



HAL
open science

Implication de la protéine Rnd3/RhoE dans la physiologie et la carcinogenèse hépatiques

Lisa Paysan

► **To cite this version:**

Lisa Paysan. Implication de la protéine Rnd3/RhoE dans la physiologie et la carcinogenèse hépatiques. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0275 . tel-01417801

HAL Id: tel-01417801

<https://theses.hal.science/tel-01417801>

Submitted on 16 Dec 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Par Lisa PAYSAN

**Implication de la protéine Rnd3/RhoE dans la physiologie et
la carcinogenèse hépatiques**

Sous la direction de Violaine MOREAU

Soutenue le 15 décembre 2014

Membres du jury :

Pr. François DOIGNON.....**Président du jury**
Professeur des Universités, CNRS UMR 5200, Bordeaux
Dr. Evelyne BLOCH-GALLEGO.....**Rapporteur**
Directeur de recherche, INSERM U1016 - CNRS 8104, Paris
Dr. Catherine SCHUSTER.....**Rapporteur**
Directeur de recherche, INSERM UMR 1110, Strasbourg
Dr. Violaine MOREAU.....**Directeur de thèse**
Directeur de recherche, INSERM U1053, Bordeaux

Implication de la protéine Rnd3/RhoE dans la physiologie et la carcinogénèse hépatiques

L'étude des mécanismes moléculaires de la carcinogénèse hépatique a montré l'implication de la RhoGTPase, Rnd3/RhoE. La protéine Rnd3 est sous-exprimée dans le carcinome hépatocellulaire et la diminution de son expression engendre, *in vitro*, une augmentation de l'invasion des hépatocytes tumoraux. Sur la base de ces travaux, ce projet de thèse s'est décomposé en deux axes. Le premier axe a été d'étudier le rôle de Rnd3 dans la carcinogénèse ainsi que dans la physiologie hépatique *in vivo*. Ce projet a débuté par la génération d'un modèle murin présentant un KO conditionnel et hépato-spécifique de Rnd3 (KORnd3^{Hep}). L'utilisation de plusieurs stratégies s'est révélée nécessaire pour obtenir une extinction protéique de Rnd3 dans la majorité des hépatocytes chez les souris KO. Après hépatectomie des deux tiers, les premiers résultats montrent un retard de régénération hépatique chez les souris KORnd3^{Hep}. En ce qui concerne la carcinogénèse hépatique, nous avons mis en place un modèle de carcinogène chimique en utilisant le diéthylnitrosamine et un modèle de carcinogénèse spontanée chez les animaux KORnd3^{Hep}. Le deuxième axe a porté sur l'étude des invadosomes, structures d'actine impliquées dans l'invasion cellulaire. Nous avons établi une signature minimum pour les invadosomes, impliquant la GTPase Cdc42 et la protéine d'échafaudage Tks5. Nos résultats suggèrent également une implication de Rnd3 dans la fonction de dégradation des invadosomes. Ce travail de thèse a ainsi permis d'apporter de nouveaux outils et de nouvelles pistes quant à l'implication de Rnd3 dans la physiopathologie hépatique et dans l'invasion cellulaire.

Mots clés : GTPase Rnd3/RhoE, souris, régénération hépatique, invasion, carcinome hépatocellulaire, invadosomes

Role of Rnd3/RhoE in hepatic physiology and carcinogenesis

The study of the molecular mechanisms involved in hepatic carcinogenesis revealed the significant down-regulation of the RhoGTPase Rnd3/RhoE in hepatocellular carcinoma as compared to non-tumor liver. Rnd3 down-regulation provides an invasive advantage to tumor hepatocytes suggesting that *RND3* might represent a metastasis suppressor gene in hepatocellular carcinoma. This PhD work was divided in two axes. We first studied the role of Rnd3 in the mouse liver using carcinogenesis and liver regeneration protocols. We thus generated conditional and liver specific Rnd3 KO mice (KORnd3^{Hep}). The first results obtained after partial hepatectomy suggest a delay in liver regeneration for the KORnd3^{Hep} mice. We also developed a carcinogenesis strategy in KORnd3^{Hep} mice using diethylnitrosamine treatment. The second axis focused on invadosomes, which are actin-based structures involved in cell invasion. We have determined a minimal and universal molecular signature for functional invadosomes, which involves the RhoGTPase Cdc42 and the adaptor protein Tks5. We also highlighted the role of Rnd3 in invadosome degradation. In conclusion, this work provides new tools and new insights on Rnd3 function in hepatic physiopathology and cellular invasion.

Key words : Rnd3/RhoE GTPase ; mice ; liver regeneration ; invasion ; hepatocellular carcinoma ; invadosomes

Unité de recherche :

Groupe de Recherches pour l'Etude du Foie (GREF)
Unité INSERM U1053 - Université de Bordeaux
Bât 1A, 2ème étage - Carreire Zone Nord - Case 53
146, rue Léo Saignat
33076 Bordeaux

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Jean Rosenbaum de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et conseillée sur mon projet tout au long de ma thèse.

Je souhaite vivement remercier le professeur François Doignon d'avoir accepté de présider mon jury de thèse, ainsi que les docteurs Evelyne Bloch-Gallego et Catherine Schuster d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie tout particulièrement ma directrice de thèse, Violaine Moreau, pour toute l'aide et le soutien qu'elle m'a apportés pendant ces trois ans. J'ai beaucoup appris au cours de ce projet grâce à ta disponibilité, ton encadrement et ta rigueur scientifique.

Je tiens également à remercier toutes les personnes de l'unité INSERM 1053 que j'ai rencontrées au cours de ma thèse. L'ambiance de travail a été très agréable, tout comme les soirées à l'extérieur du laboratoire.

Je remercie notamment tous les membres du groupe Moreau composé de Sandra, Aurélien et Bertille au début de ma thèse, puis de Caroline, Léo, Fabien, Valérie et Terezinha pour la suite. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec vous tous au sein d'un groupe soudé avec beaucoup d'entraide, de bonne humeur et de bons moments passés ensemble.

Je tiens à remercier Nathalie pour toute son aide et son soutien dans la mise au point des modèles murins et la réalisation des expérimentations animales. J'ai été très contente d'apprendre à mieux te connaître au cours des longues heures passées ensemble dans les animaleries (à la fois en journée, mais aussi la nuit pour les fameux points de cinétique à 36 heures).

Merci à Stéphanie pour les moments que l'on a pu partager ensemble, à la fois sur Bordeaux mais aussi en Dordogne.

Je souhaite aussi remercier Pierre Costet, Benoit Rousseau et Laetitia Medan, ainsi que leurs équipes respectives pour leur travail, leur implication et les nombreux conseils qui m'ont permis de réaliser le premier axe de ma thèse.

Je remercie enfin particulièrement mes parents et mon frère pour tout leur soutien et leurs encouragements durant ma thèse.

SOMMAIRE

CHAPITRE 1 – INTRODUCTION	14
I. Migration et invasion tumorales	14
1. La migration en quatre étapes	14
2. Les différents modes de migration des cellules tumorales.....	17
2.1 La migration de type mésoenchymateuse	18
2.2 La migration de type amiboïde	19
2.3 La migration collective	19
2.4 La plasticité de la migration des cellules tumorales.....	19
3. Les invadosomes, des structures dédiées à l’invasion cellulaire	21
II. Les GTPases de la famille Rho	24
1. Les membres de la famille des GTPases Rho.....	24
2. Le cycle et la régulation des GTPases Rho.....	24
3. Les fonctions des RhoGTPases	26
III. Rnd3	28
1. Identification et propriétés de Rnd3.....	28
2. Localisation cellulaire.....	29
3. Fonctions cellulaires de Rnd3	32
3.1 Régulation du cytosquelette d’actine	32
3.2 Implication dans la croissance cellulaire.....	33
3.3 Implication dans l’apoptose.....	35
4. Rôle de Rnd3 en physiopathologie	35
4.1 Modèles animaux.....	35
4.2 Implication de Rnd3 dans les cancers	37
5. Régulation de l’expression de Rnd3.....	38
5.1 Régulation transcriptionnelle de Rnd3	38
5.2 Régulation post-transcriptionnelle de Rnd3	41
5.3 Régulation de Rnd3 au niveau protéique.....	42
IV. Le foie	43
1. Présentation générale du foie.....	43
1.1 Anatomie du foie	43
1.2 Cellules hépatiques	43
1.2.1 Les hépatocytes.....	44
1.2.2 Les cellules non parenchymales.....	44
2. Physiologie du foie	45

2.1	Description des lobules et acini hépatiques.....	45
2.2	Zonation métabolique du foie.....	46
3.	Fonctions du foie.....	49
4.	Capacité de régénération du foie.....	49
V.	Le carcinome hépatocellulaire	52
1.	Epidémiologie	52
2.	Facteurs de risque.....	52
3.	Survenue et progression du CHC	53
4.	Diagnostic et suivi des patients.....	54
5.	Voies de signalisation impliquées	57
5.1	P53	58
5.2	Wnt/ β -caténine.....	58
6.	Classification des CHCs.....	61
VI.	Rnd3 et carcinome hépatocellulaire	64
1.	Dérégulation de l'expression de Rnd3	64
2.	Rôle de la protéine Rnd3 dans la croissance des cellules de CHC.....	65
3.	Rôle de la protéine Rnd3 dans la migration et l'invasion des cellules de CHC.....	66
	CHAPITRE 2 - MATERIEL ET METHODES.....	68
1.	Culture cellulaire et transfections.....	68
1.1	Culture de lignées cellulaires de carcinome hépatocellulaire.....	68
1.2	Culture d'une autre lignée cellulaire tumorale	68
1.3	Culture d'hépatocytes primaires de souris	68
1.4	Techniques de transfection.....	69
1.4.1	Transfection de plasmides dans les cellules Hep3B	69
1.4.2	Transfection de siARNs dans les cellules Hep3B	69
1.4.3	Transfection de micro-ARNs dans les cellules Huh7, SNU398 et HeLa	70
2.	Techniques de biologie moléculaire	70
2.1	Extraction de l'ADN	70
2.2	PCR.....	71
3.	Techniques de biochimie	72
3.1	Extraction des protéines	72
3.2	Western blot	72
3.2.1	Electrophorèse en conditions dénaturantes.....	73
3.2.2	Transfert sur membrane PVDF.....	73
3.2.3	Immunodétection	73

3.3	Immunoprécipitation	74
4.	Immunofluorescence et immunohistochimie	74
4.1	Immunofluorescence	74
4.2	Immunohistochimie	75
5.	Expérimentation animale.....	76
5.1	Administration de tamoxifène	76
5.2	Infection par les adénovirus codant pour une Cre recombinase	77
5.3	Hépatectomie des deux tiers	77
5.4	Administration de diéthylnitrosamine	79
CHAPITRE 3 - RESULTATS		80
Axe 1 : Etude du rôle de Rnd3 dans la physiopathologie hépatique		80
1.	Résultats préliminaires obtenus dans le laboratoire sur l'implication de Rnd3 dans la prolifération des hépatocytes tumoraux	81
1.1	Impact de l'extinction de Rnd3 sur la prolifération <i>in vitro</i> des hépatocytes tumoraux	81
1.2	Impact de l'extinction de Rnd3 sur la croissance <i>in vivo</i> des hépatocytes tumoraux	83
1.3	Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans la diminution de la croissance cellulaire induite par l'extinction de Rnd3 dans les hépatocytes tumoraux.....	84
1.3.1	Analyse des acteurs de l'apoptose.....	84
1.3.2	Analyse des acteurs du cycle cellulaire	86
2.	Génération de souris présentant un KO conditionnel de Rnd3 spécifiquement dans le foie	88
2.1	Les souris Rnd3 floxées	88
2.2	Croisement des souris Rnd3 floxées avec des souris TTR-iCre recombinase.....	89
2.2.1	Mise au point d'un modèle murin KORnd3 ^{TTR}	89
2.2.2	Etude de l'efficacité de notre modèle murin KORnd3 ^{TTR}	92
2.2.3	Utilisation d'un adénovirus exprimant une Cre recombinase pour identifier le problème de notre modèle murin KORnd3 ^{TTR}	98
2.3	Injection des adénovirus exprimant une Cre recombinase chez les souris Rnd3 floxées.....	103
2.4	Croisement des souris Rnd3 floxées avec des souris Alb-iCre recombinase.....	110
3.	Rôle de Rnd3 dans la régénération hépatique.....	111
4.	Rôle de Rnd3 dans la carcinogenèse hépatique	117
4.1	Implication de l'extinction de Rnd3 dans la carcinogenèse hépatique spontanée	117
4.2	Implication de l'extinction de Rnd3 dans la carcinogenèse hépatique induite....	118

5. Résultats complémentaires	119
5.1 Régulation de l'expression de Rnd3 par les micro-ARNs, miR-200b et miR-200c, dans le carcinome hépatocellulaire	119
5.1.1 Impact de miR-200b et miR-200c sur l'expression de Rnd3 dans deux lignées de carcinomes hépatocellulaires	120
5.1.2 Impact de miR-200b et miR-200c sur l'expression de Rnd3 dans la lignée HeLa	123
5.2 IQGAP2, partenaire potentiel de Rnd3 dans le carcinome hépatocellulaire	125
5.2.1 Recherche d'une colocalisation entre les protéines Rnd3 et IQGAP2 dans la lignée Hep3B	126
5.2.2 Etude de l'interaction entre les protéines Rnd3 et IQGAP2.....	129
5.2.3 Impact de la variation d'expression de Rnd3 sur la localisation d'IQGAP2...	132
Axe 2 : Etude du rôle des GTPases Rho dans la formation et la fonction des invadosomes.	135
1. Implication des RhoGTPases classiques dans la fonction des invadosomes.....	135
2. Implication de la protéine Rnd3 dans la fonction des invadosomes.....	172
CHAPITRE 4 - DISCUSSION.....	175
CHAPITRE 5 - CONCLUSION.....	185
CHAPITRE 6 - REFERENCES	187
CHAPITRE 7 - ANNEXES	213
- Publication n°1	213
- Publication n°2	239

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN = acide désoxyribonucléique

AMT = amoeboid–mesenchymal transition

APS = ammonium persulfate

ARNm = acide ribonucléique messenger

BrdU = 5-bromo-2'-deoxyuridine

BSA = bovine serum albumin

CAG = Cytomegalovirus early enhancer, chicken β -Actin promoter, rabbit β -Globin splice acceptor

CAT = collective-amoeboid transition

CB = cytoskeletal buffer

CHC = carcinome hépatocellulaire

Cdc42 = cell division control protein 42 homolog

CMV = cytomégalovirus

Cre = causes recombination

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium

dNTP = deoxynucleotide tri-phosphate

eCFP = enhanced cyan fluorescent protein

EDTA = ethylene diamine tetraacetic acid

EGTA = ethylene glycol tetraacetic acid

EMT = epithelial–mesenchymal transition

ES = embryonnaire souche

FAPB = fatty-acid-binding protein

fl = floxé

Flp = flippase

FRET = fluorescence resonance energy transfer

FRT = Flp recombinase target

GAP = GTPase activating protein

GAPDH = Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GDI = guanine nucleotide dissociation inhibitor

GDP = guanosine diphosphate

GEF = guanine nucleotide exchange factor

GFP = green fluorescent protein

GTP = guanosine triphosphate

HES = hématoéine/éosine/safran

HRP = horseradish peroxidase

HSP = heat-shock protein

IQGAP1 = IQ motif containing GTPase activating protein 1

IQGAP2 = IQ motif containing GTPase activating protein 2

IRES = internal ribosome entry site

KO = knock-out

LIMK1 = LIM domain kinase 1

LIMK2 = LIM domain kinase 2

LoxP = locus of crossing-over

LSECs = liver sinusoidal endothelial cells

MDCK = Madin-Darby canine kidney

MEC = matrice extracellulaire

Mer = mouse estrogen receptor

MES = 2-(N-Morpholino) ethane sulfonic acid

MLCK = myosin light chain kinase

MMPs = matrix metalloproteinases

MOI = multiplicity of infection

Néo = néomycine

N-WASP = neural Wiskott-Aldrich syndrome protein

4-OHT = 4-hydroxy tamoxifène

PBS = phosphate buffered saline

PCR = polymerase chain reaction

PKC = protéine kinase C

PS = pénicilline/streptomycine

PVDF = polyfluorure de vinylidène

Ras = Rat sarcoma

Rho = Ras homologous

ROCK1 = Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase I

RPM = rotation par minute

RPMI = Roswell Park Memorial Institute

SA = serum albumin

SDS = sodium dodecyl sulfate

shARN = short hairpin RNA

siARN = small interfering RNA

SVF = sérum de veau foetal

TBS = Tris-buffered saline

TEMED = tetramethylethylenediamine

Tks4 = tyrosine kinase substrate 4

Tks5 = tyrosine kinase substrate 5

TTR = transthyretin

UI = unités internationales

ZEB2 = zinc finger E-box binding homeobox 2

LISTE DES FIGURES

Figure 1: La migration cellulaire se décompose en quatre étapes successives (Mattila et al., 2008).....	15
Figure 2: Les cellules peuvent utiliser différents modes de migration en trois dimensions (Friedl et al., 2003).....	18
Figure 3: La migration des cellules tumorales est caractérisée par une importante plasticité permettant de changer de mode de migration (Friedl et al., 2003).	20
Figure 4: Les invadosomes présentent différentes organisations structurales en fonction du type cellulaire (adapté de Linder et al., 2011).	21
Figure 5: La fonction des podosomes et des invadopodes est visualisée <i>in vitro</i> par la dégradation d'une matrice de gélatine fluorescente (Saltel et al., 2011).	22
Figure 6: La famille des GTPases Rho (Grise et al., 2009).	24
Figure 7: La régulation des GTPases de la famille Rho (adapté de Fukata et al., 2001).....	25
Figure 8: Rnd3 est incapable d'hydrolyser le GTP <i>in vitro</i> et est en permanence lié au GTP <i>in vivo</i> (adapté de Foster et al., 1996).	28
Figure 9: La protéine Rnd3 est farnésylée <i>in vivo</i> sur la séquence CTVM (adapté de Foster et al., 1996).	30
Figure 10: La protéine Rnd3 colocalise partiellement avec le réseau trans-golgien dans les cellules COS-7 (adapté de Riento et al., 2003).....	31
Figure 11: La protéine Rnd3 est majoritairement associée aux membranes (adapté de Riento et al., 2003).	32
Figure 12: Rnd3 peut inhiber la fonction de Rho A en activant p190RhoGAP ou en inhibant Syx (adapté de Goh et al., 2010).....	33
Figure 13: Rnd3 régule la progression du cycle cellulaire (adapté de Riou et al., 2010).	34
Figure 14: Les souris Rnd3 KO homozygotes sont de plus petite taille que les souris contrôles (Mocholi et al., 2011).....	36
Figure 15: L'ARNm de <i>RND3</i> est exprimé de façon ubiquitaire dans la majorité des tissus humains adultes et fœtaux (Nobes et al., 1998).....	39
Figure 16: L'organisation du foie (adapté de http://www.amfe.fr).....	43
Figure 17: Le lobule et l'acinus hépatiques (http://fbt.cz/en).	46
Figure 18: La voie de signalisation Wnt/ β -caténine régule la zonation du foie (Colnot et al., 2011).....	48
Figure 19: Progression histopathologique et caractéristiques moléculaires du carcinome hépatocellulaire (Farazi et al., 2006).....	54
Figure 20: La classification Barcelona Clinic Liver Cancer permet de corréler les stades de développement du CHC avec les traitements (adapté de Llovet et al., 2008).....	56
Figure 21: La voie de signalisation Wnt/béta-caténine (Moon et al., 2004).....	60
Figure 22: Les CHCs peuvent être classés en six sous-groupes selon l'analyse de leurs données transcriptomiques associée avec les altérations génomiques et les paramètres cliniques (Boyault et al., 2007).....	62
Figure 23: La GTPase Rnd3 est sous-exprimée dans les majorité des CHCs humains, à la fois au niveau de l'ARNm et de la protéine (adapté de Grise et al., 2012).....	64
Figure 24: L'extinction de Rnd3 par siARN induit une diminution de la croissance cellulaire dans la lignée Hep3B (adapté de Grise et al., 2012).	65
Figure 25: L'extinction de Rnd3 par siARN induit une augmentation de l'invasion cellulaire dans la lignée Hep3B (adapté de Grise et al., 2012).	66

Figure 26: L'extinction de Rnd3 par siARN induit une augmentation de l'invasion tumorale <i>in vivo</i> dans la lignée MHCC-97L (Ma et al., 2013).....	67
Figure 27: Description des trois ligatures nécessaires pour réaliser une hépatectomie des deux tiers chez la souris (adapté de Mitchell et al., 2008).....	78
Figure 28: L'extinction de Rnd3 par shARN provoque une inhibition de la croissance cellulaire dans la lignée Hep3B (donnée non publiée).	82
Figure 29: L'extinction de Rnd3 induit un retard de croissance des sphéroïdes formées à partir des cellules Hep3B (donnée non publiée).....	83
Figure 30: La perte de Rnd3 provoque une diminution de la croissance des tumeurs sous-cutanées induites par xénotransplantation chez la souris (donnée non publiée).	84
Figure 31: La perte de Rnd3 ne modifie pas l'expression de gènes pro et anti-apoptotiques dans la lignée Hep3B (donnée non publiée).	85
Figure 32: L'extinction de Rnd3 induit une diminution de l'expression de la cycline D1 dans les cellules Hep3B.	86
Figure 33: L'extinction de la protéine Rnd3 provoque une augmentation de l'expression de la cycline B1 dans les cellules Hep3B.....	87
Figure 34: Stratégie d'obtention et de génotypage des souris Rnd3 floxées (adapté de l'Institut clinique de la souris).	89
Figure 35: Génération d'un modèle murin présentant un KO inducible et hépato-spécifique de Rnd3 (KORnd3 ^{TTR}).....	91
Figure 36: L'allèle RND3 floxé est excisé dans le foie des souris KORnd3 ^{TTR} hétérozygotes traitées au tamoxifène.....	93
Figure 37: Le gène RND3 floxé est excisé uniquement dans le foie des souris KORnd3 ^{TTR} homozygotes traitées au tamoxifène.	95
Figure 38: L'extinction de la protéine Rnd3 n'est pas visible par western blot dans le foie des souris KORnd3 ^{TTR} homozygotes traitées au tamoxifène.	96
Figure 39: L'extinction de la protéine Rnd3 n'est pas visible dans les hépatocytes isolés des souris KORnd3 ^{TTR} homozygotes traitées au tamoxifène, malgré l'excision du gène RND3 floxé détectée en PCR.....	97
Figure 40: L'infection des hépatocytes primaires Rnd3 floxés avec un adénovirus exprimant une recombinaise Cre ubiquitaire induit une excision quasiment complète du gène RND3 floxé et une extinction de la protéine.....	99
Figure 41: L'ajout du métabolite actif du tamoxifène directement sur les hépatocytes primaires KORnd3 ^{TTR} homozygotes ne permet d'augmenter l'excision du gène RND3 floxé induite <i>in vivo</i> par l'administration de tamoxifène.....	101
Figure 42: La recombinaise CAG-Cre est fortement exprimée dans les hépatocytes Rnd3 floxés infectés avec l'adénovirus, alors que l'expression de la recombinaise TTR-iCre n'est pas détectable dans les hépatocytes KORnd3 ^{TTR} homozygotes avec la même technique.....	102
Figure 43: La GFP est exprimée dans le cytoplasme et le noyau de la majorité des cellules du foie après une infection avec les adénovirus CMV-GFP.....	104
Figure 44: La GFP est exprimée uniquement dans le noyau de la majorité des cellules du foie après une infection avec les adénovirus CMV-GFP-Cre.	105
Figure 45: L'expression de la recombinaise GFP-Cre induit une excision quasiment complète du gène RND3 floxé et une extinction de la protéine dans le foie des souris Rnd3 floxées.	107
Figure 46: L'infection par les adénovirus CMV-GFP ou CMV-GFP-Cre induit une inflammation hépatique majeure à 15 jours qui diminue progressivement au cours du temps.	109

Figure 47: L'expression de la protéine Rnd3 augmente progressivement à partir de la 8ème heure de régénération hépatique.....	111
Figure 48: Schéma de l'expérience d'hépatectomie des deux tiers réalisée chez les souris KORnd3 ^{TTR}	112
Figure 49: Les souris KORnd3 ^{TTR} montrent un retard de régénération hépatique à 48 heures malgré la faible excision du gène RND3 floxé chez ces animaux.	113
Figure 50: La régénération hépatique est identique à 72 heures chez les souris contrôles et KORnd3 ^{TTR}	114
Figure 51: Schéma de l'expérience d'hépatectomie des deux tiers réalisée chez les souris KORnd3 ^{Ad}	115
Figure 52: Les souris KORnd3 ^{Ad} montrent un retard de régénération hépatique à 36 heures.	116
Figure 53: Protocole de carcinogenèse hépatique spontanée chez les souris KORnd3 ^{TTR}	118
Figure 54: Protocole de carcinogenèse hépatique induite chez les souris KORnd3 ^{Ad}	119
Figure 55: L'extinction de l'expression de Drosha induit une augmentation de l'expression de Rnd3 dans les cellules Hep3B.....	120
Figure 56: La base de données TargetScan prédit deux sites de fixation de miR-200b et miR-200c dans la région 3' non traduite de l'ARNm de RND3.....	120
Figure 57: MiR-200b et miR-200c ne régulent pas l'expression de Rnd3 dans la lignée Huh7.	122
Figure 58: MiR-200b et miR-200c ne régulent pas l'expression de Rnd3 dans la lignée SNU398.	123
Figure 59: MiR-200b et miR-200c régulent tous deux l'expression de Rnd3 dans la lignée HeLa.	124
Figure 60: Les différents domaines de la protéine IQGAP2 humaine (adapté de Schmidt et al., 2012).....	126
Figure 61: Enrichissement membranaire des protéines Rnd3 et IQGAP2 dans la lignée Hep3B Myc-Rnd3.....	127
Figure 62: Colocalisation membranaire des protéines GFP-Rnd3 et IQGAP2 dans la lignée Hep3B surexprimant de façon transitoire la protéine GFP-Rnd3.....	128
Figure 63: Co-immunoprécipitation d'IQGAP2 avec Myc-Rnd3 dans la lignée Hep3B Myc-Rnd3.....	130
Figure 64: Co-immunoprécipitation de Myc-Rnd3 avec IQGAP2 dans la lignée Hep3B Myc-Rnd3.....	131
Figure 65: L'extinction de Rnd3 ne modifie pas la localisation d'IQGAP2 à la membrane plasmique dans les cellules Hep3B.	133
Figure 66: Les siARNs ciblant Rnd3 induisent une extinction de l'expression de la protéine dans les cellules MDA-MB-231.....	172
Figure 67: L'extinction de Rnd3 inhibe l'activité de dégradation de la gélatine des invadopodes présents dans les cellules MDA-MB-231.	173
Figure 68: L'ARNm de RND3 est plus fortement sous-exprimé dans les CHCs mutés sur le gène codant pour la β-caténine (donnée non publiée).	181
Figure 69: L'expression de l'ARNm de RND3 est corrélé négativement avec celui d'IQGAP2 dans les échantillons humains de CHCs (donnée non publiée).	183

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Présentation des facteurs de transcription régulant l'expression de l'ARNm de <i>RND3</i>	41
Tableau 2: Caractéristiques des différentes réactions de PCR utilisées à partir de l'ADN génomique extrait des souris.....	72
Tableau 3: Caractéristiques des programmes utilisés pour les marquages anti-BrdU et anti-GFP sur les coupes de tissus de souris.	76

AVANT-PROPOS

La protéine Rnd3/RhoE est un GTPase atypique de la famille Rho qui est dépourvue d'activité GTPasique et qui est maintenue en permanence dans une conformation active liée au GTP. Sa fonction principale est de réguler le cytosquelette d'actine en induisant un arrondissement des cellules et une réduction des fibres de stress grâce à une diminution de l'activation de la voie RhoA/ROCK. De par son rôle dans la régulation du cytosquelette d'actine, la protéine Rnd3 est impliquée dans la migration et l'invasion de nombreux types cellulaires parmi lesquels les cellules tumorales. Elle est également impliquée dans la régulation des processus de croissance cellulaire et d'apoptose. L'expression de la protéine Rnd3 a été décrite comme dérégulée dans de nombreux cancers dont notamment le carcinome hépatocellulaire auquel je me suis intéressée durant ma thèse.

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le principal cancer primitif du foie. Ce cancer est associé à un mauvais pronostic en raison d'un diagnostic tardif ainsi que de forts taux de récurrence post-opératoire et de développement de métastases. De plus, il n'existe pas de traitement thérapeutique efficace. La GTPase Rnd3 a été montrée comme sous-exprimée dans le CHC, à la fois au niveau de l'ARNm et de la protéine. La dérégulation de son expression est d'autant plus importante dans les CHCs de haut grade ainsi que dans les tumeurs présentant des nodules satellites correspondant à des métastases hépatiques. L'implication de la sous-expression de Rnd3 dans la migration et l'invasion tumorales a été confirmée *in vitro* dans des lignées cellulaires de CHC. La protéine Rnd3 est également impliquée dans la croissance des lignées d'hépatocytes tumoraux mais son rôle reste très dépendant de la lignée utilisée.

Sur la base de ces travaux, ma thèse s'est articulée autour de deux axes. Le premier axe a été d'étudier *in vivo* le rôle de Rnd3 d'une part dans la carcinogenèse hépatique et l'invasion tumorale, et d'autre part dans la physiologie hépatique. Pour cela, un modèle murin présentant un KO conditionnel et hépato-spécifique de Rnd3 (KORnd3^{Hep}) a été généré.

Le deuxième axe a porté sur l'analyse des invadosomes qui sont des structures d'actine protrusives impliquées dans l'invasion cellulaire. Nous avons tout d'abord cherché à identifier la signature minimum de ces structures permettant à la fois leur formation et leur fonction de dégradation de la matrice extracellulaire. Nous avons ensuite étudié le rôle de Rnd3 dans ces structures d'invasion.

Une synthèse bibliographique est réalisée dans la première partie de ce manuscrit afin de replacer le projet de thèse ainsi que l'analyse et l'implication des résultats obtenus dans leur contexte scientifique. Cette introduction aborde les sujets de migration et d'invasion tumorales, des GTPases de la famille Rho, du foie et du développement de carcinome hépatocellulaire et s'intéresse plus particulièrement à la protéine Rnd3 et à son implication

dans le CHC qui a été le thème central de ce projet. Les protocoles utilisés dans les expériences non publiées sont décrits dans la deuxième partie de ce manuscrit. Les résultats relatifs à l'implication de Rnd3 dans la physiologie et la carcinogenèse hépatiques, ainsi que ceux portant sur l'étude du rôle des GTPases Rho dans la formation et la fonction des invadosomes sont ensuite présentés dans la troisième partie et discutés en quatrième partie.

CHAPITRE 1 – INTRODUCTION

I. Migration et invasion tumorales

La migration cellulaire est un mécanisme critique pour l'invasion tumorale et le développement de métastases. Elle va notamment permettre aux cellules tumorales d'entrer dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques pour se disséminer dans la circulation et former des métastases à distance de la tumeur primaire. Les mécanismes de migration utilisés par les cellules tumorales sont très proches de ceux utilisés par les cellules normales lors de processus physiologiques comme la mise en place des tissus et des organes lors du développement embryonnaire, la cicatrisation des tissus endommagés, l'angiogenèse ou la recherche et la destruction de pathogènes par les cellules immunitaires.

1. La migration en quatre étapes

Les principes de la migration cellulaire ont été bien décrits dans les cellules normales comme les fibroblastes, les kératinocytes ou les myoblastes sur des surfaces planes (Abercrombie et al., 1977 ; Lauffenburger et al., 1996). Dans ces conditions, la migration cellulaire résulte d'un cycle continu de plusieurs étapes qui ont été décrites dans de nombreux types cellulaires (Mitchison et al., 1996). La première étape débute par la polarisation de la cellule et par la formation d'une protrusion membranaire au niveau du front de migration. Cette extension de la membrane est induite par la polymérisation du cytosquelette d'actine et dépend de l'activation des GTPases de la famille Rho. La deuxième étape consiste en l'établissement de liaisons appelées contacts focaux entre la protrusion membranaire et la matrice extracellulaire (MEC) sous-jacente. La troisième étape est la contraction de la cellule grâce à l'actomyosine qui va générer des forces de traction permettant à la cellule d'avancer vers le front de migration. La dernière étape correspond au détachement et à la rétractation de l'arrière de la cellule grâce au désassemblage des adhésions focales (figure 1).

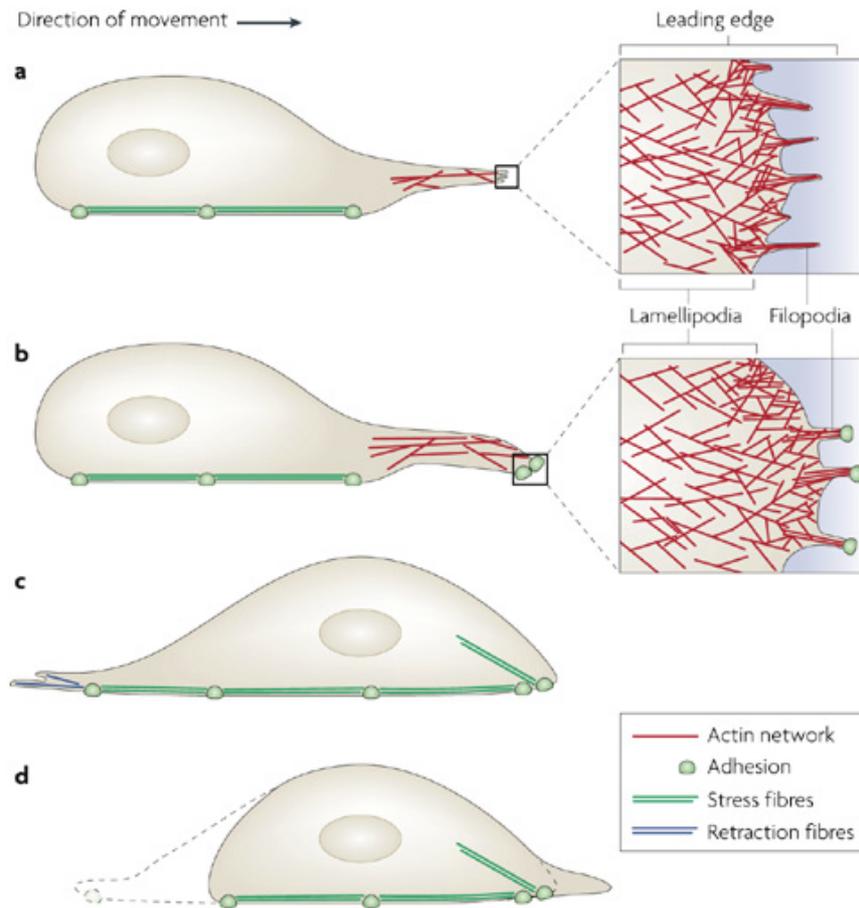


Figure 1: La migration cellulaire se décompose en quatre étapes successives (Mattila et al., 2008).

(a) La première étape de la migration débute par une polarisation de la cellule et par la formation d'une protrusion membranaire au niveau du front de migration. Les protrusions membranaires formées sont appelées des lamellipodes et des filopodes. (b) La deuxième étape consiste à établir des contacts focaux entre la protrusion membranaire et la matrice extracellulaire sous-jacente. (c) La troisième étape est la contraction de la cellule grâce à l'actomyosine qui va générer des forces de traction permettant à la cellule d'avancer vers le front de migration. (d) La dernière étape correspond au détachement et à la rétraction de l'arrière de la cellule grâce au désassemblage des adhésions focales.

Lors de la première étape, les protusions membranaires formées au niveau du front de migration des cellules en cours de migration peuvent être émises spontanément ou en réponse à des facteurs de croissance et des chimiokines et sont appelées les lamellipodes et les filopodes. Ces deux structures de morphologie différente, sont constituées d'actine filamenteuse mais aussi de nombreuses protéines de structure et de signalisation qui divergent entre les deux types de protusions.

- Les lamellipodes sont des protrusions plates constituées à leur base de longs filaments d'actine qui vont progressivement se ramifier en se rapprochant du front de migration. L'assemblage et la ramification de l'actine dépendent principalement du

complexe Arp2/3, dont l'activité est sous le contrôle de facteurs favorisant la nucléation de l'actine tels que la neural wiskott-aldrich syndrome protein (N-WASP) ou Scar/WAVE qui sont recrutés et activés au niveau de la membrane par les GTPases Rac1 et Cdc42 (Miki et al., 1998 ; Tomasevic et al., 2007). L'expression de Arp2/3 et WAVE2 est d'ailleurs corrélée à un mauvais pronostic et à une augmentation de l'invasion dans certains cancers, comme c'est le cas dans les carcinomes colorectaux où leur co-expression favorise le développement de métastases au niveau du foie (Iwaya et al., 2007). Les lamellipodes interagissent avec leur environnement via différentes molécules d'adhérence, incluant les intégrines, les cadhérines et CD44 qui est le récepteur de l'acide hyaluronique.

- Les filopodes sont de fines extensions membranaires constituées d'un réseau de fibres d'actine parallèles et très serrées qui se forment à la base des lamellipodes. Elles s'étendent au niveau du front de migration et permettent de détecter et d'assimiler des signaux extracellulaires tels que des chimioattractants ou des nutriments libérés par les vaisseaux sanguins. La formation des filopodes est basée sur un assemblage de filaments d'actine non ramifiés qui est contrôlé par des protéines comme la fascine, les protéines diaphanous et Ena/VASP régulées par les GTPases Rac et Cdc42. L'augmentation de l'expression de la fascine est également corrélée à un mauvais pronostic dans de nombreux types tumoraux comme les cancers pulmonaires ou mammaires (Pelosi et al., 2003 ; Rodríguez-Pinilla et al., 2006). Il a de plus été récemment décrit que les filopodes peuvent se transformer en lamellipodes en initiant une nucléation de l'actine ce qui montre que ces deux types de protusions sont inter-convertibles (Mongiu et al., 2007).

Lors de la deuxième étape, les adhésions focales permettent d'une part de fixer et de stabiliser la protrusion membranaire au niveau de la MEC, et d'autre part de constituer un point d'ancrage pour les forces contractiles médiées par l'actomyosine qui vont permettre de déplacer le reste du corps cellulaire vers l'avant lors de l'étape suivante. Au fur et à mesure du mouvement, ces contacts vont subir une maturation en complexes d'adhésion plus stables et étendus qui sont appelés des contacts focaux. L'établissement des contacts focaux entre la cellule et la MEC est médiée par des molécules d'adhésion, et notamment les récepteurs transmembranaires de la famille des intégrines, qui vont être engagées et recrutées pour interagir avec des ligands de la MEC. Les intégrines se couplent au cytosquelette d'actine grâce à des protéines adaptatrices et initient la formation d'un complexe focal qui va se développer pour former un contact focal. Selon le type cellulaire et la MEC, l'assemblage des contacts focaux et la migration sont régulés par différentes intégrines ou d'autres types de récepteurs.

Pendant le développement des contacts focaux, les filaments d'actine s'allongent et s'assemblent grâce à l'action de protéines comme l'alpha-actinine et la myosine II. Ces réseaux branchés d'actine à la membrane plasmique sont appelés de l'actine corticale alors que les câbles d'actine cytoplasmiques sont appelés des fibres de stress. L'assemblage des

fibres de stress et leur contraction sont induits par la voie RhoA/ROCK et sont contrôlés par la myosine II alors que l'actine corticale est, elle régulée par MLCK (myosin light chain kinase). Lors de la troisième étape, la contraction de l'actomyosine provoque le raccourcissement de la cellule nécessaire au déplacement des cellules.

Lors de la dernière étape, les adhésions cellule/matrice se détachent à l'arrière de la cellule pour permettre l'élongation du front de migration. Après le désassemblage des contacts focaux, la partie arrière de la cellule contenant le corps cellulaire et le noyau glisse vers l'avant. La vitesse de migration est limitée par le taux de renouvellement des événements d'adhésion et de dé-adhésion. La force des adhésions focales ne doit pas être trop forte pour favoriser la migration. Le désassemblage des adhésions focales à l'origine du détachement de l'arrière de la cellule fait intervenir des protéines de régulation du cytosquelette d'actine, de protéolyse, d'internalisation et de recyclage des intégrines.

Ces différentes étapes extrêmement bien décrites *in vitro* sur des surfaces planes et qui ont permis de définir les bases de la migration cellulaire, peuvent être retrouvées *in vivo*. Cependant, en fonction de leur origine, de leur environnement tridimensionnel et de leur expression génique, les cellules tumorales peuvent adopter différents types de migration.

2. Les différents modes de migration des cellules tumorales

Il a été montré que les cellules tumorales peuvent adopter trois principaux modes de migration dans un environnement en trois dimensions (Friedl et al., 2003 ; Sahai et al., 2003). Elles peuvent se déplacer de manière individuelle en utilisant un mode de migration mésenchymal ou amiboïde, ou migrer de manière collective (figure 2) (Friedl et al., 2003). Ces différents modes de migration se distinguent notamment par le maintien des jonctions cellulaires dans la migration collective, la mise en place d'une activité protéolytique dans les modes de migration mésenchymal et collectif et la capacité de déformation du corps cellulaire dans la migration de type amiboïde.

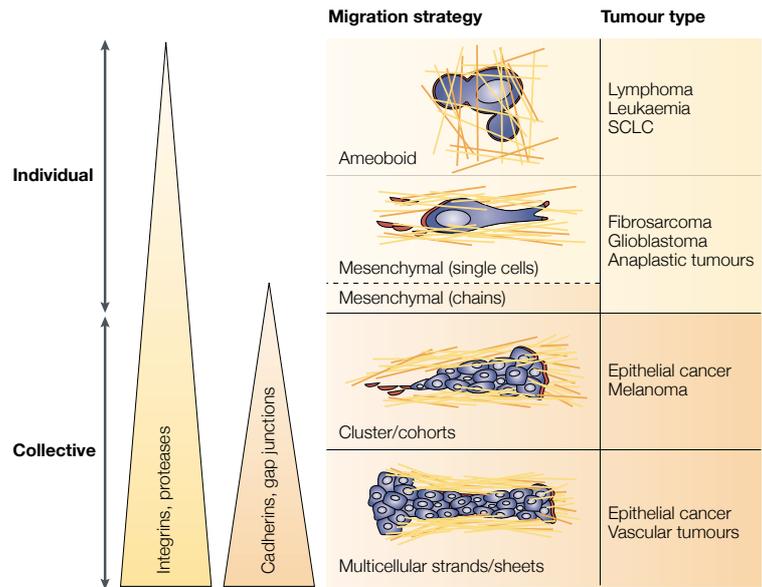


Figure 2: Les cellules peuvent utiliser différents modes de migration en trois dimensions (Friedl et al., 2003).

Les cellules peuvent se déplacer individuellement en utilisant un mode de migration mésenchymal ou amiboïde, ou alors migrer de façon collective. La migration mésenchymale est principalement caractérisée par une sécrétion de métalloprotéases matricielles dégradant la matrice extracellulaire afin de créer un espace de migration. La migration amiboïde dépend notamment de la capacité de déformation du corps des cellules grâce à la contraction de l'actomyosine médiée par la voie RhoA/ROCK. La migration collective est principalement caractérisée par le maintien des jonctions cellulaires et par une augmentation de l'activité des métalloprotéases afin de permettre respectivement le déplacement des cellules en groupe et la dégradation polarisée de la matrice extracellulaire. SCLC = carcinome du poumon à petites cellules.

2.1 La migration de type mésenchymateuse

La migration mésenchymale suit le processus de migration décrit ci-dessus avec une cinquième étape correspondant à la dégradation de la matrice extracellulaire adjacente pour créer un espace de migration. Pour cela, les cellules sécrètent des métalloprotéases matricielles (MMPs) au niveau de structures d'adhésion spécialisées appelées des invadosomes. Les cellules ont une morphologie proche des fibroblastes qui dépend de la dynamique d'adhésion médiée par les intégrines et de la présence de différentes forces de traction aux deux pôles de la cellule. L'activation des MMPs et de l'urokinase est nécessaire pour le maintien du phénotype mésenchymateux et la migration. Le potentiel invasif de la migration mésenchymale résulte principalement des contacts focaux et de la contractilité médiée par l'actomyosine qui sont contrôlés par Rho, ROCK et MLCK. Cette migration est ainsi perturbée par l'inhibition des intégrines, des RhoGTPases ou de MLCK. En cas d'inhibition de l'activité des MMPs, la migration mésenchymale peut évoluer en migration amiboïde. La migration mésenchymale est retrouvée dans des tumeurs comme les fibrosarcomes, les gliomes et les cancers épithéliaux dédifférenciés.

2.2 La migration de type amiboïde

La migration amiboïde correspond à un déplacement des cellules dans l'environnement constitué de matrice extracellulaire et de fibres de collagène grâce à des contorsions médiées par un resserrement du corps cellulaire et une contraction de l'actomyosine médiée par une forte activité de la voie de signalisation RhoA/ROCK. L'actine corticale permet aux cellules d'interagir rapidement et faiblement avec la matrice ce qui permet d'obtenir une migration plus rapide que le mode mésenchymateux. Les cellules, de morphologie arrondie, sont très déformables en raison de l'absence de contacts focaux et de fibres de stress et ne sont pas capables de dégrader la MEC. Le mouvement amiboïde a été décrit dans les cellules d'une amibe *Dictyostelium discoideum* et est utilisé par les leucocytes ainsi que par certaines cellules tumorales comme les lymphomes ou les cancers du poumon à petites cellules (Sahai et al., 2003).

2.3 La migration collective

La migration collective est impliquée dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques comme la régénération des épithéliums, l'angiogenèse ou l'invasion des tissus par des cellules tumorales. Les cellules agrégées fonctionnent comme une unité fonctionnelle avec l'assemblage des filaments d'actine corticale le long des jonctions cellulaires. Une traction migratoire est générée pour les cellules localisées au niveau du front de migration avec une activité des protusions membranaires, un engagement des intégrines et une augmentation de l'activité de MT1-MMP et MMP2 conduisant à une dégradation polarisée de la MEC. Ce type de migration nécessite de l'adhésion et de la communication entre les cellules grâce notamment à l'expression de connexines, de cadhérines et d'immunoglobulines. Dans les cellules tumorales, il existe deux types de migration collective : l'émission de fines protusions cellulaires à partir de la tumeur primaire générant de l'invasion locale ou le détachement de petits groupes de cellules pouvant pénétrer dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques.

La migration collective est principalement retrouvée dans les tumeurs très différenciées comme le cancer du sein lobulaire, le cancer de la prostate ou le cancer du poumon à grandes cellules. Elle présente plusieurs avantages pour la migration des cellules tumorales tels qu'une forte concentration de facteurs pro-migratoires et de protéases ainsi qu'une protection des cellules internes contre le système immunitaire. De plus, les populations clonales migrant collectivement sont hétérogènes ce qui permet de cumuler plusieurs fonctions pro-tumorales au sein de l'unité fonctionnelle de migration comme par exemple une augmentation des capacités invasives et une résistance à l'apoptose.

2.4 La plasticité de la migration des cellules tumorales

La migration des cellules tumorales dépend de nombreux paramètres parmi lesquels les adhésions cellulaires, la force de traction médiée par l'actomyosine, l'adhésion à la MEC ou encore la capacité de dégradation de cette matrice. La modification de ces paramètres peut entraîner un changement du mode de migration de ces cellules. Les cellules peuvent ainsi passer d'une migration individuelle de type mésenchymale à une migration de type amiboïde ou inversement grâce respectivement à la transition mésenchymale-amiboïde (MAT) ou à la transition amiboïde-mésenchymale (AMT). Les cellules peuvent aussi passer d'une migration collective à une migration individuelle grâce à la transition collective-amiboïde (CAT). Des cellules épithéliales peuvent aussi acquérir les propriétés de dégradation de la MEC et d'invasion caractéristiques du mode mésenchymal grâce à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (figure 3) (Friedl et al., 2003).

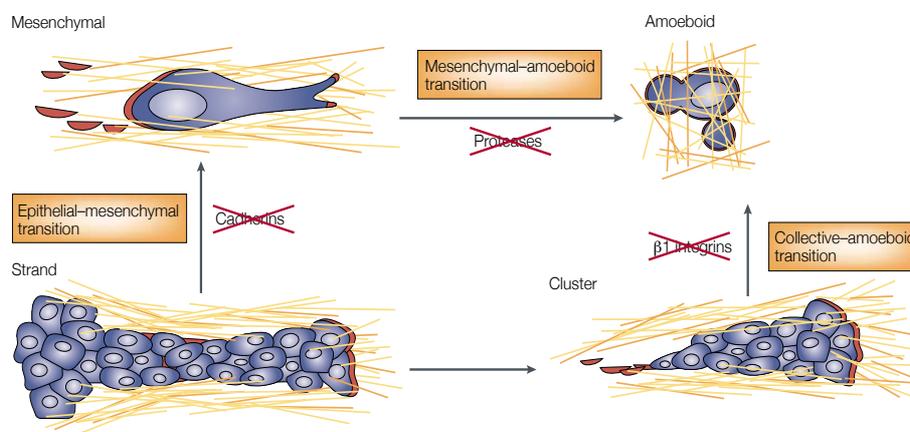


Figure 3: La migration des cellules tumorales est caractérisée par une importante plasticité permettant de changer de mode de migration (Friedl et al., 2003).

Les cellules tumorales peuvent changer de mode de migration et passer par exemple d'une migration individuelle mésenchymale à une migration individuelle de type amiboïde grâce à la transition mésenchymale-amiboïde (MAT). Elles peuvent aussi passer d'une migration collective à une migration individuelle grâce à la transition collective-amiboïde (CAT). Les cellules épithéliales peuvent acquérir les propriétés de dégradation de la matrice extracellulaire et d'invasion du mode de migration mésenchymal grâce à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT).

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) correspond à l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux pro-migratoire par des cellules de phénotype épithéliales. Ce processus est très important dans l'invasion tumorale et le développement de métastases avec la transition d'une migration collective vers une migration individuelle. Elle est caractérisée par une perte des jonctions intercellulaires avec une diminution de l'expression de la E-cadhérine, une conservation de l'expression de protéines favorisant la migration comme les intégrines ou les GTPases Rho, ainsi que par une perte de l'expression des cytokératines épithéliales et une expression de la vimentine. L'EMT représente un exemple de plasticité fonctionnelle et phénotypique qui apparaît au cours de la progression tumorale.

3. Les invadosomes, des structures dédiées à l'invasion cellulaire

Les invadosomes sont des structures d'adhésion cellulaire dynamiques qui forment des protusions au niveau basal des cellules afin de permettre à la fois une interaction de la cellule avec la MEC et une dégradation de cette dernière. Ces structures ont été identifiées pour la première fois dans des fibroblastes transformés par le virus du sarcome de Rous (Chen et al., 1985 ; Tarone et al., 1985). Le terme « invadosomes » regroupe à la fois les podosomes observés dans les cellules normales et les invadopodes présents dans les cellules tumorales et les fibroblastes transformés. La formation des podosomes est inductible dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Hai et al., 2002 ; Moreau et al., 2003) ou constitutive comme par exemple dans les macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles et les ostéoclastes (Davies et al., 1977 ; Zambonin-Zallone et al., 1988 ; Burns et al., 2001 ; Calle et al., 2006). Les invadopodes sont retrouvés dans de nombreux types de cellules tumorales comme les cellules de mélanome, de cancer du sein ou de cancer de la vessie ainsi que dans les fibroblastes transformés (Tarone et al., 1985 ; Monsky et al., 1994 ; Lizarraga et al., 2009 ; Sutoh et al., 2010). Les invadosomes peuvent se présenter sous différentes formes en fonction des types cellulaires et sont principalement organisés en points, en agrégats ou en rosettes (figure 4) (Linder et al., 2011).

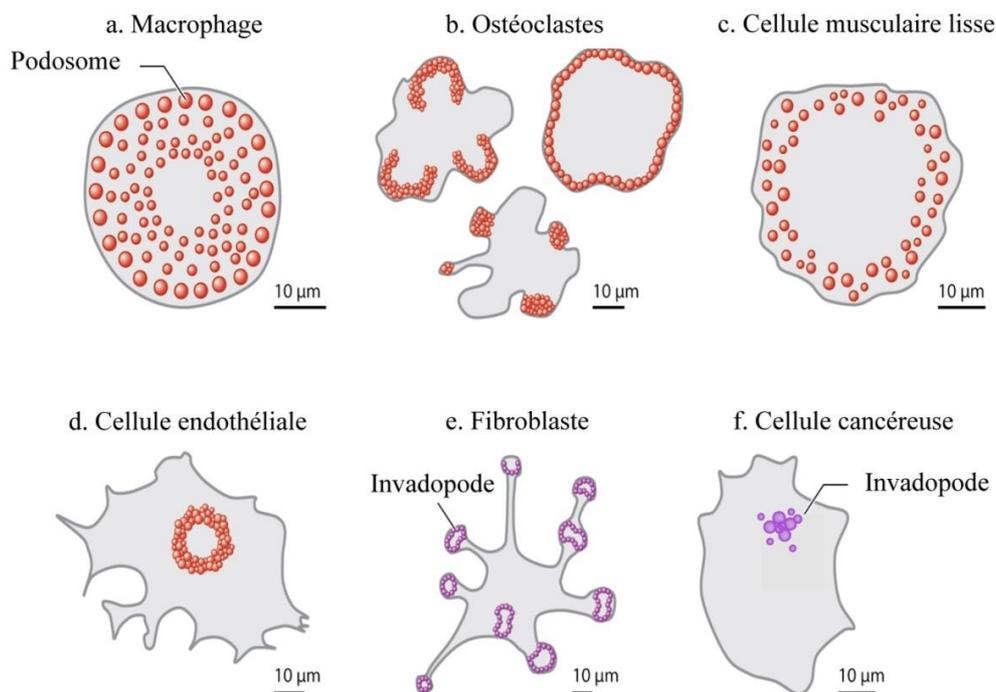


Figure 4: Les invadosomes présentent différentes organisations structurales en fonction du type cellulaire (adapté de Linder et al., 2011).

Les invadosomes regroupent à la fois les podosomes présents dans les cellules normales (a, b, c et d ; rouge) et les invadopodes retrouvés dans les fibroblastes transformés et les cellules cancéreuses (e et f ; violet). Ils peuvent être organisés en points, en agrégats ou en rosettes selon le contexte cellulaire.

Les invadosomes sont composés d'un cœur d'actine polymérisée qui est associé à des protéines d'échafaudage (ex : cortactine, Tks4 et Tks5), à des protéines d'adhésion (ex : taline, paxilline, vinculine) ainsi qu'à des récepteurs (ex : intégrines, CD44). Ces structures sont dynamiques et sont régulées par de nombreuses protéines parmi lesquelles les activateurs de la polymérisation N-WASP et Arp2/3, les kinases Src et les RhoGTPases RhoA et Cdc42. Leur composition peut toutefois varier en fonction du type cellulaire dans lequel ces structures se forment.

La fonction principale des invadosomes est de dégrader la MEC, et plus particulièrement les protéines de cette matrice telles que la fibronectine, le collagène ou encore la laminine (Kelly et al., 1994). Cette activité a tout d'abord été observée dans les fibroblastes transformés (Chen et al., 1985 ; Monsky et al., 1993) avant d'être visualisée dans d'autres types cellulaires tels que les cellules cancéreuses (Nakahara et al., 1997), les ostéoclastes (Sato et al., 1997 ; Delaissé et al., 2000) ou encore les cellules endothéliales (Osiak et al., 2005 ; Tatin et al., 2006). Cette activité de dégradation peut être observée *in vitro* en déposant les cellules sur une matrice conjuguée à un composé fluorescent comme par exemple la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (figure 5).

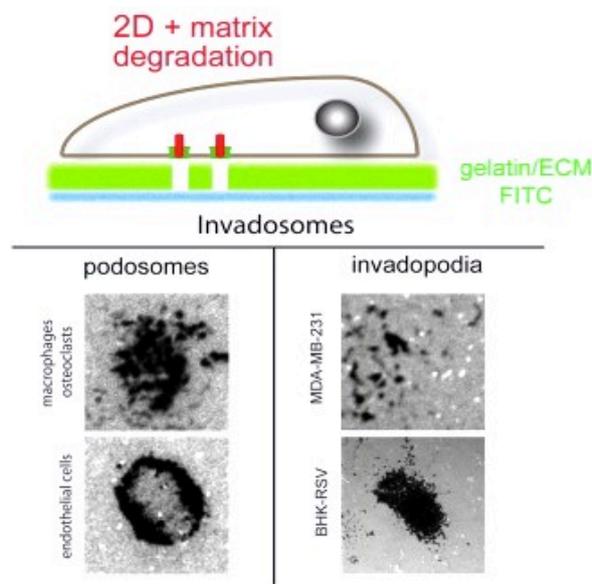


Figure 5: La fonction des podosomes et des invadopodes est visualisée *in vitro* par la dégradation d'une matrice de gélatine fluorescente (Saltel et al., 2011).

La partie supérieure de la figure représente une cellule formant des invadosomes qui sont capables de dégrader la matrice de gélatine conjuguée à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) sur laquelle la cellule repose. La partie inférieure contient des images de dégradation de la gélatine FITC, visualisées par l'absence de marquage fluorescent, par les invadosomes formés dans différents types cellulaires.

L'activité de dégradation nécessite le recrutement de deux principaux types d'enzymes qui sont les métalloprotéases matricielles (MMPs) et les sérines protéases. Les MMPs impliquées dans la fonction des invadosomes sont notamment les gélatinases MMP-2 et MMP-9 et la collagénase MT1-MMP (Monsky et al., 1993 ; Nakahara et al., 1997 ; Redondo-

Munoz et al., 2006 ; Xiao et al., 2010). D'autres métalloprotéases de la famille ADAM, ADAM8, ADAM12, ADAM15 et ADAM19, sont aussi recrutées au niveau des invadosomes (Abram et al., 2003). Les sérines protéases impliquées comprennent essentiellement les séprases qui sont impliquées dans la dégradation de la MEC et l'invasion cellulaire (Linder et al., 2007). Seul le mécanisme impliqué dans le recrutement des MMPs au niveau des invadosomes est connu. Ces dernières sont recrutées grâce au trafic de vésicules associé aux microtubules qui vont s'ancrer et fusionner avec la membrane plasmique pour libérer les MMPs (Poincloux et al., 2009 ; Linder et al., 2011).

La fonction principale des invadosomes dans la dégradation de la MEC suggère un rôle majeur de ces structures dans l'invasion des cellules tumorales. Ils pourraient notamment permettre de dégrader la membrane basale comme cela a été montré *in vitro* à partir de cellules tumorales et *in vivo* chez *C. elegans* (Schoumacher et al., 2011 ; Kelley et al., 2014) afin de permettre aux cellules tumorales d'envahir les tissus environnants.

En plus de ce rôle dans la dégradation de la MEC et l'invasion cellulaire, les invadosomes sont impliqués dans d'autres fonctions comme la détection de la rigidité de la matrice. En effet, les podosomes ont été décrits comme des mécanosenseurs qui sont sensibles à la rigidité du substrat et aux forces appliquées (Collin et al., 2008). Ce rôle a également été décrit dans les invadopodes dont la formation et l'activité de dégradation sont augmentées par la rigidité de la matrice (Alexander et al., 2008). Ces structures pourraient aussi jouer un rôle dans l'adhésion cellulaire notamment grâce à l'expression des intégrines et des protéines d'adhérence comme la taline, la vinculine et la paxilline, ainsi que dans la migration cellulaire (Linder et al., 2011). Les invadosomes peuvent aussi des rôles plus inattendus comme par exemple dans la fusion directe de deux cellules. C'est le cas des podosomes qui participent à la formation du pore lors de la fusion du myoblaste (Sung et al., 2011).

L'étude des invadosomes *in vivo* est très récente en raison de la difficulté à les observer dans un organisme vivant et à les distinguer d'autres structures invasives comme les lamellipodes. Leur rôle a été mis en évidence *in vivo* pour la première fois en 2012 dans le modèle du poisson zèbre (Seiler et al., 2012). Cette étude a permis de visualiser les invadopodes *in vivo* et de montrer leur rôle dans la dégradation de la MEC et l'invasion cellulaire d'un tissu *in vivo*. Le rôle des invadopodes a ensuite été confirmé en utilisant notamment la technique de microscopie intravitale qui a permis de montrer l'implication de ces structures dans l'extravasation des cellules tumorales et ainsi dans le développement de métastases (Leong et al., 2014).

II. Les GTPases de la famille Rho

1. Les membres de la famille des GTPases Rho

La famille des protéines Rho (Ras homolog) est constituée de petites GTPases qui appartiennent à la superfamille Ras (Madaule et al., 1985). Chez l'homme, cette famille compte vingt-trois membres qui sont répartis en six sous-familles selon l'homologie de leur séquence en acides aminés : Rho (RhoA/B/C), Rac (Rac1/2/3 et RhoG), Cdc42 (Cdc42, TCL, TC10, Chp et Wrch1), Rnd (Rnd1/2/3), RhoBTB (RhoBTB1/2/3) et Miro (Miro1/2). Les trois membres restants, RhoD/F/H, n'appartiennent à aucune sous-famille (figure 6).

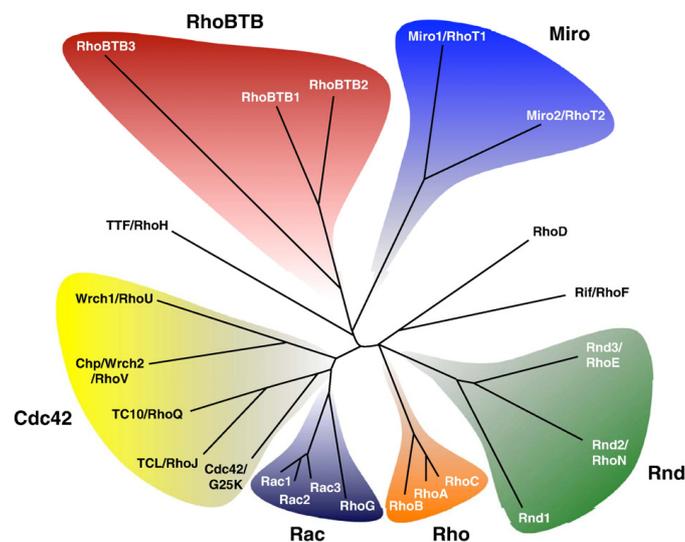


Figure 6: La famille des GTPases Rho (Grise et al., 2009).

Arbre phylogénétique basé sur les similarités de séquence entre les différents membres de la famille Rho. Cette famille peut être subdivisée en six sous-familles : Rho, Rac, Cdc42, Rnd, RhoBTB et Miro.

2. Le cycle et la régulation des GTPases Rho

La plupart des GTPases Rho cyclent entre un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP. Elles sont activées par les protéines RhoGEFs (guanine nucleotide exchange factors) qui vont échanger le GDP pour du GTP en réponse à des signaux provenant en amont de facteurs de croissance ou de l'engagement des intégrines. Quand les GTPases Rho sont liées au GTP, elles vont interagir avec des effecteurs en aval pour induire un signal intracellulaire. A l'inverse, ces protéines sont inactivées par les protéines RhoGAPs (GTPases activating proteins) qui vont stimuler l'activité intrinsèque des RhoGTPases, c'est à dire l'hydrolyse du GTP en GDP (figure 7).

Les GTPases Rho sont aussi majoritairement régulées par les protéines RhoGDIs (guanine nucleotide dissociation inhibitors) qui vont contrôler le trafic de ces protéines entre le

cytoplasme et les membranes. En effet, les GTPases Rho sont modifiées au niveau post-traductionnel par l'ajout d'un groupement isoprényl sur le résidu cystéine d'un motif CAAX situé à leur extrémité C-terminale ce qui permet l'ancrage à la membrane plasmique (Roberts et al., 2008). Les RhoGDIs se fixent sur les GTPases inactives pour les extraire de la membrane plasmique et les séquestrer dans le cytoplasme. Elles protègent alors ces protéines d'une activation inappropriée en inhibant la dissociation du GDP, d'un mauvais repliement et d'une dégradation par le protéasome afin de maintenir un important réservoir de GTPases inactives rapidement mobilisables (figure 7) (Garcia-Mata et al., 2011). Les RhoGDIs peuvent par ailleurs aussi réguler l'activité des GTPases actives en inhibant l'hydrolyse du GTP (Hart et al., 1992).

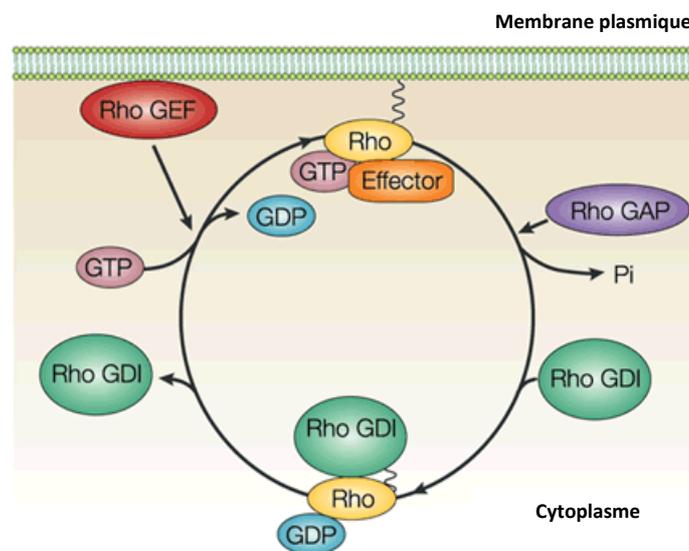


Figure 7: La régulation des GTPases de la famille Rho (adapté de Fukata et al., 2001).

Les GTPases Rho oscillent entre une forme active liée au GTP et une forme inactive liée au GDP. Elles sont activées par les RhoGEFs qui catalysent l'échange du GDP en GTP, et inactivées par les RhoGAPs qui stimulent l'hydrolyse du GTP. Les GTPases Rho possèdent un groupement isoprényl qui leur permet de s'ancrer à la membrane plasmique. Les RhoGDIs se fixent sur les GTPases liées au GDP pour les extraire de la membrane plasmique et les stocker dans le cytoplasme.

Il existe cependant six membres atypiques de la famille Rho (Rnd1, Rnd2, Rnd3, RhoH, RhoBTB1 et RhoBTB2) qui ne sont pas capables de cycliser et qui sont en permanence dans une conformation active liée au GTP (Riou et al., 2010). Ces protéines présentent des substitutions au niveau des acides aminés nécessaires à l'hydrolyse du GTP (par exemple, G17S/A64S/Q66S pour la protéine Rnd3) (Foster et al., 1996). Par conséquent, ces protéines ne sont pas régulées de manière classique par les GAPs et les GEFs, mais plutôt au niveau de leur expression et de leur localisation. De plus, les protéines Rnd ne sont pas régulées par les RhoGDIs. Leur localisation est soit préférentiellement membranaire comme Rnd1 et Rnd3, soit plutôt cytoplasmique comme Rnd2.

Les GTPases Rho sont aussi régulées par d'autres modifications post-traductionnelles qui vont modifier leur activation, leur localisation, leur demi-vie ainsi que leurs fonctions. Ces protéines peuvent être phosphorylées par plusieurs kinases, comme c'est le cas pour RhoA, ce qui favorise l'interaction avec les RhoGDIs et le détachement de la membrane plasmique conduisant par conséquent à une inactivation des GTPases (Lang et al., 1996). De plus, cette phosphorylation protège les GTPases Rho de la dégradation par le protéasome ce qui pourrait permettre de constituer un réservoir de GTPases actives rapidement disponibles en l'absence de GEFs (Loirand et al., 2006). Il existe aussi des modifications post-traductionnelles qui vont activer les GTPases Rho comme la déamidation, la transglutamination ou encore la sérotonylation. L'activation de ces protéines reste cependant transitoire car les GTPases Rho peuvent être ubiquitinylées pour être dégradées par le protéasome (Doye et al., 2002).

3. Les fonctions des RhoGTPases

La fonction principale des RhoGTPases est le remodelage du cytosquelette d'actine. Les trois principaux membres de cette famille, RhoA, Rac1 et Cdc42, jouent un rôle majeur dans cette fonction en induisant notamment la formation de structures d'actine particulières. La GTPase RhoA est impliquée dans la formation des fibres de stress et des adhésions focales notamment grâce à l'assemblage des filaments d'actomyosine médié par une activation de ROCK ou à la polymérisation de l'actine induite par la formine mDia (Ridley et al., 1992). La protéine Rac1 permet la formation des lamellipodes et des replis membranaires qui sont deux structures d'actine protrusives impliquées dans la migration cellulaire (Ridley et al., 1992). L'activation de Rac1 à la membrane conduit à la formation d'un réseau branché d'actine mis en place par la protéine WAVE/Scar et le complexe Arp2/3 permettant de repousser la membrane plasmique vers l'avant pour générer ces deux types de protrusions. La GTPase Cdc42 participe à la formation des filopodes qui sont de fines protrusions d'actine impliquées notamment dans la migration et les jonctions intercellulaires (Nobes et al., 1995). Ces structures sont constituées grâce à la polymérisation de l'actine induite par l'activation de plusieurs protéines dont N-WASP/Arp2/3, mDia2 et IRSp53 par Cdc42. Cette GTPase participe aussi à la mise en place de la polarité dans les cellules en migration, et notamment à la réorientation du centre organisateur des microtubules vers le front de migration grâce à son interaction avec les protéines Par3, Par6 et PKC atypique. Grâce à ce rôle de régulateur du cytosquelette d'actine, les RhoGTPases sont particulièrement impliquées dans les processus de migration et d'invasion cellulaire qui nécessitent une activation coordonnée des différentes voies de signalisation induites par ces protéines.

Mais leurs fonctions ne se limitent pas à l'organisation structurale du cytosquelette. Les RhoGTPases participent, avec les autres GTPases de la famille Ras, à de très nombreux processus cellulaires qui impliquent ou pas une réorganisation du cytosquelette d'actine. C'est notamment le cas de la sécrétion et du transport vésiculaire, de la contraction

cellulaire, de la phagocytose ainsi que de la dynamique des microtubules (Etienne-Manneville, 2002 ; Jaffe et Hall, 2005). Les protéines Rho régulent également la signalisation nucléaire et la transcription de certains gènes. Enfin, les protéines Rac et Rho pourraient jouer un rôle important dans la prolifération cellulaire et la transformation par l'oncogène Ras.

III. Rnd3

1. Identification et propriétés de Rnd3

La protéine Rnd3, également appelée RhoE, Rho8 ou ArhE, appartient à la sous-famille Rnd des GTPases de la famille Rho. Cette sous-famille constituée de trois membres (Rnd1, Rnd2 et Rnd3) est apparue au cours de l'évolution dans les chordés (Boureux et al., 2007). La protéine Rnd3 est le premier membre de la famille à avoir été identifié et ceci grâce à sa capacité d'interaction avec p190RhoGAP, une GAP de RhoA (Foster et al., 1996).

Comme décrit précédemment, les membres de la sous-famille Rnd sont des RhoGTPases atypiques. En effet, Rnd3 n'est pas capable d'hydrolyser le GTP *in vitro* (figure 8A), et ceci même en présence de RhoGAPs. Dans les conditions expérimentales testées, RhoA hydrolyse plus de 75% du GTP fixé alors qu'aucune hydrolyse du GTP n'est détectée avec Rnd3 (Foster et al., 1996). De plus, cette caractéristique a été confirmée *in vivo* avec une association constitutive de Rnd3 avec du GTP (figure 8B) (Foster et al., 1996).

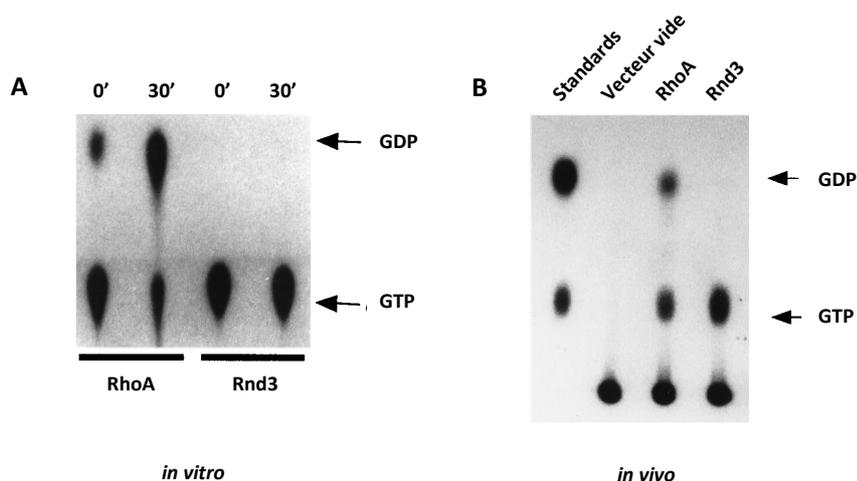


Figure 8: Rnd3 est incapable d'hydrolyser le GTP *in vitro* et est en permanence lié au GTP *in vivo* (adapté de Foster et al., 1996).

A. Les protéines de fusion GST-RhoA et GST-Rnd3 ont été fixées sur des billes d'agarose couplées au glutathion. Après la liaison du GTP marqué au phosphore 32 sur le phosphate alpha, les protéines ont été incubées ou pas pendant 30 minutes à 37°C. Les nucléotides fixés ont ensuite été élués et analysés par chromatographie sur couche mince et autoradiographie. La faible quantité de GDP visible dans la condition RhoA au temps 0 reflète une faible hydrolyse du GTP qui a eu lieu à 4°C avant l'incubation à 37°C. **B.** Les cellules COS ont été transfectées avec un vecteur d'expression mammifère (Rc/CMV ; Invitrogen) contenant la séquence de RhoA ou de Rnd3 marquée avec une étiquette HA, ou avec un vecteur vide. Après 24 heures, les cellules ont été incubées pendant 18 heures avec des phosphates inorganiques marqués au phosphore 32. Les extraits protéiques ont été analysés par immunoprécipitation avec un anticorps ciblant l'étiquette HA. Les nucléotides fixés ont ensuite été élués et analysés par chromatographie sur couche mince et autoradiographie. Des échantillons de GTP et de GDP marqués au phosphore 32 (standards) ont aussi été utilisés pour identifier la zone de migration de ces deux nucléotides.

