintenant, nous savons que les adipocytes agissent en tant que cellules endocrines en produisant des hormones, des facteurs de croissance et des cytokines dites adipokines (Calle & Kaaks, 2004; Dirat, Bochet, Escourrou, Valet, & Muller, 2010). Les adipocytes, comme les autres cellules stromales, promeuvent la croissance tumorale, l'invasion et la formation de métastase en sécrétant des cytokines, chimiokines et d'autres facteurs de croissance. Réciproquement, les cellules tumorales affectent le phénotype de ces cellules stromales (Park, Euhus, & Scherer, 2011). En effet, il a été démontré que les cellules tumorales humaines co-cultivées avec des adipocytes matures ont des capacités invasives supérieures, à la fois *in vitro* et *in vivo*. De plus, les adipocytes co-cultivés avec les cellules cancéreuses présentent un phénotype modifié, accompagné d'une délipidation et d'une diminution des marqueurs adipocytaires (Dirat et al., 2010). Il a notamment été démontré que les cellules de cancer du sein peuvent modifier le phénotype des adipocytes normaux, afin de promouvoir leur propre migration (Fujisaki et al., 2015). Après 7 jours, en présence directe de cellules MCF-7 ou de cellules MDA-MB-231, le nombre d'adipocytes avec une forme en fuseau est augmenté de manière significative (Fujisaki et al., 2015). Cet état est dit état activé, il est caractérisé par la surexpression des protéases telles que la MMP-11 et des cytokines pro-inflammatoire comme l'interleukine 6 (IL-6) et 1 β (Dirat et al., 2011). Les facteurs tels que, l'IL-1 sécrétée par les adipocytes rend la tumeur plus agressive et lorsque sécrétée par la tumeur rend les adipocytes plus différencié (Perrier, Caldefie-Chezet, & Vasson, 2009). Il se pourrait donc que les

shedding vésicules puissent elles aussi influencer, à leur façon, le phénotype des adipocytes. En effet, celles-ci contiennent de l'IL-1 β et du VEGF, deux facteurs importants pour la transformation des adipocytes normaux en adipocytes associés au cancer (MacKenzie et al., 2001; Mao et al., 2013; Perrier et al., 2009; Taraboletti et al., 2006). Nous savons déjà que les protéines ARF contrôlent la libération de ces structures (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006; Muralidharan-Chari, Clancy, et al., 2009; Schlienger et al., 2014). De plus, une étude récente a démontré que des vésicules sécrétoires, de plus petite taille que les microvésicules dérivées de tumeurs, les exosomes, peuvent jouer sur la différenciation des adipocytes pour contribuer ainsi à la progression tumorale (Cho, Park, Lim, & Lee, 2012). L'autre lien que nous pouvons faire avec les petites GTPases, c'est qu'il a été démontré que ces protéines peuvent réguler la sécrétion de facteurs que nous savons importants pour les adipocytes. En effet, la GTPase Rac3 dans les cellules MDA-MB-231 contrôle la sécrétion de l'interleukine-6 (Gest et al., 2013). Au laboratoire, nous avons démontré que la protéine ARF1, dans les MDA-MB-231, peut contrôler l'activité d'un autre isoforme de Rac, Rac1 (Lewis-Saravalli et al., 2013). Les protéines ARF pourraient donc contrôler la transformation des adipocytes normaux en adipocytes associés au cancer. Il serait donc intéressant d'examiner en détail le rôle des protéines ARF sur ce type cellulaire.

- *conception expérimentale :*

Bien que les interactions des cellules tumorales et stromales soient vraiment mutuelles, nous continuerons à nous intéresser à l'impact des cellules tumorales envers le stroma. Tout d'abord, nous vérifierons si la présence de milieux de culture provenant de cellules cancéreuses (MDA-MB-231 et MCF7), dont l'expression est modulée pour les ARF, peut jouer sur la différenciation des adipocytes. Les adipocytes humains matures, Had, achetés sur Cell Applications Inc, seront utilisés dans cette étude, plutôt que des pré-adipocytes car il a été démontré qu'ils sont des promoteurs de la croissance pour le carcinome du sein (Manabe, Toda, Miyazaki, & Sugihara, 2003). Les adipocytes seront cultivés dans la chambre inférieure de chambres de Boydens de 0.4 μ m (milipore), en présence ou non de 10⁵ cellules cancéreuses dans la chambre supérieure. Après 3 jours, nous examinerons le phénotype des adipocytes et nous calculerons le nombre et la taille

des gouttelettes lipidiques formées qui nous indiqueront un effet sur l'accumulation de lipides. Nous compterons ensuite, dans chacune des conditions, le nombre d'adipocytes normaux comparé au nombre d'adipocytes de type associés au cancer du sein. Un adipocyte normal perd plusieurs de ses facteurs pour devenir un adipocytes de type associés au cancer, notamment l'hormone sensible à la lipase (HSL), l'adipokine : adiponectin, la resistine, le facteur de transcription adipogène CEBP α (Bing & Trayhurn, 2008; Dirat et al., 2011). À l'inverse, un adipocyte modifié exprime d'avantage d'ARNm de MMP-11, de TNF α , d'IL-6 et 1 β (Dirat et al., 2011; Fujisaki et al., 2015). Après les 3 jours, nous extrairons les ARNm dans les surnageant des adipocytes cultivés seuls ou en présence de cellules tumorales du sein et l'expression des gènes sera analysée par qPCR. Nous doserons également la quantité protéique de ces facteurs sécrétés dans les surnageants, en utilisant la méthode d'Elisa (pour *enzyme-linked immunosorbent assay*). Pour compléter cette expérience, des adipocytes seront mis en co-culture indirecte avec les cellules cancéreuses dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de FBS. Pour cela 1,5 x 10⁵ adipocytes par puits de plaque à 6 puits, serontensemencés dans une matrice de collagen de type I. Après solidification, le milieux de cellules cancéreuses sera rajouté (Elsdale & Bard, 1972). Nous regarderons après 4 jours si l'expression des ARF, qui a été diminuée ou augmentée dans les MDA-MB-231 et MCF7 respectivement, peut influencer le nombre de colonies formées par les adipocytes. Cette expérience nous permettra ainsi de voir l'apparition d'un état activé chez les adipocytes cultivés.

Nous savons que les cellules cancéreuses transforment les adipocytes normaux, mais nous ne savons pas quelle est la différence d'influence entre des cellules invasives (MDA-MB-231) et non-invasives (MCF7). Pour déterminer si les microvésicules dérivées de cellules cancéreuses invasives jouent un rôle important dans ce système, nous traiterons cette fois-ci uniquement les adipocytes avec les microvésicules dérivées de tumeurs, pour chacune des conditions. Nous regarderons à quel point le phénotype des adipocytes matures est altéré par la présence de microvésicules et si la modulation des ARF a un impact. Nous testerons au préalable différentes concentrations de microvésicules en condition normale sur les adipocytes, pour trouver la condition optimum. Comme nous savons que le nombre de microvésicules sécrétées peut varier selon les conditions de cellules cancéreuses, le nombre de cellules cancéreuses sera notre

point de référence pour ajuster la quantité de microvésicules et non la quantité de protéine contenue dans celle-ci (Schlienger et al., 2014).

Nous nous attendons donc à ce que la modulation de l'expression d'ARF1 et/ou d'ARF6 affecte la nature des adipocytes en jouant sur les facteurs sécrétés, comme l'IL-1 et le VEGF. Nous ne pouvons pas savoir, à ce stade, si ce sera dépendant des microvésicules ou de l'ensemble des facteurs sécrétés. Si ce mécanisme dépend uniquement des microvésicules, il se pourrait fortement que la réponse sur les adipocytes soit différente selon la protéine modulée. En effet, ARF6 régule la sécrétion des microvésicules par la voie ERK/MLC alors que ARF1 régule la sécrétion via une autre voie, la voie Rho/MLC (Muralidharan-Chari, Clancy, et al., 2009; Schlienger et al., 2014). Si toutefois aucun effet ne serait trouvé sur les adipocytes, nous pourrions regarder la dernière relation des cellules cancéreuses avec le stroma, celle sur les fibroblastes. Pour finir, dans nos expériences, le point délicat sera de faire vivre en harmonie deux types cellulaires bien différents. Ces expériences nous apporteront des preuves supplémentaires du rôle crucial des protéines ARF dans la progression tumorales et mettrons en avant leur potentiel de cibles thérapeutiques.

Il ne faut pas oublier que les adipocytes ne sont pas seulement des cellules du stroma, mais c'est également un important constituant dans la moelle osseuse, une zone qui favorise fréquemment la progression des métastases du cancer du sein (Dirat et al., 2010). Notre prochaine perspective portera donc tout particulièrement sur cette zone.

VI. 5. Implication des protéines ARF dans le nichage des cellules souches

- Contexte et raisonnement:

De nombreuses tumeurs sont très hétérogènes et contiennent plusieurs types de cellules natives de l'organe hôte. L'hétérogénéité est communément retenue par les métastases tumorales. Les cellules tumorales ont donc un potentiel multi-différenciatif, caractéristique classique des cellules souches. De plus, elles utilisent également des voies similaires à celles des cellules souches hématopoïétiques et des cellules progénitrices

(HSPCs) pour coloniser la moelle et compétitionnent ainsi leur habitat naturel (Shiozawa & Taichman, 2012). C'est le cas des cellules cancéreuses du sein qui ont tendance à former des métastases et notamment des métastases osseuses (Coleman, 2002). L'hétérogénéité des tumeurs rend ainsi les approches thérapeutiques plus difficiles. En effet, en dehors des thérapies basées sur la chirurgie, les métastases osseuses sont incurables (Mundy, 2002). Il est donc important de comprendre comment les cellules cancéreuses utilisent et détournent leur environnement à leur insu.

Nous savons que la co-culture de cellules primaires cancéreuses du sein (MDA-MB-231 et MCF7) avec des cellules mésenchymateuses du stroma influence leur attraction aux cellules hématopoïétiques (Wobus et al., 2015). Cela permet aux cellules cancéreuses de faciliter leur colonisation, l'étape clé pour la formation de métastases, en prenant la place des cellules souches hématopoïétiques et des cellules progénitrices (HSCP pour *Human stem cell and progenitor*). De plus, nous savons que les protéines ARF ont un impact sur la formation des métastases. En utilisant un modèle métastatique basé sur l'injection de cellules via la veine caudale de la queue, nous avons démontré que la déplétion d'ARF1 peut prévenir de façon significative la formation de métastases aux poumons (Schlienger et al., 2016). De plus, nous avons démontré que la surexpression de cette petite GTPase ARF1 mais aussi ARF6, confèrent aux cellules cancéreuses non-invasives, MCF7, la capacité de former des métastases *in vivo* (Schlienger et al., 2016). Il serait donc intéressant de voir si la modulation de l'expression des protéines ARF, comme précédemment dans les cellules tumorales MDA-MB-231 et MCF7, serait suffisante pour rétablir ou interférer avec le nichage, « homing » des cellules souches.

- *conception expérimentale* :

Nous réaliserons cette étude dans un modèle *in vivo*. Le modèle de métastase osseuse traditionnel nécessite l'inoculation de MDA-MB-231 dans le ventricule cardiaque gauche de la souris immunodéficiente (Arguello, Baggs, & Frantz, 1988; Peyruchaud et al., 2001). Comme nous voulons regarder le nombre de cellules hématopoïétiques présentes, nous devons tout d'abord reconstruire un système immunitaire humain autologue (Manz, 2007). Pour nos expériences, nous avons besoin des cellules hématopoïétiques et progénitrices HSCP qui seront isolées comme dans la

partie VI. 3. Les souris NSG seront irradiées puis transplantées avec nos HSCP obtenus de sang de cordon dans la veine de la queue (Legrand et al., 2009; Manz, 2007). Après 16 semaines, on vérifiera la présence de HSPC dans le sang des souris. On utilisera des modèles stables de cellules invasives (MDA-MB-231) ou non-invasives (MCF7) qui respectivement sont déplétées ou surexpriment ARF1 ou ARF6. On inoculera ensuite nos cellules tumorales, modifiées pour l'expression des ARF, de façon intracardiaque (10^5 cells dans 0.1 ml de PBS). Plusieurs semaines après (minimum 4 semaines), pour s'assurer des lésions ostéolytiques, les souris seront anesthésiées puis soumises à des radiographies. Les souris seront ensuite euthanasiées. La moelle osseuse des fémurs (un des sites préférentiels des cellules souches) sera extraite, les globules rouge lysés et les cellules HSPC seront triées par FACS (Ema & Suda, 2012). Le pourcentage de HSPC contenu dans chaque souris permettra de déterminer si la variation d'expression des protéines ARF dans les cellules tumorales a affecté le nichage des cellules HSPC.

Dans le modèle *in vivo*, si l'on se fie à l'exemple où une des ARF est déplétée dans les cellules MDA-MB-231, nous nous attendons à ce que le nichage des cellules HSCP soit meilleur qu'en condition non déplétées. La limitation de cet essai se résume à la présence du système immunitaire humain qui interagit avec une tumeur humaine. Il se peut que le développement de métastases soit beaucoup plus long en raison des moyens de défense présents. Toutefois, grâce à l'utilisation de ce modèle beaucoup plus fidèle à celui retrouvé chez les patients réels, nous serons en mesure de mieux comprendre l'implication des protéines ARF dans la progression tumorale. Ces données plus réalistes nous aiderons, dans le futur, à développer de meilleures thérapies anti-cancéreuses.

VI. 6. Les protéines ARF comme outils de pronostic:

- *Contexte et raisonnement:*

Le cancer du sein, lorsqu'il reste uniquement *in situ* n'est pas dangereux en soit, car le sein n'est pas un organe vital. C'est l'apparition des métastases qui est associée au décès. On estime que 30% des patients atteints du cancer du sein développeront des

métastases. Les femmes sont les plus touchées. Chaque année, près de 1,3 million de nouveaux cas sont découverts dans le monde et 465 000 décès recensés (Canadian Breast Cancer Foundation, www.cancer.ca). Le taux de survie des patients avec des métastases est par conséquent fortement réduit. Les cellules du cancer du sein migrent le plus souvent par la voie lymphatique ; au moment du diagnostic 60% des cas présentent des métastases dans les ganglions lymphatiques. On les appelle, pour cette raison, les ganglions sentinelles (T. Kim, Giuliano, & Lyman, 2006). Suite à une lésion latérale du sein, on retrouvera le plus souvent des métastases dans les ganglions axillaires et supra claviculaires, une lésion médiane entrainera des métastases dans les ganglions mammaires internes, supra claviculaires et médiastinale (Meiers, Cil, Guller, & Zuber, 2013; Veronesi et al., 2003). Le statut des ganglions fournit ainsi des renseignements précieux au sujet du stade de développement de la tumeur, le pronostic et la décision de traitement. Il semble qu'une forte proportion de femmes qui présentent initialement un cancer localisé possèdent des métastases indétectables, qui progressent finalement à des tumeurs métastatiques mortelles (Lyman et al., 2014). Développer des biomarqueurs diagnostiques pour prédire la présence de métastases ganglionnaires est une stratégie prometteuse pour améliorer les méthodes de traitement et le taux de survie des patients. Il serait donc très intéressant d'étudier l'expression des protéines ARF dans les ganglions sentinelles pour déterminer sa pertinence pronostique sur la survie des patients atteints de cancer du sein.

Nous savons, d'après le site internet « Protéine Atlas » que la protéine ARF1 est détectée de façon modérée et ARF6 est détectée de façon faible dans les ganglions lymphatiques. Nos résultats préliminaires réalisés dans les ganglions lymphatiques associés avec l'apparition de métastases, démontrent également une forte présence de la protéine ARF1 (Figure VI-5). Il serait donc intéressant de comparer l'expression des GTPases ARF dans des ganglions sains versus associés à des métastases.

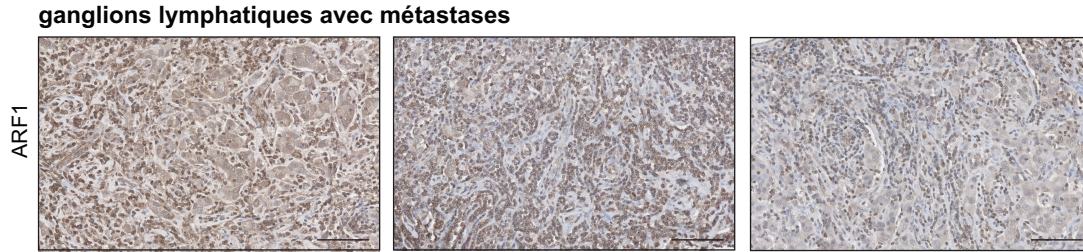


Figure VI-5: ARF1 est présente dans les ganglions lymphatiques qui ont des métastases.

Immunohistochimie de ganglions lymphatiques incubés avec un anticorps anti-ARF1. Les échantillons correspondent à des tissus de seins de différents patients provenant du même TMA que celui utilisé dans le chapitre IV. Bar d'échelle 100 μ m.

- *conception expérimentale :*

Les tissus de ganglions lymphatiques provenant de différentes biopsies de patients seront obtenus de la même façon que nos premiers TMA et ce, en collaboration avec le docteur Louis Gaboury (Schlienger et al., 2016). Les différents types de ganglions seront fixés à la formaline (10%) puis inclus dans la paraffine. Les TMA seront construits comme décrit précédemment (Yousef, Tahir, St-Pierre, & Gaboury, 2014). Pour l'immunohistochimie (IHC), les coupes de tissus seront marquées pour l'hématoxyline et eosine et pour les protéines ARF1 et ARF6. La notation de l'expression de la protéine ARF1 ou ARF6 sera réalisée en utilisant un système de notation à deux niveaux. Le premier paramètre correspond au pourcentage ou quantité de cellules immunoréactives et le deuxième correspond à l'intensité du marquage. Le score total de ces deux paramètres varie sur un échelle de 0 à 12 et représente le score d'IHC (Bai et al., 2004; Wolff et al., 2013).

Une partie des tissus sera également conservée pour analyser l'expression génique et protéique des GTPases ARF. Après homogénéisation des échantillons de tissus à l'aide de TRIzol, et digestion par la DNase, l'ARN total sera extrait. Il sera inversement transcrit, la PCR en temps réel sera réalisée par la plate-forme génomique de l'IRIC

(Université de Montréal, Montréal, Canada). Les analyses de protéines se feront par la méthode d'immunobuvardage de type Western.