Ainsi, malgré son appartenance à la famille des GTPases Rho, la protéine Rnd3 est dépourvue d'activité GTPasique et est maintenue en permanence dans une conformation active liée au GTP. Cette caractéristique est due à la substitution de trois acides aminés à des positions clés pour l'hydrolyse du GTP. En effet, les acides aminés en position 17, 64 et 66 sont tous remplacés par des sérines dans la séquence protéique de Rnd3 (Foster et al., 1996). Le remplacement de ces trois acides aminés avec ceux normalement présents dans les protéines Ras et Rho (Gly-17, Ala-64 et Gln-66) permet de restaurer l'activité GTPasique de Rnd3 en induisant une hydrolyse du GTP plus importante que celle induite par RhoA dans les mêmes conditions (Foster et al., 1996). Le remplacement de seulement deux de ces acides aminés, Ala-64 et Gln-66, permet à la protéine Rnd3 d'hydrolyser le GTP à un niveau comparable à celui de RhoA. Cependant, le remplacement de ces acides aminés ne permet pas de restaurer la sensibilité de Rnd3 à l'activité des RhoGAPs, ce qui suggère que cette caractéristique dépend d'autres acides aminés. La substitution de ces trois acides aminés est également retrouvée dans la protéine Ras mutée ce qui provoque aussi un défaut d'hydrolyse du GTP et une résistance à l'action des GAPs (Colby et al., 1986 ; Trahey et al., 1987 ; Feig et al., 1988). Ces mutations confèrent un potentiel oncogénique à Ras qui reste en permanence dans un état activé.

La cristallisation de la protéine Rnd3 a permis d'identifier les modifications structurales responsables de l'absence d'activité GTPase et de la résistance à l'action des RhoGAPs (Fiegen et al., 2002). Rnd3 est incapable d'hydrolyser le GTP en raison de la substitution de quatre acides aminés (G17S, A18Q, A64S, Q66S) qui vont perturber la position et la stabilisation de molécules d'eau autour du phosphate γ du GTP. Elle est également insensible à la régulation par les RhoGAPs à cause de l'absence de glutamine en position 66 et de l'encombrement stérique généré notamment par la substitution G17S qui empêchent l'accès du résidu arginine des RhoGAPs (appelé « arginine finger ») au domaine catalytique de Rnd3.

2. Localisation cellulaire

Contrairement aux RhoGTPases classiques qui possèdent un motif CAAX à leur extrémité C-terminale, la protéine Rnd3 contient la séquence CTVM (correspondant à un motif CXXM) qui peut-être modifiée post-traductionnellement par l'ajout d'un groupement farnésyl. L'existence de cette modification post-traductionnelle a été démontrée *in vivo* pour Rnd3 (figure 9) (Foster et al., 1996).

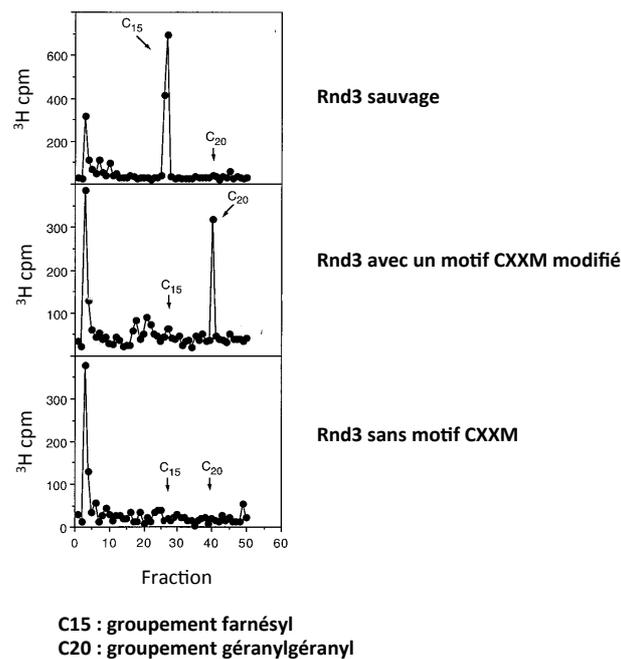


Figure 9: La protéine Rnd3 est farnésylée in vivo sur la séquence CTVM (adapté de Foster et al., 1996).

Les cellules COS ont été transfectées avec un vecteur contenant la séquence de Rnd3 marquée avec une étiquette HA. Dans cette expérience, trois versions de Rnd3 ont été utilisées : une version sauvage, une version mutée sur le dernier acide aminé du motif CXXM en C-terminal (CTVL) et une version délétée du motif CXXM. Les cellules ont été incubées avec du mévalonate marqué au tritium (^3H) qui est un précurseur des groupements farnésyl et géranylgeranyl. Les extraits protéiques ont été immunoprécipités avec un anticorps dirigé contre l'étiquette HA. Les groupements prényls marqués au tritium ont été clivés avant d'analyser leur radioactivité par chromatographie en phase liquide à haute performance et en phase inverse. Des groupements prényls contrôles (farnésol and géranylgeraniol), marqués par des flèches sur la figure, ont été ajoutés dans chaque échantillon afin de permettre leur détection. Le groupement farnésyl est constitué de 15 carbones alors que le groupement géranylgeranyl est composé de 20 carbones.

La farnésylation est également retrouvée dans d'autres GTPases comme les protéines Ras et est nécessaire à leur localisation à la membrane plasmique (Glomset et al., 1994). De manière similaire, cette modification post-traductionnelle est indispensable à la localisation de Rnd3 à la membrane plasmique dans de nombreuses lignées cellulaires comme les cellules d'ostéosarcomes U2OS, les fibroblastes NIH3T3, les cellules de carcinome épidermoïde A431, les cellules de cancers du sein Con8 ou encore les cellules rénales COS-7 (Foster et al., 1996 ; Katoh et al., 2002 ; Rubenstein et al., 2005 ; Roberts et al., 2008 ; Hidalgo-Carcedo et al., 2011). En effet, la délétion du motif CXXM ou l'utilisation d'inhibiteurs de farnésyl-transférase provoque la perte de la localisation membranaire de Rnd3, ainsi qu'une accumulation de cette protéine dans le cytoplasme et le noyau des cellules (Foster et al., 1996 ; Roberts et al., 2008).

Cependant à l'inverse, la farnésylation de Rnd3 peut aussi être associée à une localisation cytoplasmique de la protéine. En effet, l'interaction stable des protéines 14-3-3 avec Rnd3 nécessite à la fois la farnésylation et la phosphorylation de la GTPase et conduit à son extraction des membranes et à sa translocation dans le cytoplasme (Riou et al., 2013).

La présence d'une autre séquence appelée KERRA (Lys-Glu-Arg-Arg-Ala) est nécessaire à la localisation de la protéine Rnd3 au niveau des radeaux lipidiques au sein de la membrane plasmique dans les cellules COS-7 (Oinuma et al., 2012). Cette localisation de Rnd3 est indépendante de ROCK et permet l'activation de p190RhoGAP.

Cependant, la localisation de la protéine Rnd3 n'est pas aussi simple et peut varier selon les études. En effet, en plus d'un marquage diffus dans le cytoplasme et d'une localisation à la membrane plasmique, la localisation de la protéine Rnd3 a également été décrite au niveau d'autres structures cellulaires. Par exemple, le marquage de Rnd3 est observé dans la région péri-nucléaire et au niveau de structures vésiculaires qui correspondent au réseau trans-golgien dans les cellules COS-7 (figure 10) (Riento et al., 2003). Il n'y a cependant pas de colocalisation entre la protéine Rnd3 et les marqueurs des endosomes précoces et des lysosomes.

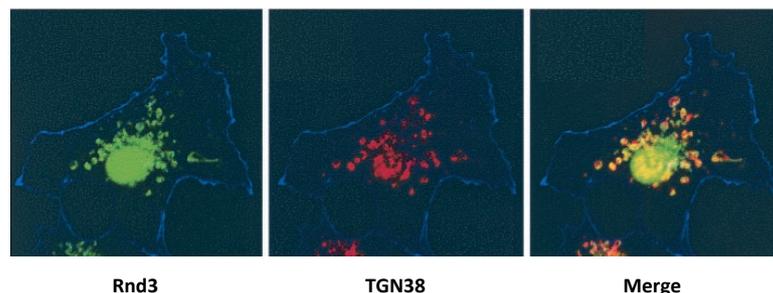


Figure 10: La protéine Rnd3 colocalise partiellement avec le réseau trans-golgien dans les cellules COS-7 (adapté de Riento et al., 2003).

Les cellules COS-7 ont été marquées avec des anticorps dirigés contre Rnd3 (vert) et TGN38 (rouge) qui est un marqueur du réseau trans-golgien. L'actine filamenteuse a été marquée avec de la phalloïdine-TRITC et est montrée en bleu sur ces images.

De manière générale, les expériences de fractionnement cellulaire ont montré que la protéine Rnd3 est majoritairement associée aux membranes (figure 11) (Foster et al., 1996 ; Riento et al., 2003).

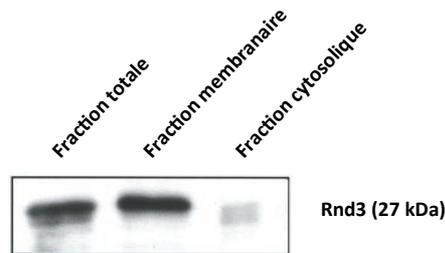


Figure 11: La protéine Rnd3 est majoritairement associée aux membranes (adapté de Riento et al., 2003).

Les cellules Swiss 3T3 ont été lysées et fractionnées pour récupérer séparément les protéines liées aux membranes et les protéines cytosoliques. Une extraction totale des protéines a aussi été réalisée sur ces cellules. Les extraits protéiques ont été analysés par western blot en utilisant un anticorps dirigé contre Rnd3.

3. Fonctions cellulaires de Rnd3

Les protéines Rnd sont impliquées dans de nombreux mécanismes parmi lesquels le contrôle de la dynamique du cytosquelette d'actine, la prolifération et la survie cellulaire.

3.1 Régulation du cytosquelette d'actine

La fonction la mieux décrite de la protéine Rnd3 est la régulation du cytosquelette d'actine. Les premiers travaux sur la fonction de Rnd3 ont montré que son expression dans des fibroblastes Swiss/3T3 provoque un arrondissement des cellules (« Rnd » vient du terme « round ») et une réduction des fibres de stress (Nobes et al., 1998). Cet effet sur le cytosquelette d'actine a été confirmé dans de nombreux types cellulaires dont les macrophages et les cellules MDCK (Guasch et al., 1998 ; Chardin et al., 2006). Cet effet est dû à une diminution de l'activation de la GTPase RhoA grâce à l'interaction de Rnd3 avec la GAP p190RhoGAP qui va stimuler l'hydrolyse du GTP de RhoA (Wennerberg et al., 2003). Dans le même but, Rnd3 peut inhiber Syx (synectin-binding RhoA exchange factor) qui est une GEF de RhoA afin de réduire l'activation de la GTPase (Goh et al., 2010). Rnd3 inhibe aussi la phosphorylation d'autres substrats de ROCK1 comme la myosine light chain phosphatase ce qui empêche la contractilité de l'actomyosine médiée par ROCK et la formation des fibres de stress (figure 12) (Riento et al., 2005). La liaison de Rnd3 avec ROCK1 n'est en revanche pas nécessaire pour inhiber la formation des fibres de stress (Komander et al., 2008).

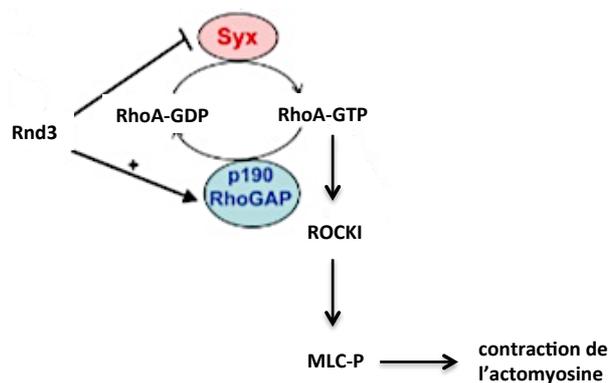


Figure 12: Rnd3 peut inhiber la fonction de Rho A en activant p190RhoGAP ou en inhibant Syx (adapté de Goh et al., 2010).

Rnd3 peut se lier à p190RhoGAP et l'activer, ou se lier à Syx et l'inhiber ce qui conduit à une inactivation de la voie RhoA/ROCK et en aval la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC-P) et la contractilité de l'actomyosine.

La diminution de la contractilité de l'actomyosine médiée par Rnd3 est très importante pour induire la relaxation des cellules musculaires. La protéine Rnd3 est par exemple surexprimée dans le myomètre à la moitié de la grossesse pour inhiber sa contractilité avant le terme de la grossesse (Lartey et al., 2006 ; Cario-Toumaniantz et al., 2003).

Cependant, l'expression de Rnd3 ne provoque pas une inhibition de l'activité de RhoA dans toutes les cellules. C'est le cas des neurones corticaux où la plexine 2 interagit avec Rnd3 ce qui bloque son interaction avec p190RhoGAP et recrute des RhoGEFs conduisant ainsi à l'activation de RhoA par ces deux mécanismes (Azzarelli et al., 2014).

De par son rôle de régulateur du cytosquelette d'actine, la protéine Rnd3 est impliquée dans la migration et l'invasion dans de nombreux types cellulaires. Elle joue un rôle important dans la migration neuronale, et notamment dans celle des neurones corticaux et de leurs progéniteurs qui sont les cellules souches de la glie radiale en induisant respectivement une inhibition de l'activité de RhoA ou une dépolymérisation des filaments d'actine (Pacary et al., 2011 ; Pacary et al., 2013). La protéine Rnd3 est aussi nécessaire à la migration d'autres cellules normales non neuronales comme les ostéoclastes (Georgess et al., 2014). Son expression est dérégulée dans de nombreux cancers afin d'augmenter les capacités migratoires et invasives des cellules tumorales, comme c'est le cas dans le glioblastome, le cancer colorectal, le CHC ou encore le mélanome (publication n°1 en annexe).

3.2 Implication dans la croissance cellulaire

Plusieurs études ont montré que la protéine Rnd3 inhibe la croissance dans plusieurs types cellulaires parmi lesquels les fibroblastes NIH3T3, les cellules de glioblastome U87 ou les cellules de cancers de la prostate DU-145 (Villalonga et al., 2004 ; Bektic et al., 2005 ; Poch et

al., 2007). Cet impact sur la croissance cellulaire semble indépendant de la voie de signalisation RhoA/ROCK (Villalonga et al., 2004). L'augmentation de l'expression de Rnd3 induit principalement un blocage du cycle cellulaire en phase G1 même si un arrêt en phase G2/M peut être détecté dans certains cas. L'arrêt en phase G1 est dû à une diminution de l'expression de la cycline D1 qui permet de phosphoryler la protéine du rétinoblastome et d'activer les facteurs de transcription E2F nécessaires à l'entrée en phase S (Villalonga et al., 2004 ; Poch et al., 2007). La baisse d'expression de la cycline D1 est due à la protéine Rnd3 qui diminue la phosphorylation du régulateur de la traduction 4EBP1 provoquant ainsi une réduction de la traduction d'ARNm avec une coiffe en 5' comme c'est le cas pour la cycline D1 mais aussi pour c-Myc (figure 13) (Villalonga et al., 2009).

De manière intéressante, afin d'exercer son rôle de régulateur du cycle, l'expression de la protéine Rnd3 est elle-même régulée au cours du cycle cellulaire. Cette RhoGTPase atypique s'accumule durant la phase G1 et est rapidement dégradée durant la transition G1/S pour permettre la poursuite du cycle cellulaire (Lonjedo et al., 2013). Sa dégradation est réalisée par le protéasome après la surexpression de Skp2 qui est la sous-unité de reconnaissance du substrat de l'ubiquitine ligase E3 et dont l'expression est régulée par Akt.

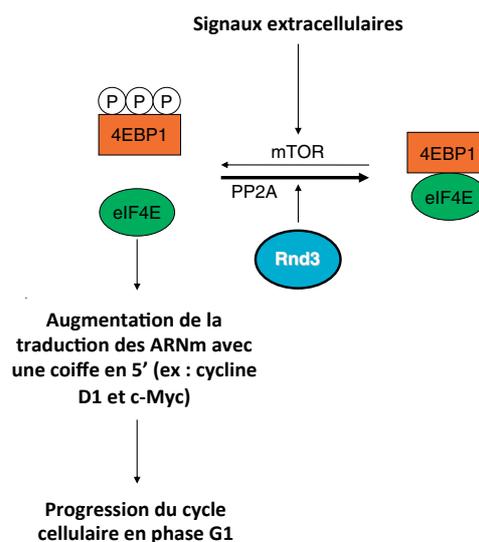


Figure 13: Rnd3 régule la progression du cycle cellulaire (adapté de Riou et al., 2010).

En réponse à des signaux extracellulaires, la protéine kinase mTOR phosphoryle le régulateur de la traduction 4EBP1 ce qui libère le facteur d'initiation de la traduction eIF4E. Ce facteur reconnaît la coiffe en 5' des ARNm et permet ainsi la traduction des gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire en phase G1, comme la cycline D1 et c-Myc. A l'inverse, la phosphatase PP2A déphosphoryle 4EBP1 qui piège alors eIF4E ce qui inhibe sa fonction de traduction. La protéine Rnd3 inhibe la progression du cycle cellulaire en réduisant la phosphorylation de 4EBP1.

Cependant, la protéine Rnd3 peut aussi jouer un rôle inverse et favoriser la croissance cellulaire comme c'est le cas dans les lignées Hep3B et Huh7 de carcinome hépatocellulaire

(Grise et al., 2012). Dans ce cas, les mécanismes moléculaires responsables n'ont pas encore été élucidés.

3.3 Implication dans l'apoptose

Rnd3 peut également moduler la survie et l'induction de l'apoptose dans les cellules. Cependant, l'impact de cette protéine sur l'apoptose est très dépendant de la lignée cellulaire étudiée. Par exemple, la déplétion de Rnd3 augmente l'apoptose en réponse à des agents génotoxiques ou à des rayons UVB (Boswell et al., 2007 ; Ongusaha et al., 2006). A l'inverse, l'expression de Rnd3 provoque la mort cellulaire par apoptose dans les lignées tumorales de glioblastome U87 et de cancers de la prostate DU-145 (Bektic et al., 2005 ; Poch et al., 2007). Des mécanismes moléculaires communs ne sont pas identifiés pour expliquer l'impact de Rnd3 sur l'apoptose dans ces différentes lignées. Selon les types cellulaires étudiés, les mécanismes impliqués sont l'inhibition de facteurs pro-survie (Boswell et al., 2007), l'inhibition de l'apoptose médiée par ROCK (Ongusaha et al., 2006), la diminution de l'expression de protéines pro-apoptotiques comme Bax (Li et al., 2009). En raison du rôle de Rnd3 dans l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines, l'apoptose pourrait aussi être induite par anoikis dans certaines cellules (Riou et al., 2010).

4. Rôle de Rnd3 en physiopathologie

4.1 Modèles animaux

Le premier modèle murin généré est un modèle de knock-out (KO) constitutif de Rnd3 obtenu par la technique de « gene trapping » dans des cellules souches embryonnaires (Lexicon Pharmaceuticals). Pour cela, le vecteur rétroviral utilisé contient notamment un site accepteur d'épissage, le gène β -Géo résultant de la fusion entre le gène de la β -galactosidase et le gène de résistance à la néomycine, et un site de polyadénylation. L'insertion de ce vecteur dans l'intron 2 du gène *RND3* provoque un arrêt de la transcription de l'ARNm après le signal poly(A) aboutissant à la synthèse d'une protéine Rnd3 tronquée composée uniquement des deux premiers exons (Stanford et al., 2001).

Les souris Rnd3 KO homozygotes générées avec cette technique (Rnd3 gt/gt) présentent un retard de croissance (figure 14) et une très forte létalité post-natale qui ne permet pas aux animaux de survivre au-delà de 30 jours après la naissance (Mocholi et al., 2011).

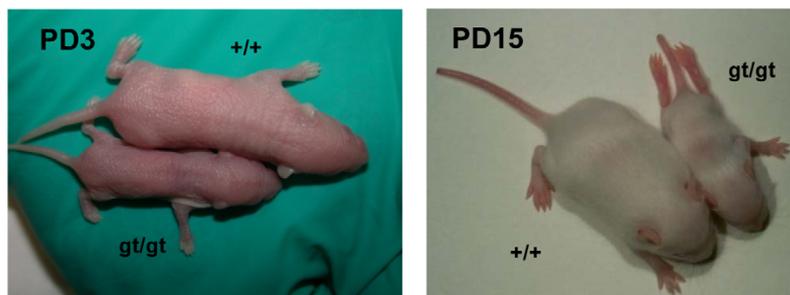


Figure 14: Les souris Rnd3 KO homozygotes sont de plus petite taille que les souris contrôles (Mocholi et al., 2011).

Des photos des souris Rnd3 KO homozygotes (gt/gt) et contrôles (+/+) sont prises au troisième jour (PD3) et au quinzième jour (PD15) après la naissance pour comparer leur taille. La position anormale des pattes arrières de la souris gt/gt est visible sur la photo prise au quinzième jour post-natal.

Ces animaux sont aussi caractérisés par un développement anormal du système nerveux avec de nombreuses altérations neuromusculaires conduisant à des déficits moteurs et neurocomportementaux (Mocholi et al., 2011). Ces altérations s'expliquent notamment par une diminution du nombre de neurones moteurs et de neurites ainsi que par une réduction de la croissance des axones et un retard de polarisation neuronale (Mocholi et al., 2011 ; Peris et al., 2012). Les premiers résultats obtenus montrent une implication de la voie de signalisation RhoA/ROCK/LIMK/cofiline dans les altérations neuronales induites par la perte de Rnd3 (Peris et al., 2012). En effet, l'extinction de Rnd3 induit une augmentation de l'activation de RhoA et une augmentation de l'expression de ROCK-I qui ont pour conséquence d'inhiber la croissance des neurites. L'utilisation d'un inhibiteur de ROCK permet ainsi de compenser l'absence de Rnd3 en rétablissant le nombre et la longueur des neurites observés dans les neurones contrôles. L'augmentation de l'expression de ROCK-I dans les neurones Rnd3 KO augmente la phosphorylation de LIMK-1, LIMK-2 et par conséquent de la cofiline ce qui stabilise les filaments d'actine et participe à la rétraction des neurites. Par contre, il n'y a pas d'anomalie particulière décrite au niveau des organes internes, mis à part une réduction de leur poids et de leur taille proportionnelle au retard de croissance des animaux.

Ce modèle murin Rnd3 KO a également été utilisé dans deux autres études publiées récemment (Ballester-Lurbe et al., 2014 ; Gomez et al., 2014). La première s'est intéressée au rôle de la protéine Rnd3 dans le développement des cellules de la zone subventriculaire. L'extinction de Rnd3 induit une augmentation de la prolifération et un défaut de migration des cellules progénitrices de la zone subventriculaire (Ballester-Lurbe et al., 2014). Elle perturbe aussi le bulbe olfactif en diminuant le nombre d'interneurones exprimant la calbindine. La deuxième étude a évalué l'impact de Rnd3 dans le développement et la fonction des gonades mâles. Les résultats obtenus montrent une diminution de la taille des testicules, ainsi qu'une perturbation des tubules séminifères qui présentent un diamètre

réduit et une paroi épithéliale plus fine et désorganisée chez les souris Rnd3 KO (Gomez et al., 2014). La perte de Rnd3 a par ailleurs une conséquence fonctionnelle sur la physiologie reproductive en diminuant la concentration en spermatozoïdes dans le sperme de ces animaux.

Le deuxième modèle murin généré est aussi un KO constitutif de Rnd3 obtenu par la même technique de « gene trapping » dans des cellules souches embryonnaires (Texas Institute for Genomic Medicine). Le vecteur contenant notamment une cassette d'expression lacZ et une séquence IRES est également inséré dans l'intron 2 du gène *RND3* pour induire la synthèse d'une protéine tronquée.

La première étude utilisant ce modèle montre que les souris Rnd3 KO développent une hydrocéphalie obstructive et une sténose de l'aqueduc du mésencéphale qui s'expliquent notamment par une activation de la voie de signalisation Notch favorisant une croissance aberrante des cellules épendymaires (Lin et al., 2013). La voie Notch est activée grâce à l'accumulation de la protéine NICD (Notch intracellular domain) qui ne peut plus interagir avec Rnd3 lorsque cette protéine est éteinte ce qui la protège de la dégradation par le protéasome.

Ce deuxième modèle murin Rnd3 KO a aussi été utilisé pour étudier le rôle de Rnd3 dans les cardiomyopathies. En effet, l'ARNm de *RND3* est sous-exprimé chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque terminale. Les souris Rnd3 KO hétérozygotes sont prédisposées à un stress hémodynamique et développent des insuffisances cardiaques caractérisées par une forte apoptose induite en partie par une hyperactivation de kinases Rho dont ROCK1 (Yue et al., 2014).

4.2 Implication de Rnd3 dans les cancers

Comme décrit ci-dessus, Rnd3 est impliquée dans les processus de croissance, de migration et d'apoptose dont la dérégulation peut conduire à la carcinogenèse. Elle a également été décrite pour inhiber la transformation tumorale de fibroblastes transformés par les oncogènes Ras et Raf (Villalonga et al., 2004). Plusieurs études ont permis de montrer que l'expression de la protéine Rnd3 est dérégulée dans de nombreux cancers. Il n'y a pas de consensus sur son niveau d'expression car Rnd3 peut être surexprimée ou sous-exprimée selon le contexte tumoral. Cependant, l'altération de son expression favorise toujours le développement tumoral ce qui implique que Rnd3 peut jouer un rôle pro ou anti-tumoral selon les cancers. En plus de cette variabilité d'expression dans les tumeurs, les mécanismes moléculaires impliqués dans la dérégulation de l'expression de Rnd3 sont également très différents selon le contexte tumoral. Par exemple, son expression peut être altérée par des micro-ARNs dans les cancers gastriques et colorectaux, ou alors par la voie de signalisation mTOR ou Notch1 respectivement dans les astrocytomes ou les carcinomes à cellules squameuses. La dérégulation de l'expression de Rnd3 participe notamment à l'invasion

tumorale et à la formation de métastases dans la majorité des cancers. Elle est également souvent associée à un mauvais pronostic chez les patients. Rnd3 pourrait ainsi être utilisé comme un marqueur pronostic dans les cancers où son niveau d'expression est dérégulé, comme c'est déjà le cas dans le cancer du poumon. Elle pourrait également constituer une cible thérapeutique afin de diminuer l'agressivité et le développement métastatique des tumeurs (publication n°1 en annexe).

5. Régulation de l'expression de Rnd3

Comme la protéine Rnd3 est une RhoGTPase atypique qui ne cycle pas entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP, son expression est régulée par d'autres mécanismes. En effet, de nombreuses publications récentes décrivent des mécanismes de régulation de Rnd3 aussi bien au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel que post-translationnel.

5.1 Régulation transcriptionnelle de Rnd3

L'ARNm de *RND3* est exprimé dans la majorité des tissus humains adultes et fœtaux, même si son expression est particulièrement faible dans le cerveau, le pancréas, le thymus, les testicules et les leucocytes du sang périphérique (figure 15) (Nobes et al. 1998). Alors que Rnd3 présente un profil d'expression faible et ubiquitaire, l'expression des deux autres membres de la sous-famille Rnd est totalement différente. En effet, l'ARNm de *RND1* est majoritairement exprimé dans le cerveau et le foie alors que l'ARNm de *RND2* est principalement détecté dans les testicules (figure 15).

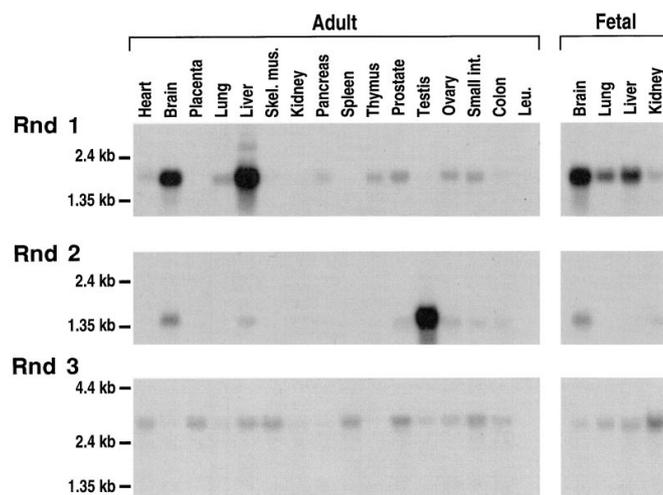


Figure 15: L'ARNm de *RND3* est exprimé de façon ubiquitaire dans la majorité des tissus humains adultes et fœtaux (Nobes et al., 1998).

Les ARNs polyadénylés extraits de différents tissus humains adultes et fœtaux ont été analysés par northern blot avec des sondes dirigées contre les ARNm des trois membres de la famille Rnd. L'intensité des signaux obtenus avec les trois sondes est comparable. L'hybridation des mêmes membranes avec une sonde dirigée contre l'ARNm de l'actine a permis d'obtenir des signaux plus intenses, avec des intensités comparables dans tous les tissus. L'expression de Rnd3 dans le cerveau, le pancréas, le thymus, les testicules et les leucocytes du sang périphérique (Leu) a été détectée seulement après une longue exposition.

La transcription de l'ARNm de *RND3* est régulée par différents facteurs de transcription qui sont très variables selon le contexte cellulaire. Les facteurs identifiés sont par exemple p53, NFκB, MIC-1 (macrophage inhibitory cytokine 1) qui appartient à la famille des facteurs de croissance du TGF-β, mTOR, l'oncogène B-Raf ou encore l'oestradiol (tableau 1).

On peut également constater qu'au sein d'un même type cellulaire, la transcription de *RND3* peut être régulée de manière totalement opposée par l'expression de deux facteurs de transcription différents. C'est le cas de NFκB qui augmente le niveau d'expression de l'ARNm de *RND3* dans les cellules de cancer de la prostate (Nadiminty et al., 2010), alors qu'à l'inverse MIC-1 diminue sa transcription (Liu et al., 2003).

De plus, un même facteur de transcription peut également faire varier de manière totalement opposée le niveau d'expression de l'ARNm de *RND3* en fonction du type cellulaire choisi. C'est le cas d'une hormone, l'oestradiol, qui diminue la transcription de *RND3* dans les cellules de la prostate (Bektic et al., 2004) alors qu'elle augmente sa transcription dans les cellules des muscles lisses (Shimomura et al., 2009).

Certains de ces facteurs de transcription peuvent être induits par des stimuli externes comme les agents de chimiothérapie ou les rayons ultra-violet qui induisent tous deux des dommages au niveau de l'ADN. Suite à une exposition à des agents de chimiothérapies, le

niveau d'expression de l'ARNm de *RND3* est augmenté dans les cellules d'ostéosarcomes grâce à la fixation de p53 sur son promoteur et à l'activation de la transcription du gène (Ongusaha et al., 2006). L'expression de Rnd3 médiée par p53 favorise la survie cellulaire en inhibant en partie l'apoptose induite par ROCK1. Les dommages à l'ADN provoqués par l'exposition des kératinocytes à des rayons ultra-violet conduisent aussi à une augmentation de la transcription de *RND3* mais sans que le facteur de transcription p53 soit impliqué ce qui suggère un autre mécanisme de régulation (Boswell et al., 2007).

Facteur de transcription	Régulation transcriptionnelle directe ?	Effet sur la transcription de <i>RND3</i>	Contexte cellulaire	Références
p53	Oui (cellules PC3, Saos2 et U2OS)	Activateur	HepG2 (cellules de cancer du foie) SW480 (cellules de cancer colorectal) MKN45 (cellules de cancer gastrique) SPCA1 (cellules de cancer du poumon) PC3 (cellules de cancer de la prostate) Saos2 (cellules d'ostéosarcome) U2OS (cellules d'ostéosarcome)	Zhu et al., 2014 Ongusaha et al., 2006
AES	Oui (cellules HeLa)	Activateur	MDA-MB-231 (cellules de cancer du sein) HepG2 (cellules de cancer du foie)	Xia et al., 2013
Nanog	Oui (cellules HEK293T)	Répresseur	HeLa (cellules de cancer du col utérin)	Zhou et al., 2013
Ascl1	Oui (cellules P19)	Activateur	Cortex embryonnaire de souris	Pacary et al., 2011
c/EBP δ	Oui	Répresseur	MEF (fibroblastes embryonnaires murins)	Wiejak et al., 2013
NFkB	Non démontré	Activateur	LNCaP (cellules de cancer de la prostate)	Nadiminty et al., 2010
CREB	Oui	Activateur	Neurones de l'hippocampe de souris	Lesiak et al., 2013
MIC-1	Non démontré	Répresseur	DU-145 (cellules de cancer de la prostate)	Liu et al., 2003

mTOR	Non démontré	Activateur	Cellules dérivées de SEGA (astrocytomes sous-épendymaires à cellules géantes)	Tyburczy et al., 2010
HIF-1 α	Oui	Activateur	AGS (cellules de cancer gastrique)	Zhou et al., 2011
FOXD3	Oui (cellules A375)	Répresseur	WM793 (cellules de cancer de la peau)	Katiyar et al., 2011
Notch	Oui	Activateur	Kératinocytes humains primaires	Zhu et al., 2014
B-Raf	Non démontré	Activateur	WM793 (cellules de cancer de la peau) WM115 (cellules de cancer de la peau) Mélanocytes de l'épiderme humain	Klein et al., 2008
Oestradiol	Non démontré	Répresseur	Cellules stromales humaines de la prostate	Bektic et al., 2004
	Non démontré	Activateur	Cellules musculaires lisses de l'iléon de rat	Shimomura et al., 2009

Tableau 1: Présentation des facteurs de transcription régulant l'expression de l'ARNm de *RND3*.

Ce tableau récapitule les facteurs de transcription décrits dans la littérature comme pouvant réguler l'expression de l'ARNm de *RND3*. Certains de ces facteurs ont été montrés comme interagissant directement avec le promoteur de *Rnd3* et peuvent jouer un rôle d'activateur ou de répresseur de la transcription de *RND3*.

5.2 Régulation post-transcriptionnelle de *Rnd3*

Le niveau d'expression de *Rnd3* peut également être régulé au niveau post-transcriptionnel, et notamment par l'expression de micro-ARNs. En effet, l'ARNm de *RND3* possède une région 3' non traduite très longue de 1792 pb contenant des sites de fixation pour de nombreux micro-ARNs qui sont prédits par les bases de données miRWalk et TargetScan. C'est le cas de miR-200c qui pourrait réguler la quantité d'ARNm de *RND3* dans les cellules de cancer du sein (Hurteau et al., 2003), et de miR-17 dont l'effet a été validé dans les cellules de cancer colorectal (Luo et al., 2012). Un autre micro-ARN, miR-128a, vient très récemment d'être décrit dans les cellules de carcinome hépatocellulaire dans lesquelles il diminue la quantité d'ARNm de *RND3* en se fixant dans sa région 3' non traduite et en entraînant sa dégradation (Guo et al., 2014).

5.3 Régulation de Rnd3 au niveau protéique

L'expression de la protéine Rnd3 dépend de modifications post-traductionnelles, et en particulier de la phosphorylation de la protéine par ROCK1 et PKC α qui permet la translocation de la protéine Rnd3 de la membrane plasmique dans le cytosol. Cette modification post-traductionnelle protège Rnd3 de la dégradation par le protéasome ce qui participe ainsi à la régulation de la demi-vie de la protéine dans les kératinocytes (Liebig et al., 2009 ; Ryan et al., 2012). Cet effet a également été étudié dans la lignée COS-7 pour laquelle le niveau d'expression de Rnd3 semble moduler l'impact de ROCK1 sur la dégradation protéasomale de la GTPase. En effet, ROCK1 augmente la demi-vie de Rnd3 dans les cellules COS-7 surexprimant Rnd3 (Riento et al., 2005), alors qu'il favorise sa dégradation par le protéasome dans les cellules COS-7 sauvages et les cellules HeLa exprimant peu la protéine Rnd3 (Goh et al., 2012).

Le niveau d'expression de la protéine Rnd3 est aussi régulé par une autre modification post-traductionnelle qui est l'ubiquitinylation. Cette modification est induite dans la région C-terminale de la protéine, et notamment au niveau de la lysine 235, grâce à l'interaction de la protéine Rnd3 avec Skp2 qui est la sous-unité de reconnaissance du substrat de l'ubiquitine ligase E3 (Lonjedo et al., 2013). Cette ubiquitinylation conduit à une dégradation de la protéine Rnd3 par le protéasome, et ainsi à une diminution de sa demi-vie.

De manière plus surprenante, la protéine Rnd3 peut par ailleurs être stabilisée par l'interaction avec ses effecteurs comme Syx qui est une RhoGEF et p190 RhoGAP ce qui augmente la demi-vie de la protéine (Goh et al., 2012).

IV. Le foie

1. Présentation générale du foie

1.1 Anatomie du foie

Le foie, situé dans la partie supérieure droite de l'abdomen, est l'organe le plus volumineux du corps humain. Il est entouré d'une couche de tissu conjonctif appelée capsule de Glisson qui s'invagine dans le parenchyme hépatique permettant ainsi de déterminer les différents lobes. Le foie humain est composé de deux lobes principaux (= les lobes droit et gauche) séparés par le ligament falciforme, et de deux lobes accessoires (= les lobes caudé et carré) séparés eux par le hile hépatique.

Le foie reçoit à la fois le sang artériel oxygéné par l'artère hépatique (30% de la vascularisation) et le sang de l'appareil digestif par la veine porte (70% de la vascularisation). Ces deux voies se rejoignent au niveau du hile hépatique et se ramifient pour atteindre les espaces portes. Le sang veineux est expulsé par les veines sus-hépatiques droite, médiane et gauche qui se jettent dans la veine cave inférieure. En parallèle de ces réseaux sanguins, il existe les voies biliaires qui drainent la bile du foie jusqu'à la vésicule biliaire ou l'intestin grêle. La bile produite par le foie s'accumule dans les canaux hépatiques qui rejoignent le canal hépatique commun. Le canal cystique partant de la vésicule biliaire rejoint le canal hépatique commun pour former le canal cholédoque aboutissant dans l'intestin grêle (figure 16).

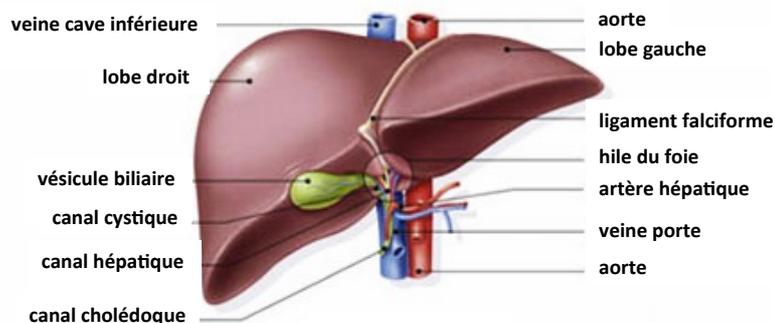


Figure 16: L'organisation du foie (adapté de <http://www.amfe.fr>).

Schéma représentant une vue de face du foie avec les différents vaisseaux sanguins afférents et efférents.

1.2 Cellules hépatiques

Le foie est constitué de plus de 15 types cellulaires différents regroupant à la fois les cellules parenchymales, qui sont les hépatocytes, et les cellules non-parenchymales (Malarkey et al., 2005).

1.2.1 Les hépatocytes

Les hépatocytes, cellules majoritaires du foie, représentent 60% de la population cellulaire du foie et 80% de son volume. Ces cellules sont de forme polyédrique et contiennent un ou plusieurs noyaux arrondi(s). On compte environ 30 à 40% d'hépatocytes qui sont au minimum binucléés dans un foie adulte humain (Gupta et al., 2000). Les hépatocytes sont organisés en travées unicellulaires bordées de part et d'autre par des capillaires sinusoides et remplissent la plupart des fonctions hépatiques.

Les hépatocytes sont des cellules épithéliales qui possèdent une polarité particulière avec la présence de plusieurs pôles basolatéraux et apicaux. Les pôles basolatéraux sont bordés de nombreuses microvillosités et permettent le contact avec les capillaires sinusoides par l'intermédiaire de l'espace de Disse. Ils participent à l'absorption de substances transportées par le sang et à la sécrétion de protéines plasmatiques. L'assemblage des pôles apicaux des différents hépatocytes constitue un réseau de canalicules biliaires scellé par des jonctions serrées étanches afin d'éviter la fuite de la bile qui est déversée dans ces structures.

1.2.2 Les cellules non parenchymales

Les cellules hépatiques non parenchymales représentent 40% de la population cellulaire et 6,5% du volume du foie (Kmieć et al., 2001). Ces cellules sont principalement représentées par les cellules endothéliales sinusoidales du foie, les cellules de Kupffer, les cellules étoilées, les cellules de Pit et les cellules épithéliales biliaires.

Les cellules endothéliales sinusoidales du foie (LSECs) tapissent les capillaires sinusoides et constituent la principale barrière entre le sang et les hépatocytes. Ces cellules endothéliales sont caractérisées par la présence de structures dynamiques appelées fenêtres et par l'absence de lame basale. Les LSECs jouent un rôle important de filtration grâce à la présence de ces fenêtres qui permettent la diffusion de certaines substances entre les compartiments sanguin et cellulaire. Ces cellules peuvent aussi transférer des substances par endocytose ou transcytose (Braet et al., 2002).

Les cellules de Kupffer, localisées en bordure des capillaires sinusoides, sont les macrophages résidents du foie. Elles participent à la réponse immunitaire innée en éliminant les pathogènes circulants par phagocytose et en sécrétant des médiateurs de l'inflammation pour recruter d'autres cellules immunitaires (Bouwens et al., 1992). Ces macrophages sont également impliqués dans l'immunité acquise en participant à la présentation antigénique.

Les cellules étoilées du foie ou cellules d'Ito sont présentes dans l'espace de Disse séparant les capillaires sinusoides des hépatocytes (Ito et al., 1952). Ces cellules sont caractérisées par la présence de gouttelettes lipidiques dans leur cytoplasme. Elles interviennent dans le

stockage de la vitamine A, la synthèse des composants de la matrice extracellulaire et la dégradation de cette matrice, ainsi que dans la régulation de la vasomotricité des sinusoides. Les cellules étoilées peuvent aussi se transformer en myofibroblastes en réponse à des lésions hépatiques chroniques et participer au développement de la fibrose hépatique (Hautekeete et al., 1997).

Les cellules de Pit sont des grands lymphocytes granulaires spécifiques du foie qui sont présents dans la lumière des capillaires sinusoides. Elles possèdent une activité cytotoxique de type natural killer qui leur permet de détruire les cellules tumorales (Wisse et al., 1997).

Le foie est également composé de cellules épithéliales biliaires (BECs) ou cholangiocytes qui constituent un réseau de conduits biliaires. Ces cellules modifient et concentrent la bile produite par les hépatocytes en sécrétant de l'eau, des électrolytes et des immunoglobulines IgA et en absorbant des fluides, des électrolytes, des acides aminés, du glucose et des acides biliaires (Strazzabosco et al., 1997).

2. Physiologie du foie

2.1 Description des lobules et acini hépatiques

Le foie peut être subdivisé selon deux critères différents : un critère anatomique plus classique définissant le lobule hépatique comme unité de base, et un critère fonctionnel décrivant l'acinus hépatique comme élément de base.

Le lobule hépatique est constitué d'un ensemble d'hépatocytes centré autour d'une veine centrolobulaire et limité en périphérie par une ligne imaginaire joignant 4 à 6 espaces portes voisins (Kiernan et al., 1833) (figure 17A et B). Les hépatocytes sont organisés en travées disposées de façon radiaire autour de la veine centrolobulaire. Ces travées sont bordées de chaque côté par des capillaires sinusoides qui vascularisent le lobule et se jettent dans la veine centrolobulaire. Les espaces portes comportent une branche de la veine porte, une branche de l'artère hépatique et un canal biliaire auxquels sont associés quelques vaisseaux lymphatiques. Le sang circule de l'espace porte vers la veine centrolobulaire, alors que la bile progresse en sens inverse pour rejoindre le canal biliaire de chaque espace porte.

Cependant, cette subdivision anatomique présente un inconvénient d'un point de vue physiologique car le lobule hépatique est vascularisé par de nombreuses branches artérielles et veineuses provenant de plusieurs espaces portes. De même, les conduits biliaires d'un lobule rejoignent tous les espaces portes qui le composent. Le lobule hépatique résulte ainsi de l'assemblage de plusieurs unités ce qui ne reflète pas l'unité fonctionnelle du foie.

La subdivision du foie en acini hépatiques a été proposée par Rappaport en se basant sur l'architecture vasculaire du foie dont dépend sa fonction (Rappaport et al., 1958). L'acinus

hépatique correspond à la portion de foie vascularisée par les branches terminales artérielles et veineuses présentes entre deux espaces portes (figure 17B). La bile d'un acinus est drainée jusqu'aux deux espaces portes qui le délimitent. Dans cet espace, deux zones fonctionnelles peuvent être facilement identifiables grâce à des repères anatomiques. La zone centrale de l'acinus correspond à la zone périportale centrée autour des espaces portes, alors que la périphérie de cette zone correspond à la zone périveineuse proche des veines centrolobulaires.

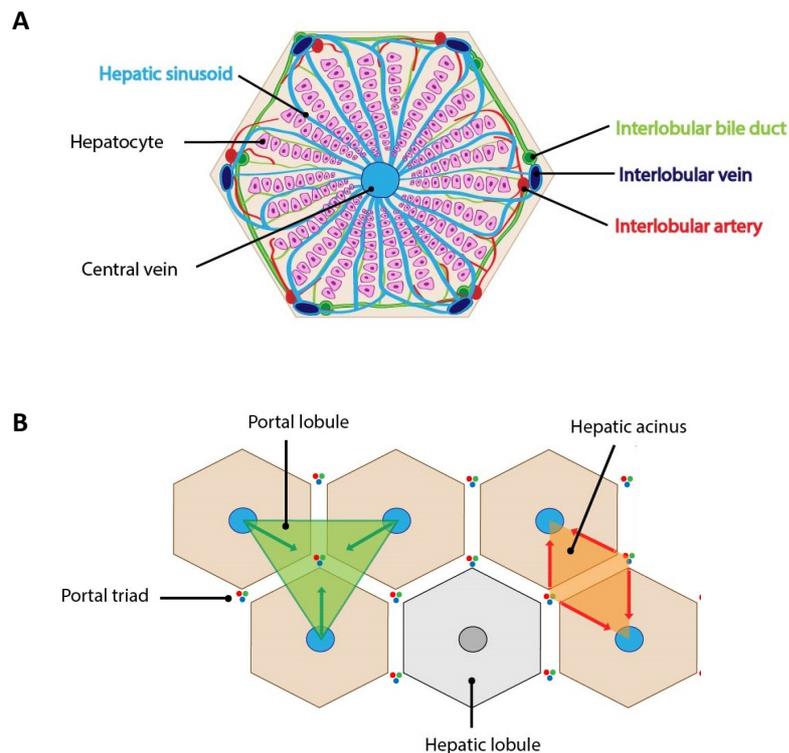


Figure 17: Le lobule et l'acinus hépatiques (<http://fbt.cz/en>).

A. Schéma représentant en détail l'organisation d'un lobule hépatique. Cette unité est composée de travées hépatocytaires centrées autour d'une veine centrolobulaire et délimitées en périphérie par plusieurs espaces portes. **B.** Schéma représentant la différence entre un lobule hépatique (= unité anatomique du foie) en gris, et un acinus hépatique (= unité fonctionnelle du foie) en orange. L'acinus hépatique est délimité par la vascularisation des branches terminales artérielles et veineuses présentes entre deux espaces portes.

2.2 Zonation métabolique du foie

Le concept de zonation métabolique du foie repose sur le fait que tous les hépatocytes ne présentent pas les mêmes caractéristiques morphologiques et fonctionnelles en fonction de leur position le long de l'axe porto-central du foie (Sasse et al., 1975). Les hépatocytes entourant les espaces portes, en contact avec le sang afférent, sont appelés les hépatocytes périportaux. Les hépatocytes proches de la veine centrolobulaire et ainsi du sang efférent sont appelés les hépatocytes périveineux. Cependant, toutes les fonctions hépatiques ne

sont pas zonées. C'est le cas de nombreuses protéines sériques comme la transthyrétine et la transferrine qui sont synthétisées par tous les hépatocytes.

Les différences morphologiques observées entre les différents hépatocytes sont minimales et portent essentiellement sur une activité mitochondriale plus importante, avec des mitochondries moins nombreuses mais plus volumineuses, dans la zone périportale que dans la zone périveineuse.

Certaines fonctions métaboliques du foie sont zonées avec une distribution homogène au sein d'un compartiment cellulaire spécifique ou en gradients le long de l'axe porto-central. Les fonctions métaboliques peuvent être opposées ou complémentaires entre deux compartiments cellulaires afin de maintenir l'homéostasie hépatique. La zone périportale est spécialisée dans le métabolisme oxydatif, la néoglucogenèse, le catabolisme des acides gras et des acides aminés, la synthèse de cholestérol et la synthèse d'urée à partir d'ammoniac. La zone périveineuse assure préférentiellement la glycolyse, la synthèse des acides gras et la cétogenèse. Elle est également responsable de la synthèse de glutamine à partir d'ammoniac et de la plupart des étapes de transformation des médicaments et xénobiotiques. En effet, c'est dans cette zone que prédominent les activités de la plupart des cytochromes et des enzymes de détoxification (Jungermann, 1986). La synthèse des protéines plasmatiques est aussi une fonction métabolique zonée dans le foie. Même si tous les hépatocytes sont capables de synthétiser l'ensemble des protéines plasmatiques, il existe un gradient de concentration de ces protéines. Pour la majorité de ces protéines, la synthèse est plus importante dans la zone périportale. C'est notamment le cas de l'albumine et du fibrinogène. A l'inverse, d'autres protéines plasmatiques comme l'alpha-foetoprotéine et l'alpha-1-antitrypsine présentent des concentrations plus élevées dans la zone périveineuse. C'est également la région périveineuse qui contient les plus fortes activités des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'alcool, comme l'alcool-déshydrogénase et l'acétaldéhyde-déshydrogénase.

La zonation métabolique du foie est un processus très complexe dont les mécanismes de régulation ne sont pas encore bien compris. L'existence d'un microenvironnement sanguin différent entre les hépatocytes périportaux et périveineux pourrait expliquer la zonation de certaines fonctions hépatiques. En effet, étant donné que le sang circule des espaces portes vers les veines centrolobulaires, tous les hépatocytes ne sont pas en contact avec les mêmes concentrations en oxygène, hormones, médicaments et métabolites. Le principal mécanisme de régulation de la zonation du foie reste toutefois l'expression différentielle de gènes codant pour les enzymes responsables des différentes fonctions hépatiques entre les zones périportale et périveineuse. Cette régulation peut s'exercer au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel et induit ainsi l'expression d'ARNm spécifiques dans les hépatocytes périportaux ou périveineux (Braeuning et al., 2006).

D'après plusieurs études, la voie de signalisation Wnt/ β -caténine est un régulateur majeur de la zonation du foie. Son implication dans la zonation du foie a été mise en évidence par l'expression d'un profil transcriptomique proche du métabolisme périveineux dans les tumeurs présentant une activation de la β -caténine (Hailfinger et al., 2006). Elle a ensuite été confirmée par l'établissement de gradient d'expression de la β -caténine activée dans les hépatocytes périveineux et du régulateur négatif Apc dans les hépatocytes périportaux de souris adultes sauvages (figure 18A) (Benhamouche et al., 2006). La génération de souris présentant une extinction d'Apc spécifiquement dans le foie est caractérisée par une activation de la β -caténine qui induit l'expression des gènes périveineux dans tout le lobule hépatique et réprime l'expression des gènes périportaux (figure 18B). A l'inverse, l'expression de Dkk1 qui est un inhibiteur de Wnt ou l'inactivation des gènes régulés par la β -caténine induit la mise en place du programme génétique périportal et l'extinction des gènes périveineux dans les lobules hépatiques murins (figure 18B) (Benhamouche et al., 2006 ; Sekine et al., 2006). Apc est ainsi également impliqué dans la zonation du foie en régulant négativement la voie de signalisation de la β -caténine. La β -caténine contrôle de nombreuses fonctions hépatiques zonées comme le cycle de l'urée, la synthèse de glutamine ou encore le métabolisme de l'ammonium, des xénobiotiques ou du glucose (Benhamouche et al., 2006 ; Sekine et al., 2006 ; Chafey et al., 2009). D'autres facteurs pourraient également être impliqués dans la régulation de la zonation du foie comme le facteur de croissance HGF via l'activation de la voie de signalisation Ras, ou la voie de signalisation Hedgehog (Braeuning et al., 2007 ; Matz-Soja et al., 2013 ; Gebhardt et al., 2014).

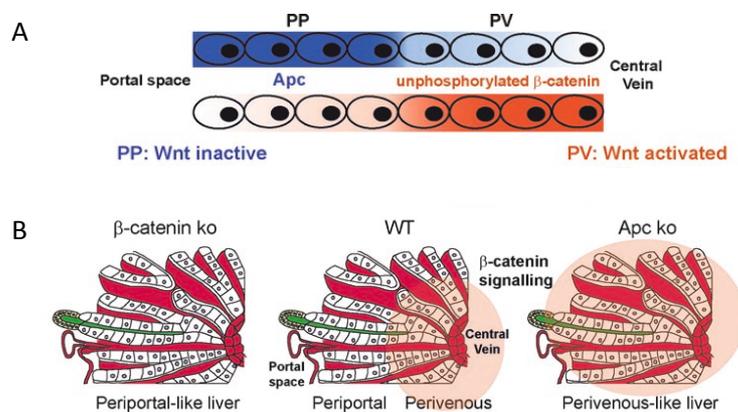


Figure 18: La voie de signalisation Wnt/ β -caténine régule la zonation du foie (Colnot et al., 2011).

A. Schéma représentant la zonation des hépatocytes le long de l'axe porto-central du foie. Les hépatocytes périportaux (PP) expriment fortement Apc, alors que les hépatocytes périveineux (PV) accumulent la β -caténine active non phosphorylée. **B.** Schéma représentant les différents modèles murins d'inactivation de la β -caténine ou d'Apc ainsi que leurs conséquences sur la zonation hépatique.

3. Fonctions du foie

Le foie participe à de nombreuses fonctions essentielles dans l'organisme comme le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines. En effet, il transforme les glucides en glycogènes qui sont stockés dans le foie et libérés sous forme de glucose selon les besoins de l'organisme. Les lipides sont transformés en triglycérides et également stockés dans le foie. Les protéines et acides aminés issus de la digestion sont eux utilisés par le foie pour synthétiser essentiellement la majorité des protéines sanguines comme l'albumine, les globines et les facteurs de coagulation. Les vitamines et les minéraux (= fer et cuivre) issus de l'alimentation sont également stockés dans cet organe. Le foie participe par ailleurs à la fonction immunitaire de l'organisme. Il est impliqué d'une part dans l'immunité innée via notamment le rôle de barrière des cellules endothéliales sinusoidales du foie, l'action des cellules de Kupffer et des lymphocytes NK ainsi que la synthèse de la majorité des protéines du complément. Il intervient d'autre part dans l'immunité acquise avec l'activité spécifique des lymphocytes T et B hépatiques. Le foie joue un autre rôle important dans la détoxification du sang en dégradant les substances toxiques issues de l'organisme (ex : l'ammoniac ou l'hémoglobine) ou ingérées (ex : l'alcool ou les médicaments). Il intervient aussi dans la synthèse et la sécrétion de la bile qui est acheminée et concentrée dans la vésicule biliaire. La bile se compose principalement de sels biliaires, de cholestérol, de bilirubine, d'électrolytes et d'eau. Elle est impliquée dans le transport des déchets liposolubles et dans la digestion des graisses au niveau de l'intestin grêle.

4. Capacité de régénération du foie

Le foie est le seul organe qui est capable de se régénérer, c'est à dire de restaurer à la fois sa masse originale et ses fonctions, suite à des lésions ou à une résection partielle. Après une hépatectomie partielle, les lobes hépatiques restants vont tout d'abord s'hypertrophier pour restaurer la masse initiale et ensuite se diviser pour synthétiser les différentes populations cellulaires du foie. La capacité de régénération du foie est un processus quasiment illimité. Chez l'homme, elle permet de restaurer la fonction hépatique en 2 à 3 semaines, et la masse initiale du foie entre 3 à 6 mois après une hépatectomie partielle (Gove et al., 1991 ; Nagasue et al., 1987).

La capacité de régénération du foie a été découverte en 1931 par Higgins et Anderson chez le rat après une hépatectomie des deux tiers (Higgins et al., 1931). Ce modèle est aujourd'hui très utilisé pour étudier la régénération hépatique dans les modèles murins. De plus, la résection des deux tiers du foie est facilement réalisable en excisant les lobes latéraux et médians chez les animaux.

A l'état normal, les hépatocytes sont quiescents et se divisent très rarement. On compte en effet 0,1% de mitose dans un foie adulte (Diehl et al., 1996). Suite à des lésions du foie ou à une résection partielle, le processus de régénération hépatique est mis en place. Il se

déroule en trois principales étapes qui comprennent une phase d'initiation permettant de préparer les hépatocytes pour la réplication, une phase de prolifération et une phase de terminaison. Durant la phase de prolifération, les hépatocytes synthétisés doivent être réorganisés en lobules hépatiques par les cellules non parenchymales ce qui pourrait constituer une quatrième phase de remodelage dans le processus de régénération.

La phase d'initiation de la régénération consiste à faire entrer les hépatocytes normalement quiescents en phase G1 du cycle cellulaire et à les rendre sensibles aux facteurs de croissance pour la suite de la réplication. L'expression de plus d'une centaine de gènes est induite dès les premières minutes après l'hépatectomie et jusqu'à quelques heures après.

Par conséquent, la dérégulation d'un seul de ces gènes peut induire un retard dans le processus de régénération hépatique (Latasa et al., 2007 ; Li et al., 2009). La phase d'initiation est activée par la libération de cytokines comme l'interleukine 6 et le TNF α par les cellules non parenchymales. Le TNF α induit l'activation de NF κ B dans les cellules de Kupffer ce qui augmente la sécrétion d'interleukine 6 et conduit à l'activation de STAT3 dans les hépatocytes. L'activation de ce facteur de transcription conduit à la transcription des gènes précoces de l'initiation comme c-fos, c-myc et c-jun qui vont permettre la transition G0/G1 dans les hépatocytes. Les gènes tardifs de l'initiation sont exprimés quelques heures après l'hépatectomie et sont composés principalement de p53, mdm2, p21, les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines (cdk). L'induction de la cycline D1 est d'ailleurs le marqueur le plus important pour la progression du cycle cellulaire des hépatocytes *in vitro* (Albrecht et al., 1999).

La deuxième phase de prolifération correspond à la progression du cycle cellulaire qui nécessite l'expression continue de facteurs de croissance et est aussi caractérisée par la mise en place de changements métaboliques. Ces derniers sont notamment caractérisés par l'accumulation transitoire de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes. En parallèle, de nombreux facteurs de croissance exprimés par différents tissus viennent se fixer à deux principaux récepteurs de facteurs de croissance, EGFR et C-Met, présents sur les hépatocytes. C'est le cas des facteurs EGF, HB-EGF, TGF α , HGF et de l'amphiréguline. Ceci conduit à une activation des voies de signalisation MAPK, STAT3, Pi3K/Akt et ERK1/2 qui permettent la progression du cycle cellulaire et ainsi la régénération du foie (Gilgenkrantz et al., 2011). La bêta-caténine est aussi impliquée dans le processus de régénération hépatique en raison de son activation durant la transition G1/S (Torre et al., 2011). D'autres mitogènes peuvent également être surexprimés lors du processus de régénération hépatique, comme c'est le cas de l'hépassocine, afin de favoriser la prolifération des hépatocytes (Hara et al., 2000 ; Li et al., 2010). Durant cette phase, les hépatocytes se répliquent au minimum une fois. Ils atteignent la phase S du cycle cellulaire 12 à 15 heures après l'hépatectomie et la mitose se termine environ 24 heures après la chirurgie. Les cellules non parenchymales prolifèrent également mais avec un retard de 24 à 48 heures par rapport aux hépatocytes en raison d'une prolongation de leur phase G1 (LaBrecque, 1994). *In vivo*, la réplication débute

au niveau des hépatocytes périportaux pour ensuite se propager aux hépatocytes péricentraux (Court et al., 2002). La prolifération de la majorité des hépatocytes conduit à la formation d'amas de 8 à 10 hépatocytes entourés de structures vasculaires immatures ou désagrégées. La formation de ces amas est associée à une altération du réseau sinusoidal normal, une perte partielle de l'espace de Disse et une dégradation de la matrice extracellulaire par des métalloprotéases. Ces amas vont ensuite subir des modifications avec la formation de nouvelles sinusoides, la synthèse de protéines de la MEC et l'apparition de cellules hépatiques étoilées afin de constituer des lobules hépatiques de grande taille. L'organisation et la taille de ces structures sont finalisées pendant les phases de remodelage et de terminaison de la régénération.

La phase de terminaison induit l'arrêt de la prolifération cellulaire notamment grâce à l'implication des protéines de la famille du TGF β et des activines qui inhibent la synthèse d'ADN dans les hépatocytes. Plus récemment, il a été décrit que les kinases Mst1/2 pourraient participer à l'arrêt de la régénération hépatique, et plus particulièrement au retour des hépatocytes à l'état de quiescence, en inhibant l'activité de Yap (Avruch et al., 2011).

Les hépatocytes jouent un rôle primordial dans la régénération hépatique, mais ce processus dépend aussi de la présence d'autres types cellulaires comme les macrophages, les cellules hépatiques étoilées, les cellules natural killer ou encore les cellules endothéliales sinusoidales du foie (Meijer et al., 2000 ; Sun et al., 2004 ; Atzori et al., 2009 ; Ding et al., 2010).

V. Le carcinome hépatocellulaire

1. Epidémiologie

Le cancer du foie représente le sixième type de cancer le plus fréquent et la deuxième cause de mortalité par cancer dans le monde avec 745 000 décès en 2012 (Ferlay et al., 2014). Il touche principalement les pays en voie de développement situés dans l'Est et le Sud de l'Asie, ainsi qu'en Afrique de l'Ouest.

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le principal cancer primitif du foie dont l'incidence est en constante augmentation. Il se développe à partir des cellules majoritaires du foie, les hépatocytes, et représente 85 à 90% des tumeurs primaires du foie. Les hommes développent plus fréquemment des CHCs que les femmes avec un ratio de 5:1 en France (Nordenstedt et al., 2010). Ce cancer est associé à un mauvais pronostic en raison d'un diagnostic tardif, de forts taux de récurrence post-opératoire et de développement de métastases, ainsi que de l'absence de traitements thérapeutiques efficaces.

Le deuxième type de cancer primitif du foie le plus fréquent est le cholangiocarcinome qui se développe à partir des canaux biliaires intra ou extra-hépatiques. Les autres tumeurs primitives du foie sont plus rares et comprennent notamment l'angiosarcome, l'adénocarcinome mixte, le carcinome indifférencié et l'hépatoblastome qui touche habituellement les enfants. Il existe aussi des tumeurs bénignes du foie parmi lesquelles l'hémangiome, l'hyperplasie nodulaire focale et l'adénome.

2. Facteurs de risque

Le CHC se développe dans 80 à 90% des cas sur un foie cirrhotique (Tiribelli et al., 1989). La cirrhose correspond au dernier stade de développement de la fibrose qui est induite par la mort d'une partie des hépatocytes et leur remplacement par un tissu cicatriciel, appelé tissu fibreux, en réponse à des agressions du foie. Dans les premiers stades de la fibrose, le foie peut encore fonctionner normalement. Cependant, sa progression conduit à l'apparition d'une cirrhose qui est caractérisée par une importante perturbation de l'architecture et de la fonction du foie avec la présence de nombreux nodules de régénération, d'une hypertension portale, et d'une insuffisance hépatique.

La cirrhose est une maladie chronique du foie qui se développe principalement suite à une infection par les virus de l'hépatite B (VHB) ou C (VHC), ou en réponse à une consommation excessive et prolongée d'alcool. Dans les pays en voie de développement, le principal facteur est l'infection par le VHB qui est responsable de plus de 50% des CHCs (Parkin et al., 2006). Plusieurs voies de carcinogenèse hépatique ont été proposées pour le VHB. En effet, ce virus peut provoquer des lésions du foie conduisant au développement d'une cirrhose et à la mise

en place de cycles de régénération des hépatocytes qui permettent l'acquisition de mutations. Il est aussi capable de s'intégrer dans le génome des hépatocytes ce qui peut provoquer une mutagénèse insertionnelle, une instabilité chromosomique ou une transactivation d'oncogènes grâce à l'action de protéines virales. On estime qu'un patient atteint du VHB a 100 fois plus de risque de développer un CHC qu'un sujet sain, d'où l'importance de la vaccination pour les populations protégées du CHC (But et al., 2008). Dans les pays industrialisés, le VHC représente le principal facteur de risque avec la consommation d'alcool. Ce virus n'est pas capable de s'intégrer dans le génome de l'hôte ce qui suggère un mécanisme différent du VHB dans la carcinogenèse hépatique. En plus de l'inflammation chronique et de la cirrhose induites par l'infection, certaines protéines du VHC jouent un rôle dans la transformation tumorale et l'activation de voies oncogéniques (Levrero et al., 2006). L'incidence du CHC est en constante augmentation depuis une vingtaine d'années notamment en raison d'une infection accrue par le VHC, d'un meilleur diagnostic et d'une prise en charge plus performante des autres complications de la cirrhose (Garcia-Tsao et al., 2001 ; Trinchet et al., 2009). Le CHC est ainsi devenu la principale cause de décès en cas de cirrhose. Cependant, deux nouveaux traitements du VHC ont été très récemment mis sur le marché et se révèlent bien plus efficaces que le dernier traitement de référence constitué d'interféron alpha, de ribavirine ainsi que d'un des premiers inhibiteurs directs du VHC (le telaprevir ou le boceprevir) pour les patients atteints d'un virus de génotype 1. Ces nouveaux traitements sont le simeprevir qui appartient à la deuxième vague des inhibiteurs de protéase du virus, et le sofosbuvir qui est le premier inhibiteur de la polymérase du VHC. Ils peuvent être combinés à l'interféron alpha et à la ribavirine et bloquent efficacement la multiplication du VHC quel que soit son génotype en provoquant beaucoup moins d'effets secondaires que le dernier traitement de référence. Ces nouvelles molécules devraient conduire à une diminution drastique voire à une éradication des CHCs développés sur un foie infecté par le VHC dans les prochaines années même si pour l'instant, il reste encore à solutionner leur coût exorbitant.

Un autre facteur de risque en pleine expansion dans les pays industrialisés est la stéatose hépatique non alcoolique provoquée par l'obésité et le diabète qui favorise également le développement de CHC (Powell et al., 1990). Les autres facteurs de risque du CHC sont l'exposition à l'aflatoxine B1 qui contamine les aliments dans les pays en voie de développement ou encore des maladies telles que l'hépatite auto-immune, le déficit en alpha 1-antitrypsine et l'hémochromatose. L'aflatoxine B1 favorise le développement des CHCs de manière indépendante, mais elle agit aussi comme un cofacteur chez les personnes déjà infectées par le VHB (Kensler et al., 2011). Le sexe masculin et un âge supérieur à 60 ans sont aussi des paramètres favorables au développement d'un cancer du foie.

3. Survenue et progression du CHC

La carcinogenèse hépatique est un processus en plusieurs étapes débutant avec l'exposition à différents facteurs de risque, suivie de la mise en place d'une atteinte hépatique chronique et d'une cirrhose constituant une lésion préneoplasique et se terminant avec le développement d'un CHC. En cas d'absence de cirrhose, les mécanismes de carcinogenèse hépatique les mieux connus sont les altérations génétiques induites par l'intégration du VHB dans le génome des hépatocytes et l'expression de ses protéines virales (Bréchot et al., 2000), ainsi que la mutation de p53 par l'aflatoxine B1 (Bressac et al., 1991). En présence d'une cirrhose, les anomalies génétiques apparaissent au cours des nombreux cycles de nécrose et de régénération hépatique (ex : perte d'allèles chromosomiques, mutations). Elles sont principalement retrouvées dans les régions chromosomiques contenant des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur et confèrent un avantage prolifératif. C'est le cas du bras long du chromosome 17, contenant le gène suppresseur de tumeur *TP53*, qui est perdu dans la moitié des CHCs (Boige et al., 1997). Des défaillances dans les mécanismes de réparation des erreurs de l'ADN semblent également être impliquées. Toutes ces anomalies conduisent à l'apparition de foyers d'hépatocytes dysplasiques qui vont progresser en nodules. Ces derniers peuvent dégénérer en CHC si les altérations génétiques sont suffisantes pour entraîner la transformation tumorale et l'immortalisation de ces hépatocytes grâce à la réexpression de la télomérase (figure 19) (Farazi et al., 2006). La durée de tout ce processus est longue car il peut s'écouler jusqu'à plus de 30 ans entre l'exposition chronique à un facteur de risque et le développement d'un CHC.

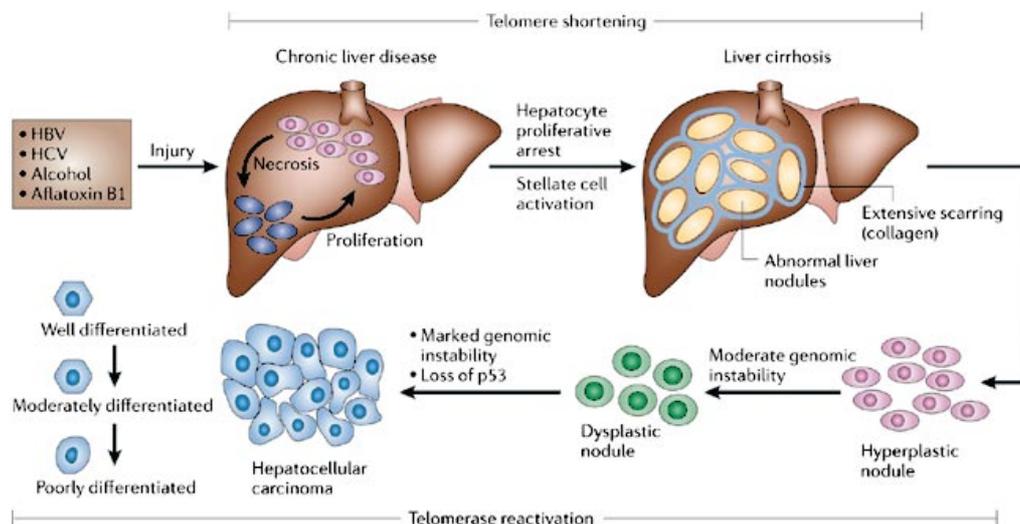


Figure 19: Progression histopathologique et caractéristiques moléculaires du carcinome hépatocellulaire (Farazi et al., 2006).

4. Diagnostic et suivi des patients

En cas de cirrhose ou d'infection par le VHB sans apparition d'une cirrhose, les patients sont surveillés tous les 6 mois par échographie abdominale pour dépister la formation d'un CHC.

Le dosage sérique de l'alpha-foetoprotéine (AFP) est également réalisé en parallèle même si sa sensibilité est seulement de 60% et que son élévation peut être liée à une cirrhose ou à d'autres types de cancers (Bruix et al., 2005 ; Lok et al., 2010). Après la détection d'une lésion nodulaire par échographie, la confirmation du diagnostic repose sur la taille du nodule et sur la mise en évidence d'une hypervascularisation par scanner ou imagerie par résonance magnétique (IRM). Le CHC peut également être identifié par l'apparition de symptômes liés au développement tumoral comme l'altération de l'état général, des douleurs abdominales, l'apparition d'ascite et/ou une hémorragie digestive. Dans ce cas, la cirrhose et le CHC souvent déjà évolué sont généralement découverts en même temps.

Les traitements thérapeutiques existants pour le CHC sont très limités. La résection chirurgicale est le principal traitement curatif, surtout pour les CHCs qui se développent sur un foie non cirrhotique. Elle est cependant réalisée seulement chez une minorité de patients en raison de nombreuses contre-indications comme la présence de lésions multifocales, d'une extension extra-hépatique ou d'une cirrhose. En effet, la présence d'une cirrhose augmente le risque de mortalité lié à la chirurgie mais également celui de développer une insuffisance hépatique ou des récurrences tumorales ce qui limite l'utilisation de ce traitement. Par contre, la résection chirurgicale peut être réalisée avec succès sur des CHCs de grande taille pour lesquels il n'existe pas d'autres alternatives thérapeutiques efficaces (Pache et al., 2010). Pour les petites tumeurs du foie inférieures à 3 cm, il existe des techniques de résection locale comme la radiofréquence ou l'injection d'éthanol qui sont moins invasives, moins coûteuses et moins risquées que la chirurgie.

La transplantation hépatique est le traitement le plus adapté pour traiter les CHCs qui se développent sur un foie cirrhotique car elle permet d'éliminer complètement la tumeur et le foie cirrhotique sous-jacent. Cependant, le nombre d'organes disponibles étant très limité, les patients sont rigoureusement sélectionnés pour obtenir le meilleur bénéfice en terme de survie. On utilise pour cela depuis 1996 les critères dits de Milan (lésion unique de moins de 5 cm ou un maximum de 3 lésions de moins de 3 cm, sans invasion vasculaire ni lésion extra-hépatique) pour obtenir une survie à cinq ans de 70%. Il existe également des contre-indications pour ce traitement telles qu'un âge supérieur à 65 ans ou des comorbidités associées au CHC. Pendant la période d'attente de la greffe, un traitement néo-adjuvant peut être envisagé chez les patients présentant une fonction hépatique suffisante. Dans ce cas, le traitement utilisé est une résection par radiofréquence avec ou sans chimio-embolisation artérielle.

Le diagnostic tardif des CHCs conduit à traiter fréquemment des stades avancés de CHCs pour lesquels la prise en charge thérapeutique est très limitée. Le choix s'oriente alors souvent vers des soins palliatifs avec l'utilisation de la chimio-embolisation artérielle ou de la chimiothérapie. La classification BLBC (Barcelona Clinic Liver Cancer) permet justement de choisir le traitement en fonction du stade du CHC (figure 20).

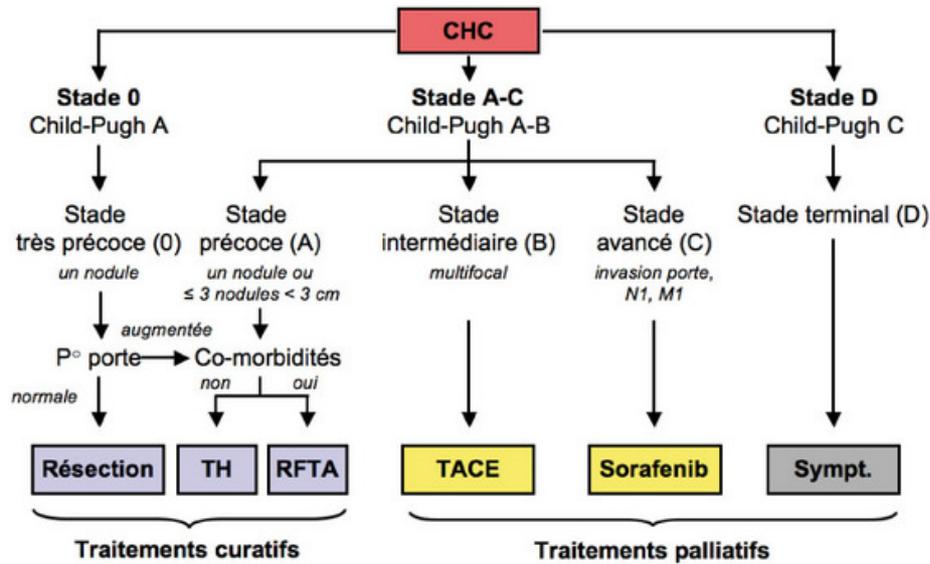


Figure 20: La classification Barcelona Clinic Liver Cancer permet de corréliser les stades de développement du CHC avec les traitements (adapté de Llovet et al., 2008).

D'importantes recherches ont été réalisées au cours des dix dernières années afin d'identifier une thérapie ciblée dans les CHCs. La principale découverte repose sur l'utilisation d'une nouvelle molécule anti-angiogénique, le sorafénib (Nexavar®) pour les CHCs à un stade avancé (Llovet et al., 2008). L'angiogenèse est en effet important dans la progression des CHCs et son augmentation est associée à un mauvais pronostic (Mann et al., 2007; Ribatti et al., 2006). Depuis, plusieurs études ont montré que le Sorafénib inhibe différentes voies de signalisation, dont les voies du VEGF (Vascular endothelial growth factor) et du PDGF (Platelet-derived growth factor) qui régulent l'angiogenèse, mais aussi la voie Ras/MAPK qui régule la prolifération cellulaire (Villanueva et Llovet, 2011). Il n'est donc pas évident d'identifier les voies utilisées par le Sorafénib pour ralentir la progression tumorale dans le CHC. Cette molécule a permis une amélioration significative de la survie globale et de la survie sans progression tumorale, qui était auparavant médiocre et est aujourd'hui le traitement de référence du CHC avancé. Cependant, ce traitement n'est pas efficace chez tous les patients et entraîne de nombreux effets secondaires. Les patients pour lesquels le Sorafénib n'est pas bénéfique reçoivent uniquement des soins palliatifs c'est pourquoi il est nécessaire de découvrir de nouvelles thérapies ciblées.

D'autres molécules ont vu le jour depuis, tels que des inhibiteurs de la voie mTOR (mammalian target of Rapamycin) (sirolimus (Rapamune®)), ou de la voie de l'EGFR (« Epidermal growth factor receptor ») (cetuximab (Erbix®)). Cependant, malgré les résultats très encourageants de plusieurs études, leur utilisation doit être évaluée dans le cadre d'essais thérapeutiques prospectifs (Villanueva et Llovet, 2011).

Une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la carcinogenèse hépatique devrait permettre le développement de nouvelles thérapies ciblées dans les prochaines années.

5. Voies de signalisation impliquées

De nombreuses altérations génétiques et épigénétiques ont été décrites dans le CHC et aboutissent à la dérégulation de différentes voies de signalisation impliquées dans la survie, la prolifération, l'apoptose, la motilité et la différenciation cellulaire. Les mécanismes de la carcinogenèse hépatique restent cependant encore mal connus en raison de la grande hétérogénéité des facteurs impliqués dans le développement des CHCs.

Les altérations génétiques sont principalement retrouvées dans les voies de signalisation impliquées dans la régulation du cycle cellulaire comme p53, Wnt/ β -caténine, c-Myc, ou pRb et dans la balance entre la survie et l'apoptose avec les voies TGF β , AKT et EGFR. Ces voies sont aussi la cible d'altérations épigénétiques avec notamment des variations de la méthylation de l'ADN et de protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine comme la reptine (Calvisi et al., 2007 ; Rousseau et al., 2007). La dérégulation de ces voies est impliquée à la fois dans la mise en place de la carcinogenèse hépatique, mais également dans l'invasion tumorale et la formation de métastases (Giannelli et al., 2002 ; Park et al., 2001). La réactivation de la télomérase retrouvée dans près de 90% des CHCs est aussi un facteur important dans la progression tumorale (Nagao et al., 1999).

L'accumulation de ces altérations conduit à l'apparition de populations monoclonales d'hépatocytes dysplasiques présentant une réactivation de la télomérase, une instabilité des microsatellites dans certains cas et des altérations au niveau de certains gènes et chromosomes. Ces altérations conduisent notamment à l'activation d'oncogènes (ex : c-myc et β -caténine) et de facteurs de croissance (TGF α et IGF2), à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (ex : p53, Rb et IGF2R) et à de fréquentes délétions chromosomiques (1p, 4q, 6q, 8p, 9p, 13q, 16p, 16q et 17p). Après une sélection des populations clonales, ces dernières vont se développer et accumuler des altérations au sein des nodules dysplasiques pour permettre l'émergence de CHC. La carcinogenèse hépatique reste cependant très hétérogène car elle résulte de l'altération de plusieurs gènes possibles.

Certaines voies de signalisation sont altérées dès les étapes précancéreuses au stade de la cirrhose. C'est le cas des facteurs de croissance TGF α (Transforming growth factor alpha) et IGF2 (Insulin-like growth factor 2) (Rehem et al., 2011). Au contraire, d'autres voies ne sont dérégulées que lors des étapes tardives de carcinogenèse comme la voie Wnt/ β -caténine dont l'activation n'est généralement pas dérégulée dans le tissu cirrhotique et les nodules dysplasiques.

Nous allons nous intéresser particulièrement aux deux grandes voies de carcinogenèse hépatique qui sont le gène suppresseur de tumeur p53 et de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (Laurent-Puig et al., 2001 ; Boyault et al., 2007).

5.1 P53

Le gène *TP53* est le gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans les cancers humains, et en particulier dans les CHCs (Zucman-Rossi et al., 2010). Lors d'une agression cellulaire, la protéine p53 sauvage est stabilisée ce qui favorise son rôle de facteur de transcription en induisant l'expression de plusieurs gènes cibles. Elle peut provoquer un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 pour permettre la réparation des dommages à l'ADN ou une mort des cellules par apoptose ou sénescence selon le stimulus reçu. Son rôle est ainsi d'éviter la multiplication de cellules défectueuses pouvant participer à la transformation tumorale.

On trouve des mutations de p53 dans plus de 50% des CHC développés chez les patients exposés à l'aflatoxine B1, alors que ce chiffre n'est que de 20% chez les autres patients. En effet, l'aflatoxine B1 est un puissant carcinogène hépatique qui induit la substitution d'une guanine en thymine (ou en cytosine dans certains cas) au niveau du codon 249 de p53 et ainsi l'expression d'une protéine mutée au niveau de l'acide aminé correspondant (R249S) et non fonctionnelle (Bressac et al., 1991 ; Hsu et al., 1991). L'aflatoxine B1 a aussi un effet coopératif avec le VHB dans la survenue de mutations de p53. D'autres facteurs peuvent entraîner une inactivation de p53 comme par exemple la délétion du bras long du chromosome 17 contenant le locus du gène, la surexpression de MDM2 qui inhibe p53 ou au contraire l'inactivation de p19ARF qui active le gène suppresseur de tumeur.

Dans plusieurs types tumoraux, la mutation de p53 et/ou l'accumulation de la protéine mutée est associée à l'agressivité tumorale avec des cancers de plus haut grade (Esrig et al., 1993 ; Kupryjańczyk et al., 1993). Dans le CHC, les altérations de p53 sont retrouvées dans des tumeurs peu différenciées et de plus grande taille et sont corrélées à une survie réduite des patients (Qin et al., 2002).

5.2 Wnt/ β -caténine

La β -caténine est une protéine impliquée à la fois dans l'adhésion cellulaire et la régulation de la transcription de gènes cibles en réponse aux facteurs Wnt. La voie Wnt/ β -caténine joue un rôle important au cours du développement embryonnaire en modulant l'expression de protéines qui contrôlent la croissance, la migration, le déterminisme et la polarisation cellulaires. Elle joue aussi un rôle dans les tissus adultes en participant au contrôle de la prolifération cellulaire. Cette voie peut être activée de façon anormale par mutation de l'un

de ses composants et participer ainsi à la carcinogenèse dans de nombreux tissus (Reya et al., 2005).

Dans le cytoplasme, la β -caténine est liée à l'E-cadhérine et au cytosquelette d'actine via une molécule d' α -caténine ce qui est essentiel à la formation des jonctions adhérentes. En l'absence de ligand Wnt, la β -caténine non engagée dans les jonctions intercellulaires est piégée au sein d'un complexe multiprotéique composé de deux protéines adaptatrices appelées l'axine et APC, de deux sérine/thréonine kinases comprenant la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β) et la caséine kinase 1 (CK1 α), et de la protéine phosphatase PP2A. Au sein de ce complexe, la β -caténine est tout d'abord phosphorylée par CK1 α au niveau de la sérine 45 ce qui crée un site de fixation pour GSK3 β qui induit une cascade de phosphorylation parmi lesquelles la thréonine 41 et les sérines 33 et 37 (Amit et al., 2002). La protéine phosphorylée est alors reconnue par une ubiquitine ligase E3 appelée β -TRCP (transducing repeat containing protein) ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome. Dans ce cas là, la voie Wnt/ β -caténine est inactive.

La présence d'un ligand Wnt permet sa fixation sur les récepteurs frizzled ce qui conduit à l'activation concomitante de ces récepteurs et de leurs corécepteurs LRP5/6 et au recrutement de la protéine cytoplasmique dishevelled (DVL). La protéine DVL est ensuite activée ce qui entraîne la phosphorylation des corécepteurs LRP5/6 sur un motif PPPSPXS par une caséine kinase membranaire (CK1 γ) et par GSK3 β . Cette modification crée un site de forte affinité pour l'axine ce qui permet son recrutement et dissout ainsi le complexe de phosphorylation de la β -caténine. Cette dernière s'accumule dans le cytoplasme et peut transloquer dans le noyau où elle se lie aux facteurs de transcription de la famille LEF (Lymphoid enhancer factor) et TCF (T-cell factor » (TCF)) ce qui induit la transcription de gènes cibles, tels que la cycline D1 (Shtutman et al., 1999). La voie Wnt/ β -caténine est alors active (figure 21).

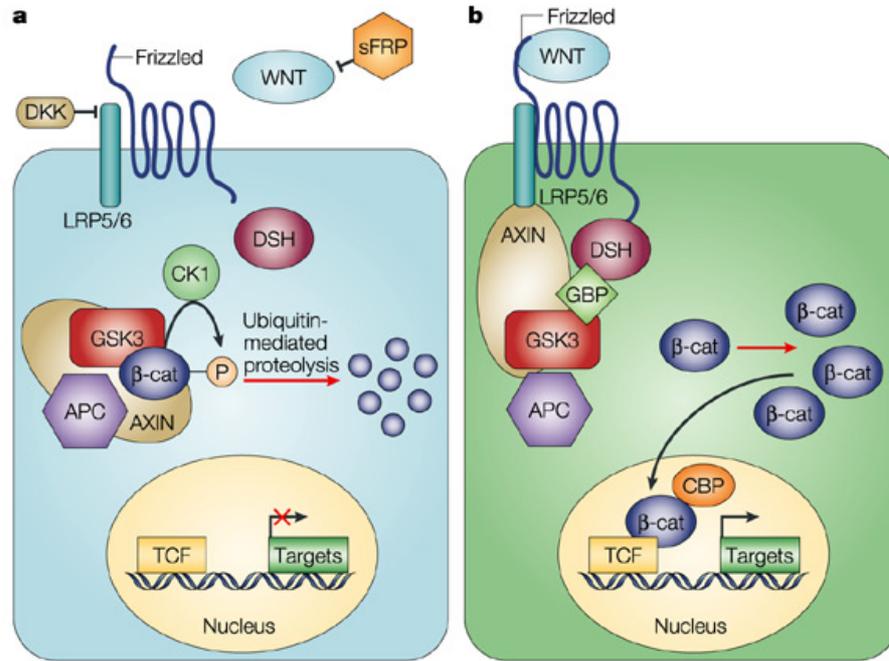


Figure 21: La voie de signalisation Wnt/béta-caténine (Moon et al., 2004).

(a) En l'absence d'un ligand Wnt, la β -caténine est piégée au sein d'un complexe constitué de l'axine, d'APC, de la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β) et de la caséine kinase 1 (CK1). Au sein de ce complexe, la β -caténine est phosphorylée par CK1 et GSK3 β ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome. Dans ce cas, la voie Wnt/béta-caténine est inactive. (b) En présence d'un ligand Wnt, ce dernier se fixe sur les récepteurs frizzled ce qui active à la fois les récepteurs et leurs corécepteurs LRP5/6 et conduit au recrutement de la protéine cytoplasmique dishevelled (DSH). Ceci participe au recrutement de l'axine et ainsi à la dissolution du complexe de phosphorylation de la β -caténine. La protéine s'accumule dans le cytoplasme et peut transloquer dans le noyau où elle se lie aux facteurs de transcription de la famille LEF (Lymphoid enhancer factor) et TCF (T-cell factor) ce qui induit la transcription de gènes cibles. La voie Wnt/béta-caténine est alors active.

La voie Wnt/ β -caténine est la voie de signalisation la plus dérégulée dans les CHCs (Zucman-Rossi et al., 2010) ce qui aboutit à une activation constitutive de la voie indépendamment de la présence d'un ligand Wnt. Le gène *CTNNB1* codant pour la β -caténine peut être directement altéré dans certains CHCs. Dans ce cas, les mutations ou les délétions retrouvées dans la β -caténine touchent les sites de phosphorylation par GSK3 β et CK1 α localisés dans l'exon 3 du gène ce qui bloque la dégradation de la β -caténine et conduit à son accumulation dans le noyau et à la transcription de ses gènes cibles (Miyoshi et al., 1998). La voie Wnt/ β -caténine peut être aussi activée de manière constitutive dans certains CHCs par l'activation ou l'inactivation de gènes impliqués dans le complexe de phosphorylation de la β -caténine. C'est le cas de l'axine pour laquelle des mutations inactivatrices ont été décrites dans certains CHCs (Taniguchi et al., 2002). Cependant, l'analyse des gènes cibles de la β -caténine comme la glutamine synthase (GS), GPR49 ou GLT1 a montré que la perte de fonction de l'axine n'est pas équivalente au gain de fonction de la β -caténine dans le CHC ce qui suggère que le rôle de l'axine ne passe pas uniquement

par la β -caténine (Zucman-Rossi et al., 2007). Il existe aussi des mutations rares d'APC dans le CHC qui ont été mises en évidence par séquençage à haut débit (Guichard et al., 2012). Chez la souris, l'activation de la voie Wnt/ β -caténine par inactivation du gène *APC* spécifiquement dans le foie conduit au développement de CHC (Colnot et al., 2004).

6. Classification des CHCs

Il existe plusieurs systèmes de classification des CHCs qui évoluent en permanence. La classification BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) est la plus utilisée dans les études et la prise en charge clinique des patients (Bruix et al., 2005 ; Llovet et al., 2008). Les principaux facteurs pronostiques de cette classification sont la fonction hépatique, la présence d'une hypertension portale, le nombre et la taille des nodules tumoraux, la présence d'une invasion vasculaire ou de métastases extra-hépatiques, ainsi que l'état général du patient. Cependant, cette classification ne tient pas compte des altérations moléculaires des CHCs. Le développement récent d'études à haut débit a permis d'obtenir les données transcriptomiques des CHCs et de les associer avec les altérations génomiques et les paramètres cliniques et étiologiques pour obtenir une classification moléculaire des CHCs en six groupes distincts (Boyault et al., 2007). Selon cette classification détaillée sur la figure n°22, les CHCs des groupes G1/G2/G3 sont caractérisés par une forte instabilité chromosomique associée à une perte d'hétérozygotie à différents loci comme au niveau des régions 16p et 4q. Les CHCs des deux premiers groupes se développent majoritairement suite à une infection chronique par le VHB et sont caractérisés notamment par une activation de la voie AKT et une dérégulation du cycle cellulaire. Les mutations du gène *TP53* sont retrouvées dans les groupes G2 et G3. Les CHCs des groupes G4/G5/G6 présentent un profil d'expression très différent de celui des trois premiers groupes et associé à une stabilité chromosomique. Le groupe G4 est très hétérogène et comprend à la fois des adénomes et des carcinomes hépatocellulaires qui présentent notamment des mutations du gène *TCF1* codant pour la protéine HNF1a (Hepatocyte nuclear factor 1 alpha). Les groupes G5 et G6 sont caractérisés par la présence de mutations activatrices de la β -caténine et par une hyperméthylation du promoteur de la E-cadhérine (*CDH1*) (Boyault et al., 2007). Les CHCs du groupe G6 sont plus agressifs avec la présence de nodules satellites, une très forte activation de la voie Wnt/ β -caténine et une sous-expression de la E-cadhérine.

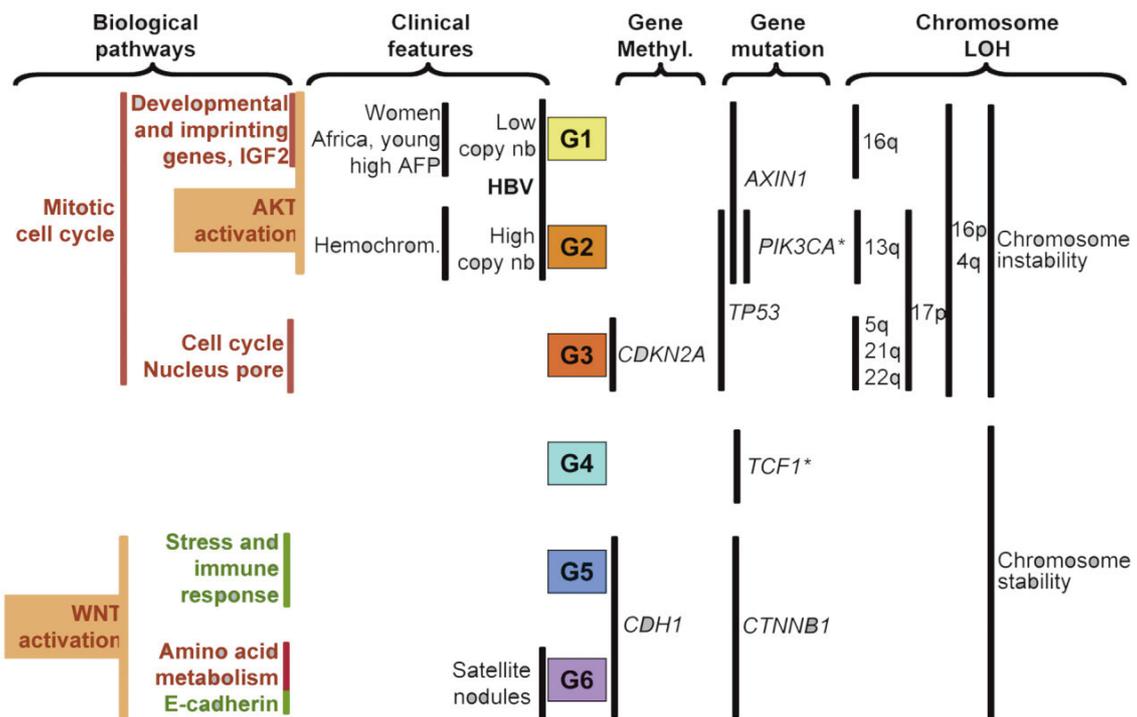


Figure 22: Les CHCs peuvent être classés en six sous-groupes selon l'analyse de leurs données transcriptomiques associée avec les altérations génomiques et les paramètres cliniques (Boyault et al., 2007).

Les CHCs sont classés en six sous-groupes de G1 à G6 selon l'étude de leur transcriptome. Les lignes verticales correspondent aux caractéristiques cliniques et génomiques qui leur sont associées. La couleur rouge indique une surexpression des gènes alors que la couleur verte indique une sous-expression. * = événement rare.

Depuis, d'autres classifications reliant les anomalies moléculaires et les paramètres cliniques sont apparues. La classification la plus robuste est celle de Hoshida et al. qui repose sur l'analyse des échantillons de plus de 600 patients et permet de classer les CHCs en trois grands groupes (Hoshida et al., 2009). Le groupe S1 est caractérisé par une activation aberrante de la voie Wnt/ β -caténine, le groupe S2 est associé à une augmentation de la prolifération cellulaire avec une activation de Myc et AKT et le groupe S3 est lié à une différenciation des hépatocytes. L'étude de la signature de gènes caractéristiques de chaque groupe permet d'identifier de nouveaux mécanismes impliqués dans la carcinogénèse hépatique, comme le rôle de l'activation du TGF β dans l'activation de la voie Wnt/ β -caténine.

D'autres travaux plus récents de séquençage du génome complet de plusieurs CHCs issus de différentes étiologies ont permis de confirmer les mutations déjà étudiées, et d'identifier des mutations récurrentes et de nouvelles altérations (Fujimoto et al., 2012; Guichard et al., 2012). Les mutations récurrentes identifiées sont principalement retrouvées dans les gènes

ARI1B, *ARID2*, *MLL*, *MLL3* impliqués dans la régulation de la chromatine (Fujimoto et al., 2012). L'intégration du génome du VHB au niveau du locus de TERT est aussi un événement fréquent dans les sous-populations clonales. Ce séquençage à grande échelle a aussi permis quatre nouvelles altérations dans les gènes *ARID1A*, *RPS6KA3*, *NFE2L2* et *IRF2* qui n'avaient encore jamais été décrites dans le CHC (Guichard et al., 2012). L'analyse fonctionnelle de ces mutations a mis en évidence leur rôle dans la carcinogenèse hépatique. De plus, la présence de certaines de ces mutations est spécifique d'une étiologie donnée du CHC. C'est le cas de l'inactivation de *IRF2* qui est retrouvée exclusivement dans les CHCs liés à une infection par le VHB et qui provoque une inhibition de p53. A l'inverse, l'inactivation des gènes impliqués dans la régulation de la chromatine est principalement identifiée dans les CHCs induits par une consommation excessive d'alcool.

Ces données fournissent de nouveaux éléments dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la carcinogenèse hépatique et ouvrent de nouvelles pistes de recherche pour le développement de thérapies ciblées.

VI. Rnd3 et carcinome hépatocellulaire

1. Dérégulation de l'expression de Rnd3

Trois études indépendantes, dont l'une effectuée au laboratoire avant mon arrivée, ont démontré que la GTPase Rnd3 est sous-exprimée dans le CHC (Grise et al., 2012 ; Luo et al., 2012 ; Ma et al., 2013). La sous-expression de Rnd3 est détectée dans la majorité des échantillons humains de CHC, à la fois au niveau de l'ARNm et de la protéine (figure 23A et B). Elle est retrouvée quelle que soit l'étiologie du CHC qui est principalement une infection par les virus de l'hépatite B ou C, ou une consommation excessive d'alcool selon les échantillons. L'expression de l'ARNm de *RND3* est diminuée au minimum d'un facteur 2 dans les échantillons tumoraux testés. De plus, cette sous-expression est retrouvée dans de nombreuses lignées cellulaires de CHCs en comparaison avec des hépatocytes primaires ou des lignées d'hépatocytes normaux. Par ailleurs, deux de ces études mettent en évidence que la sous-expression de la protéine Rnd3 est associée à une diminution de la survie sans maladie chez les patients atteints de CHC (Luo et al., 2012 ; Ma et al., 2013). Il a également été montré une corrélation inverse du niveau d'expression de Rnd3 avec le grade des CHCs ainsi qu'avec la présence de nodules satellites qui sont des métastases intra-hépatiques. L'ensemble de ces données souligne l'implication de Rnd3 dans l'invasion tumorale et suggère qu'il pourrait jouer un rôle de gène suppresseur de métastases dans le CHC.

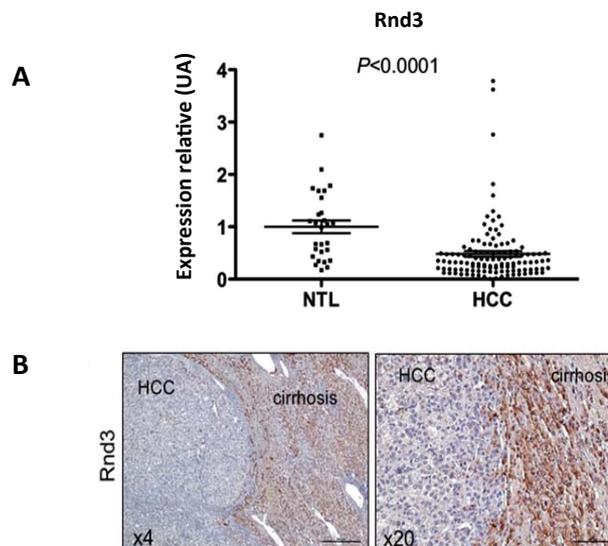


Figure 23: La GTPase Rnd3 est sous-exprimée dans la majorité des CHCs humains, à la fois au niveau de l'ARNm et de la protéine (adapté de Grise et al., 2012).

A. Le niveau d'expression de l'ARNm de *RND3* est mesuré par RT-PCR quantitative sur 28 échantillons de foie non tumoral (NTL) et 120 échantillons de CHC (HCC). **B.** Le marquage de la protéine Rnd3 est analysé par immunohistochimie sur des tissus cirrhotiques en comparaison avec des tissus de CHC.

2. Rôle de la protéine Rnd3 dans la croissance des cellules de CHC

L'impact de la sous-expression de Rnd3 dans la croissance des cellules tumorales de foie semble être très dépendant de la lignée cellulaire étudiée. En effet, la diminution de l'expression de Rnd3 peut conduire à une inhibition de la croissance cellulaire comme c'est le cas dans les lignées Hep3B et Huh7 (figure 24) (Grise et al., 2012). Elle peut à l'inverse augmenter la croissance des cellules HepG2 (Xia et al., 2013), ou encore n'avoir aucun impact sur la croissance des lignées SMMC-7721 et BEL-7402 (Ma et al., 2013).

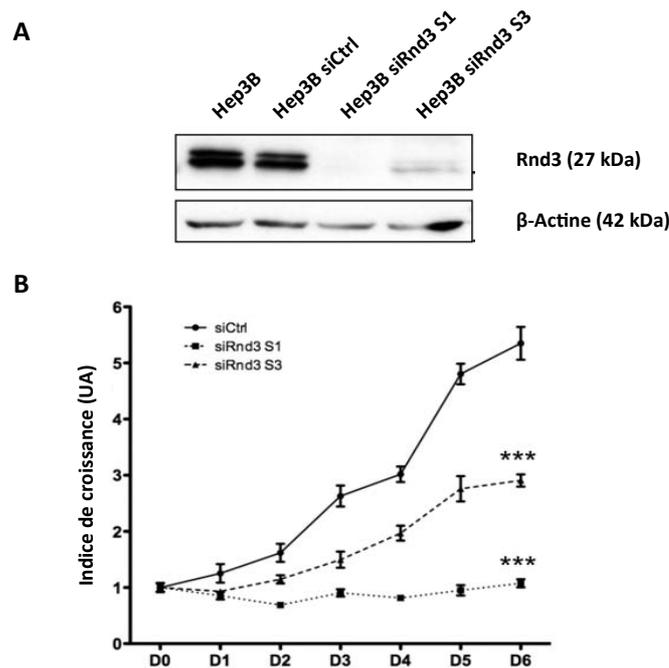


Figure 24: L'extinction de Rnd3 par siARN induit une diminution de la croissance cellulaire dans la lignée Hep3B (adapté de Grise et al., 2012).

A. Les cellules Hep3B sont transfectées ou pas avec deux siARNs ciblant Rnd3 (S1 et S3) ou un siARN contrôle (Ctrl). Après 72 heures, les extraits protéiques sont analysés par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre Rnd3 et la β -actine. Le niveau d'expression de la β -actine sert de contrôle de charge. **B.** La croissance des cellules Hep3B transfectées avec les siARNs ciblant Rnd3 (S1 ou S3) ou avec un siCtrl est mesurée pendant 6 jours. Pour chaque temps, les cellules sont fixées dans de l'acide trichloroacétique 50% pendant 1 heure à 4°C, et marquées avec le kit SulfoRhodamine B (Sigma). L'absorbance à 545 nm, proportionnelle au nombre de cellules vivantes, est mesurée au spectrophotomètre (n=3). ***P < 0.0005 par rapport à la condition siCtrl.

Cet impact très variable de la sous-expression de Rnd3 sur la croissance des lignées d'hépatocytes tumoraux pourrait s'expliquer par la présence d'autres altérations moléculaires dans certaines lignées permettant de contrebalancer les mécanismes mis en jeu par Rnd3 pour perturber la croissance cellulaire.

3. Rôle de la protéine Rnd3 dans la migration et l'invasion des cellules de CHC

Les trois études décrites précédemment permettent par contre d'établir un consensus sur l'implication de Rnd3 dans la migration et l'invasion des cellules tumorales de foie. Toutes les données montrent une augmentation de l'invasion tumorale lors de l'extinction de Rnd3. Les résultats obtenus sur les échantillons tumoraux humains montrent une sous-expression de Rnd3 plus importante dans les CHCs présentant des nodules satellites qui correspondent à des métastases intra-hépatiques (Grise et al., 2012). De plus, la sous-expression de Rnd3 est associée aux CHCs de haut grade et à une diminution de la survie sans maladie des patients (Luo et al., 2012 ; Ma et al., 2013). Ces résultats ont été confirmés *in vitro* dans des lignées cellulaires de CHC dans lesquelles l'extinction de Rnd3 augmente les capacités d'invasion tumorale (figure 25).

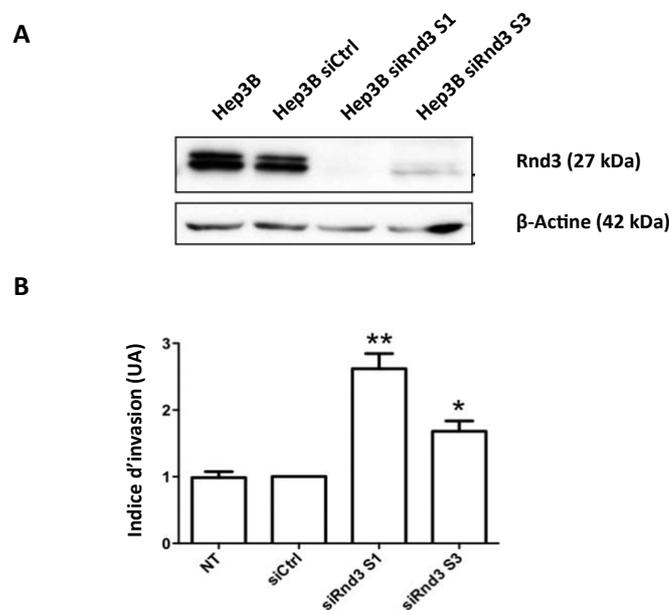


Figure 25: L'extinction de Rnd3 par siARN induit une augmentation de l'invasion cellulaire dans la lignée Hep3B (adapté de Grise et al., 2012).

A. Les cellules Hep3B sont transfectées ou pas avec deux siARNs ciblant Rnd3 (S1 et S3) ou un siARN contrôle (Ctrl). Après 72 heures, les extraits protéiques sont analysés par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre Rnd3 et la β -actine. Le niveau d'expression de la β -actine sert de contrôle de charge. **B.** 48 heures après la transfection, les cellules sont ensemencées sur une chambre coâtée avec du Matrigel afin d'évaluer l'invasion des cellules pendant 20 heures. * $P=0,0221$ et ** $P=0,0057$ par rapport aux cellules transfectées avec le siCtrl.

Le mode d'invasion semble cependant différent selon la lignée cellulaire utilisée. En effet, la perte de Rnd3 induit la mise en place d'une transition épithélio-mésenchymateuse dans les cellules Hep3B avec une diminution de l'expression de miR-200 et une augmentation de celle de ZEB2 qui conduisent tous deux à une répression de la E-cadhérine (Grise et al., 2012). Dans ce cas, l'invasion induite par la perte de Rnd3 dépend de l'activité de Rac et

Cdc42. L'extinction de Rnd3 dans les lignées SMMC-7721 et BEL-7402 provoque l'activation de la voie RhoA/ROCK ce qui augmente la phosphorylation de MYPT1 et favorise ainsi la migration et l'invasion des cellules selon un mode amiboïde (Ma et al., 2013).

L'impact de l'extinction de Rnd3 a également été confirmé *in vivo* en utilisant un modèle de xéngreffes orthotopiques de cellules MHCC-97L dans le lobe hépatique gauche de souris immunodéprimées (Ma et al., 2013). L'extinction de Rnd3 augmente l'invasion locale des hépatocytes tumoraux MHCC-97L en induisant la présence de fronts tumoraux irréguliers et en augmentant surtout l'invasion veineuse des tumeurs formées (figure 26).

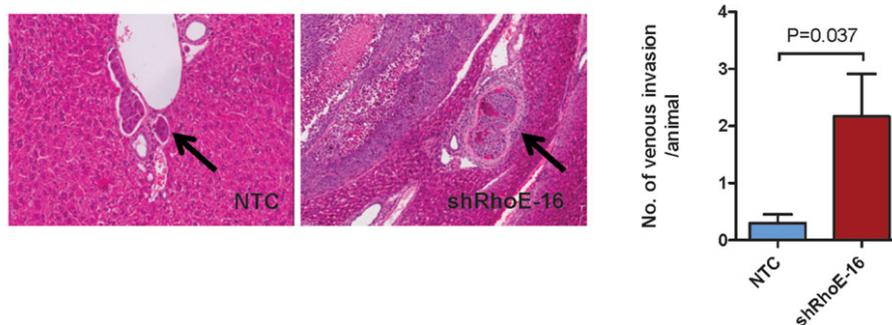


Figure 26: L'extinction de Rnd3 par siARN induit une augmentation de l'invasion tumorale *in vivo* dans la lignée MHCC-97L (Ma et al., 2013).

De multiples foyers d'invasion veineuse, comme ceux marqués par la flèche noire, sont retrouvés plus fréquemment dans le foie des souris injectées avec les cellules MHCC-97L exprimant un shARN dirigé contre RhoE (= Rnd3) que dans celui des souris contrôles (test de Student $P=0,037$).

Les différents mécanismes moléculaires mis en jeu par Rnd3 en fonction de la lignée de CHC utilisée ne semblent pas être dus à une différence dans l'environnement des hépatocytes tumoraux car les tests d'invasion sur les lignées Hep3B, SMMC-7721 et BEL-7402 ont tous été réalisés dans du Matrigel. Ces trois lignées pourraient présenter des altérations dans l'expression et/ou la fonction des RhoGTPases classiques (RhoA, Rac1 et Cdc42) ou de ROCK qui pourraient expliquer ces différences.

CHAPITRE 2 - MATERIEL ET METHODES

1. Culture cellulaire et transfections

1.1 Culture de lignées cellulaires de carcinome hépatocellulaire

Les lignées Hep3B et Huh7 sont cultivées dans du milieu DMEM Glutamax contenant 4.5g/L de glucose (Gibco®) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (PAN Biotech) et 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco®). La lignée SNU398 est elle cultivée dans du milieu RPMI 1640 Glutamax (Gibco®) supplémenté avec 10% de SVF décomplémenté (PAN Biotech) et 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco®). Les lignées sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humide enrichie à 5% de dioxyde de carbone.

1.2 Culture d'une autre lignée cellulaire tumorale

La lignée HeLa, dérivée d'un adénocarcinome du col de l'utérus, est cultivée dans du milieu DMEM Glutamax contenant 4.5g/L de glucose (Gibco®) supplémenté avec 10% de SVF décomplémenté (PAN Biotech) et 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco®). Elle est maintenue à 37°C dans une atmosphère humide enrichie à 5% de dioxyde de carbone.

1.3 Culture d'hépatocytes primaires de souris

Le protocole d'isolement et de culture des hépatocytes primaires de souris nous a été fourni par le Dr. Chantal Desdouets (Institut Cochin, Paris). Les souris âgées de 8 à 12 semaines sont anesthésiées par injection intra-péritonéale d'un mélange de kétamine (0,15 mg/g de poids corporel) et xylazine (15 µg/g de poids corporel). Après avoir réalisé une laparotomie, un cathéter est inséré dans la veine cave inférieure et fixé à l'aide d'un clamp. La veine porte est sectionnée et la pompe est ouverte pour perfuser le foie avec 50 mL de tampon Hépès (Hépès 10 mM ; NaCl 137 mM ; KCl 2,7 mM ; Na₂HPO₄ 0,2 mM ; EDTA 0,5 mM ; pH 7,65) préalablement chauffé à 37°C. Le foie est ensuite perfusé avec 15 mL de collagénase (0,6 mg/mL ; CaCl₂ - 2H₂O 10,9 mM) également chauffée à 37°C avant d'être prélevé et dilacéré dans du milieu William's Glutamax (pénicilline/streptomycine 1% ; fungizone 0,54 µM ; insuline 700 nM ; albumine de sérum bovin 0,1% ; dexaméthasone 25 nM) pour libérer les hépatocytes. La suspension cellulaire est filtrée sur un tamis de 70 µm puis centrifugée à 500 rpm pendant 2 minutes. Le culot contenant les hépatocytes est repris délicatement dans du milieu William's et lavé à deux nouvelles reprises par centrifugation. Lors du dernier lavage, le culot est repris dans 10 mL de milieu William's complété avec 10% de SVF et filtré sur un tamis de 40 µm. Le nombre d'hépatocytes vivants est obtenu par comptage après coloration au bleu trypan. Le pourcentage de viabilité des hépatocytes primaires doit être supérieur ou égal à 70% afin d'attester de la qualité de l'isolement et de valider ainsi l'utilisation des

cellules pour des expériences. 800 000 hépatocytes vivants sontensemencés par boîte de 6 cm, préalablement coatée avec du collagène (collagène de type I 0,01% ; acide acétique glacial 0,1% ; incubation 30 minutes à 37°C), dans du milieu William's contenant 10% de SVF. Après 4 heures d'adhésion, les hépatocytes sont lavés deux fois et incubés toute la nuit dans du milieu William's avec 10% de SVF. Le milieu de culture des hépatocytes est changé toutes les 24 heures.

1.4 Techniques de transfection

1.4.1 Transfection de plasmides dans les cellules Hep3B

Les cellules Hep3B sontensemencées la veille de la transfection avec du milieu de culture sans antibiotiques (200 000 cellules Hep3B par puits d'une plaque 6 puits). Le lendemain, les cellules sont transfectées avec la promofectin-hépatocyte (PromoKine®) en suivant le protocole du fournisseur. Le mélange de transfection est constitué de 200 µL de milieu Opti-MEM, 3 µg d'ADN plasmidique et 9,6 µL de promofectin-hépatocyte pour un puits d'une plaque 6 puits. Les plasmides utilisés sont le plasmide pcFP-IQGAP2 fourni par le Dr. Patrick Auguste (Unité INSERM U1029, Bordeaux) et le plasmide pGFP-Rnd3 fourni par le Dr. Emilie Pacary (Unité INSERM U862, Bordeaux) (Kato et al., 2002). Après 25 minutes d'incubation à température ambiante, le mélange de transfection est déposé sur les cellules qui sont alors incubées pendant 4 heures à 37°C. Le milieu est ensuite changé avec du milieu complet contenant des antibiotiques avant de replacer les cellules dans l'incubateur. Les expériences d'immunofluorescence et d'immunoprécipitation sont réalisées 24 heures après la transfection.

1.4.2 Transfection de siARNs dans les cellules Hep3B

Les siARNs sont transfectés deux fois dans les cellules Hep3B en utilisant la lipofectamine RNAiMAX® (Invitrogen) selon le protocole du fournisseur. La première transfection est effectuée en même temps que l'ensemencement des cellules (J1). Le mélange de transfection est constitué de 500 µL de milieu Opti-MEM, de 10 nM de siARN (Qiagen) et de 5 µL de lipofectamine RNAiMAX® pour un puits d'une plaque 6 puits. Les deux siARNs ciblant l'ARNm humain de Rnd3 sont basés sur des séquences publiées dans la littérature (S1 : 5'-TAGTAGAGCTCTCCAATCACA-3' et S3 : 5'-CAGAACGTGAAATGCAAGATA-3') (Fortier, 2008 ; Ongusaha, 2006). Les cellules sont ensuiteensemencées avec du milieu de culture sans antibiotiques dans des plaques 6 puits (200 000 cellules Hep3B par puits). Après 25 minutes d'incubation à température ambiante, le mélange de transfection est déposé sur les cellules et incubé pendant 4 heures à 37°C. Le milieu est alors changé avec du milieu complet contenant des antibiotiques. Deux jours après (J3), la deuxième transfection est réalisée en suivant le même protocole que celui utilisé pour la première. Avant l'ajout du mix de

transfection, le milieu de culture des cellules est remplacé avec du milieu sans antibiotiques. Les expériences sont effectuées 48 heures après la deuxième transfection (J5).

1.4.3 Transfection de micro-ARNs dans les cellules Huh7, SNU398 et HeLa

La transfection des micro-ARNs est réalisée en même temps que l'ensemencement des cellules en utilisant la lipofectamine RNAiMAX® (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. Le mélange de transfection est constitué de 500 µL de milieu Opti-MEM, 20 ou 25 nM de micro-ARN (Dharmacon) et 5 µL de lipofectamine RNAiMAX® pour un puits d'une plaque 6 puits. Les micro-ARNs utilisés appartiennent à la famille miR-200 (miR-200b : 5'-UAAUACUGCCUGGUAUGAUGA-3' ; miR-200c : 5'-UAAUACUGCCGGGUAUGAUGGA-3'). Les cellules sont ensuiteensemencées avec du milieu de culture sans antibiotiques dans des plaques 6 puits (100 000 cellules Huh7 ; 200 000 cellules SNU398 ou HeLa par puits). Après 25 minutes d'incubation à température ambiante, le mix de transfection est ajouté sur les cellules qui sont alors placées pendant 4 heures dans l'incubateur à 37°C. Le milieu est ensuite changé avec du milieu complet contenant des antibiotiques avant de replacer les cellules dans l'incubateur. Les expériences de western blot sont effectuées 72 heures après la transfection.

2. Techniques de biologie moléculaire

2.1 Extraction de l'ADN

Pour le génotypage des souris, l'ADN génomique est extrait en incubant un morceau de queue de souris d'environ 5 mm dans de la soude 50 mM pendant 1 heure à 95°C. La solution est ensuite vortexée et neutralisée avec une solution de Tris HCl 85 mM.

Pour les autres tissus prélevés sur les souris comme le foie, l'ADN génomique est extrait en incubant un morceau de tissu d'environ 30 mg dans une solution de lyse (DirectPCR Lysis Reagent, Viagen ; protéinase K 0,4 mg/mL) pendant 4 heures à 55°C sous agitation. La protéinase K est ensuite inactivée en incubant les échantillons pendant 45 minutes à 85°C. L'ADN extrait des différents tissus est conservé à -20°C.

En ce qui concerne les hépatocytes primaires isolés de souris, ils sont lavés une fois dans du PBS et lysés dans du tampon LBPK (Tris 100 mM pH 8,5 ; EDTA 5 mM ; SDS 0,2% ; NaCl 200 mM ; protéinase K 25 µg/mL) à l'aide d'un grattoir. Le lysat cellulaire est incubé pendant 14 à 16 heures à 55°C et sous agitation. Le lendemain, après une centrifugation à 13000 rpm pendant 10 minutes, les surnageants sont récupérés et mélangés avec de l'isopropanol 100%. Les pelotes d'ADN formées sont ensuite lavées dans de l'éthanol 70% avant d'être placées dans de l'eau et incubées pendant 4 heures à 37°C et sous agitation pour les

solubiliser. L'ADN extrait des hépatocytes primaires est dosé à l'aide d'un spectrophotomètre à 260 nm.

2.2 PCR

Les PCR sont utilisées d'une part pour le génotypage des animaux en utilisant l'ADN génomique extrait des queues de souris, et d'autre part pour l'étude de l'excision de l'exon 3 du gène *RND3* en utilisant l'ADN génomique extrait des tissus prélevés sur les souris ou des hépatocytes primaires murins. Le mélange de PCR est constitué d'ADN, de tampon de réaction GoTaq® 1X (Promega), de 0,2 mM d'un mélange de dNTPs, de 0,4 µM de chaque amorce et de 1,25 unités d'ADN polymérase GoTaq® (Promega). Le volume d'ADN utilisé pour une réaction de PCR diffère selon le tissu d'origine : 2,5 µL d'ADN de queue de souris ou 10 µL d'ADN de foie de souris. Pour les hépatocytes primaires, 1 µg d'ADN est utilisé pour chaque réaction de PCR. Les différents couples d'amorces utilisés permettent soit de génotyper les souris en détectant la présence des gènes *RND3* sauvage/floxé et *TTR-Cre*, soit d'étudier l'excision du gène *RND3* floxé par la recombinaison Cre en amplifiant des fragments du gène *RND3* sauvage/floxé/excisé. Le programme de PCR commun à ces trois réactions de PCR comprend une étape de dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 5 minutes, des cycles de dénaturation (30 secondes à 94°C) - hybridation des amorces (30 secondes à une température variable) - élongation (1 minute à 72°C), et une dernière étape de élongation de l'ADN à 72°C pendant 5 minutes (tableau 1). Les produits de PCR sont ensuite déposés sur un gel à 2% d'agarose contenant du bromure d'éthidium avant d'être révélés sous les rayons ultra-violet.

La réaction de PCR du gène *RND3* permet de détecter une bande à 465 pb correspondant à la forme sauvage du gène, et une bande à 595 pb correspond à la forme floxée. La PCR du gène *TTR-Cre* est associée à la PCR du gène *FABP* afin de toujours détecter la présence d'une bande quelque soit le génotype de l'animal. Cette double PCR amplifie une bande à 290 pb correspondant au gène *FABP* et une bande à 356 pb correspondant au gène *TTR-Cre*. La PCR de détection de l'excision du gène *RND3* permet de détecter une bande à 1554 pb correspondant à la forme sauvage du gène, une bande à 1715 pb correspondant à la forme floxée et une bande à 612 pb correspondant à la forme excisée (tableau 1).

PCR	Amorces	Température d'hybridation - Nombre de cycles	Fragments amplifiés
<i>RND3</i>	5'-GAGGGCCCTTGGATTATGTCCTG-3' Ef 5'-GGGAACATGGTGACAACCTATATCCAC-3' Er	62°C 40 cycles	<i>RND3</i> sauvage : 465 pb <i>RND3</i> floxé : 595 pb
<i>TTR-Cre</i> <i>FABP</i>	5'-CTGCATTACCGGTCGATGCA-3' 5'-ACGTTACACGGCATCAACGT-3' 5'-TGGCATGTGAGGCGGTTAGGTTATCT-3' 5'-GAGCTTTGGCCACATCACAGGTCATTC-3'	57°C 35 cycles	<i>TTR-Cre</i> : 356 pb <i>FABP</i> : 290 pb
<i>RND3</i> excisé	5'-GAGGGCCCTTGGATTATGTCCTG-3' Ef 5'-CCAGTAACCAGGGCTGTGTGATAACAT-3' L3r	65°C 35 cycles	<i>RND3</i> sauvage : 1554 pb <i>RND3</i> floxé : 1715 pb <i>RND3</i> excisé : 612 pb

Tableau 2: Caractéristiques des différentes réactions de PCR utilisées à partir de l'ADN génomique extrait des souris.

L'amplification du gène *TTR-Cre* et des formes sauvage et floxée du gène *RND3* permet de génotyper les souris. L'amplification des formes sauvage, floxée et excisée du gène *RND3* permet de visualiser l'excision du gène par la recombinaise Cre.

3. Techniques de biochimie

3.1 Extraction des protéines

Pour les lignées cellulaires et les hépatocytes primaires de souris, les cellules sont lavées deux fois dans du PBS froid et lysées sur de la glace dans du tampon RIPA (Tris base 50 mM ; NaCl 150 mM ; NP-40 1% ; désoxycholate de sodium 0,5% ; SDS 0,1% ; EDTA 5 mM ; EGTA 1 mM ; cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases Thermo Scientific 1X ; pH 8) à l'aide d'un grattoir. Le lysat cellulaire est ensuite centrifugé à 4°C et à 13000 rpm pendant 10 minutes afin de récupérer le surnageant.

Pour les tissus prélevés sur les souris comme le foie, l'extraction protéique doit d'abord être précédée par un broyage des échantillons. Pour cela, un morceau de tissu d'environ 30 mg est déposé dans un tube Safe-Lock™ pré-refroidi dans de la glace qui contient du tampon RIPA et une bille de tungstène. Les échantillons sont broyés pendant 2 minutes, puis centrifugés à 4°C et à 13000 rpm pendant 10 minutes. Après récupération du surnageant, les protéines obtenues sont dosées selon le protocole d'un kit utilisant la méthode de Lowry (DC™ Protein Assay, Biorad) et conservées à -80°C.

3.2 Western blot

3.2.1 Electrophorèse en conditions dénaturantes

Les échantillons protéiques sont mélangés dans du tampon de charge Laemmli (Laemmli Sample Buffer 1X, Biorad ; β -mercaptoéthanol 358 mM) et chauffés pendant 5 minutes à 95°C afin de dénaturer les protéines. Ils sont déposés sur un gel de polyacrylamide préalablement coulé (acrylamide 4 à 12,5% ; Tris HCl pH 8,8 375 mM ou pH 6,8 150 mM ; SDS 0,1% ; APS 0,075% ; TEMED 10 mM). La migration est réalisée entre 100 et 150V dans un tampon de migration (Tris base 25 mM ; glycine 192 mM ; SDS 0,1%).

3.2.2 Transfert sur membrane PVDF

Après la migration, les gels sont transférés sur une membrane de PVDF (Millipore) préalablement activée pendant 30 secondes dans du méthanol pur. Le transfert est effectué à 110V et à 4°C dans un tampon de transfert (Tris base 25 mM ; glycine 192 mM ; éthanol 10%). Le temps de transfert varie entre 1 à 2 heures selon le poids moléculaire des protéines à transférer. L'efficacité du transfert est vérifiée par une coloration de la membrane au rouge Ponceau.

3.2.3 Immunodétection

Les membranes sont incubées dans une solution de blocage (PBS ; Tween-20 0,1% ; BSA 5%) pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation afin de réduire les liaisons non spécifiques des anticorps. Elles sont ensuite incubées avec les anticorps primaires dilués dans la solution de blocage pendant une durée variable selon les anticorps utilisés. Les anticorps primaires peuvent être incubés pendant 14 à 16 heures à 4°C et sous agitation ou pendant 30 minutes à 1 heure à température ambiante et sous agitation. Après 3 lavages de 5 minutes dans une solution de lavage (PBS ; Tween-20 0,1%), les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires également dilués dans la solution de blocage pendant 30 minutes à 1 heure à température ambiante et sous agitation. Les anticorps secondaires utilisés sont couplés soit à la peroxydase (HRP), soit directement avec un fluorochrome. Après 3 lavages de 5 minutes dans la solution de lavage, les membranes sont prêtes pour la révélation. Pour les anticorps secondaires couplés à la HRP, les membranes sont incubées dans une solution de révélation (Tris HCl 0,1 M pH 8,8 ; luminol 1,25 mM ; acide coumarique 225 μ M ; peroxyde d'hydrogène 0,009%) pendant 1 minute à température ambiante. La membrane est ensuite placée dans une cassette de révélation et mise en contact avec un film photographique dans une chambre noire (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare). Le film est ensuite plongé successivement dans une solution de révélation puis de fixation pour révéler la chimioluminescence émise par la peroxydase. Pour les anticorps secondaires couplés à un fluorochrome, la fluorescence est directement détectée par un appareil Odyssey® (LI-COR®).

3.3 Immunoprécipitation

Les cellules Hep3B-Myc-Rnd3 sont ensemencées au nombre de $3,4 \times 10^6$ cellules par boîte de 15 cm afin de reproduire les conditions d'ensemencement utilisées pour la première immunoprécipitation analysée par spectrométrie de masse qui a permis d'identifier les partenaires protéiques de Rnd3. L'extraction protéique est réalisée 3 à 4 jours après l'ensemencement, une fois que les cellules sont confluentes et ont établi de nombreuses jonctions intercellulaires. Les cellules sont lavées deux fois dans du PBS froid et grattées sur de la glace dans du tampon de lyse (Tris HCl pH 7,4 50 mM ; NaCl 150 mM ; Triton X-100 1% ; cocktail d'inhibiteurs de protéases Thermo Scientific 1X, Na_3VO_4 1 mM). Le lysat cellulaire est ensuite centrifugé à 4°C et à 13000 rpm pendant 10 minutes. Les protéines contenues dans le surnageant sont récupérées et dosées à l'aide du kit DC™ Protein Assay (Biorad) suivant les recommandations du fournisseur. L'immunoprécipitation est alors effectuée en incubant 4 mg de protéines avec 6 µg d'anticorps dirigé contre Myc, IQGAP2 ou IgG1 utilisé comme contrôle isotypique pendant 14 à 16 heures à 4°C et sous agitation. L'extrait protéique total restant est conservé à -80°C.

Le lendemain, les billes magnétiques protein G (Dynabeads® Protein G, Life Technologies) sont prélavées 3 fois dans du tampon de lyse sans inhibiteurs de protéases ni Na_3VO_4 avant d'être ajoutées aux échantillons (50 µL de billes par immunoprécipitation). Après 1 heure d'incubation à 4°C et sous agitation, les tubes sont placés sur un portoir magnétique pour éliminer toutes les protéines qui ne sont pas fixées aux billes et aux anticorps (= Δ anticorps). Les billes sont lavées 5 fois avec du tampon de lyse contenant 0,5X d'inhibiteurs de protéases et 0,5 mM de Na_3VO_4 . Les protéines fixées sur les billes sont à ce moment-là reprises dans 30 µL de tampon de charge (tampon de lyse complet 0,5X ; Laemmli Sample Buffer 0,5X, Biorad ; β -mercaptoéthanol 179 mM). Les échantillons protéiques correspondant aux protéines totales (= input) et aux protéines non fixées par les billes et les anticorps (= Δ anticorps) sont mélangés avec du tampon de charge Laemmli (Laemmli Sample Buffer 1X, Biorad ; β -mercaptoéthanol 358 mM). Tous les tubes sont chauffés pendant 5 minutes à 95°C pour dénaturer les protéines avant d'être déposés sur un gel avec un gradient 4-12% de polyacrylamide (NuPAGE® Gels Bis-Tris 4-12%, 1.5 mm et 10 puits, Life Technologies). L'utilisation de ce gradient permet d'étudier à la fois une protéine de faible poids moléculaire, Rnd3 (27 kDa), et une protéine de haut poids moléculaire, IQGAP2 (180 kDa). La migration des échantillons s'effectue dans un tampon MES (NuPAGE® Tampon de migration MES SDS 1X, Life Technologies). Les gels sont ensuite transférés sur une membrane de PVDF et révélés comme décrit précédemment pour un western blot classique.

4. Immunofluorescence et immunohistochimie

4.1 Immunofluorescence

Les cellules,ensemencées sur des lamelles de verre, sont fixées avec du paraformaldéhyde 3% dilué dans du tampon CB 1X (tampon MES 10 mM ; NaCl 150 mM ; EGTA 5 mM ; MgCl₂ 5 mM ; glucose 5 mM ; pH 6,1) pendant 10 minutes à température ambiante. Après 3 lavages dans du tampon CB1X, les cellules sont perméabilisées avec du Triton-X100 0,1% pendant 1 minute. Les sites aspécifiques sont bloqués en incubant les lamelles dans une solution de blocage (BSA 1% ; SVF 2%) diluée dans du tampon TBS 1X (tampon Tris 20 mM ; NaCl 154 mM ; EGTA 2 mM ; MgCl₂ 2 mM ; pH 7,5) pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite incubées avec les anticorps primaires dilués dans la solution de blocage pendant 30 minutes (dilution variable selon les anticorps). Après 3 lavages dans du tampon TBS 1X, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires également dilués dans la solution de blocage pendant 30 minutes à l'obscurité (dilution 1/250). Les cellules sont lavées 3 fois dans du tampon TBS 1X avec l'ajout de Hoechst dans le dernier lavage pour marquer les noyaux (dilution 1/50 000). Après 2 minutes d'incubation dans le Hoechst, les lamelles sont rincées dans de l'eau et montées sur des lames avec du milieu de montage Fluoromount-G™ (FluoProbes®, Interchim) et stockées à 4°C à l'obscurité. Les images sont prises soit sur un microscope à épifluorescence (Zeiss Axioplan 2, Unité INSERM 1053), soit sur un microscope confocal (Leica SP5, Bordeaux Imaging Center) à l'objectif 63X en immersion.

4.2 Immunohistochimie

Le foie prélevé sur les souris est sectionné en tranches de 2 à 3 mm de largeur qui sont rincées dans du PBS et fixées dans du formaldéhyde 4% pendant 24 heures. Les tranches de foie sont ensuite placées dans de l'éthanol 70% pendant 1 heure au minimum avant d'être incluses en paraffine à l'aide d'une machine à imprégnation en paraffine Histokinette (Thermo Shandon). A l'aide d'un microtome, les blocs de paraffine sont coupés en sections de 2,5 à 4 µm d'épaisseur qui sont ensuite collées sur des lames de verre. Les lames sont placées dans une étuve à 56°C pendant 14 à 16 heures afin d'éviter le décollement des tissus lors des étapes suivantes. Les échantillons sont déparaffinés en les plongeant successivement dans des bains de toluène 100% (2 fois pendant 5 minutes), d'éthanol 100% (2 fois pendant 1 minute) et d'éthanol 95% (1 fois pendant 1 minute) avant d'être hydratés dans de l'eau pendant 5 minutes. Pour les immunomarquages, les sites antigéniques sont démasqués en incubant les lames dans un tampon citrate pH 6 (Dako) chauffé à 98°C pendant 40 minutes. Après 20 minutes de refroidissement, une étape supplémentaire consistant à placer les lames dans une solution d'HCl 2M pendant 1 heure à 37°C est réalisée pour les marquages anti-BrdU. Les lames sont ensuite placées dans un automate Autostainer (Dako) pour réaliser les immunomarquages selon un programme spécifique pour chaque anticorps (tableau 2).

Marquage anti-BrdU	Marquage anti-GFP
Tampon de rinçage (Dako)	
Inhibition des peroxydases endogènes - Peroxyde d'hydrogène 3% - 10 minutes	
Tampon de rinçage (Dako)	
Blocage des sites aspécifiques - Solution de blocage (sérum 10% ; BSA 1%) dilué dans du tampon TBS 1X-Tween 0,05% - 30 minutes	
Tampon de rinçage (Dako)	
Anticorps primaire dilué dans du tampon TBS 1X-Tween 0,05% - 1 heure	Anticorps primaire dilué dans du tampon TBS 1X-Tween 0,05% - 30 minutes
Tampon de rinçage (Dako)	
Anticorps secondaire ImmPRESS™ (Vector Laboratories) - 45 minutes	Anticorps secondaire EnVision™ (Dako) - 30 minutes
Tampon de rinçage (Dako)	
DAB (Dako) - 10 minutes	
Rinçage à l'eau	
Hémalun (Labonord) - 3 minutes	
Rinçage à l'eau	
Eau ammoniacuée 1% - 2 minutes	
Rinçage à l'eau	

Tableau 3: Caractéristiques des programmes utilisés pour les marquages anti-BrdU et anti-GFP sur les coupes de tissus de souris.

Pour la coloration HES, les lames sont placées dans un bain d'hémalun (Labonord) pendant 5 minutes pour marquer les noyaux avant d'être rincées dans de l'eau. Elles sont incubées dans de l'eau ammoniacuée 1% pendant 3 minutes puis rincées à nouveau dans de l'eau. Les tissus sont marqués avec de l'éosine (Labonord) pendant 5 minutes pour colorer les cytoplasmes. Après un rinçage dans de l'eau, les échantillons sont déshydratés dans de l'éthanol 100%, incubés dans du safran (Labonord) pendant 15 minutes à 60°C pour marquer les fibres de collagène, et déshydratés à nouveau dans de l'éthanol 100%. Toutes les lames sont ensuite déshydratées dans deux bains de toluène 100% de 5 minutes chacun. Les lamelles sont montées avec de l'Eukitt (Labonord).

5. Expérimentation animale

5.1 Administration de tamoxifène

Les souris sont traitées à l'âge de 8 semaines avec du tamoxifène. Ce traitement comprend une injection intra-péritonéale de tamoxifène (Sigma T5648 ; 40 mg/kg de poids corporel) et un régime alimentaire de 7 jours avec des croquettes contenant du tamoxifène (LASCRdiet™

CreActive TAM400, LASvendi ; 40 mg/kg de poids corporel/jour). La solution injectable est obtenue en resuspendant le tamoxifène dans de l'éthanol 100% et de l'huile d'arachide. La solution est ensuite chauffée pendant 15 minutes à 56°C avant d'être soniquée pendant 2 minutes. En cas d'utilisation ultérieure, la solution de tamoxifène sera conservée à -20°C et devra être à nouveau soniquée pendant 2 minutes avant l'injection. Les croquettes enrichies en tamoxifène sont, elles renouvelées une fois pendant la période de 7 jours selon les recommandations du fournisseur.

Les hépatocytes primaires de souris peuvent aussi être directement traités avec un métabolite actif du tamoxifène (= 4-hydroxy tamoxifène ou 4-OHT, Sigma). Le lendemain de leur isolement, le 4-OHT est ajouté sur les cellules à deux concentrations différentes (1 ou 5 µM) pendant 48 heures. La solution stock de 4-OHT étant diluée dans de l'éthanol 100%, les hépatocytes de la condition contrôle sont traités avec 0,01% d'éthanol, ce qui correspond au volume de tamoxifène ajouté dans la condition 1 µM. Les extractions d'ADN et de protéines sont réalisées 24 heures après l'arrêt du traitement avec le 4-OHT.

5.2 Infection par les adénovirus codant pour une Cre recombinase

Les souris âgées de 6/8 semaines ou de 9 mois reçoivent, sous anesthésie par inhalation d'isoflurane, une injection de 2×10^9 particules infectieuses d'adénovirus (Ad-CMV-GFP ou Ad-CMV-GFP-Cre) par voie rétro-orbitale. L'efficacité de l'infection est visualisée par le marquage de la GFP en immunohistochimie avec les deux lots d'adénovirus.

Les hépatocytes primaires de souris peuvent également être directement infectés par les adénovirus codant pour une Cre recombinase ubiquitaire. Le lendemain de leur isolement, les cellules sont infectées avec les particules infectieuses d'adénovirus CAG-Cre à une forte MOI de 50 ou de 100. Les hépatocytes primaires sont incubés pendant 5 heures avec les particules virales diluées dans du milieu de culture sans SVF. Les extractions d'ADN et de protéines sont effectuées 48 heures après l'infection.

5.3 Hépatectomie des deux tiers

La chirurgie d'hépatectomie des deux tiers est réalisée selon un protocole bien décrit dans la littérature (Mitchell et al., 2008) par Nathalie Allain-Courtois (Technicienne, Unité INSERM 1053). Nous avons toutes deux suivi un tutorat sur cette technique à l'Institut Cochin (Paris) afin de perfectionner notre protocole chirurgical.

L'hépatectomie des deux tiers est toujours réalisée le matin sur des souris mâles âgées de 8 à 14 semaines. Après une pesée, les animaux sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane (induction 4% à 2L/min air ; maintenance 2% à 0.2 L/min air) et injectés en sous-cutané avec de la buprénorphine (0.1 mg/kg de poids corporel). Les souris sont placées sur un tapis

chauffant dès le début de la chirurgie et jusqu'à 4 à 5 heures après leur réveil. La chirurgie débute par une laparotomie médiane effectuée après une désinfection de la peau avec de la biseptine®. Un premier fil de suture (Fil Vicryl™ rapide 19 mm - 3/0 - 75 cm, Ethicon) est inséré dans le processus xiphoïde des souris à l'aide d'une aiguille et scotché sur le masque d'anesthésie afin de dégager l'accès au foie. Dans le même but, deux autres fils de suture munis d'aiguilles sont insérés à travers le péritoine et la peau de chaque côté de l'animal et également scotchés jouant ainsi le rôle d'écarteur. Avec un coton-tige, un fil de soie (Ligature de soie noire non résorbable 18 mm - 3/0 - 45 cm, Péters Surgical) est placé sous la base du lobe latéral, près du hile hépatique et utilisé pour ligaturer et exciser ce lobe. Deux autres fils de soie permettent de ligaturer et de couper successivement le lobe médian droit et le lobe médian gauche tout en évitant de s'approcher trop près de la veine cave inférieure supra-hépatique pour ne pas provoquer de sténose (figure 27). L'hépatectomie des deux tiers étant terminée, le péritoine des animaux est suturé en surjet avec du fil Vicryl et la peau est refermée avec la pose d'agrafes. Les animaux sont surveillés et reçoivent, en cas de souffrance, une deuxième injection de buprénorphine 4 à 5 heures après la fin de la chirurgie.

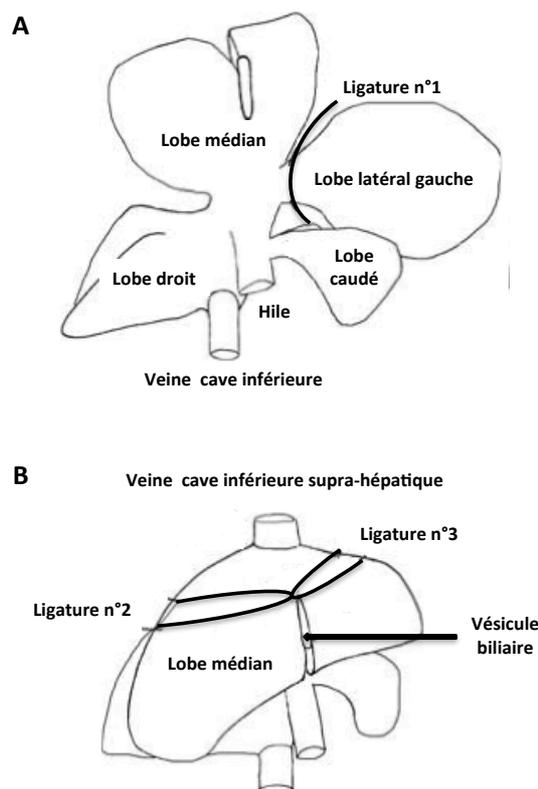


Figure 27: Description des trois ligatures nécessaires pour réaliser une hépatectomie des deux tiers chez la souris (adapté de Mitchell et al., 2008).

A. La première ligature est effectuée à la base du lobe latéral gauche. **B.** La deuxième ligature permet d'exciser le lobe médian droit, alors que la troisième permet de couper le lobe médian gauche. Ces deux dernières ligatures sont placées au-dessus de la vésicule biliaire, mais pas trop près de la veine cave inférieure supra-hépatique pour ne pas induire de sténose.

Pendant la ligature et la pose d'agrafes, les deux lobes excisés sont pesés, fractionnés et répartis en fonction des différentes analyses souhaitées. Pour l'immunohistochimie, certains échantillons sont fixés dans du formaldéhyde 4%, alors que d'autres sont placés dans une cassette contenant de l'OCT (Tissue-Tek® O.C.T™ Compound, Sakura®) et congelés avec de l'isopentane 100% refroidi par de l'azote liquide. Pour les PCR et les western blot, les échantillons sont directement congelés dans de l'azote liquide.

La cinétique de régénération des hépatocytes est étudiée entre 4 heures et 72 heures après l'hépatectomie. Les animaux sont pesés et reçoivent une injection intra-péritonéale de BrdU (Sigma ; 100 mg/kg de poids corporel) 2 heures avant le sacrifice. Après une anesthésie par inhalation d'isoflurane en surdosage (induction et maintenance 5% à 2L/min air) et une laparotomie, un prélèvement terminal de sang est réalisé en intra-cardiaque avec une seringue héparinée munie d'une aiguille 25G. Les souris sont alors sacrifiées par dislocation cervicale afin de prélever le foie restant qui est pesé et fractionné comme pour les deux lobes enlevés lors de l'hépatectomie. Un morceau de queue est systématiquement prélevé sur les souris ce qui permettra de vérifier leur génotype. Le sang prélevé est déposé dans un tube contenant de l'héparine (10 UI) puis centrifugé pendant 8 minutes à 8 000 rpm pour récupérer le plasma qui sera conservé à -80°C.

5.4 Administration de diéthylnitrosamine

Les souris âgées de 15 jours reçoivent une injection intra-péritonéale de diéthylnitrosamine (Sigma N0258 ; 25 mg/kg de poids corporel) afin d'induire le développement de CHC 8 à 9 mois plus tard.

CHAPITRE 3 - RESULTATS

Mon projet de thèse s'est décomposé en deux principaux axes. Le premier axe a porté sur l'étude du rôle de Rnd3 dans la physiologie et la carcinogenèse hépatiques *in vivo*. Le deuxième axe s'est focalisé sur l'analyse des invadosomes qui sont des structures d'actine impliquées dans l'invasion cellulaire.

Axe 1 : Etude du rôle de Rnd3 dans la physiopathologie hépatique

Le principal objectif de ma thèse est d'étudier, *in vivo*, le rôle de Rnd3 dans la physiopathologie hépatique. Comme décrit dans l'introduction de ce manuscrit, les souris dépourvues de Rnd3 ne survivent pas au-delà de trente jours après la naissance en raison de sévères altérations neuromusculaires et développementales (Mocholi, 2011). Afin de mener à bien notre projet de recherche, il est nécessaire de générer un modèle murin permettant d'induire un KO de Rnd3 spécifiquement dans le foie. Ce modèle présente l'avantage de pouvoir étudier les effets de l'extinction de la protéine Rnd3 spécifiquement dans le foie car l'expression de la protéine n'est pas modifiée dans les autres tissus. Il permet aussi d'induire le KO du gène à tout moment ce qui donne la possibilité d'analyser le rôle de ce KO pendant le développement embryonnaire ou au contraire sur un foie adulte. Durant ma thèse, nous avons décidé de nous focaliser sur l'impact du KO de Rnd3 dans un foie de souris adulte.

Ce modèle murin permettra, dans un premier temps, d'étudier le rôle de Rnd3 dans la régénération hépatique qui est un modèle attractif pour étudier la prolifération des hépatocytes normaux *in vivo*. Préalablement, je vous présenterai les résultats, non publiés, obtenus au laboratoire sur le rôle de Rnd3 dans la croissance des hépatocytes tumoraux en culture. Ce modèle murin sera utilisé, dans un deuxième temps, pour analyser le rôle de Rnd3 dans la carcinogenèse hépatique et l'invasion tumorale *in vivo*. Les travaux du laboratoire ont établi que la sous-expression de Rnd3 provoque une augmentation de l'invasion des cellules de CHC *in vitro* (Grise et al., 2012 ; Ma et al., 2013). Une seule expérience a été réalisée *in vivo* et a montré que la perte de Rnd3 augmente l'invasion locale de tumeurs hépatiques induites par l'injection orthotopique de cellules de CHC chez des souris immunodéprimées (Ma et al., 2013). L'utilisation des souris KORnd3^{Hep} permettra ainsi d'étudier à la fois l'impact de l'extinction de Rnd3 dans la carcinogenèse hépatique spontanée et dans l'invasion tumorale de CHCs induits par l'injection d'un carcinogène chimique. Pour conclure cette partie, je vous présenterai les résultats complémentaires portant sur la régulation de l'expression de Rnd3 par des micro-ARNs et l'analyse d'un nouvel interactant de cette GTPase que j'ai obtenus durant ma thèse.

1. Résultats préliminaires obtenus dans le laboratoire sur l'implication de Rnd3 dans la prolifération des hépatocytes tumoraux

Trois études différentes ont confirmé que la GTPase Rnd3 est sous-exprimée dans le CHC (Grise, 2012 ; Luo, 2012 ; Ma, 2013) et que cette dérégulation joue un rôle important dans l'invasion tumorale et le développement de métastases. Le groupe du Dr. Moreau s'est intéressé au rôle de cette protéine dans la prolifération des cellules de CHC en raison de l'implication des GTPases Rho dans ce mécanisme.

1.1 Impact de l'extinction de Rnd3 sur la prolifération *in vitro* des hépatocytes tumoraux

L'implication de la protéine Rnd3 dans la croissance tumorale a tout d'abord été étudiée dans les lignées cellulaires Hep3B et Huh7 de CHC. Pour cela, ces deux lignées cellulaires ont été toutes deux transfectées avec deux siARNs différents dirigés contre Rnd3. L'extinction de Rnd3 dans la lignée Hep3B induit une importante diminution de la croissance cellulaire par rapport aux cellules transfectées avec un siARN contrôle (figure 24B). Cet effet est d'ailleurs proportionnel à l'efficacité d'extinction de l'expression de Rnd3 de chaque siARN (figure 24A ; 95% d'extinction avec le siRnd3 S1 et 75% d'extinction avec le siRnd3 S3). Etant donné que la protéine Rnd3 est sous-exprimée dans le CHC, ce résultat est surprenant mais il a également été obtenu avec la lignée Huh7.