D'après nos résultats récents, nous savons que ARF1 est exprimée plus fortement dans les cancers triples négatifs et a tendance à être plus exprimée dans les cancers HER2 positifs (Schlienger et al., 2016). Nous savons également que plus de 80% des patientes associées à ces deux sous types moléculaires de cancers du sein qui expriment ARF1, l'expriment avec une très forte expression (données non montrées). Dans ces essais, nous utiliserons, comme contrôle positif, plusieurs protéines telles que, HSP70 (pour *Heat shock protein 70*), vimentine et moesine qui sont reconnues comme marqueurs prédictifs de métastases tout particulièrement dans les cancers du seins triples négatifs (Sun et al., 2008). Nous utiliserons également HER2, PAI1 (pour *plasminogen activator inhibitor 1*) et uPA (pour *urokinase-type plasminogen activator*) comme autres marqueurs prédictifs (Janicke et al., 2001; Look et al., 2002; Ross et al., 2003). Cela nous permettra de comparer l'expression des protéines ARF avec les marqueurs connus, déjà utilisés dans le pronostique de survie des patients atteints du cancer du sein.

Pour finir et renforcer le rôle d'ARF1 comme outils de pronostics, on étudiera également si il existe une corrélation entre ARF1 et les marqueurs conventionnels d'agressivité au sein même des tumeurs primaires. Nous savons déjà que l'expression de MMP-9 est liée à celle d'ARF1 chez les patientes atteintes du cancer du sein (données non montrées). Nous savons également dans ces même patients que plus l'expression de MMP-9 est élevée et moins la survie est bonne en étant associée à plus de récidives (Yousef et al., 2014). Nous assumons donc retrouver un profil de survie et de récidive assez identique à celui de MMP-9 avec ARF1. De plus, comme on retrouve dans 60% des cas de cancer triples négatifs une mutation du gène BRCA1, des mutations de p53, une surexpression de l'EGFR et de Ki-67, il sera intéressant de confirmer si il existe une corrélation de l'expression d'ARF1 avec ces marqueurs (Cleator et al., 2007).

Nous nous attendons à ce que les patients, qui présentent des métastases, possèdent une expression plus forte des protéines ARF dans leurs ganglions. Toutefois, nous nous attendons à ce type de résultats pour ARF1, uniquement pour les patients triple négatifs ou HER2+, en raison de la corrélation observée dans le chapitre IV. Ultiment,

ARF1 ou ARF6 pourrait donc être utilisée comme caractéristique au moment du diagnostic pour estimer le risque de formation de métastases dans certains sous types de cancer du sein, en l'absence de traitement.

Références

- Abram, C. L., Seals, D. F., Pass, I., Salinsky, D., Maurer, L., Roth, T. M., & Courtneidge, S. A. (2003). The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. *J Biol Chem*, 278(19), 16844-16851. doi:10.1074/jbc.M300267200
- Adjei, A. A., & Hidalgo, M. (2005). Treating cancer by blocking cell signals. *{Friedl, 2000 #4314}J Clin Oncol*, 23(23), 5279-5280. doi:10.1200/JCO.2005.07.001
- Ager, E. I., Neo, J., & Christophi, C. (2008). The renin-angiotensin system and malignancy. *Carcinogenesis*, 29(9), 1675-1684. doi:10.1093/carcin/bgn171
- Ahmed, N., Maines-Bandiera, S., Quinn, M. A., Unger, W. G., Dedhar, S., & Auersperg, N. (2006). Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290(6), C1532-1542. doi:10.1152/ajpcell.00478.2005
- Al-Awar, O., Radhakrishna, H., Powell, N. N., & Donaldson, J. G. (2000). Separation of membrane trafficking and actin remodeling functions of ARF6 with an effector domain mutant. *Mol Cell Biol*, 20(16), 5998-6007. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10913182>
- Al-Mehdi, A. B., Tozawa, K., Fisher, A. B., Shientag, L., Lee, A., & Muschel, R. J. (2000). Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med*, 6(1), 100-102. doi:10.1038/71429
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., Kerbel, R. S., Allison, A. C., & Rak, J. (2009). Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(10), 3794-3799. doi:10.1073/pnas.0804543106
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., & Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol*, 10(5), 619-624. doi:10.1038/ncb1725
- Albiges-Rizo, C., Destaing, O., Fourcade, B., Planus, E., & Block, M. R. (2009). Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *J Cell Sci*, 122(Pt 17), 3037-3049. doi:10.1242/jcs.052704
- Alexander, N. R., Branch, K. M., Parekh, A., Clark, E. S., Iwueke, I. C., Guelcher, S. A., & Weaver, A. M. (2008). Extracellular matrix rigidity promotes invadopodia activity. *Curr Biol*, 18(17), 1295-1299. doi:10.1016/j.cub.2008.07.090
- Amano, M., Nakayama, M., & Kaibuchi, K. (2010). Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 67(9), 545-554. doi:10.1002/cm.20472
- Ames, B. N. (1979). Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science*, 204(4393), 587-593. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/373122>
- Amor, J. C., Harrison, D. H., Kahn, R. A., & Ringe, D. (1994). Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. *Nature*, 372(6507), 704-708. doi:10.1038/372704a0

- Andreu, P., Johansson, M., Affara, N. I., Pucci, F., Tan, T., Junankar, S., . . . Coussens, L. M. (2010). FcRgamma activation regulates inflammation-associated squamous carcinogenesis. *Cancer Cell*, *17*(2), 121-134. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.019
- Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P., & Chabre, M. (1997). N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry*, *36*(15), 4675-4684. doi:10.1021/bi962252b
- Arboleda, M. J., Lyons, J. F., Kabbinavar, F. F., Bray, M. R., Snow, B. E., Ayala, R., . . . Slamon, D. J. (2003). Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res*, *63*(1), 196-206. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517798>
- Arguello, F., Baggs, R. B., & Frantz, C. N. (1988). A murine model of experimental metastasis to bone and bone marrow. *Cancer Res*, *48*(23), 6876-6881. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3180096>
- Arteaga, C. L. (2002). Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist*, *7 Suppl 4*, 31-39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12202786>
- Arteaga, C. L., Hurd, S. D., Winnier, A. R., Johnson, M. D., Fendly, B. M., & Forbes, J. T. (1993). Anti-transforming growth factor (TGF)-beta antibodies inhibit breast cancer cell tumorigenicity and increase mouse spleen natural killer cell activity. Implications for a possible role of tumor cell/host TGF-beta interactions in human breast cancer progression. *J Clin Invest*, *92*(6), 2569-2576. doi:10.1172/JCI116871
- Avizienyte, E., Fincham, V. J., Brunton, V. G., & Frame, M. C. (2004). Src SH3/2 domain-mediated peripheral accumulation of Src and phospho-myosin is linked to deregulation of E-cadherin and the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell*, *15*(6), 2794-2803. doi:10.1091/mbc.E03-12-0879
- Ayala, I., Baldassarre, M., Caldieri, G., & Buccione, R. (2006). Invadopodia: a guided tour. *Eur J Cell Biol*, *85*(3-4), 159-164. doi:10.1016/j.ejcb.2005.09.005
- Badve, S., Dabbs, D. J., Schnitt, S. J., Baehner, F. L., Decker, T., Eusebi, V., . . . 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. *Mod Pathol*, *24*(2), 157-167. doi:10.1038/modpathol.2010.200
- Bai, X. F., Ni, X. G., Zhao, P., Liu, S. M., Wang, H. X., Guo, B., . . . Zhao, X. H. (2004). Overexpression of annexin 1 in pancreatic cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol*, *10*(10), 1466-1470. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15133855>
- Baj-Krzyworzeka, M., Szatanek, R., Weglarczyk, K., Baran, J., Urbanowicz, B., Branski, P., . . . Zembala, M. (2006). Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol Immunother*, *55*(7), 808-818. doi:10.1007/s00262-005-0075-9
- Baker, N. M., & Der, C. J. (2013). Cancer: Drug for an 'undruggable' protein. *Nature*, *497*(7451), 577-578. doi:10.1038/nature12248

- Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Rivelino, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., . . . Geiger, B. (2001). Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol*, 3(5), 466-472. doi:10.1038/35074532
- Balbin, M., Fueyo, A., Tester, A. M., Pendas, A. M., Pitiot, A. S., Astudillo, A., . . . Lopez-Otin, C. (2003). Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nat Genet*, 35(3), 252-257. doi:10.1038/ng1249
- Bani, M. R., Nicoletti, M. I., Alkharouf, N. W., Ghilardi, C., Petersen, D., Erba, E., . . . Giavazzi, R. (2004). Gene expression correlating with response to paclitaxel in ovarian carcinoma xenografts. *Mol Cancer Ther*, 3(2), 111-121. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14985451>
- Barber, T., Esteban-Pretel, G., Marin, M. P., & Timoneda, J. (2014). Vitamin a deficiency and alterations in the extracellular matrix. *Nutrients*, 6(11), 4984-5017. doi:10.3390/nu6114984
- Barrett, J. C. (2000). Molecular and environmental causes of cancer. *Drug Metab Rev*, 32(2), 139-142. doi:10.1081/DMR-100100567
- Bauer, K. R., Brown, M., Cress, R. D., Parise, C. A., & 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(9), 1721-1728. doi:10.1002/cncr.22618
- Bauer, T. M., Patel, M. R., & Infante, J. R. (2015). Targeting PI3 kinase in cancer. *Pharmacol Ther*, 146, 53-60. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.09.006
- Baum, C. M., Weissman, I. L., Tsukamoto, A. S., Buckle, A. M., & Peault, B. (1992). Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(7), 2804-2808. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1372992>
- Bax, N. A., Pijnappels, D. A., van Oorschot, A. A., Winter, E. M., de Vries, A. A., van Tuyn, J., . . . Gittenberger-de Groot, A. C. (2011). Epithelial-to-mesenchymal transformation alters electrical conductivity of human epicardial cells. *J Cell Mol Med*, 15(12), 2675-2683. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01266.x
- Beck, R., Sun, Z., Adolf, F., Rutz, C., Bassler, J., Wild, K., . . . Wieland, F. (2008). Membrane curvature induced by Arf1-GTP is essential for vesicle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(33), 11731-11736. doi:10.1073/pnas.0805182105
- Bellone, S., Frera, G., Landolfi, G., Romani, C., Bandiera, E., Tognon, G., . . . Santin, A. D. (2007). Overexpression of epidermal growth factor type-1 receptor (EGF-R1) in cervical cancer: implications for Cetuximab-mediated therapy in recurrent/metastatic disease. *Gynecol Oncol*, 106(3), 513-520. doi:10.1016/j.ygyno.2007.04.028
- Bergers, G., & Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, 3(6), 401-410. doi:10.1038/nrc1093
- Bernard, O. (2007). Lim kinases, regulators of actin dynamics. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(6), 1071-1076. doi:10.1016/j.biocel.2006.11.011
- Besterman, J. M., & Low, R. B. (1983). Endocytosis: a review of mechanisms and plasma membrane dynamics. *Biochem J*, 210(1), 1-13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6342614>

- Bhargava, R., Gerald, W. L., Li, A. R., Pan, Q., Lal, P., Ladanyi, M., & Chen, B. (2005). EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Mod Pathol*, *18*(8), 1027-1033. doi:10.1038/modpathol.3800438
- Bianco, F., Pravettoni, E., Colombo, A., Schenk, U., Moller, T., Matteoli, M., & Verderio, C. (2005). Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. *J Immunol*, *174*(11), 7268-7277. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15905573>
- Bill, A., Schmitz, A., Albertoni, B., Song, J. N., Heukamp, L. C., Walrafen, D., . . . Famulok, M. (2010). Cytohesins are cytoplasmic ErbB receptor activators. *Cell*, *143*(2), 201-211. doi:10.1016/j.cell.2010.09.011
- Billottet, C., Tuefferd, M., Gentien, D., Rapinat, A., Thiery, J. P., Broet, P., & Jouanneau, J. (2008). Modulation of several waves of gene expression during FGF-1 induced epithelial-mesenchymal transition of carcinoma cells. *J Cell Biochem*, *104*(3), 826-839. doi:10.1002/jcb.21667
- Bing, C., & Trayhurn, P. (2008). Regulation of adipose tissue metabolism in cancer cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, *11*(3), 201-207. doi:10.1097/MCO.0b013e3282f948e2
- Biro, M., Munoz, M. A., & Weninger, W. (2014). Targeting Rho-GTPases in immune cell migration and inflammation. *Br J Pharmacol*, *171*(24), 5491-5506. doi:10.1111/bph.12658
- Bissell, M. J., Weaver, V. M., Lelievre, S. A., Wang, F., Petersen, O. W., & Schmeichel, K. L. (1999). Tissue structure, nuclear organization, and gene expression in normal and malignant breast. *Cancer Res*, *59*(7 Suppl), 1757-1763s; discussion 1763s-1764s. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10197593>
- Bjorge, J. D., Pang, A. S., Funnell, M., Chen, K. Y., Diaz, R., Magliocco, A. M., & Fujita, D. J. (2011). Simultaneous siRNA targeting of Src and downstream signaling molecules inhibit tumor formation and metastasis of a human model breast cancer cell line. *PLoS One*, *6*(4), e19309. doi:10.1371/journal.pone.0019309
- Blume-Jensen, P., & Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, *411*(6835), 355-365. doi:10.1038/35077225
- Bonifacino, J. S. (2004). The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *5*(1), 23-32. doi:10.1038/nrm1279
- Bonifacino, J. S., & Traub, L. M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem*, *72*, 395-447. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161800
- Boshans, R. L., Szanto, S., van Aelst, L., & D'Souza-Schorey, C. (2000). ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA. *Mol Cell Biol*, *20*(10), 3685-3694. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10779358>
- Boulay, P. L., Cotton, M., Melancon, P., & Claing, A. (2008). ADP-ribosylation factor 1 controls the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway to regulate epidermal growth factor-dependent growth and migration of breast cancer cells. *J Biol Chem*, *283*(52), 36425-36434. doi:10.1074/jbc.M803603200

- Boulay, P. L., Schlienger, S., Lewis-Saravalli, S., Vitale, N., Ferbeyre, G., & Claing, A. (2011). ARF1 controls proliferation of breast cancer cells by regulating the retinoblastoma protein. *Oncogene*, *30*(36), 3846-3861. doi:10.1038/onc.2011.100
- Bouzahzah, B., Albanese, C., Ahmed, F., Pixley, F., Lisanti, M. P., Segall, J. D., . . . Pestell, R. G. (2001). Rho family GTPases regulate mammary epithelium cell growth and metastasis through distinguishable pathways. *Mol Med*, *7*(12), 816-830. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11844870>
- Brabender, J., Danenberg, K. D., Metzger, R., Schneider, P. M., Park, J., Salonga, D., . . . Danenberg, P. V. (2001). Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer Is correlated with survival. *Clin Cancer Res*, *7*(7), 1850-1855. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11448895>
- Brand, S., Norcross, N. R., Thompson, S., Harrison, J. R., Smith, V. C., Robinson, D. A., . . . Read, K. D. (2014). Lead optimization of a pyrazole sulfonamide series of Trypanosoma brucei N-myristoyltransferase inhibitors: identification and evaluation of CNS penetrant compounds as potential treatments for stage 2 human African trypanosomiasis. *J Med Chem*, *57*(23), 9855-9869. doi:10.1021/jm500809c
- Bravo-Cordero, J. J., Oser, M., Chen, X., Eddy, R., Hodgson, L., & Condeelis, J. (2011). A novel spatiotemporal RhoC activation pathway locally regulates cofilin activity at invadopodia. *Curr Biol*, *21*(8), 635-644. doi:10.1016/j.cub.2011.03.039
- Brigati, C., Noonan, D. M., Albin, A., & Benelli, R. (2002). Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? *Clin Exp Metastasis*, *19*(3), 247-258. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12067205>
- Briscoe, J., & Therond, P. P. (2013). The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *14*(7), 416-429. doi:10.1038/nrm3598
- Brouty-Boye, D. (2005). Developmental biology of fibroblasts and neoplastic disease. *Prog Mol Subcell Biol*, *40*, 55-77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17153480>
- Brown, F. D., Rozelle, A. L., Yin, H. L., Balla, T., & Donaldson, J. G. (2001). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J Cell Biol*, *154*(5), 1007-1017. doi:10.1083/jcb.200103107
- Brown, M. C., Cary, L. A., Jamieson, J. S., Cooper, J. A., & Turner, C. E. (2005). Src and FAK kinases cooperate to phosphorylate paxillin kinase linker, stimulate its focal adhesion localization, and regulate cell spreading and protrusiveness. *Mol Biol Cell*, *16*(9), 4316-4328. doi:10.1091/mbc.E05-02-0131
- Brown, M. T., Andrade, J., Radhakrishna, H., Donaldson, J. G., Cooper, J. A., & Randazzo, P. A. (1998). ASAP1, a phospholipid-dependent arf GTPase-activating protein that associates with and is phosphorylated by Src. *Mol Cell Biol*, *18*(12), 7038-7051. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9819391>
- Brufsky, A. M., Hurvitz, S., Perez, E., Swamy, R., Valero, V., O'Neill, V., & 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. *J Clin Oncol*, 29(32), 4286-4293. doi:10.1200/JCO.2010.34.1255
- Buccione, R., Orth, J. D., & McNiven, M. A. (2004). Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(8), 647-657. doi:10.1038/nrm1436
- Burbelo, P., Wellstein, A., & Pestell, R. G. (2004). Altered Rho GTPase signaling pathways in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 84(1), 43-48. doi:10.1023/B:BREA.0000018422.02237.f9
- Burdak-Rothkamm, S., & Prise, K. M. (2009). New molecular targets in radiotherapy: DNA damage signalling and repair in targeted and non-targeted cells. *Eur J Pharmacol*, 625(1-3), 151-155. doi:10.1016/j.ejphar.2009.09.068
- Burness, M. L., Grushko, T. A., & Olopade, O. I. (2010). Epidermal growth factor receptor in triple-negative and basal-like breast cancer: promising clinical target or only a marker? *Cancer J*, 16(1), 23-32. doi:10.1097/PPO.0b013e3181d24fc1
- Burtness, B. (2007). Her signaling in pancreatic cancer. *Expert Opin Biol Ther*, 7(6), 823-829. doi:10.1517/14712598.7.6.823
- Byford, J. R., Shaw, L. E., Drew, M. G., Pope, G. S., Sauer, M. J., & Darbre, P. D. (2002). Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 80(1), 49-60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11867263>
- Cain, R. J., & Ridley, A. J. (2009). Phosphoinositide 3-kinases in cell migration. *Biol Cell*, 101(1), 13-29. doi:10.1042/BC20080079
- Calle, E. E., & Kaaks, R. (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 4(8), 579-591. doi:10.1038/nrc1408
- Cameron, A. J., & Parker, P. J. (2010). Protein kinase C - a family of protein kinases, allosteric effectors or both? *Adv Enzyme Regul*, 50(1), 169-177. doi:10.1016/j.advenzreg.2009.10.004
- Cantley, L. C., & Neel, B. G. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(8), 4240-4245. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10200246>
- Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., . . . Millikan, R. C. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 295(21), 2492-2502. doi:10.1001/jama.295.21.2492
- Carmichael, A. R. (2006). Obesity and prognosis of breast cancer. *Obes Rev*, 7(4), 333-340. doi:10.1111/j.1467-789X.2006.00261.x
- Castellano, E., & Downward, J. (2010). Role of RAS in the regulation of PI 3-kinase. *Curr Top Microbiol Immunol*, 346, 143-169. doi:10.1007/82_2010_56
- Cauwe, B., Van den Steen, P. E., & Opdenakker, G. (2007). The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 42(3), 113-185. doi:10.1080/10409230701340019
- Cavaillon, J. M. (1994). Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother*, 48(10), 445-453. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7858154>