Cette expérience a été répétée en utilisant un shARN dirigé contre Rnd3 afin de valider le premier résultat obtenu tout en mettant au point un outil d'extinction de Rnd3 à plus long terme pour de futures expériences. La lignée Hep3B a donc été transduite avec des particules lentivirales exprimant, seulement en présence de doxycycline, un shARN dirigé contre Rnd3 (shRnd3) ou un shARN contrôle ciblant la luciférase (shGL2) avec une MOI de 5. Le shRnd3 a été construit à partir de la séquence du siRnd3 S1 qui induit une forte extinction de l'expression de cette protéine. L'expression de Rnd3 est uniquement éteinte dans les cellules Hep3B shRnd3 en présence de doxycycline (figure 28A ; 30 ng/mL) et provoque également une inhibition de la croissance cellulaire par rapport aux conditions contrôles (figure 28B). Ainsi la perte de Rnd3 diminue la croissance des hépatocytes tumoraux mais augmente leur invasion ce qui pourrait permettre la transition d'un état prolifératif vers un état invasif favorable au développement de métastases.

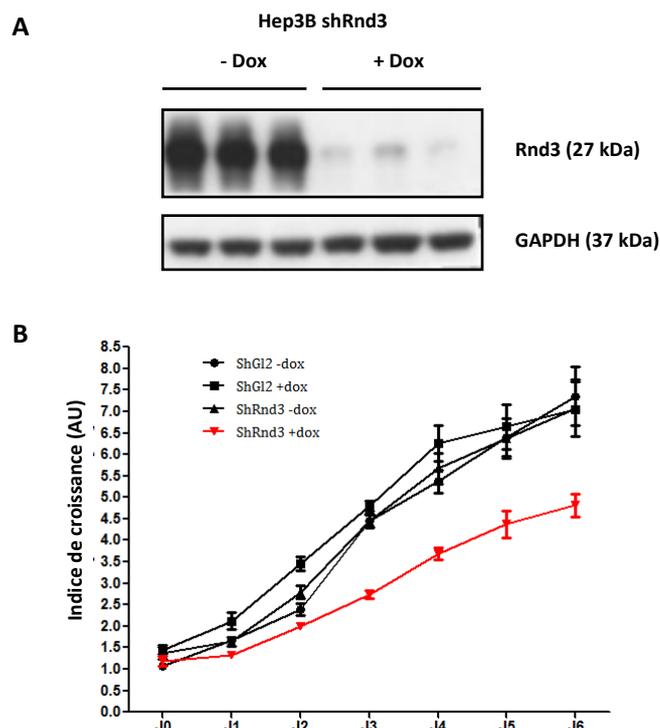


Figure 28: L'extinction de Rnd3 par shARN provoque une inhibition de la croissance cellulaire dans la lignée Hep3B (donnée non publiée).

A. Les cellules Hep3B Krab shRnd3 sont traitées ou pas à la doxycycline (30 ng/mL) pendant 10 jours. Les extraits protéiques sont analysés par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre Rnd3 et la GAPDH. Le niveau d'expression de la GAPDH est utilisé comme contrôle de charge. **B.** Les cellules Hep3B Krab shGL2/shRnd3 sont prétraitées ou pas à la doxycycline (30 ng/mL) pendant 4 jours. Leur croissance est évaluée pendant 6 jours tout en maintenant le traitement à la doxycycline pour les deux conditions concernées. Pour chaque temps, les cellules sont fixées dans de l'acide trichloroacétique 50% pendant 1 heure à 4°C, et marquées avec le kit SulfoRhodamine B (Sigma). L'absorbance à 545 nm, proportionnelle au nombre de cellules vivantes, est mesurée au spectrophotomètre.

Le groupe du Dr. Moreau a ensuite étudié l'impact de la perte de Rnd3 sur la prolifération cellulaire dans un modèle plus physiologique en trois dimensions : les sphéroïdes. Les cellules Hep3B Krab shGL2 et shRnd3 ont été ensemencées sur de l'agar afin que les cellules ne puissent pas adhérer et forment ainsi des sphéroïdes. Le lendemain, la doxycycline a été ajoutée sur les sphéroïdes dans les deux conditions concernées (30 ng/mL) pour induire l'extinction de Rnd3. L'aire des sphéroïdes a ensuite été mesurée 24 heures après l'ajout de doxycycline (J3) et jusqu'à 12 jours après l'ensemencement (J12). Nous pouvons voir que la perte de Rnd3, induite par la doxycycline (figure 29A), diminue l'aire des sphéroïdes et par conséquent leur prolifération cellulaire (figure 29B) ce qui concorde avec les résultats précédents.

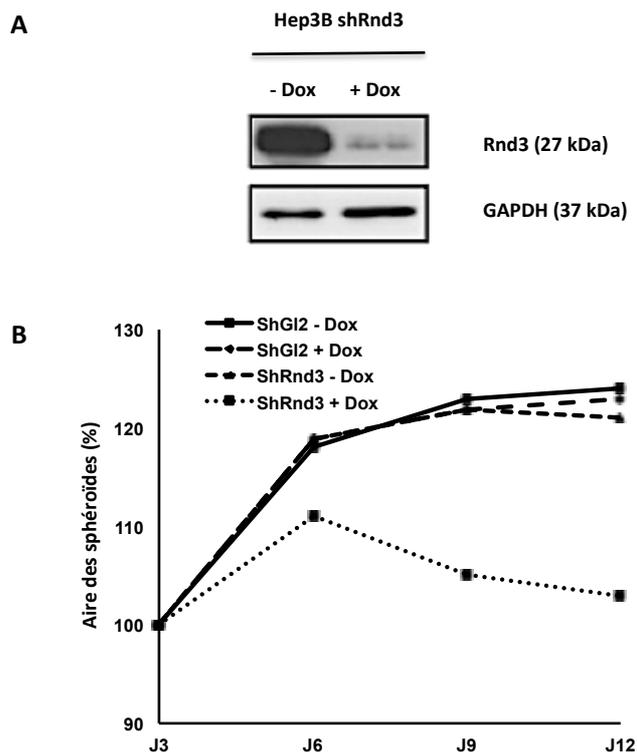


Figure 29: L'extinction de Rnd3 induit un retard de croissance des sphéroïdes formées à partir des cellules Hep3B (donnée non publiée).

2000 cellules Hep3B Krab shGL2/shRnd3 sont ensemencées sur de l'agar et traitées ou pas le lendemain avec de la doxycycline (30 ng/mL). **A.** Après 6 jours, les protéines sont extraites et analysées par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre Rnd3 et la GAPDH. Le niveau d'expression de la GAPDH est utilisé comme contrôle de charge. **B.** La croissance des sphéroïdes est évaluée en mesurant leur aire du 3^{ème} jour jusqu'au 12^{ème} jour après l'ensemencement des cellules.

1.2 Impact de l'extinction de Rnd3 sur la croissance *in vivo* des hépatocytes tumoraux

Pour valider le rôle de la protéine Rnd3 dans la croissance tumorale *in vivo*, des expériences de xénogreffes sous-cutanées de cellules Hep3B ont été réalisées chez des souris NOG immunodéprimées. Les souris ont été injectées en sous-cutané avec des cellules Hep3B exprimant soit un shARN contrôle (shGL2) soit un shARN dirigé contre Rnd3 qui sont tous deux inducibles à la doxycycline. Les souris ont débuté un traitement à la doxycycline (2 mg/mL), ou au sucrose en contrôle, une fois que les tumeurs sous-cutanées ont atteint un volume de 200 mm³. Le volume des tumeurs a ensuite été mesuré jusqu'à 30 jours après le début du traitement afin d'évaluer la croissance tumorale. L'extinction de Rnd3 entraîne une diminution de la croissance des tumeurs sous-cutanées qui semble tendre vers une régression tumorale au cours du temps (figure 30). Cette diminution de la croissance tumorale induite par la perte de Rnd3 peut s'expliquer par plusieurs mécanismes comme par exemple une diminution de la prolifération des hépatocytes tumoraux ou une augmentation de leur mort par apoptose.

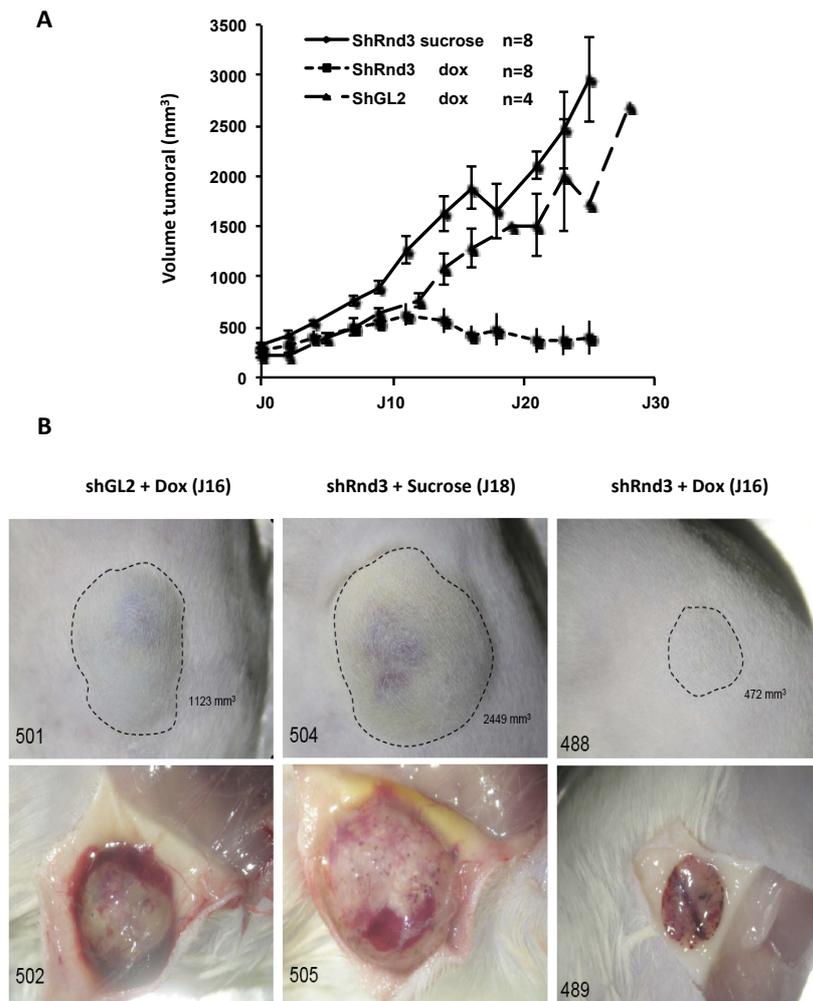


Figure 30: La perte de Rnd3 provoque une diminution de la croissance des tumeurs sous-cutanées induites par xénogreffe chez la souris (donnée non publiée).

Des souris NOG immunodéprimées reçoivent une injection sous-cutanée de 3.10^6 cellules Hep3B Krab shGL2 ou shRnd3. Une fois que les tumeurs ont atteint un volume de 200 mm^3 , les souris sont traitées à la doxycycline (2 mg/mL) ou au sucrose en contrôle dans l'eau de boisson. **A.** Le volume des tumeurs sous-cutanées est estimé tous les 2 jours jusqu'à 30 jours après le début du traitement (volume = (longueur x largeur²)/2). **B.** Les photos prises au moment du sacrifice (J16 ou J18) montre déjà une diminution du volume tumoral dans la condition d'extinction de Rnd3 (shRnd3 + Doxycycline) par rapport aux conditions contrôles.

1.3 Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans la diminution de la croissance cellulaire induite par l'extinction de Rnd3 dans les hépatocytes tumoraux

1.3.1 Analyse des acteurs de l'apoptose

Par la suite, le groupe du Dr. Moreau a voulu vérifier si la perte de Rnd3 avait également un effet sur la mort des cellules de CHC par apoptose. Pour cela, ils ont tout d'abord analysé le pourcentage de cellules en apoptose par cytométrie en flux après un marquage avec l'annexine V et l'iodure de propidium. Les résultats obtenus ne montrent pas de variation du

pourcentage de cellules en apoptose lors de l'extinction de l'expression de Rnd3 dans les cellules Hep3B (donnée non montrée).

Ils ont ensuite vérifié l'expression de gènes pro et anti-apoptotiques par PCR quantitative dans les cellules Hep3B shGL2 et Hep3B shRnd3 traitées ou pas à la doxycycline (30 ng/mL). Les résultats obtenus ne montrent pas de variation de l'expression des gènes *BAX*, *BAD*, *BID*, *BCL-XS* (= gènes pro-apoptotiques) ainsi que du gène *BCL-XL* (= gène anti-apoptotique) lors de l'extinction de Rnd3 dans les cellules Hep3B (figure 31). Ce résultat suggère que la perte de Rnd3 n'induit pas d'apoptose dans les hépatocytes tumoraux. La diminution de la croissance cellulaire observée lors de l'extinction de Rnd3 ne semble pas due à une augmentation de l'apoptose dans ces cellules.

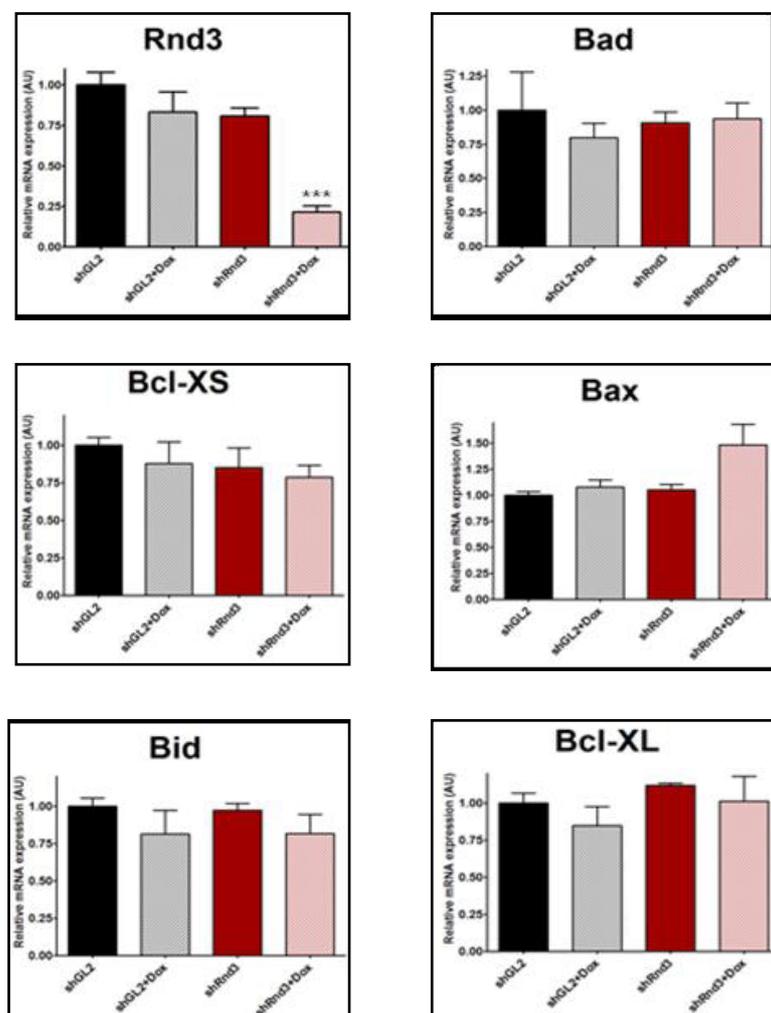


Figure 31: La perte de Rnd3 ne modifie pas l'expression de gènes pro et anti-apoptotiques dans la lignée Hep3B (donnée non publiée).

Les cellules Hep3B Krab shGL2/shRnd3 sont traitées ou pas à la doxycycline pendant 10 jours (30 ng/mL). Après 10 jours, les ARNm sont extraits, rétro-transcrits en ADNc et analysés par PCR quantitative avec des amorces spécifiques des gènes *BAX*, *BAD*, *BID*, *BCL-XS*, *BCL-XL* et *RND3*. *** $P < 0.001$ par rapport à la condition shRnd3 non traitée.

1.3.2 Analyse des acteurs du cycle cellulaire

Il existe plusieurs liens décrits dans la littérature entre la protéine Rnd3 et la prolifération cellulaire qui mettent tous en avant une implication de la cycline D1. En effet, qu'il s'agisse de cellules normales comme des fibroblastes ou des progéniteurs neuronaux, ou de cellules tumorales comme les cellules HeLa ou les cellules de carcinome de l'œsophage à cellules squameuses, la sous-expression de Rnd3 est associée à une augmentation de l'expression de la cycline D1 et de la prolifération cellulaire (Xia et al., 2010 ; Zhao et al., 2012 ; Pacary et al., 2013 ; Tong et al., 2014).

Selon ces données, une première expérience a été réalisée au laboratoire pour analyser le niveau d'expression de la cycline D1 qui pourrait être impliquée dans les mécanismes moléculaires à l'origine de la diminution de la prolifération cellulaire en absence de Rnd3. L'analyse biochimique des extraits protéiques de cellules Hep3B transfectées avec deux siARNs ciblant Rnd3 (S1 ou S3) ou un siCtrl a montré que la perte de Rnd3 engendre une diminution d'expression de la cycline D1 (figure 32).

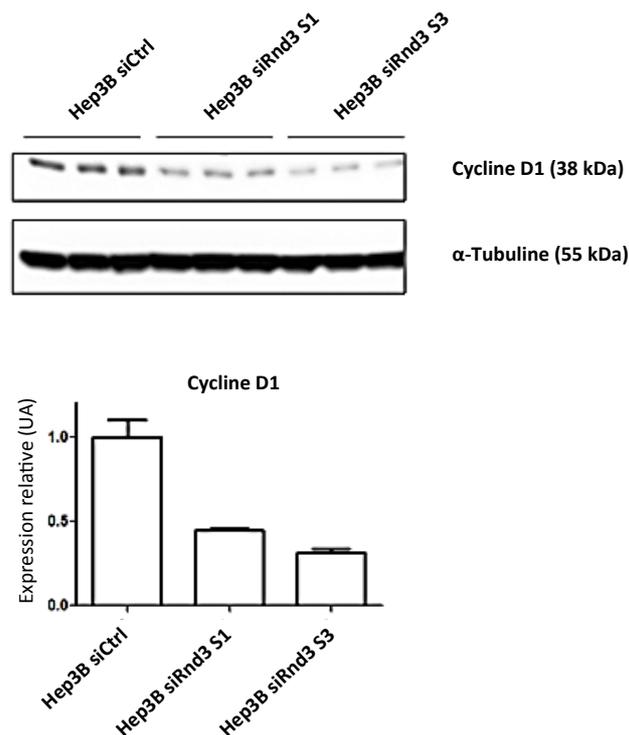


Figure 32: L'extinction de Rnd3 induit une diminution de l'expression de la cycline D1 dans les cellules Hep3B.

Les cellules Hep3B sont transfectées avec deux siARNs ciblant Rnd3 (S1 et S3) ou un siARN contrôle (Ctrl). Les protéines sont extraites 48 heures après la deuxième transfection et analysées par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre la cycline D1 et l'α-tubuline. Le niveau d'expression de l'α-tubuline est utilisé comme contrôle de charge.

J'ai poursuivi l'étude des mécanismes moléculaires responsables de la diminution de la croissance des cellules de CHC lors de l'extinction de Rnd3 en étudiant le niveau d'expression d'autres cyclines impliquées dans la progression du cycle cellulaire. Les premiers résultats obtenus dans les cellules Hep3B transfectées avec les siARNs dirigés contre Rnd3 (S1 ou S3) montrent une augmentation de l'expression de la cycline B1 sans qu'il y ait de variation nette de l'expression des autres cyclines (A2 et E1) commune avec les deux siARNs (figure 33).

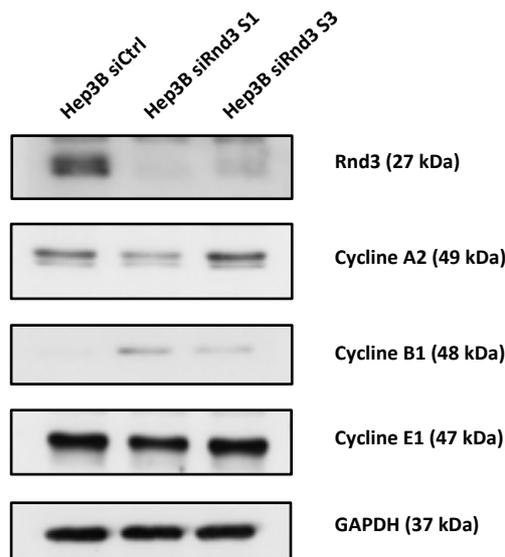


Figure 33: L'extinction de la protéine Rnd3 provoque une augmentation de l'expression de la cycline B1 dans les cellules Hep3B.

Les cellules Hep3B sont transfectées deux fois avec deux siARNs dirigés contre Rnd3 (S1 ou S3) ou un siARN contrôle (Ctrl). Les protéines sont extraites 48 heures après la deuxième transfection et analysées par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre Rnd3, les cyclines A2/B1/E1 et la GAPDH. Le niveau d'expression de la GAPDH est utilisé comme contrôle de charge (n=1).

L'ensemble de ces résultats montre que la perte de Rnd3 induit une diminution de la croissance des cellules Hep3B qui pourrait notamment s'expliquer par une diminution de l'expression de la cycline D1. Cette diminution de la cycline D1 pourrait provoquer un arrêt dans la progression du cycle cellulaire en phase G1/S. Cependant, le rôle de cette GTPase atypique dans la prolifération cellulaire semble très dépendant de la lignée de CHC utilisée. En effet, l'extinction de l'expression de Rnd3 peut également conduire à une augmentation de la prolifération cellulaire ou au contraire n'avoir aucun impact sur ce paramètre selon les lignées de CHC (Xia et al., 2013 ; Ma et al., 2013). L'utilisation d'un modèle murin de KO de Rnd3 permettra de répondre à cette question en étudiant directement l'impact de la perte de Rnd3 sur la croissance tumorale induite par l'injection d'un carcinogène chez la souris. Il permettra aussi d'étudier le rôle de cette protéine dans la prolifération des hépatocytes normaux lors du phénomène de régénération hépatique.

2. Génération de souris présentant un KO conditionnel de Rnd3 spécifiquement dans le foie

Pour générer un modèle murin de KO conditionnel et hépato-spécifique de Rnd3 (KORnd3^{Hep}), nous avons choisi la technique de recombinaison Cre-LoxP issue du bactériophage P1 (Sternberg et al., 1981 ; Sauer et al., 1988). Elle permet de déléter un fragment d'ADN situé entre deux sites LoxP lorsque ces deux sites sont présents sur le même brin d'ADN et dans le même sens (Nagy et al., 2000). Pour cela, il a tout d'abord fallu obtenir des souris Rnd3 floxées chez lesquelles deux sites loxP ont été insérés en phase dans la séquence codante du gène *RND3* pour ne pas perturber l'expression de la protéine.

2.1 Les souris Rnd3 floxées

Les souris Rnd3 floxées ont été générées par l'Institut clinique de la souris (Illkirch), en collaboration avec le Dr. Evelyne Bloch-Gallego (Institut Cochin, Paris) et le Dr. Cécile Gauthier-Rouvière (CRBM, Montpellier). Elles ont été obtenues à partir de cellules embryonnaires souches (ES) qui sont modifiées par recombinaison homologue avec un vecteur de remplacement constitué des séquences de l'exon 3 du gène *RND3* flanqué de deux sites LoxP, ainsi que de deux marqueurs de sélection Néomycine et β -Géo. Le marqueur β -Géo résulte de la fusion entre le gène de la β -galactosidase et le gène de résistance à la néomycine, et permet de combiner une sélection antibiotique et un système de gène rapporteur. Il est associé à un signal poly A qui stabilise l'ARNm transcrit. A l'inverse, le marqueur de sélection antibiotique Néo ne possède pas de signal poly A ; par conséquent, seule l'intégration par recombinaison homologue permettra d'augmenter la stabilité de son ARNm. Ces deux gènes de sélection permettent de conserver uniquement les cellules ES qui ont subi une recombinaison homologue (figure 34, allèle L3). Les souris C57BL/6 générées à partir de ces cellules ES modifiées possèdent encore les deux marqueurs de sélection qui seront excisés *in vivo* par l'action d'une recombinase Flp, dérivée de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Sadowski et al., 1995), entre les deux sites FRT. Les souris obtenues sont appelées Rnd3 floxées (figure 34, allèle L2). L'action d'une recombinase Cre dans ces souris induit la délétion de l'exon 3 du gène *RND3* entre les deux sites loxP et permet d'obtenir des souris Rnd3 KO (figure 34, allèle L-).

A leur arrivée, les souris Rnd3 floxées ont été placées dans l'animalerie conventionnelle de l'Université de Bordeaux en raison de leur statut sanitaire. Une décontamination a été nécessaire pour pouvoir établir la colonie Rnd3 floxée au sein de l'animalerie spécialisée de l'Université. Les souris Rnd3 floxées sont génotypées par PCR à partir de l'ADN extrait d'un morceau de queue en utilisant deux couples d'amorces différents. Les amorces Ef et Er sont utilisées pour le génotypage classique des animaux et permettent d'amplifier une bande à 465 pb correspondant à la forme sauvage du gène *RND3*, et une bande à 595 pb correspond à sa forme floxée. Les amorces Ef et L3r sont nécessaires pour détecter l'excision de l'exon 3

du gène *RND3*. Elles permettent d'amplifier une bande à 1554 pb correspondant à la forme sauvage du gène, une bande à 1715 pb correspondant à la forme floxée et une bande à 612 pb correspondant à la forme excisée. Ces amorces sont positionnées sur les différents allèles de *RND3* dans la figure n°34.

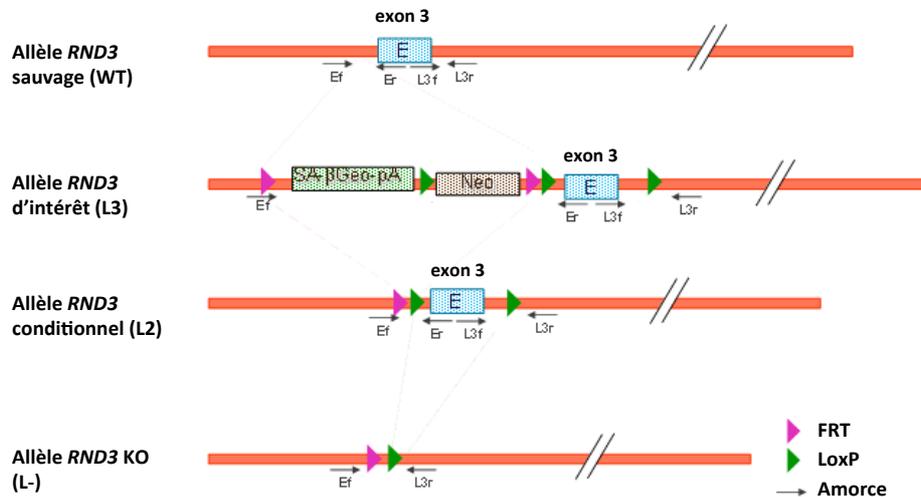


Figure 34: Stratégie d'obtention et de génotypage des souris *Rnd3* floxées (adapté de l'Institut clinique de la souris).

Les souris *Rnd3* floxées sont obtenues à partir de cellules souches embryonnaires modifiées par recombinaison homologe avec un vecteur contenant les séquences de l'exon 3 du gène *RND3* flanqué de deux sites LoxP. Ce vecteur contient également deux marqueurs de sélection *Néo* (gène de résistance à la néomycine) et *β-Géo* (fusion entre le gène de la *β*-galactosidase et le gène de résistance à la néomycine). Le marqueur *β-Géo* est associé à un signal poly A qui stabilise l'ARNm transcrit. Ces deux marqueurs permettent de sélectionner uniquement les cellules ES qui ont subi une recombinaison homologe (allèle *RND3* d'intérêt L3) pour générer des souris. Ils sont ensuite excisés par l'action *in vivo* d'une recombinaison Fip entre les deux sites FRT (allèle *RND3* conditionnel L2). Les souris *Rnd3* floxées obtenues peuvent être modifiées par l'action *in vivo* d'une recombinaison Cre qui excise l'exon 3 du gène *RND3* et permet d'obtenir des souris *Rnd3* KO (allèle *RND3* KO L-).

Après obtention des souris *Rnd3* floxées, la recombinaison Cre-LoxP a nécessité l'expression d'une recombinaison Cre spécifiquement dans le foie de ces souris.

2.2 Croisement des souris *Rnd3* floxées avec des souris TTR-iCre recombinaison

2.2.1 Mise au point d'un modèle murin KORnd3^{TTR}

Afin d'induire une recombinaison Cre-LoxP dans les souris *Rnd3* floxées, nous avons décidé d'utiliser les souris TTR-iCre exprimant une recombinaison Cre inducible par le tamoxifène et sous le contrôle du promoteur de la transthyréline (TTR), spécifique des hépatocytes (Tannour-Louet et al., 2002). Dans les souris TTR-iCre, les séquences de régulation de la transcription du gène *TTR*, codant pour un transporteur des hormones thyroïdiennes, sont choisies pour permettre une expression spécifique dans les hépatocytes (Yan et al., 1990). La

Cre est fusionnée de chaque côté avec le domaine de liaison du ligand du récepteur murin aux oestrogènes (Mer) (figure 35). Ce domaine Mer présente une mutation (G525R) qui ne permet plus la fixation des oestrogènes mais seulement du tamoxifène (Danielian et al., 1993).

Les souris TTR-iCre ont été obtenues du centre de Transgénèse et d'Archivage d'Animaux Modèles d'Orléans après accord préalable du Dr. Mireille Vasseur-Cognet (Institut Cochin, Paris). Elles ont été placées à leur arrivée au sein de l'animalerie conventionnelle de l'Université de Bordeaux ce qui a aussi nécessité une décontamination pour établir la colonie au sein de l'animalerie spécialisée. Les souris TTR-iCre sont génotypées par PCR à partir de l'ADN extrait d'un morceau de queue. La PCR du gène *TTR*-Cre est associée à la PCR du gène *FABP* afin de toujours détecter une bande quel que soit le génotype de l'animal. Cette double PCR amplifie une bande à 290 pb correspondant au gène *FABP* et une bande à 356 pb correspondant au gène *TTR*-Cre.

Le modèle KORnd3^{TTR} est obtenu en croisant les souris Rnd3 floxées avec les souris TTR-iCre (figure 35). En absence de tamoxifène, la Cre exprimée par les hépatocytes des souris KORnd3^{TTR} est piégée dans le cytoplasme par la protéine chaperonne HSP90. Le tamoxifène administré à ces souris se fixe sur la protéine de fusion MerCreMer et induit un changement de sa conformation, libérant ainsi la recombinase qui peut entrer dans le noyau et cliver l'exon 3 de *RND3* encadré des sites loxP pour induire le KO (figure 35).

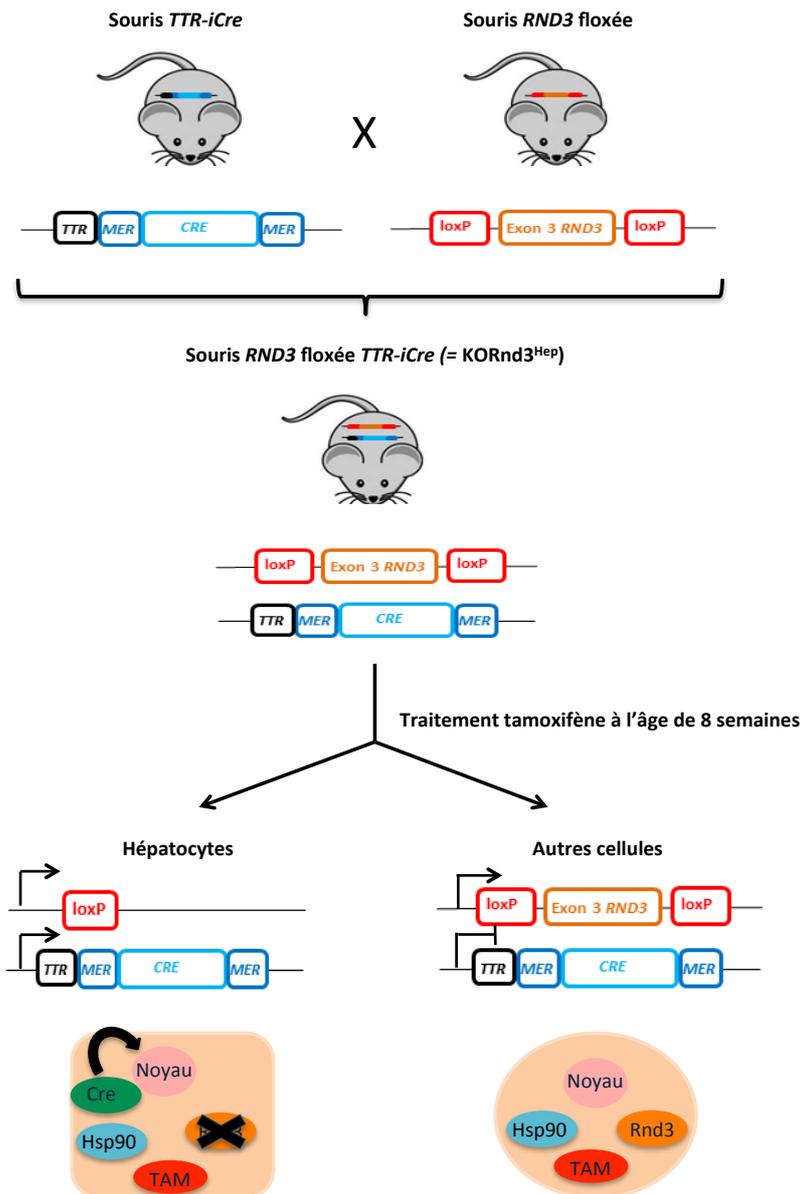


Figure 35: Génération d'un modèle murin présentant un KO inducible et hépatosécific de *Rnd3* (KORnd3^{TTR}).

Les souris *Rnd3* floxées sont caractérisées par l'insertion de deux sites loxP qui encadrent l'exon 3 du gène *RND3*. Les souris TTR-iCre expriment une Cre recombinase inducible par le tamoxifène (iCre) et sous le contrôle du promoteur de la transthyréline (TTR), spécifique des hépatocytes. Cette Cre est fusionnée à deux domaines de liaison du récepteur murin aux oestrogènes (Mer) qui sont mutés afin de fixer uniquement le tamoxifène. Les souris *Rnd3* floxées sont croisées avec les souris TTR-iCre pour obtenir les souris KORnd3^{TTR}. En absence de tamoxifène, la Cre exprimée par les hépatocytes des souris KORnd3^{TTR} est piégée dans le cytoplasme par la protéine chaperonne HSP90. Le tamoxifène est administré aux souris à l'âge de 8 semaines. Il se fixe sur la Cre et induit un changement de sa conformation, libérant ainsi la recombinase qui peut entrer dans le noyau et cliver les sites loxP encadrant l'exon 3 de *RND3* pour induire le KO.

2.2.2 Etude de l'efficacité de notre modèle murin KORnd3^{TTR}

- Chez les souris KORnd3^{TTR} hétérozygotes

L'efficacité de notre modèle murin KORnd3^{TTR} a tout d'abord été évaluée chez les animaux double hétérozygotes (= Rnd3 +/fl ; TTR-iCre +/-Cre). A l'âge de 8 semaines, ces souris KORnd3^{TTR} hétérozygotes ainsi que des souris contrôles ne possédant qu'un seul des deux gènes d'intérêt, sont traitées au tamoxifène. Dans cette expérience, deux modes d'administration du tamoxifène sont comparés pour choisir le système le plus simple et le plus efficace. Le premier groupe de souris est nourri pendant 7 jours avec des croquettes contenant du tamoxifène (LASCRdiet™ CreActive TAM400, LASvendi ; 40 mg/kg de poids corporel/jour) (figure 36A). Le deuxième groupe reçoit une injection intra-péritonéale quotidienne de tamoxifène (40 mg/kg de poids corporel/jour) pendant 5 jours (figure 3B). Toutes les souris sont sacrifiées 72 heures après la fin du traitement pour prélever leur foie et en extraire l'ADN. Une PCR est réalisée sur ces extraits en utilisant le couple d'amorces Ef et L3r permettant de détecter les différents allèles du gène *RND3* (*RND3* sauvage 1554 pb ; *RND3* floxé 1715 pb ; *RND3* excisé 612 pb). Le résultat obtenu montre une excision de l'exon 3 du gène *RND3* seulement chez les souris KORnd3^{TTR} hétérozygotes traitées au tamoxifène, quel que soit le mode d'administration utilisé (figure 36A et B). Ce résultat valide la fonctionnalité des souris KORnd3^{TTR} et l'utilisation du tamoxifène pour engendrer une excision de l'exon 3 de *RND3* par la Cre recombinase. Il reste cependant toujours une bande correspondant à la forme floxée de *RND3* qui n'a pas été excisée par la recombinase Cre chez ces animaux (figure 36A et B).

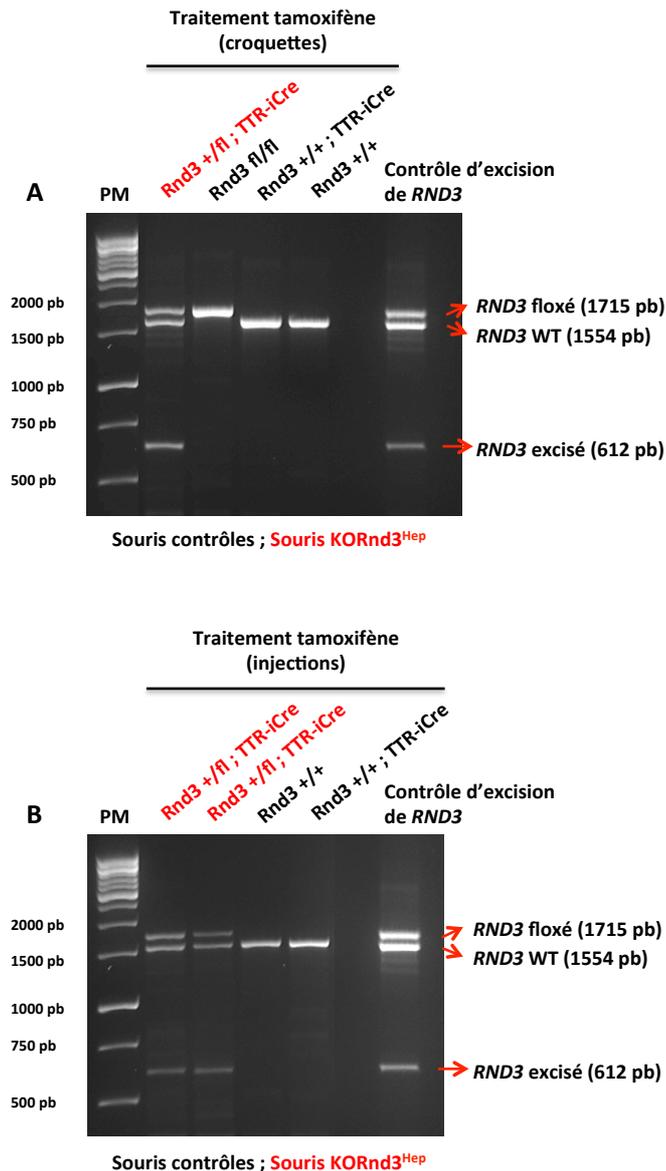


Figure 36: L'allèle *RND3* floxé est excisé dans le foie des souris KORnd3^{TTR} hétérozygotes traitées au tamoxifène.

Les souris KORnd3^{TTR} hétérozygotes (*Rnd3* +/fl ; TTR-iCre +/Cre) et contrôles sont traitées à l'âge de 8 semaines avec du tamoxifène. 72 heures après la fin du traitement, les souris sont sacrifiées pour prélever leur foie et en extraire l'ADN. Une PCR amplifiant les trois allèles du gène *RND3* : sauvage (1554 pb), floxé (1715 pb) et excisé (612 pb) est réalisée sur ces extraits. **A.** Les souris sont nourries pendant 7 jours avec des croquettes enrichies en tamoxifène (LASCRediet™ CreActive TAM400, LASvendi ; 40 mg/kg de poids corporel/jour). **B.** Les souris reçoivent une injection intra-péritonéale quotidienne de tamoxifène (40 mg/kg de poids corporel/jour) pendant 5 jours.

L'efficacité de l'excision de l'allèle *RND3* floxé obtenue est très proche avec les deux traitements de tamoxifène testés. Nous avons donc décidé de choisir le régime alimentaire pour les prochaines expériences d'administration de tamoxifène afin de simplifier la procédure. Cependant, comme les souris mangent très peu de croquettes enrichies en

tamoxifène le premier jour, nous avons ajouté une injection de tamoxifène au début du traitement pour commencer l'induction du KO de Rnd3 dès le début du traitement.

Nous avons également utilisé les souris KORnd3^{TTR} hétérozygotes pour tester la spécificité d'induction du KO de Rnd3 par le tamoxifène. Pour cela, les souris KORnd3^{TTR} hétérozygotes ont reçu ou pas un traitement tamoxifène à l'âge de 8 semaines selon le protocole décrit ci-dessus. Les souris sont sacrifiées 72 heures après la fin du traitement pour prélever leur foie. L'ADN extrait du foie de ces souris est analysé par PCR avec les amorces Ef et L3r. Cette expérience confirme que le KO de Rnd3 est bien inductible car les souris KORnd3^{TTR} hétérozygotes non traitées au tamoxifène ne présentent pas de bande d'excision de *RND3* (donnée non montrée).

Les résultats obtenus sur les souris KORnd3^{TTR} hétérozygotes mettent en avant un modèle murin Rnd3 KO fonctionnel et conditionnel avec une excision de l'allèle floxé de *RND3* induite uniquement par l'administration de tamoxifène.

- Chez les souris KORnd3^{TTR} homozygotes

Après de nombreux croisements et génotypages, nous avons obtenu les premiers animaux KORnd3^{TTR} homozygotes (= Rnd3 fl/fl ; TTR-iCre +/-Cre). Ces animaux sont appelés KORnd3^{TTR} homozygotes dans un souci de simplicité même si l'allèle *TTR-iCre* est toujours conservé à l'état hétérozygote. En effet, l'expression hétérozygote de la recombinase Cre est suffisante pour induire l'excision complète d'un gène et permet de limiter les éventuels problèmes de toxicité de la Cre (Benhamouche et al., 2006 ; Schmidt-Supprian et al., 2007).

L'efficacité de notre modèle murin KORnd3^{TTR} est désormais évaluée uniquement sur des souris mâles qui seront exclusivement utilisés dans les expériences de régénération et de carcinogénèse hépatiques *in vivo*. La première expérience a consisté à administrer du tamoxifène à deux souris KORnd3^{TTR} homozygotes âgées de 8 semaines et à les sacrifier 1 jour après la fin du traitement. Le foie, ainsi que huit organes contrôles (rein, rate, cerveau, intestin, cœur, poumon, péritoine, pancréas) sont prélevés sur ces deux animaux pour en extraire l'ADN. La PCR réalisée sur ces différents extraits avec les amorces Ef et L3r montre une excision de l'exon 3 du gène *RND3* seulement dans le foie des souris KORnd3^{TTR} homozygotes (figure 37). Toutefois comme dans le foie des souris KORnd3^{TTR} hétérozygotes, les deux allèles *RND3* floxés des souris KORnd3^{TTR} homozygotes ne sont pas totalement excisés par la recombinase Cre (figure 37).

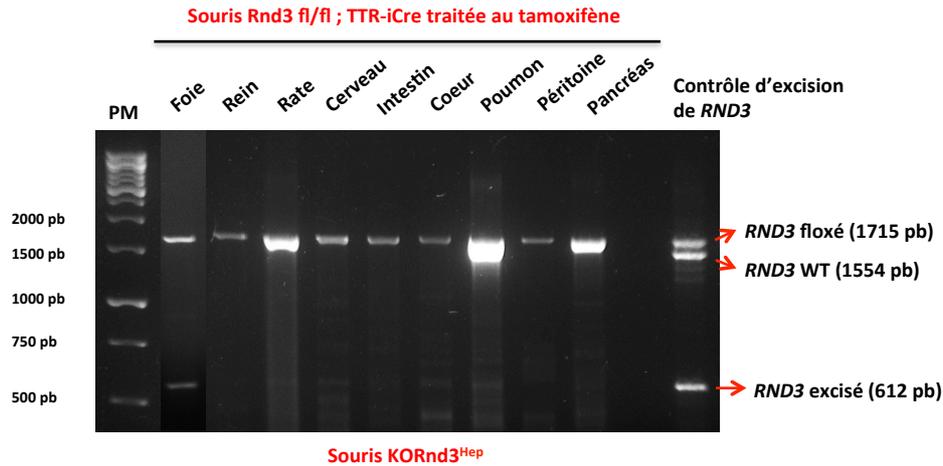


Figure 37: Le gène RND3 floxé est excisé uniquement dans le foie des souris KORnd3^{TTR} homozygotes traitées au tamoxifène.

Deux souris KORnd3^{TTR} homozygotes (Rnd3 fl/fl ; TTR-iCre +/Cre) sont traitées à l'âge de 8 semaines avec du tamoxifène. 24 heures après la fin du traitement, les souris sont sacrifiées pour prélever leur foie ainsi que huit organes contrôles (rein, rate, cerveau, intestin, cœur, poumon, péritoine, pancréas). L'ADN extrait de ces différents organes est analysé en effectuant une PCR qui amplifie les trois allèles du gène *RND3* : sauvage (1554 pb), floxé (1715 pb) et excisé (612 pb). Le résultat représentatif de la PCR d'une seule souris KORnd3^{TTR} homozygote traitée au tamoxifène est présenté dans cette figure.

Cette expérience permet de confirmer la fonctionnalité et le caractère hépato-spécifique de notre modèle murin dans lequel l'excision du gène *RND3* floxé est induit uniquement dans le foie des souris KORnd3^{TTR}.

Nous avons ensuite souhaité évaluer l'extinction protéique de Rnd3 chez les souris KORnd3^{TTR}. Pour cela, deux souris contrôles (= Rnd3 floxées homozygotes) et deux souris KORnd3^{TTR} homozygotes sont traitées à l'âge de 8 semaines avec du tamoxifène. Elles sont sacrifiées à un temps plus long, 2 semaines après l'arrêt du traitement, pour obtenir une bonne extinction de la protéine tout en permettant aux souris de stabiliser leur poids après la reprise d'une alimentation normale. Ce délai de 2 semaines est le temps choisi et utilisé pour pouvoir réaliser de la chirurgie sur des souris traitées au tamoxifène. Le foie de ces quatre souris est prélevé pour en extraire les protéines qui sont analysées par western blot. Le résultat obtenu ne montre pas de diminution de l'expression de la protéine Rnd3 chez les souris KORnd3^{TTR} homozygotes traitées au tamoxifène (figure 38).

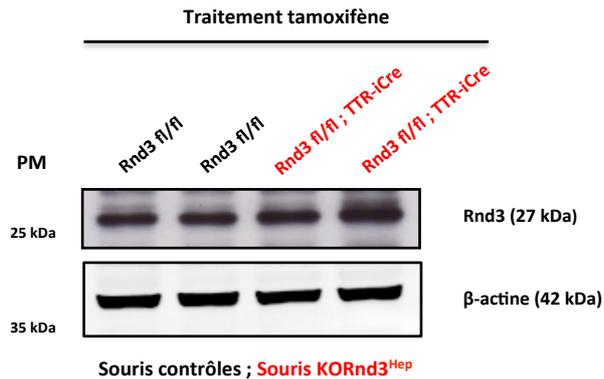


Figure 38: L’extinction de la protéine Rnd3 n’est pas visible par western blot dans le foie des souris KORnd3^{TTR} homozygotes traitées au tamoxifène.

A l’âge de 8 semaines, deux souris contrôles (= Rnd3 floxées homozygotes) et deux souris KORnd3^{TTR} homozygotes sont traitées avec du tamoxifène. Leur foie est prélevé 2 semaines après la fin du traitement pour en extraire les protéines. Les extraits protéiques sont analysés par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre Rnd3 et la β -actine. Le niveau d’expression de la β -actine est utilisé comme contrôle de charge.

En raison de l’absence d’extinction protéique de Rnd3 chez ces deux souris KORnd3^{TTR} homozygotes, nous avons extrait l’ADN de leur foie pour vérifier l’excision du gène par PCR. Cette expérience a confirmé l’excision de l’exon 3 du gène *RND3* floxé chez ces deux animaux, même si comme avec les premiers animaux KORnd3^{TTR} homozygotes, cette excision par la recombinase Cre n’est pas totale (donnée non montrée). Ce résultat suggère que le problème pourrait venir des conditions d’extraction protéique sur tissu et/ou de d’immunodétection de la protéine Rnd3. La détection des chaînes légères des anticorps provenant du foie avec l’anticorps anti-Rnd3 de souris pourrait empêcher la détection de la protéine Rnd3 qui a un poids moléculaire très proche (Rnd3 = 27 kDa ; chaînes légères des anticorps = 25 kDa).

Pour pallier ces problèmes, nous avons décidé d’isoler les hépatocytes des souris KORnd3^{Hep} traitées au tamoxifène pour en extraire les protéines qui seront analysées par western blot. En effet, la technique d’extraction protéique sur cellules permettant de détecter la protéine Rnd3 est maîtrisée au laboratoire. De plus, l’isolement des hépatocytes permettra de ne pas récupérer d’anticorps dans les extraits, ainsi que d’autres types cellulaires du foie ne présentant pas de KO de Rnd3. Le protocole d’isolement et de culture des hépatocytes primaires de souris est celui utilisé par le Dr. Chantal Desdouets (Institut Cochin, Paris). Les hépatocytes de deux souris contrôles (= Rnd3 floxées homozygotes) et de deux souris KORnd3^{TTR} homozygotes ont été isolés et mis en culture pendant 24 heures. L’ADN extrait de ces hépatocytes est analysé par PCR avec les amorces Ef et L3r. L’excision du gène *RND3* floxé est présente uniquement dans les hépatocytes des souris KORnd3^{TTR} homozygotes traitées au tamoxifène, et là encore l’excision est très incomplète (figure 39A). Les protéines sont également extraites de ces hépatocytes pour réaliser un western blot. Le résultat

obtenu ne montre pas d'extinction de l'expression de la protéine Rnd3 dans les hépatocytes KORnd3^{TTR} homozygotes par rapport aux hépatocytes contrôles (figure 39B).

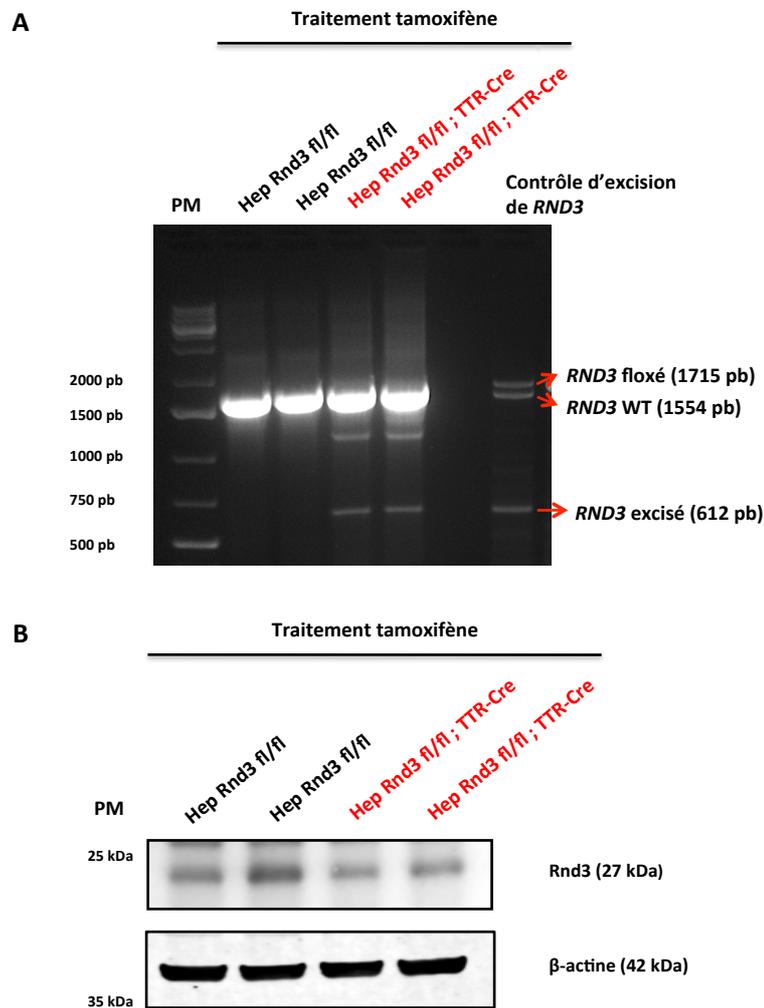


Figure 39: L'extinction de la protéine Rnd3 n'est pas visible dans les hépatocytes isolées des souris KORnd3^{TTR} homozygotes traitées au tamoxifène, malgré l'excision du gène RND3 floxé détectée en PCR.

Deux souris contrôles (= Rnd3 floxées homozygotes) et deux souris KORnd3^{TTR} homozygotes sont traitées à l'âge de 8 semaines avec du tamoxifène. Leurs hépatocytes sont isolés 15 jours après la fin du traitement selon le protocole décrit dans ce manuscrit. Après 24 heures de culture, les hépatocytes sont lysés pour extraire l'ADN et les protéines. **A.** La PCR est réalisée avec les amorces Ef et L3r permettant d'amplifier les trois allèles du gène *RND3* : sauvage (1554 pb), floxé (1715 pb) et excisé (612 pb). **B.** Les extraits protéiques sont analysés par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre Rnd3 et la β-actine. Le niveau d'expression de la β-actine est utilisé comme contrôle de charge.

L'excision du gène *RND3* floxé détectée en PCR dans les hépatocytes des souris KORnd3^{TTR} homozygotes traitées au tamoxifène révèle que les hépatocytes KO pour Rnd3 survivent au protocole d'isolement et de mise en culture. Cependant, l'absence d'extinction de la protéine Rnd3 dans ces mêmes hépatocytes suggère un problème d'immunodétection de la

forme murine de Rnd3 ou un problème d'extinction protéique dans notre modèle. Pour identifier le problème, nous avons décidé d'exprimer une autre recombinaise Cre dans les hépatocytes des souris Rnd3 floxées.

2.2.3 Utilisation d'un adénovirus exprimant une Cre recombinaise pour identifier le problème de notre modèle murin KORnd3^{TTR}

Le modèle murin KORnd3^{TTR} ne permet pas d'obtenir d'extinction protéique de Rnd3 détectable en western blot chez les souris et les hépatocytes primaires. Afin d'identifier le problème et de pouvoir le résoudre, nous avons utilisé un adénovirus codant pour une recombinaise Cre sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire (Ad-CAG-Cre) (Tanaka et al., 2010). Dans un premier temps, les hépatocytes primaires d'une souris Rnd3 floxée sont isolés et mis en culture. Le lendemain, ils sont infectés ou pas avec un lot d'adénovirus CAG-Cre fourni par le Dr. Sabine Colnot (Institut Cochin, Paris) en utilisant une forte concentration virale (MOI 100) pour générer un modèle murin KORnd3^{Ad}. L'ADN et les protéines sont extraits 48 heures après l'infection virale pour être analysés respectivement par PCR et western blot. L'adénovirus CAG-Cre induit une excision quasiment complète du gène *RND3* floxé dans les hépatocytes infectés (figure 40A). De plus, le résultat du western blot montre une extinction de 60% de l'expression de la protéine Rnd3 dans les hépatocytes après 48 heures d'infection (figure 40B).

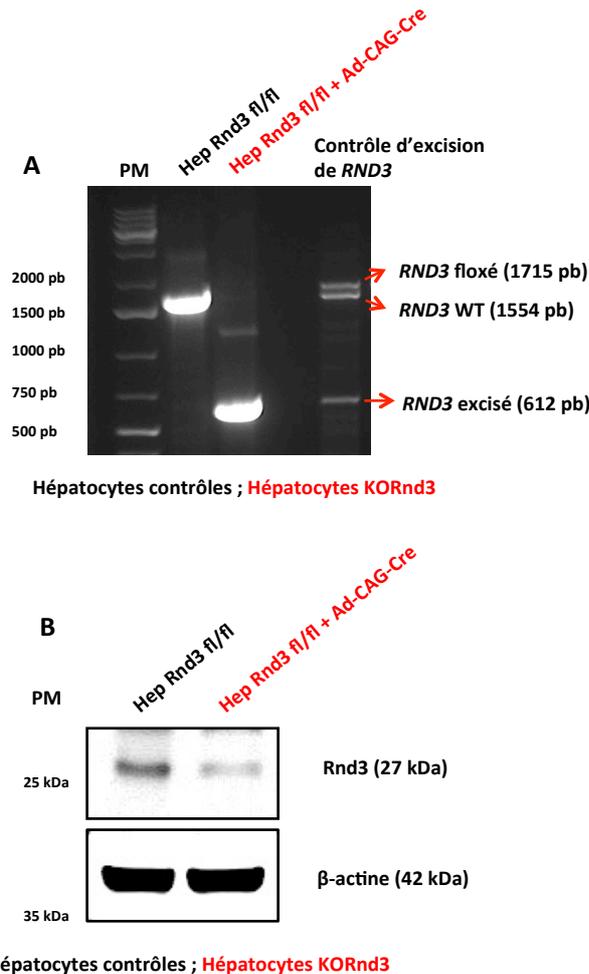


Figure 40: L'infection des hépatocytes primaires Rnd3 floxés avec un adénovirus exprimant une recombinaise Cre ubiquitaire induit une excision quasiment complète du gène RND3 floxé et une extinction de la protéine.

Les hépatocytes primaires d'une souris contrôle (= Rnd3 floxée) sont isolés, mis en culture et infectés ou pas le lendemain avec l'adénovirus CAG-Cre exprimant une recombinaise Cre ubiquitaire à une forte MOI de 100 (KORnd3^{Ad}). Les hépatocytes sont lysés 48 heures après l'infection virale pour en extraire l'ADN et les protéines. **A.** L'ADN est analysé par PCR avec une amplification des trois allèles du gène *RND3* : sauvage (1554 pb), floxé (1715 pb) et excisé (612 pb). **B.** Les protéines sont analysées par western blot et révélées avec des anticorps dirigés contre Rnd3 et la β -actine. Le niveau d'expression de la β -actine est utilisé comme contrôle de charge.

Cette expérience nous permet de constater que la recombinaise CAG-Cre est beaucoup plus efficace *in vitro* que la recombinaise TTR-iCre exprimée dans le modèle murin KORnd3^{TTR}. En effet, la CAG-Cre induit une excision presque complète du gène *RND3* floxé alors que ce gène est encore présent de manière importante après l'action de la TTR-iCre. Cette différence d'efficacité est illustrée sur la figure n°7 car le contrôle d'excision de *RND3* utilisé pour la PCR est réalisé à partir de l'ADN extrait d'un foie de souris KORnd3^{TTR} hétérozygote traitée au tamoxifène. De plus, elle permet d'induire une forte diminution de l'expression de la protéine Rnd3 ce qui n'a jamais pu être détectée avec la TTR-iCre. Ce résultat positif

obtenu avec la recombinaise CAG-Cre nous permet de conclure que l'exon 3 du gène *RND3* est bien flanqué de 2 sites loxP accessibles et clivables *in vitro* par une Cre. Le problème pourrait alors venir d'un défaut de quantité et/ou d'accessibilité du tamoxifène au niveau hépatique chez les souris KORnd3^{TTR}.

Pour tester cette hypothèse, nous avons dans un deuxième temps isolé et mis en culture les hépatocytes d'une souris KORnd3^{TTR} homozygote ayant reçu un traitement de tamoxifène à l'âge de 8 semaines. Le lendemain, un métabolite actif du tamoxifène (= 4-hydroxy tamoxifène ou 4-OHT, Sigma) est ajouté directement sur les hépatocytes primaires à deux concentrations différentes (1 ou 5 µM). Une condition contrôle est réalisée en ajoutant seulement de l'éthanol, qui est utilisé pour resuspendre le 4-OHT, sur les hépatocytes. Un contrôle positif de KO de Rnd3 est également effectué en infectant les hépatocytes avec l'adénovirus CAG-Cre (MOI 50). L'ADN des hépatocytes primaires est extrait 48 heures après l'infection virale, et 72 heures après l'ajout de 4-OHT ou d'éthanol. Ces extraits sont analysés par PCR en utilisant le couple d'amorces Ef et L3r. Quelle que soit la dose de 4-OHT utilisée (1 ou 5 µM), on peut voir qu'il n'y a pas d'augmentation de l'excision du gène *RND3* floxé induite par la première administration de tamoxifène chez la souris (figure 41). De plus, seule l'infection de ces hépatocytes primaires avec l'adénovirus CAG-Cre augmente l'excision de *RND3* induite *in vivo* en induisant une délétion quasiment complète du gène floxé (figure 41).

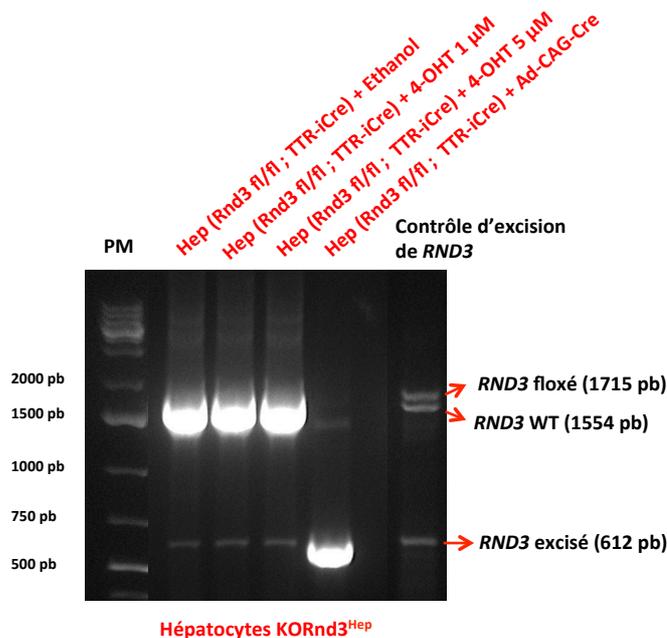


Figure 41: L'ajout du métabolite actif du tamoxifène directement sur les hépatocytes primaires KORnd3^{TTR} homozygotes ne permet d'augmenter l'excision du gène RND3 floxé induite *in vivo* par l'administration de tamoxifène.

Une souris KORnd3^{TTR} homozygote est traitée à l'âge de 8 semaines avec du tamoxifène. Elle est sacrifiée 3 semaines après la fin du traitement pour isoler et mettre en culture ses hépatocytes. Le lendemain de l'isolement, les hépatocytes sont répartis en quatre conditions. Dans les deux premières conditions, un métabolite actif du tamoxifène (4-OHT) est ajouté sur les hépatocytes à deux concentrations différentes (1 ou 5 μ M). Une condition contrôle est réalisée en ajoutant seulement de l'éthanol, utilisé pour resuspendre le 4-OHT, sur les hépatocytes. La dernière condition est un contrôle positif d'excision de l'exon 3 du gène *RND3* floxé dans laquelle les hépatocytes sont infectés avec l'adénovirus CAG-Cre (MOI 50). L'ADN est extrait des hépatocytes primaires 48 heures après l'infection virale, et 72 heures après l'ajout de 4-OHT ou d'éthanol. La PCR est effectuée avec les amorces Ef et L3r permettant d'amplifier les trois allèles du gène *RND3* : sauvage (1554 pb), floxé (1715 pb) et excisé (612 pb).

Ce résultat indique que le problème rencontré ne provient pas de la quantité ni de la biodisponibilité du tamoxifène *in vivo*, étant donné que l'ajout de fortes concentrations de 4-OHT directement sur les hépatocytes primaires KORnd3^{TTR} homozygotes ne permet pas d'augmenter la délétion du gène *RND3* floxé. De plus, l'utilisation d'adénovirus exprimant la CAG-Cre fonctionne très efficacement ce qui suggère que le problème pourrait venir de l'expression ou de la fonctionnalité de la Cre issue des souris TTR-iCre.

Pour répondre à cette question, l'expression des deux recombinaisons Cre (CAG-Cre et TTR-Cre) a été analysée par western blot dans les hépatocytes primaires Rnd3 floxés infectés avec l'adénovirus CAG-Cre (KORnd3^{Ad}), ainsi que dans les hépatocytes primaires isolés de souris KORnd3^{TTR} homozygotes. Deux anticorps différents sont utilisés pour détecter l'expression de la Cre. Cette expérience révèle une très forte expression de la CAG-Cre issue de l'infection virale des hépatocytes Rnd3 floxés avec une MOI de 100 (figure 42A). A

l'inverse, et malgré l'utilisation de deux anticorps différents, nous n'avons pas détecté d'expression de la TTR-iCre dans les hépatocytes isolés de souris KORnd3^{TTR} homozygotes traitées au tamoxifène par rapport aux hépatocytes contrôles (figure 42B).

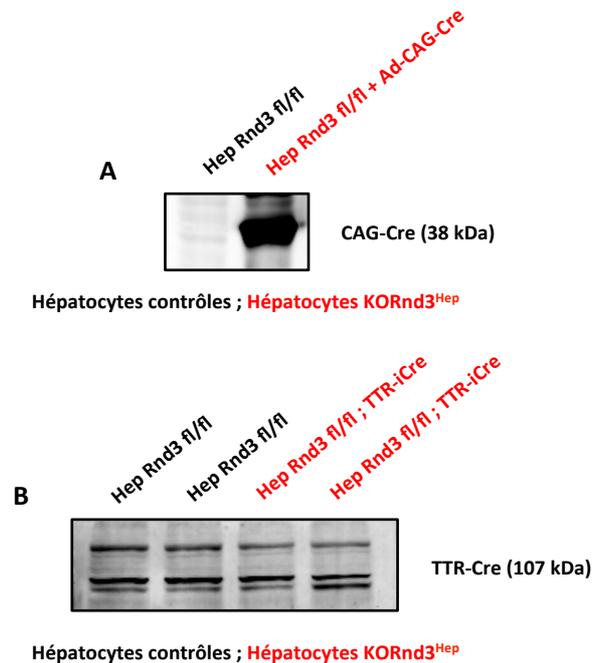


Figure 42: La recombinaise CAG-Cre est fortement exprimée dans les hépatocytes Rnd3 floxés infectés avec l'adénovirus, alors que l'expression de la recombinaise TTR-iCre n'est pas détectable dans les hépatocytes KORnd3^{TTR} homozygotes avec la même technique.

Les extraits protéiques sont analysés par western blot en utilisant un anticorps dirigé contre la Cre. **A.** Les hépatocytes primaires d'une souris contrôle (= Rnd3 floxée homozygote) sont isolés et mis en culture pour être infectés ou pas le lendemain avec l'adénovirus CAG-Cre exprimant une recombinaise Cre ubiquitaire à une forte MOI de 100 (KORnd3^{Ad}). Les hépatocytes sont lysés 48 heures après l'infection virale pour extraire les protéines. **B.** A l'âge de 8 semaines, deux souris contrôles (= Rnd3 floxées homozygotes) et deux souris KORnd3^{TTR} homozygotes sont traitées avec du tamoxifène. Leur foie est prélevé 2 semaines après la fin du traitement pour en extraire les protéines.

L'ensemble de ces résultats suggère fortement une expression trop faible de la recombinaise TTR-iCre dans les hépatocytes des souris KORnd3^{Hep} pouvant expliquer l'absence d'excision efficace de *RND3* et par conséquent d'extinction de l'expression de la protéine. Malgré l'utilisation de ces souris TTR-iCre dans plusieurs publications (Tannour-Louet et al., 2002 ; Benhamouche et al., 2006 ; Singh et al., 2014), cette stratégie n'a malheureusement pas été satisfaisante dans notre cas, ni dans celui d'un autre projet mené en parallèle dans le laboratoire. Toutefois, ce modèle murin KORnd3^{Hep} provoquant une excision de l'allèle *RND3* floxé seulement dans quelques hépatocytes présente l'avantage de mimer le développement tumoral avec l'altération de gènes dans seulement quelques cellules au départ. Il sera utilisé pour évaluer l'impact du KO de Rnd3 au sein de quelques hépatocytes dans la carcinogenèse hépatique spontanée. Par contre, l'utilisation d'adénovirus exprimant

une recombinaise Cre dans les hépatocytes Rnd3 floxés s'avère être une stratégie fonctionnelle efficace *in vitro* et pourrait être utilisée *in vivo* pour induire un KO de Rnd3 dans la majorité des hépatocytes d'un foie adulte.

2.3 Injection des adénovirus exprimant une Cre recombinaise chez les souris Rnd3 floxées

En raison de l'inefficacité de notre premier modèle murin KORnd3^{TTR}, nous avons mis en place une nouvelle stratégie qui consiste à injecter directement un adénovirus exprimant une recombinaise Cre chez les souris Rnd3 floxées homozygotes. Pour cela, nous avons utilisé un lot d'adénovirus contrôle (Ad-CMV-GFP) et un lot d'adénovirus exprimant une recombinaise Cre (Ad-CMV-GFP-Cre) (Plate-forme de production de vecteur viraux, INSERM U1089, Nantes). Le promoteur de ces deux lots est identique et induit une expression ubiquitaire de la GFP seule, ou de la recombinaise Cre fusionnée à la GFP selon le lot choisi. Cette nouvelle stratégie permet de générer un modèle murin présentant un KO inducible de Rnd3 (KORnd3^{Ad}). Cependant, malgré le tropisme des adénovirus pour le foie, la présence du promoteur ubiquitaire CMV dans les adénovirus ne permettra pas d'induire le KO de Rnd3 uniquement dans le foie des souris. Par conséquent, cette stratégie ne pourra pas être utilisée pour les expériences à long terme comme la carcinogénèse. Dès la réception des adénovirus, cette stratégie a été rapidement mise en place car les souris Rnd3 floxées étaient amplifiées et immédiatement disponibles au sein de l'animalerie spécialisée de l'Université.

Pour tester l'efficacité de ce nouveau modèle murin KORnd3^{Ad}, neuf souris Rnd3 floxées âgées de 8 semaines reçoivent une injection de 2×10^9 particules infectieuses d'adénovirus par voie rétro-orbitale. Dans ce groupe, trois souris sont injectées avec les adénovirus contrôles CMV-GFP et six souris sont injectées avec les adénovirus CMV-GFP-Cre. Les souris sont sacrifiées par lot de trois (1 souris contrôle et deux souris KORnd3^{Ad}) 96 heures, 15 jours et 30 jours après l'injection d'adénovirus. Leur foie est prélevé pour extraire l'ADN et les protéines, ainsi que pour fixer une partie du tissu en formaldéhyde. L'immunohistochimie réalisée sur ces échantillons révèle une expression de la GFP dans la majorité des cellules ce qui traduit une bonne efficacité d'infection du foie avec les deux lots d'adénovirus utilisés (figures 43 et 44). Les adénovirus contrôles CMV-GFP induisent une expression cytoplasmique et nucléaire de la GFP dans les cellules (figure 43). L'expression de la GFP induite par les adénovirus CMV-GFP-Cre est exclusivement localisée dans le noyau où la recombinaise Cre est active et peut cliver les régions d'ADN flanquées de deux sites loxP (figure 44). L'expression de la GFP diminue au cours du temps avec les deux lots d'adénovirus en raison de l'absence d'intégration génomique des adénovirus (figures 43 et 44). L'expression transitoire de la recombinaise GFP-Cre ne pose pas de problème car l'excision du gène *RND3* floxé est permanente et transmise aux cellules filles en cas de mitose.

Adénovirus CMV-GFP ; Marquage de la GFP

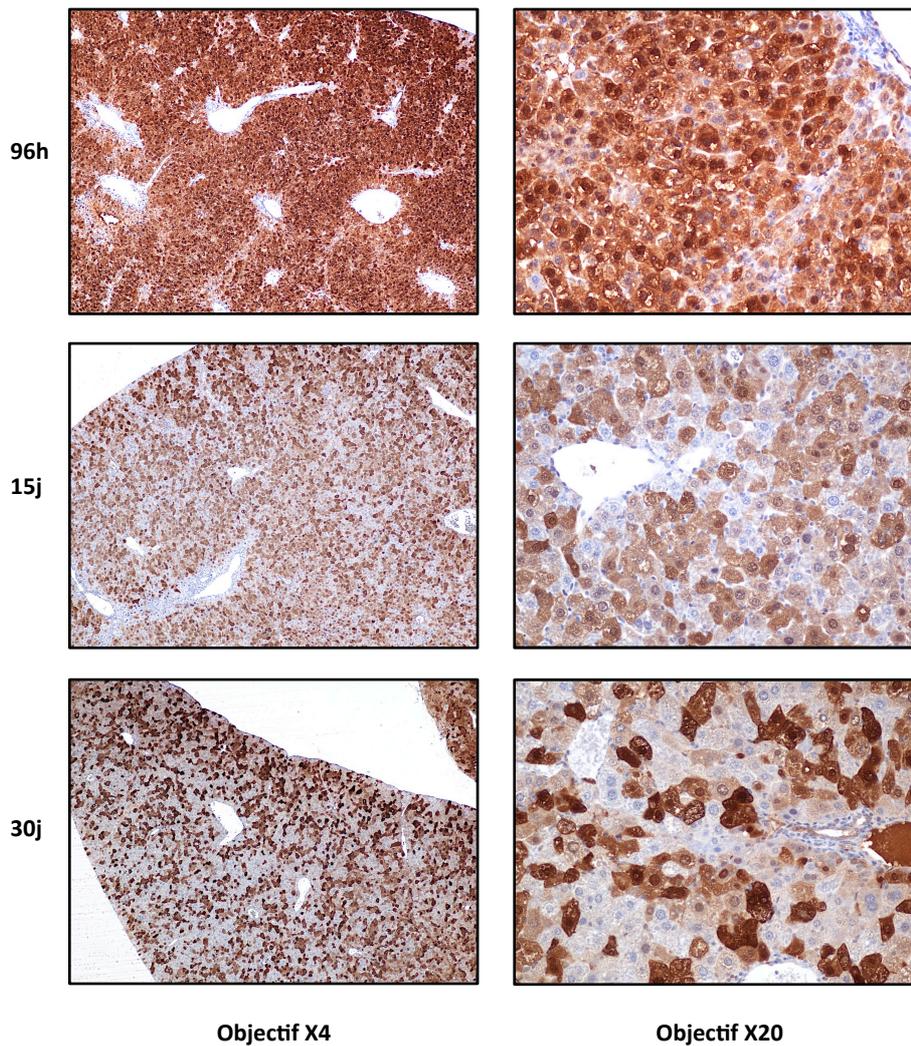


Figure 43: La GFP est exprimée dans le cytoplasme et le noyau de la majorité des cellules du foie après une infection avec les adénovirus CMV-GFP.