- Cavallaro, U., & Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*, 4(2), 118-132. doi:10.1038/nrc1276
- Chabottaux, V., Sounni, N. E., Pennington, C. J., English, W. R., van den Brule, F., Blacher, S., . . . Noel, A. (2006). Membrane-type 4 matrix metalloproteinase promotes breast cancer growth and metastases. *Cancer Res*, 66(10), 5165-5172. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3012
- Chaffer, C. L., Thompson, E. W., & Williams, E. D. (2007). Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs*, 185(1-3), 7-19. doi:10.1159/000101298
- Chambers, A. F., Groom, A. C., & MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2(8), 563-572. doi:10.1038/nrc865
- Chan, H. W., Smith, N. J., Hannan, R. D., & Thomas, W. G. (2006). Tackling the EGFR in pathological tissue remodelling. *Pulm Pharmacol Ther*, 19(1), 74-78. doi:10.1016/j.pupt.2005.04.005
- Chanrion, M., Fontaine, H., Rodriguez, C., Negre, V., Bibeau, F., Theillet, C., . . . 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. doi:10.1186/1471-2407-7-39
- Chardin, P., & McCormick, F. (1999). Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. *Cell*, 97(2), 153-155. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10219235>
- Chardin, P., Paris, S., Antonny, B., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Jackson, C. L., & Chabre, M. (1996). A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature*, 384(6608), 481-484. doi:10.1038/384481a0
- Chatenay-Rivauday, C., Yamodo, I., Sciotti, M. A., Troffer-Charlier, N., Klein, J. P., & Ogier, J. A. (2000). TNF-alpha release by monocytic THP-1 cells through cross-linking of the extended V-region of the oral streptococcal protein I/II. *J Leukoc Biol*, 67(1), 81-89. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648001>
- Chavrier, P., & Menetrey, J. (2010). Toward a structural understanding of arf family:effector specificity. *Structure*, 18(12), 1552-1558. doi:10.1016/j.str.2010.11.004
- Chen, H. C., Appeddu, P. A., Parsons, J. T., Hildebrand, J. D., Schaller, M. D., & Guan, J. L. (1995). Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J Biol Chem*, 270(28), 16995-16999. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7622520>
- Chen, J. L., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Stames, M. (2004). Cytosol-derived proteins are sufficient for Arp2/3 recruitment and ARF/coatomer-dependent actin polymerization on Golgi membranes. *FEBS Lett*, 566(1-3), 281-286. doi:10.1016/j.febslet.2004.04.061
- Chen, P., Xie, H., Sekar, M. C., Gupta, K., & Wells, A. (1994). Epidermal growth factor receptor-mediated cell motility: phospholipase C activity is required, but mitogen-activated protein kinase activity is not sufficient for induced cell movement. *J*

- Cell Biol*, 127(3), 847-857. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7962064>
- Cherfils, J., Menetrey, J., Mathieu, M., Le Bras, G., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., . . . Chardin, P. (1998). Structure of the Sec7 domain of the Arf exchange factor ARNO. *Nature*, 392(6671), 101-105. doi:10.1038/32210
- Cherfils, J., & Zeghouf, M. (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev*, 93(1), 269-309. doi:10.1152/physrev.00003.2012
- Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J., & van Deursen, J. M. (2014). Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep*, 15(11), 1139-1153. doi:10.15252/embr.201439245
- Cho, J. A., Park, H., Lim, E. H., & Lee, K. W. (2012). Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. *Int J Oncol*, 40(1), 130-138. doi:10.3892/ijo.2011.1193
- Chu, C. T., Everiss, K. D., Wikstrand, C. J., Batra, S. K., Kung, H. J., & Bigner, D. D. (1997). Receptor dimerization is not a factor in the signalling activity of a transforming variant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII). *Biochem J*, 324 (Pt 3), 855-861. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9210410>
- Chun, J., Shapovalova, Z., Dejgaard, S. Y., Presley, J. F., & Melancon, P. (2008). Characterization of class I and II ADP-ribosylation factors (Arfs) in live cells: GDP-bound class II Arfs associate with the ER-Golgi intermediate compartment independently of GBF1. *Mol Biol Cell*, 19(8), 3488-3500. doi:10.1091/mbc.E08-04-0373
- Claing, A., Chen, W., Miller, W. E., Vitale, N., Moss, J., Premont, R. T., & Lefkowitz, R. J. (2001). beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *J Biol Chem*, 276(45), 42509-42513. doi:10.1074/jbc.M108399200
- Clark, E. A., Golub, T. R., Lander, E. S., & Hynes, R. O. (2000). Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature*, 406(6795), 532-535. doi:10.1038/35020106
- Clark, W. H., Jr., Elder, D. E., Guerry, D. t., Braitman, L. E., Trock, B. J., Schultz, D., . . . Halpern, A. C. (1989). Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst*, 81(24), 1893-1904. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2593166>
- Claude, A., Zhao, B. P., Kuziemy, C. E., Dahan, S., Berger, S. J., Yan, J. P., . . . Melancon, P. (1999). GBF1: A novel Golgi-associated BFA-resistant guanine nucleotide exchange factor that displays specificity for ADP-ribosylation factor 5. *J Cell Biol*, 146(1), 71-84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10402461>
- Cleator, S., Heller, W., & Coombes, R. C. (2007). Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncol*, 8(3), 235-244. doi:10.1016/S1470-2045(07)70074-8
- Clemente, C. G., Mihm, M. C., Jr., Bufalino, R., Zurrada, S., Collini, P., & Cascinelli, N. (1996). Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*, 77(7), 1303-1310. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19960401)77:7<1303::AID-CNCR12>3.0.CO;2-5

- Cocucci, E., Racchetti, G., & Meldolesi, J. (2009). Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*, *19*(2), 43-51. doi:10.1016/j.tcb.2008.11.003
- Cocucci, E., Racchetti, G., Podini, P., & Meldolesi, J. (2007). Enlargeosome traffic: exocytosis triggered by various signals is followed by endocytosis, membrane shedding or both. *Traffic*, *8*(6), 742-757. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00566.x
- Coffin, J. M., Varmus, H. E., Bishop, J. M., Essex, M., Hardy, W. D., Jr., Martin, G. S., . . . Vogt, P. K. (1981). Proposal for naming host cell-derived inserts in retrovirus genomes. *J Virol*, *40*(3), 953-957. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7321107>
- Cohen, D., Lane, B., Jin, T., Magi-Galluzzi, C., Finke, J., Rini, B. I., . . . Zhou, M. (2007). The prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in clear-cell renal cell carcinoma: a call for standardized methods for immunohistochemical evaluation. *Clin Genitourin Cancer*, *5*(4), 264-270. doi:10.3816/CGC.2007.n.002
- Cohen, D. W., Simak, R., Fair, W. R., Melamed, J., Scher, H. I., & Cordon-Cardo, C. (1994). Expression of transforming growth factor-alpha and the epidermal growth factor receptor in human prostate tissues. *J Urol*, *152*(6 Pt 1), 2120-2124. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7525998>
- Cohen, L. A., Honda, A., Varnai, P., Brown, F. D., Balla, T., & Donaldson, J. G. (2007). Active Arf6 recruits ARNO/cytohesin GEFs to the PM by binding their PH domains. *Mol Biol Cell*, *18*(6), 2244-2253. doi:10.1091/mbc.E06-11-0998
- Coleman, R. E. (2002). Future directions in the treatment and prevention of bone metastases. *Am J Clin Oncol*, *25*(6 Suppl 1), S32-38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12562049>
- Condeelis, J., Singer, R. H., & Segall, J. E. (2005). The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *21*, 695-718. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.122303.120306
- Corkery, B., Crown, J., Clynes, M., & O'Donovan, N. (2009). Epidermal growth factor receptor as a potential therapeutic target in triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*, *20*(5), 862-867. doi:10.1093/annonc/mdn710
- Cornillon, J., Campos, L., & Guyotat, D. (2003). [Focal adhesion kinase (FAK), a multifunctional protein]. *Med Sci (Paris)*, *19*(6-7), 743-752. doi:10.1051/medsci/20031967743
- Cotton, M., Boulay, P. L., Houndolo, T., Vitale, N., Pitcher, J. A., & Claing, A. (2007). Endogenous ARF6 interacts with Rac1 upon angiotensin II stimulation to regulate membrane ruffling and cell migration. *Mol Biol Cell*, *18*(2), 501-511. doi:10.1091/mbc.E06-06-0567
- Courtney, K. D., Corcoran, R. B., & Engelman, J. A. (2010). The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol*, *28*(6), 1075-1083. doi:10.1200/JCO.2009.25.3641
- Coussens, L. M., Fingleton, B., & Matrisian, L. M. (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*, *295*(5564), 2387-2392. doi:10.1126/science.1067100
- Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, *420*(6917), 860-867. doi:10.1038/nature01322

- Cox, R., Mason-Gamer, R. J., Jackson, C. L., & Segev, N. (2004). Phylogenetic analysis of Sec7-domain-containing Arf nucleotide exchangers. *Mol Biol Cell*, *15*(4), 1487-1505. doi:10.1091/mbc.E03-06-0443
- Creighton, C. J., Li, X., Landis, M., Dixon, J. M., Neumeister, V. M., Sjolund, A., . . . Chang, J. C. (2009). Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(33), 13820-13825. doi:10.1073/pnas.0905718106
- Criscitello, C., Azim, H. A., Jr., Schouten, P. C., Linn, S. C., & Sotiriou, C. (2012). Understanding the biology of triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*, *23 Suppl 6*, vi13-18. doi:10.1093/annonc/mds188
- Cukierman, E., Huber, I., Rotman, M., & Cassel, D. (1995). The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. *Science*, *270*(5244), 1999-2002. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8533093>
- Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., . . . Van Cutsem, E. (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, *351*(4), 337-345. doi:10.1056/NEJMoa033025
- D'Souza-Schorey, C., & Chavrier, P. (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *7*(5), 347-358. doi:10.1038/nrm1910
- D'Souza-Schorey, C., & Stahl, P. D. (1995). Myristoylation is required for the intracellular localization and endocytic function of ARF6. *Exp Cell Res*, *221*(1), 153-159. doi:10.1006/excr.1995.1362
- D'Souza-Schorey, C., van Donselaar, E., Hsu, V. W., Yang, C., Stahl, P. D., & Peters, P. J. (1998). ARF6 targets recycling vesicles to the plasma membrane: insights from an ultrastructural investigation. *J Cell Biol*, *140*(3), 603-616. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9456320>
- Daher, Z., Boulay, P. L., Desjardins, F., Gratton, J. P., & Claing, A. (2010). Vascular endothelial growth factor receptor-2 activates ADP-ribosylation factor 1 to promote endothelial nitric-oxide synthase activation and nitric oxide release from endothelial cells. *J Biol Chem*, *285*(32), 24591-24599. doi:10.1074/jbc.M110.115311
- Daher, Z., Noel, J., & Claing, A. (2008). Endothelin-1 promotes migration of endothelial cells through the activation of ARF6 and the regulation of FAK activity. *Cell Signal*, *20*(12), 2256-2265. doi:10.1016/j.cellsig.2008.08.021
- Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K., & Dockrell, D. H. (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*, *5*(1), e8668. doi:10.1371/journal.pone.0008668
- Dammann, R., Li, C., Yoon, J. H., Chin, P. L., Bates, S., & Pfeifer, G. P. (2000). Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet*, *25*(3), 315-319. doi:10.1038/77083
- Darbre, P. D., & Harvey, P. W. (2008). Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J Appl Toxicol*, *28*(5), 561-578. doi:10.1002/jat.1358

- Dascher, C., & Balch, W. E. (1994). Dominant inhibitory mutants of ARF1 block endoplasmic reticulum to Golgi transport and trigger disassembly of the Golgi apparatus. *J Biol Chem*, *269*(2), 1437-1448. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8288610>
- Dassonville, O., Formento, J. L., Francoual, M., Ramaioli, A., Santini, J., Schneider, M., . . . Milano, G. (1993). Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *J Clin Oncol*, *11*(10), 1873-1878. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8410112>
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., & Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, *91*(2), 231-241. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9346240>
- Daub, H., Wallasch, C., Lankenau, A., Herrlich, A., & Ullrich, A. (1997). Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J*, *16*(23), 7032-7044. doi:10.1093/emboj/16.23.7032
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., . . . Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, *417*(6892), 949-954. doi:10.1038/nature00766
- De Craene, B., & Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer*, *13*(2), 97-110. doi:10.1038/nrc3447
- de Cremoux, P., Zimmer, A., Calvo, F., Lanotte, M., Mercken, L., & Abita, J. P. (1991). Gs alpha availability to cholera toxin-catalysed ADP-ribosylation is decreased in membranes of retinoic acid-treated leukemic cell lines HL-60 and THP-1. A posttranslational effect. *Biochem Pharmacol*, *42*(11), 2141-2146. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1659820>
- Debnath, J., Mills, K. R., Collins, N. L., Reginato, M. J., Muthuswamy, S. K., & Brugge, J. S. (2002). The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. *Cell*, *111*(1), 29-40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12372298>
- Dell'Angelica, E. C. (2009). AP-3-dependent trafficking and disease: the first decade. *Curr Opin Cell Biol*, *21*(4), 552-559. doi:10.1016/j.ceb.2009.04.014
- Deryugina, E. I., & Quigley, J. P. (2006). Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, *25*(1), 9-34. doi:10.1007/s10555-006-7886-9
- Desgrosellier, J. S., & Chersesh, D. A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*, *10*(1), 9-22. doi:10.1038/nrc2748
- Devreotes, P., & Janetopoulos, C. (2003). Eukaryotic chemotaxis: distinctions between directional sensing and polarization. *J Biol Chem*, *278*(23), 20445-20448. doi:10.1074/jbc.R300010200
- Di Vizio, D., Kim, J., Hager, M. H., Morello, M., Yang, W., Lafargue, C. J., . . . Freeman, M. R. (2009). Oncosome formation in prostate cancer: association with a region of frequent chromosomal deletion in metastatic disease. *Cancer Res*, *69*(13), 5601-5609. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3860
- Dimri, M., Naramura, M., Duan, L., Chen, J., Ortega-Cava, C., Chen, G., . . . Band, H. (2007). Modeling breast cancer-associated c-Src and EGFR overexpression in human MECs: c-Src and EGFR cooperatively promote aberrant three-dimensional

- acinar structure and invasive behavior. *Cancer Res*, 67(9), 4164-4172.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2580
- Ding, M., Vitale, N., Tsai, S. C., Adamik, R., Moss, J., & Vaughan, M. (1996). Characterization of a GTPase-activating protein that stimulates GTP hydrolysis by both ADP-ribosylation factor (ARF) and ARF-like proteins. Comparison to the ARD1 gap domain. *J Biol Chem*, 271(39), 24005-24009. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8798635>
- Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., . . . Muller, C. (2011). Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res*, 71(7), 2455-2465.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3323
- Dirat, B., Bochet, L., Escourrou, G., Valet, P., & Muller, C. (2010). Unraveling the obesity and breast cancer links: a role for cancer-associated adipocytes? *Endocr Dev*, 19, 45-52. doi:10.1159/000316896
- Distler, J. H., Pisetsky, D. S., Huber, L. C., Kalden, J. R., Gay, S., & Distler, O. (2005). Microparticles as regulators of inflammation: novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*, 52(11), 3337-3348.
doi:10.1002/art.21350
- Dolo, V., Ginestra, A., Cassara, D., Violini, S., Lucania, G., Torrisi, M. R., . . . Vittorelli, M. L. (1998). Selective localization of matrix metalloproteinase 9, beta1 integrins, and human lymphocyte antigen class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells. *Cancer Res*, 58(19), 4468-4474. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9766680>
- Donaldson, J. G. (2003). Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J Biol Chem*, 278(43), 41573-41576.
doi:10.1074/jbc.R300026200
- Donaldson, J. G., & Honda, A. (2005). Localization and function of Arf family GTPases. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 4), 639-642. doi:10.1042/BST0330639
- Donaldson, J. G., & Jackson, C. L. (2000). Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr Opin Cell Biol*, 12(4), 475-482. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10873831>
- Donaldson, J. G., & Jackson, C. L. (2011). ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(6), 362-375. doi:10.1038/nrm3117
- Donaldson, J. G., Radhakrishna, H., & Peters, P. J. (1995). The ARF GTPases: defining roles in membrane traffic and organelle structure. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 60, 229-234. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8824395>
- Dormann, D., & Weijer, C. J. (2003). Chemotactic cell movement during development. *Curr Opin Genet Dev*, 13(4), 358-364. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12888008>
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3(1), 11-22. doi:10.1038/nrc969
- Dragovich, T., McCoy, S., Fenoglio-Preiser, C. M., Wang, J., Benedetti, J. K., Baker, A. F., . . . Abbruzzese, J. L. (2006). Phase II trial of erlotinib in gastroesophageal junction and gastric adenocarcinomas: SWOG 0127. *J Clin Oncol*, 24(30), 4922-4927. doi:10.1200/JCO.2006.07.1316

- Duan, L., Chen, G., Virmani, S., Ying, G., Raja, S. M., Chung, B. M., . . . Band, H. (2010). Distinct roles for Rho versus Rac/Cdc42 GTPases downstream of Vav2 in regulating mammary epithelial acinar architecture. *J Biol Chem*, *285*(2), 1555-1568. doi:10.1074/jbc.M109.057976
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, *3*(11), 991-998. doi:10.1038/ni1102-991
- Eades, G., Wolfson, B., Zhang, Y., Li, Q., Yao, Y., & Zhou, Q. (2015). lincRNA-RoR and miR-145 regulate invasion in triple-negative breast cancer via targeting ARF6. *Mol Cancer Res*, *13*(2), 330-338. doi:10.1158/1541-7786.MCR-14-0251
- Edwards, J., Traynor, P., Munro, A. F., Pirret, C. F., Dunne, B., & Bartlett, J. M. (2006). The role of HER1-HER4 and EGFRvIII in hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res*, *12*(1), 123-130. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1445
- Egeblad, M., & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, *2*(3), 161-174. doi:10.1038/nrc745
- Ekstrand, A. J., Sugawa, N., James, C. D., & Collins, V. P. (1992). Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(10), 4309-4313. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1584765>
- Elgert, K. D., Alleva, D. G., & Mullins, D. W. (1998). Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol*, *64*(3), 275-290. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9738653>
- Elsdale, T., & Bard, J. (1972). Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol*, *54*(3), 626-637. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4339818>
- Ema, H., & Suda, T. (2012). Two anatomically distinct niches regulate stem cell activity. *Blood*, *120*(11), 2174-2181. doi:10.1182/blood-2012-04-424507
- Engelbraaten, O., Vollan, H. K., & Borresen-Dale, A. L. (2013). Triple-negative breast cancer and the need for new therapeutic targets. *Am J Pathol*, *183*(4), 1064-1074. doi:10.1016/j.ajpath.2013.05.033
- Escobar, E., Rodriguez-Reyna, T. S., Arrieta, O., & Sotelo, J. (2004). Angiotensin II, cell proliferation and angiogenesis regulator: biologic and therapeutic implications in cancer. *Curr Vasc Pharmacol*, *2*(4), 385-399. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15320819>
- Fackler, M. J., McVeigh, M., Evron, E., Garrett, E., Mehrotra, J., Polyak, K., . . . Argani, P. (2003). DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2 and Twist in in situ and invasive lobular breast carcinoma. *Int J Cancer*, *107*(6), 970-975. doi:10.1002/ijc.11508
- Fialkow, P. J. (1974). The origin and development of human tumors studied with cell markers. *N Engl J Med*, *291*(1), 26-35. doi:10.1056/NEJM197407042910109
- Fidler, I. J. (2002). The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation*, *70*(9-10), 498-505. doi:10.1046/j.1432-0436.2002.700904.x
- Fingleton, B. (2008). MMPs as therapeutic targets--still a viable option? *Semin Cell Dev Biol*, *19*(1), 61-68. doi:10.1016/j.semcdb.2007.06.006

- Fisher, B., & Fisher, E. R. (1966). The interrelationship of hematogenous and lymphatic tumor cell dissemination: an experimental study. *Rev Inst Nac Cancerol (Mex)*, 19, 576-581. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5999885>
- Fisher, E. R., & Fisher, B. (1967). Recent observations on concepts of metastasis. *Arch Pathol*, 83(4), 321-324. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6022744>
- Flisiak, S., Zeeh, J. C., Guibert, B., Cherfils, J., & Zeghouf, M. (2008). An Arf1 GTPase mutant with different responses to GEF inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*, 377(1), 156-160. doi:10.1016/j.bbrc.2008.09.107
- Folkman, J. (1986). How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer Res*, 46(2), 467-473. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2416426>
- Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*, 29(6 Suppl 16), 15-18. doi:10.1053/sonc.2002.37263
- Franco, M., Boretto, J., Robineau, S., Monier, S., Goud, B., Chardin, P., & Chavrier, P. (1998). ARNO3, a Sec7-domain guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factor 1, is involved in the control of Golgi structure and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(17), 9926-9931. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9707577>
- Franco, M., Peters, P. J., Boretto, J., van Donselaar, E., Neri, A., D'Souza-Schorey, C., & Chavrier, P. (1999). EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization. *EMBO J*, 18(6), 1480-1491. doi:10.1093/emboj/18.6.1480
- Frearson, J. A., Brand, S., McElroy, S. P., Cleghorn, L. A., Smid, O., Stojanovski, L., . . . Wyatt, P. G. (2010). N-myristoyltransferase inhibitors as new leads to treat sleeping sickness. *Nature*, 464(7289), 728-732. doi:10.1038/nature08893
- Frederick, L., Wang, X. Y., Eley, G., & James, C. D. (2000). Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res*, 60(5), 1383-1387. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10728703>
- French, A. R., Tadaki, D. K., Niyogi, S. K., & Lauffenburger, D. A. (1995). Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly influenced by the pH sensitivity of the receptor/ligand interaction. *J Biol Chem*, 270(9), 4334-4340. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7876195>
- Freyssinet, J. M. (2003). Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost*, 1(7), 1655-1662. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871302>
- Friedl, P., & Bockler, E. B. (2000). The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci*, 57(1), 41-64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10949580>
- Fritz, G., Brachetti, C., Bahlmann, F., Schmidt, M., & Kaina, B. (2002). Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer*, 87(6), 635-644. doi:10.1038/sj.bjc.6600510
- Fritz, G., Just, I., & Kaina, B. (1999). Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer*, 81(5), 682-687. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10328216>

- Fucini, R. V., Chen, J. L., Sharma, C., Kessels, M. M., & Stamnes, M. (2002). Golgi vesicle proteins are linked to the assembly of an actin complex defined by mAbp1. *Mol Biol Cell*, *13*(2), 621-631. doi:10.1091/mbc.01-11-0547
- Fucini, R. V., Navarrete, A., Vadakkan, C., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Stamnes, M. (2000). Activated ADP-ribosylation factor assembles distinct pools of actin on golgi membranes. *J Biol Chem*, *275*(25), 18824-18829. doi:10.1074/jbc.M000024200
- Fujisaki, K., Fujimoto, H., Sangai, T., Nagashima, T., Sakakibara, M., Shiina, N., . . . Miyazaki, M. (2015). Cancer-mediated adipose reversion promotes cancer cell migration via IL-6 and MCP-1. *Breast Cancer Res Treat*, *150*(2), 255-263. doi:10.1007/s10549-015-3318-2
- Fujiwara, T., Oda, K., Yokota, S., Takatsuki, A., & Ikehara, Y. (1988). Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, *263*(34), 18545-18552. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3192548>
- Furman, C., Short, S. M., Subramanian, R. R., Zetter, B. R., & Roberts, T. M. (2002). DEF-1/ASAP1 is a GTPase-activating protein (GAP) for ARF1 that enhances cell motility through a GAP-dependent mechanism. *J Biol Chem*, *277*(10), 7962-7969. doi:10.1074/jbc.M109149200
- Futter, C. E., Pearse, A., Hewlett, L. J., & Hopkins, C. R. (1996). Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J Cell Biol*, *132*(6), 1011-1023. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8601581>
- Gajiwala, K. S. (2013). EGFR: tale of the C-terminal tail. *Protein Sci*, *22*(7), 995-999. doi:10.1002/pro.2283
- Galas, M. C., Helms, J. B., Vitale, N., Thierse, D., Aunis, D., & Bader, M. F. (1997). Regulated exocytosis in chromaffin cells. A potential role for a secretory granule-associated ARF6 protein. *J Biol Chem*, *272*(5), 2788-2793. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9006918>
- Gangadhara, S., Barrett-Lee, P., Nicholson, R. I., & Hiscox, S. (2012). Pro-metastatic tumor-stroma interactions in breast cancer. *Future Oncol*, *8*(11), 1427-1442. doi:10.2217/fon.12.134
- Garcia-Echeverria, C., & Sellers, W. R. (2008). Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene*, *27*(41), 5511-5526. doi:10.1038/onc.2008.246
- Garcia-Ranea, J. A., & Valencia, A. (1998). Distribution and functional diversification of the ras superfamily in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, *434*(3), 219-225. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9742927>
- Gee, J. M., & Knowlden, J. M. (2003). ADAM metalloproteases and EGFR signalling. *Breast Cancer Res*, *5*(5), 223-224. doi:10.1186/bcr637
- Gest, C., Joimel, U., Huang, L., Pritchard, L. L., Petit, A., Dulong, C., . . . Soria, C. (2013). Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *BMC Cancer*, *13*, 63. doi:10.1186/1471-2407-13-63

- Gillingham, A. K., & Munro, S. (2007). The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 579-611. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123209
- Ginestra, A., La Placa, M. D., Saladino, F., Cassara, D., Nagase, H., & Vittorelli, M. L. (1998). The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Anticancer Res*, 18(5A), 3433-3437. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9858920>
- Godi, A., Santone, I., Pertile, P., Devarajan, P., Stabach, P. R., Morrow, J. S., . . . De Matteis, M. A. (1998). ADP ribosylation factor regulates spectrin binding to the Golgi complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(15), 8607-8612. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9671725>
- Goley, E. D., & Welch, M. D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(10), 713-726. doi:10.1038/nrm2026
- Gonzalez, L., Agullo-Ortuno, M. T., Garcia-Martinez, J. M., Calcabrini, A., Gamallo, C., Palacios, J., . . . Martin-Perez, J. (2006). Role of c-Src in human MCF7 breast cancer cell tumorigenesis. *J Biol Chem*, 281(30), 20851-20864. doi:10.1074/jbc.M601570200
- Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 5(12), 953-964. doi:10.1038/nri1733
- Gorrin-Rivas, M. J., Arii, S., Furutani, M., Mizumoto, M., Mori, A., Hanaki, K., . . . Imamura, M. (2000). Mouse macrophage metalloelastase gene transfer into a murine melanoma suppresses primary tumor growth by halting angiogenesis. *Clin Cancer Res*, 6(5), 1647-1654. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10815882>
- Gschwind, A., Fischer, O. M., & Ullrich, A. (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 4(5), 361-370. doi:10.1038/nrc1360
- Gupta, G. P., & Massague, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127(4), 679-695. doi:10.1016/j.cell.2006.11.001
- Gutierrez-Fernandez, A., Inada, M., Balbin, M., Fueyo, A., Pitiot, A. S., Astudillo, A., . . . Puente, X. S. (2007). Increased inflammation delays wound healing in mice deficient in collagenase-2 (MMP-8). *FASEB J*, 21(10), 2580-2591. doi:10.1096/fj.06-7860com
- Hafner, M., Schmitz, A., Grune, I., Srivatsan, S. G., Paul, B., Kolanus, W., . . . Famulok, M. (2006). Inhibition of cytohesins by SecinH3 leads to hepatic insulin resistance. *Nature*, 444(7121), 941-944. doi:10.1038/nature05415
- Haigis, K. M., Kendall, K. R., Wang, Y., Cheung, A., Haigis, M. C., Glickman, J. N., . . . Jacks, T. (2008). Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nat Genet*, 40(5), 600-608. doi:10.1038/ng.115
- Haines, E., Saucier, C., & Claing, A. (2014). The adaptor proteins p66Shc and Grb2 regulate the activation of the GTPases ARF1 and ARF6 in invasive breast cancer cells. *J Biol Chem*, 289(9), 5687-5703. doi:10.1074/jbc.M113.516047
- Haines, E., Schlienger, S., & Claing, A. (2015). The small GTPase ADP-Ribosylation Factor 1 mediates the sensitivity of triple negative breast cancer cells to EGFR

- tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Biol Ther*, 0.
doi:10.1080/15384047.2015.1071737
- Hajdu, S. I. (2008). A note from history: scarcely remembered inventors of new terms in clinical and laboratory science. *Ann Clin Lab Sci*, 38(2), 174-176. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18469365>
- Hajdu, S. I. (2011a). A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*, 117(5), 1097-1102. doi:10.1002/cncr.25553
- Hajdu, S. I. (2011b). A note from history: landmarks in history of cancer, part 2. *Cancer*, 117(12), 2811-2820. doi:10.1002/cncr.25825
- Hajdu, S. I. (2012a). A note from history: landmarks in history of cancer, part 3. *Cancer*, 118(4), 1155-1168. doi:10.1002/cncr.26320
- Hajdu, S. I. (2012b). A note from history: landmarks in history of cancer, part 4. *Cancer*, 118(20), 4914-4928. doi:10.1002/cncr.27509
- Hakem, A., Sanchez-Sweetman, O., You-Ten, A., Duncan, G., Wakeham, A., Khokha, R., & Mak, T. W. (2005). RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis. *Genes Dev*, 19(17), 1974-1979. doi:10.1101/gad.1310805
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hao, Q. L., Thiemann, F. T., Petersen, D., Smogorzewska, E. M., & Crooks, G. M. (1996). Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population. *Blood*, 88(9), 3306-3313. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8896394>
- Hashimoto, S., Hashimoto, A., Yamada, A., Kojima, C., Yamamoto, H., Tsutsumi, T., . . . Sabe, H. (2004). A novel mode of action of an ArfGAP, AMAP2/PAG3/Papa lpha, in Arf6 function. *J Biol Chem*, 279(36), 37677-37684. doi:10.1074/jbc.M404196200
- Hashimoto, S., Onodera, Y., Hashimoto, A., Tanaka, M., Hamaguchi, M., Yamada, A., & Sabe, H. (2004). Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(17), 6647-6652. doi:10.1073/pnas.0401753101
- Haslekas, C., Breen, K., Pedersen, K. W., Johannessen, L. E., Stang, E., & Madhus, I. H. (2005). The inhibitory effect of ErbB2 on epidermal growth factor-induced formation of clathrin-coated pits correlates with retention of epidermal growth factor receptor-ErbB2 oligomeric complexes at the plasma membrane. *Mol Biol Cell*, 16(12), 5832-5842. doi:10.1091/mbc.E05-05-0456
- Hatzivassiliou, G., Haling, J. R., Chen, H., Song, K., Price, S., Heald, R., . . . Belvin, M. (2013). Mechanism of MEK inhibition determines efficacy in mutant KRAS-versus BRAF-driven cancers. *Nature*, 501(7466), 232-236. doi:10.1038/nature12441
- Hauck, C. R., Hsia, D. A., Ilic, D., & Schlaepfer, D. D. (2002). v-Src SH3-enhanced interaction with focal adhesion kinase at beta 1 integrin-containing invadopodia promotes cell invasion. *J Biol Chem*, 277(15), 12487-12490. doi:10.1074/jbc.C100760200
- Heasman, S. J., & Ridley, A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(9), 690-701. doi:10.1038/nrm2476

- Hegerfeldt, Y., Tusch, M., Brocker, E. B., & Friedl, P. (2002). Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res*, *62*(7), 2125-2130. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11929834>
- Heitz, F., Harter, P., Lueck, H. J., Fissler-Eckhoff, A., Lorenz-Salehi, F., Scheil-Bertram, S., . . . du Bois, A. (2009). Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancers exhibit an elevated risk and an earlier occurrence of cerebral metastases. *Eur J Cancer*, *45*(16), 2792-2798. doi:10.1016/j.ejca.2009.06.027
- Hemmi, H., & Breitman, T. R. (1985). Induction of functional differentiation of a human monocytic leukemia cell line (THP-1) by retinoic acid and cholera toxin. *Jpn J Cancer Res*, *76*(5), 345-351. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2989063>
- Hennessy, B. T., Gonzalez-Angulo, A. M., Stenke-Hale, K., Gilcrease, M. Z., Krishnamurthy, S., Lee, J. S., . . . Mills, G. B. (2009). Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res*, *69*(10), 4116-4124. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3441
- Herschkowitz, J. I., Simin, K., Weigman, V. J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., . . . Perou, C. M. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*, *8*(5), R76. doi:10.1186/gb-2007-8-5-r76
- Hervent, A. S., & De Keulenaer, G. W. (2012). Molecular mechanisms of cardiotoxicity induced by ErbB receptor inhibitor cancer therapeutics. *Int J Mol Sci*, *13*(10), 12268-12286. doi:10.3390/ijms131012268
- Hirst, J., Irving, C., & Borner, G. H. (2013). Adaptor protein complexes AP-4 and AP-5: new players in endosomal trafficking and progressive spastic paraplegia. *Traffic*, *14*(2), 153-164. doi:10.1111/tra.12028
- Hitt, R., Ciruelos, E., Amador, M. L., Benito, A., Sanchez, J. J., Ballestin, C., & Cortes-Funes, H. (2005). Prognostic value of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and p53 in advanced head and neck squamous cell carcinoma patients treated with induction chemotherapy. *Eur J Cancer*, *41*(3), 453-460. doi:10.1016/j.ejca.2004.10.014
- Ho, W. T., Exton, J. H., & Williger, B. T. (2003). Arfaptin 1 inhibits ADP-ribosylation factor-dependent matrix metalloproteinase-9 secretion induced by phorbol ester in HT 1080 fibrosarcoma cells. *FEBS Lett*, *537*(1-3), 91-95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12606037>
- Hoefen, R. J., & Berk, B. C. (2006). The multifunctional GIT family of proteins. *J Cell Sci*, *119*(Pt 8), 1469-1475. doi:10.1242/jcs.02925
- Hofmann, U. B., Westphal, J. R., Zendman, A. J., Becker, J. C., Ruiters, D. J., & van Muijen, G. N. (2000). Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression. *J Pathol*, *191*(3), 245-256. doi:10.1002/1096-9896(2000)9999:9999::AID-PATH632>3.0.CO;2-#
- Honda, A., Nogami, M., Yokozeiki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., . . . Kanaho, Y. (1999). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation.