Des souris Rnd3 floxées homozygotes âgées de 8 semaines sont injectées par voie rétro-orbitale avec 2×10^9 particules infectieuses d'adénovirus CMV-GFP. Les souris sont sacrifiées 96 heures, 15 jours ou 30 jours après l'injection d'adénovirus pour prélever leur foie dont une partie sera fixée dans du formaldéhyde 4% en vue d'une inclusion en paraffine. Les coupes de foie sont analysées par immunohistochimie avec un anticorps dirigé contre la GFP et observées au microscope Nikon Eclipse 50i (objectif X4 ou X20). Une photo représentative du marquage GFP obtenu pour chaque temps et chaque grossissement est présentée.

Adénovirus CMV-GFP-Cre ; Marquage de la GFP

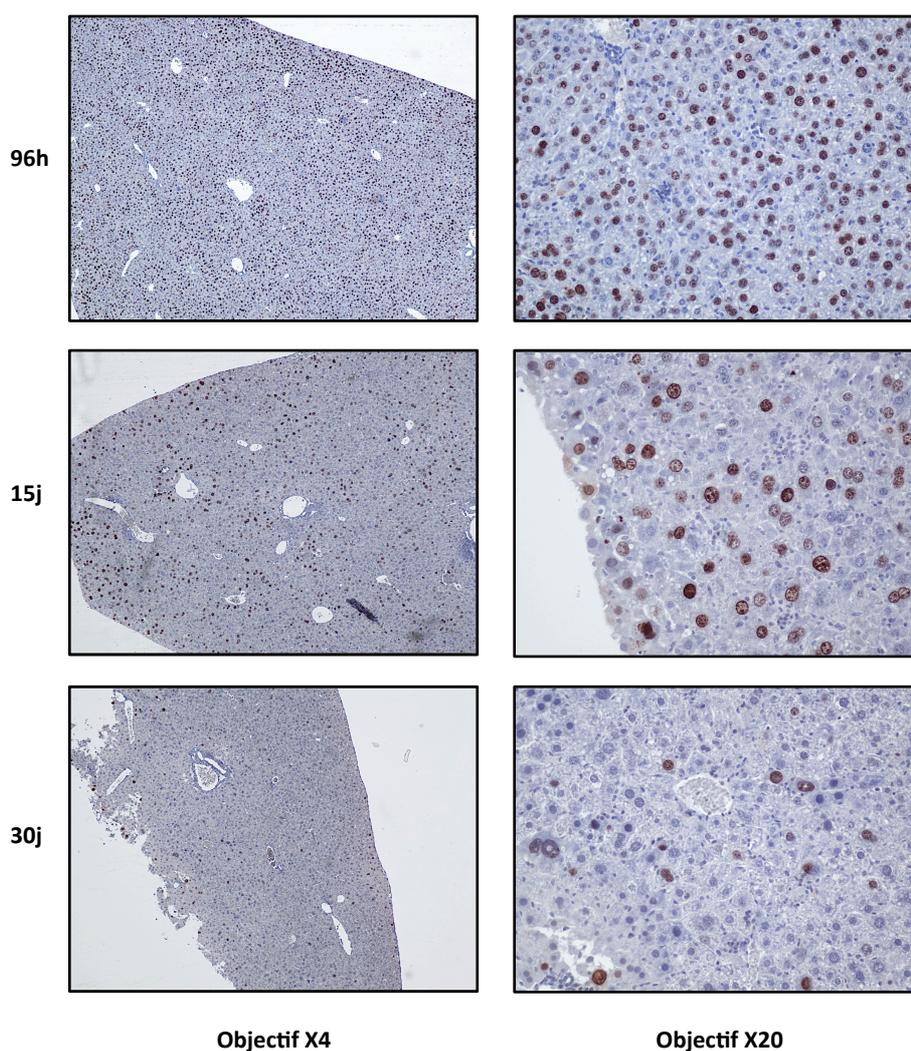
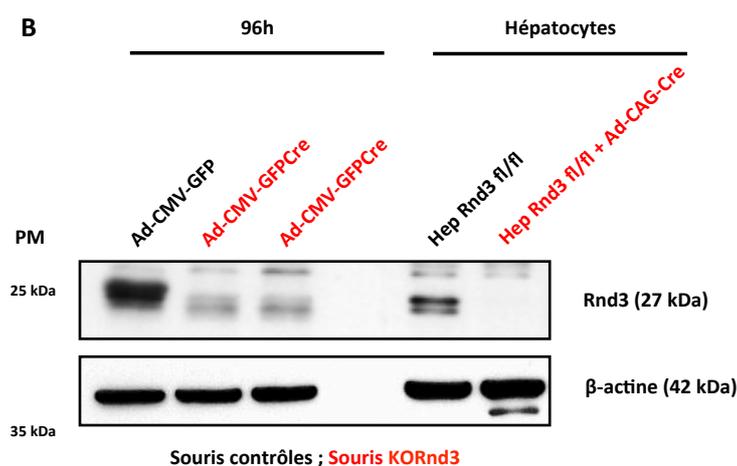
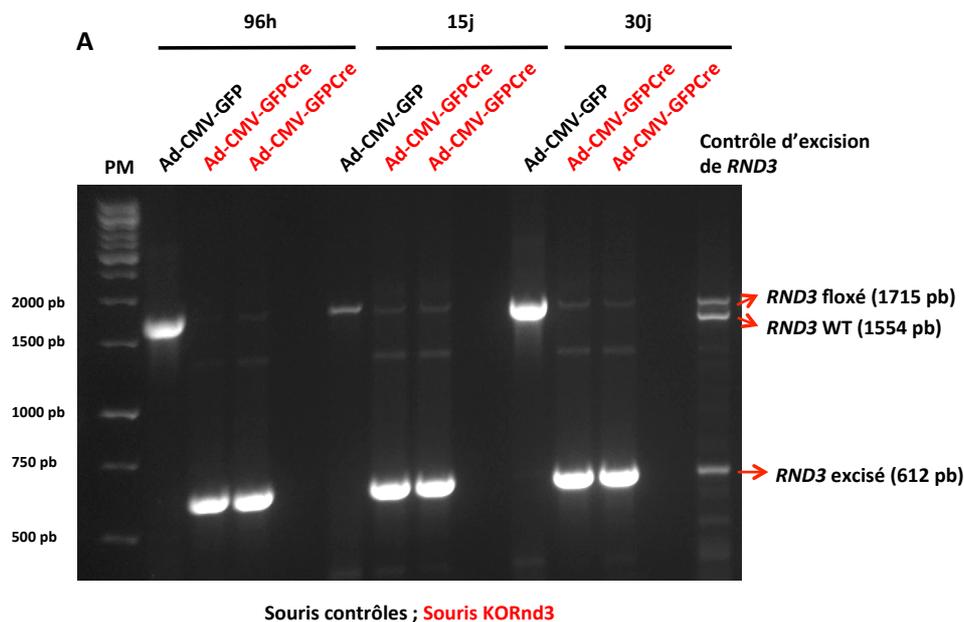


Figure 44: La GFP est exprimée uniquement dans le noyau de la majorité des cellules du foie après une infection avec les adénovirus CMV-GFP-Cre.

Des souris Rnd3 floxées homozygotes âgées de 8 semaines sont injectées par voie rétro-orbitale avec 2×10^9 particules infectieuses d'adénovirus CMV-GFP-Cre. Les souris sont sacrifiées 96 heures, 15 jours ou 30 jours après l'injection d'adénovirus pour prélever leur foie dont une partie sera fixée dans du formaldéhyde 4% en vue d'une inclusion en paraffine. Les coupes de foie sont analysées par immunohistochimie avec un anticorps dirigé contre la GFP et observées au microscope Nikon Eclipse 50i (objectif X4 ou X20). Une photo représentative du marquage GFP obtenu pour chaque temps et chaque grossissement est présentée.

Ce résultat met en évidence l'efficacité d'infection du foie *in vivo* avec les deux lots d'adénovirus. De plus, la localisation exclusivement nucléaire de la GFP dans le foie des souris traitées avec les adénovirus CMV-GFP-Cre indique de manière indirecte que la recombinase Cre est bien présente dans le compartiment cellulaire où elle pourra jouer son rôle d'excision de l'ADN floxé.

Nous avons ensuite analysé l'ADN et les protéines extraits du foie des souris $KORnd3^{Ad}$ pour évaluer respectivement l'excision du gène *RND3* floxé et l'extinction de la protéine. Le résultat de la PCR montre une excision quasiment complète de l'exon 3 du gène *RND3* floxé dans le foie des souris infectées avec les adénovirus CMV-GFP-Cre (figure 45A). Cette excision est détectée dès 96 heures après l'infection et est maintenue jusqu'à 30 jours (figure 45A). L'analyse des extraits protéiques par western blot révèle une très forte extinction de l'expression de la protéine Rnd3 par la recombinaison GFP-Cre à 96 heures (figure 45B). Cette extinction semble maintenue après 15 et 30 jours, même si un doublet apparaît dans ces deux conditions juste en dessous de la bande correspondant à Rnd3 (figure 45C).



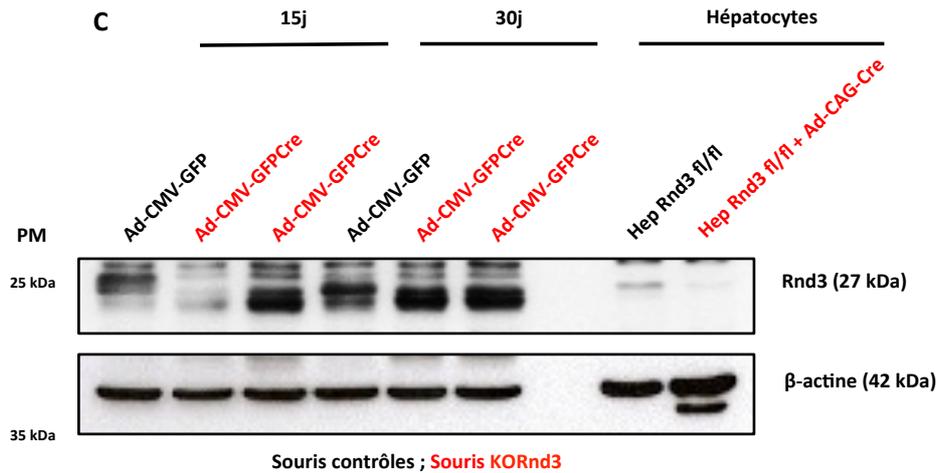


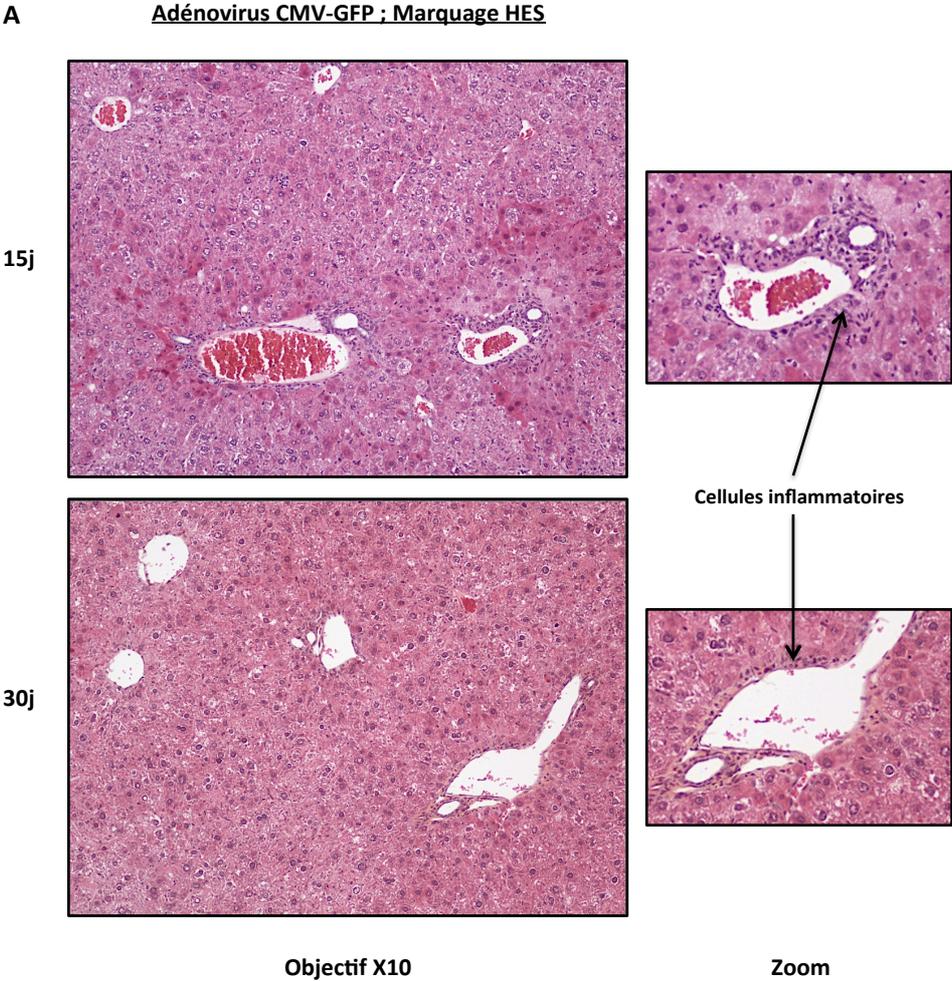
Figure 45: L'expression de la recombinase GFP-Cre induit une excision quasiment complète du gène RND3 floxé et une extinction de la protéine dans le foie des souris Rnd3 floxées.

Des souris Rnd3 floxées homozygotes âgées de 8 semaines sont injectées par voie rétro-orbitale avec 2×10^9 particules infectieuses d'adénovirus (Ad-CMV-GFP ou Ad-CMV-GFP-Cre). Les souris sont sacrifiées 96 heures, 15 jours ou 30 jours après l'injection d'adénovirus pour prélever leur foie et en extraire l'ADN et les protéines. **A.** L'ADN est analysé par PCR avec les amorces Ef et L3r qui permettent d'amplifier les trois allèles du gène *RND3* : sauvage (1554 pb), floxé (1715 pb) et excisé (612 pb). **B.** Un premier western blot est réalisé avec les protéines extraites à 96 heures et est révélé avec des anticorps dirigés contre Rnd3 et la β -actine. Le niveau d'expression de Rnd3 est normalisé par rapport à celui de la β -actine. **C.** Un deuxième western blot est réalisé avec les protéines extraites à 15 et 30 jours, et est révélé avec des anticorps dirigés contre Rnd3 et la β -actine. Le niveau d'expression de Rnd3 est normalisé par rapport à celui de la β -actine. **B et C.** Les deux pistes de droite correspondent à des extraits protéiques d'hépatocytes primaires Rnd3 floxés homozygotes infectés ou pas avec l'adénovirus CAG-Cre exprimant une recombinase Cre ubiquitaire à une forte MOI de 100 (KORnd3^{Ad}). Ces échantillons sont utilisés comme des contrôles positifs de l'extinction de l'expression de la protéine Rnd3 murine.

Cette expérience valide notre modèle murin KORnd3^{Ad} obtenu en injectant des adénovirus CMV-GFP-Cre chez des souris Rnd3 floxées. En effet, l'expression de la recombinase GFP-Cre induit une excision quasiment complète du gène floxé et une extinction de la protéine Rnd3 dès 96 heures après l'injection d'adénovirus. L'apparition d'un doublet juste en dessous de la bande correspondant à Rnd3 est intrigante, même si l'extinction de la protéine Rnd3 semble être maintenue après 15 et 30 jours. Il faudra ainsi vérifier par RT-PCR quantitative que l'expression de l'ARNm de *RND3* est bien éteinte et qu'il n'y a pas de compensation avec l'expression de *RND1* et/ou *RND2* dans les échantillons de foie infectés avec les adénovirus CMV-GFP-Cre, et ceci jusqu'à 30 jours après l'infection virale. En effet, l'anticorps utilisé pour détecter la protéine Rnd3 peut également reconnaître la protéine Rnd1.

Afin de pouvoir utiliser notre modèle murin KORnd3^{Ad}, l'inflammation du foie induite par les adénovirus est étudiée 96 heures, 15 et 30 jours après l'infection virale. La coloration HES montre l'apparition de foyers inflammatoires et de petites zones de nécrose dans le foie des souris traitées avec les deux lots d'adénovirus. Malgré une importante hétérogénéité entre

les animaux d'une même condition et les lobes hépatiques étudiés, l'inflammation induite par les adénovirus CMV-GFP ou CMV-GFP-Cre semble identique. L'état inflammatoire du foie est majoritairement détecté 15 jours après l'infection virale. Après 30 jours, les foyers inflammatoires sont moins nombreux et de plus petite taille ce qui traduit une diminution progressive de l'inflammation (figure 46A et B).



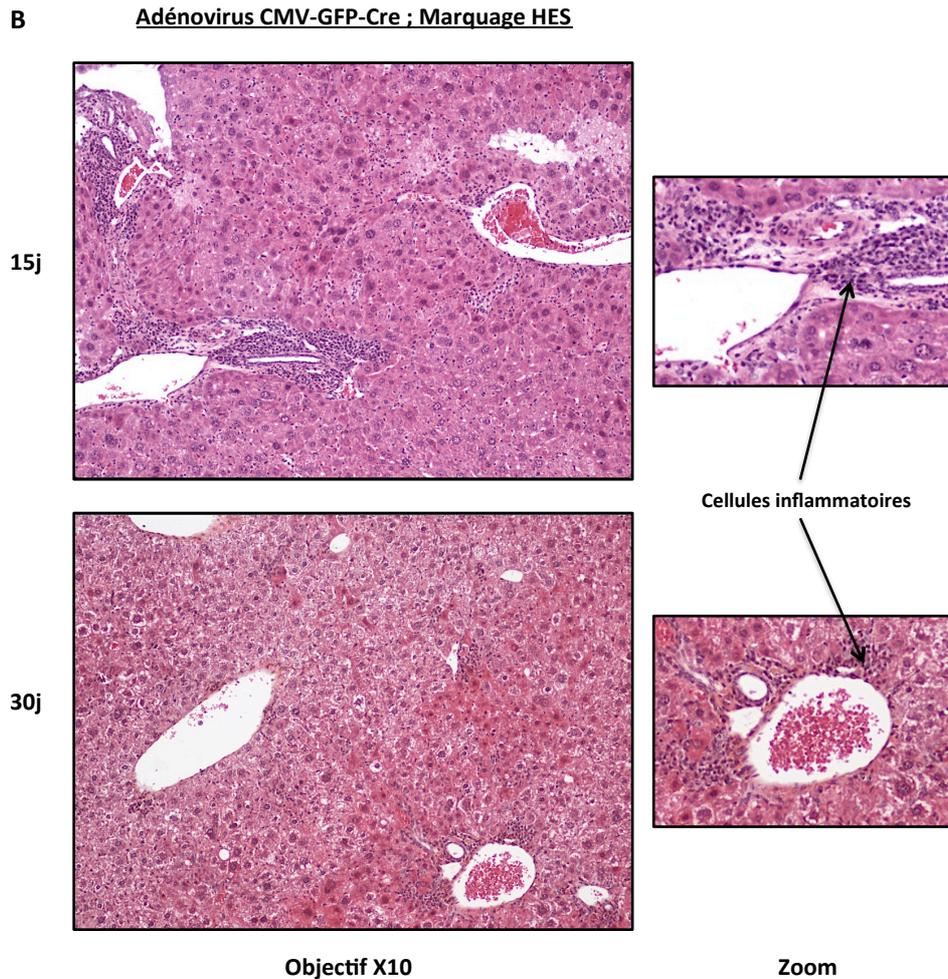


Figure 46: L'infection par les adénovirus CMV-GFP ou CMV-GFP-Cre induit une inflammation hépatique majeure à 15 jours qui diminue progressivement au cours du temps.

Des souris Rnd3 floxées homozygotes âgées de 8 semaines sont injectées par voie rétro-orbitale avec 2×10^9 particules infectieuses d'adénovirus (Ad-CMV-GFP ou Ad-CMV-GFP-Cre). Les souris sont sacrifiées 15 jours ou 30 jours après l'injection d'adénovirus pour prélever leur foie et en fixer une partie dans du formaldéhyde 4% en vue d'une inclusion en paraffine. Les coupes de foie sont analysées par immunohistochimie avec une coloration HES et observées au microscope Nikon Eclipse 50i (objectif X10 et zoom). **A et B.** Une photo du marquage HES obtenu dans le foie des souris infectées avec les adénovirus CMV-GFP (**A**) et CMV-GFP-Cre (**B**) est présentée pour les temps 15 jours et 30 jours. La présence de cellules inflammatoires est signalée par des flèches noires sur les agrandissements des photos prises à l'objectif X10.

Ces données sur la cinétique d'inflammation du foie après l'infection par des adénovirus nous permettent de déterminer le délai nécessaire entre l'injection des animaux et leur utilisation possible en expérimentation. Ainsi, nous avons décidé d'attendre 2 mois après l'injection des adénovirus afin de pouvoir travailler sur un foie non inflammatoire. De nouvelles expériences devront être réalisées sur les souris Rnd3 floxées injectées avec les deux lots d'adénovirus afin de vérifier l'état inflammatoire du foie après ce délai de 2 mois.

Le dosage des transaminases ALAT pourrait également nous aider à évaluer le fonctionnement du foie après l'infection par les adénovirus.

Ce modèle murin KORnd3^{Ad} peut être utilisé pour des expériences à court terme comme les expériences de régénération hépatique après extinction de l'expression de Rnd3 dans le foie. Cependant, étant donné l'absence de promoteur hépato-spécifique dans ce modèle, nous ne pouvons pas l'utiliser pour les expériences à long terme de carcinogénèse. Nous avons donc décidé de générer en parallèle un nouveau modèle murin de KO conditionnel et hépato-spécifique de Rnd3 à partir des souris Rnd3 floxées.

2.4 Croisement des souris Rnd3 floxées avec des souris Alb-iCre recombinase

Pour générer un nouveau modèle murin KORnd3^{Hep}, nous avons décidé d'utiliser les souris SA-Cre-ER^{T2} qui expriment une recombinaise Cre inducible par le tamoxifène et sous le contrôle du promoteur de l'albumine sérique (SA), spécifique des hépatocytes (Schuler et al., 2004). La recombinaise Cre-ER^{T2} a été obtenue en fusionnant une Cre avec le domaine de liaison du ligand du récepteur humain aux oestrogènes qui présente trois mutations (G400V/M543A/L540A) permettant à la fois d'abolir l'activation de la Cre par les oestrogènes et d'augmenter sa sensibilité au tamoxifène (Feil et al., 1997). Les souris SA-Cre-ER^{T2} ont été obtenues en insérant la séquence codante de la recombinaise Cre-ER^{T2}, précédée d'une séquence IRES favorisant l'initiation de la traduction des ARNm, dans la région 3' non traduite du gène de l'albumine sérique (Schuler et al., 2004). La recombinaise SA-Cre-ER^{T2} est exprimée uniquement dans le foie, contrairement à l'albumine qui est aussi exprimée dans des tissus extra-hépatiques comme l'estomac, la rate et les reins (Nahon et al., 1988).

Les souris SA-Cre-ER^{T2} nous ont été fournies par le Dr. Daniel Metzger (IGBMC, Strasbourg). Elles ont été placées à leur arrivée au sein de l'animalerie conventionnelle de l'Université de Bordeaux en raison de leur statut sanitaire. Une décontamination a récemment été réalisée pour établir la colonie SA-Cre-ER^{T2} au sein de l'animalerie spécialisée de l'Université. Les souris SA-Cre-ER^{T2} sont génotypées par PCR à partir de l'ADN extrait d'un morceau de queue. La PCR utilisée est la même que celle permettant de génotyper les souris TTR-iCre.

Le modèle KORnd3^{Alb} est obtenu en croisant les souris Rnd3 floxées avec les souris SA-Cre-ER^{T2}. L'administration de tamoxifène chez ces souris permettra d'induire l'excision de l'exon 3 du gène *RND3* floxé par la Cre selon le même principe que celui décrit pour notre premier modèle KORnd3^{TTR}.

Les croisements entre les souris Rnd3 floxées et SA-Cre-ERT2 sont actuellement en cours au sein de l'animalerie spécialisée afin d'obtenir les souris KORnd3^{Alb} (= Rnd3 fl/fl ; SA-Cre-ERT2 +/-Cre).

3. Rôle de Rnd3 dans la régénération hépatique

Les modèles murins KORnd3 générés sont utilisés pour étudier le rôle de Rnd3 dans la prolifération des hépatocytes normaux. En effet, comme décrit ci-dessus, l'extinction de Rnd3 diminue la prolifération des hépatocytes tumoraux mais son rôle n'est pas connu dans les hépatocytes normaux. La prolifération des hépatocytes normaux est un mécanisme important et nécessaire à la régénération du foie suite à des lésions ou à des maladies hépatiques. L'identification de nouveaux mécanismes impliqués dans ce processus pourrait permettre de mettre en place des stratégies innovantes favorisant la régénération du foie afin d'améliorer la prise en charge et le traitement des maladies hépatiques humaines (Huang et al., 2014).

Pour étudier la prolifération des hépatocytes normaux *in vivo*, nous avons décidé d'utiliser la technique de référence qui est l'hépatectomie des deux tiers. Cette chirurgie induit une régénération du foie avec l'entrée des hépatocytes normalement quiescents dans le cycle cellulaire pour restaurer la masse hépatique initiale.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'expression de la protéine Rnd3 au cours du processus de régénération hépatique normal. Pour cela, une hépatectomie des deux tiers est réalisée chez 14 souris C57BL/6 sauvages qui sont sacrifiées deux par deux à différents temps après la fin de la chirurgie (4, 8, 12, 24, 36, 48 et 72 heures). Au moment du sacrifice, le foie des souris est prélevé pour en extraire les protéines. Le western blot réalisé avec ces échantillons montre une induction de l'expression des cyclines A totales (cyclines A1 et A2) après 36 heures (figure 47) ce qui correspond aux données publiées dans la littérature (Merlen et al., 2014). L'expression des autres cyclines est en cours d'analyse. De manière très intéressante, l'expression de la protéine Rnd3 est induite dès 8 heures après la chirurgie et augmente jusqu'au temps 48 heures (figure 47).

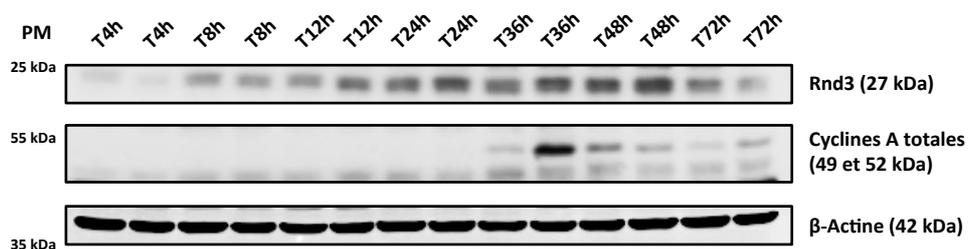


Figure 47: L'expression de la protéine Rnd3 augmente progressivement à partir de la 8ème heure de régénération hépatique.

Une hépatectomie des deux tiers est réalisée chez 14 souris Rnd3 floxées qui sont sacrifiées deux par deux à différents temps après la fin de la chirurgie (4, 8, 12, 24, 36, 48 et 72 heures). Leur foie est prélevé pour en extraire les protéines. Les échantillons protéiques sont analysés par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre Rnd3, les cyclines A totales et la β -actine. Le niveau d'expression de Rnd3 et des cyclines A totales est normalisé par rapport à celui de la β -actine.

L'induction et l'augmentation progressive de l'expression de la protéine Rnd3 au cours du processus de régénération hépatique constituent un premier élément prometteur quant à l'importance de Rnd3 dans la prolifération des hépatocytes normaux. De plus, l'induction de l'expression des cyclines A totales après 36 heures permet de valider notre chirurgie d'hépatectomie des deux tiers.

Le premier modèle murin utilisé pour faire des hépatectomies des deux tiers est le modèle KORnd3^{TTR} obtenu par croisement entre les souris Rnd3 floxées et les souris TTR-iCre. Ces chirurgies ont été réalisées en parallèle des expériences visant à confirmer l'efficacité de ce modèle. Le protocole consiste à administrer du tamoxifène à des souris contrôles (= Rnd3 floxées homozygotes) et KORnd3^{TTR} homozygotes âgées de 8 semaines. Ces animaux sont opérés 15 jours après la fin du traitement pour subir une hépatectomie des deux tiers. Nos premiers résultats ont été obtenus 48 et 72 heures après hépatectomie (figure 48).

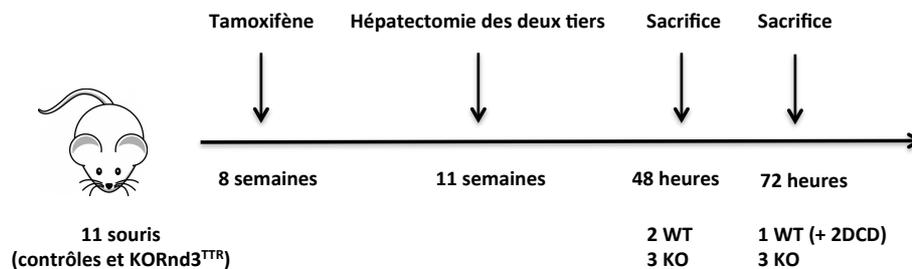


Figure 48: Schéma de l'expérience d'hépatectomie des deux tiers réalisée chez les souris KORnd3^{TTR}.

5 souris contrôles (Rnd3 floxées homozygotes) et 6 souris KORnd3^{TTR} homozygotes sont traitées à l'âge de 8 semaines avec du tamoxifène. L'hépatectomie des deux tiers est réalisée chez ces animaux 15 jours après la fin du traitement. Les souris sont sacrifiées 48 heures et 72 heures après la chirurgie (2 souris n'ont pas survécu à la chirurgie ; 2DCD).

La quantification de la régénération hépatique se fait par immunohistochimie après incorporation de BrdU. Malgré une faible excision du gène *RND3* floxé par la TTR-iCre (figure 49A), les premiers résultats obtenus montrent un retard de prolifération des hépatocytes KORnd3^{TTR} à 48 heures en quantifiant le nombre d'hépatocytes BrdU positifs (figure 49). En effet, on compte en moyenne 30% d'hépatocytes BrdU positifs chez les souris contrôles contre seulement 18% chez les souris KORnd3^{TTR}. Les animaux KORnd3^{TTR} semblent rattraper leur retard de prolifération à 72 heures car la différence de prolifération des hépatocytes entre les deux groupes d'animaux n'est plus visible à ce moment là (4% versus 6% en moyenne d'hépatocytes BrdU positifs respectivement pour les souris contrôles et KORnd3^{TTR}) (figure 50). La régénération hépatique peut aussi être évaluée en comparant le poids du foie récupéré au moment du sacrifice avec le pourcentage d'hépatectomie réalisé ce qui correspond au calcul du pourcentage de régénération hépatique. Dans ce cas, la faible

excision du gène *RND3* ne semble pas modifier le pourcentage de régénération hépatique à 48 ou 72 heures (figures 49 et 50).

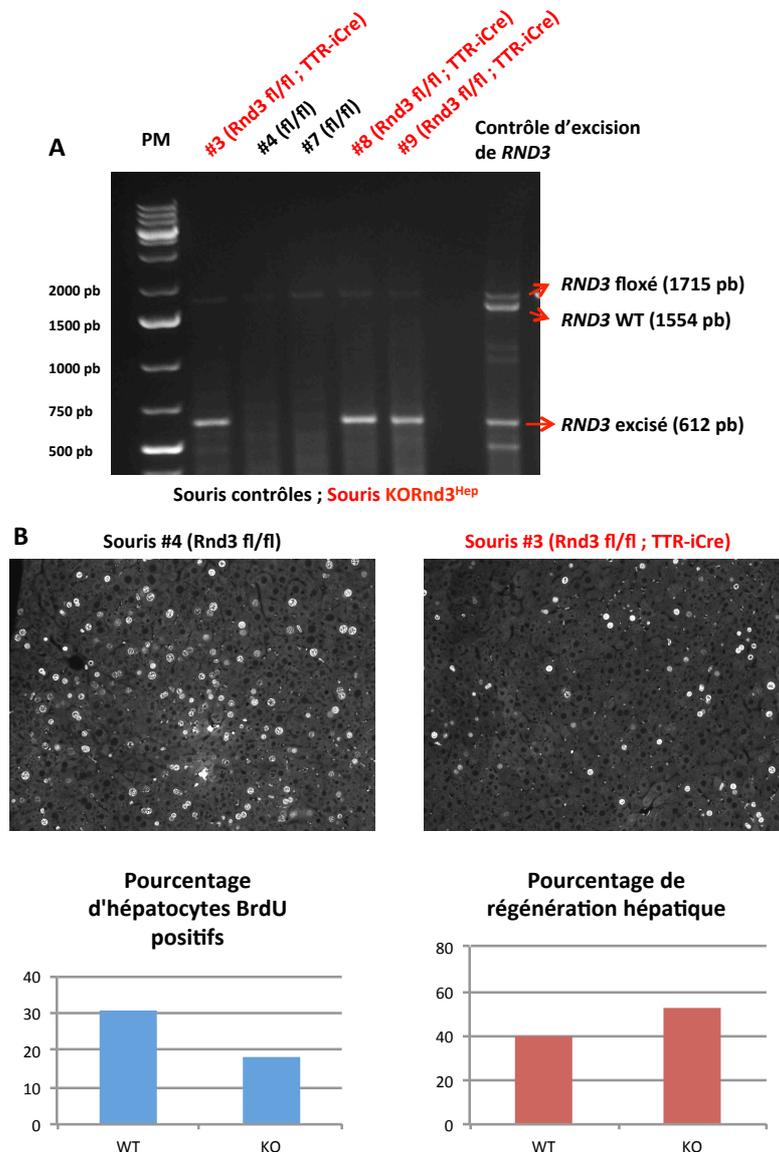


Figure 49: Les souris *KORnd3*^{TTR} montrent un retard de régénération hépatique à 48 heures malgré la faible excision du gène *RND3* floxé chez ces animaux.

Les souris contrôles (= *Rnd3* floxées homozygotes) et *KORnd3*^{TTR} homozygotes sont traitées à l'âge de 8 semaines avec du tamoxifène. L'hépatectomie des deux tiers est réalisée chez ces animaux 15 jours après la fin du traitement. Les souris sacrifiées à 48 heures reçoivent une injection intra-péritonéale de BrdU (100 mg/kg de poids corporel) 2 heures avant le sacrifice. **A.** L'ADN est extrait du foie et analysé par PCR avec les amorces Ef et L3r qui permettent d'amplifier les trois allèles du gène *RND3* : sauvage (1554 pb), floxé (1715 pb) et excisé (612 pb). **B.** Une partie du foie est fixée et analysée par immunohistochimie en utilisant un anticorps ciblant le BrdU. Une photo représentative du marquage BrdU obtenu dans chaque groupe est présentée. Le pourcentage d'hépatocytes BrdU positifs est quantifié dans 10 champs pris au hasard au microscope à épifluorescence Zeiss Axioplan 2 (objectif X20). Le pourcentage de régénération hépatique est calculé en utilisant la formule suivante : (((poids foie sans nécrose récupéré au sacrifice - poids foie restant après l'hépatectomie) / poids total estimé du foie) * (100 / pourcentage d'hépatectomie)) * 100. Le poids total du foie est estimé à 4% du poids de l'animal.

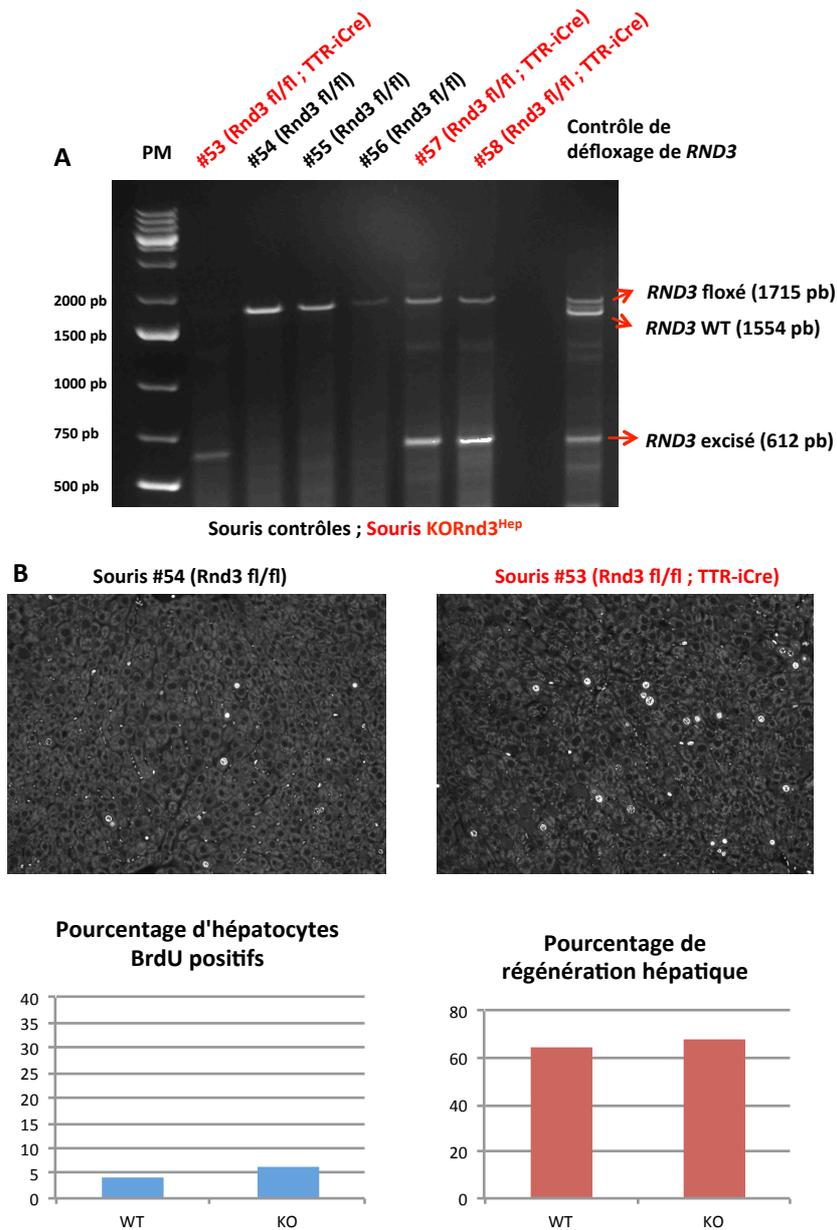


Figure 50: La régénération hépatique est identique à 72 heures chez les souris contrôles et KOR*Rnd3*^{TTR}.

Les souris contrôles (= *Rnd3* floxées homozygotes) et KOR*Rnd3*^{TTR} homozygotes sont traitées à l'âge de 8 semaines avec du tamoxifène. L'hépatectomie des deux tiers est réalisée chez ces animaux 15 jours après la fin du traitement. Les souris sacrifiées à 72 heures reçoivent une injection intra-péritonéale de BrdU (100 mg/kg de poids corporel) 2 heures avant le sacrifice. **A.** L'ADN est extrait du foie et analysé par PCR avec les amorces Ef et L3r qui permettent d'amplifier les trois allèles du gène *RND3* : sauvage (1554 pb), floxé (1715 pb) et excisé (612 pb). **B.** Une partie du foie est fixée et analysée par immunohistochimie en utilisant un anticorps ciblant le BrdU. Une photo représentative du marquage BrdU obtenu dans chaque groupe est présentée. Le pourcentage d'hépatocytes BrdU positifs est quantifié dans 10 champs pris au hasard au microscope à épifluorescence Zeiss Axioplan 2 (objectif X20). Le pourcentage de régénération hépatique est calculé en utilisant la formule suivante : (((poids foie sans nécrose récupéré au sacrifice - poids foie restant après l'hépatectomie) / poids total estimé du foie) * (100 / pourcentage d'hépatectomie)) * 100. Le poids total du foie est estimé à 4% du poids de l'animal.

Ces résultats sont plutôt encourageants en raison de la faible excision du gène *RND3* floxé et de l'absence d'extinction protéique détectable en western blot dans notre premier modèle murin KORnd3^{TR}. Cependant, devant les problèmes rencontrés, nous n'avons pas poursuivi l'analyse de la régénération hépatique avec ce modèle.

Pour la suite, nous avons décidé de changer de modèle et d'utiliser le modèle murin KORnd3^{Ad} obtenu en injectant des adénovirus CMV-GFP-Cre chez des souris Rnd3 floxées. Comme montré précédemment, ce modèle permet d'obtenir une forte extinction de l'expression de la protéine Rnd3. Pour cette expérience, des souris Rnd3 floxées reçoivent une injection de 2×10^9 particules infectieuses d'adénovirus (CMV-GFP ou CMV-GFP-Cre) par voie rétro-orbitale à l'âge de 6 semaines. La chirurgie d'hépatectomie des deux tiers est réalisée sur ces animaux 2 mois après l'injection d'adénovirus. Les souris sont sacrifiées au temps 36 heures, qui correspond au pic de régénération hépatique chez des souris sauvages, ainsi qu'au temps 48 heures (figure 51).

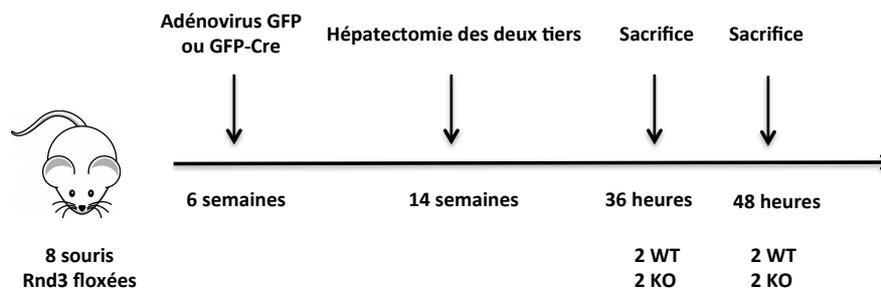


Figure 51: Schéma de l'expérience d'hépatectomie des deux tiers réalisée chez les souris KORnd3^{Ad}.

Les premiers résultats montrent un retard de prolifération des hépatocytes KORnd3^{Ad} à 36 heures par rapport aux hépatocytes contrôles (figure 52A). En effet, on compte en moyenne 72 hépatocytes BrdU positifs par champ chez les souris contrôles contre 42 chez les souris KORnd3^{Ad} à 36 heures. Cette situation est inversée à 48 heures avec une prolifération des hépatocytes plus importante chez les souris KORnd3^{Ad} (8 versus 16 hépatocytes BrdU positifs en moyenne par champ respectivement pour les souris contrôles et KORnd3^{Ad}) (figure 52B). Le pourcentage de régénération hépatique corrèle avec le nombre d'hépatocytes BrdU positifs par champ à 36 heures (figure 52) ce qui est prometteur quant au retard de prolifération observé dans les hépatocytes KORnd3^{Ad} à ce temps-là. En effet, le pourcentage de régénération hépatique n'a jamais montré de diminution dans le modèle Rnd3KO^{TR}. Cependant, cette corrélation n'a pas été retrouvée à 48 heures.

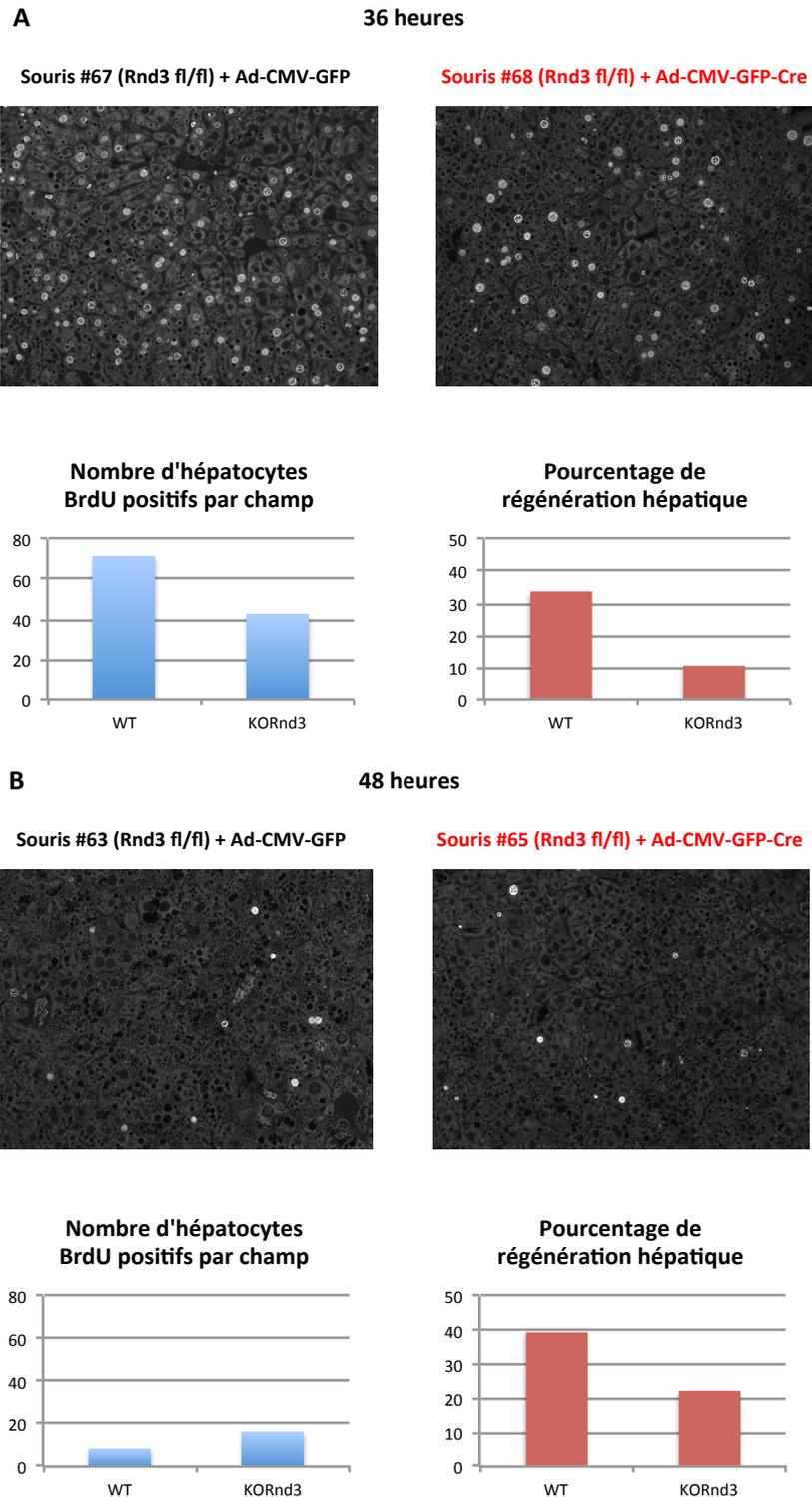


Figure 52: Les souris KORnd3^{Ad} montrent un retard de régénération hépatique à 36 heures.

Les souris Rnd3 floxées homozygotes reçoivent une injection de 2×10^9 particules infectieuses d'adénovirus (CMV-GFP ou CMV-GFP-Cre) par voie rétro-orbitale à l'âge de 6 semaines. L'hépatectomie des deux tiers est réalisée chez ces animaux 2 mois après l'injection. Les souris sacrifiées à 36 ou 48 heures reçoivent une injection intra-péritonéale de BrdU (100 mg/kg de poids corporel) 2 heures avant le sacrifice. Une partie du foie est fixée et analysée par immunohistochimie en utilisant un anticorps ciblant le BrdU. Une photo représentative du marquage BrdU obtenu dans le

foie de chaque souris est présentée. Le nombre d'hépatocytes BrdU positifs est quantifié dans 10 champs pris au hasard au microscope à épifluorescence Zeiss Axioplan 2 (objectif X20). Le pourcentage de régénération hépatique est calculé en utilisant la formule suivante : $((\text{poids foie sans nécrose récupéré au sacrifice} - \text{poids foie restant après l'hépatectomie}) / \text{poids total estimé du foie}) * (100 / \text{pourcentage d'hépatectomie}) * 100$. Le poids total du foie est estimé à 4% du poids de l'animal.

Cette expérience montre un retard de prolifération des hépatocytes normaux KORnd3^{Ad} qui provoque un décalage de la cinétique de régénération chez ces animaux. Elle devra être réalisée sur un nombre d'animaux plus important pour pouvoir confirmer le rôle de Rnd3 dans la régénération du foie. Il faudra également vérifier le maintien de l'extinction de Rnd3 deux mois après l'injection des adénovirus afin de valider ces résultats.

Cependant, la cinétique de régénération est différente entre les souris KORnd3^{TTR} et KORnd3^{Ad}, à la fois au niveau de la régénération des souris contrôles et du temps pour lequel un retard de régénération est visible chez les souris KORnd3. En effet, le foie des souris KORnd3^{TTR} régénère moins que les souris contrôles à 48 heures, alors que ce retard n'est observé qu'à 36 heures chez les souris KORnd3^{Ad}. Cette différence pourrait s'expliquer par la forte extinction protéique de Rnd3 induite chez les souris KORnd3^{Ad} qui provoquerait ainsi un retard de régénération plus précoce.

Après avoir confirmé le retard de régénération hépatique induit par la perte de Rnd3, les mécanismes moléculaires devront être élucidés en étudiant particulièrement l'expression des différentes cyclines impliquées dans la progression du cycle cellulaire ainsi que celle des kinases qui leur sont associées. Les premiers résultats obtenus montrent une diminution du nombre d'hépatocytes BrdU positifs lors de l'absence de Rnd3. Sachant que le BrdU est incorporé durant la phase S, les premières cibles intéressantes à étudier seront les cyclines D et E, ainsi que les cdk 2, 4 et 6 qui sont impliquées dans la transition entre les phases G1 et S.

4. Rôle de Rnd3 dans la carcinogénèse hépatique

Les modèles murins générés sont également utilisés pour étudier le rôle de Rnd3 dans la carcinogénèse hépatique et l'invasion tumorale *in vivo*. Pour ce projet, nous nous sommes intéressés à deux types de carcinogénèses hépatiques : la carcinogénèse spontanée et la carcinogénèse induite par l'injection d'un carcinogène chimique.

4.1 Implication de l'extinction de Rnd3 dans la carcinogénèse hépatique spontanée

La protéine Rnd3 a été décrite pour inhiber la transformation tumorale de fibroblastes transformés par les oncogènes Ras et Raf (Villalonga et al., 2004). Les résultats de l'équipe ont montré que Rnd3 est sous-exprimé dans le foie tumoral par rapport au foie sain (Grise et al., 2012). Bien que dans les cellules tumorales en culture la perte de Rnd3 engendre un arrêt de croissance, nous souhaitons analyser l'impact de l'extinction de cette protéine sur le

développement éventuel de CHC chez la souris. Cette approche a été motivée par le fait qu'une autre GTPase Rho a été décrite comme impliquée dans la carcinogenèse hépatique spontanée. En effet, des souris présentant une extinction de Cdc42 dans les hépatocytes et les cellules biliaires développent des CHCs à l'âge de 8 mois (van Hengel et al., 2008). De plus, le KO de IQGAP2, partenaire potentiel de Rnd3 (voir les résultats complémentaires de l'axe 1) engendre également le développement de CHC chez la souris (Schmidt et al., 2008).

Le modèle murin utilisé au départ pour cette étude est le modèle KORnd3^{TTR} obtenu par croisement entre les souris Rnd3 floxées et les souris TTR-iCre. Cette expérience permettra de déterminer si l'extinction de Rnd3 dans quelques hépatocytes est suffisante pour induire un développement tumoral dans le foie. Pour cela, des souris contrôles (= Rnd3 floxées) et KORnd3^{TTR} ont reçu deux traitements de tamoxifène à l'âge de 2 mois et de 5 mois. Ces souris actuellement âgées de 17 mois seront sacrifiées dans trois mois afin de prélever leur foie pour rechercher des signes de transformation tumorale (figure 53).

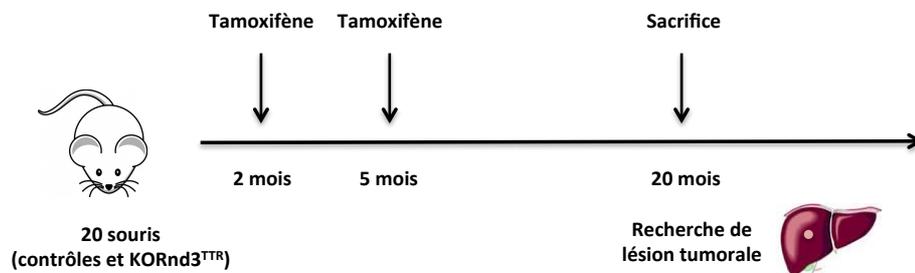


Figure 53: Protocole de carcinogenèse hépatique spontanée chez les souris KORnd3^{TTR}.

Il sera intéressant de répéter ce protocole avec les souris KORnd3^{Alb} obtenues en croisant les souris Rnd3 floxées avec les souris SA-Cre-ER^{T2} qui devraient permettre d'induire une extinction de la protéine Rnd3 dans la quasi-totalité des hépatocytes.

4.2 Implication de l'extinction de Rnd3 dans la carcinogenèse hépatique induite

L'utilisation d'un carcinogène chimique appelé le diéthylnitrosamine (DEN) permet d'induire le développement de CHCs dans le foie des souris qui, dans 22% des cas, vont conduire à la formation de foyers métastatiques au niveau des poumons (Thomas et al., 1963 ; Kyriazis et al., 1974). Cette technique est choisie pour évaluer le rôle de la perte de Rnd3 dans le développement de ces tumeurs et également dans leur potentiel invasif. En effet, il est déjà connu que la sous-expression de Rnd3 provoque une augmentation de l'invasion des cellules de CHC *in vitro* (Grise et al., 2012 ; Ma et al., 2013).

Le modèle murin utilisé pour cette étude est le modèle murin KORnd3^{Ad} obtenu en injectant des adénovirus CMV-GFPCre chez des souris Rnd3 floxées. Les souris Rnd3 floxées ont tout d'abord reçu une injection intra-péritonéale de DEN (25 mg/kg de poids corporel) à l'âge de

15 jours pour induire le développement de CHCs. La dose de DEN utilisée induit le développement de CHCs après 8 à 9 mois chez les souris C57BL/6 selon la littérature (Bard-Chapeau et al., 2011 ; Rappa et al., 2013). A l'âge de 8 mois, quelques souris ont été sacrifiées pour vérifier la cinétique de développement tumoral au niveau du foie. L'analyse des foies montre que le développement tumoral vient tout juste de commencer avec l'apparition de nodules et de lésions pré-néoplasiques. A l'âge de 9 mois, les souris reçoivent une injection de 2×10^9 particules infectieuses d'adénovirus (CMV-GFP ou CMV-GFP-Cre) par voie rétro-orbitale. Toutes les souris sont sacrifiées à l'âge de 11 mois et sont en cours d'analyse (figure 44).

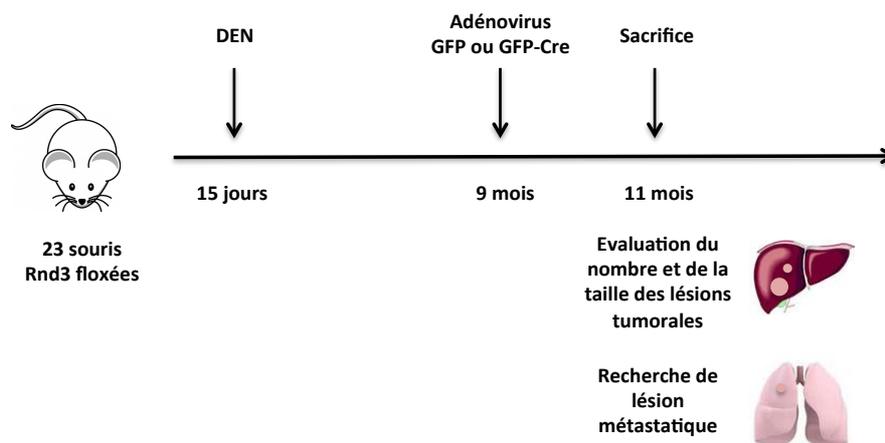


Figure 54: Protocole de carcinogénèse hépatique induite chez les souris KORnd3^{Ad}.

Les premiers comptages macroscopiques ne montrent pas d'impact de l'extinction de Rnd3 sur le nombre de lésions tumorales hépatiques développées par les souris. Des analyses plus complètes seront nécessaires afin d'une part de confirmer l'extinction de Rnd3 dans le foie des souris, et d'autre part d'analyser les lésions tumorales hépatiques et pulmonaires des animaux par immunohistochimie.

5. Résultats complémentaires

5.1 Régulation de l'expression de Rnd3 par les micro-ARNs, miR-200b et miR-200c, dans le carcinome hépatocellulaire

Le groupe du Dr. Moreau a montré que la RhoGTPase Rnd3 est sous-exprimée dans le CHC, à la fois dans les tumeurs humaines et dans les lignées cellulaires (Grise et al., 2012). Cependant, les mécanismes à l'origine de la dérégulation de Rnd3 dans ce contexte tumoral ne sont pas identifiés. L'un des objectifs du groupe est d'expliquer ces mécanismes, notamment en étudiant l'implication des micro-ARNs dans ce processus. Une expérience préliminaire réalisée au laboratoire a montré que l'expression de Rnd3 est augmentée dans les cellules de CHC transfectées avec un siRNA ciblant Drosha qui est une protéine impliquée dans la formation des micro-ARNs (figure 55).

Afin de déterminer si les deux micro-ARNs, miR-200b et miR-200c, peuvent réguler l'expression de Rnd3 dans le CHC, nous avons surexprimé chacun de ces micro-ARNs par transfection dans les lignées Huh7 et SNU398 issues de ce type de cancer. Les effets de cette surexpression ont été évalués par western blot en quantifiant le niveau d'expression de cibles connues de la famille miR-200 comme la E-cadhérine et ZEB2, ainsi que celui de notre cible d'intérêt Rnd3. Ces deux micro-ARNs sont correctement surexprimés dans les deux lignées car ils induisent tous deux une augmentation de l'expression de la E-cadhérine par rapport aux cellules transfectées avec un micro-ARN contrôle (figures 57B et 58). L'augmentation d'expression de la E-cadhérine est également visible au microscope avec un changement morphologique des cellules. En effet, les cellules Huh7 transfectées avec miR-200b ou miR-200c présentent un phénotype plus épithélial avec des cellules qui sont plus jointives que dans la condition contrôle (figure 57A). En ce qui concerne notre cible d'intérêt, de manière étonnante la surexpression de miR-200b ou miR-200c dans les lignées Huh7 et SNU398 n'induit pas de variation significative du niveau d'expression protéique de Rnd3 (figures 57B et 58).

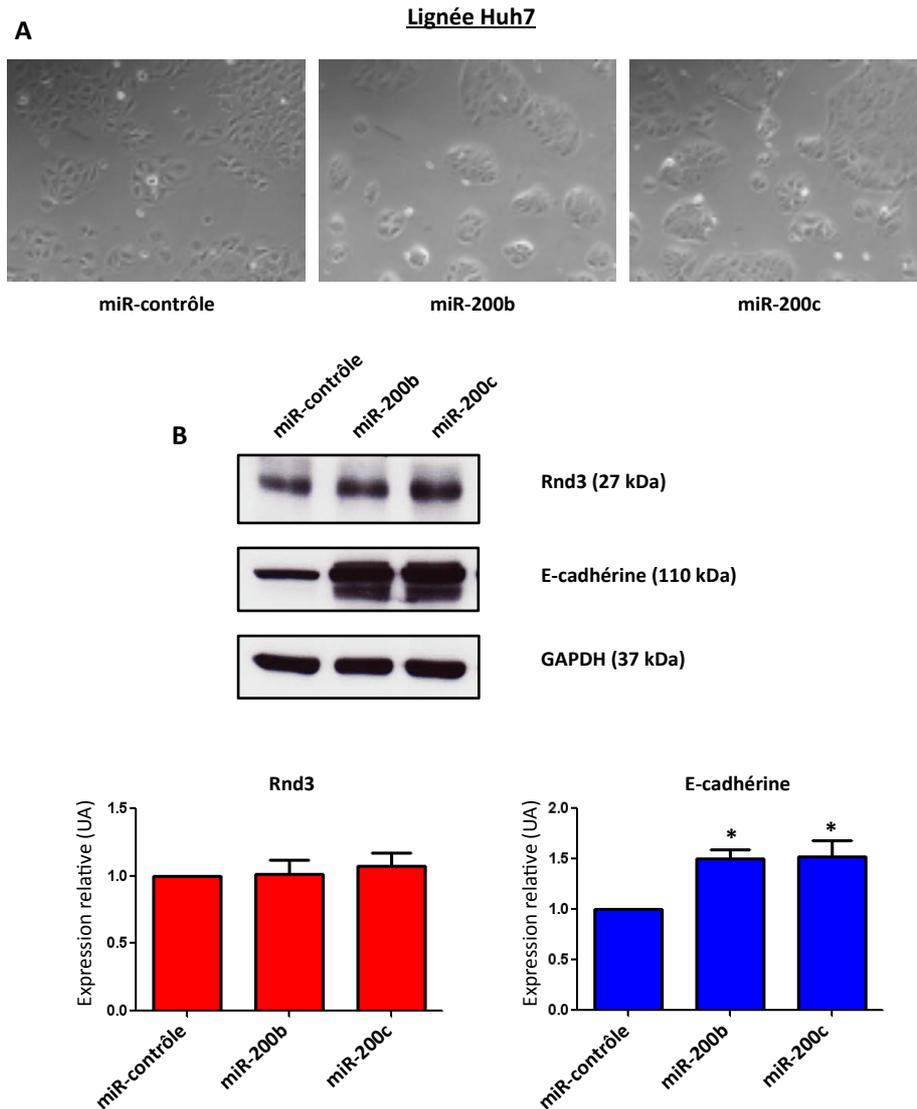


Figure 57: MiR-200b et miR-200c ne régulent pas l'expression de Rnd3 dans la lignée Huh7.

Les cellules sont transfectées avec miR-200b, miR-200c ou un miR-contrôle. **A.** 72 heures après la transfection, une augmentation des contacts cellule-cellule est visible. **B.** En parallèle, des extraits protéiques sont réalisés et ensuite analysés par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre Rnd3, la E-cadherine et la GAPDH. Les niveaux d'expression de Rnd3 et de la E-cadherine sont normalisés par rapport à la GAPDH (n=3). *P < 0.05 en comparaison avec le miR-contrôle.

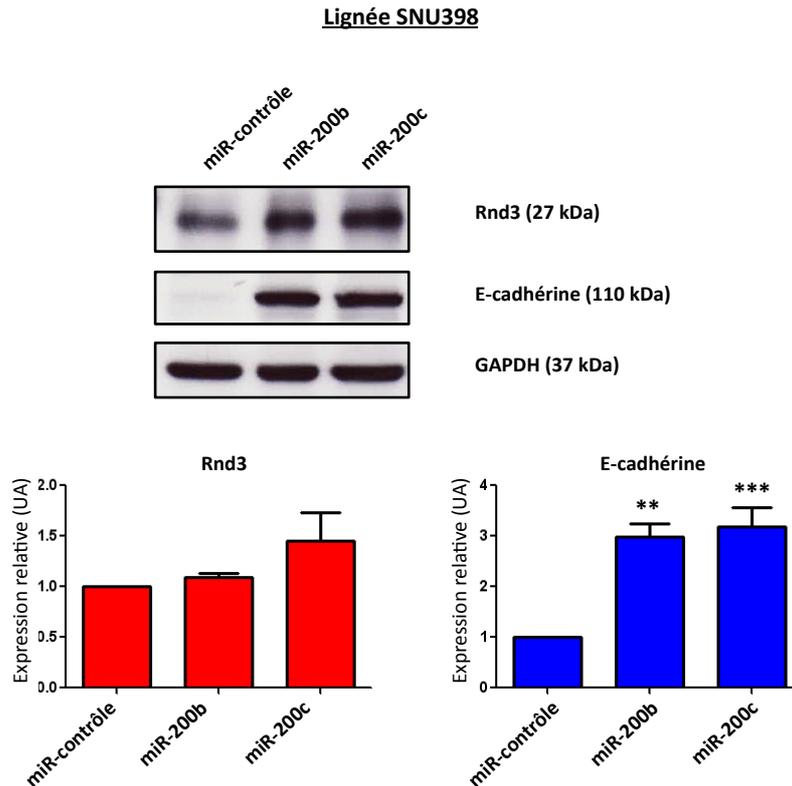


Figure 58: MiR-200b et miR-200c ne régulent pas l'expression de Rnd3 dans la lignée SNU398.

Les cellules sont transfectées avec miR-200b, miR-200c ou un miR-contrôle. 72 heures après la transfection, des extraits protéiques sont réalisés et ensuite analysés par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre Rnd3, la E-cadhérine et la GAPDH. Les niveaux d'expression de Rnd3 et de la E-cadhérine sont normalisés par rapport à la GAPDH (n=3). **P < 0.01 et ***P < 0.001 en comparaison avec le miR-contrôle.

5.1.2 Impact de miR-200b et miR-200c sur l'expression de Rnd3 dans la lignée HeLa

En parallèle, nous avons réalisé les mêmes expériences que précédemment dans la lignée HeLa pour valider notre protocole expérimental et reproduire les résultats publiés dans la littérature (Xia et al., 2010). La surexpression de miR-200b ou miR-200c est validée dans cette lignée par la diminution d'expression protéique de ZEB2 (figure 59B). Nous n'avons pas pu observer une augmentation d'expression protéique de la E-cadhérine car cette protéine n'était pas détectable dans la lignée HeLa dans nos conditions de western blot. Toutefois, tout comme pour la lignée Huh7, les cellules HeLa transfectées avec miR-200b ou miR-200c sont visiblement plus jointives que les cellules transfectées avec un miR-contrôle (figure 59A). De plus, la surexpression de miR-200b ou miR-200c dans les cellules HeLa induit une diminution d'expression de Rnd3 de 30 à 40% par rapport à la condition contrôle (figure 59B). Ces résultats confirment la régulation de l'expression de Rnd3 par miR-200b dans les cellules HeLa et montrent que miR-200c peut jouer le même rôle dans ces cellules.

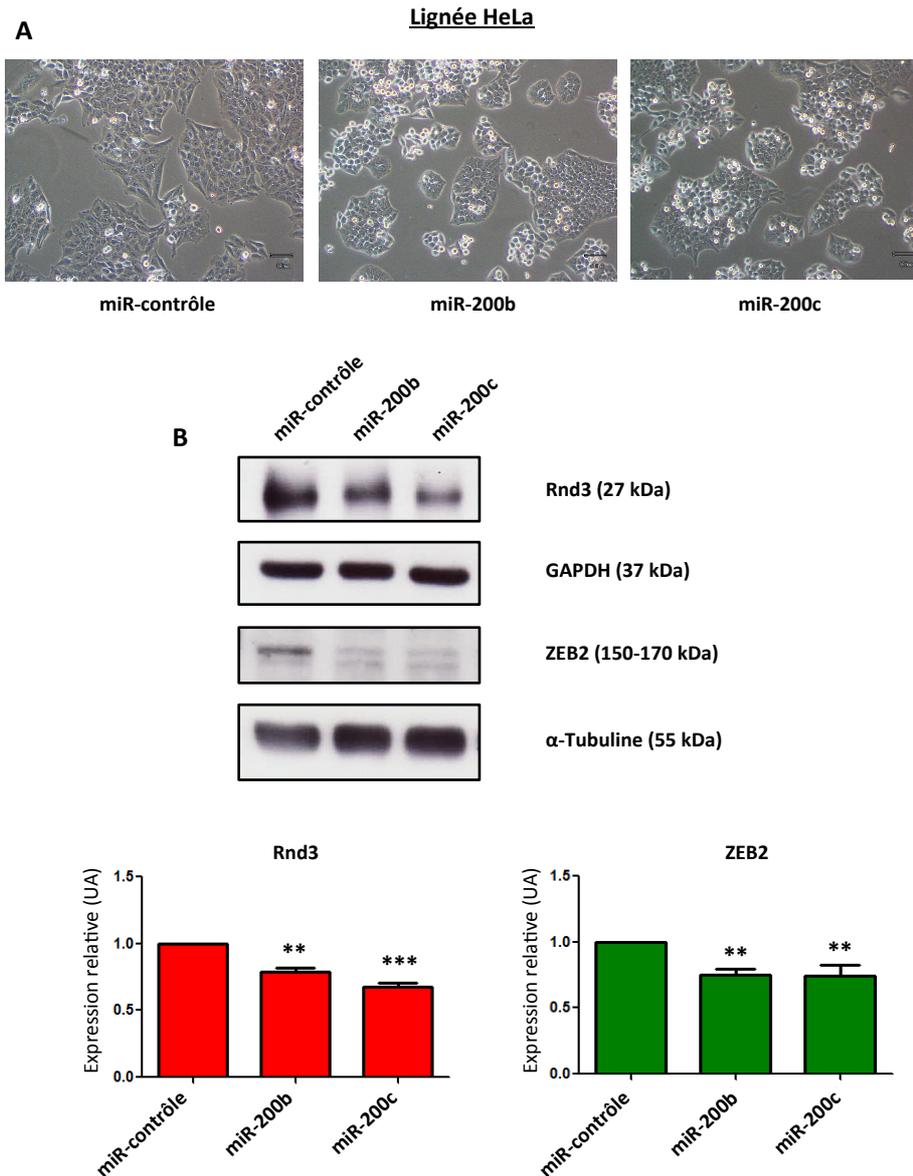


Figure 59: MiR-200b et miR-200c régulent tous deux l'expression de Rnd3 dans la lignée HeLa.

Les cellules sont transfectées avec miR-200b, miR-200c ou un miR-contrôle. **A.** 72 heures après la transfection, une augmentation des contacts cellule-cellule est visible. **B.** En parallèle, des extraits protéiques sont réalisés et ensuite analysés par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre Rnd3, ZEB2, la GAPDH et la tubuline α . Le niveau d'expression de Rnd3 est normalisé par rapport à la GAPDH, et celui de ZEB2 par rapport à la tubuline α (n=3). **P < 0.01 et ***P < 0.001 en comparaison avec le miR-contrôle.

Ces résultats montrent que l'expression de la protéine Rnd3 ne semble pas être régulée par miR-200b et miR-200c dans les lignées cellulaires de CHC testées. Toutefois, comme la protéine Rnd3 est déjà sous-exprimée dans les lignées de CHC, il serait intéressant de réaliser l'expérience inverse en inhibant miR-200b ou miR-200c endogène afin d'étudier le niveau d'expression de Rnd3. Il faudra utiliser pour cela des anti-miRs spécifiques de ces

deux micro-ARNs pour pouvoir refaire cette expérience et conclure sur la régulation de Rnd3 par miR-200b et miR-200c dans les cellules tumorales de foie. De plus, il serait intéressant de séquencer la région 3'UTR de l'ARNm de *RND3* dans quelques lignées cellulaires de CHCs et de les comparer à celle de la lignée HeLa afin de pouvoir identifier d'éventuelles mutations. En cas d'absence d'anomalies, l'absence de régulation de Rnd3 par miR-200b et miR-200c dans les lignées de CHC pourrait s'expliquer par l'expression d'un ARN ou d'une protéine dans ces cellules qui pourrait piéger ces deux micro-ARNs ou empêcher leur fixation sur la région 3'UTR de *RND3*. De plus, il serait intéressant d'entreprendre l'analyse globale des micro-ARNs ciblant l'ARNm de *RND3*. Ceci pourrait être réalisé en utilisant la stratégie FunREG développée dans le laboratoire par le Dr. Christophe Grosset (Laloo et al., 2009).

5.2 IQGAP2, partenaire potentiel de Rnd3 dans le carcinome hépatocellulaire

La RhoGTPase Rnd3 est impliquée dans la migration et l'invasion des cellules de carcinome hépatocellulaire (Grise et al., 2012 ; Ma et al., 2013). Afin de mieux comprendre son rôle dans le CHC, le groupe du Dr. Moreau a cherché à identifier de nouveaux partenaires protéiques de Rnd3. Pour cela, la lignée Hep3B a été transduite avec des particules lentivirales exprimant la protéine Rnd3 sauvage étiquetée Myc (Myc-Rnd3) afin de créer une surexpression de cette protéine dans la lignée Hep3B. Une immunoprécipitation avec un anticorps anti-Myc suivie d'une analyse par spectrométrie de masse a été réalisée. Cette expérience a révélé de nombreux partenaires potentiels spécifiques de Rnd3 parmi lesquels la protéine IQGAP2 sur laquelle nous avons focalisé notre intérêt.