- Cell*, 99(5), 521-532. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10589680>
- Hotary, K., Li, X. Y., Allen, E., Stevens, S. L., & Weiss, S. J. (2006). A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes Dev*, 20(19), 2673-2686. doi:10.1101/gad.1451806
- Hu, B., Shi, B., Jarzynka, M. J., Yiin, J. J., D'Souza-Schorey, C., & Cheng, S. Y. (2009). ADP-ribosylation factor 6 regulates glioma cell invasion through the IQ-domain GTPase-activating protein 1-Rac1-mediated pathway. *Cancer Res*, 69(3), 794-801. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2110
- Hu, Z., Fan, C., Oh, D. S., Marron, J. S., He, X., Qaqish, B. F., . . . Perou, C. M. (2006). The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*, 7, 96. doi:10.1186/1471-2164-7-96
- Huang, M., & Prendergast, G. C. (2006). RhoB in cancer suppression. *Histol Histopathol*, 21(2), 213-218. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16329046>
- Huang, R. Y., Guilford, P., & Thiery, J. P. (2012). Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci*, 125(Pt 19), 4417-4422. doi:10.1242/jcs.099697
- Hunyady, L., & Catt, K. J. (2006). Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol*, 20(5), 953-970. doi:10.1210/me.2004-0536
- Huston, J. S., & George, A. J. (2001). Engineered antibodies take center stage. *Hum Antibodies*, 10(3-4), 127-142. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11847424>
- Hutchinson, J. N., Jin, J., Cardiff, R. D., Woodgett, J. R., & Muller, W. J. (2004). Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. *Cancer Res*, 64(9), 3171-3178. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15126356>
- Huttenlocher, A., & Horwitz, A. R. (2011). Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(9), a005074. doi:10.1101/cshperspect.a005074
- Hynes, N. E., & Lane, H. A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 5(5), 341-354. doi:10.1038/nrc1609
- Ikeda, S., Ushio-Fukai, M., Zuo, L., Tojo, T., Dikalov, S., Patrushev, N. A., & Alexander, R. W. (2005). Novel role of ARF6 in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res*, 96(4), 467-475. doi:10.1161/01.RES.0000158286.51045.16
- Ikenouchi, J., & Umeda, M. (2010). FRMD4A regulates epithelial polarity by connecting Arf6 activation with the PAR complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(2), 748-753. doi:10.1073/pnas.0908423107
- Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., . . . Yamamoto, T. (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*, 377(6549), 539-544. doi:10.1038/377539a0
- Irby, R. B., & Yeatman, T. J. (2000). Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene*, 19(49), 5636-5642. doi:10.1038/sj.onc.1203912
- Ishizawar, R., & Parsons, S. J. (2004). c-Src and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell*, 6(3), 209-214. doi:10.1016/j.ccr.2004.09.001

- Italiani, P., & Boraschi, D. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol*, 5, 514. doi:10.3389/fimmu.2014.00514
- Itoh, M., Nelson, C. M., Myers, C. A., & Bissell, M. J. (2007). Rap1 integrates tissue polarity, lumen formation, and tumorigenic potential in human breast epithelial cells. *Cancer Res*, 67(10), 4759-4766. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4246
- Itoh, Y., & Nagase, H. (2002). Matrix metalloproteinases in cancer. *Essays Biochem*, 38, 21-36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12463159>
- Jackman, D., Pao, W., Riely, G. J., Engelman, J. A., Kris, M. G., Janne, P. A., . . . Miller, V. A. (2010). Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 28(2), 357-360. doi:10.1200/JCO.2009.24.7049
- Jackson, C. L., & Casanova, J. E. (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol*, 10(2), 60-67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10652516>
- Jackson, T. R., Brown, F. D., Nie, Z., Miura, K., Foroni, L., Sun, J., . . . Randazzo, P. A. (2000). ACAPs are arf6 GTPase-activating proteins that function in the cell periphery. *J Cell Biol*, 151(3), 627-638. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11062263>
- Jaffe, A. B., & Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, 247-269. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721
- Jang, S. Y., Jang, S. W., & Ko, J. (2012). Regulation of ADP-ribosylation factor 4 expression by small leucine zipper protein and involvement in breast cancer cell migration. *Cancer Lett*, 314(2), 185-197. doi:10.1016/j.canlet.2011.09.028
- Janicke, F., Prechtel, A., Thomssen, C., Harbeck, N., Meisner, C., Untch, M., . . . German, N. S. G. (2001). Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst*, 93(12), 913-920. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11416112>
- Jiang, L., Liu, X., Kolokythas, A., Yu, J., Wang, A., Heidbreder, C. E., . . . Zhou, X. (2010). Downregulation of the Rho GTPase signaling pathway is involved in the microRNA-138-mediated inhibition of cell migration and invasion in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 127(3), 505-512. doi:10.1002/ijc.25320
- Jones, D. H., Morris, J. B., Morgan, C. P., Kondo, H., Irvine, R. F., & Cockcroft, S. (2000). Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase directly interacts with ADP-ribosylation factor 1 and is responsible for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in the golgi compartment. *J Biol Chem*, 275(18), 13962-13966. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10747863>
- Jones, G. E., Allen, W. E., & Ridley, A. J. (1998). The Rho GTPases in macrophage motility and chemotaxis. *Cell Adhes Commun*, 6(2-3), 237-245. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9823474>
- Jost, M., Folgueras, A. R., Frerart, F., Pendas, A. M., Blacher, S., Houard, X., . . . Noel, A. (2006). Earlier onset of tumoral angiogenesis in matrix metalloproteinase-19-deficient mice. *Cancer Res*, 66(10), 5234-5241. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4315

- Jura, N., Endres, N. F., Engel, K., Deindl, S., Das, R., Lamers, M. H., . . . Kuriyan, J. (2009). Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell*, *137*(7), 1293-1307. doi:10.1016/j.cell.2009.04.025
- Kahn, R. A., & Gilman, A. G. (1984). Purification of a protein cofactor required for ADP-ribosylation of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase by cholera toxin. *J Biol Chem*, *259*(10), 6228-6234. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6327671>
- Kahn, R. A., & Gilman, A. G. (1986). The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *J Biol Chem*, *261*(17), 7906-7911. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3086320>
- Kahner, B. N., Dorsam, R. T., & Kunapuli, S. P. (2008). Role of P2Y receptor subtypes in platelet-derived microparticle generation. *Front Biosci*, *13*, 433-439. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981558>
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, *119*(6), 1420-1428. doi:10.1172/JCI39104
- Kao, J., Salari, K., Bocanegra, M., Choi, Y. L., Girard, L., Gandhi, J., . . . Pollack, J. R. (2009). Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS One*, *4*(7), e6146. doi:10.1371/journal.pone.0006146
- Karam, A. (2013). Update on breast cancer surgery approaches. *Curr Opin Obstet Gynecol*, *25*(1), 74-80. doi:10.1097/GCO.0b013e32835c03fa
- Karlsson, R., Pedersen, E. D., Wang, Z., & Brakebusch, C. (2009). Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, *1796*(2), 91-98. doi:10.1016/j.bbcan.2009.03.003
- Karn, T., Ruckhaberle, E., Hanker, L., Muller, V., Schmidt, M., Solbach, C., . . . Rody, A. (2011). Gene expression profiling of luminal B breast cancers reveals NHERF1 as a new marker of endocrine resistance. *Breast Cancer Res Treat*, *130*(2), 409-420. doi:10.1007/s10549-010-1333-x
- Katz, M., Amit, I., & Yarden, Y. (2007). Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta*, *1773*(8), 1161-1176. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.01.002
- Keely, P. J. (2011). Mechanisms by which the extracellular matrix and integrin signaling act to regulate the switch between tumor suppression and tumor promotion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, *16*(3), 205-219. doi:10.1007/s10911-011-9226-0
- Kelly, P. M., Davison, R. S., Bliss, E., & McGee, J. O. (1988). Macrophages in human breast disease: a quantitative immunohistochemical study. *Br J Cancer*, *57*(2), 174-177. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2833921>
- Kelly, T., Yan, Y., Osborne, R. L., Athota, A. B., Rozypal, T. L., Colclasure, J. C., & Chu, W. S. (1998). Proteolysis of extracellular matrix by invadopodia facilitates human breast cancer cell invasion and is mediated by matrix metalloproteinases. *Clin Exp Metastasis*, *16*(6), 501-512. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9872598>
- Kim, C. W., Lee, H. M., Lee, T. H., Kang, C., Kleinman, H. K., & Ghossein, Y. S. (2002). Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via

- sphingomyelin. *Cancer Res*, 62(21), 6312-6317. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414662>
- Kim, J. W., Wieckowski, E., Taylor, D. D., Reichert, T. E., Watkins, S., & Whiteside, T. L. (2005). Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res*, 11(3), 1010-1020. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15709166>
- Kim, S. W., Hayashi, M., Lo, J. F., Yang, Y., Yoo, J. S., & Lee, J. D. (2003). ADP-ribosylation factor 4 small GTPase mediates epidermal growth factor receptor-dependent phospholipase D2 activation. *J Biol Chem*, 278(4), 2661-2668. doi:10.1074/jbc.M205819200
- Kim, T., Giuliano, A. E., & Lyman, G. H. (2006). Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in early-stage breast carcinoma: a metaanalysis. *Cancer*, 106(1), 4-16. doi:10.1002/cncr.21568
- Kinoshita, R., Nam, J. M., Ito, Y. M., Hatanaka, K. C., Hashimoto, A., Handa, H., . . . Sabe, H. (2013). Co-overexpression of GEP100 and AMAP1 proteins correlates with rapid local recurrence after breast conservative therapy. *PLoS One*, 8(10), e76791. doi:10.1371/journal.pone.0076791
- Klein, C. A. (2009). Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*, 9(4), 302-312. doi:10.1038/nrc2627
- Kondo, Y., Hanai, A., Nakai, W., Katoh, Y., Nakayama, K., & Shin, H. W. (2012). ARF1 and ARF3 are required for the integrity of recycling endosomes and the recycling pathway. *Cell Struct Funct*, 37(2), 141-154. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22971977>
- Kourtidis, A., Ngok, S. P., & Anastasiadis, P. Z. (2013). p120 catenin: an essential regulator of cadherin stability, adhesion-induced signaling, and cancer progression. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 116, 409-432. doi:10.1016/B978-0-12-394311-8.00018-2
- Kovacic, J. C., Mercader, N., Torres, M., Boehm, M., & Fuster, V. (2012). Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition: from cardiovascular development to disease. *Circulation*, 125(14), 1795-1808. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.040352
- Krall, J. A., Beyer, E. M., & MacBeath, G. (2011). High- and low-affinity epidermal growth factor receptor-ligand interactions activate distinct signaling pathways. *PLoS One*, 6(1), e15945. doi:10.1371/journal.pone.0015945
- Krugmann, S., Anderson, K. E., Ridley, S. H., Risso, N., McGregor, A., Coadwell, J., . . . Hawkins, P. T. (2002). Identification of ARAP3, a novel PI3K effector regulating both Arf and Rho GTPases, by selective capture on phosphoinositide affinity matrices. *Mol Cell*, 9(1), 95-108. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11804589>
- Kume, A., Nishiura, H., Suda, J., & Suda, T. (1997). Focal adhesion kinase upregulated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor but not by interleukin-3 in differentiating myeloid cells. *Blood*, 89(9), 3434-3442. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9129051>

- Kurzrock, R., Gutterman, J. U., & Talpaz, M. (1988). The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*, *319*(15), 990-998. doi:10.1056/NEJM198810133191506
- Lal, H., Verma, S. K., Foster, D. M., Golden, H. B., Reneau, J. C., Watson, L. E., . . . Dostal, D. E. (2009). Integrins and proximal signaling mechanisms in cardiovascular disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*, *14*, 2307-2334. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273203>
- Lam, K., Carpenter, C. L., Ruderman, N. B., Friel, J. C., & Kelly, K. L. (1994). The phosphatidylinositol 3-kinase serine kinase phosphorylates IRS-1. Stimulation by insulin and inhibition by Wortmannin. *J Biol Chem*, *269*(32), 20648-20652. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8051164>
- Lauder, I., Aherne, W., Stewart, J., & Sainsbury, R. (1977). Macrophage infiltration of breast tumours: a prospective study. *J Clin Pathol*, *30*(6), 563-568. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/874114>
- Lauffenburger, D. A., & Horwitz, A. F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, *84*(3), 359-369. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608589>
- Learn, C. A., Hartzell, T. L., Wikstrand, C. J., Archer, G. E., Rich, J. N., Friedman, A. H., . . . Sampson, J. H. (2004). Resistance to tyrosine kinase inhibition by mutant epidermal growth factor receptor variant III contributes to the neoplastic phenotype of glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res*, *10*(9), 3216-3224. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15131063>
- Leek, R. D., & Harris, A. L. (2002). Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, *7*(2), 177-189. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12463738>
- Legrand, N., Ploss, A., Balling, R., Becker, P. D., Borsotti, C., Brezillon, N., . . . Ziegler, P. (2009). Humanized mice for modeling human infectious disease: challenges, progress, and outlook. *Cell Host Microbe*, *6*(1), 5-9. doi:10.1016/j.chom.2009.06.006
- Lehmann, U., Hasemeier, B., Romermann, D., Muller, M., Langer, F., & Kreipe, H. (2007). [Epigenetic inactivation of microRNA genes in mammary carcinoma]. *Verh Dtsch Ges Pathol*, *91*, 214-220. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18314617>
- Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, *141*(7), 1117-1134. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011
- Leong, H. S., Robertson, A. E., Stoletov, K., Leith, S. J., Chin, C. A., Chien, A. E., . . . Lewis, J. D. (2014). Invadopodia are required for cancer cell extravasation and are a therapeutic target for metastasis. *Cell Rep*, *8*(5), 1558-1570. doi:10.1016/j.celrep.2014.07.050
- Lewis-Saravalli, S., Campbell, S., & Claing, A. (2013). ARF1 controls Rac1 signaling to regulate migration of MDA-MB-231 invasive breast cancer cells. *Cell Signal*, *25*(9), 1813-1819. doi:10.1016/j.cellsig.2013.05.011
- Li, R., Hehlman, R., Sachs, R., & Duesberg, P. (2005). Chromosomal alterations cause the high rates and wide ranges of drug resistance in cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet*, *163*(1), 44-56. doi:10.1016/j.cancergencyto.2005.05.003

- Li, R., Martin, M. P., Liu, Y., Wang, B., Patel, R. A., Zhu, J. Y., . . . Sebti, S. M. (2012). Fragment-based and structure-guided discovery and optimization of Rho kinase inhibitors. *J Med Chem*, *55*(5), 2474-2478. doi:10.1021/jm201289r
- Li, Y., Sun, L., Zhang, Y., Wang, D., Wang, F., Liang, J., . . . Shang, Y. (2011). The histone modifications governing TFF1 transcription mediated by estrogen receptor. *J Biol Chem*, *286*(16), 13925-13936. doi:10.1074/jbc.M111.223198
- Lim, E., Vaillant, F., Wu, D., Forrest, N. C., Pal, B., Hart, A. H., . . . Lindeman, G. J. (2009). Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med*, *15*(8), 907-913. doi:10.1038/nm.2000
- Lim, J., & Thiery, J. P. (2012). Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development*, *139*(19), 3471-3486. doi:10.1242/dev.071209
- Lin, E. Y., Gouon-Evans, V., Nguyen, A. V., & Pollard, J. W. (2002). The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, *7*(2), 147-162. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12465600>
- Linder, S. (2007). The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol*, *17*(3), 107-117. doi:10.1016/j.tcb.2007.01.002
- Liotta, L. A., & Rao, C. N. (1986). Tumor invasion and metastasis. *Monogr Pathol*(27), 183-192. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3762553>
- Liu, M., Bi, F., Zhou, X., & Zheng, Y. (2012). Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications. *Trends Cell Biol*, *22*(7), 365-373. doi:10.1016/j.tcb.2012.04.004
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T. M., & Zhao, J. J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, *8*(8), 627-644. doi:10.1038/nrd2926
- Liu, Y., Loijens, J. C., Martin, K. H., Karginov, A. V., & Parsons, J. T. (2002). The association of ASAP1, an ADP ribosylation factor-GTPase activating protein, with focal adhesion kinase contributes to the process of focal adhesion assembly. *Mol Biol Cell*, *13*(6), 2147-2156. doi:10.1091/mbc.E02-01-0018
- Lombard, C., Saulnier, J., & Wallach, J. (2005). Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: a review. *Biochimie*, *87*(3-4), 265-272. doi:10.1016/j.biochi.2005.01.007
- Look, M. P., van Putten, W. L., Duffy, M. J., Harbeck, N., Christensen, I. J., Thomssen, C., . . . Foekens, J. A. (2002). Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, *94*(2), 116-128. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792750>
- LoRusso, P. M., Krishnamurthi, S. S., Rinehart, J. J., Nabell, L. M., Malburg, L., Chapman, P. B., . . . Ricart, A. D. (2010). Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral MAPK/ERK kinase inhibitor PD-0325901 in patients with advanced cancers. *Clin Cancer Res*, *16*(6), 1924-1937. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1883
- Lozano, E., Betson, M., & Braga, V. M. (2003). Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion. *Bioessays*, *25*(5), 452-463. doi:10.1002/bies.10262

- Lwin, K. Y., Zuccarini, O., Sloane, J. P., & Beverley, P. C. (1985). An immunohistological study of leukocyte localization in benign and malignant breast tissue. *Int J Cancer*, *36*(4), 433-438. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3930410>
- Lyman, G. H., Temin, S., Edge, S. B., Newman, L. A., Turner, R. R., Weaver, D. L., . . . American Society of Clinical Oncology Clinical, P. (2014). Sentinel lymph node biopsy for patients with early-stage breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*, *32*(13), 1365-1383. doi:10.1200/JCO.2013.54.1177
- Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., . . . Haber, D. A. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, *350*(21), 2129-2139. doi:10.1056/NEJMoa040938
- Macia, E., Chabre, M., & Franco, M. (2001). Specificities for the small G proteins ARF1 and ARF6 of the guanine nucleotide exchange factors ARNO and EFA6. *J Biol Chem*, *276*(27), 24925-24930. doi:10.1074/jbc.M103284200
- MacKenzie, A., Wilson, H. L., Kiss-Toth, E., Dower, S. K., North, R. A., & Surprenant, A. (2001). Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity*, *15*(5), 825-835. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11728343>
- Majid, S., Dar, A. A., Saini, S., Yamamura, S., Hirata, H., Tanaka, Y., . . . Dahiya, R. (2010). MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer*, *116*(24), 5637-5649. doi:10.1002/cncr.25488
- Malhotra, V., & Perry, M. C. (2003). Classical chemotherapy: mechanisms, toxicities and the therapeutic window. *Cancer Biol Ther*, *2*(4 Suppl 1), S2-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14508075>
- Manabe, Y., Toda, S., Miyazaki, K., & Sugihara, H. (2003). Mature adipocytes, but not preadipocytes, promote the growth of breast carcinoma cells in collagen gel matrix culture through cancer-stromal cell interactions. *J Pathol*, *201*(2), 221-228. doi:10.1002/path.1430
- Mangerich, A., & Burkle, A. (2011). How to kill tumor cells with inhibitors of poly(ADP-ribosylation). *Int J Cancer*, *128*(2), 251-265. doi:10.1002/ijc.25683
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, *298*(5600), 1912-1934. doi:10.1126/science.1075762
- Manolea, F., Chun, J., Chen, D. W., Clarke, I., Summerfeldt, N., Dacks, J. B., & Melancon, P. (2010). Arf3 is activated uniquely at the trans-Golgi network by brefeldin A-inhibited guanine nucleotide exchange factors. *Mol Biol Cell*, *21*(11), 1836-1849. doi:10.1091/mbc.E10-01-0016
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, *25*(12), 677-686. doi:10.1016/j.it.2004.09.015
- Manz, M. G. (2007). Human-hemato-lymphoid-system mice: opportunities and challenges. *Immunity*, *26*(5), 537-541. doi:10.1016/j.immuni.2007.05.001