La protéine IQGAP2 (IQ motif containing GTPase activating protein 2) est une protéine d'échafaudage qui est essentiellement exprimée dans le foie, les reins et les plaquettes (Schmidt et al., 2012). Cette protéine cytoplasmique joue un rôle dans la réorganisation du cytosquelette d'actine en interagissant avec les GTPases Rac1 et Cdc42 au niveau de son domaine GBD (figure 60). Cependant, il manque un acide aminé arginine dans le domaine de liaison des GTPases de la protéine IQGAP2 ce qui l'empêche d'hydrolyser le GTP. Les GTPases Rac1 et Cdc42 restent ainsi préférentiellement dans une conformation active, d'autant plus qu'elles sont également protégées de l'interaction avec des RhoGAPs par IQGAP2 (Brill et al., 1996). La protéine IQGAP2 est aussi impliquée dans l'adhésion cellulaire en interagissant avec la E-cadhérine et la bêta-caténine probablement au niveau de son domaine RGCT (figure 60).

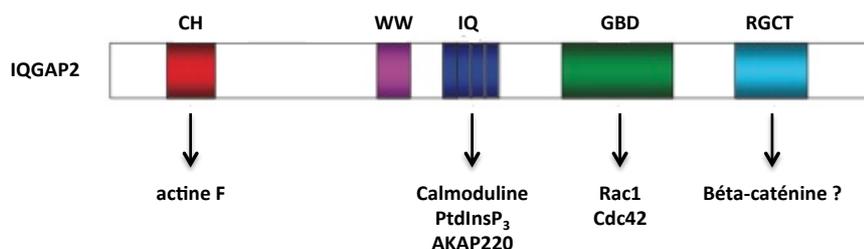


Figure 60: Les différents domaines de la protéine IQGAP2 humaine (adapté de Schmidt et al., 2012).

La protéine IQGAP2 est constituée d'un domaine CH (calponin homology) qui lie l'actine filamenteuse, d'un domaine WW qui est capable de fixer différentes protéines riches en proline, de quatre domaines IQ qui interagissent avec la calmoduline/les phosphatidylinositol-triphosphates (PtdInsP₃)/la protéine d'ancrage des kinases A (AKAP220), d'un domaine GBD (GTPase binding domain) qui lie Rac1 et Cdc42 et d'un domaine RGCT (RasGAP C-terminus domain) qui pourrait interagir avec la bêta-caténine par analogie avec IQGAP1.

La protéine IQGAP2 est par ailleurs impliquée dans la physiologie hépatique et le développement de CHC. En effet, cette protéine est sous-exprimée dans le CHC (White et al., 2010). Le KO d'IQGAP2 provoque le développement de CHC caractérisés au niveau moléculaire notamment par une augmentation de la cycline D1 et une perte d'expression de la E-cadhérine dans des modèles murins (Schmidt et al., 2008). De plus, la protéine IQGAP2 a été montrée comme interagissant au sein de complexes constitués d'IQGAP1, de la bêta-caténine et de la E-cadhérine dans les hépatocytes normaux (Schmidt et al., 2008). Cette protéine joue aussi un rôle dans l'invasion tumorale comme c'est le cas dans les cancers gastriques où sa sous-expression induit une augmentation du potentiel invasif des cellules (Jin et al., 2008).

Toutes ces informations sur la protéine IQGAP2, notamment son expression majoritaire dans le foie, son interaction avec des RhoGTPases et son implication dans la carcinogénèse hépatique et l'invasion tumorale, nous ont conduit à étudier l'interaction possible de cette protéine avec Rnd3.

5.2.1 Recherche d'une colocalisation entre les protéines Rnd3 et IQGAP2 dans la lignée Hep3B

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à la localisation intracellulaire des protéines Rnd3 et IQGAP2 dans la lignée Hep3B afin de pouvoir visualiser une éventuelle colocalisation entre ces deux protéines. Pour cela, des immunofluorescences ont été réalisées dans la lignée Hep3B surexprimant de manière stable la protéine Rnd3 étiquetée Myc (Hep3B Myc-Rnd3) et dans la lignée Hep3B surexprimant de façon transitoire la protéine Rnd3 étiquetée GFP (Hep3B GFP-Rnd3). Les images obtenues dans la lignée Hep3B Myc-Rnd3 montrent un enrichissement des protéines Rnd3 et IQGAP2 à la membrane de certaines cellules où

semblent colocaliser les deux partenaires (figure 61). Cette expérience a été répétée dans la lignée Hep3B GFP-Rnd3, puis analysée au microscope confocal afin de pouvoir confirmer ce résultat. Les immunomarquages révèlent aussi une colocalisation membranaire entre les protéines GFP-Rnd3 et IQGAP2 dans quelques cellules (figure 62).

Lignée Hep3B Myc Rnd3

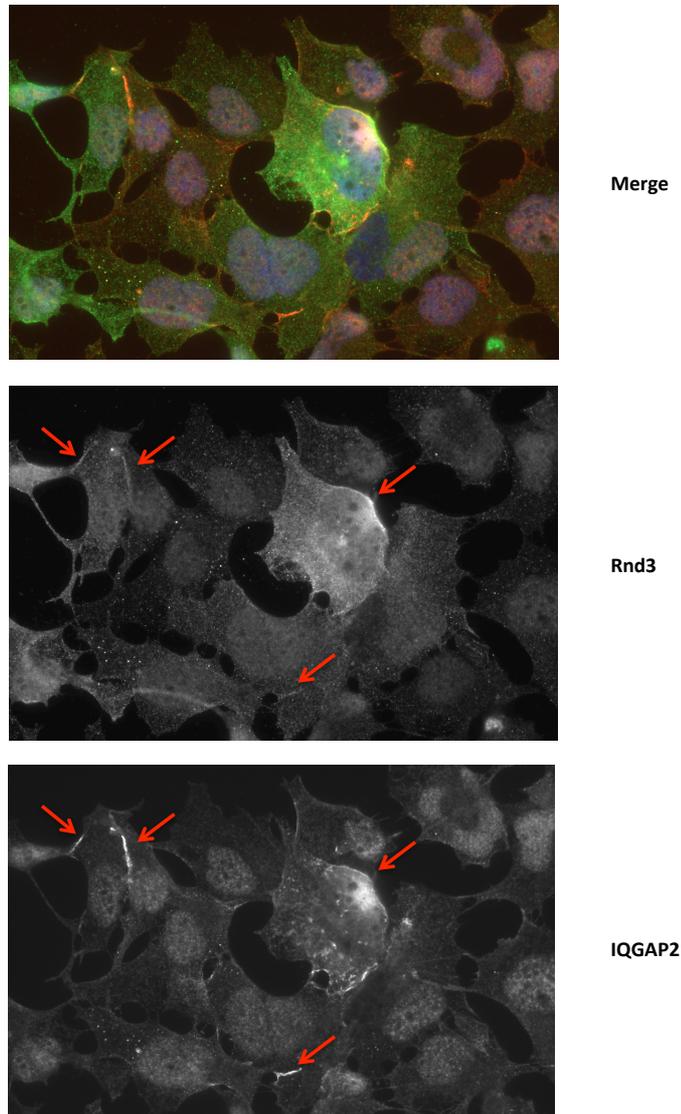


Figure 61: Enrichissement membranaire des protéines Rnd3 et IQGAP2 dans la lignée Hep3B Myc-Rnd3.

Les cellules Hep3B Myc-Rnd3 sont ensemencées sur des lamelles de verre et fixées après 72 heures avec du paraformaldéhyde 3%. Les immunomarquages sont réalisés en utilisant des anticorps dirigés contre Rnd3 (vert) et IQGAP2 (rouge), ainsi que du Hoechst (bleu) pour marquer les noyaux. Les images sont prises au microscope à épifluorescence Zeiss Axioplan 2 (objectif X63 ; en immersion). Les flèches rouges indiquent des zones de colocalisation entre les protéines Rnd3 et IQGAP2.

Lignée Hep3B GFP Rnd3

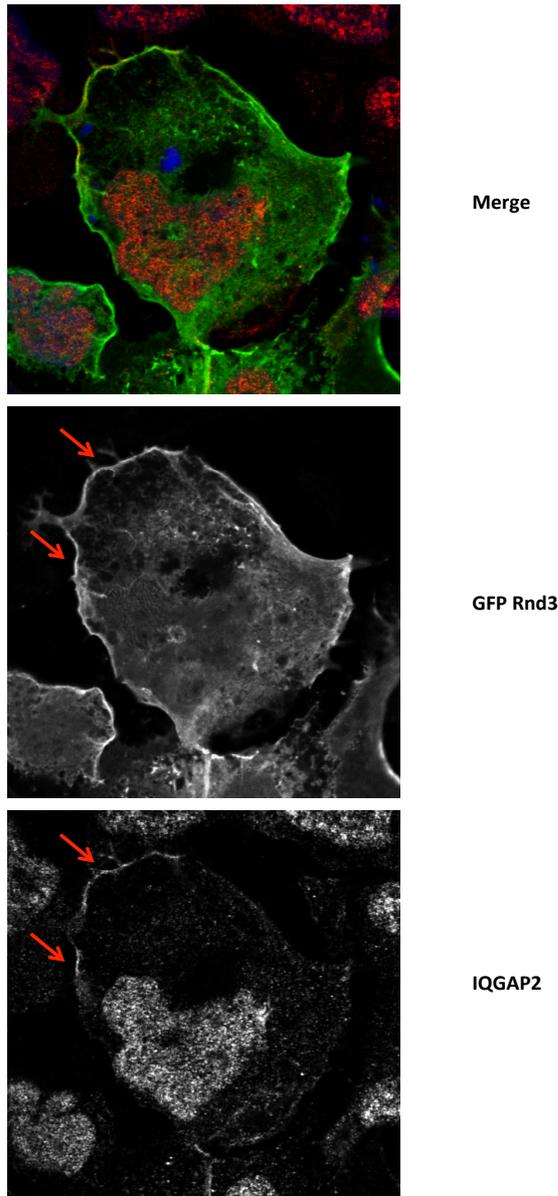


Figure 62: Colocalisation membranaire des protéines GFP-Rnd3 et IQGAP2 dans la lignée Hep3B surexprimant de façon transitoire la protéine GFP-Rnd3

Les cellules Hep3B sont transfectées directement sur des lamelles de verre avec le plasmide pGFP-Rnd3 et fixées après 24 heures avec du paraformaldéhyde 3%. Les immunomarquages sont réalisés en utilisant un anticorps dirigé contre IQGAP2 (rouge), ainsi que du Hoechst (bleu) pour marquer les noyaux. Les images sont prises au microscope confocal (objectif X63 ; en immersion). Les flèches rouges indiquent des zones de colocalisation entre les protéines Rnd3 et IQGAP2.

Ces résultats d'immunofluorescence ont permis de mettre en évidence une colocalisation des protéines Rnd3 et IQGAP2 au niveau de certaines régions membranaires, dont les jonctions intercellulaires, dans les cellules Hep3B. Toutefois, cette colocalisation n'est pas visible dans toutes les cellules.

5.2.2 Etude de l'interaction entre les protéines Rnd3 et IQGAP2

Pour déterminer s'il existe bien une interaction entre les protéines Rnd3 et IQGAP2, nous avons dans un premier temps effectué une immunoprécipitation contre la protéine Myc-Rnd3 dans la lignée Hep3B Myc-Rnd3 suivie d'une révélation d'IQGAP2 par western blot. Cette expérience a été faite sur des cellules confluentes afin d'augmenter le nombre de jonctions intercellulaires qui représentent une zone de colocalisation entre les deux protéines. L'immunoprécipitation contrôle est réalisée avec un anticorps anti-IgG1 de même isotype que l'anticorps anti-Myc utilisé. Le résultat obtenu montre une co-immunoprécipitation d'IQGAP2 dans la piste correspondant à l'IP contre la protéine Myc-Rnd3 (figure 63A). Nous avons également surexprimé la protéine IQGAP2 fusionnée à l'eCFP (enhanced cyan fluorescent protein) dans la lignée Hep3B Myc-Rnd3 afin de mieux visualiser l'interaction possible entre les deux protéines. L'immunoprécipitation anti-Myc-Rnd3 dans la lignée Hep3B Myc-Rnd3 exprimant la protéine eCFP-IQGAP2 révèle également une bande spécifique correspondant à la protéine eCFP-IQGAP2 (figure 63B).

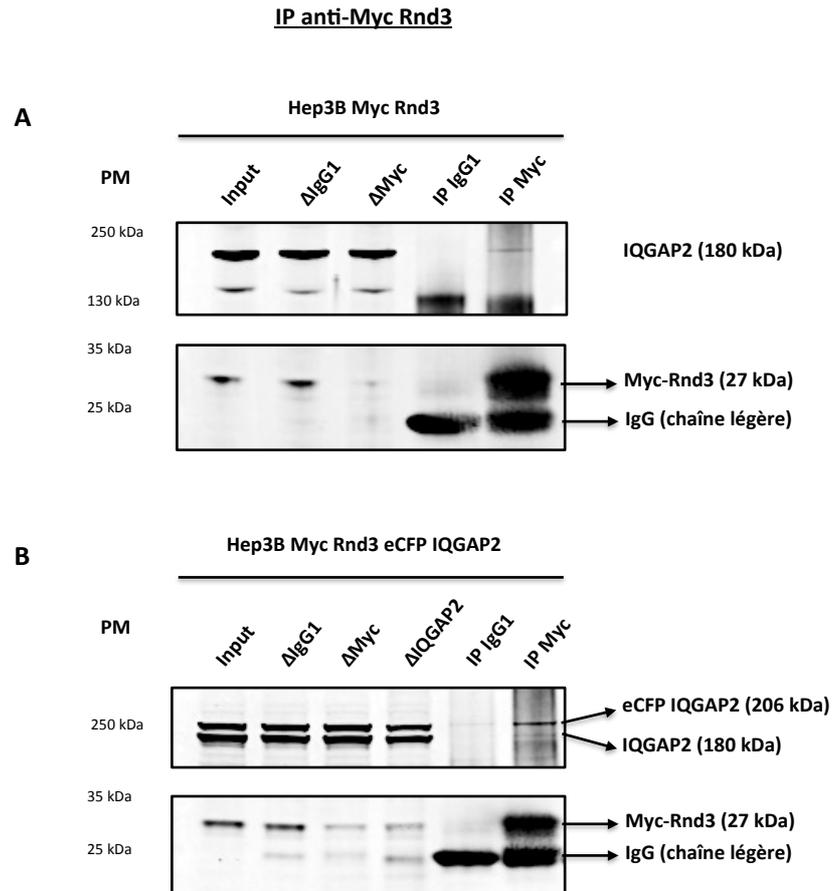


Figure 63: Co-immunoprécipitation d'IQGAP2 avec Myc-Rnd3 dans la lignée Hep3B Myc-Rnd3.

Les protéines sont extraites à partir de cellules confluentes et sont incubées avec un anticorps dirigé contre Myc ou un anticorps contrôle (IgG1). Les protéines immunoprécipitées avec les deux anticorps sont analysées par western blot (IP IgG1 et IP Myc), avec également l'extrait protéique total (input) et les protéines non fixées par les billes magnétiques et les anticorps (Δ IgG1 et Δ Myc). Le western blot est analysé en utilisant des anticorps dirigés contre Myc et IQGAP2. **A.** L'immunoprécipitation anti-Myc est réalisée dans la lignée Hep3B Myc-Rnd3. **B.** Les cellules Hep3B Myc Rnd3 sont transfectées avec le plasmide pECFP-IQGAP2, et lysées après 24 heures pour réaliser une immunoprécipitation anti-Myc.

Les immunoprécipitations inverses ont ensuite été réalisées afin de pouvoir confirmer les résultats obtenus. L'immunoprécipitation anti-IQGAP2 dans les cellules Hep3B Myc-Rnd3 montre également la présence spécifique de la protéine Myc Rnd3 (figure 64A). De même, on a obtenu une co-immunoprécipitation de Myc-Rnd3 dans la condition correspondant à l'immunoprécipitation anti-IQGAP2 (= IQGAP2 endogène et eCFP IQGAP2) dans la lignée Hep3B Myc-Rnd3 exprimant IQGAP2 fusionnée à l'eCFP (figure 64B).

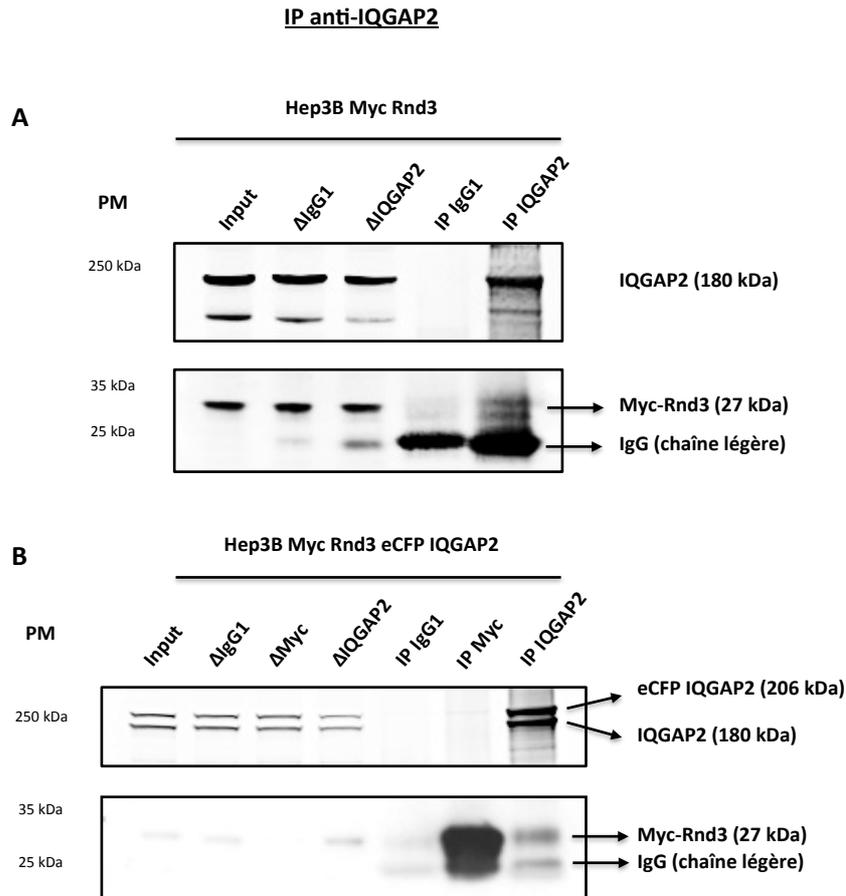


Figure 64: Co-immunoprécipitation de Myc-Rnd3 avec IQGAP2 dans la lignée Hep3B Myc-Rnd3.

Les protéines sont extraites à partir de cellules confluentes et sont incubées avec un anticorps dirigé contre IQGAP2 ou un anticorps contrôle (IgG1). Les protéines immunoprécipitées avec les deux anticorps sont analysées par western blot (IP IgG1 et IP IQGAP2), avec également l'extrait protéique total (input) et les protéines non fixées par les billes magnétiques et les anticorps (Δ IgG1 et Δ IQGAP2). Le western blot est analysé en utilisant des anticorps dirigés contre Myc et IQGAP2. **A.** L'immunoprécipitation anti-IQGAP2 est réalisée dans la lignée Hep3B Myc-Rnd3. **B.** Les cellules Hep3B Myc-Rnd3 sont transfectées avec le plasmide pECFP-IQGAP2, et lysées après 24 heures pour réaliser une immunoprécipitation anti-IQGAP2.

L'immunoprécipitation anti-IQGAP2 dans la lignée Hep3B semble aussi induire la présence spécifique de la protéine Rnd3 qui est cependant difficilement visualisable en raison de la très grande proximité de Rnd3 avec les chaînes légères des anticorps (donnée non montrée).

L'ensemble de ces résultats montre qu'il existe bien un lien entre les protéines Rnd3 et IQGAP2. L'utilisation de la technique de FRET permettrait de déterminer s'il existe une interaction entre Rnd3 et IQGAP2 en déterminant la proximité entre ces deux protéines. Elle pourrait également nous renseigner sur la localisation cellulaire de cette interaction ce qui apporterait de nouvelles pistes quant à sa fonctionnalité.

5.2.3 Impact de la variation d'expression de Rnd3 sur la localisation d'IQGAP2

Pour débiter l'étude de la fonctionnalité de l'interaction entre les protéines Rnd3 et IQGAP2, une immunofluorescence d'IQGAP2 a été réalisée dans la lignée Hep3B transfectée avec un siARNs ciblant Rnd3 (S1) ou un siARN contrôle. L'extinction de Rnd3 est validée par la réapparition des fibres de stress dans les cellules (figure 65). Le résultat obtenu ne montre pas de variation de la localisation d'IQGAP2, et notamment de sa présence au niveau de la membrane plasmique, en l'absence de Rnd3 dans les cellules Hep3B (figure 65).

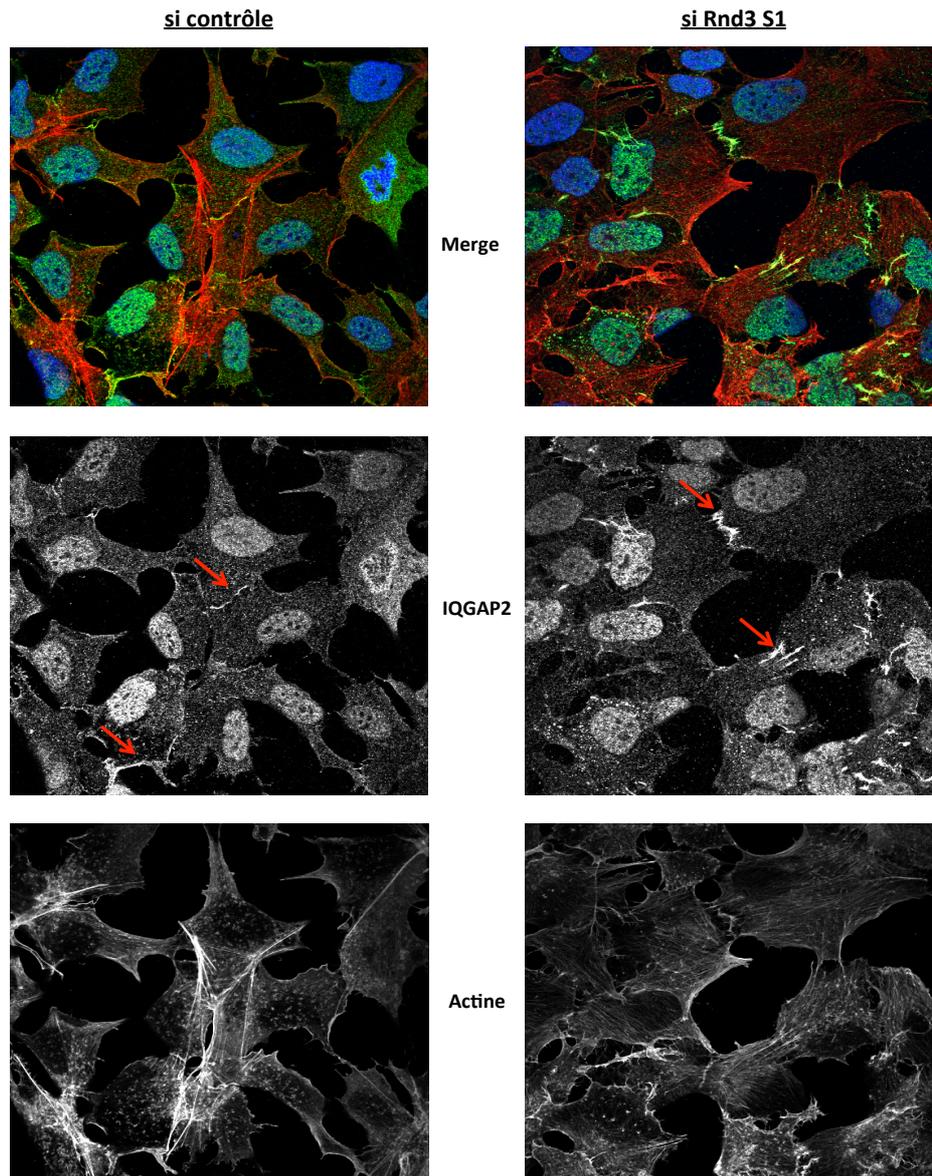


Figure 65: L’extinction de Rnd3 ne modifie pas la localisation d’IQGAP2 à la membrane plasmique dans les cellules Hep3B.

Les cellules Hep3B sont transfectées deux fois avec un siARN dirigé contre Rnd3 (S1) ou un siARN contrôle (Ctrl). Elles sont fixées 48 heures après la deuxième transfection avec du paraformaldéhyde 3%. Les immunomarquages sont réalisés en utilisant de la phalloïdine (Alexa Fluor® 568 Phalloidin, Molecular Probes®) (rouge) pour marquer l’actine, un anticorps dirigé contre IQGAP2 (vert), ainsi que du Hoechst (bleu) pour marquer les noyaux. Les images sont prises au microscope confocal Leica SP5 (objectif X63 ; en immersion). Les flèches rouges indiquent des zones de localisation d’IQGAP2 à la membrane plasmique.

Après ce résultat, nous avons décidé d’étudier l’impact de la variation de l’expression de Rnd3 sur une autre localisation cellulaire de la protéine IQGAP2 qui a été mise en évidence au laboratoire. En effet, comme cela a été décrit pour IQGAP1 (Emadali et al., 2006), la protéine IQGAP2 se localise également au niveau des canalicules biliaires dans les hépatocytes tumoraux de la lignée HepG2. La stratégie choisie a été de surexprimer la

protéine Rnd3 dans les cellules HepG2 car le niveau d'expression endogène de Rnd3 est très faible dans cette lignée. Les résultats obtenus ne montre pas de variation de la localisation d'IQGAP2 au niveau de ces structures ni du nombre de canalicules biliaires formés dans les cellules HepG2 surexprimant Rnd3 par rapport aux cellules sauvages (donnée non montrée). Il reste intéressant d'étudier le rôle de Rnd3 dans d'autres fonctions d'IQGAP2 comme par exemple le transport de vésicules médié par le complexe de l'exocyste par homologie avec IQGAP1. Les expériences inverses de variation de l'expression d'IQGAP2 permettront aussi d'analyser leur impact sur les fonctions de Rnd3 comme la formation des fibres de stress.

Axe 2 : Etude du rôle des GTPases Rho dans la formation et la fonction des invadosomes

1. Implication des RhoGTPases classiques dans la fonction des invadosomes

Les invadosomes sont des structures d'actine filamenteuse qui permettent l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire. Ils sont caractérisés par une capacité de dégradation des éléments de la matrice extracellulaire qui leur confère un rôle clé dans les processus d'invasion physiologique et pathologique. Le terme invadosome regroupe à la fois les podosomes dans les cellules normales et les invadopodes dans les cellules cancéreuses. Il existe de nombreux articles dans la littérature qui impliquent les GTPases Rho dans la formation et la fonction des invadopodes. Les GTPases RhoA et Cdc42 sont nécessaires à la formation et à la fonction des podosomes dans de nombreux types cellulaires comme les ostéoclastes, les cellules endothéliales ou encore les fibroblastes transformés par Src (Chellaiah et al., 2000 ; Moreau et al., 2003 ; Berdeaux et al., 2004). Ces protéines jouent par ailleurs un rôle dans les invadopodes comme c'est le cas de RhoC qui est régulé de façon spatiotemporelle par p190RhoGEF et p190RhoGAP pour permettre une activation de la cofiline nécessaire à la dynamique de l'actine seulement au niveau du cœur des invadopodes classiques (Bravo-Cordero et al., 2011). Les invadopodes linéaires induits par le collagène fibrillaire de type I sont aussi régulés par les RhoGTPases, et notamment par Cdc42 dont l'expression est induite par le collagène en présence du récepteur DDR1 et est nécessaire à la formation de ces structures (publication n°2 en annexe).

Pendant ma thèse, j'ai participé à une étude visant à définir la signature moléculaire minimale des invadosomes. En effet, il existe une très grande diversité dans les invadosomes, à la fois dans les types cellulaires qui forment ces structures mais aussi dans leur organisation et leur composition moléculaire au sein de ces cellules. Pourtant, ces structures partagent toutes la même fonction de dégradation de la matrice extracellulaire. L'objectif de cette étude est d'identifier les molécules communes essentielles à la formation d'un invadosome actif. Dans cet article, nous avons montré que la RhoGTPase Cdc42 est indispensable à la formation des invadosomes. L'activité de dégradation de la matrice dépend quant à elle de l'expression d'une protéine d'échafaudage appelée Tks5. A l'inverse, les kinases Src ne font pas parties de cette signature minimale étant donné que certains invadosomes sont maintenus en présence d'inhibiteurs de kinases de la famille Src.

Cdc42 and Tks5: a minimal and universal molecular signature for functional invadosomes

Julie Di Martino^{1,2} *, Lisa Paysan^{1,2} *, Caroline Gest^{1,2} *, Valérie Lagrée^{1,2}, Amélie Juin^{1,2,3}, Frédéric Saltel^{1,2} # and Violaine Moreau^{1,2} #

¹ INSERM, Physiopathologie du cancer du foie, U1053, F-33000 Bordeaux, France; ² Univ. Bordeaux, Physiopathologie du cancer du foie, U1053, F-33000 Bordeaux, France

³ Current address: Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow

*, # these authors contributed equally to this work

corresponding authors. Phone: +33 (0)5 57 57 17 71. Fax: +33 (0)5 56 51 40 77. E-mail: violaine.moreau@inserm.fr / frederic.saltel@inserm.fr

Keywords: Invadosomes, Cdc42, Tks5, Src, actin cytoskeleton, invasion

Abbreviations: CNF1, Cytotoxic Necrotizing Factor 1; ECM, extracellular matrix; GEF, guanine exchange factor; HUVECs, human umbilical vein endothelial cells; IPTG, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; NaF, sodium fluoride; PAE, porcine aortic endothelial; RITC, rhodamine B isothiocyanate.

ABSTRACT

Invadosomes are actin-based structures involved in extracellular-matrix degradation. Invadosomes, either known as podosomes or invadopodia, are found in an increasing number of cell types. Moreover, their overall organization and molecular composition may vary from one cell type to the other. Some are constitutive such as podosomes in hematopoietic cells whereas others are inducible. However, they share the same feature, their ability to interact and to degrade the extracellular matrix. Based on the literature and our own experiments, the aim of this study was to establish a minimal molecular definition of active invadosomes. We first highlighted that Cdc42 is the key RhoGTPase involved in invadosome formation in all described models. Using different cellular models, such as NIH-3T3, Hela and endothelial cells, we demonstrated that overexpression of an active form of Cdc42 is sufficient to form invadosomes actin core. Therefore, active Cdc42 must be considered not only as an inducer of filopodia, but also as an inducer of invadosomes. Depending on the expression level of Tks5, these Cdc42-dependent actin cores were endowed or not with a proteolytic activity. In fact, Tks5 overexpression rescued this activity in Tks5 low expressing cells. We thus described the adaptor protein Tks5 as a major actor of the invadosome degradation function. Surprisingly, we found that Src kinases are not always required for invadosome formation and function. These data suggest that even if Src family members are the principal kinases involved in the majority of invadosomes, it cannot be considered as a common element for all invadosome structures. We thus define a minimal and universal molecular signature of invadosome that includes Cdc42 activity and Tks5 presence in order to drive the actin machinery and the proteolytic activity of these invasive structures.

INTRODUCTION

Podosomes and invadopodia, formed by normal and cancer cells respectively, are sub-cellular actin-rich structures that are endowed with a proteolytic activity. Both these structures, that share a high level of similarity, are collectively named invadosomes. As these structures are dedicated to invasion, they are found in cells that are able to migrate across tissue boundaries. Under physiological conditions, podosomes are formed in cells of the myelomonocytic lineage, such as macrophages, dendritic cells, neutrophils, and osteoclasts. Some non-haematopoietic cells including fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells can also form podosomes under appropriate stimulation with growth factors (PDGF, VEGF, TGF β , TNF α) (for a review see ref.¹) or activating components (phorbol esters, cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1), sodium fluoride (NaF))²⁻⁵. However, VEGF, TNF α and phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) were reported to promote podosome formation in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)^{2, 6}, but not in bovine aortic endothelial cells (BAECs)⁷, pointing out some different signalling pathways required for podosome formation in endothelial cells⁸. On the other hand, invadopodia do form spontaneously in cancer cells and more specifically in metastatic cancer cells. They were also described in cancer cells that undergo epithelial-mesenchymal transition^{9, 10}. Finally, we recently described a new class of invadosomes, called linear invadosomes that form in a large number of cell types, both normal and cancer cells, upon contact with fibrillar type I collagen¹¹. Even if until recently invadosomes were mainly described *in vitro*, an increasing number of studies tend to address their existence *in vivo*. Indeed, invadosomes have now been described during cell invasion in various models including mice, zebrafish, *Drosophila melanogaster*, and *Caenorhabditis elegans* (for a review see Sherwood and collaborators, this issue). Besides their presence in a variety of cell types, invadosomes organization inside the cell is also a variable parameter. The base unit of an invadosome is an actin core observed as an actin dot by immunofluorescence. Although invadopodia are often present as individual structures in cancer cells, podosomes can

assemble into mega-structures described as clusters, rosettes, belts (for a review see ref.¹) or lines¹¹. This variability in the invadosome world is probably due to the complex combination of molecules and pathways required for their formation, organization and function. Like focal adhesions, invadosomes are multi-protein complexes that link the extracellular matrix to the actin cytoskeleton. However, it is clear that according to the cell context and the microenvironment, the requirement of invadosome components may differ from one cell type to the other. Over the past ten years, many components and pathways regulating invadosome formation and function have been discovered. Podosomes and invadopodia are enriched with phosphatidylinositides, which requires a tight regulation of the phosphoinositide 3-kinases (PI3K) pathway (reviewed by¹²). Several actin nucleators are associated with the F-actin-rich core, such as the Arp2/3 complex and its nucleation promoting factors (N-WASP/WASP and cortactin)^{4, 13-15}, formins^{16, 17}, or Spire¹⁸ that drive F-actin polymerization. Many actin-binding proteins such as fascin, vinculin or cofilin are also markers of these structures. Consequently, RhoGTPases are highly required for invadosome formation and organization. RhoA, Rac1 or Cdc42 were all described to be involved, depending on the model. For example, podosomes are disrupted in osteoclast-like multinucleated cells upon inhibition of Rho using C3 transferase¹⁹, whereas they still form in primary osteoclasts under the same treatment²⁰. In addition, RhoA silencing has no effect on podosome formation in fibroblasts (²¹⁻²³ and (Table I)). Similarly, macrophages from mice that lack Rac expression (Rac1/2^{-/-} mice) are unable to form podosomes²⁴, whereas Rac expression is dispensable for podosome formation in endothelial cells². Finally, Cdc42 appears as a consensus in the invadosome landscape as all podosomes and invadopodia are Cdc42-dependent irrespectively of the cell type (Table I).

In addition to RhoGTPases, Src kinases activity appears as a key signal to control invadopodia and podosomes. Podosome formation was initially observed in fibroblasts transformed by the Rous sarcoma virus, demonstrating that Src kinase was sufficient to

induce podosomes²⁵. In addition, many studies demonstrated that Src inhibitors abolished invadopodia and podosome formation. But recently, several Src-independent models of invadosomes were reported in the literature^{26, 27}, suggesting that the requirement of Src kinase activity is probably not a universal parameter for invadosome assembly. Alternatively, Tks5 (also known as Fish), which was identified as an Src substrate²⁸, is a scaffolding protein found in podosomes and invadopodia^{29, 30}. Although the involvement of Tks5 in the formation or function of invadosomes is specific to each cell type, Tks5 appears as a universal marker of these structures.

Finally, many adhesion molecules such as integrins or CD44 may or not be present. Indeed, CD44, which is a transmembrane proteoglycan expressed in most cell types, was shown to be a marker of podosome cores in osteoclasts³¹ and macrophages when cultured in 3D³² and of invadopodia in cancer cells³³. On the other hand, integrins are described as the universal receptors involved at invadosomes^{34, 35}. However, the impact of integrins can be positive or negative for invadosome formation depending on the nature of the ECM. Indeed, if laminin-332 via $\alpha3\beta1$ can reduce invadosome formation in rat bladder carcinoma cells³⁶, on the contrary fibronectin via $\alpha5\beta1$ stimulates their formation in breast cancer cells and head and neck squamous carcinoma cells³⁷. On the other hand, recent studies asked the question about the real impact of integrins in invadosome core formation in some cellular models. Indeed, $\beta1/\beta2/\alpha v$ integrins triple-null osteoclasts still formed small actin dots suggesting that integrins are not required for initial actin core formation in osteoclasts³⁸. We also recently demonstrated that linear invadosomes formed on type I collagen in an integrin-independent manner in mouse embryonic fibroblasts¹¹. Thus, the molecular identity of the ECM receptors at invadosome may obviously adapt to the substrate and is not restricted to integrins.

In addition to all these proteins and pathways involved in invadosome formation, proteomic analyses recently identified novel invadopodia and podosomes components, which need to be studied and confirmed^{39, 40}. In front of this wide panel of molecules, we attempted to

simplify the invadosome schema. The aim of this study was thus to adopt a minimalist view to determine a minimal but universal molecular definition of invadosomes that would fit with all models and contexts. Based on the literature, we used various cellular models to challenge the functions of Cdc42 and Tks5 at invadosomes. We thus define both molecules as universal markers of invadosomes in all cell types and organisms.

RESULTS

Cdc42 is the main RhoGTPase involved for invadosome formation

Based on their involvement in actin cytoskeleton remodelling, RhoGTPases are major regulators of invadosomes. RhoGTPases involvement was sought in most of the podosomes- and invadopodia-presenting cell types. Due to the variety of cellular models combined with various stimuli, the picture obtained is not clear. However, interestingly, Cdc42 appears as a key and central molecule for invadosome formation in all cell types independently of the stimuli used to form invadosomes (Table I). To confirm this observation, we used siRNA approach to knockdown Cdc42 in NIH-3T3 cells expressing a constitutively active form of Src, a classical model to study invadosomes. Src-transformed NIH-3T3 (Src-3T3) cells were transfected using siRNAs targeting murine Cdc42 and formation of podosome rosettes was assayed by co-staining of F-actin and cortactin (Fig1A). Cdc42 expression was efficiently knocked-down using two distinct siRNAs (Fig1B). We found that Cdc42 downregulation strongly decreases the ability of cells to form invadosome rosettes, when compared with the control condition (Fig1A and C). This result confirms that Cdc42 is involved in invadosome formation. Interestingly, siRNA directed against RhoA promoted an increase in invadosome rosette formation, whereas Rac1 depletion did not affect them (data not shown). Moreover, constitutively active form of Cdc42 (V12Cdc42) was early shown to act as an inducer of invadosomes in HeLa and porcine aortic endothelial (PAE) cells^{4, 41}. We first confirmed this result in both cell types (Fig2A and B) and also found that expression of V12Cdc42 was able to induce invadosomes in additional cell types such as NIH-3T3 fibroblasts (Fig2C), HUVECs², and HuH7, a hepatocarcinoma cell line without constitutive invadopodia (data not shown). It is important to notice that V12Cdc42 protein accumulates into invadosomes (Fig2B-C). Thus, based on the literature and our own experiments, we support the fact that Cdc42 is the critical inducer for invadosome actin core formation.

Degradation activity of V12Cdc42-induced invadosomes

To test the ability of V12Cdc42-induced invadosomes to degrade the extracellular matrix, we used the classical gelatin matrix degradation assay. After V12Cdc42-GFP transfection, NIH-3T3 cells were seeded on rhodamine B isothiocyanate (RITC)-gelatin. Twenty-four hours later, cells were fixed and stained for F-actin. Confocal analysis showed that in NIH-3T3 fibroblasts, V12Cdc42-induced invadosomes were able to degrade the gelatin, demonstrating the functionality of these structures (Fig3A). This result suggests that Cdc42 activity alone is sufficient to promote the formation of functional invadosomes. We aimed at confirming this result using the model of PAE cells stably expressing an isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)-inducible active form of Cdc42. After 24 hours IPTG stimulation, cells were placed on RITC-gelatin to visualize PAE degradation activity. Surprisingly, although most cells indeed exhibited podosomes, no degradation could be noticed (Fig3B). Thus, depending on the cellular model, active Cdc42 appears sufficient to recruit the actin machinery to form invadosomes core, but not to bring the degradation activity to the structure.

Tks5 is required to assure degradation activity of invadosomes

In the literature, Tks5 appears as an early marker during invadosome formation. However, depending on the cellular model, Tks5 depletion could promote invadosome destabilization or only inhibition of the degradation activity. It was shown that Tks5 allows metalloproteinase activation at invadosomes and consequently matrix degradation as described in macrophages⁴². Considering this, we hypothesized that Cdc42 could promote formation of the invadosome F-actin architecture, and Tks5 could control and regulate the degradation activity. Interestingly, we demonstrated previously that PAE cells express very low level of Tks5 protein, when compared to other cell lines¹¹. In addition, we found that, in

PAE cells, V12Cdc42-induced podosomes are devoid of Tks5 staining whereas Tks5 clearly accumulates in V12Cdc42-induced podosomes of NIH-3T3 cells (Fig3C). We then asked whether Tks5 overexpression can rescue the degradation phenotype of PAE-V12Cdc42 cells. After Tks5-GFP transfection, PAE-V12Cdc42 cells were stimulated with IPTG to promote invadosome formation and seeded on RITC-gelatin to investigate their degradation activity. Using confocal microscopy, we showed that Tks5-GFP co-localizes with F-actin in invadosomes (Fig4A). Strikingly, Tks5-GFP overexpression is associated with a degradation activity of V12-Cdc42-induced invadosomes (Fig4A). We can notice a perfect co-localization of F-actin, Tks5-GFP and gelatin degradation. This result prompted us to check for the expression of MT1-MMP in GFP control condition versus Tks5-GFP in PAE cells. As expected, we were able to visualize MT1-MMP staining only upon Tks5-GFP transfection (Fig4B-C). Thus, these data suggest that Tks5 is a limiting factor in PAE cells, which allows us to dissect the molecular requirements to build a functional invadosome. Our results demonstrate the molecular complementary between Cdc42 and Tks5 to form functional invadosomes.

Src kinase involvement varies according to the invadosome model

As Src family kinases are thought to be required for invadosome formation, we checked their involvement in V12Cdc42-expressing PAE cells that form individual podosomes. We found that Src inhibitors such as SU6656 and PP2 were not able to inhibit podosome formation in PAE cells (Fig5A). As expected, both inhibitors abolished the formation of rosettes in Src-3T3 fibroblasts (Fig5B). However, V12Cdc42-induced invadosomes in NIH-3T3 cells were also resistant to Src inhibitors (Fig5C). These data confirm results that we previously observed in V12Cdc42-induced podosomes in HUVECs². To strengthen this observation, we further screened for other invadosome models that were resistant to Src inhibition. We previously demonstrated that NIH-3T3 fibroblasts form linear invadosomes upon contact with collagen fibrils¹¹. Treatment of NIH-3T3 cells with either SU6656 or PP2 did not affect their ability to

form linear invadosomes (Fig5D). Altogether, these data demonstrate that Src activation is not a prerequisite for invadosome formation in all models.

We further tested whether Src kinases were required for the degradation activity of these latter invadosomes. Thus, V12Cdc42-transformed NIH-3T3 cells were seeded on fluorescent gelatin and treated using Src inhibitors. Whereas invadosomes were still present, inhibition of Src kinases completely blocked their degradation activity (Fig6A). However, when invadosomes were induced upon contact with collagen fibrils in the same cellular background, we found that neither PP2 nor SU6656 treatment abolished the degradation activity of the linear invadosomes (Fig6B). These results suggest that depending on the inducer, Src kinases are or not required for invadosome formation and function. Thus, these data demonstrate that even if Src is required in a large number of invadosomes, it is not a common element of all invadosome models.

DISCUSSION

Recently our group described a novel class of invadosomes, named linear invadosomes that form upon contact with fibrillar type-I collagen in either normal or cancer cells¹¹. These structures belong to the invadosome family as they are F-actin-based structures endowed with a proteolytic activity. However, these structures challenged our view of the minimal molecular composition of the invadosome unit. Indeed, linear invadosomes form in an integrin and Src-independent manner. This led us to propose that a limited number of elements might be enough to define an invadosome. Based on our own data and data available in the literature, we suggest that, besides the actin machinery requirement, all invadosomes are Cdc42-dependent and Tks5-positive.

Cdc42 is a universal regulator of invadosomes

Cdc42 is a well-studied RhoGTPase involved in actin cytoskeleton remodelling and in the establishment of cell polarity from yeast to mammalian cells. Since the pioneer experiments demonstrating that expression of V12Cdc42 in Swiss 3T3 fibroblasts induced the formation of finger-like protrusions called filopodia involved in probing the environment during cell migration^{43, 44}, it has been a dogma that expression of constitutively active Cdc42 promotes filopodia formation. However, activation of Cdc42 is also able to induce podosomes in a large number of cell types including HeLa, NIH-3T3, PAE and HUVEC cells (^{4, 41} and (Fig1)). In addition, knockdown of Cdc42 inhibits podosomes and invadopodia formation (Table I and Fig1). Accordingly, Cdc42 should not be restricted to its role as filopodia inducer but instead should be presented as a filopodia and invadosome inducer. In contrast to a recent publication showing that vSrc-induced invadosomes in NIH-3T3 fibroblasts were highly sensitive to the expression of a dominant negative mutant of Rac1 and only moderately sensitive to the expression of a dominant negative mutant of Cdc42⁴⁵, we found that Cdc42

knock-down completely abolished podosome rosettes in this cell type. The dominant-negative form of Rho GTPases acts by sequestering the upstream Rho guanine exchange factors (GEFs), which can lead to nonspecific effects since the same GEF can activate several Rho GTPases⁴⁶. Due to this possible "sponge" effect of overexpressed RhoGTPase mutants, it is highly recommended to use knock-down approach to address GTPase requirement in cells. Thus, we can safely conclude that Cdc42 is both necessary and sufficient to promote the formation of invadopodia and podosomes. For the initiation of both kinds of structures, the best-described pathway regulated by Cdc42 is the activation of Arp2/3 complex-dependent actin polymerization. This leads to generation of a branched actin network via the activation of WASP/N-WASP proteins. Activation of this machinery will engage many additional components involved in regulating actin polymerization⁴⁷. However, invadosomes induced by active Cdc42 exhibit a lack of dynamics, as they appear abnormally stable (data not shown). This may probably be due to the incapacity of V12Cdc42 protein to cycle between an active and an inactive form. Indeed, wild-type Cdc42 is activated by GEFs. Cdc42-activating GEFs involved in invadosome formation include alpha-PIX/ArhGEF6, beta-PIX/ArhGEF7, Fgd1 and Vav1⁴⁸⁻⁵². However, as more than 70 Rho-GEFs are encoded in the human genome and as most are tissue specific, the identity of the Cdc42-GEF may differ according to the cell type. Also recently, other molecules such as palladin were shown to regulate Cdc42 activation²³. More generally, upstream stimuli known to induce podosome formation such as TGF β , phorbol ester, CNF1, NaF were all described to induce Cdc42 activation^{2-4, 7}. Altogether these observations lead to the fact that all pathways promoting invadosome formation converge to Cdc42 activation.

It has to be noted that many other RhoGTPases including, RhoA, Rac1, Rac2, RhoC, RhoE, RhoG and RhoU (for a review see refs.⁵³ and ⁵⁴; ⁵⁵⁻⁵⁸) were also involved in invadosome formation or function, and they can contribute to control invadosome organization and

dynamics; but their requirement is not as universal as Cdc42 one's is. Moreover, Cdc42 is the only RhoGTPase to act as an invadosome inducer.

Tks5 is a marker of all invadosomes

Tks5 encoded by the human *SH3PXD2A* gene, is a large scaffolding protein with an Nter phox homology (PX) domain and five SH3 domains. Tks5 is localized to invadosomes in normal and cancer cells. Tks5 was indeed found in podosomes of Src-transformed cells²⁹, macrophages⁴², osteoclasts⁵⁹, PDBu-treated A7r5 rat smooth muscle cells⁶⁰, myoblasts⁶¹, TGFβ-stimulated neural crest stem cells⁶², microvascular cells⁶³, in invadopodia of breast, melanoma and prostate cancer cell lines^{30, 64, 65} and in linear invadosomes found in endothelial cells, macrophages, fibroblasts and cancer cells¹¹. Thus, Tks5 appears as an universal marker of invadosomes and is particularly useful as it lacks specific localization in the absence of invadosomes²⁹. Indeed, Tks5 seems dedicated to invadosome formation and function.

As described above, Cdc42 activation in cells may lead to podosome/invadopodia formation. However, depending on the cellular background, the structures may not be functional. Indeed, in PAE cells, V12Cdc42-induced podosomes were devoid of proteolytic activity. Interestingly, we found that expression of Tks5 rescued the function of these invadosomes. This result suggests a key role of Tks5 in the proteolytic activity of invadosomes as previously described in macrophages and in prostate cancer cells^{42, 65}. We can not exclude a role of Tks5 in invadosome formation as demonstrated in in Src-transformed fibroblasts, in breast cancer cells and in bovine aortic endothelial cells^{11, 26, 30}. However, a threshold of Tks5 is necessary in PAE cells to localize MT1-MMP and functionalize invadosomes.

Given that Tks5 has no catalytic activity, its function at invadosomes should come from its interaction with other molecules. Indeed, as a scaffolding protein, Tks5 interacts with multiple proteins found in invadosomes including the SH3/SH2 adaptors, Grb2⁶⁶ and

Nck1/2⁶⁴, the nucleation-promoting factor, NWASP⁶⁶, and ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) family metalloproteases²⁹. Together, these data suggest that Tks5 is an essential scaffold protein of invadosomes.

Src is not always required for invadosome formation and function

Src is the founding member of a small family of structurally related non-receptor tyrosine kinases, called the Src family kinases (SFK) that includes Src, Yes Fyn and the hematopoietic restricted members Hck, Lyn and Fgr⁶⁷. Src, that plays a key role in regulating various signal transduction pathways, is described as a central hub of the invadosome network⁶⁸. Pioneer work by Marchisio and collaborators, demonstrated the ability of Rous-sarcoma virus encoding the v-Src oncogene to induce the formation of F-actin dots and rosettes at the ventral membrane in BHK cells²⁵. Cellular Src was required for mitogenesis initiated by multiple growth factor receptors⁶⁹, including the receptors for epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and colony stimulating factor-1 (CSF1), that were all described to promote invadosome formation. Moreover, many proteins of the invadosome core are Src-substrates, such as cortactin, p190RhoGAP, Tks4/5, Grb2, FAK and CIP4. Consequently, many models of invadosomes are Src inhibitor sensitive suggesting that Src kinase is necessary and sufficient for the induction of invadopodia and podosome formation. However, there is evidence that Src kinases are not required for all invadosome formation. Indeed, we described herein that V12Cdc42 and type-I collagen-induced invadosomes are resistant to Src-family kinase inhibitors such as PP2 and SU6656. These results are reminiscent of the fact that actin cores still formed in c-src-deficient osteoclasts⁷⁰. Interestingly, Mader et al.²⁶ also demonstrated that Src is not required for the actin core formation of invadopodia in breast cancer cells. Podosome-like structures formed in non-transformed fibroblasts plated on an Arg-Gly-Asp peptide-lipid surface were also found to be resistant to a high concentration of the PP2 inhibitor⁷¹. Another example comes from the *in*

vivo description of invadopodia-like protrusions in the zebrafish intestine epithelium²⁷. Indeed, matrix-degrading protrusions observed in invasive cancer cells of the zebrafish *meltdown* mutant, are not disrupted upon Src inhibition²⁷. Thus, Src kinases are clearly not always required for invadosome formation. On the other hand, in most of the models described above, Src activity was required for invadosome maturation and matrix degradation. This is also true for V12Cdc42-induced podosomes in NIH-3T3 fibroblasts, which appear to require Src kinase for their proteolysis activity. However, we described here for the first time Src kinase-independent invadosomes as formation and function of linear invadosomes are insensitive to Src kinase inhibitors. Altogether these data suggest that Src kinases, depending on the cellular context, are involved either in invadosome formation or only in later stages for matrix degradation, or not involved at all.

In conclusion, even if many components such as kinases, phosphatases, integrins, MMPs are required to regulate invadosome dynamics, supra-organization and function, we propose a minimal definition of invadosomes based on Cdc42 dependence and Tks5 presence. We thereby reconcile podosomes and invadopodia, structures that indeed share the same molecular basis. We invite you to challenge our findings: is there one model where Cdc42 and Tks5 are not involved?

MATERIAL AND METHODS

Cells and culture conditions – NIH-3T3 cells and their derivatives, Src-3T3 cells, which stably express a mutant form of chicken Src with an activating Y527F substitution, were generous gifts from Dr. Sara A. Courtneidge (Burnham Institute for Medical Research, LaJolla, CA)²⁹. HeLa cells were purchased from ATCC. Porcine aortic endothelial (PAE) cells (clone p23) and their derivatives PAE-V12Cdc42 cells expressing V12Cdc42 under the control of an isopropyl- β -d-thiogalactopyranoside (IPTG)-inducible promoter were described previously⁴. NIH-3T3, Src-3T3, and HeLa cells were maintained in DMEM Glutamax 4.5 g/L glucose medium (GIBCO) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; PAN-Biotech GmbH) and 100 U/mL penicillin–streptomycin (PS; GIBCO). PAE cells were cultured as published previously⁴. Expression of V12Cdc42 was achieved by using 0.1 mM IPTG. All cell lines were maintained at 37°C in 5% CO₂ humidified atmosphere.

Transfection - siRNAs were purchased from Eurofins MWG Operons. Cdc42-specific siRNA duplexes are directed against the target sequence 5'-AAGATAACTCACCCTGTCCA-3' for siRNA#1 and 5'-GAGATGACCCCTCTACTATTG-3' for siRNA#2. Human and mouse Tks5-specific siRNA duplexes are directed against the target sequence 5'-GCCAAAGCAAGGACGAGAT-3' and 5'-GAACGAAAGCGGCTGGTGG-3', respectively. The control siRNA is targeted against luciferase 5'-CGTACGCGGAATACTTCGA-3'. Cells were transfected in two rounds of transfection (one reverse and one forward transfection both 24 hrs spaced) with 50 nM siRNA using lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Experiments were performed 48hrs or 72hrs after transfection. For DNA transfection, 1×10^6 PAE-V12Cdc42, 0.6×10^6 HeLa, 7×10^5 NIH-3T3 and src-3T3 were seeded on 100-mm dish and transfected the following day with 5 μ g DNA using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Experiments were performed 24hrs after transfection. Tks5-GFP plasmid was kindly donated by Dr. Sara A.

Courtneidge (LaJolla, CA, USA). Cdc42-GFP and Cdc42-Myc plasmids were generous gifts from Dr. Philippe Fort (CRBM, Montpellier, France).

Reagents and antibodies - Puromycin, hygromycin B and IPTG were from Calbiochem. FCS was from PAN-Biotech GmbH, and culture medium and antibiotics were purchased from GIBCO. Fluorescent Gelatin was homemade using the following protocol: 10 µg/ml 5-(and-6)-Carboxy-X-Rhodamine, Succinimidyl Ester (5(6)-ROX, SE) mixed isomers (Molecular Probes®) was hybridized with 10 mg/ml gelatin solution (Sigma), 10 minutes at room temperature and finally used at 1 mg/ml on coverslip. Collagen type I from rat tail was purchased from BD Biosciences. Phalloidin-FluoProbes® and FluoProbes® secondary antibodies were purchased from Interchim and Hoescht from Sigma. Monoclonal anti-cortactin (4F11), anti-Cdc42 and anti-MT1-MMP antibodies were purchased from Millipore, BD transduction Laboratories and Chemicon, respectively. Monoclonal anti-GAPDH (D-6) and polyclonal anti-Tks5 (M300) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology. Src inhibitors PP2 and SU6656 were purchased from Abcam and Santa Cruz Biotechnology, respectively.

Immunofluorescence microscopy - For matrix degradation assay, glass coverslips were coated with fluorescent gelatin and crosslinked with glutaraldehyde 0.5% before cell seeding. 3.5×10^4 cells transfected 24h before with plasmid and/or stimulated 24hrs by IPTG were seeded on each coverslip. For type-I collagen stimulation, glass coverslips were coated as described previously¹¹. 24hrs after seeding, cells were fixed with 4% paraformaldehyde prepared in PBS for 10 min at room temperature and permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min. After 3 washes in PBS, the cells were incubated successively with blocking solution (1% bovine serum albumin, 2% FCS in Tris-buffered saline (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 2 mM MgCl₂ [pH 7.5])) for 10 min, with primary antibody diluted in blocking solution for 40 min, and then with fluorescently labeled secondary diluted in

blocking solution antibody for 30 min. Between each step, cells were washed 3 times with Tris-buffered saline. The coverslips were washed in water and mounted on microscope slides using Fluoromount-G mounting medium (FluoProbes® Interchim). Confocal images were captured on a Leica SP5 microscope using a 63X oil immersion objective at the Bordeaux Imaging Center. The images were processed with Adobe Photoshop 5.5. Quantitation of cells showing invadosomes was assessed in three independent experiments in which at least 200 cells were counted.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Sara A. Courtneidge (Burnham Institute for Medical Research, LaJolla, CA, USA) for Src-3T3 cell line and Tks5-GFP construct, Dr. Philippe Fort (CRBM, Montpellier, France) for Cdc42 encoding constructs and Dr. J. Saklatvala (London, UK) for the PAE cell lines. We thank the Bordeaux Imaging Center for help in fluorescence quantification and Dr. Jean Rosenbaum for critical comments on the manuscript. L. P. and J. D. M. are supported by predoctoral fellowships from the Région Aquitaine and from the Région Aquitaine/INSERM, respectively. C.G. is a recipient of a post-doc fellowship from La Ligue contre le Cancer, comité des Landes. F. S. is a recipient of grant ANR-13-JJC-JSV1-0005. This work was supported by grants from La Ligue contre le Cancer, comité des Pyrénées-Atlantiques (to F.S.), from Association pour la Recherche sur le Cancer (to F.S. and V.M.) and from La Ligue Nationale contre le Cancer « Equipe Labellisée 2011 » (to V.M.).

REFERENCES

1. Hoshino D, Branch KM, Weaver AM. Signaling inputs to invadopodia and podosomes. *Journal of cell science* 2013; 126:2979-89.
2. Tatin F, Varon C, Genot E, Moreau V. A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester. *Journal of cell science* 2006; 119:769-81.
3. Tatin F, Grise F, Reuzeau E, Genot E, Moreau V. Sodium fluoride induces podosome formation in endothelial cells. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 2010; 102:489-98.
4. Moreau V, Tatin F, Varon C, Genot E. Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Molecular and cellular biology* 2003; 23:6809-22.
5. Hai CM, Hahne P, Harrington EO, Gimona M. Conventional protein kinase C mediates phorbol-dibutyrate-induced cytoskeletal remodeling in a7r5 smooth muscle cells. *Exp Cell Res* 2002; 280:64-74.
6. Osiak AE, Zenner G, Linder S. Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Exp Cell Res* 2005; 307:342-53.
7. Varon C, Tatin F, Moreau V, Van Obberghen-Schilling E, Fernandez-Sauze S, Reuzeau E, Kramer I, Genot E. Transforming growth factor beta induces rosettes of podosomes in primary aortic endothelial cells. *Molecular and cellular biology* 2006; 26:3582-94.
8. Billottet C, Rottiers P, Tatin F, Varon C, Reuzeau E, Maitre JL, Saltel F, Moreau V, Genot E. Regulatory signals for endothelial podosome formation. *European journal of cell biology* 2008; 87:543-54.
9. Eckert MA, Lwin TM, Chang AT, Kim J, Danis E, Ohno-Machado L, Yang J. Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis. *Cancer cell* 2011; 19:372-86.
10. Pignatelli J, Tumbarello DA, Schmidt RP, Turner CE. Hic-5 promotes invadopodia formation and invasion during TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of cell biology* 2012; 197:421-37.
11. Juin A, Billottet C, Moreau V, Destaing O, Albiges-Rizo C, Rosenbaum J, Genot E, Saltel F. Physiological type I collagen organization induces the formation of a novel class of linear invadosomes. *Molecular biology of the cell* 2012; 23:297-309.
12. Yamaguchi H, Oikawa T. Membrane lipids in invadopodia and podosomes: key structures for cancer invasion and metastasis. *Oncotarget* 2010; 1:320-8.
13. Linder S, Nelson D, Weiss M, Aepfelbacher M. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96:9648-53.
14. Burns S, Thrasher AJ, Blundell MP, Machesky L, Jones GE. Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood* 2001; 98:1142-9.
15. Mizutani K, Miki H, He H, Maruta H, Takenawa T. Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer research* 2002; 62:669-74.
16. Lizarraga F, Poincloux R, Romao M, Montagnac G, Le Dez G, Bonne I, Rigail G, Raposo G, Chavrier P. Diaphanous-related formins are required for invadopodia formation and invasion of breast tumor cells. *Cancer research* 2009; 69:2792-800.
17. Gardberg M, Kaipio K, Lehtinen L, Mikkonen P, Heuser VD, Talvinen K, Iljin K, Kampf C, Uhlen M, Grenman R, Koivisto M, Carpen O. FHOD1, a Formin Upregulated in

Epithelial-Mesenchymal Transition, Participates in Cancer Cell Migration and Invasion. *PLoS one* 2013; 8:e74923.

18. Lagal V, Abrivard M, Gonzalez V, Perazzi A, Popli S, Verzeroli E, Tardieux I. Spire-1 a novel contributor of invadosome and associated invasive properties. *Journal of cell science* 2013.

19. Zhang D, Udagawa N, Nakamura I, Murakami H, Saito S, Yamasaki K, Shibasaki Y, Morii N, Narumiya S, Takahashi N, et al. The small GTP-binding protein, rho p21, is involved in bone resorption by regulating cytoskeletal organization in osteoclasts. *Journal of cell science* 1995; 108 (Pt 6):2285-92.

20. Saltel F, Destaing O, Bard F, Eichert D, Jurdic P. Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts. *Molecular biology of the cell* 2004; 15:5231-41.

21. Cougoule C, Carreno S, Castandet J, Labrousse A, Astarie-Dequeker C, Poincloux R, Le Cabec V, Maridonneau-Parini I. Activation of the lysosome-associated p61Hck isoform triggers the biogenesis of podosomes. *Traffic* 2005; 6:682-94.

22. Kuroiwa M, Oneyama C, Nada S, Okada M. The guanine nucleotide exchange factor Arhgef5 plays crucial roles in Src-induced podosome formation. *Journal of cell science* 2011; 124:1726-38.

23. Goicoechea SM, Garcia-Mata R, Staub J, Valdivia A, Sharek L, McCulloch CG, Hwang RF, Urrutia R, Yeh JJ, Kim HJ, Otey CA. Palladin promotes invasion of pancreatic cancer cells by enhancing invadopodia formation in cancer-associated fibroblasts. *Oncogene* 2013.

24. Wheeler AP, Smith SD, Ridley AJ. CSF-1 and PI 3-kinase regulate podosome distribution and assembly in macrophages. *Cell motility and the cytoskeleton* 2006; 63:132-40.

25. Tarone G, Cirillo D, Giancotti F, Comoglio P, Marchisio P. Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp Cell Res* 1985; 159:141-57.

26. Mader CC, Oser M, Magalhaes MA, Bravo-Cordero JJ, Condeelis J, Koleske AJ, Gil-Henn H. An EGFR-Src-Arg-cortactin pathway mediates functional maturation of invadopodia and breast cancer cell invasion. *Cancer research* 2011; 71:1730-41.

27. Seiler C, Davuluri G, Abrams J, Byfield FJ, Janmey PA, Pack M. Smooth muscle tension induces invasive remodeling of the zebrafish intestine. *PLoS biology* 2012; 10:e1001386.

28. Lock P, Abram CL, Gibson T, Courtneidge SA. A new method for isolating tyrosine kinase substrates used to identify fish, an SH3 and PX domain-containing protein, and Src substrate. *The EMBO journal* 1998; 17:4346-57.

29. Abram CL, Seals DF, Pass I, Salinsky D, Maurer L, Roth TM, Courtneidge SA. The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278:16844-51.

30. Seals DF, Azucena EF, Jr., Pass I, Tesfay L, Gordon R, Woodrow M, Resau JH, Courtneidge SA. The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer cell* 2005; 7:155-65.

31. Chabadel A, Banon-Rodriguez I, Cluet D, Rudkin BB, Wehrle-Haller B, Genot E, Jurdic P, Anton IM, Saltel F. CD44 and beta3 integrin organize two functionally distinct actin-based domains in osteoclasts. *Molecular biology of the cell* 2007; 18:4899-910.

32. Van Goethem E, Guiet R, Balor S, Charriere GM, Poincloux R, Labrousse A, Maridonneau-Parini I, Le Cabec V. Macrophage podosomes go 3D. *European journal of cell biology* 2011; 90:224-36.

33. Vikesaa J, Hansen TV, Jonson L, Borup R, Wewer UM, Christiansen J, Nielsen FC. RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation. *The EMBO journal* 2006; 25:1456-68.
34. Destaing O, Block MR, Planus E, Albiges-Rizo C. Invadosome regulation by adhesion signaling. *Current opinion in cell biology* 2011; 23:597-606.
35. Destaing O, Planus E, Bouvard D, Oddou C, Badowski C, Bossy V, Raducanu A, Fourcade B, Albiges-Rizo C, Block MR. beta1A integrin is a master regulator of invadosome organization and function. *Molecular biology of the cell* 2010; 21:4108-19.
36. Liu S, Yamashita H, Weidow B, Weaver AM, Quaranta V. Laminin-332-beta1 integrin interactions negatively regulate invadopodia. *Journal of cellular physiology* 2010; 223:134-42.
37. Branch KM, Hoshino D, Weaver AM. Adhesion rings surround invadopodia and promote maturation. *Biology open* 2012; 1:711-22.
38. Schmidt S, Nakchbandi I, Ruppert R, Kawelke N, Hess MW, Pfaller K, Jurdic P, Fassler R, Moser M. Kindlin-3-mediated signaling from multiple integrin classes is required for osteoclast-mediated bone resorption. *The Journal of cell biology* 2011; 192:883-97.
39. Attanasio F, Caldieri G, Giacchetti G, van Horssen R, Wieringa B, Buccione R. Novel invadopodia components revealed by differential proteomic analysis. *European journal of cell biology* 2011; 90:115-27.
40. Cervero P, Himmel M, Kruger M, Linder S. Proteomic analysis of podosome fractions from macrophages reveals similarities to spreading initiation centres. *European journal of cell biology* 2012; 91:908-22.
41. Dutartre H, Davoust J, Gorvel JP, Chavrier P. Cytokinesis arrest and redistribution of actin-cytoskeleton regulatory components in cells expressing the Rho GTPase CDC42Hs. *Journal of cell science* 1996; 109 (Pt 2):367-77.
42. Burger KL, Davis AL, Isom S, Mishra N, Seals DF. The podosome marker protein Tks5 regulates macrophage invasive behavior. *Cytoskeleton (Hoboken, NJ)* 2011; 68:694-711.
43. Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 1995; 81:53-62.
44. Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Molecular and cellular biology* 1995; 15:1942-52.
45. Oikawa T, Okamura H, Dietrich F, Senju Y, Takenawa T, Suetsugu S. IRSp53 mediates podosome formation via VASP in NIH-Src cells. *PloS one* 2013; 8:e60528.
46. Wang L, Zheng Y. Cell type-specific functions of Rho GTPases revealed by gene targeting in mice. *Trends in cell biology* 2007; 17:58-64.
47. Ridley AJ. Life at the leading edge. *Cell* 2011; 145:1012-22.
48. Ayala I, Giacchetti G, Caldieri G, Attanasio F, Mariggio S, Tete S, Polishchuk R, Castronovo V, Buccione R. Faciogenital dysplasia protein Fgd1 regulates invadopodia biogenesis and extracellular matrix degradation and is up-regulated in prostate and breast cancer. *Cancer research* 2009; 69:747-52.
49. Daubon T, Buccione R, Genot E. The Aarskog-Scott syndrome protein Fgd1 regulates podosome formation and extracellular matrix remodeling in transforming growth factor beta-stimulated aortic endothelial cells. *Molecular and cellular biology* 2011; 31:4430-41.
50. Gringel A, Walz D, Rosenberger G, Minden A, Kutsche K, Kopp P, Linder S. PAK4 and alphaPIX determine podosome size and number in macrophages through localized actin regulation. *Journal of cellular physiology* 2006; 209:568-79.
51. Razidlo GL, Schroeder B, Chen J, Billadeau DD, McNiven MA. Vav1 as a Central Regulator of Invadopodia Assembly. *Current biology : CB* in press.

52. Webb BA, Eves R, Crawley SW, Zhou S, Cote GP, Mak AS. PAK1 induces podosome formation in A7r5 vascular smooth muscle cells in a PAK-interacting exchange factor-dependent manner. *American journal of physiology Cell physiology* 2005; 289:C898-907.
53. van Helden SF, Hordijk PL. Podosome regulation by Rho GTPases in myeloid cells. *European journal of cell biology* 2011; 90:189-97.
54. Itzstein C, Coxon FP, Rogers MJ. The regulation of osteoclast function and bone resorption by small GTPases. *Small GTPases* 2011; 2:117-30.
55. Brazier H, Pawlak G, Vives V, Blangy A. The Rho GTPase Wrchl regulates osteoclast precursor adhesion and migration. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2009; 41:1391-401.
56. Bravo-Cordero JJ, Oser M, Chen X, Eddy R, Hodgson L, Condeelis J. A novel spatiotemporal RhoC activation pathway locally regulates cofilin activity at invadopodia. *Current biology : CB* 2011; 21:635-44.
57. Kwiatkowska A, Didier S, Fortin S, Chuang Y, White T, Berens ME, Rushing E, Eschbacher J, Tran NL, Chan A, Symons M. The small GTPase RhoG mediates glioblastoma cell invasion. *Molecular cancer* 2012; 11:65.
58. Georgess D, Mazzorana M, Terrado J, Delprat C, Chamot C, Guasch RM, Perez-Roger I, Jurdic P, Machuca-Gayet I. Comparative transcriptomics reveal RhoE as a novel regulator of actin dynamics in bone-resorbing osteoclasts. *Molecular biology of the cell* 2013 Nov 27. [Epub ahead of print].
59. Oikawa T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Uehara S, Udagawa N, Saya H, Matsuo K. Tks5-dependent formation of circumferential podosomes/invadopodia mediates cell-cell fusion. *The Journal of cell biology* 2012; 197:553-68.
60. Crimaldi L, Courtneidge SA, Gimona M. Tks5 recruits AFAP-110, p190RhoGAP, and cortactin for podosome formation. *Exp Cell Res* 2009; 315:2581-92.
61. Thompson O, Kleino I, Crimaldi L, Gimona M, Saksela K, Winder SJ. Dystroglycan, Tks5 and Src mediated assembly of podosomes in myoblasts. *PloS one* 2008; 3:e3638.
62. Murphy DA, Diaz B, Bromann PA, Tsai JH, Kawakami Y, Maurer J, Stewart RA, Izpisua-Belmonte JC, Courtneidge SA. A Src-Tks5 pathway is required for neural crest cell migration during embryonic development. *PloS one* 2011; 6:e22499.
63. Juin A, Planus E, Guillemot F, Horakova P, Albiges-Rizo C, Genot E, Rosenbaum J, Moreau V, Saltel F. Extracellular matrix rigidity controls podosome induction in microvascular endothelial cells. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 2013; 105:46-57.
64. Stylli SS, Stacey TT, Verhagen AM, Xu SS, Pass I, Courtneidge SA, Lock P. Nck adaptor proteins link Tks5 to invadopodia actin regulation and ECM degradation. *Journal of cell science* 2009; 122:2727-40.
65. Burger KL, Learman BS, Boucherle AK, Sirintrapun SJ, Isom S, Diaz B, Courtneidge SA, Seals DF. Src-dependent Tks5 phosphorylation regulates invadopodia-associated invasion in prostate cancer cells. *The Prostate* 2013.
66. Oikawa T, Itoh T, Takenawa T. Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. *The Journal of cell biology* 2008; 182:157-69.
67. Parsons SJ, Parsons JT. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 2004; 23:7906-9.
68. Hoshino D, Jourquin J, Emmons SW, Miller T, Goldgof M, Costello K, Tyson DR, Brown B, Lu Y, Prasad NK, Zhang B, Mills GB, Yarbrough WG, Quaranta V, Seiki M, Weaver AM. Network analysis of the focal adhesion to invadopodia transition identifies a PI3K-PKCalpha invasive signaling axis. *Science signaling* 2012; 5:ra66.

69. Belsches AP, Haskell MD, Parsons SJ. Role of c-Src tyrosine kinase in EGF-induced mitogenesis. *Front Biosci* 1997; 2:d501-18.
70. Destaing O, Sanjay A, Itzstein C, Horne WC, Toomre D, De Camilli P, Baron R. The tyrosine kinase activity of c-Src regulates actin dynamics and organization of podosomes in osteoclasts. *Molecular biology of the cell* 2008; 19:394-404.
71. Yu CH, Rafiq NB, Krishnasamy A, Hartman KL, Jones GE, Bershadsky AD, Sheetz MP. Integrin-Matrix Clusters Form Podosome-like Adhesions in the Absence of Traction Forces. *Cell reports* 2013.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Cdc42 is involved in invadosome formation. (A) Representative confocal microscopy images of invadosome rosettes in Src-3T3 cells. Control siRNA (CT) and Cdc42 targeting siRNA (siCdc42#2)-transfected cells were seeded on glass coverslips for 24 h, fixed and stained for F-actin (red) and cortactin (green). Scale bar: 10 μ m. (B) Protein extracts of Src-3T3 cells transfected with control siRNA and two siRNA targeting Cdc42 (Si#1 and Si#2) were analyzed by western blot using Cdc42 and GADPH (loading control) antibodies. (C) Diagram representing the percentage of cells exhibiting podosome rosettes. Cells depleted of Cdc42 were compared to control cells. Each bar represents the mean \pm S.D. of three independent experiments. *** $P < 0.001$ using the t test when compared with control.