- Mao, Y., Keller, E. T., Garfield, D. H., Shen, K., & Wang, J. (2013). Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*, *32*(1-2), 303-315. doi:10.1007/s10555-012-9415-3
- Margadant, C., Monsuur, H. N., Norman, J. C., & Sonnenberg, A. (2011). Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr Opin Cell Biol*, *23*(5), 607-614. doi:10.1016/j.ceb.2011.08.005
- Margheri, F., Schiavone, N., Papucci, L., Magnelli, L., Serrati, S., Chilla, A., . . . Del Rosso, M. (2012). GDF5 regulates TGF β s-dependent angiogenesis in breast carcinoma MCF-7 cells: in vitro and in vivo control by anti-TGF β s peptides. *PLoS One*, *7*(11), e50342. doi:10.1371/journal.pone.0050342
- Martel, S. (2014). Presenting a new paradigm in cancer therapy: delivering therapeutic agents using navigable microcarriers. *IEEE Pulse*, *5*(3), 48-55. doi:10.1109/MPUL.2014.2309581
- Maschler, S., Wirl, G., Spring, H., Bredow, D. V., Sordat, I., Beug, H., & Reichmann, E. (2005). Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization. *Oncogene*, *24*(12), 2032-2041. doi:10.1038/sj.onc.1208423
- Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J. D., Wolf, B., Sato, G., & Mendelsohn, J. (1984). Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res*, *44*(3), 1002-1007. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6318979>
- Matas, O. B., Martinez-Menarguez, J. A., & Egea, G. (2004). Association of Cdc42/N-WASP/Arp2/3 signaling pathway with Golgi membranes. *Traffic*, *5*(11), 838-846. doi:10.1111/j.1600-0854.2004.00225.x
- Mazaki, Y., Hashimoto, S., Okawa, K., Tsubouchi, A., Nakamura, K., Yagi, R., . . . Sabe, H. (2001). An ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein Git2-short/KIAA0148 is involved in subcellular localization of paxillin and actin cytoskeletal organization. *Mol Biol Cell*, *12*(3), 645-662. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11251077>
- McBride, W. H. (1986). Phenotype and functions of intratumoral macrophages. *Biochim Biophys Acta*, *865*(1), 27-41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3524684>
- McCawley, L. J., Crawford, H. C., King, L. E., Jr., Mudgett, J., & Matrisian, L. M. (2004). A protective role for matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, *64*(19), 6965-6972. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0910
- Md, M. B., & Leipzig, R. M. (2007). Daily folic acid supplementation for 3 years improved cognitive function in older persons. *ACP J Club*, *146*(3), 71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17474680>
- Meiers, P., Cil, T., Guller, U., & Zuber, M. (2013). Sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer patients: improved survival through better staging? *Langenbecks Arch Surg*, *398*(5), 687-690. doi:10.1007/s00423-012-1037-2
- Mendelsohn, J. (1997). Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. *Clin Cancer Res*, *3*(12 Pt 2), 2703-2707. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10068277>
- Mendelsohn, J., & Baselga, J. (2006). Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin Oncol*, *33*(4), 369-385. doi:10.1053/j.seminoncol.2006.04.003

- Merlot, S., & Firtel, R. A. (2003). Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *J Cell Sci*, *116*(Pt 17), 3471-3478. doi:10.1242/jcs.00703
- Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M., & Ford, H. L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, *15*(2), 117-134. doi:10.1007/s10911-010-9178-9
- Michalovitz, D., Halevy, O., & Oren, M. (1991). p53 mutations: gains or losses? *J Cell Biochem*, *45*(1), 22-29. doi:10.1002/jcb.240450108
- Milburn, M. V., Tong, L., deVos, A. M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., & Kim, S. H. (1990). Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science*, *247*(4945), 939-945. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2406906>
- Miles, D. W., Chan, A., Dirix, L. Y., Cortes, J., Pivot, X., Tomczak, P., . . . 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. *J Clin Oncol*, *28*(20), 3239-3247. doi:10.1200/JCO.2008.21.6457
- Milkiewicz, M., Ispanovic, E., Doyle, J. L., & Haas, T. L. (2006). Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *Int J Biochem Cell Biol*, *38*(3), 333-357. doi:10.1016/j.biocel.2005.10.006
- Mishima, K., Tsuchiya, M., Nightingale, M. S., Moss, J., & Vaughan, M. (1993). ARD 1, a 64-kDa guanine nucleotide-binding protein with a carboxyl-terminal ADP-ribosylation factor domain. *J Biol Chem*, *268*(12), 8801-8807. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8473324>
- Mitchell, R., Robertson, D. N., Holland, P. J., Collins, D., Lutz, E. M., & Johnson, M. S. (2003). ADP-ribosylation factor-dependent phospholipase D activation by the M3 muscarinic receptor. *J Biol Chem*, *278*(36), 33818-33830. doi:10.1074/jbc.M305825200
- Mitra, S. K., Hanson, D. A., & Schlaepfer, D. D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *6*(1), 56-68. doi:10.1038/nrm1549
- Modi, S., D'Andrea, G., Norton, L., Yao, T. J., Caravelli, J., Rosen, P. P., . . . Seidman, A. D. (2006). A phase I study of cetuximab/paclitaxel in patients with advanced-stage breast cancer. *Clin Breast Cancer*, *7*(3), 270-277. doi:10.3816/CBC.2006.n.040
- Mograb, B., Rochet, N., Imbert, V., Bourget, I., Boccardi, R., Emiliozzi, C., & Rossi, B. (1997). Human monocytes express amphiregulin and heregulin growth factors upon activation. *Eur Cytokine Netw*, *8*(1), 73-81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9110152>
- Monsky, W. L., Lin, C. Y., Aoyama, A., Kelly, T., Akiyama, S. K., Mueller, S. C., & Chen, W. T. (1994). A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells. *Cancer Res*, *54*(21), 5702-5710. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7923219>

- Moore, M. S. (1998). Ran and nuclear transport. *J Biol Chem*, 273(36), 22857-22860. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9722501>
- Morinaga, N., Tsai, S. C., Moss, J., & Vaughan, M. (1996). Isolation of a brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein for ADP ribosylation factor (ARF) 1 and ARF3 that contains a Sec7-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(23), 12856-12860. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8917509>
- Morishige, M., Hashimoto, S., Ogawa, E., Toda, Y., Kotani, H., Hirose, M., . . . Sabe, H. (2008). GEP100 links epidermal growth factor receptor signalling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion. *Nat Cell Biol*, 10(1), 85-92. doi:10.1038/ncb1672
- Moro, L., Dolce, L., Cabodi, S., Bergatto, E., Boeri Erba, E., Smeriglio, M., . . . Defilippi, P. (2002). Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *J Biol Chem*, 277(11), 9405-9414. doi:10.1074/jbc.M109101200
- Morris, V. L., Schmidt, E. E., MacDonald, I. C., Groom, A. C., & Chambers, A. F. (1997). Sequential steps in hematogenous metastasis of cancer cells studied by in vivo videomicroscopy. *Invasion Metastasis*, 17(6), 281-296. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9949288>
- Moshfegh, Y., Bravo-Cordero, J. J., Miskolci, V., Condeelis, J., & Hodgson, L. (2014). A Trio-Rac1-Pak1 signalling axis drives invadopodia disassembly. *Nat Cell Biol*, 16(6), 574-586. doi:10.1038/ncb2972
- Mossessova, E., Gulbis, J. M., & Goldberg, J. (1998). Structure of the guanine nucleotide exchange factor Sec7 domain of human arno and analysis of the interaction with ARF GTPase. *Cell*, 92(3), 415-423. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9476900>
- Motoyoshi, K. (1998). Biological activities and clinical application of M-CSF. *Int J Hematol*, 67(2), 109-122. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9631577>
- Motoyoshi, K. (1999). [Macrophage colony-stimulating factor]. *Nihon Rinsho*, 57 Suppl, 765-768. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10635965>
- Mundy, G. R. (2002). Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*, 2(8), 584-593. doi:10.1038/nrc867
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G., & D'Souza-Schorey, C. (2009). ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol*, 19(22), 1875-1885. doi:10.1016/j.cub.2009.09.059
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J. W., Sedgwick, A., & D'Souza-Schorey, C. (2010). Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci*, 123(Pt 10), 1603-1611. doi:10.1242/jcs.064386
- Muralidharan-Chari, V., Hoover, H., Clancy, J., Schweitzer, J., Suckow, M. A., Schroeder, V., . . . D'Souza-Schorey, C. (2009). ADP-ribosylation factor 6 regulates tumorigenic and invasive properties in vivo. *Cancer Res*, 69(6), 2201-2209. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1301
- Murao, S., Gemmell, M. A., Callahan, M. F., Anderson, N. L., & Huberman, E. (1983). Control of macrophage cell differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and phorbol-12-myristate-13-

- acetate. *Cancer Res*, 43(10), 4989-4996. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6576856>
- Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S. B., & Lewis, C. E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, 8(8), 618-631. doi:10.1038/nrc2444
- Murphy, G., & Gavrilovic, J. (1999). Proteolysis and cell migration: creating a path? *Curr Opin Cell Biol*, 11(5), 614-621. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10508651>
- Murray, M. J., Shilo, B. Z., Shih, C., Cowing, D., Hsu, H. W., & Weinberg, R. A. (1981). Three different human tumor cell lines contain different oncogenes. *Cell*, 25(2), 355-361. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6269741>
- Muthuswamy, S. K., Li, D., Lelievre, S., Bissell, M. J., & Brugge, J. S. (2001). ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini. *Nat Cell Biol*, 3(9), 785-792. doi:10.1038/ncb0901-785
- Myoui, A., Nishimura, R., Williams, P. J., Hiraga, T., Tamura, D., Michigami, T., . . . Yoneda, T. (2003). C-SRC tyrosine kinase activity is associated with tumor colonization in bone and lung in an animal model of human breast cancer metastasis. *Cancer Res*, 63(16), 5028-5033. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12941830>
- Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, 69(3), 562-573. doi:10.1016/j.cardiores.2005.12.002
- Nakagawa, K., Sogo, S., Hioki, K., Tokunaga, R., & Taketani, S. (1998). Acquisition of cell adhesion and induction of focal adhesion kinase of human colon cancer Colo 201 cells by retinoic acid-induced differentiation. *Differentiation*, 62(5), 249-257. doi:10.1046/j.1432-0436.1998.6250249.x
- Nakahara, H., Mueller, S. C., Nomizu, M., Yamada, Y., Yeh, Y., & Chen, W. T. (1998). Activation of beta1 integrin signaling stimulates tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP and membrane-protrusive activities at invadopodia. *J Biol Chem*, 273(1), 9-12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9417037>
- Nakai, W., Kondo, Y., Saitoh, A., Naito, T., Nakayama, K., & Shin, H. W. (2013). ARF1 and ARF4 regulate recycling endosomal morphology and retrograde transport from endosomes to the Golgi apparatus. *Mol Biol Cell*, 24(16), 2570-2581. doi:10.1091/mbc.E13-04-0197
- Natsume, W., Tanabe, K., Kon, S., Yoshida, N., Watanabe, T., Torii, T., & Satake, M. (2006). SMAP2, a novel ARF GTPase-activating protein, interacts with clathrin and clathrin assembly protein and functions on the AP-1-positive early endosome/trans-Golgi network. *Mol Biol Cell*, 17(6), 2592-2603. doi:10.1091/mbc.E05-10-0909
- Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F. L., Fevr, T., . . . Gray, J. W. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, 10(6), 515-527. doi:10.1016/j.ccr.2006.10.008
- Nicolson, G. L. (1988). Cancer metastasis: tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites. *Biochim Biophys Acta*, 948(2), 175-224. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3052592>

- Nie, Z., Stanley, K. T., Stauffer, S., Jacques, K. M., Hirsch, D. S., Takei, J., & Randazzo, P. A. (2002). AGAP1, an endosome-associated, phosphoinositide-dependent ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein that affects actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, 277(50), 48965-48975. doi:10.1074/jbc.M202969200
- Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(12), 767-779. doi:10.1038/nrm3470
- Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., . . . Perou, C. M. (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*, 10(16), 5367-5374. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0220
- Nobes, C. D., & Hall, A. (1999). Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol*, 144(6), 1235-1244. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10087266>
- Noel, A., Maillard, C., Rocks, N., Jost, M., Chabottaux, V., Sounni, N. E., . . . Foidart, J. M. (2004). Membrane associated proteases and their inhibitors in tumour angiogenesis. *J Clin Pathol*, 57(6), 577-584. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15166260>
- Norman, J. C., Jones, D., Barry, S. T., Holt, M. R., Cockcroft, S., & Critchley, D. R. (1998). ARF1 mediates paxillin recruitment to focal adhesions and potentiates Rho-stimulated stress fiber formation in intact and permeabilized Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol*, 143(7), 1981-1995. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9864369>
- Novelli, M., Cossu, A., Oukrif, D., Quaglia, A., Lakhani, S., Poulson, R., . . . Wright, N. (2003). X-inactivation patch size in human female tissue confounds the assessment of tumor clonality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(6), 3311-3314. doi:10.1073/pnas.0437825100
- O'Shaughnessy, J. A. (2010). Lethal breast cancer. *Clin Breast Cancer*, 10 Suppl 1, E6-7. doi:10.3816/CBC.2010.s.001
- Ohashi, Y., Iijima, H., Yamaotsu, N., Yamazaki, K., Sato, S., Okamura, M., . . . Yamori, T. (2012). AMF-26, a novel inhibitor of the Golgi system, targeting ADP-ribosylation factor 1 (Arf1) with potential for cancer therapy. *J Biol Chem*, 287(6), 3885-3897. doi:10.1074/jbc.M111.316125
- Ohm, J. E., & Carbone, D. P. (2001). VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency. *Immunol Res*, 23(2-3), 263-272. doi:10.1385/IR:23:2-3:263
- Ohtsu, H., Dempsey, P. J., & Eguchi, S. (2006). ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291(1), C1-10. doi:10.1152/ajpcell.00620.2005
- Oikawa, T., Itoh, T., & Takenawa, T. (2008). Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. *J Cell Biol*, 182(1), 157-169. doi:10.1083/jcb.200801042
- Olofsson, B. (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal*, 11(8), 545-554. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10433515>
- Onodera, Y., Hashimoto, S., Hashimoto, A., Morishige, M., Mazaki, Y., Yamada, A., . . . Sabe, H. (2005). Expression of AMAP1, an ArfGAP, provides novel targets to

- inhibit breast cancer invasive activities. *EMBO J*, 24(5), 963-973.
doi:10.1038/sj.emboj.7600588
- Ordinario, E., Han, H. J., Furuta, S., Heiser, L. M., Jakkula, L. R., Rodier, F., . . . Kohwi-Shigematsu, T. (2012). ATM suppresses SATB1-induced malignant progression in breast epithelial cells. *PLoS One*, 7(12), e51786.
doi:10.1371/journal.pone.0051786
- Ostuni, R., Kratochvill, F., Murray, P. J., & Natoli, G. (2015). Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends Immunol*, 36(4), 229-239.
doi:10.1016/j.it.2015.02.004
- Ottenhoff-Kalff, A. E., Rijksen, G., van Beurden, E. A., Hennipman, A., Michels, A. A., & Staal, G. E. (1992). Characterization of protein tyrosine kinases from human breast cancer: involvement of the c-src oncogene product. *Cancer Res*, 52(17), 4773-4778. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1380891>
- Ouyang, X., Gulliford, T., Huang, G., & Epstein, R. J. (1999). Transforming growth factor-alpha short-circuits downregulation of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Physiol*, 179(1), 52-57. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199904)179:1<52::AID-JCP7>3.0.CO;2-M
- Overall, C. M. (2002). Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol Biotechnol*, 22(1), 51-86. doi:10.1385/MB:22:1:051
- Oza, A. M., & Boyd, N. F. (1993). Mammographic parenchymal patterns: a marker of breast cancer risk. *Epidemiol Rev*, 15(1), 196-208. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8405204>
- Pages, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J. C., Meloche, S., & Pouyssegur, J. (1993). Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(18), 8319-8323. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8397401>
- Palacios, F., Price, L., Schweitzer, J., Collard, J. G., & D'Souza-Schorey, C. (2001). An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration. *EMBO J*, 20(17), 4973-4986.
doi:10.1093/emboj/20.17.4973
- Pan, H., Yu, J., Zhang, L., Carpenter, A., Zhu, H., Li, L., . . . Yuan, J. (2008). A novel small molecule regulator of guanine nucleotide exchange activity of the ADP-ribosylation factor and golgi membrane trafficking. *J Biol Chem*, 283(45), 31087-31096. doi:10.1074/jbc.M806592200
- Pap, E., Pallinger, E., Pasztoi, M., & Falus, A. (2009). Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. *Inflamm Res*, 58(1), 1-8. doi:10.1007/s00011-008-8210-7
- Parachoniak, C. A., Luo, Y., Abella, J. V., Keen, J. H., & Park, M. (2011). GGA3 functions as a switch to promote Met receptor recycling, essential for sustained ERK and cell migration. *Dev Cell*, 20(6), 751-763.
doi:10.1016/j.devcel.2011.05.007
- Park, J., Euhus, D. M., & Scherer, P. E. (2011). Paracrine and endocrine effects of adipose tissue on cancer development and progression. *Endocr Rev*, 32(4), 550-570. doi:10.1210/er.2010-0030

- Parri, M., & Chiarugi, P. (2010). Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Commun Signal*, 8, 23. doi:10.1186/1478-811X-8-23
- Pasqualato, S., Renault, L., & Cherfils, J. (2002). Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for 'front-back' communication. *EMBO Rep*, 3(11), 1035-1041. doi:10.1093/embo-reports/kvf221
- Pennacchietti, S., Michieli, P., Galluzzo, M., Mazzone, M., Giordano, S., & Comoglio, P. M. (2003). Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell*, 3(4), 347-361. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12726861>
- Pepperkok, R., Whitney, J. A., Gomez, M., & Kreis, T. E. (2000). COPI vesicles accumulating in the presence of a GTP restricted arf1 mutant are depleted of anterograde and retrograde cargo. *J Cell Sci*, 113 (Pt 1), 135-144. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10591632>
- Perou, C. M. (2011). Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*, 16 Suppl 1, 61-70. doi:10.1634/theoncologist.2011-S1-61
- Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., . . . Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747-752. doi:10.1038/35021093
- Perrier, S., Caldefie-Chezet, F., & Vasson, M. P. (2009). IL-1 family in breast cancer: potential interplay with leptin and other adipocytokines. *FEBS Lett*, 583(2), 259-265. doi:10.1016/j.febslet.2008.12.030
- Peschard, P., & Park, M. (2003). Escape from Cbl-mediated downregulation: a recurrent theme for oncogenic deregulation of receptor tyrosine kinases. *Cancer Cell*, 3(6), 519-523. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12842080>
- Peters, P. J., Hsu, V. W., Ooi, C. E., Finazzi, D., Teal, S. B., Oorschot, V., . . . Klausner, R. D. (1995). Overexpression of wild-type and mutant ARF1 and ARF6: distinct perturbations of nonoverlapping membrane compartments. *J Cell Biol*, 128(6), 1003-1017. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7896867>
- Peto, J. (2001). Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature*, 411(6835), 390-395. doi:10.1038/35077256
- Peyroche, A., Antony, B., Robineau, S., Acker, J., Cherfils, J., & 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. *Mol Cell*, 3(3), 275-285. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10198630>
- Peyruchaud, O., Winding, B., Pecheur, I., Serre, C. M., Delmas, P., & Clezardin, P. (2001). Early detection of bone metastases in a murine model using fluorescent human breast cancer cells: application to the use of the bisphosphonate zoledronic acid in the treatment of osteolytic lesions. *J Bone Miner Res*, 16(11), 2027-2034. doi:10.1359/jbmr.2001.16.11.2027
- Piccin, A., Murphy, W. G., & Smith, O. P. (2007). Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev*, 21(3), 157-171. doi:10.1016/j.blre.2006.09.001
- Pille, J. Y., Denoyelle, C., Varet, J., Bertrand, J. R., Soria, J., Opolon, P., . . . Li, H. (2005). Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro and in vivo. *Mol Ther*, 11(2), 267-274. doi:10.1016/j.ymthe.2004.08.029

- Pilzer, D., Gasser, O., Moskovich, O., Schifferli, J. A., & Fishelson, Z. (2005). Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. *Springer Semin Immunopathol*, 27(3), 375-387. doi:10.1007/s00281-005-0004-1
- Pizzirani, C., Ferrari, D., Chiozzi, P., Adinolfi, E., Sandona, D., Savaglio, E., & Di Virgilio, F. (2007). Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1beta-loaded microvesicles from human dendritic cells. *Blood*, 109(9), 3856-3864. doi:10.1182/blood-2005-06-031377
- Poincloux, R., Lizarraga, F., & Chavrier, P. (2009). Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *J Cell Sci*, 122(Pt 17), 3015-3024. doi:10.1242/jcs.034561
- Polte, T. R., & Hanks, S. K. (1997). Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crk-associated substrate (p130(Cas)) are elevated in cytoskeleton-associated fractions following adhesion and Src transformation. Requirements for Src kinase activity and FAK proline-rich motifs. *J Biol Chem*, 272(9), 5501-5509. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9038154>
- Popoff, V., Langer, J. D., Reckmann, I., Hellwig, A., Kahn, R. A., Brugger, B., & Wieland, F. T. (2011). Several ADP-ribosylation factor (Arf) isoforms support COPI vesicle formation. *J Biol Chem*, 286(41), 35634-35642. doi:10.1074/jbc.M111.261800
- Powelka, A. M., Sun, J., Li, J., Gao, M., Shaw, L. M., Sonnenberg, A., & Hsu, V. W. (2004). Stimulation-dependent recycling of integrin beta1 regulated by ARF6 and Rab11. *Traffic*, 5(1), 20-36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14675422>
- Prat, A., Carey, L. A., Adamo, B., Vidal, M., Tabernero, J., Cortes, J., . . . Baselga, J. (2014). Molecular features and survival outcomes of the intrinsic subtypes within HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 106(8). doi:10.1093/jnci/dju152
- Prat, A., Parker, J. S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J. I., . . . Perou, C. M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*, 12(5), R68. doi:10.1186/bcr2635
- Prat, A., & Perou, C. M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*, 5(1), 5-23. doi:10.1016/j.molonc.2010.11.003
- Premont, R. T., Claing, A., Vitale, N., Freeman, J. L., Pitcher, J. A., Patton, W. A., . . . Lefkowitz, R. J. (1998). beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(24), 14082-14087. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9826657>
- Premont, R. T., Claing, A., Vitale, N., Perry, S. J., & Lefkowitz, R. J. (2000). The GIT family of ADP-ribosylation factor GTPase-activating proteins. Functional diversity of GIT2 through alternative splicing. *J Biol Chem*, 275(29), 22373-22380. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10896954>
- Puertollano, R., & Bonifacino, J. S. (2004). Interactions of GGA3 with the ubiquitin sorting machinery. *Nat Cell Biol*, 6(3), 244-251. doi:10.1038/ncb1106
- Pyun, B. J., Choi, S., Lee, Y., Kim, T. W., Min, J. K., Kim, Y., . . . Kwon, Y. G. (2008). Capsiate, a nonpungent capsaicin-like compound, inhibits angiogenesis and

- vascular permeability via a direct inhibition of Src kinase activity. *Cancer Res*, 68(1), 227-235. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2799
- Quesnelle, K. M., Boehm, A. L., & Grandis, J. R. (2007). STAT-mediated EGFR signaling in cancer. *J Cell Biochem*, 102(2), 311-319. doi:10.1002/jcb.21475
- Radhakrishna, H., Al-Awar, O., Khachikian, Z., & Donaldson, J. G. (1999). ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. *J Cell Sci*, 112 (Pt 6), 855-866. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10036235>
- Raizer, J. J. (2005). HER1/EGFR tyrosine kinase inhibitors for the treatment of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*, 74(1), 77-86. doi:10.1007/s11060-005-0603-7
- Rakha, E. A., Elsheikh, S. E., Aleskandarany, M. A., Habashi, H. O., Green, A. R., Powe, D. G., . . . Ellis, I. O. (2009). Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res*, 15(7), 2302-2310. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2132
- Randazzo, P. A., Andrade, J., Miura, K., Brown, M. T., Long, Y. Q., Stauffer, S., . . . Cooper, J. A. (2000). The Arf GTPase-activating protein ASAP1 regulates the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(8), 4011-4016. doi:10.1073/pnas.070552297
- Randazzo, P. A., & Hirsch, D. S. (2004). Arf GAPs: multifunctional proteins that regulate membrane traffic and actin remodelling. *Cell Signal*, 16(4), 401-413. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14709330>
- Randazzo, P. A., Inoue, H., & Bharti, S. (2007). Arf GAPs as regulators of the actin cytoskeleton. *Biol Cell*, 99(10), 583-600. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17868031>
- Randazzo, P. A., Terui, T., Sturch, S., Fales, H. M., Ferrige, A. G., & Kahn, R. A. (1995). The myristoylated amino terminus of ADP-ribosylation factor 1 is a phospholipid- and GTP-sensitive switch. *J Biol Chem*, 270(24), 14809-14815. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7782347>
- Ravid, T., Sweeney, C., Gee, P., Carraway, K. L., 3rd, & Goldkorn, T. (2002). Epidermal growth factor receptor activation under oxidative stress fails to promote c-Cbl mediated down-regulation. *J Biol Chem*, 277(34), 31214-31219. doi:10.1074/jbc.M204677200
- Reiske, H. R., Kao, S. C., Cary, L. A., Guan, J. L., Lai, J. F., & Chen, H. C. (1999). Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Biol Chem*, 274(18), 12361-12366. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10212207>
- Reynolds, P. (2013). Smoking and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 18(1), 15-23. doi:10.1007/s10911-012-9269-x
- Ridley, A. J. (2001). Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci*, 114(Pt 15), 2713-2722. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11683406>
- Ridley, A. J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol*, 16(10), 522-529. doi:10.1016/j.tcb.2006.08.006

- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., . . . Horwitz, A. R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, *302*(5651), 1704-1709. doi:10.1126/science.1092053
- Rinehart, J., Adjei, A. A., Lorusso, P. M., Waterhouse, D., Hecht, J. R., Natale, R. B., . . . Meyer, M. B. (2004). Multicenter phase II study of the oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non-small-cell lung, breast, colon, and pancreatic cancer. *J Clin Oncol*, *22*(22), 4456-4462. doi:10.1200/JCO.2004.01.185
- Rivera-Feliciano, J., Lee, K. H., Kong, S. W., Rajagopal, S., Ma, Q., Springer, Z., . . . Pu, W. T. (2006). Development of heart valves requires Gata4 expression in endothelial-derived cells. *Development*, *133*(18), 3607-3618. doi:10.1242/dev.02519
- Robert, N. J., Dieras, V., Glaspy, J., Brufsky, A. M., Bondarenko, I., Lipatov, O. N., . . . 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. *J Clin Oncol*, *29*(10), 1252-1260. doi:10.1200/JCO.2010.28.0982
- Roberts, P. J., Mitin, N., Keller, P. J., Chenette, E. J., Madigan, J. P., Currin, R. O., . . . Der, C. J. (2008). Rho Family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification. *J Biol Chem*, *283*(37), 25150-25163. doi:10.1074/jbc.M800882200
- Rocha-Lima, C. M., Soares, H. P., Raez, L. E., & Singal, R. (2007). EGFR targeting of solid tumors. *Cancer Control*, *14*(3), 295-304. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17615536>
- Roskoski, R., Jr. (2014a). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res*, *79*, 34-74. doi:10.1016/j.phrs.2013.11.002
- Roskoski, R., Jr. (2014b). ErbB/HER protein-tyrosine kinases: Structures and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res*, *87*, 42-59. doi:10.1016/j.phrs.2014.06.001
- Ross, J. S., Fletcher, J. A., Linette, G. P., Stec, J., Clark, E., Ayers, M., . . . Bloom, K. J. (2003). The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist*, *8*(4), 307-325. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12897328>
- Routledge, E. J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J., & Sumpter, J. P. (1998). Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol Appl Pharmacol*, *153*(1), 12-19. doi:10.1006/taap.1998.8544
- Rovera, G., O'Brien, T. G., & Diamond, L. (1979). Induction of differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor promoters. *Science*, *204*(4395), 868-870. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/286421>
- Sabe, H., Onodera, Y., Mazaki, Y., & Hashimoto, S. (2006). ArfGAP family proteins in cell adhesion, migration and tumor invasion. *Curr Opin Cell Biol*, *18*(5), 558-564. doi:10.1016/j.ceb.2006.08.002
- Sahai, E., & Marshall, C. J. (2002). RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer*, *2*(2), 133-142. doi:10.1038/nrc725
- Sahai, E., & Marshall, C. J. (2003). Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol*, *5*(8), 711-719. doi:10.1038/ncb1019

- Sakurai-Yageta, M., Recchi, C., Le Dez, G., Sibarita, J. B., Daviet, L., Camonis, J., . . . Chavrier, P. (2008). The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is required for tumor cell invasion downstream of Cdc42 and RhoA. *J Cell Biol*, *181*(6), 985-998. doi:10.1083/jcb.200709076
- Santy, L. C., & Casanova, J. E. (2001). Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D. *J Cell Biol*, *154*(3), 599-610. doi:10.1083/jcb.200104019
- Sata, M., Moss, J., & Vaughan, M. (1999). Structural basis for the inhibitory effect of brefeldin A on guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(6), 2752-2757. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10077583>
- Schaller, M. D. (2001). Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta*, *1540*(1), 1-21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11476890>
- Schlaepfer, D. D., & Hunter, T. (1997). Focal adhesion kinase overexpression enhances ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src. *J Biol Chem*, *272*(20), 13189-13195. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9148935>
- Schlessinger, J. (2002). Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell*, *110*(6), 669-672. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12297041>
- Schlienger, S., Campbell, S., & Claing, A. (2014). ARF1 regulates the Rho/MLC pathway to control EGF-dependent breast cancer cell invasion. *Mol Biol Cell*, *25*(1), 17-29. doi:10.1091/mbc.E13-06-0335
- Schlienger, S., Campbell, S., Pasquin, S., Gaboury, L., & Claing, A. (2016). ADP-ribosylation factor 1 expression regulates epithelial-mesenchymal transition and predicts poor clinical outcome in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. doi:10.18632/oncotarget.7515
- Schlienger, S., Ramirez, R. A., & Claing, A. (2015). ARF1 regulates adhesion of MDA-MB-231 invasive breast cancer cells through formation of focal adhesions. *Cell Signal*, *27*(3), 403-415. doi:10.1016/j.cellsig.2014.11.032
- Schmalzigaug, R., Phee, H., Davidson, C. E., Weiss, A., & Premont, R. T. (2007). Differential expression of the ARF GAP genes GIT1 and GIT2 in mouse tissues. *J Histochem Cytochem*, *55*(10), 1039-1048. doi:10.1369/jhc.7A7207.2007
- Schneider, I. C., & Haugh, J. M. (2006). Mechanisms of gradient sensing and chemotaxis: conserved pathways, diverse regulation. *Cell Cycle*, *5*(11), 1130-1134. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16760661>
- Schonichen, A., & Geyer, M. (2010). Fifteen formins for an actin filament: a molecular view on the regulation of human formins. *Biochim Biophys Acta*, *1803*(2), 152-163. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.01.014
- Selvakumar, P., Lakshmikuttyamma, A., Shrivastav, A., Das, S. B., Dimmock, J. R., & Sharma, R. K. (2007). Potential role of N-myristoyltransferase in cancer. *Prog Lipid Res*, *46*(1), 1-36. doi:10.1016/j.plipres.2006.05.002
- Shaw, K. R., Wrobel, C. N., & Brugge, J. S. (2004). Use of three-dimensional basement membrane cultures to model oncogene-induced changes in mammary epithelial

- morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 9(4), 297-310.
doi:10.1007/s10911-004-1402-z
- Shaw, R. J., & Cantley, L. C. (2006). Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*, 441(7092), 424-430. doi:10.1038/nature04869
- Shedden, K., Xie, X. T., Chandaroy, P., Chang, Y. T., & Rosania, G. R. (2003). Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res*, 63(15), 4331-4337. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12907600>
- Shiozawa, Y., & Taichman, R. S. (2012). Cancer Stem Cells and the Bone Marrow Microenvironment. *Bonekey Rep*, 2012(1). doi:10.1038/bonekey.2012.48
- Sieg, D. J., Hauck, C. R., Ilic, D., Klingbeil, C. K., Schaefer, E., Damsky, C. H., & Schlaepfer, D. D. (2000). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol*, 2(5), 249-256. doi:10.1038/35010517
- Sieg, D. J., Hauck, C. R., & Schlaepfer, D. D. (1999). Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J Cell Sci*, 112 (Pt 16), 2677-2691. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10413676>
- Siemann, D. W., Mercer, E., Lepler, S., & Rojiani, A. M. (2002). Vascular targeting agents enhance chemotherapeutic agent activities in solid tumor therapy. *Int J Cancer*, 99(1), 1-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11948484>
- Sikand, K., Slaibi, J. E., Singh, R., Slane, S. D., & Shukla, G. C. (2011). miR 488* inhibits androgen receptor expression in prostate carcinoma cells. *Int J Cancer*, 129(4), 810-819. doi:10.1002/ijc.25753
- Simpson, K. J., Dugan, A. S., & Mercurio, A. M. (2004). Functional analysis of the contribution of RhoA and RhoC GTPases to invasive breast carcinoma. *Cancer Res*, 64(23), 8694-8701. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2247
- Sims, A. H., Howell, A., Howell, S. J., & Clarke, R. B. (2007). Origins of breast cancer subtypes and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Oncol*, 4(9), 516-525. doi:10.1038/ncponc0908
- Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., . . . et al. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244(4905), 707-712. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2470152>
- Small, J. V., Stradal, T., Vignat, E., & Rottner, K. (2002). The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol*, 12(3), 112-120. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11859023>
- Soldati, T., & Schliwa, M. (2006). Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(12), 897-908. doi:10.1038/nrm2060
- Someya, A., Sata, M., Takeda, K., Pacheco-Rodriguez, G., Ferrans, V. J., Moss, J., & Vaughan, M. (2001). ARF-GEP(100), a guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(5), 2413-2418. doi:10.1073/pnas.051634798
- Sordella, R., Bell, D. W., Haber, D. A., & Settleman, J. (2004). Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science*, 305(5687), 1163-1167. doi:10.1126/science.1101637