Figure 2: V12Cdc42 is an invadosome inducer. (A) PAE stably expressing an IPTG-inducible V12Cdc42 construct were treated or not with IPTG, as described previously ⁴. Cells were stained for F-actin (red), cortactin (green) and nuclei (blue). Scale bars: 10 μ m. (B-C) Representative confocal microscopy images of HeLa and NIH-3T3 cells transfected or not with a GFP-V12Cdc42 expressing construct. Twenty-four hours after transfection, cells were plated on glass coverslips and stained for F-actin (red), cortactin (green), GFP-V12Cdc42 (grey) and nuclei (blue). Merged images correspond to superposition of F-actin, cortactin and nuclei stainings. Note that GFP-V12Cdc42 concentrates and co-localizes in formed podosomes (white arrows). Inserts show zoom of the white square. Scale bars: 10 μ m.

Figure 3: Matrix degradation activity of V12Cdc42-induced podosomes. (A) Representative confocal microscopy images of NIH-3T3 cells expressing GFP-V12Cdc42. Twenty-four hours after transfection, cells were plated on fluorescent (RITC) gelatin-coated glass coverslips and stained for F-actin (red), V12Cdc42-GFP (green) and nuclei (blue). Dark areas on gelatin-

RITC channel (grey) correspond to podosome-associated gelatin degradation. Scale bar: 10 μm . (B) Representative confocal microscopy images of PAE-V12Cdc42 cells treated with IPTG to induce podosome formation and seeded on fluorescent gelatin (grey). Cells were stained for F-actin (red), cortactin (green) and nuclei (blue). Note that in this cell type, V12Cdc42-induced podosomes are unable to degrade the gelatin. Scale bar: 10 μm . (C) Immunofluorescence analysis was performed to control Tks5 localization on V12Cdc42-induced podosomes in NIH-3T3 and PAE cells. Cells were stained for F-actin (red), Tks5 (Green). Scale bar: 5 μm .

Figure 4: Tks5 overexpression rescues degradation activity of V12Cdc42-induced podosomes in PAE cells. (A) Tks5-GFP was overexpressed in PAE-V12Cdc42 cells. Cells were seeded on fluorescent gelatin and stained for F-actin (red), Tks5-GFP (green), gelatin (grey) and nuclei (blue). Dark areas on gelatin show the degradative activity of podosomes in the Tks5 overexpression condition. Scale bar: 10 μm . (B-C) MT1-MMP staining was performed on PAE-V12Cdc42 transfected respectively with GFP or Tks5-GFP. Cells were stained for F-actin (red), GFP or Tks5-GFP (green), gelatin (grey) and MT1-MMP (grey). Tks5-GFP overexpression promotes a concentration of MT1-MMP on podosomes. Scale bar: 5 μm .

Figure 5: Src involvement in invadosome formation activity. (A-C) PAE-V12Cdc42 cells stimulated with IPTG (A), Src-3T3 cells (B) and NIH-3T3 cells expressing GFP-V12Cdc42 (C) that form invadosomes in the control condition (DMSO), were treated or not with Src inhibitors, SU6656 or PP2. Cells were plated on glass coverslips and treated with inhibitors at 5 μM for 1 hour. After fixation, cells were stained for F-actin (red), cortactin (green) and nuclei (blue). This analysis reveals that even in presence of Src inhibitors, V12Cdc42-induced podosomes are still present, whereas formation of Src-induced rosettes is strongly inhibited. Scale bars: 10 μm . (D) NIH-3T3 cells were seeded on type I collagen fibrils for 12 hours and

treated with inhibitors at 5 μ M for 1 hour. The same analysis shows that linear invadosomes are not sensitive to Src inhibitors. Scale bars: 10 μ m.

Figure 6: Src involvement in invadosome degradation activity. (A) Representative confocal microscopy images of NIH-3T3 cells and NIH-3T3 cells expressing GFP-V12Cdc42 seeded on gelatin-RITC and treated or not with Src inhibitors (SU6656 or PP2) for 24 hours. After fixation, cells were stained for F-actin (inserts). Black areas correspond to cell degradation activity. This analysis reveals that NIH-3T3 cells are unable to degrade gelatin at the contrary of NIH-3T3 cells expressing GFP-V12Cdc42. Src inhibitors treatment inhibits degradation activity of these cells. Scale bars: 30 μ m. (B) Representative confocal microscopy images of NIH-3T3 cells seeded on gelatin-RITC/type I collagen matrix. The cells were treated with the indicated Src inhibitors, and after fixation, stained for F-actin. Degradation activity of type I collagen-induced invadosomes is not affected upon Src kinase inhibition. Scale bars: 30 μ m.

TABLES

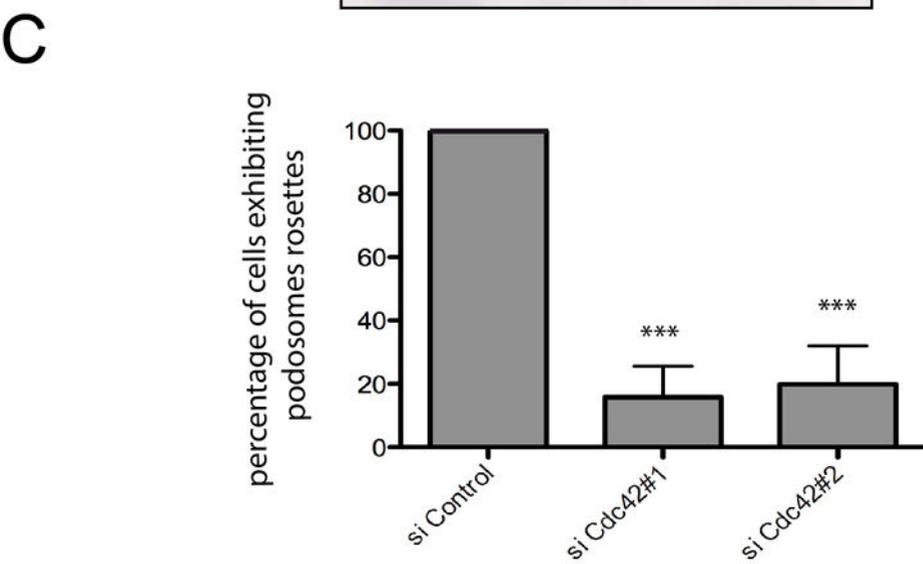
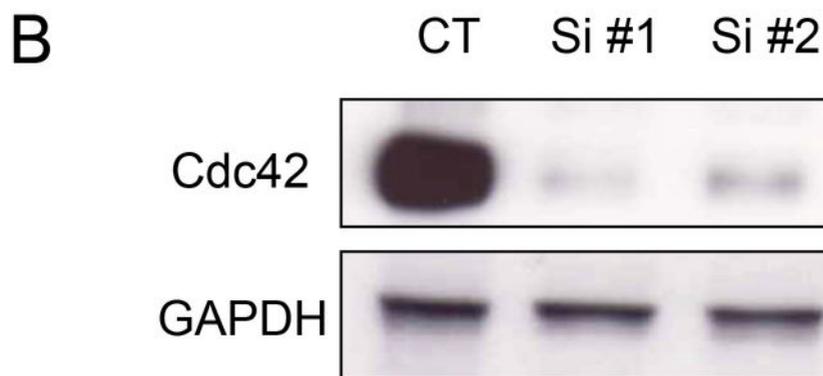
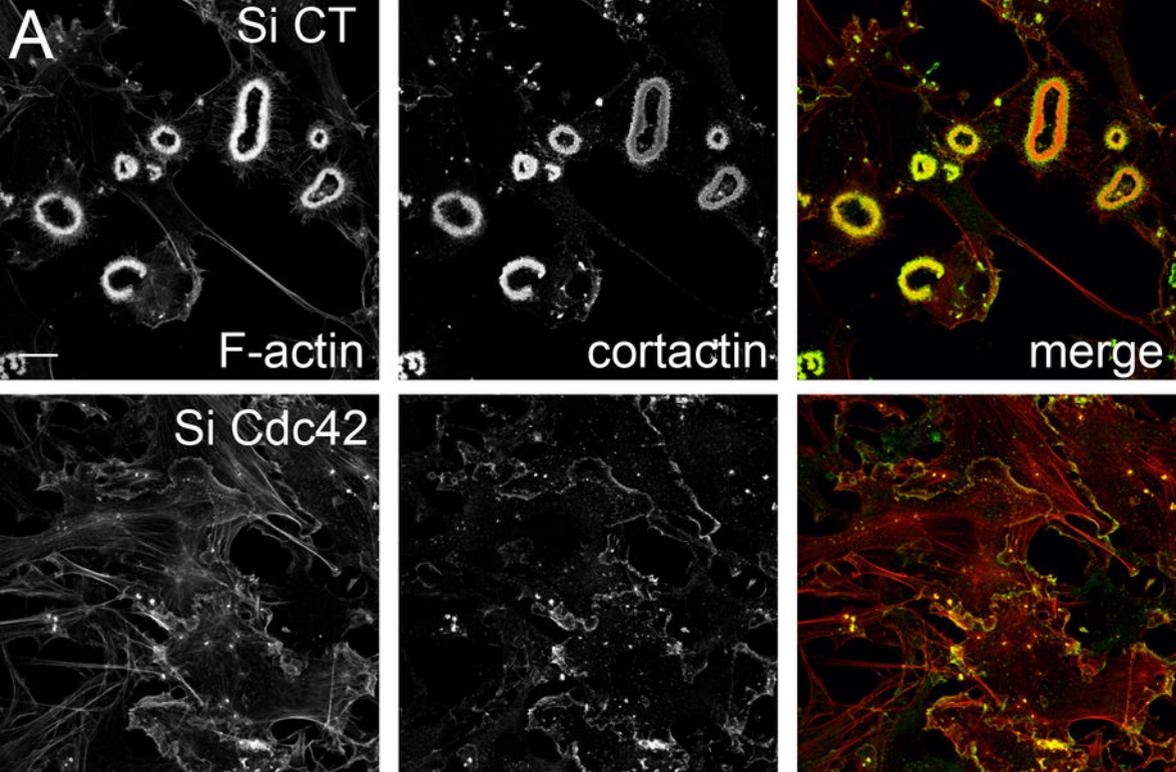
Table I: RhoGTPases (Cdc42, RhoA and Rac1) involvement in different models of invadosomes. nd, not determined; +, involved; -, not involved.

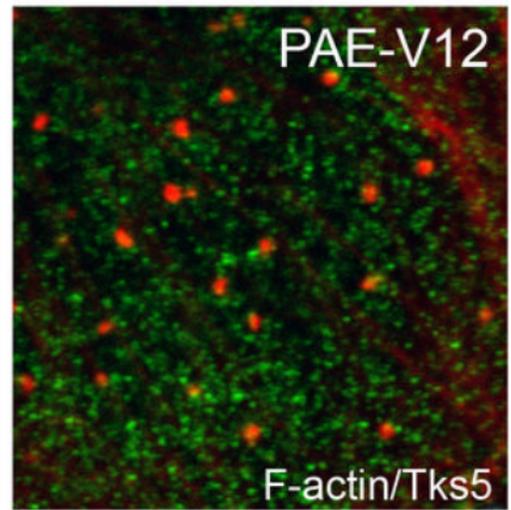
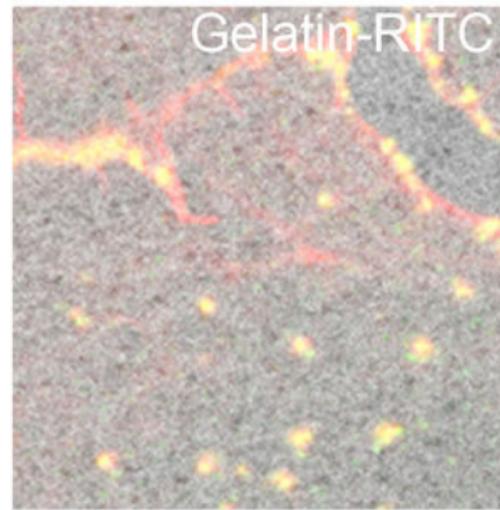
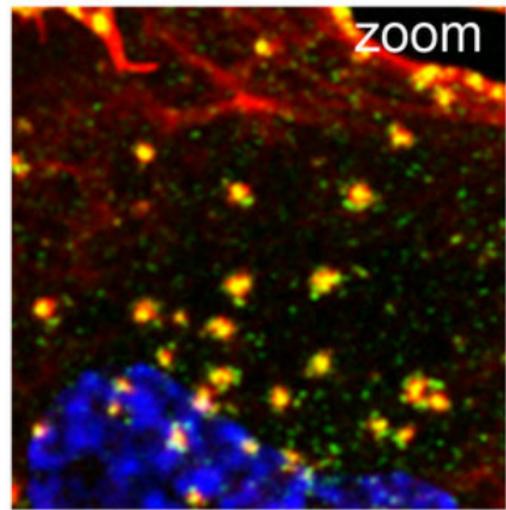
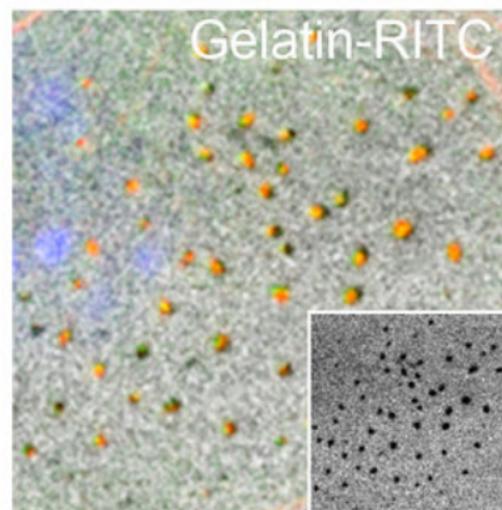
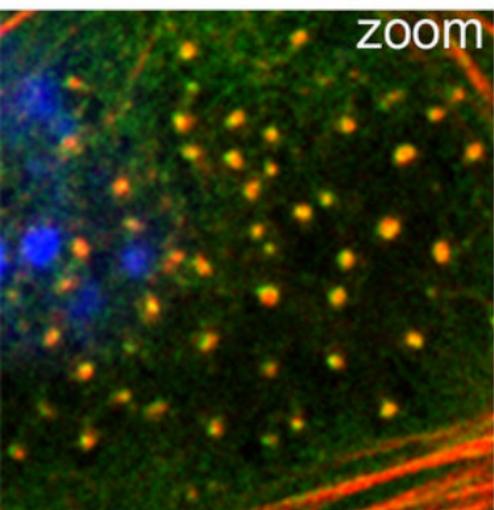
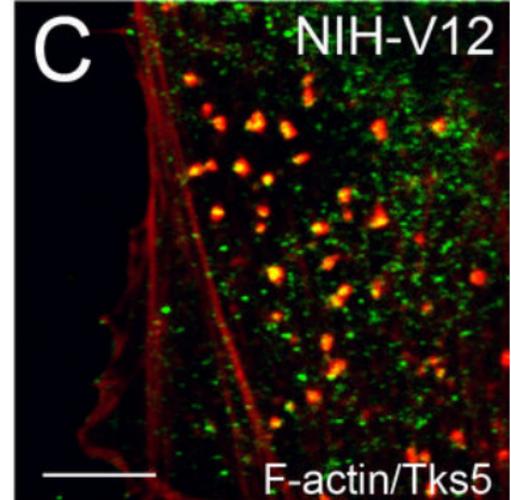
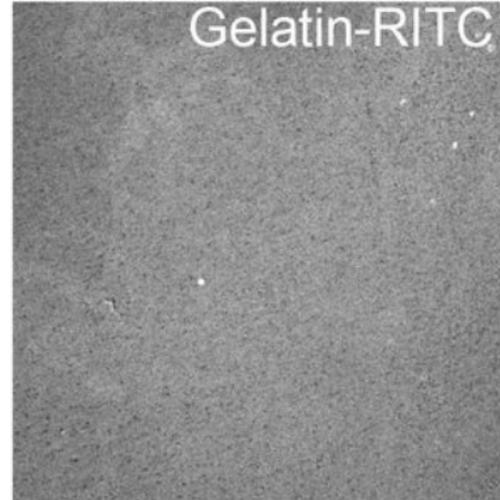
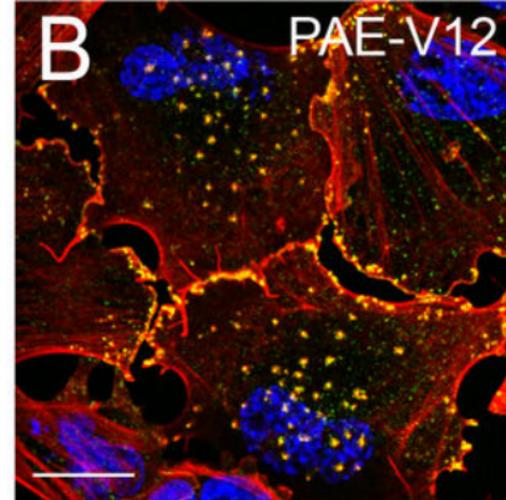
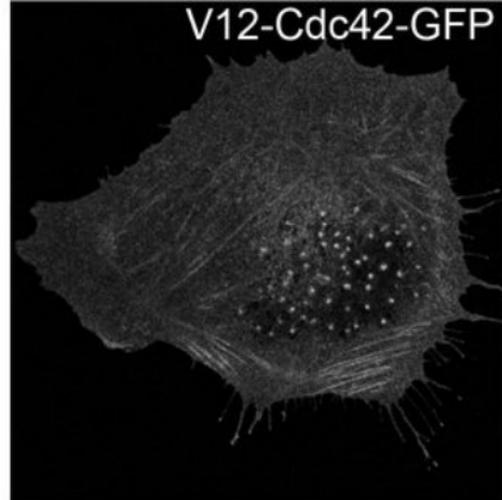
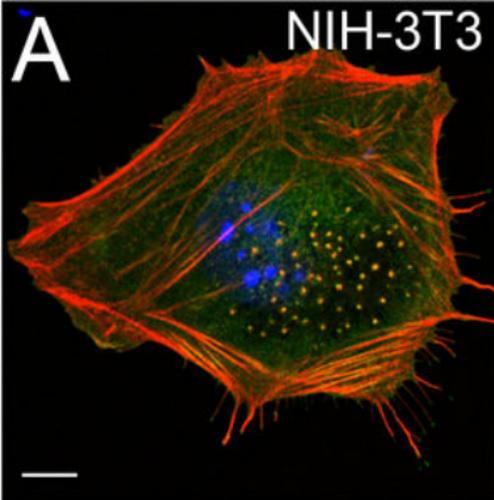
Cellular model	Cdc42	RhoA	Rac1	References
PODOSOMES				
macrophages	+	nd	nd	[1] [2] [3]
OC	+	-/+	+	[4] [5] [6] [7] [8] [9]
DC	+	-/+	+	[10] [11] [12] [13]
EC	+	-/+	-	[14] [15] [16] [17] [18]
SMC	+	nd	+	[19] [20]
fibroblasts	+	-	+	[21] [22] [23]
Src-transformed cells	+	-/+	-/+	[24] [22] [25] [26] [27] [28] [29]
INVADOPODIA				
MDA-MB-231	+	+	nd	[30] [31] [32]
A375MM	+	nd	nd	[33]
RPMI7951	+	-	+	[34]
MTIn3	+	+	nd	[35]
SNB19,U87	nd	nd	+	[36]

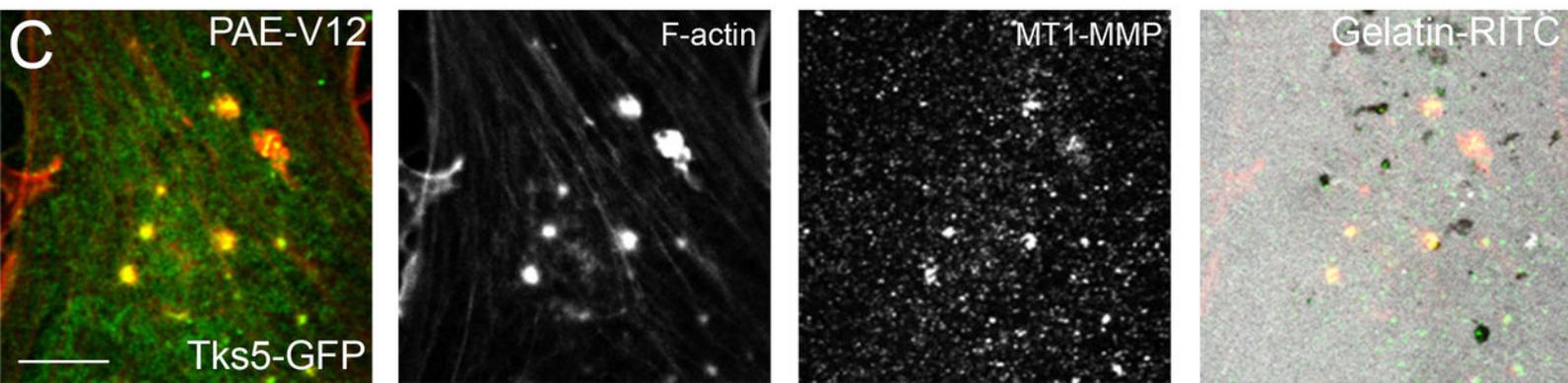
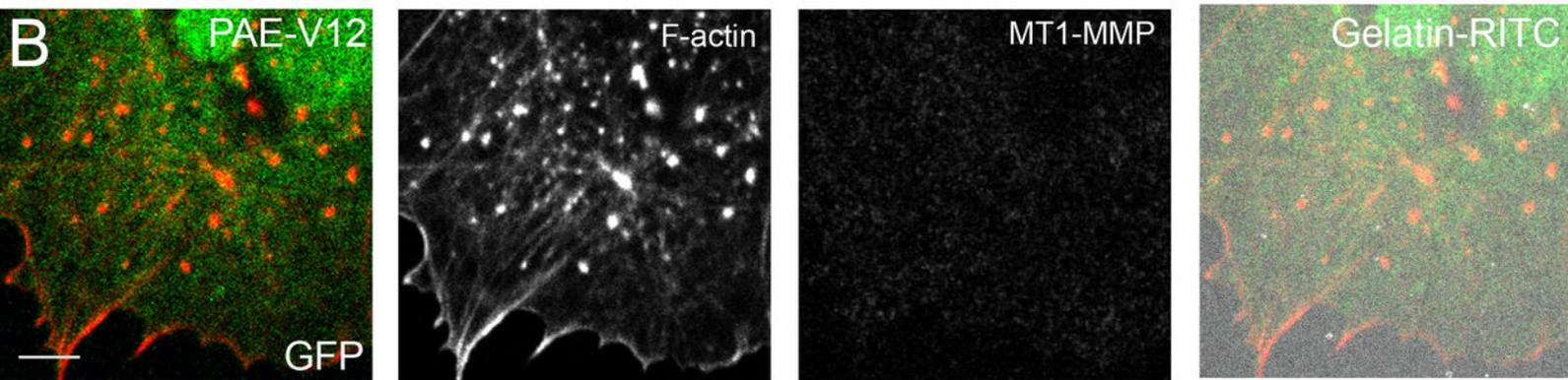
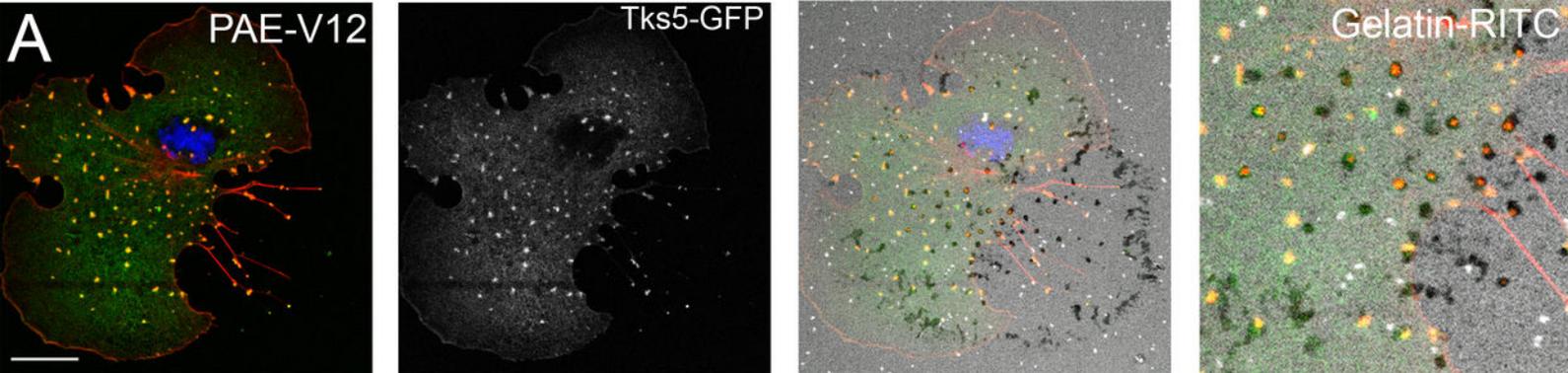
1. Linder, S., et al., *Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(17): p. 9648-53.
2. Linder, S., et al., *Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages*. J Cell Sci, 2000. **113 Pt 23**: p. 4165-76.
3. Dovas, A., et al., *Regulation of podosome dynamics by WASp phosphorylation: implication in matrix degradation and chemotaxis in macrophages*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 21): p. 3873-82.
4. Ory, S., et al., *Rho and Rac exert antagonistic functions on spreading of macrophage-derived multinucleated cells and are not required for actin fiber formation*. J Cell Sci, 2000. **113 (Pt 7)**: p. 1177-88.
5. Chellaiah, M.A., *Regulation of actin ring formation by rho GTPases in osteoclasts*. J Biol Chem, 2005. **280**(38): p. 32930-43.
6. Takegahara, N., et al., *Integral roles of a guanine nucleotide exchange factor, FARP2, in osteoclast podosome rearrangements*. FASEB J, 2010. **24**(12): p. 4782-92.
7. Saltel, F., et al., *Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(12): p. 5231-41.
8. Chellaiah, M.A., et al., *Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility, and bone resorption*. J Biol Chem, 2000. **275**(16): p. 11993-2002.
9. Zhang, D., et al., *The small GTP-binding protein, rho p21, is involved in bone resorption by regulating cytoskeletal organization in osteoclasts*. J Cell Sci, 1995. **108 (Pt 6)**: p. 2285-92.
10. West, M.A., et al., *Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation*. Curr Biol, 2000. **10**(14): p. 839-48.
11. Burns, S., et al., *Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation*. Blood, 2001. **98**(4): p. 1142-9.

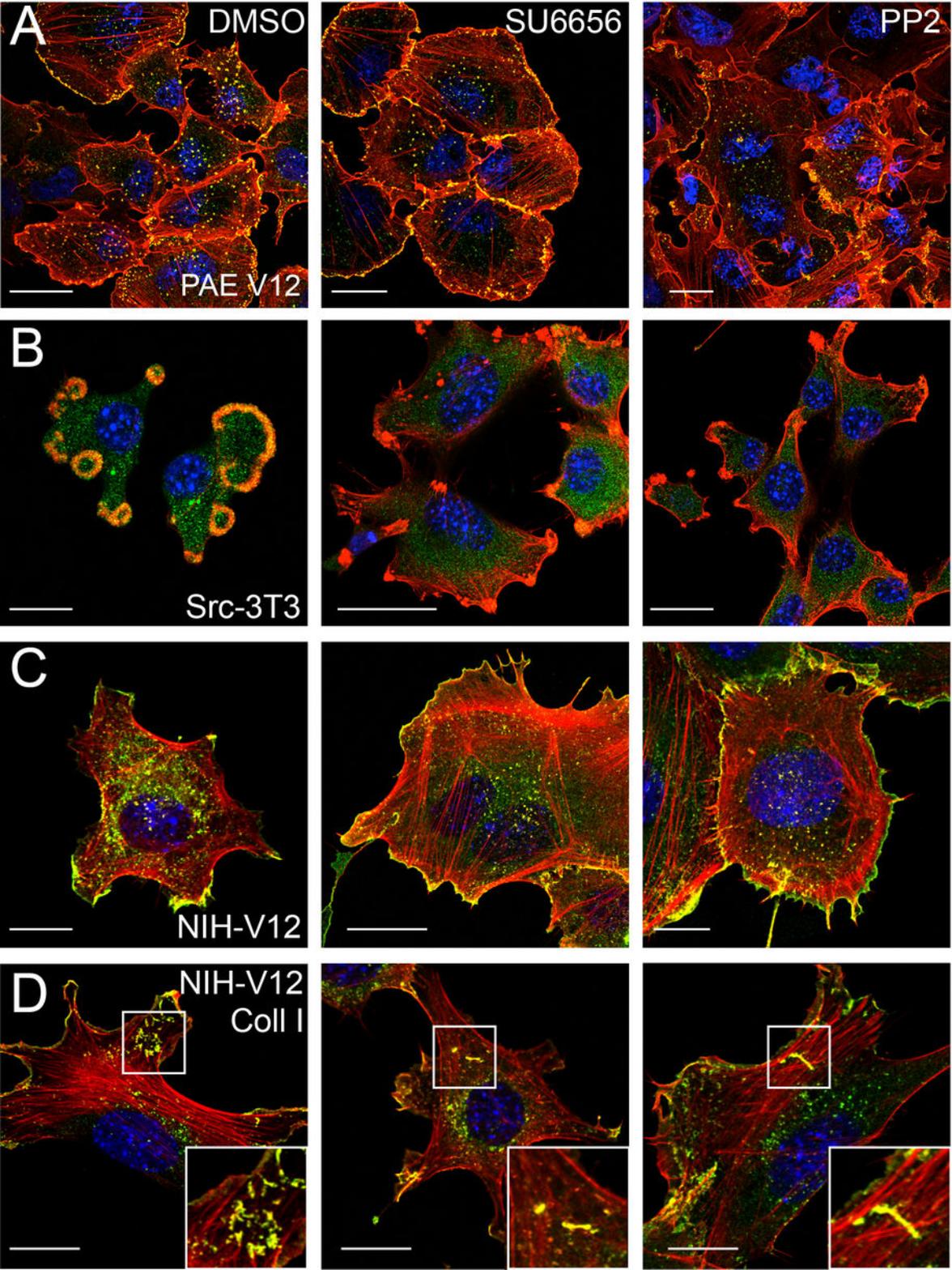
12. van Helden, S.F., et al., *PGE2-mediated podosome loss in dendritic cells is dependent on actomyosin contraction downstream of the RhoA-Rho-kinase axis*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 7): p. 1096-106.
13. Prasad, A., et al., *Slit2N/Robo1 inhibit HIV-gp120-induced migration and podosome formation in immature dendritic cells by sequestering LSP1 and WASp*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e48854.
14. Moreau, V., et al., *Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(19): p. 6809-22.
15. Tatin, F., et al., *A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 4): p. 769-81.
16. Varon, C., et al., *Transforming growth factor beta induces rosettes of podosomes in primary aortic endothelial cells*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(9): p. 3582-94.
17. Tatin, F., et al., *Sodium fluoride induces podosome formation in endothelial cells*. Biol Cell, 2010. **102**(9): p. 489-98.
18. Juin, A., et al., *Extracellular matrix rigidity controls podosome induction in microvascular endothelial cells*. Biol Cell, 2013. **105**(1): p. 46-57.
19. Webb, B.A., et al., *PAK1 induces podosome formation in A7r5 vascular smooth muscle cells in a PAK-interacting exchange factor-dependent manner*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(4): p. C898-907.
20. Furmaniak-Kazmierczak, E., et al., *Formation of extracellular matrix-digesting invadopodia by primary aortic smooth muscle cells*. Circ Res, 2007. **100**(9): p. 1328-36.
21. Cougoule, C., et al., *Activation of the lysosome-associated p61Hck isoform triggers the biogenesis of podosomes*. Traffic, 2005. **6**(8): p. 682-94.
22. Kuroiwa, M., et al., *The guanine nucleotide exchange factor Arhgef5 plays crucial roles in Src-induced podosome formation*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 10): p. 1726-38.
23. Goicoechea, S.M., et al., *Palladin promotes invasion of pancreatic cancer cells by enhancing invadopodia formation in cancer-associated fibroblasts*. Oncogene, 2013.
24. Gelman, I.H. and L. Gao, *SSECKS/Gravin/AKAP12 metastasis suppressor inhibits podosome formation via RhoA- and Cdc42-dependent pathways*. Mol Cancer Res, 2006. **4**(3): p. 151-8.
25. Schramp, M., et al., *ERK5 promotes Src-induced podosome formation by limiting Rho activation*. J Cell Biol, 2008. **181**(7): p. 1195-210.
26. Huveneers, S., et al., *Integrins uncouple Src-induced morphological and oncogenic transformation*. J Biol Chem, 2008. **283**(19): p. 13243-51.
27. Oikawa, T., et al., *IRSp53 mediates podosome formation via VASP in NIH-Src cells*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e60528.
28. Pan, Y.R., C.L. Chen, and H.C. Chen, *FAK is required for the assembly of podosome rosettes*. J Cell Biol, 2011. **195**(1): p. 113-29.
29. Berdeaux, R.L., et al., *Active Rho is localized to podosomes induced by oncogenic Src and is required for their assembly and function*. J Cell Biol, 2004. **166**(3): p. 317-23.
30. Sakurai-Yageta, M., et al., *The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is required for tumor cell invasion downstream of Cdc42 and RhoA*. J Cell Biol, 2008. **181**(6): p. 985-98.

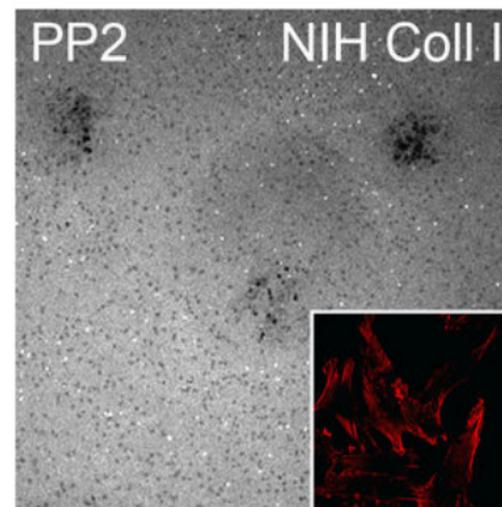
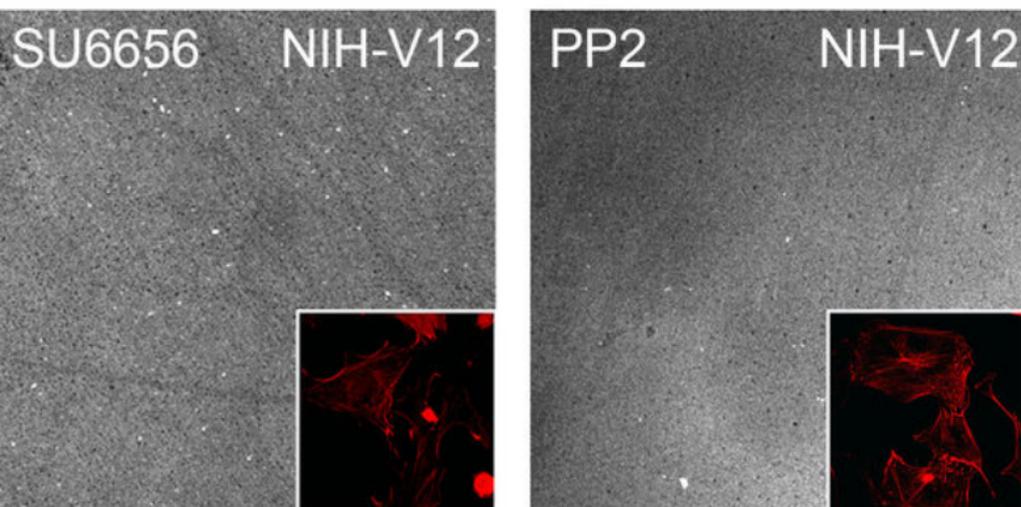
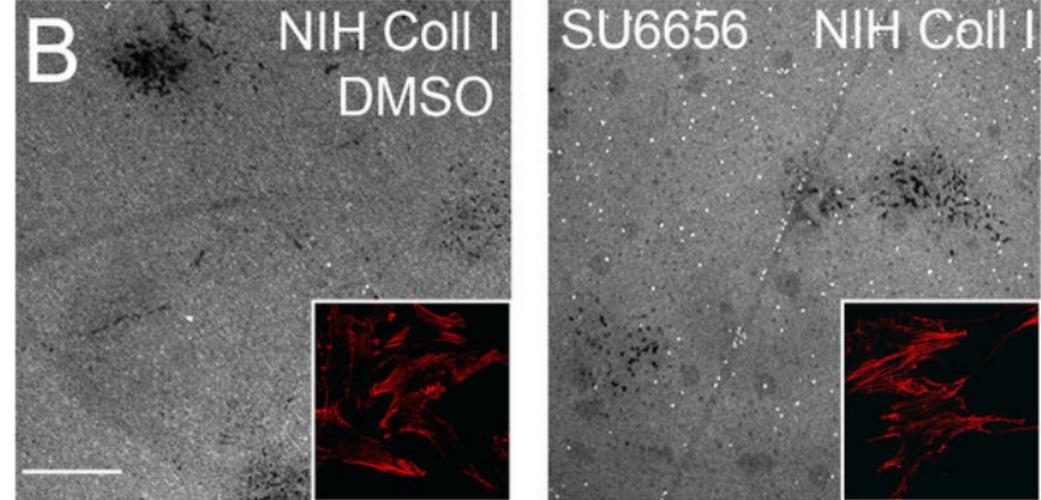
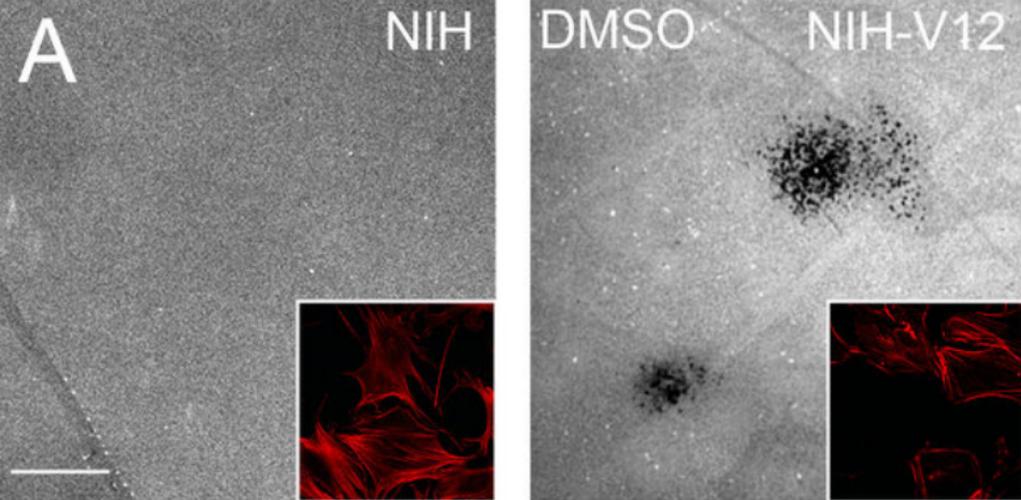
31. Pichot, C.S., et al., *Cdc42-interacting protein 4 promotes breast cancer cell invasion and formation of invadopodia through activation of N-WASp*. *Cancer Res*, 2010. **70**(21): p. 8347-56.
32. Liu, H., et al., *Effect of microRNA-206 on cytoskeleton remodelling by downregulating Cdc42 in MDA-MB-231 cells*. *Tumori*, 2010. **96**(5): p. 751-5.
33. Ayala, I., et al., *Faciogenital dysplasia protein Fgd1 regulates invadopodia biogenesis and extracellular matrix degradation and is up-regulated in prostate and breast cancer*. *Cancer Res*, 2009. **69**(3): p. 747-52.
34. Nakahara, H., et al., *Involvement of Cdc42 and Rac small G proteins in invadopodia formation of RPMI7951 cells*. *Genes Cells*, 2003. **8**(12): p. 1019-27.
35. Yamaguchi, H., et al., *Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin*. *J Cell Biol*, 2005. **168**(3): p. 441-52.
36. Chuang, Y.Y., et al., *Role of synaptojanin 2 in glioma cell migration and invasion*. *Cancer Res*, 2004. **64**(22): p. 8271-5.











2. Implication de la protéine Rnd3 dans la fonction des invadosomes

Il a récemment été décrit dans la littérature que la protéine Rnd3 est indispensable à l'activité de dégradation osseuse des podosomes présents dans les ostéoclastes (Georgess et al., 2014). Le rôle de cette protéine n'a pas été mis en évidence dans la fonction des invadopodes. Etant donné l'association de la dérégulation du niveau d'expression de Rnd3 dans les cancers avec un mauvais pronostic et une augmentation de l'invasion tumorale (publication n°1 en annexe), nous avons décidé d'étudier le rôle de cette protéine dans les invadopodes.

Pour cette expérience, la lignée cellulaire MDA-MB-231 d'adénocarcinome mammaire a été choisie car elle constitue un modèle couramment utilisé pour l'étude des invadopodes. Les cellules MDA-MB-231 sont transfectées avec des siARNs ciblant Rnd3 (S1 ou S3) ou un siARN contrôle (Ctrl). Elles sont ensuite ensemencées sur des lamelles de verre préalablement traitées avec de la gélatine FITC (OREGON Green® 488, Molecular Probes® ; 1 mg/mL) pour visualiser les invadopodes et leur capacité de dégradation. Les cellules transfectées restantes sont ensemencées dans une plaque 6 puits pour extraire les protéines et vérifier l'extinction de la protéine Rnd3. La fixation des cellules et l'extraction protéique sont réalisées 24 heures après l'ensemencement. Le résultat du western blot montre une très forte extinction de l'expression de la protéine Rnd3 avec le siRnd3 S1 et une extinction plus faible avec le siRnd3 S3 (figure 66 ; 96% d'extinction avec le siRnd3 S1 et 57% d'extinction avec le siRnd3 S3). La qualité du marquage des invadopodes avec les anticorps ciblant Tks5 ou la cortactine n'a pas permis de visualiser correctement les invadopodes dans cette expérience. Cependant, la fonction de dégradation de ces structures est perturbée par l'extinction de l'expression de la protéine Rnd3. En effet, en l'absence de Rnd3, les cellules MDA-MB-231 ne sont plus capables de dégrader la gélatine (figure 67). Cet effet est d'ailleurs proportionnel à l'efficacité d'extinction protéique de chaque siRnd3 (figure 66).

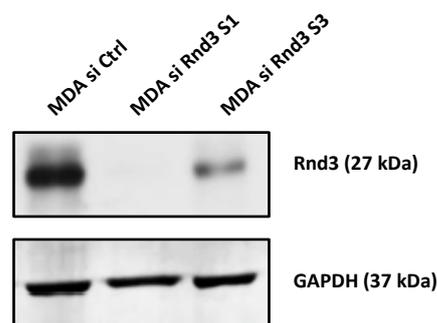


Figure 66: Les siARNs ciblant Rnd3 induisent une extinction de l'expression de la protéine dans les cellules MDA-MB-231

Les cellules MDA-MB-231 sont transfectées deux fois avec deux siARNs dirigés contre Rnd3 (S1 ou S3) ou un siARN contrôle (Ctrl). Les protéines sont extraites 72 heures après la deuxième transfection et analysées par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre Rnd3 et la GAPDH. Le niveau d'expression de Rnd3 est normalisé par rapport à celui de la GAPDH (n=1).

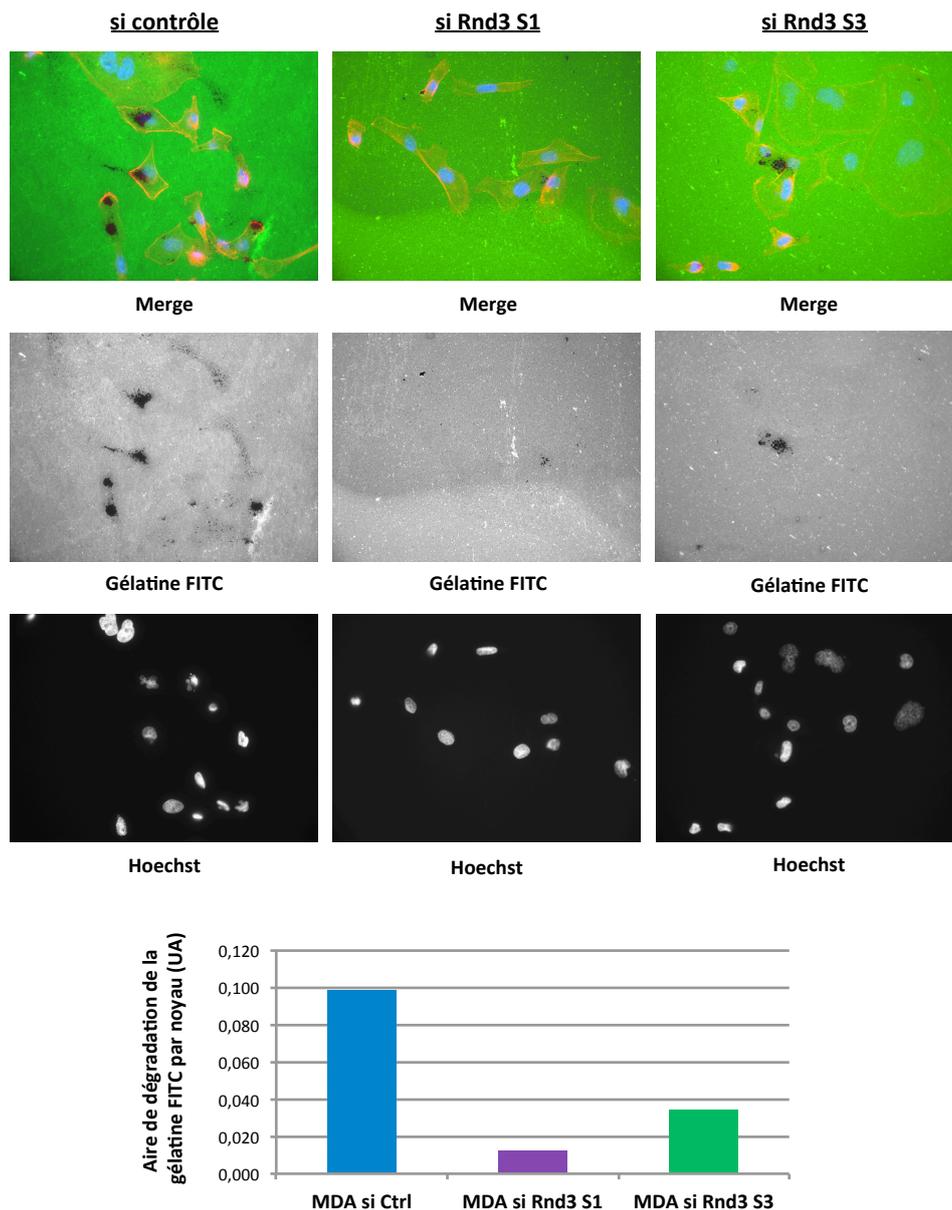


Figure 67: L’extinction de Rnd3 inhibe l’activité de dégradation de la gélatine des invadopodes présents dans les cellules MDA-MB-231.

Les cellules MDA-MB-231 sont transfectées deux fois avec deux siARNs dirigés contre Rnd3 (S1 ou S3) ou un siARN contrôle (Ctrl). 48 heures après la deuxième transfection, les cellules sont décollées et ensemencées sur des lamelles de verre préalablement coatées avec de la gélatine FITC (OREGON Green® 488, Molecular Probes®; 1 mg/mL). Les cellules sont fixées 24 heures après l’ensemencement avec du paraformaldéhyde 3%. Les immunomarquages sont réalisés en utilisant de la phalloïdine (Alexa Fluor® 568 Phalloidin, Molecular Probes®) (rouge) pour marquer l’actine, ainsi que du Hoechst (bleu) pour marquer les noyaux. Les images sont prises au microscope à épifluorescence Zeiss Axioplan 2 (objectif X40) et la dégradation est quantifiée sur 30 champs par condition en utilisant le logiciel ImageJ (n=1).

Ce premier résultat qui vient d’être confirmé au laboratoire dans la lignée de mélanome A375 est très prometteur quant au rôle de la protéine Rnd3 dans la fonction de dégradation des invadopodes. Toutefois, en l’absence de détection des invadopodes dans ces deux

lignées, nous ne pouvons pas savoir si l'extinction de Rnd3 inhibe la formation des invadopodes ou seulement leur activité. Pour répondre à cette question, cette expérience devra être refaite dans la lignée MDA-MB-231 ensemencée sur du collagène fibrillaire de type I pour induire la formation d'invadosomes linéaires plus facilement visibles en microscopie. Il serait également intéressant de voir si la protéine Rnd3, de par son implication dans l'invasion tumorale des CHCs, joue le même rôle dans ce contexte tumoral. La lignée Huh6 pourrait ainsi être utilisée car elle forme des invadopodes de manière constitutive. En raison de la sous-expression de Rnd3 dans les lignées de CHC, la protéine Rnd3 pourrait être surexprimée dans la lignée Huh6 pour étudier son impact sur le nombre d'invadopodes et leur fonction de dégradation. Après la confirmation du rôle de la protéine Rnd3 dans les invadopodes, les mécanismes moléculaires impliqués resteront à être identifiés.

CHAPITRE 4 - DISCUSSION

- Mise en place d'un modèle murin KORnd3^{Hep}

Le premier modèle murin KORnd3^{Hep} généré est le modèle KORnd3^{TTR} obtenu par croisement entre des souris Rnd3 floxées et des souris exprimant une Cre recombinase inducible par le tamoxifène et sous le contrôle du promoteur du gène *TTR*. Ce modèle n'a pas permis d'obtenir d'extinction protéique de Rnd3 détectable en western blot en raison d'une expression trop faible de la Cre recombinase dans le foie des souris KORnd3^{TTR}. Les souris TTR-iCre ont pourtant été utilisées avec succès pour générer d'autres modèles murins KO (Tannour-Louet et al., 2002 ; Benhamouche et al., 2006 ; Singh et al., 2014). Cependant, l'efficacité de recombinaison d'une Cre reste variable selon le gène cible (Schmidt-Suppran et al., 2007) ce qui pourrait expliquer le problème rencontré avec notre modèle murin KORnd3^{Hep}. Cette variabilité d'efficacité s'est également illustrée au sein du laboratoire avec l'absence totale d'excision du gène floxé de la reptine dans le modèle KOReptine^{TTR} mis en place parallèlement au nôtre.

Ce problème a été résolu par l'utilisation d'une autre Cre recombinase qui s'est avérée très efficace pour exciser l'exon 3 du gène *RND3* floxé *in vivo*. Il s'agit de la Cre recombinase fusionnée à la GFP et sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CMV qui est exprimée par des adénovirus (Ad-CMV-GFP-Cre). L'infection des souris Rnd3 floxées avec ces adénovirus conduit à l'obtention des souris KORnd3^{Ad} chez lesquelles l'extinction de Rnd3 est induite dans la majorité des hépatocytes. Cependant, en l'absence de promoteur hépato-spécifique dans ce modèle, l'extinction ubiquitaire de Rnd3 pourrait poser des problèmes dans le développement d'anomalies dans d'autres tissus que le foie ainsi que dans la survie à long terme des animaux. La mise en place du modèle KORnd3^{Alb} devrait permettre de résoudre ce problème tout en obtenant une extinction efficace de l'expression de Rnd3.

Les modèles murins KORnd3^{Hep} générés nous permettent d'étudier le rôle de Rnd3 dans la transformation tumorale des hépatocytes, ainsi que dans la croissance et l'invasion des hépatocytes tumoraux.

- Rôle de Rnd3 dans les hépatocytes tumoraux

Avant mon arrivée au laboratoire, le groupe du Dr. Moreau disposait déjà d'informations sur le rôle de Rnd3 dans la croissance et l'invasion des hépatocytes tumoraux. En effet, ils avaient montré que la sous-expression de Rnd3 provoque une diminution de la croissance et une augmentation de l'invasion des cellules tumorales de CHC *in vitro*. Ces résultats permettent de présenter Rnd3 comme un gène régulateur de la transition entre prolifération et invasion en accord avec la théorie du « GO or GROW ». Il existe d'autres gènes qui jouent un effet anti-prolifératif et pro-invasif dans les cancers, comme par

exemple *ARG* dans les cancers du sein (Gil-Henn et al., 2013) ou *TMEM16A* dans les carcinomes à cellules squameuses de la tête et du cou (Shiwarski et al., 2014).

Cet effet anti-prolifératif induit par la sous-expression de Rnd3 n'est pas favorable au développement tumoral. On peut donc se demander si la dérégulation de l'expression de Rnd3 n'est pas une étape tardive dans la carcinogenèse hépatique, une fois que la tumeur est bien établie et est prête à envahir d'autres tissus. Une des trois études décrivant la sous-expression de Rnd3 dans le CHC a montré que l'expression de Rnd3 est inversement corrélée au grade de la tumeur (Luo et al., 2012). L'étude menée au laboratoire n'a pas montré d'association de l'expression de Rnd3 avec le grade des CHCs, mais a par contre mis en évidence une extinction plus importante de l'expression de Rnd3 dans les CHCs présentant des nodules satellites qui correspondent à des métastases intra-hépatiques (Grise et al., 2012). Ces informations indiquent que la sous-expression de Rnd3 peut être accentuée dans les CHCs invasifs de haut grade, mais cette dérégulation est présente dès les premiers stades de développement tumoral. Cette altération n'apparaît pas avant le stade de CHC car elle n'est pas détectée au stade de la cirrhose (Grise et al., 2012). Une des hypothèses possibles expliquant la croissance tumorale en présence d'une sous-expression de Rnd3 est l'existence d'autres anomalies qui fournissent un avantage prolifératif suffisant pour contrebalancer le rôle de Rnd3. Il pourrait s'agir par exemple d'une surexpression des cyclines ou de l'activation d'oncogènes comme c-Myc. La cycline D1 est par exemple retrouvée surexprimée dans un peu plus de 10% des CHCs humains correspondant aux stades les plus avancés et les plus agressifs (Zhang et al., 1993 ; Nishida et al., 1994). L'amplification de l'oncogène c-Myc est détectée dans 35% environ des CHCs humains, principalement de haut grade, et est associé à un mauvais pronostic chez les patients (Peng et al., 1993 ; Abou-Ellella et al., 1996). L'association de ces altérations avec la sous-expression de Rnd3 permet d'induire de fortes capacités de prolifération et d'invasion dans les hépatocytes tumoraux, ce qui pourrait expliquer en partie leur présence dans les CHCs les plus agressifs. Une autre hypothèse possible pourrait être le niveau de sous-expression de Rnd3 avec l'existence d'un seuil qui pourrait moduler son impact sur la croissance tumorale. En effet, la faible sous-expression de Rnd3 n'entraînerait pas de variation de la croissance alors qu'une forte extinction de Rnd3, pouvant apparaître plus tardivement dans le processus de carcinogenèse hépatique, diminuerait la croissance des hépatocytes tumoraux pour permettre leur dissémination et la formation de métastases. Cette hypothèse concorde avec les données montrant une sous-expression de Rnd3 plus importante dans les tumeurs de haut grade présentant des nodules satellites.

L'un des mécanismes moléculaires impliqués dans la diminution de la croissance induite lors de l'extinction de Rnd3 dans les hépatocytes tumoraux des lignées Hep3B et Huh7 est la diminution de l'expression de la cycline D1. Ce mécanisme reste cependant spécifique de ces deux lignées de CHC car l'extinction de Rnd3 n'a pas du tout le même effet sur la croissance cellulaire d'autres lignées de CHCs. En effet, elle peut à l'inverse augmenter la prolifération

des cellules HepG2 (Xia et al., 2013), ou encore n'avoir aucun impact sur la prolifération des lignées SMMC-7721 et BEL-7402 (Ma et al., 2013). Comme décrit ci-dessus, le niveau d'expression de la cycline D1 est très hétérogène dans les tumeurs humaines de CHCs ce qui pourrait se retrouver dans les différentes lignées de CHCs et ainsi expliquer l'impact très différent de la sous-expression de Rnd3 sur leur croissance. Il a été montré que la cycline D1 n'est pas surexprimée dans la lignée Hep3B (Zhang et al., 1993). Il serait intéressant de vérifier si cette surexpression pourrait être présente dans les lignées SMMC-7721 et BEL-7402 ce qui expliquerait l'absence d'impact de l'extinction de Rnd3 sur la croissance de ces lignées qui possèdent un excès de cycline D1. En revanche, l'augmentation de la croissance des cellules HepG2 lors de l'extinction de Rnd3 reste très curieuse et pourrait s'expliquer par un mécanisme d'action de Rnd3 totalement différent dans cette lignée. Cette expérience reste tout de même à reproduire car le niveau d'expression de Rnd3 est excessivement faible dans la lignée HepG2 ce qui pose à la fois un problème technique dans l'extinction de cette protéine par siARN et dans la pertinence physiologique de cette extinction. La surexpression de Rnd3 dans la lignée HepG2 pourrait ainsi permettre de valider l'impact de Rnd3 sur la croissance de cette lignée en cas de réversion du phénotype observé lors de son extinction.

Le rôle de Rnd3 dans la transformation tumorale des hépatocytes est évalué à l'aide de deux processus de carcinogenèse hépatique différents qui correspondent à un développement tumoral spontané ou induit par l'injection d'un carcinogène chimique appelé le diéthylnitrosamine (DEN). Le protocole de carcinogenèse spontanée a été réalisé chez les souris KORnd3^{TTR} et n'est pas encore terminé. Les résultats nous montreront l'impact de l'extinction de Rnd3 seulement dans quelques hépatocytes sur la transformation tumorale du foie et le développement de CHC. Cette expérience sera répétée avec le modèle murin KORnd3^{Alb} qui devrait permettre d'obtenir une extinction de Rnd3 dans la majorité des hépatocytes. Le protocole de carcinogenèse induite avec une extinction précoce de l'expression de Rnd3 devra être réalisé chez les souris KORnd3^{Alb} en injectant le DEN à l'âge de 15 jours et en administrant le tamoxifène à l'âge de 8 semaines soit bien avant la survenue des CHCs. Cette expérience permettra d'apporter de nouvelles informations sur le rôle de Rnd3 dans la croissance des hépatocytes tumoraux induits par l'injection de DEN et les mécanismes moléculaires impliqués sans avoir de biais en raison de l'utilisation de lignées cellulaires de CHCs.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'augmentation de l'invasion induite lors de l'extinction de Rnd3 dans des lignées d'hépatocytes tumoraux semblent très différents selon la lignée étudiée. En effet, l'extinction de Rnd3 dans la lignée Hep3B induit la mise en place d'une transition épithélio-mésenchymateuse avec une perte de l'expression de la E-cadhérine, une expression de ZEB2 et l'activité de Rac et Cdc42 (Grise et al., 2012). A l'inverse, l'extinction de Rnd3 dans les lignées SMMC-7721 BEL-7402 nécessite l'activation de la voie RhoA/ROCK favorisant une migration individuelle de type amiboïde (Ma et al.,

2013). L'analyse des données d'invasion des tumeurs induites par l'injection de DEN chez les souris KORnd3^{Ad} pour lesquelles l'extinction de Rnd3 a été induite à l'âge de 9 mois après la formation des CHCs devrait permettre d'élucider le rôle de Rnd3 dans l'invasion tumorale *in vivo* sans utiliser de lignées cellulaires. Les premiers comptages du nombre de lésions tumorales macroscopiques sur le foie des animaux ne montre pas d'impact de l'extinction de Rnd3 sur le développement des tumeurs du foie induit par le DEN. Des analyses plus complètes, et notamment grâce à des marquages des foies et des poumons de ces animaux en immunohistochimie, seront nécessaires pour connaître l'impact de la sous-expression de Rnd3 sur l'invasion des CHCs induits par le DEN. Les mécanismes moléculaires seront ensuite étudiés afin d'identifier les cibles en aval de Rnd3 impliquées dans l'invasion des cellules tumorales *in vivo*.

Les expériences de carcinogénèse hépatique étant très longues (18 à 24 mois pour la carcinogénèse spontanée et 10 à 12 mois pour la carcinogénèse induite), il pourrait être intéressant de vérifier en parallèle le potentiel rôle de suppresseur de métastases de Rnd3 *in vivo* en utilisant une lignée cellulaire de CHC à fort potentiel métastatique (MHCC97) (Tian et al., 1999). Cette lignée pourrait être transduite avec des particules virales exprimant un shARN inducible dirigé contre Rnd3. Les cellules pourraient ensuite être injectées directement dans le foie de souris immunodéprimées pour évaluer l'impact de l'extinction de Rnd3 sur la croissance et l'invasion tumorales. Ces cellules pourraient aussi être injectées dans la veine de la queue de souris immunodéprimées pour étudier rapidement leur potentiel métastatique en comptant le nombre de foyers tumoraux dans les poumons. Les informations obtenues avec ce dernier modèle présenteront cependant des limites dans l'interprétation du rôle de Rnd3 dans le développement de métastases, principalement en raison de l'absence de tumeur primaire et du contournement des premières étapes du processus métastatique en injectant directement les cellules tumorales dans la circulation sanguine.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'invasion utilisés par les hépatocytes tumoraux, nous nous sommes également intéressés aux invadopodes qui sont des structures d'invasion capables de dégrader la matrice extracellulaire et qui nécessitent l'expression de GTPases de la famille Rho, et notamment de Cdc42 (Di Martino et al., 2014). La première expérience a été réalisée dans la lignée de cancer du sein MDA-MB-231 qui forme constitutivement des invadopodes. L'extinction de l'expression de Rnd3 dans la lignée MDA-MB-231 provoque une inhibition de la capacité de dégradation de la gélatine par les cellules. Cet effet a été retrouvé dans la lignée A375 de mélanome ce qui est en accord avec les données de la littérature. En effet, la sous-expression de Rnd3 diminue la dissémination et l'invasion de sphéroïdes formées à partir de lignées cellulaires de mélanome et incluses dans un gel de collagène (Klein et al., 2009). A partir de ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle la sous-expression de Rnd3 dans les hépatocytes tumoraux augmenterait la dégradation de la MEC afin de favoriser l'invasion tumorale. Cette hypothèse sera testée

dans la lignée Huh6 de CHC qui forme des invadopodes de manière constitutive, ainsi que d'autres lignées de CHCs capables de former des invadosomes linéaires sur une matrice de collagène fibrillaire de type I.

De plus, les premiers résultats obtenus au laboratoire semblent indiquer que la formation des invadopodes est maintenue en l'absence de Rnd3 ce qui suggère un rôle de Rnd3 au niveau de l'expression et/ou de la fonction des MMPs. De manière intéressante, plusieurs MMPs ont été décrites comme dérégulées dans le CHC comme MMP2, MMP9 ou MMP14 (Musso et al., 1997 ; Jia et al., 2011). Des expériences de zymographie pourront être réalisées dans les lignées de CHCs formant des invadopodes classiques ou linéaires pour identifier l'expression des formes précurseur (proMMP) et mature (MMP) de chaque cible en présence et en absence de Rnd3.

- Rôle de Rnd3 dans les hépatocytes normaux

Les modèles murins KORnd3^{Hep} nous ont aussi permis d'analyser le rôle de Rnd3 dans la prolifération des hépatocytes normaux.

La prolifération des hépatocytes normaux est étudiée au cours du processus de régénération hépatique induit après une chirurgie d'hépatectomie des deux tiers chez les souris. Nous avons pu montrer que l'expression de la protéine Rnd3 est induite dès 8 heures après la chirurgie et augmente jusqu'au temps 48 heures. De par son induction 8 heures après la chirurgie, Rnd3 pourrait appartenir à la réponse génique secondaire de la première étape de la régénération du foie caractérisée par une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Les composants essentiels de la réponse secondaire sont représentés par les gènes p53, mdm2, p21, les cyclines A/B1/D1/D3 et E ainsi que la kinase cycline-dépendante 1 (cdk1). L'expression de tous ces gènes est augmentée entre la 8^{ème} et la 24^{ème} heure après hépatectomie afin de permettre les premières synthèses d'ADN qui auront lieu à 24 heures. Les gènes activés dans cette réponse vont majoritairement activer l'entrée des hépatocytes dans le cycle cellulaire, mais ils peuvent aussi jouer un rôle d'inhibiteur pour empêcher une éventuelle dérégulation des activateurs du cycle cellulaire. L'appartenance de Rnd3 à la phase d'induction de la croissance des hépatocytes normaux correspondrait bien avec le mécanisme d'action de la protéine Rnd3 observé lors de la croissance des hépatocytes tumoraux des lignées Hep3B et Huh7, ainsi qu'avec la régulation de l'expression de Rnd3 au cours du cycle cellulaire. L'extinction de Rnd3 dans ces cellules induit en effet une diminution de l'expression de la cycline D1. De plus, l'expression de la protéine Rnd3 est elle-même régulée au cours du cycle cellulaire par Skp2 qui est la sous-unité de reconnaissance du substrat de l'ubiquitine ligase E3 (Lonjedo et al., 2013). Rnd3 s'accumule durant la phase G1 et est rapidement dégradée durant la transition G1/S pour permettre la poursuite du cycle cellulaire.

Les premiers résultats de régénération hépatique obtenus chez les animaux KORnd3^{TTR} et KORnd3^{Ad} après hépatectomie des deux tiers montrent un retard de croissance des hépatocytes normaux en l'absence de Rnd3. Ce résultat devra être confirmé sur un plus grand nombre d'animaux pour chaque point de la cinétique de régénération, ainsi que sur des hépatocytes primaires isolés de souris KORnd3^{Ad} afin de confirmer que l'effet provient bien des cellules et non pas d'une interférence avec l'environnement. La protéine Rnd3 semble ainsi jouer le même rôle dans la croissance des hépatocytes normaux et tumoraux ce qui pourrait suggérer l'implication de mécanismes moléculaires communs dans ces deux populations d'hépatocytes. La sous-expression de la cycline D1, induite par l'extinction de Rnd3 dans les hépatocytes tumoraux, pourrait également être impliquée dans la diminution du nombre d'hépatocytes normaux BrdU positifs chez les souris Rnd3KO^{Hep}. En effet, le BrdU est intégré pendant la phase S du cycle cellulaire, et la cycline D1 participe à la transition G1/S. L'analyse des acteurs moléculaires de la régénération hépatique, et notamment des différentes cyclines et des cdk qui leur sont associées, reste cependant à faire afin d'identifier le ou les mécanismes d'action de Rnd3 dans la prolifération des hépatocytes normaux.

La protéine Rnd3 joue un rôle totalement opposé dans la croissance d'autres types de cellules normales. En effet, l'extinction de Rnd3 conduit à une augmentation de la croissance des progéniteurs neuronaux, des fibroblastes de la capsule de Tenon, des cellules épendymaires ou encore des cellules progénitrices de la zone subventriculaire (Lin, 2013 ; Pacary et al., 2013 ; Ballester-Lurbe et al., 2014 ; Tong et al., 2014). De plus, l'impact de la perte de Rnd3 fait dans certains cas intervenir les mêmes cibles moléculaires qui semblent impliquées dans les hépatocytes. C'est le cas dans les progéniteurs neuronaux et les fibroblastes où l'extinction de Rnd3 augmente l'expression de la cycline D1 (Pacary et al., 2013 ; Tong et al., 2014). Le rôle de Rnd3 dans la croissance des hépatocytes normaux reste donc à confirmer, mais il pourrait s'avérer être dépendant du type cellulaire étudié.

La sous-expression de Rnd3 dans un foie normal pourrait ralentir la régénération du foie en réponse à des lésions ou des maladies hépatiques et perturber alors davantage la fonction hépatique. Nos données transcriptomiques ne montrent pas de variation significative de l'expression de Rnd3 dans le foie cirrhotique par rapport au foie normal (Grise et al., 2012). Le niveau d'expression de Rnd3 pourrait être évalué dans des maladies hépatiques telles que le déficit en alpha 1-antitrypsine ou encore l'hémochromatose. Dans ce cas, sa sous-expression serait un facteur aggravant de ces maladies et nécessiterait un traitement plus efficace et un suivi plus régulier des patients.

Les modèles murins KORnd3^{Hep} pourront également être utilisés pour étudier le rôle de Rnd3 dans l'organisation et la fonction des hépatocytes normaux. Pour cela, les souris KORnd3^{Alb} permettraient d'analyser l'impact de l'extinction de Rnd3 sur la sécrétion des enzymes hépatiques telles que les transaminases ALAT et ASAT, ainsi que l'organisation des

hépatocytes avec la mise en place d'une zonation et d'une polarité particulière dans ces cellules.

- Régulation de l'expression de Rnd3 dans les hépatocytes tumoraux

Trois études différentes ont confirmé que la GTPase Rnd3 est sous-exprimée dans le CHC, à la fois au niveau de l'ARNm et de la protéine (Grise et al., 2012 ; Luo et al., 2012 ; Ma et al., 2013). Il existe deux principales voies qui sont dérégulées dans une grande proportion des CHCs. La première voie est caractérisée par une instabilité chromosomique et la présence de mutations de p53. La deuxième voie est liée à une activation de la voie Wnt/ β -caténine, très souvent à cause d'une mutation activatrice de la β -caténine retrouvée dans 15 à 30% des CHCs (de La Coste et al., 1998). Il a été montré que Rnd3 est une cible transcriptionnelle de p53 qui augmente son expression en se fixant sur son promoteur (Ongusaha et al., 2006). Cependant, nous n'avons pas obtenu de corrélation entre la sous-expression de Rnd3 et les mutations de p53 dans nos échantillons humains de CHC. Nous avons par contre observé un niveau d'expression de l'ARNm de *RND3* plus faible dans les CHCs présentant une mutation sur le gène *CTNNB1* codant pour la β -caténine (figure 68) (donnée non publiée).

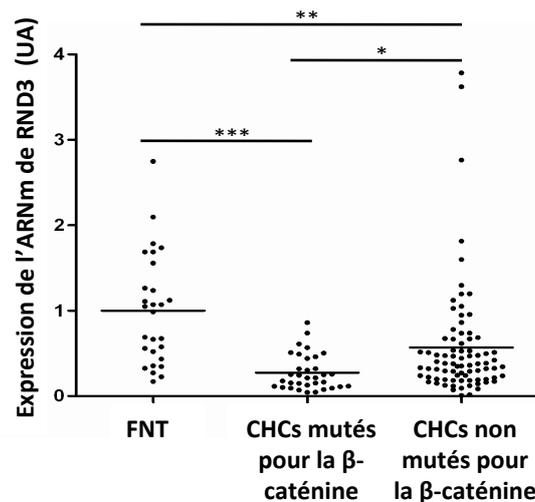


Figure 68: L'ARNm de *RND3* est plus fortement sous-exprimé dans les CHCs mutés sur le gène codant pour la β -caténine (donnée non publiée).

Le niveau d'expression de l'ARNm de *RND3* est mesuré par RT-PCR quantitative dans des échantillons de foie non tumoral (FNT) ainsi que sur des échantillons de CHCs mutés ou pas sur le gène *CTNNB1* codant pour la β -caténine. * $p=0.0126$, ** $p=0.0036$, *** $p<0.0001$

Ce résultat suggère que la sous-expression de Rnd3 dans les CHCs dépend en partie de la voie de signalisation de la β -caténine. Cependant, d'autres mécanismes sont impliqués dans la dérégulation de cette protéine. Nous avons décidé d'étudier la piste des micro-ARNs dont certains ont une expression dérégulée dans les CHCs et sont impliqués dans la carcinogenèse hépatique (Zhu et al., 2014). Ce choix a également été renforcé par l'augmentation de l'expression de Rnd3 lors de l'extinction de Drosha qui est une protéine impliquée dans la

formation des micro-ARNs. La prédiction de deux sites de fixation pour miR-200b et miR-200c dans la région 3' non traduite (3'UTR) de l'ARNm de RND3 (bases de données miRWalk et TargetScan ; Hurteau et al., 2006) et l'existence de la régulation de Rnd3 par miR-200b dans la lignée HeLa (Xia et al., 2010) nous ont notamment conduit à travailler sur ces deux micro-ARNs.

Les expériences de surexpression de miR-200b ou miR200c dans les lignées Huh7 et SNU398 de CHC n'ont pas montré de régulation de l'expression de Rnd3 par ces deux micro-ARNs. Comme discuté dans les résultats, des expériences complémentaires restent à réaliser pour pouvoir conclure que les micro-ARNs de la famille miR-200 ne régulent pas l'expression de Rnd3 dans le CHC.

- Lien entre les protéines Rnd3 et IQGAP2 dans les hépatocytes tumoraux

Afin de mieux comprendre le rôle de Rnd3 dans les hépatocytes tumoraux, nous avons recherché ses partenaires dans la lignée Hep3B surexprimant de façon stable la protéine Rnd3 étiquetée Myc. Les immunoprécipitations dirigées contre les protéines Rnd3 et IQGAP2 ont permis de mettre en évidence une possible interaction entre les deux partenaires qui devra ensuite être confirmée en utilisant la technique de FRET. Il serait intéressant par la suite d'identifier le domaine d'interaction d'IQGAP2 avec Rnd3 grâce à des expériences de pull-down. En effet, Rnd3 est une GTPase atypique qui ne partage pas forcément les mêmes sites de fixation que les RhoGTPases classiques et qui pourrait ainsi interagir avec IQGAP2 au niveau d'un autre domaine que le domaine GBD.