- Sounni, N. E., & Noel, A. (2005). Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression. *Biochimie*, *87*(3-4), 329-342. doi:10.1016/j.biochi.2004.07.012
- Sparano, J. A., Fazzari, M. J., & Childs, G. (2005). Clinical application of molecular profiling in breast cancer. *Future Oncol*, *1*(4), 485-496. doi:10.2217/14796694.1.4.485
- Stearns, T., Willingham, M. C., Botstein, D., & Kahn, R. A. (1990). ADP-ribosylation factor is functionally and physically associated with the Golgi complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *87*(3), 1238-1242. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2105501>
- Stroka, D. M., Burkhardt, T., Desbaillets, I., Wenger, R. H., Neil, D. A., Bauer, C., . . . Candinas, D. (2001). HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J*, *15*(13), 2445-2453. doi:10.1096/fj.01-0125com
- Struewing, J. P., Hartge, P., Wacholder, S., Baker, S. M., Berlin, M., McAdams, M., . . . Tucker, M. A. (1997). The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*, *336*(20), 1401-1408. doi:10.1056/NEJM199705153362001
- Sullivan, N. J., Sasser, A. K., Axel, A. E., Vesuna, F., Raman, V., Ramirez, N., . . . Hall, B. M. (2009). Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene*, *28*(33), 2940-2947. doi:10.1038/onc.2009.180
- Sun, B., Zhang, S., Zhang, D., Li, Y., Zhao, X., Luo, Y., & Guo, Y. (2008). Identification of metastasis-related proteins and their clinical relevance to triple-negative human breast cancer. *Clin Cancer Res*, *14*(21), 7050-7059. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0520
- Swallow, C. J., Murray, M. P., & Guillem, J. G. (1996). Metastatic colorectal cancer cells induce matrix metalloproteinase release by human monocytes. *Clin Exp Metastasis*, *14*(1), 3-11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8521614>
- Swift-Scanlan, T., Vang, R., Blackford, A., Fackler, M. J., & Sukumar, S. (2011). Methylated genes in breast cancer: associations with clinical and histopathological features in a familial breast cancer cohort. *Cancer Biol Ther*, *11*(10), 853-865. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21383541>
- Szabo, K. A., & Singh, G. (2005). Modulation of monocyte matrix metalloproteinase-2 by breast adenocarcinoma cells. *Breast Cancer Res*, *7*(5), R661-668. doi:10.1186/bcr1261
- Tague, S. E., Muralidharan, V., & D'Souza-Schorey, C. (2004). ADP-ribosylation factor 6 regulates tumor cell invasion through the activation of the MEK/ERK signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(26), 9671-9676. doi:10.1073/pnas.0403531101
- Takatsu, H., Yoshino, K., Toda, K., & Nakayama, K. (2002). GGA proteins associate with Golgi membranes through interaction between their GGAH domains and ADP-ribosylation factors. *Biochem J*, *365*(Pt 2), 369-378. doi:10.1042/BJ20020428

- Takenawa, T., & Suetsugu, S. (2007). The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *8*(1), 37-48. doi:10.1038/nrm2069
- Tanabe, K., Torii, T., Natsume, W., Braesch-Andersen, S., Watanabe, T., & Satake, M. (2005). A novel GTPase-activating protein for ARF6 directly interacts with clathrin and regulates clathrin-dependent endocytosis. *Mol Biol Cell*, *16*(4), 1617-1628. doi:10.1091/mbc.E04-08-0683
- Tanaka, M., Sasaki, K., Kamata, R., & Sakai, R. (2007). The C-terminus of ephrin-B1 regulates metalloproteinase secretion and invasion of cancer cells. *J Cell Sci*, *120*(Pt 13), 2179-2189. doi:10.1242/jcs.008607
- Tanigawa, G., Orci, L., Amherdt, M., Ravazzola, M., Helms, J. B., & Rothman, J. E. (1993). Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *J Cell Biol*, *123*(6 Pt 1), 1365-1371. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8253837>
- Taraboletti, G., D'Ascenzo, S., Borsotti, P., Giavazzi, R., Pavan, A., & Dolo, V. (2002). Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol*, *160*(2), 673-680. doi:10.1016/S0002-9440(10)64887-0
- Taraboletti, G., D'Ascenzo, S., Giusti, I., Marchetti, D., Borsotti, P., Millimaggi, D., . . . Dolo, V. (2006). Bioavailability of VEGF in tumor-shed vesicles depends on vesicle burst induced by acidic pH. *Neoplasia*, *8*(2), 96-103. doi:10.1593/neo.05583
- Taube, J. H., Herschkowitz, J. I., Komurov, K., Zhou, A. Y., Gupta, S., Yang, J., . . . Mani, S. A. (2010). Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(35), 15449-15454. doi:10.1073/pnas.1004900107
- Terry, P. D., & Rohan, T. E. (2002). Cigarette smoking and the risk of breast cancer in women: a review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *11*(10 Pt 1), 953-971. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12376493>
- Thien, C. B., & Langdon, W. Y. (1997). EGF receptor binding and transformation by v-cbl is ablated by the introduction of a loss-of-function mutation from the *Caenorhabditis elegans* sli-1 gene. *Oncogene*, *14*(18), 2239-2249. doi:10.1038/sj.onc.1201193
- Thomas, S. M., & Brugge, J. S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *13*, 513-609. doi:10.1146/annurev.cellbio.13.1.513
- Timmerman, L. A., Grego-Bessa, J., Raya, A., Bertran, E., Perez-Pomares, J. M., Diez, J., . . . de la Pompa, J. L. (2004). Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev*, *18*(1), 99-115. doi:10.1101/gad.276304
- Timpl, R., & Brown, J. C. (1996). Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays*, *18*(2), 123-132. doi:10.1002/bies.950180208
- Togawa, A., Morinaga, N., Ogasawara, M., Moss, J., & Vaughan, M. (1999). Purification and cloning of a brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein for

- ADP-ribosylation factors. *J Biol Chem*, 274(18), 12308-12315. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10212200>
- Tomar, A., Lim, S. T., Lim, Y., & Schlaepfer, D. D. (2009). A FAK-p120RasGAP-p190RhoGAP complex regulates polarity in migrating cells. *J Cell Sci*, 122(Pt 11), 1852-1862. doi:10.1242/jcs.046870
- Trevino, J. G., Summy, J. M., Lesslie, D. P., Parikh, N. U., Hong, D. S., Lee, F. Y., . . . Gallick, G. E. (2006). Inhibition of SRC expression and activity inhibits tumor progression and metastasis of human pancreatic adenocarcinoma cells in an orthotopic nude mouse model. *Am J Pathol*, 168(3), 962-972. doi:10.2353/ajpath.2006.050570
- Tsai, M. M., Lin, P. Y., Cheng, W. L., Tsai, C. Y., Chi, H. C., Chen, C. Y., . . . Lin, K. H. (2012). Overexpression of ADP-ribosylation factor 1 in human gastric carcinoma and its clinicopathological significance. *Cancer Sci*, 103(6), 1136-1144. doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02243.x
- Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T., & Tada, K. (1982). Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res*, 42(4), 1530-1536. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6949641>
- Ueno, K., Hirata, H., Majid, S., Yamamura, S., Shahryari, V., Tabatabai, Z. L., . . . Dahiya, R. (2012). Tumor suppressor microRNA-493 decreases cell motility and migration ability in human bladder cancer cells by downregulating RhoC and FZD4. *Mol Cancer Ther*, 11(1), 244-253. doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0592
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., . . . et al. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, 309(5967), 418-425. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6328312>
- Umekita, Y., Ohi, Y., Sagara, Y., & Yoshida, H. (2000). Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-alpha predicts worse prognosis in breast-cancer patients. *Int J Cancer*, 89(6), 484-487. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11102891>
- Valastyan, S., Benaich, N., Chang, A., Reinhardt, F., & Weinberg, R. A. (2009). Concomitant suppression of three target genes can explain the impact of a microRNA on metastasis. *Genes Dev*, 23(22), 2592-2597. doi:10.1101/gad.1832709
- Valastyan, S., Reinhardt, F., Benaich, N., Calogrias, D., Szasz, A. M., Wang, Z. C., . . . Weinberg, R. A. (2009). A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell*, 137(6), 1032-1046. doi:10.1016/j.cell.2009.03.047
- Valastyan, S., & Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2), 275-292. doi:10.1016/j.cell.2011.09.024
- Valenti, R., Huber, V., Filipazzi, P., Pilla, L., Sovena, G., Villa, A., . . . Rivoltini, L. (2006). Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Res*, 66(18), 9290-9298. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1819

- Valenti, R., Huber, V., Iero, M., Filipazzi, P., Parmiani, G., & Rivoltini, L. (2007). Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression. *Cancer Res*, 67(7), 2912-2915. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0520
- Van Lint, P., & Libert, C. (2006). Matrix metalloproteinase-8: cleavage can be decisive. *Cytokine Growth Factor Rev*, 17(4), 217-223. doi:10.1016/j.cytogfr.2006.04.001
- Van Lint, P., & Libert, C. (2007). Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J Leukoc Biol*, 82(6), 1375-1381. doi:10.1189/jlb.0607338
- Vega, F. M., & Ridley, A. J. (2008). Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett*, 582(14), 2093-2101. doi:10.1016/j.febslet.2008.04.039
- Veronesi, U., Paganelli, G., Viale, G., Luini, A., Zurrada, S., Galimberti, V., . . . Gennari, R. (2003). A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med*, 349(6), 546-553. doi:10.1056/NEJMoa012782
- Viaud, J., Zeghouf, M., Barelli, H., Zeeh, J. C., Padilla, A., Guibert, B., . . . Chavanieu, A. (2007). Structure-based discovery of an inhibitor of Arf activation by Sec7 domains through targeting of protein-protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(25), 10370-10375. doi:10.1073/pnas.0700773104
- Volpicelli-Daley, L. A., Li, Y., Zhang, C. J., & Kahn, R. A. (2005). Isoform-selective effects of the depletion of ADP-ribosylation factors 1-5 on membrane traffic. *Mol Biol Cell*, 16(10), 4495-4508. doi:10.1091/mbc.E04-12-1042
- Vu, T. H., & Werb, Z. (2000). Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev*, 14(17), 2123-2133. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10970876>
- Wallar, B. J., & Alberts, A. S. (2003). The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol*, 13(8), 435-446. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12888296>
- Walter, B. A., Gomez-Macias, G., Valera, V. A., Sobel, M., & Merino, M. J. (2011). miR-21 Expression in Pregnancy-Associated Breast Cancer: A Possible Marker of Poor Prognosis. *J Cancer*, 2, 67-75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21326627>
- Wanami, L. S., Chen, H. Y., Peiro, S., Garcia de Herreros, A., & Bachelder, R. E. (2008). Vascular endothelial growth factor-A stimulates Snail expression in breast tumor cells: implications for tumor progression. *Exp Cell Res*, 314(13), 2448-2453. doi:10.1016/j.yexcr.2008.05.004
- Wang, D., Boerner, S. A., Winkler, J. D., & LoRusso, P. M. (2007). Clinical experience of MEK inhibitors in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*, 1773(8), 1248-1255. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.11.009
- Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T., & Narumiya, S. (1999). Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol*, 1(3), 136-143. doi:10.1038/11056
- Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., . . . Narumiya, S. (1997). p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J*, 16(11), 3044-3056. doi:10.1093/emboj/16.11.3044

- Watson, M. B., Bahia, H., Ashman, J. N., Berrieman, H. K., Drew, P., Lind, M. J., . . . Cawkwell, L. (2004). Chromosomal alterations in breast cancer revealed by multicolour fluorescence in situ hybridization. *Int J Oncol*, *25*(2), 277-283. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15254723>
- Weiderpass, E., Meo, M., & Vainio, H. (2011). Risk factors for breast cancer, including occupational exposures. *Saf Health Work*, *2*(1), 1-8. doi:10.5491/SHAW.2011.2.1.1
- Weinberg, R. A., & Steffen, D. L. (1981). Regulation of expression of the integrated retrovirus genome. *J Gen Virol*, *54*(Pt 1), 1-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7026730>
- Weinstein, I. B. (2000). Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis. *Carcinogenesis*, *21*(5), 857-864. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10783304>
- Wells, A., Welsh, J. B., Lazar, C. S., Wiley, H. S., Gill, G. N., & Rosenfeld, M. G. (1990). Ligand-induced transformation by a noninternalizing epidermal growth factor receptor. *Science*, *247*(4945), 962-964. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2305263>
- Wennerberg, K., Rossman, K. L., & Der, C. J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci*, *118*(Pt 5), 843-846. doi:10.1242/jcs.01660
- Wilkinson, S., Paterson, H. F., & Marshall, C. J. (2005). Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nat Cell Biol*, *7*(3), 255-261. doi:10.1038/ncb1230
- Williams, M. J., & Rottner, K. (2010). Introduction to Small GTPases. *Small GTPases*, *1*(1), 1. doi:10.4161/sgtp.1.1.12245
- Wobus, M., List, C., Dittrich, T., Dhawan, A., Duryagina, R., Arabanian, L. S., . . . Bornhauser, M. (2015). Breast carcinoma cells modulate the chemoattractive activity of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells by interfering with CXCL12. *Int J Cancer*, *136*(1), 44-54. doi:10.1002/ijc.28960
- Wogan, G. N., Hecht, S. S., Felton, J. S., Conney, A. H., & Loeb, L. A. (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*, *14*(6), 473-486. doi:10.1016/j.semcancer.2004.06.010
- Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U. H., Deryugina, E. I., . . . Friedl, P. (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol*, *160*(2), 267-277. doi:10.1083/jcb.200209006
- Wolff, A. C., Hammond, M. E., Hicks, D. G., Dowsett, M., McShane, L. M., Allison, K. H., . . . College of American, P. (2013). Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*, *31*(31), 3997-4013. doi:10.1200/JCO.2013.50.9984
- Woo, I. S., Eun, S. Y., Jang, H. S., Kang, E. S., Kim, G. H., Kim, H. J., . . . Seo, H. G. (2009). Identification of ADP-ribosylation factor 4 as a suppressor of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced cell death. *Cancer Lett*, *276*(1), 53-60. doi:10.1016/j.canlet.2008.10.031
- Worthylake, R., Opresko, L. K., & Wiley, H. S. (1999). ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal

- growth factor receptors. *J Biol Chem*, 274(13), 8865-8874. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10085130>
- Wyckoff, J. B., Pinner, S. E., Gschmeissner, S., Condeelis, J. S., & Sahai, E. (2006). ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo. *Curr Biol*, 16(15), 1515-1523. doi:10.1016/j.cub.2006.05.065
- Wysoczynski, M., & Ratajczak, M. Z. (2009). Lung cancer secreted microvesicles: underappreciated modulators of microenvironment in expanding tumors. *Int J Cancer*, 125(7), 1595-1603. doi:10.1002/ijc.24479
- Yamaguchi, H., Lorenz, M., Kempiak, S., Sarmiento, C., Coniglio, S., Symons, M., . . . Condeelis, J. (2005). Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J Cell Biol*, 168(3), 441-452. doi:10.1083/jcb.200407076
- Yamaguchi, H., Pixley, F., & Condeelis, J. (2006). Invadopodia and podosomes in tumor invasion. *Eur J Cell Biol*, 85(3-4), 213-218. doi:10.1016/j.ejcb.2005.10.004
- Yan, L., Yang, X., & Davidson, N. E. (2001). Role of DNA methylation and histone acetylation in steroid receptor expression in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 6(2), 183-192. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11501578>
- Yang, C. Z., Heimberg, H., D'Souza-Schorey, C., Mueckler, M. M., & Stahl, P. D. (1998). Subcellular distribution and differential expression of endogenous ADP-ribosylation factor 6 in mammalian cells. *J Biol Chem*, 273(7), 4006-4011. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9461590>
- Yang, M. H., Wu, M. Z., Chiou, S. H., Chen, P. M., Chang, S. Y., Liu, C. J., . . . Wu, K. J. (2008). Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol*, 10(3), 295-305. doi:10.1038/ncb1691
- Yap, T. A., Walton, M. I., Grimshaw, K. M., Te Poele, R. H., Eve, P. D., Valenti, M. R., . . . Garrett, M. D. (2012). AT13148 is a novel, oral multi-AGC kinase inhibitor with potent pharmacodynamic and antitumor activity. *Clin Cancer Res*, 18(14), 3912-3923. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-3313
- Yarden, Y., & Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2), 127-137. doi:10.1038/35052073
- Yarden, Y., & Ullrich, A. (1988). Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*, 57, 443-478. doi:10.1146/annurev.bi.57.070188.002303
- Yilmaz, M., & Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*, 28(1-2), 15-33. doi:10.1007/s10555-008-9169-0
- Yook, J. I., Li, X. Y., Ota, I., Hu, C., Kim, H. S., Kim, N. H., . . . Weiss, S. J. (2006). A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nat Cell Biol*, 8(12), 1398-1406. doi:10.1038/ncb1508
- Yoon, H. Y., Miura, K., Cuthbert, E. J., Davis, K. K., Ahvazi, B., Casanova, J. E., & Randazzo, P. A. (2006). ARAP2 effects on the actin cytoskeleton are dependent on Arf6-specific GTPase-activating-protein activity and binding to RhoA-GTP. *J Cell Sci*, 119(Pt 22), 4650-4666. doi:10.1242/jcs.03237
- Yousef, E. M., Tahir, M. R., St-Pierre, Y., & Gaboury, L. A. (2014). MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer. *BMC Cancer*, 14, 609. doi:10.1186/1471-2407-14-609

- Yu, H. A., Arcila, M. E., Rekhtman, N., Sima, C. S., Zakowski, M. F., Pao, W., . . . Riely, G. J. (2013). Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res*, *19*(8), 2240-2247. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2246
- Yuan, T. L., & Cantley, L. C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, *27*(41), 5497-5510. doi:10.1038/onc.2008.245
- Zandi, R., Larsen, A. B., Andersen, P., Stockhausen, M. T., & Poulsen, H. S. (2007). Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell Signal*, *19*(10), 2013-2023. doi:10.1016/j.cellsig.2007.06.023
- Zeghouf, M., Guibert, B., Zeeh, J. C., & Cherfils, J. (2005). Arf, Sec7 and Brefeldin A: a model towards the therapeutic inhibition of guanine nucleotide-exchange factors. *Biochem Soc Trans*, *33*(Pt 6), 1265-1268. doi:10.1042/BST20051265
- Zeisberg, M., & Kalluri, R. (2013). Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, *304*(3), C216-225. doi:10.1152/ajpcell.00328.2012
- Zerial, M., & McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *2*(2), 107-117. doi:10.1038/35052055
- Zhang, S., & Yu, D. (2012). Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph. *Trends Pharmacol Sci*, *33*(3), 122-128. doi:10.1016/j.tips.2011.11.002
- Zhao, L., Helms, J. B., Brugger, B., Harter, C., Martoglio, B., Graf, R., . . . Wieland, F. T. (1997). Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatomer subunit beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(9), 4418-4423. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9114004>
- Zhao, Z. S., Manser, E., Loo, T. H., & Lim, L. (2000). Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. *Mol Cell Biol*, *20*(17), 6354-6363. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10938112>
- Zwicker, J. I., Liebman, H. A., Neubergh, D., Lacroix, R., Bauer, K. A., Furie, B. C., & Furie, B. (2009). Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res*, *15*(22), 6830-6840. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0371