En ce qui concerne la recherche d'une fonction commune entre les protéines Rnd3 et IQGAP2, il a été montré que la protéine IQGAP2 interagit avec des composants des jonctions adhérentes au sein du complexe IQGAP1/ β -caténine/E-cadhérine dans les hépatocytes (Schmidt et al., 2008). Les images obtenues en microscopie montrent aussi une localisation des deux partenaires, IQGAP2 et Rnd3, au niveau des jonctions dans les lignées d'hépatocytes tumoraux. Cependant, Rnd3 ne semble pas interagir dans ce complexe car l'immunoprécipitation d'IQGAP1 ou de la β -caténine dans la lignée Hep3B Myc-Rnd3 ne permet pas de co-immunoprécipiter Rnd3 (donnée non montrée). De plus, l'extinction de Rnd3 ne perturbe pas la localisation d'IQGAP2 au niveau des jonctions intercellulaires. La protéine IQGAP2 se localise également au niveau des canalicules biliaires dans les hépatocytes tumoraux de la lignée HepG2. La surexpression de Rnd3 dans les cellules HepG2 ne perturbe pas la localisation d'IQGAP2 au niveau des canalicules biliaires, ni la formation de ces structures. De nouvelles expériences d'extinction de l'expression de Rnd3 ou d'IQGAP2 seront nécessaires pour identifier la fonction partagée par ces deux partenaires. L'étude des fonctions exercées par les autres membres de la famille IQGAP, et notamment par IQGAP1 qui est le plus étudié, pourrait aussi permettre d'identifier de nouvelles fonctions exercées par IQGAP2 et en lien avec Rnd3. Il serait notamment intéressant de

s'intéresser à l'interaction d'IQGAP1 avec les sous-unités Sec3, Sec8 et Exo70 du complexe de l'exocyste. Cette interaction dépend de l'activité de Cdc42 et RhoA et est nécessaire à la fonction de dégradation de la matrice des invadopodes en permettant l'accumulation de métalloprotéases matricielles comme MT1-MMP au niveau de ces structures (Sakurai-Yageta et al., 2008). L'implication d'IQGAP2 dans cette fonction pourrait constituer un lien avec la protéine Rnd3 qui est nécessaire à la fonction de dégradation des invadopodes. En effet, la technique de double hybride utilisée dans cet article a également identifié la protéine IQGAP2 comme un partenaire potentiel des sous-unités de l'exocyste. De plus, le domaine prédit pour l'interaction d'IQGAP1 avec Sec3, Sec8 et Exo 70 est relativement conservé dans la protéine IQGAP2 avec 57% d'homologie.

Par ailleurs, malgré la sous-expression de ces deux partenaires dans les tumeurs humaines de CHCs (White et al., 2010 ; Grise et al., 2012), le niveau d'expression de Rnd3 est corrélé négativement avec celui d'IQGAP2 dans nos échantillons de CHCs (figure 69). La sous-expression de Rnd3 et d'IQGAP2 semble ainsi être deux mécanismes indépendants et exclusifs l'un de l'autre dans le processus de carcinogenèse hépatique.

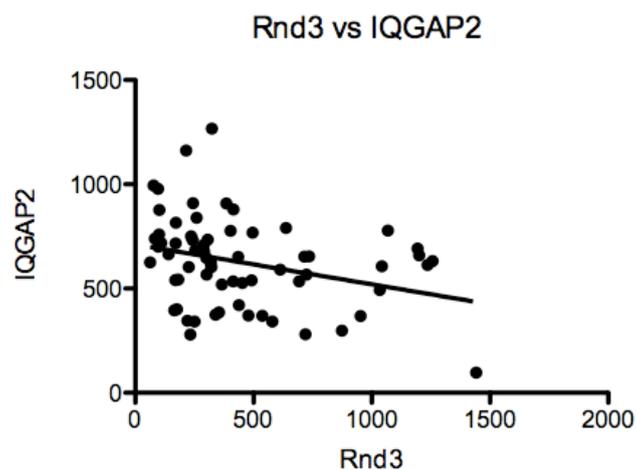


Figure 69: L'expression de l'ARNm de *RND3* est corrélé négativement avec celui d'*IQGAP2* dans les échantillons humains de CHCs (donnée non publiée).

** P = 0,0073 Corrélation de Spearman

Des expériences d'extinction et de surexpression de Rnd3 ont aussi été effectuées pour évaluer leur impact sur le niveau d'expression d'IQGAP2. Les résultats obtenus n'ont pas montré de variation de l'expression d'IQGAP2 (donnée non montrée), mais il serait intéressant de répéter cette expérience avec un autre membre de la famille appelé IQGAP3. En effet, cette protéine est enrichie au niveau des jonctions intercellulaires et est exprimée uniquement dans les hépatocytes en prolifération, à la fois pendant le développement embryonnaire et la régénération du foie (Nojima et al., 2008 ; Kunimoto et al., 2009). La protéine IQGAP3 induit la prolifération des hépatocytes en activant la voie de signalisation Ras/ERK. Le niveau d'expression d'IQGAP3 pourrait ainsi être analysé par western blot sur

les échantillons protéiques réalisés à partir du foie des souris KORnd3^{Ad} et contrôles après hépatectomie des deux tiers. Une diminution de l'expression d'IQGAP3 pourrait participer au retard de régénération hépatique observé chez les souris KORnd3^{Ad}.

CHAPITRE 5 - CONCLUSION

L'expression de la protéine Rnd3 est dérégulée dans de nombreux cancers ce qui modifie notamment les capacités prolifératives et invasives des cellules tumorales afin de favoriser le développement de métastases. Dans le carcinome hépatocellulaire, la sous-expression de la protéine Rnd3 induit, *in vitro*, une augmentation de l'invasion des hépatocytes tumoraux. Son rôle sur la prolifération cellulaire n'est pas clair et dépend de la lignée cellulaire de CHC utilisée.

Durant la première partie de ce travail de thèse, nous avons généré trois modèles murins afin d'obtenir un KO conditionnel et hépato-spécifique de Rnd3 (KORnd3^{Hep}). Le premier modèle murin KORnd3^{TR} permet d'éteindre l'expression de Rnd3 seulement dans quelques hépatocytes. Il a été principalement utilisé pour le protocole de carcinogenèse spontanée afin de mimer le développement physiologique d'un CHC. Le deuxième modèle murin KORnd3^{Ad} s'est révélé très efficace et induit l'extinction de Rnd3 dans la majorité des hépatocytes. Ce modèle a été utilisé d'une part pour le protocole de carcinogenèse hépatique induite par l'injection de diéthylnitrosamine. Les deux protocoles de carcinogenèse sont encore en cours d'expérimentation et d'analyse. Il a été utilisé d'autre part pour étudier la régénération hépatique induite après une hépatectomie des deux tiers. Les premiers résultats obtenus montrent un retard de croissance des hépatocytes normaux chez les animaux KORnd3^{Ad}. Ces résultats devront être confirmés sur un plus grand nombre d'animaux, ainsi qu'en parallèle sur les hépatocytes primaires isolés des souris KORnd3^{Ad}. Le troisième modèle murin KORnd3^{Alb}, qui est en cours de réalisation, devrait nous permettre d'obtenir une extinction efficace, inductible et spécifique de Rnd3 dans le foie, afin d'analyser le rôle de Rnd3 dans l'homéostasie hépatique.

Durant la deuxième partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux invadosomes, structures d'actine impliquées dans l'invasion cellulaire. Nous nous sommes attachés à établir une signature minimum des invadosomes, c'est à dire à définir les protéines communes aux différents modèles d'invadosomes. Ainsi nous avons montré que la GTPase Cdc42 et la protéine d'échafaudage Tks5 sont nécessaires à la formation et la fonction des invadosomes dans tous les types cellulaires présentant des invadosomes. De plus, nos résultats récents suggèrent l'implication de la protéine Rnd3 dans la fonction de dégradation des invadosomes. Ce résultat a été obtenu dans deux lignées différentes, une lignée de cancer du sein et une lignée de mélanome, et devra être reproduit dans des lignées de CHCs capables de former des invadosomes.

Ainsi, ce travail de thèse a permis de mettre en place de nouveaux modèles murins et d'apporter de nouvelles pistes sur le rôle de Rnd3 dans la physiopathologie hépatique et l'invasion cellulaire. Les souris Rnd3 floxées validées par nos modèles murins pourront

notamment être réutilisées pour éteindre l'expression de Rnd3 dans d'autres cellules ou tissus et ainsi étudier ses rôles en dehors du foie.

CHAPITRE 6 - REFERENCES

Abercrombie, M., G. A. Dunn, and J. P. Heath. "The Shape and Movement of Fibroblasts in Culture." *Society of General Physiologists Series* 32 (1977): 57–70.

Abou-Ellella, A., T. Gramlich, C. Fritsch, and T. Gansler. "C-Myc Amplification in Hepatocellular Carcinoma Predicts Unfavorable Prognosis." *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 9, no. 2 (February 1996): 95–98.

Abram, Clare L., Darren F. Seals, Ian Pass, Daniel Salinsky, Lisa Maurer, Therese M. Roth, and Sara A. Courtneidge. "The Adaptor Protein Fish Associates with Members of the ADAMs Family and Localizes to Podosomes of Src-Transformed Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 278, no. 19 (May 9, 2003): 16844–51.

Albrecht, J. H., and L. K. Hansen. "Cyclin D1 Promotes Mitogen-Independent Cell Cycle Progression in Hepatocytes." *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 10, no. 6 (June 1999): 397–404.

Alexander, Nelson R., Kevin M. Branch, Aron Parekh, Emily S. Clark, Izuchukwu C. Iwueke, Scott A. Guelcher, and Alissa M. Weaver. "Extracellular Matrix Rigidity Promotes Invadopodia Activity." *Current Biology: CB* 18, no. 17 (September 9, 2008): 1295–99.

Amit, Sharon, Ada Hatzubai, Yaara Birman, Jens S. Andersen, Etti Ben-Shushan, Matthias Mann, Yinon Ben-Neriah, and Irit Alkalay. "Axin-Mediated CKI Phosphorylation of Beta-Catenin at Ser 45: A Molecular Switch for the Wnt Pathway." *Genes & Development* 16, no. 9 (May 1, 2002): 1066–76.

Atzori, Luigi, Giuseppe Poli, and Andrea Perra. "Hepatic Stellate Cell: A Star Cell in the Liver." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, no. 8–9 (September 2009): 1639–42.

Avruch, J., D. Zhou, J. Fitamant, and N. Bardeesy. "Mst1/2 Signalling to Yap: Gatekeeper for Liver Size and Tumour Development." *British Journal of Cancer* 104, no. 1 (January 4, 2011): 24–32.

Azzarelli, Roberta, Emilie Pacary, Ritu Garg, Patricia Garcez, Debbie van den Berg, Philippe Riou, Anne J. Ridley, Roland H. Friedel, Maddy Parsons, and François Guillemot. "An Antagonistic Interaction between PlexinB2 and Rnd3 Controls RhoA Activity and Cortical Neuron Migration." *Nature Communications* 5 (2014): 3405.

Ballester-Lurbe, Begoña, Susana González-Granero, Enric Mocholí, Enric Poch, María García-Manzanares, Mara Dierssen, Ignacio Pérez-Roger, José M. García-Verdugo, Rosa M. Guasch, and José Terrado. "RhoE Deficiency Alters Postnatal Subventricular Zone Development and the Number of Calbindin-Expressing Neurons in the Olfactory Bulb of Mouse." *Brain Structure & Function*, July 10, 2014.

Bard-Chapeau, Emilie A., Shuangwei Li, Jin Ding, Sharon S. Zhang, Helen H. Zhu, Frederic Princen, Diane D. Fang, et al. "Ptpn11/Shp2 Acts as a Tumor Suppressor in Hepatocellular Carcinogenesis." *Cancer Cell* 19, no. 5 (May 17, 2011): 629–39.

Bektic, Jasmin, Oliver A. Wrulich, Gabriele Dobler, Kurt Kofler, Florian Ueberall, Zoran Culig, Georg Bartsch, and Helmut Klocker. "Identification of Genes Involved in Estrogenic Action in the Human Prostate Using Microarray Analysis." *Genomics* 83, no. 1 (January 2004): 34–44.

Bektic, Jasmin, Karina Pfeil, Andreas Paul Berger, Reinhold Ramoner, Alexandre Pelzer, Georg Schäfer, Kurt Kofler, Georg Bartsch, and Helmut Klocker. "Small G-Protein RhoE Is Underexpressed in Prostate Cancer and Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis." *The Prostate* 64, no. 4 (September 1, 2005): 332–40.

Benhamouche, Samira, Thomas Decaens, Cécile Godard, Régine Chambrey, David S. Rickman, Christophe Moinard, Mireille Vasseur-Cognet, et al. "Apc Tumor Suppressor Gene Is the 'Zonation-Keeper' of Mouse Liver." *Developmental Cell* 10, no. 6 (June 2006): 759–70.

Berdeaux, Rebecca L., Begoña Díaz, Lomi Kim, and G. Steven Martin. "Active Rho Is Localized to Podosomes Induced by Oncogenic Src and Is Required for Their Assembly and Function." *The Journal of Cell Biology* 166, no. 3 (August 2, 2004): 317–23.

Boige, V., P. Laurent-Puig, P. Fouchet, J. F. Fléjou, G. Monges, P. Bedossa, P. Bioulac-Sage, et al. "Concerted Nonsyntenic Allelic Losses in Hyperploid Hepatocellular Carcinoma as Determined by a High-Resolution Allelotype." *Cancer Research* 57, no. 10 (May 15, 1997): 1986–90.

Boswell, Sarah A., Pat P. Ongusaha, Paul Nghiem, and Sam W. Lee. "The Protective Role of a Small GTPase RhoE against UVB-Induced DNA Damage in Keratinocytes." *The Journal of Biological Chemistry* 282, no. 7 (February 16, 2007): 4850–58. doi:10.1074/jbc.M610532200.

Boureux, Anthony, Emmanuel Vignal, Sandrine Faure, and Philippe Fort. "Evolution of the Rho Family of Ras-like GTPases in Eukaryotes." *Molecular Biology and Evolution* 24, no. 1 (January 2007): 203–16.

- Bouwens, L., P. De Bleser, K. Vanderkerken, B. Geerts, and E. Wisse. "Liver Cell Heterogeneity: Functions of Non-Parenchymal Cells." *Enzyme* 46, no. 1–3 (1992): 155–68.
- Boyault, Sandrine, David S. Rickman, Aurélien de Reyniès, Charles Balabaud, Sandra Rebouissou, Emmanuelle Jeannot, Aurélie Hérault, et al. "Transcriptome Classification of HCC Is Related to Gene Alterations and to New Therapeutic Targets." *Hepatology* (Baltimore, Md.) 45, no. 1 (January 2007): 42–52.
- Braet, Filip, and Eddie Wisse. "Structural and Functional Aspects of Liver Sinusoidal Endothelial Cell Fenestrae: A Review." *Comparative Hepatology* 1, no. 1 (August 23, 2002): 1.
- Braeuning, Albert, Carina Ittrich, Christoph Köhle, Stephan Hailfinger, Michael Bonin, Albrecht Buchmann, and Michael Schwarz. "Differential Gene Expression in Periportal and Perivenous Mouse Hepatocytes." *The FEBS Journal* 273, no. 22 (November 2006): 5051–61.
- Braeuning, Albert, Carina Ittrich, Christoph Köhle, Albrecht Buchmann, and Michael Schwarz. "Zonal Gene Expression in Mouse Liver Resembles Expression Patterns of Ha-Ras and Beta-Catenin Mutated Hepatomas." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 35, no. 4 (April 2007): 503–7.
- Bravo-Cordero, Jose Javier, Matthew Oser, Xiaoming Chen, Robert Eddy, Louis Hodgson, and John Condeelis. "A Novel Spatiotemporal RhoC Activation Pathway Locally Regulates Cofilin Activity at Invadopodia." *Current Biology: CB* 21, no. 8 (April 26, 2011): 635–44.
- Bréchet, C., D. Gozuacik, Y. Murakami, and P. Paterlini-Bréchet. "Molecular Bases for the Development of Hepatitis B Virus (HBV)-Related Hepatocellular Carcinoma (HCC)." *Seminars in Cancer Biology* 10, no. 3 (June 2000): 211–31.
- Bressac, B., M. Kew, J. Wands, and M. Ozturk. "Selective G to T Mutations of p53 Gene in Hepatocellular Carcinoma from Southern Africa." *Nature* 350, no. 6317 (April 4, 1991): 429–31. doi:10.1038/350429a0.
- Brill, S., S. Li, C. W. Lyman, D. M. Church, J. J. Wasmuth, L. Weissbach, A. Bernards, and A. J. Snijders. "The Ras GTPase-Activating-Protein-Related Human Protein IQGAP2 Harbors a Potential Actin Binding Domain and Interacts with Calmodulin and Rho Family GTPases." *Molecular and Cellular Biology* 16, no. 9 (September 1996): 4869–78.
- Bruix, Jordi, Morris Sherman, and Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases. "Management of Hepatocellular Carcinoma." *Hepatology* (Baltimore, Md.) 42, no. 5 (November 2005): 1208–36.

Burns, S., A. J. Thrasher, M. P. Blundell, L. Machesky, and G. E. Jones. "Configuration of Human Dendritic Cell Cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS Protein, and Differentiation." *Blood* 98, no. 4 (August 15, 2001): 1142–49.

But, David-Yiu-Kuen, Ching-Lung Lai, and Man-Fung Yuen. "Natural History of Hepatitis-Related Hepatocellular Carcinoma." *World Journal of Gastroenterology: WJG* 14, no. 11 (March 21, 2008): 1652–56.

Calle, Yolanda, Siobhan Burns, Adrian J. Thrasher, and Gareth E. Jones. "The Leukocyte Podosome." *European Journal of Cell Biology* 85, no. 3–4 (April 2006): 151–57.

Calvisi, Diego F., Sara Ladu, Alexis Gorden, Miriam Farina, Ju-Seog Lee, Elizabeth A. Conner, Insa Schroeder, Valentina M. Factor, and Snorri S. Thorgeirsson. "Mechanistic and Prognostic Significance of Aberrant Methylation in the Molecular Pathogenesis of Human Hepatocellular Carcinoma." *The Journal of Clinical Investigation* 117, no. 9 (September 2007): 2713–22.

Cario-Toumaniantz, C., G. Reillaudoux, V. Sauzeau, F. Heutte, N. Vaillant, M. Finet, P. Chardin, G. Loirand, and P. Pacaud. "Modulation of RhoA-Rho Kinase-Mediated Ca²⁺ Sensitization of Rabbit Myometrium during Pregnancy - Role of Rnd3." *The Journal of Physiology* 552, no. Pt 2 (October 15, 2003): 403–13.

Chafey, Philippe, Laetitia Finzi, Raphael Boisgard, Michèle Caüzac, Guillem Clary, Cédric Broussard, Jean-Paul Pégrier, et al. "Proteomic Analysis of Beta-Catenin Activation in Mouse Liver by DIGE Analysis Identifies Glucose Metabolism as a New Target of the Wnt Pathway." *Proteomics* 9, no. 15 (August 2009): 3889–3900.

Chardin, Pierre. "Function and Regulation of Rnd Proteins." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7, no. 1 (January 2006): 54–62.

Chellaiah, M. A., N. Soga, S. Swanson, S. McAllister, U. Alvarez, D. Wang, S. F. Dowdy, and K. A. Hruska. "Rho-A Is Critical for Osteoclast Podosome Organization, Motility, and Bone Resorption." *The Journal of Biological Chemistry* 275, no. 16 (April 21, 2000): 11993–2.

Chen, P. J., A. Cywinski, and J. M. Taylor. "Reverse Transcription of 7S L RNA by an Avian Retrovirus." *Journal of Virology* 54, no. 2 (May 1985): 278–84.

Colby, W. W., J. S. Hayflick, S. G. Clark, and A. D. Levinson. "Biochemical Characterization of Polypeptides Encoded by Mutated Human Ha-ras1 Genes." *Molecular and Cellular Biology* 6, no. 2 (February 1986): 730–34.

Collin, Olivier, Sungsoo Na, Farhan Chowdhury, Michael Hong, Myung Eun Shin, Fei Wang, and Ning Wang. "Self-Organized Podosomes Are Dynamic Mechanosensors." *Current Biology: CB* 18, no. 17 (September 9, 2008): 1288–94.

Colnot, S., T. Decaens, M. Niwa-Kawakita, C. Godard, G. Hamard, A. Kahn, M. Giovannini, and C. Perret. "Liver-Targeted Disruption of Apc in Mice Activates Beta-Catenin Signaling and Leads to Hepatocellular Carcinomas." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, no. 49 (December 7, 2004): 17216–21.

Court, F. G., S. A. Wemyss-Holden, A. R. Dennison, and G. J. Maddern. "The Mystery of Liver Regeneration." *The British Journal of Surgery* 89, no. 9 (September 2002): 1089–95.

Danielian, P. S., R. White, S. A. Hoare, S. E. Fawell, and M. G. Parker. "Identification of Residues in the Estrogen Receptor That Confer Differential Sensitivity to Estrogen and Hydroxytamoxifen." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 7, no. 2 (February 1993): 232–40.

Davies, W. A., and T. P. Stossel. "Peripheral Hyaline Blebs (podosomes) of Macrophages." *The Journal of Cell Biology* 75, no. 3 (December 1977): 941–55.

De La Coste, A., B. Romagnolo, P. Billuart, C. A. Renard, M. A. Buendia, O. Soubrane, M. Fabre, et al. "Somatic Mutations of the Beta-Catenin Gene Are Frequent in Mouse and Human Hepatocellular Carcinomas." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, no. 15 (July 21, 1998): 8847–51.

Delaissé, J. M., M. T. Engsig, V. Everts, M. del Carmen Ovejero, M. Ferreras, L. Lund, T. H. Vu, et al. "Proteinases in Bone Resorption: Obvious and Less Obvious Roles." *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 291, no. 2 (February 15, 2000): 223–34.

Di Martino, Julie, Lisa Paysan, Caroline Gest, Valérie Lagrée, Amélie Juin, Frédéric Saltel, and Violaine Moreau. "Cdc42 and Tks5: A Minimal and Universal Molecular Signature for Functional Invadosomes." *Cell Adhesion & Migration* 8, no. 3 (June 2014): 280–92.

Diehl, A. M., and R. Rai. "Review: Regulation of Liver Regeneration by pro-Inflammatory Cytokines." *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 11, no. 5 (May 1996): 466–70.

Ding, Bi-Sen, Daniel J. Nolan, Jason M. Butler, Daylon James, Alexander O. Babazadeh, Zev Rosenwaks, Vivek Mittal, et al. "Inductive Angiocrine Signals from Sinusoidal Endothelium Are Required for Liver Regeneration." *Nature* 468, no. 7321 (November 11, 2010): 310–15.

Doye, Anne, Amel Mettouchi, Guillaume Bossis, René Clément, Caroline Buisson-Touati, Gilles Flatau, Laurent Gagnoux, Marc Piechaczyk, Patrice Boquet, and Emmanuel Lemichez. "CNF1 Exploits the Ubiquitin-Proteasome Machinery to Restrict Rho GTPase Activation for Bacterial Host Cell Invasion." *Cell* 111, no. 4 (November 15, 2002): 553–64.

Emadali, Anouk, Béatrice Muscatelli-Groux, Frédéric Delom, Sarah Jenna, Daniel Boismenu, David B. Sacks, Peter P. Metrakos, and Eric Chevet. "Proteomic Analysis of Ischemia-Reperfusion Injury upon Human Liver Transplantation Reveals the Protective Role of IQGAP1." *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 5, no. 7 (July 2006): 1300–1313.

Esrig, D., C. H. Spruck, P. W. Nichols, B. Chaiwun, K. Steven, S. Groshen, S. C. Chen, D. G. Skinner, P. A. Jones, and R. J. Cote. "p53 Nuclear Protein Accumulation Correlates with Mutations in the p53 Gene, Tumor Grade, and Stage in Bladder Cancer." *The American Journal of Pathology* 143, no. 5 (November 1993): 1389–97.

Etienne-Manneville, Sandrine, and Alan Hall. "Rho GTPases in Cell Biology." *Nature* 420, no. 6916 (December 12, 2002): 629–35.

Farazi, Paraskevi A., and Ronald A. DePinho. "Hepatocellular Carcinoma Pathogenesis: From Genes to Environment." *Nature Reviews. Cancer* 6, no. 9 (September 2006): 674–87.

Feig, L. A., and G. M. Cooper. "Relationship among Guanine Nucleotide Exchange, GTP Hydrolysis, and Transforming Potential of Mutated Ras Proteins." *Molecular and Cellular Biology* 8, no. 6 (June 1988): 2472–78.

Feil, R., J. Wagner, D. Metzger, and P. Chambon. "Regulation of Cre Recombinase Activity by Mutated Estrogen Receptor Ligand-Binding Domains." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 237, no. 3 (August 28, 1997): 752–57.

Ferlay, Jacques, Isabelle Soerjomataram, Rajesh Dikshit, Sultan Eser, Colin Mathers, Marise Rebelo, Donald Maxwell Parkin, David Forman, and Freddie Bray. "Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, September 13, 2014.

Fiegen, Dennis, Lars Blumenstein, Patricia Stege, Ingrid R. Vetter, and Mohammad Reza Ahmadian. "Crystal Structure of Rnd3/RhoE: Functional Implications." *FEBS Letters* 525, no. 1–3 (August 14, 2002): 100–104.

Fortier, M., F. Comunale, J. Kucharczak, A. Blangy, S. Charrasse, and C. Gauthier-Rouvière. "RhoE Controls Myoblast Alignment Prior Fusion through RhoA and ROCK." *Cell Death and Differentiation* 15, no. 8 (August 2008): 1221–31.

Foster, R., K. Q. Hu, Y. Lu, K. M. Nolan, J. Thissen, and J. Settleman. "Identification of a Novel Human Rho Protein with Unusual Properties: GTPase Deficiency and in Vivo Farnesylation." *Molecular and Cellular Biology* 16, no. 6 (June 1996): 2689–99.

Friedl, Peter, and Katarina Wolf. "Proteolytic and Non-Proteolytic Migration of Tumour Cells and Leucocytes." *Biochemical Society Symposium*, no. 70 (2003): 277–85.

Friedl, Peter, and Katarina Wolf. "Tumour-Cell Invasion and Migration: Diversity and Escape Mechanisms." *Nature Reviews. Cancer* 3, no. 5 (May 2003): 362–74.

Fujimoto, Akihiro, Yasushi Totoki, Tetsuo Abe, Keith A. Boroevich, Fumie Hosoda, Ha Hai Nguyen, Masayuki Aoki, et al. "Whole-Genome Sequencing of Liver Cancers Identifies Etiological Influences on Mutation Patterns and Recurrent Mutations in Chromatin Regulators." *Nature Genetics* 44, no. 7 (July 2012): 760–64.

Fukata, M., and K. Kaibuchi. "Rho-Family GTPases in Cadherin-Mediated Cell-Cell Adhesion." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2, no. 12 (December 2001): 887–97.

Garcia-Mata, Rafael, Etienne Boulter, and Keith Burridge. "The 'Invisible Hand': Regulation of RHO GTPases by RHOGDIs." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12, no. 8 (August 2011): 493–504.

Garcia-Tsao, G. "Current Management of the Complications of Cirrhosis and Portal Hypertension: Variceal Hemorrhage, Ascites, and Spontaneous Bacterial Peritonitis." *Gastroenterology* 120, no. 3 (February 2001): 726–48.

Gebhardt, Rolf, and Madlen Matz-Soja. "Liver Zonation: Novel Aspects of Its Regulation and Its Impact on Homeostasis." *World Journal of Gastroenterology: WJG* 20, no. 26 (July 14, 2014): 8491–8504.

Georgess, Dan, Marlène Mazzorana, José Terrado, Christine Delprat, Christophe Chamot, Rosa M. Guasch, Ignacio Pérez-Roger, Pierre Jurdic, and Irma Machuca-Gayet. "Comparative Transcriptomics Reveals RhoE as a Novel Regulator of Actin Dynamics in Bone-Resorbing Osteoclasts." *Molecular Biology of the Cell* 25, no. 3 (February 2014): 380–96.

Giannelli, Gianluigi, Emilia Fransvea, Felice Marinosci, Carlo Bergamini, Silvia Colucci, Oronzo Schiraldi, and Salvatore Antonaci. "Transforming Growth Factor-beta1 Triggers Hepatocellular Carcinoma Invasiveness via alpha3beta1 Integrin." *The American Journal of Pathology* 161, no. 1 (July 2002): 183–93.

Gil-Henn, H., A. Patsialou, Y. Wang, M. S. Warren, J. S. Condeelis, and A. J. Koleske. "Arg/Abl2 Promotes Invasion and Attenuates Proliferation of Breast Cancer in Vivo." *Oncogene* 32, no. 21 (May 23, 2013): 2622–30.

Glomset, J. A., and C. C. Farnsworth. "Role of Protein Modification Reactions in Programming Interactions between Ras-Related GTPases and Cell Membranes." *Annual Review of Cell Biology* 10 (1994): 181–205.

Goh, Lih Ling, and Ed Manser. "The RhoA GEF Syx Is a Target of Rnd3 and Regulated via a Raf1-like Ubiquitin-Related Domain." *PLoS One* 5, no. 8 (2010): e12409.

Goh, Lih Ling, and Ed Manser. "The GTPase-Deficient Rnd Proteins Are Stabilized by Their Effectors." *The Journal of Biological Chemistry* 287, no. 37 (September 7, 2012): 31311–20.

Gómez, Olga, Begoña Ballester-Lurbe, Rosa M. Guasch, Ignacio Pérez-Roger, Empar García-Roselló, and José Terrado. "Analysis of RhoE Expression in the Testis, Epididymis and Ductus Deferens, and the Effects of Its Deficiency in Mice." *Journal of Anatomy*, October 1, 2014.

Gove, C. D., and R. D. Hughes. "Liver Regeneration in Relationship to Acute Liver Failure." *Gut Suppl* (September 1991): S92–96.

Grise, Florence, Aurélien Bidaud, and Violaine Moreau. "Rho GTPases in Hepatocellular Carcinoma." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1795, no. 2 (April 2009): 137–51.

Grise, Florence, Sandra Sena, Aurélien Bidaud-Meynard, Jessica Baud, Jean-Baptiste Hiriart, Kassem Makki, Nathalie Dugot-Senant, et al. "Rnd3/RhoE Is down-Regulated in Hepatocellular Carcinoma and Controls Cellular Invasion." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 55, no. 6 (June 2012): 1766–75.

Guasch, R. M., P. Scambler, G. E. Jones, and A. J. Ridley. "RhoE Regulates Actin Cytoskeleton Organization and Cell Migration." *Molecular and Cellular Biology* 18, no. 8 (August 1998): 4761–71.

Guichard, Cécile, Giuliana Amaddeo, Sandrine Imbeaud, Yannick Ladeiro, Laura Pelletier, Ichrafe Ben Maad, Julien Calderaro, et al. "Integrated Analysis of Somatic Mutations and Focal Copy-Number Changes Identifies Key Genes and Pathways in Hepatocellular Carcinoma." *Nature Genetics* 44, no. 6 (June 2012): 694–98.

Guo, Xue-Jun, Chuan-Hui Cao, Jing-Yuan Sun, Dong-Yan Zhang, Li Liu, and De-Hua Wu. "[miR-128a is up-regulated in hepatocellular carcinoma and promotes tumor cell proliferation by

targeting RND3].” *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao = Journal of Southern Medical University* 34, no. 10 (October 2014): 1408–13.

Gupta, S. “Hepatic Polyploidy and Liver Growth Control.” *Seminars in Cancer Biology* 10, no. 3 (June 2000): 161–71.

Hailfinger, Stephan, Maike Jaworski, Albert Braeuning, Albrecht Buchmann, and Michael Schwarz. “Zonal Gene Expression in Murine Liver: Lessons from Tumors.” *Hepatology (Baltimore, Md.)* 43, no. 3 (March 2006): 407–14.

Hara, H., S. Uchida, H. Yoshimura, M. Aoki, Y. Toyoda, Y. Sakai, S. Morimoto, H. Fukamachi, K. Shiokawa, and K. Hanada. “Isolation and Characterization of a Novel Liver-Specific Gene, Hepassocin, Upregulated during Liver Regeneration.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1492, no. 1 (June 21, 2000): 31–44.

Hart, M. J., Y. Maru, D. Leonard, O. N. Witte, T. Evans, and R. A. Cerione. “A GDP Dissociation Inhibitor That Serves as a GTPase Inhibitor for the Ras-like Protein CDC42Hs.” *Science (New York, N.Y.)* 258, no. 5083 (October 30, 1992): 812–15.

Hautekeete, M. L., and A. Geerts. “The Hepatic Stellate (Ito) Cell: Its Role in Human Liver Disease.” *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 430, no. 3 (March 1997): 195–207.

Hidalgo-Carcedo, Cristina, Steven Hooper, Shahid I. Chaudhry, Peter Williamson, Kevin Harrington, Birgit Leitinger, and Erik Sahai. “Collective Cell Migration Requires Suppression of Actomyosin at Cell-Cell Contacts Mediated by DDR1 and the Cell Polarity Regulators Par3 and Par6.” *Nature Cell Biology* 13, no. 1 (January 2011): 49–58.

Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver – Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol.* 1931;12:186-202.

Hoshida, Yujin, Sebastian M. B. Nijman, Masahiro Kobayashi, Jennifer A. Chan, Jean-Philippe Brunet, Derek Y. Chiang, Augusto Villanueva, et al. “Integrative Transcriptome Analysis Reveals Common Molecular Subclasses of Human Hepatocellular Carcinoma.” *Cancer Research* 69, no. 18 (September 15, 2009): 7385–92.

Hsu, I. C., R. A. Metcalf, T. Sun, J. A. Welsh, N. J. Wang, and C. C. Harris. “Mutational Hotspot in the p53 Gene in Human Hepatocellular Carcinomas.” *Nature* 350, no. 6317 (April 4, 1991): 427–28.

Huang, Jiansheng, and David A. Rudnick. "Elucidating the Metabolic Regulation of Liver Regeneration." *The American Journal of Pathology* 184, no. 2 (February 2014): 309–21.

Hurteau, Gregory J., Simon D. Spivack, and Graham J. Brock. "Potential mRNA Degradation Targets of Hsa-miR-200c, Identified Using Informatics and qRT-PCR." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 5, no. 17 (September 2006): 1951–56.

Ito, T., and M. Nemoto. "[Kupfer's cells and fat storing cells in the capillary wall of human liver]." *Okajimas Folia Anatomica Japonica* 24, no. 4 (October 1952): 243–58.

Iwaya, Keiichi, Kosuke Oikawa, Seitaro Semba, Benio Tsuchiya, Yasuo Mukai, Toshiya Otsubo, Toshitaka Nagao, et al. "Correlation between Liver Metastasis of the Colocalization of Actin-Related Protein 2 and 3 Complex and WAVE2 in Colorectal Carcinoma." *Cancer Science* 98, no. 7 (July 2007): 992–99.

Jaffe, Aron B., and Alan Hall. "Rho GTPases: Biochemistry and Biology." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21 (2005): 247–69.

Jia, Ya-Li, Lei Shi, Jun-Nian Zhou, Chun-Jiang Fu, Lin Chen, Hong-Feng Yuan, Yun-Fang Wang, et al. "Epimorphin Promotes Human Hepatocellular Carcinoma Invasion and Metastasis through Activation of Focal Adhesion Kinase/extracellular Signal-Regulated Kinase/matrix Metalloproteinase-9 Axis." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 54, no. 5 (November 2011): 1808–18.

Jin, Shun-Hua, Yoshimitsu Akiyama, Hiroshi Fukamachi, Kazuyoshi Yanagihara, Takumi Akashi, and Yasuhito Yuasa. "IQGAP2 Inactivation through Aberrant Promoter Methylation and Promotion of Invasion in Gastric Cancer Cells." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 122, no. 5 (March 1, 2008): 1040–46.

Juin, Amélie, Clotilde Billottet, Violaine Moreau, Olivier Destaing, Corinne Albiges-Rizo, Jean Rosenbaum, Elisabeth Génot, and Frédéric Saltel. "Physiological Type I Collagen Organization Induces the Formation of a Novel Class of Linear Invadosomes." *Molecular Biology of the Cell* 23, no. 2 (January 2012): 297–309.

Jungermann, K. "Functional Heterogeneity of Periportal and Perivenous Hepatocytes." *Enzyme* 35, no. 3 (1986): 161–80.

Katoh, Hironori, Amane Harada, Kazutoshi Mori, and Manabu Negishi. "Socius Is a Novel Rnd GTPase-Interacting Protein Involved in Disassembly of Actin Stress Fibers." *Molecular and Cellular Biology* 22, no. 9 (May 2002): 2952–64.

Kelley, Laura C., Lauren L. Lohmer, Elliott J. Hagedorn, and David R. Sherwood. "Traversing the Basement Membrane in Vivo: A Diversity of Strategies." *The Journal of Cell Biology* 204, no. 3 (February 3, 2014): 291–302.

Kensler, Thomas W., Bill D. Roebuck, Gerald N. Wogan, and John D. Groopman. "Aflatoxin: A 50-Year Odyssey of Mechanistic and Translational Toxicology." *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 120 Suppl 1 (March 2011): S28–48.

Kiernan F (1833) The anatomy and physiology of the liver. *Phil Trans R Soc Lond* 123:711–770.

Klein, R. Matthew, Laurie S. Spofford, Ethan V. Abel, Arisa Ortiz, and Andrew E. Aplin. "B-RAF Regulation of Rnd3 Participates in Actin Cytoskeletal and Focal Adhesion Organization." *Molecular Biology of the Cell* 19, no. 2 (February 2008): 498–508.

Klein, R. Matthew, and Andrew E. Aplin. "Rnd3 Regulation of the Actin Cytoskeleton Promotes Melanoma Migration and Invasive Outgrowth in Three Dimensions." *Cancer Research* 69, no. 6 (March 15, 2009): 2224–33.

Kmieć, Z. "Cooperation of Liver Cells in Health and Disease." *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology* 161 (2001): III–XIII, 1–151.

Komander, David, Ritu Garg, Paul T. C. Wan, Anne J. Ridley, and David Barford. "Mechanism of Multi-Site Phosphorylation from a ROCK-I:RhoE Complex Structure." *The EMBO Journal* 27, no. 23 (December 3, 2008): 3175–85.

Kunimoto, Koshi, Hisashi Nojima, Yuji Yamazaki, Toshikazu Yoshikawa, Takeshi Okanoue, and Sachiko Tsukita. "Involvement of IQGAP3, a Regulator of Ras/ERK-Related Cascade, in Hepatocyte Proliferation in Mouse Liver Regeneration and Development." *Journal of Cellular Physiology* 220, no. 3 (September 2009): 621–31.

Kupryjańczyk, J., A. D. Thor, R. Beauchamp, V. Merritt, S. M. Edgerton, D. A. Bell, and D. W. Yandell. "p53 Gene Mutations and Protein Accumulation in Human Ovarian Cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, no. 11 (June 1, 1993): 4961–65.

Kyriazis, A. P., M. Koka, and S. D. Vesselinovitch. "Metastatic Rate of Liver Tumors Induced by Diethylnitrosamine in Mice." *Cancer Research* 34, no. 11 (November 1974): 2881–86.

LaBrecque, D. "Liver Regeneration: A Picture Emerges from the Puzzle." *The American Journal of Gastroenterology* 89, no. 8 Suppl (August 1994): S86–96.

Ladeiro, Yannick, Gabrielle Couchy, Charles Balabaud, Paulette Bioulac-Sage, Laura Pelletier, Sandra Rebouissou, and Jessica Zucman-Rossi. "MicroRNA Profiling in Hepatocellular Tumors Is Associated with Clinical Features and Oncogene/tumor Suppressor Gene Mutations." *Hepatology* (Baltimore, Md.) 47, no. 6 (June 2008): 1955–63.

Laloo, Benoît, Delphine Simon, Véronique Veillat, Dorine Lauzel, Véronique Guyonnet-Duperat, François Moreau-Gaudry, Francis Sagliocco, and Christophe Grosset. "Analysis of Post-Transcriptional Regulations by a Functional, Integrated, and Quantitative Method." *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 8, no. 8 (August 2009): 1777–88.

Lang, P., F. Gesbert, M. Delespine-Carmagnat, R. Stancou, M. Pouchelet, and J. Bertoglio. "Protein Kinase A Phosphorylation of RhoA Mediates the Morphological and Functional Effects of Cyclic AMP in Cytotoxic Lymphocytes." *The EMBO Journal* 15, no. 3 (February 1, 1996): 510–19.

Lartey, J., A. Gampel, J. Pawade, H. Mellor, and A. López Bernal. "Expression of RND Proteins in Human Myometrium." *Biology of Reproduction* 75, no. 3 (September 2006): 452–61.

Latasa, M. Ujue, Dominique Couton, Claude Charvet, Aurélie Lafanechère, Jacques-Emmanuel Guidotti, Zhenlin Li, David Tuil, Dominique Daegelen, Claudia Mitchell, and Hélène Gilgenkrantz. "Delayed Liver Regeneration in Mice Lacking Liver Serum Response Factor." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 292, no. 4 (April 2007): G996–1001.

Lauffenburger, D. A., and A. F. Horwitz. "Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process." *Cell* 84, no. 3 (February 9, 1996): 359–69.

Laurent-Puig, P., P. Legoix, O. Bluteau, J. Belghiti, D. Franco, F. Binot, G. Monges, G. Thomas, P. Bioulac-Sage, and J. Zucman-Rossi. "Genetic Alterations Associated with Hepatocellular Carcinomas Define Distinct Pathways of Hepatocarcinogenesis." *Gastroenterology* 120, no. 7 (June 2001): 1763–73.

Leong, Hon S., Amy E. Robertson, Konstantin Stoletov, Sean J. Leith, Curtis A. Chin, Andrew E. Chien, M. Nicole Hague, et al. "Invadopodia Are Required for Cancer Cell Extravasation and Are a Therapeutic Target for Metastasis." *Cell Reports* 8, no. 5 (September 11, 2014): 1558–70.

Lesiak, Adam, Carl Pelz, Hideaki Ando, Mingyan Zhu, Monika Davare, Talley J. Lambert, Katelin F. Hansen, et al. "A Genome-Wide Screen of CREB Occupancy Identifies the RhoA Inhibitors Par6C and Rnd3 as Regulators of BDNF-Induced Synaptogenesis." *PloS One* 8, no. 6 (2013): e64658.

Levrero, M. "Viral Hepatitis and Liver Cancer: The Case of Hepatitis C." *Oncogene* 25, no. 27 (June 26, 2006): 3834–47.

Li, Jiangning, Jean S. Campbell, Claudia Mitchell, Ryan S. McMahan, Xuesong Yu, Kimberly J. Riehle, Roger E. Bumgarner, and Nelson Fausto. "Relationships between Deficits in Tissue Mass and Transcriptional Programs after Partial Hepatectomy in Mice." *The American Journal of Pathology* 175, no. 3 (September 2009): 947–57.

Li, Chang-Yan, Chuan-Zeng Cao, Wang-Xiang Xu, Meng-Meng Cao, Fan Yang, Lan Dong, Miao Yu, et al. "Recombinant Human Hepassocin Stimulates Proliferation of Hepatocytes in Vivo and Improves Survival in Rats with Fulminant Hepatic Failure." *Gut* 59, no. 6 (June 2010): 817–26.

Liebig, Timo, Jennifer Erasmus, Ruba Kalaji, Derek Davies, Gervaise Loirand, Anne Ridley, and Vania M. M. Braga. "RhoE Is Required for Keratinocyte Differentiation and Stratification." *Molecular Biology of the Cell* 20, no. 1 (January 2009): 452–63.

Lin, Xi, Baohui Liu, Xiangsheng Yang, Xiaojing Yue, Lixia Diao, Jing Wang, and Jiang Chang. "Genetic Deletion of Rnd3 Results in Aqueductal Stenosis Leading to Hydrocephalus through up-Regulation of Notch Signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, no. 20 (May 14, 2013): 8236–41.

Linder, Stefan, Christiane Wiesner, and Mirko Himmel. "Degrading Devices: Invadosomes in Proteolytic Cell Invasion." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27 (2011): 185–211.

Liu, Tao, Asne R. Bauskin, John Zaunders, David A. Brown, Susan Pankhurst, Pamela J. Russell, Samuel N. Breit, and Susan Panhurst. "Macrophage Inhibitory Cytokine 1 Reduces Cell Adhesion and Induces Apoptosis in Prostate Cancer Cells." *Cancer Research* 63, no. 16 (August 15, 2003): 5034–40.

Lizárraga, Floria, Renaud Poincloux, Maryse Romao, Guillaume Montagnac, Gaëlle Le Dez, Isabelle Bonne, Guillem Rigai, Graça Raposo, and Philippe Chavrier. "Diaphanous-Related Formins Are Required for Invadopodia Formation and Invasion of Breast Tumor Cells." *Cancer Research* 69, no. 7 (April 1, 2009): 2792–2800.

Llovet, Josep M., Sergio Ricci, Vincenzo Mazzaferro, Philip Hilgard, Edward Gane, Jean-Frédéric Blanc, Andre Cosme de Oliveira, et al. "Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma." *The New England Journal of Medicine* 359, no. 4 (July 24, 2008): 378–90.

Loirand, Gervaise, Christophe Guilluy, and Pierre Pacaud. "Regulation of Rho Proteins by Phosphorylation in the Cardiovascular System." *Trends in Cardiovascular Medicine* 16, no. 6 (August 2006): 199–204.

Lok, Anna S., Richard K. Sterling, James E. Everhart, Elizabeth C. Wright, John C. Hoefs, Adrian M. Di Bisceglie, Timothy R. Morgan, et al. "Des-Gamma-Carboxy Prothrombin and Alpha-Fetoprotein as Biomarkers for the Early Detection of Hepatocellular Carcinoma." *Gastroenterology* 138, no. 2 (February 2010): 493–502.

Lonjedo, Marta, Enric Poch, Enric Mocholí, Marta Hernández-Sánchez, Carmen Ivorra, Thomas F. Franke, Rosa M. Guasch, and Ignacio Pérez-Roger. "The Rho Family Member RhoE Interacts with Skp2 and Is Degraded at the Proteasome during Cell Cycle Progression." *The Journal of Biological Chemistry* 288, no. 43 (October 25, 2013): 30872–82.

Luo, Hesun, Zhongyi Dong, Jinjin Zou, Qin Zeng, Dehua Wu, and Li Liu. "Down-Regulation of RhoE Is Associated with Progression and Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma." *Journal of Surgical Oncology* 105, no. 7 (June 1, 2012): 699–704.

Ma, Wei, Carmen Chak-Lui Wong, Edmund Kwok-Kwan Tung, Chun Ming Wong, and Irene Oi-Lin Ng. "RhoE Is Frequently down-Regulated in Hepatocellular Carcinoma (HCC) and Suppresses HCC Invasion through Antagonizing the Rho/Rho-Kinase/myosin Phosphatase Target Pathway." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 57, no. 1 (January 2013): 152–61.

Madaule, P., and R. Axel. "A Novel Ras-Related Gene Family." *Cell* 41, no. 1 (May 1985): 31–40.

Malarkey, David E., Kennita Johnson, Linda Ryan, Gary Boorman, and Robert R. Maronpot. "New Insights into Functional Aspects of Liver Morphology." *Toxicologic Pathology* 33, no. 1 (2005): 27–34.

Mann, Christopher D., Christopher P. Neal, Giuseppe Garcea, Margaret M. Manson, Ashley R. Dennison, and David P. Berry. "Prognostic Molecular Markers in Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review." *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 43, no. 6 (April 2007): 979–92.

Mattila, Pieta K., and Pekka Lappalainen. "Filopodia: Molecular Architecture and Cellular Functions." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9, no. 6 (June 2008): 446–54.

Matz-Soja, Madlen, Amalya Hovhannisyan, and Rolf Gebhardt. "Hedgehog Signalling Pathway in Adult Liver: A Major New Player in Hepatocyte Metabolism and Zonation?" *Medical Hypotheses* 80, no. 5 (May 2013): 589–94.

Meijer, C., M. J. Wiezer, A. M. Diehl, H. J. Schouten, H. J. Schouten, S. Meijer, N. van Rooijen, A. A. van Lambalgen, C. D. Dijkstra, and P. A. van Leeuwen. "Kupffer Cell Depletion by CI2MDP-Liposomes Alters Hepatic Cytokine Expression and Delays Liver Regeneration after Partial Hepatectomy." *Liver* 20, no. 1 (February 2000): 66–77.

Merlen, Grégory, Géraldine Gentric, Séverine Celton-Morizur, Marc Foretz, Jacques-Emmanuel Guidotti, Véronique Fauveau, Jocelyne Leclerc, Benoit Viollet, and Chantal Desdouets. "AMPK α 1 Controls Hepatocyte Proliferation Independently of Energy Balance by Regulating Cyclin A2 Expression." *Journal of Hepatology* 60, no. 1 (January 2014): 152–59.

Miki, H., S. Suetsugu, and T. Takenawa. "WAVE, a Novel WASP-Family Protein Involved in Actin Reorganization Induced by Rac." *The EMBO Journal* 17, no. 23 (December 1, 1998): 6932–41.

Mitchell, Claudia, and Holger Willenbring. "A Reproducible and Well-Tolerated Method for 2/3 Partial Hepatectomy in Mice." *Nature Protocols* 3, no. 7 (2008): 1167–70.

Mitchison, T. J., and L. P. Cramer. "Actin-Based Cell Motility and Cell Locomotion." *Cell* 84, no. 3 (February 9, 1996): 371–79.

Miyoshi, Y., K. Iwao, Y. Nagasawa, T. Aihara, Y. Sasaki, S. Imaoka, M. Murata, T. Shimano, and Y. Nakamura. "Activation of the Beta-Catenin Gene in Primary Hepatocellular Carcinomas by Somatic Alterations Involving Exon 3." *Cancer Research* 58, no. 12 (June 15, 1998): 2524–27.

Mocholí, Enric, Begoña Ballester-Lurbe, Gloria Arqué, Enric Poch, Blanca Peris, Consuelo Guerri, Mara Dierssen, Rosa M. Guasch, José Terrado, and Ignacio Pérez-Roger. "RhoE Deficiency Produces Postnatal Lethality, Profound Motor Deficits and Neurodevelopmental Delay in Mice." *PloS One* 6, no. 4 (2011): e19236.

Mongiu, Anne K., Elizabeth L. Weitzke, Oleg Y. Chaga, and Gary G. Borisy. "Kinetic-Structural Analysis of Neuronal Growth Cone Veil Motility." *Journal of Cell Science* 120, no. Pt 6 (March 15, 2007): 1113–25.

Monsky, W. L., C. Y. Lin, A. Aoyama, T. Kelly, S. K. Akiyama, S. C. Mueller, and W. T. Chen. "A Potential Marker Protease of Invasiveness, Seprase, Is Localized on Invadopodia of Human Malignant Melanoma Cells." *Cancer Research* 54, no. 21 (November 1, 1994): 5702–10.

Moreau, Violaine, Florence Tatin, Christine Varon, and Elisabeth Génot. "Actin Can Reorganize into Podosomes in Aortic Endothelial Cells, a Process Controlled by Cdc42 and RhoA." *Molecular and Cellular Biology* 23, no. 19 (October 2003): 6809–22.

Musso, O., N. Théret, J. P. Champion, B. Turlin, S. Milani, C. Grappone, and B. Clément. "In Situ Detection of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP2) and the Metalloproteinase Inhibitor TIMP2 Transcripts in Human Primary Hepatocellular Carcinoma and in Liver Metastasis." *Journal of Hepatology* 26, no. 3 (March 1997): 593–605.

Nadiminty, Nagalakshmi, Smitha Dutt, Clifford Tepper, and Allen C. Gao. "Microarray Analysis Reveals Potential Target Genes of NF-kappaB2/p52 in LNCaP Prostate Cancer Cells." *The Prostate* 70, no. 3 (February 15, 2010): 276–87.

Nagao, K., M. Tomimatsu, H. Endo, H. Hisatomi, and K. Hikiji. "Telomerase Reverse Transcriptase mRNA Expression and Telomerase Activity in Hepatocellular Carcinoma." *Journal of Gastroenterology* 34, no. 1 (February 1999): 83–87.

Nagasue, N., H. Yukaya, Y. Ogawa, H. Kohno, and T. Nakamura. "Human Liver Regeneration after Major Hepatic Resection. A Study of Normal Liver and Livers with Chronic Hepatitis and Cirrhosis." *Annals of Surgery* 206, no. 1 (July 1987): 30–39.

Nagy, A. "Cre Recombinase: The Universal Reagent for Genome Tailoring." *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 26, no. 2 (February 2000): 99–109.

Nahon, J. L., I. Tratner, A. Poliard, F. Presse, M. Poirer, A. Gal, J. M. Sala-Trepat, L. Legrès, G. Feldmann, and D. Bernuau. "Albumin and Alpha-Fetoprotein Gene Expression in Various Nonhepatic Rat Tissues." *The Journal of Biological Chemistry* 263, no. 23 (August 15, 1988): 11436–42.

Nakahara, H., L. Howard, E. W. Thompson, H. Sato, M. Seiki, Y. Yeh, and W. T. Chen. "Transmembrane/cytoplasmic Domain-Mediated Membrane Type 1-Matrix Metalloprotease Docking to Invadopodia Is Required for Cell Invasion." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, no. 15 (July 22, 1997): 7959–64.

Nishida, N., Y. Fukuda, T. Komeda, R. Kita, T. Sando, M. Furukawa, M. Amenomori, I. Shibagaki, K. Nakao, and M. Ikenaga. "Amplification and Overexpression of the Cyclin D1 Gene in Aggressive Human Hepatocellular Carcinoma." *Cancer Research* 54, no. 12 (June 15, 1994): 3107–10.

Nobes, C. D., and A. Hall. "Rho, Rac, and cdc42 GTPases Regulate the Assembly of Multimolecular Focal Complexes Associated with Actin Stress Fibers, Lamellipodia, and Filopodia." *Cell* 81, no. 1 (April 7, 1995): 53–62.

Nobes, C. D., I. Lauritzen, M. G. Mattei, S. Paris, A. Hall, and P. Chardin. "A New Member of the Rho Family, Rnd1, Promotes Disassembly of Actin Filament Structures and Loss of Cell Adhesion." *The Journal of Cell Biology* 141, no. 1 (April 6, 1998): 187–97.

Nojima, Hisashi, Makoto Adachi, Takeshi Matsui, Katsuya Okawa, Shoichiro Tsukita, and Sachiko Tsukita. "IQGAP3 Regulates Cell Proliferation through the Ras/ERK Signalling Cascade." *Nature Cell Biology* 10, no. 8 (August 2008): 971–78.

Nordenstedt, Helena, Donna L. White, and Hashem B. El-Serag. "The Changing Pattern of Epidemiology in Hepatocellular Carcinoma." *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 42 Suppl 3 (July 2010): S206–14.

Oinuma, Izumi, Kana Kawada, Kiyoka Tsukagoshi, and Manabu Negishi. "Rnd1 and Rnd3 Targeting to Lipid Raft Is Required for p190 RhoGAP Activation." *Molecular Biology of the Cell* 23, no. 8 (April 2012): 1593–1604.

Ongusaha, Pat P., Hyung-Gu Kim, Sarah A. Boswell, Anne J. Ridley, Channing J. Der, G. Paolo Dotto, Young-Bum Kim, Stuart A. Aaronson, and Sam W. Lee. "RhoE Is a pro-Survival p53 Target Gene That Inhibits ROCK I-Mediated Apoptosis in Response to Genotoxic Stress." *Current Biology: CB* 16, no. 24 (December 19, 2006): 2466–72.

Osiak, Anna-Eleonora, Gerhardt Zenner, and Stefan Linder. "Subconfluent Endothelial Cells Form Podosomes Downstream of Cytokine and RhoGTPase Signaling." *Experimental Cell Research* 307, no. 2 (July 15, 2005): 342–53.

Pacary, Emilie, Julian Heng, Roberta Azzarelli, Philippe Riou, Diogo Castro, Mélanie Lebel-Potter, Carlos Parras, et al. "Proneural Transcription Factors Regulate Different Steps of Cortical Neuron Migration through Rnd-Mediated Inhibition of RhoA Signaling." *Neuron* 69, no. 6 (March 24, 2011): 1069–84.

Pacary, Emilie, Roberta Azzarelli, and François Guillemot. "Rnd3 Coordinates Early Steps of Cortical Neurogenesis through Actin-Dependent and -Independent Mechanisms." *Nature Communications* 4 (2013): 1635.

Pache, I., P. Bize, N. Halkic, M. Montemurro, E. Giostra, P. Majno, and D. Moradpour. "[Management of hepatocellular carcinoma]." *Revue Médicale Suisse* 6, no. 233 (January 27, 2010): 198–202.

Park, N. H., Y. H. Chung, K. H. Youn, B. C. Song, S. H. Yang, J. A. Kim, H. C. Lee, et al. "Close Correlation of p53 Mutation to Microvascular Invasion in Hepatocellular Carcinoma." *Journal of Clinical Gastroenterology* 33, no. 5 (December 2001): 397–401.

Parkin, Donald Maxwell. "The Global Health Burden of Infection-Associated Cancers in the Year 2002." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 118, no. 12 (June 15, 2006): 3030–44.

Pelosi, G., U. Pastorino, F. Pasini, P. Maissonneuve, F. Fraggetta, A. Iannucci, A. Sonzogni, et al. "Independent Prognostic Value of Fascin Immunoreactivity in Stage I Nonsmall Cell Lung Cancer." *British Journal of Cancer* 88, no. 4 (February 24, 2003): 537–47.

Peng, S. Y., P. L. Lai, and H. C. Hsu. "Amplification of the c-Myc Gene in Human Hepatocellular Carcinoma: Biologic Significance." *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi* 92, no. 10 (October 1993): 866–70.

Peris, Blanca, Susana Gonzalez-Granero, Begoña Ballester-Lurbe, Jose-Manuel García-Verdugo, Ignacio Pérez-Roger, Consuelo Guerri, José Terrado, and Rosa M. Guasch. "Neuronal Polarization Is Impaired in Mice Lacking RhoE Expression." *Journal of Neurochemistry* 121, no. 6 (June 2012): 903–14.

Poch, Enric, Rebeca Miñambres, Enric Mocholí, Carmen Ivorra, Amparo Pérez-Aragó, Consuelo Guerri, Ignacio Pérez-Roger, and Rosa M. Guasch. "RhoE Interferes with Rb Inactivation and Regulates the Proliferation and Survival of the U87 Human Glioblastoma Cell Line." *Experimental Cell Research* 313, no. 4 (February 15, 2007): 719–31.

Poincloux, Renaud, Floria Lizárraga, and Philippe Chavrier. "Matrix Invasion by Tumour Cells: A Focus on MT1-MMP Trafficking to Invadopodia." *Journal of Cell Science* 122, no. Pt 17 (September 1, 2009): 3015–24.

Powell, E. E., W. G. Cooksley, R. Hanson, J. Searle, J. W. Halliday, and L. W. Powell. "The Natural History of Nonalcoholic Steatohepatitis: A Follow-up Study of Forty-Two Patients for up to 21 Years." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 11, no. 1 (January 1990): 74–80.

Qin, Lun-Xiu, Zhao-You Tang, Zeng-Chen Ma, Zhi-Quan Wu, Xin-Da Zhou, Qing-Hai Ye, Yuan Ji, et al. "P53 Immunohistochemical Scoring: An Independent Prognostic Marker for Patients after Hepatocellular Carcinoma Resection." *World Journal of Gastroenterology: WJG* 8, no. 3 (June 2002): 459–63.

Rappa, Francesca, Azzura Greco, Christine Podrini, Francesco Cappello, Michelangelo Foti, Lucie Bourgoïn, Marion Peyrou, et al. "Immunopositivity for Histone macroH2A1 Isoforms Marks Steatosis-Associated Hepatocellular Carcinoma." *PloS One* 8, no. 1 (2013): e54458.

Rappaport, A. M. "The Structural and Functional Unit in the Human Liver (liver Acinus)." *The Anatomical Record* 130, no. 4 (April 1958): 673–89.

Redondo-Muñoz, Javier, Elizabeth Escobar-Díaz, Rafael Samaniego, María José Terol, José A. García-Marco, and Angeles García-Pardo. "MMP-9 in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Is up-Regulated by alpha4beta1 Integrin or CXCR4 Engagement via Distinct Signaling Pathways, Localizes to Podosomes, and Is Involved in Cell Invasion and Migration." *Blood* 108, no. 9 (November 1, 2006): 3143–51.

Rehem, Rania Naguib Abdel Mouteleb Abdel, and Wafaa Mohamed Hussein Mekky El-Shikh. "Serum IGF-1, IGF-2 and IGFBP-3 as Parameters in the Assessment of Liver Dysfunction in Patients with Hepatic Cirrhosis and in the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma." *Hepato-Gastroenterology* 58, no. 107–108 (June 2011): 949–54.

Reya, Tannishtha, and Hans Clevers. "Wnt Signalling in Stem Cells and Cancer." *Nature* 434, no. 7035 (April 14, 2005): 843–50.

Ribatti, Domenico, Angelo Vacca, Beatrice Nico, Domenico Sansonno, and Franco Dammacco. "Angiogenesis and Anti-Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma." *Cancer Treatment Reviews* 32, no. 6 (October 2006): 437–44.

Ridley, A. J., H. F. Paterson, C. L. Johnston, D. Diekmann, and A. Hall. "The Small GTP-Binding Protein Rac Regulates Growth Factor-Induced Membrane Ruffling." *Cell* 70, no. 3 (August 7, 1992): 401–10.

Ridley, A. J., and A. Hall. "The Small GTP-Binding Protein Rho Regulates the Assembly of Focal Adhesions and Actin Stress Fibers in Response to Growth Factors." *Cell* 70, no. 3 (August 7, 1992): 389–99.

Riento, Kirsi, Rosa M. Guasch, Ritu Garg, Boquan Jin, and Anne J. Ridley. "RhoE Binds to ROCK I and Inhibits Downstream Signaling." *Molecular and Cellular Biology* 23, no. 12 (June 2003): 4219–29.

Riou, Philippe, Priam Villalonga, and Anne J. Ridley. "Rnd Proteins: Multifunctional Regulators of the Cytoskeleton and Cell Cycle Progression." *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 32, no. 11 (November 2010): 986–92.

Riou, Philippe, Svend Kjær, Ritu Garg, Andrew Purkiss, Roger George, Robert J. Cain, Ganka Bineva, et al. "14-3-3 Proteins Interact with a Hybrid Prenyl-Phosphorylation Motif to Inhibit G Proteins." *Cell* 153, no. 3 (April 25, 2013): 640–53.

Roberts, Patrick J., Natalia Mitin, Patricia J. Keller, Emily J. Chenette, James P. Madigan, Rachel O. Currin, Adrienne D. Cox, Oswald Wilson, Paul Kirschmeier, and Channing J. Der. "Rho Family GTPase Modification and Dependence on CAAX Motif-Signaled Posttranslational Modification." *The Journal of Biological Chemistry* 283, no. 37 (September 12, 2008): 25150–63.

Rodríguez-Pinilla, Socorro María, David Sarrió, Emiliano Honrado, David Hardisson, Francisco Calero, Javier Benitez, and José Palacios. "Prognostic Significance of Basal-like Phenotype and Fascin Expression in Node-Negative Invasive Breast Carcinomas." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12, no. 5 (March 1, 2006): 1533–39.

Rousseau, Benoît, Ludovic Ménard, Valérie Haurie, Danièle Taras, Jean-Frédéric Blanc, François Moreau-Gaudry, Philippe Metzler, et al. "Overexpression and Role of the ATPase and Putative DNA Helicase RuvB-like 2 in Human Hepatocellular Carcinoma." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 46, no. 4 (October 2007): 1108–18.

Rubenstein, Nicola M., James F. Chan, Joseph Y. Kim, Steen H. Hansen, and Gary L. Firestone. "Rnd3/RhoE Induces Tight Junction Formation in Mammary Epithelial Tumor Cells." *Experimental Cell Research* 305, no. 1 (April 15, 2005): 74–82.

Ryan, Katie R., Frances E. Lock, John K. Heath, and Neil A. Hotchin. "Plakoglobin-Dependent Regulation of Keratinocyte Apoptosis by Rnd3." *Journal of Cell Science* 125, no. Pt 13 (July 1, 2012): 3202–9.

Sadowski, P. D. "The F1p Recombinase of the 2-Microns Plasmid of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 51 (1995): 53–91.

Sahai, Erik, and Christopher J. Marshall. "Differing Modes of Tumour Cell Invasion Have Distinct Requirements for Rho/ROCK Signalling and Extracellular Proteolysis." *Nature Cell Biology* 5, no. 8 (August 2003): 711–19.

Sakurai-Yageta, Mika, Chiara Recchi, Gaëlle Le Dez, Jean-Baptiste Sibarita, Laurent Daviet, Jacques Camonis, Crislyn D'Souza-Schorey, and Philippe Chavrier. "The Interaction of IQGAP1 with the Exocyst Complex Is Required for Tumor Cell Invasion Downstream of Cdc42 and RhoA." *The Journal of Cell Biology* 181, no. 6 (June 16, 2008): 985–98.

Saltel, Frédéric, Thomas Daubon, Amélie Juin, Isabel Egaña Ganuza, Véronique Veillat, and Elisabeth Génot. "Invadosomes: Intriguing Structures with Promise." *European Journal of Cell Biology* 90, no. 2–3 (March 2011): 100–107.

Sasse, D., N. Katz, and K. Jungermann. "Functional Heterogeneity of Rat Liver Parenchyma and of Isolated Hepatocytes." *FEBS Letters* 57, no. 1 (September 1, 1975): 83–88.

Sato, T., M. del Carmen Ovejero, P. Hou, A. M. Heegaard, M. Kumegawa, N. T. Foged, and J. M. Delaissé. "Identification of the Membrane-Type Matrix Metalloproteinase MT1-MMP in Osteoclasts." *Journal of Cell Science* 110 (Pt 5) (March 1997): 589–96.

Sauer, B., and N. Henderson. "Site-Specific DNA Recombination in Mammalian Cells by the Cre Recombinase of Bacteriophage P1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, no. 14 (July 1988): 5166–70.

Schmidt, Valentina A., Carmine S. Chiariello, Encarnación Capilla, Frederick Miller, and Wadie F. Bahou. "Development of Hepatocellular Carcinoma in Iqgap2-Deficient Mice Is IQGAP1 Dependent." *Molecular and Cellular Biology* 28, no. 5 (March 2008): 1489–1502.

Schmidt, Valentina A. "Watch the GAP: Emerging Roles for IQ Motif-Containing GTPase-Activating Proteins IQGAPs in Hepatocellular Carcinoma." *International Journal of Hepatology* 2012 (2012): 958673.

Schmidt-Supprian, Marc, and Klaus Rajewsky. "Vagaries of Conditional Gene Targeting." *Nature Immunology* 8, no. 7 (July 2007): 665–68.

Schoumacher, Marie, Daniel Louvard, and Danijela Vignjevic. "Cytoskeleton Networks in Basement Membrane Transmigration." *European Journal of Cell Biology* 90, no. 2–3 (March 2011): 93–99.

Schuler, Michael, Andrée Dierich, Pierre Chambon, and Daniel Metzger. "Efficient Temporally Controlled Targeted Somatic Mutagenesis in Hepatocytes of the Mouse." *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 39, no. 3 (July 2004): 167–72.

Seiler, Christoph, Gangarao Davuluri, Joshua Abrams, Fitzroy J. Byfield, Paul A. Janmey, and Michael Pack. "Smooth Muscle Tension Induces Invasive Remodeling of the Zebrafish Intestine." *PLoS Biology* 10, no. 9 (2012): e1001386.

Sekine, Shigeki, Billy Yu-Ang Lan, Melanie Bedolli, Sandy Feng, and Matthias Hebrok. "Liver-Specific Loss of Beta-Catenin Blocks Glutamine Synthesis Pathway Activity and Cytochrome p450 Expression in Mice." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 43, no. 4 (April 2006): 817–25.

Shimomura, Aya, Takashi Ohama, Masatoshi Hori, and Hiroshi Ozaki. "17Beta-Estradiol Induces Gastrointestinal Motility Disorder by Decreasing CPI-17 Phosphorylation via Changes in Rho-Family G-Protein Rnd Expression in Small Intestine." *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science* 71, no. 12 (December 2009): 1591–97.

Shiwarski, Daniel J., Chunbo Shao, Anke Bill, Jean Kim, Dong Xiao, Carol A. Bertrand, Raja S. Seethala, et al. "To 'Grow' or 'Go': TMEM16A Expression as a Switch between Tumor Growth and Metastasis in SCCHN." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 20, no. 17 (September 1, 2014): 4673–88.

Shtutman, M., J. Zhurinsky, I. Simcha, C. Albanese, M. D'Amico, R. Pestell, and A. Ben-Ze'ev. "The Cyclin D1 Gene Is a Target of the Beta-catenin/LEF-1 Pathway." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, no. 10 (May 11, 1999): 5522–27.

Singh, Y., J. Port, M. Schwarz, and A. Braeuning. "Genetic Ablation of B-Catenin Inhibits the Proliferative Phenotype of Mouse Liver Adenomas." *British Journal of Cancer* 111, no. 1 (July 8, 2014): 132–38.

Stanford, W. L., J. B. Cohn, and S. P. Cordes. "Gene-Trap Mutagenesis: Past, Present and beyond." *Nature Reviews. Genetics* 2, no. 10 (October 2001): 756–68.

Sternberg, N., and D. Hamilton. "Bacteriophage P1 Site-Specific Recombination. I. Recombination between loxP Sites." *Journal of Molecular Biology* 150, no. 4 (August 25, 1981): 467–86.

Strazzabosco, M. "New Insights into Cholangiocyte Physiology." *Journal of Hepatology* 27, no. 5 (November 1997): 945–52.

Sun, Rui, and Bin Gao. "Negative Regulation of Liver Regeneration by Innate Immunity (natural Killer Cells/interferon-Gamma)." *Gastroenterology* 127, no. 5 (November 2004): 1525–39.

Sung, Bong Hwan, and Alissa Weaver. "Cell-Cell Fusion: A New Function for Invadosomes." *Current Biology: CB* 21, no. 3 (February 8, 2011): R121–23.

Sutoh, Mihoko, Yasuhiro Hashimoto, Takahiro Yoneyama, Hayato Yamamoto, Shingo Hatakeyama, Takuya Koie, Akiko Okamoto, et al. "Invadopodia Formation by Bladder Tumor Cells." *Oncology Research* 19, no. 2 (2010): 85–92.

Tanaka, Hajime, Katsumi Fukamachi, Mitsuru Futakuchi, David B. Alexander, Ne Long, Shojiro Tamamushi, Kohtaro Minami, et al. "Mature Acinar Cells Are Refractory to Carcinoma Development by Targeted Activation of Ras Oncogene in Adult Rats." *Cancer Science* 101, no. 2 (February 2010): 341–46.

Taniguchi, Ken, Lewis R. Roberts, Ileana N. Aderca, Xiangyang Dong, Chiping Qian, Linda M. Murphy, David M. Nagorney, et al. "Mutational Spectrum of Beta-Catenin, AXIN1, and AXIN2 in Hepatocellular Carcinomas and Hepatoblastomas." *Oncogene* 21, no. 31 (July 18, 2002): 4863–71.

Tannour-Louet, Mounia, Arlette Porteu, Sophie Vaultont, Axel Kahn, and Mireille Vasseur-Cognet. "A Tamoxifen-Inducible Chimeric Cre Recombinase Specifically Effective in the Fetal and Adult Mouse Liver." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 35, no. 5 (May 2002): 1072–81.

Tarone, G., D. Cirillo, F. G. Giancotti, P. M. Comoglio, and P. C. Marchisio. "Rous Sarcoma Virus-Transformed Fibroblasts Adhere Primarily at Discrete Protrusions of the Ventral Membrane Called Podosomes." *Experimental Cell Research* 159, no. 1 (July 1985): 141–57.

Tatin, Florence, Christine Varon, Elisabeth Génot, and Violaine Moreau. "A Signalling Cascade Involving PKC, Src and Cdc42 Regulates Podosome Assembly in Cultured Endothelial Cells in Response to Phorbol Ester." *Journal of Cell Science* 119, no. Pt 4 (February 15, 2006): 769–81.

Thomas, C., and D. Schmaehl. "[ON THE MORPHOLOGY OF DIETHYLNITROSAMINE-INDUCED LIVER TUMORS IN MICE AND GUINEA PIGS]." *Zeitschrift Für Krebsforschung* 65 (October 4, 1963): 531–36.

Tian, J., Z. Y. Tang, S. L. Ye, Y. K. Liu, Z. Y. Lin, J. Chen, and Q. Xue. "New Human Hepatocellular Carcinoma (HCC) Cell Line with Highly Metastatic Potential (MHCC97) and Its Expressions of the Factors Associated with Metastasis." *British Journal of Cancer* 81, no. 5 (November 1999): 814–21.

Tiribelli, C., M. Melato, L. S. Crocè, L. Giarelli, K. Okuda, and K. Ohnishi. "Prevalence of Hepatocellular Carcinoma and Relation to Cirrhosis: Comparison of Two Different Cities of the World--Trieste, Italy, and Chiba, Japan." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 10, no. 6 (December 1989): 998–1002.

Tomasevic, Nenad, Zhiheng Jia, Alan Russell, Toby Fujii, James J. Hartman, Sheila Clancy, Manping Wang, Christophe Beraud, Kenneth W. Wood, and Roman Sakowicz. "Differential Regulation of WASP and N-WASP by Cdc42, Rac1, Nck, and PI(4,5)P2." *Biochemistry* 46, no. 11 (March 20, 2007): 3494–3502.

Tong, Jun, Yuxuan Fu, Xinyu Xu, Shuxin Fan, Hong Sun, Ya Liang, Kai Xu, Zhilan Yuan, and Yingbin Ge. "TGF- β 1 Stimulates Human Tenon's Capsule Fibroblast Proliferation by miR-200b and Its Targeting of p27/kip1 and RND3." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 55, no. 4 (April 2014): 2747–56.

Torre, Cyril, Samira Benhamouche, Claudia Mitchell, Cécile Godard, Philippe Veber, Franck Letourneur, Nicolas Cagnard, et al. "The Transforming Growth Factor-A and Cyclin D1 Genes Are Direct Targets of B-Catenin Signaling in Hepatocyte Proliferation." *Journal of Hepatology* 55, no. 1 (July 2011): 86–95.

Trahey, M., and F. McCormick. "A Cytoplasmic Protein Stimulates Normal N-Ras p21 GTPase, but Does Not Affect Oncogenic Mutants." *Science (New York, N.Y.)* 238, no. 4826 (October 23, 1987): 542–45.

Trinchet, J.-C. "[Hepatocellular carcinoma: increasing incidence and optimized management]." *Gastroentérologie Clinique Et Biologique* 33, no. 8–9 (September 2009): 830–39.

Tyburczy, Magdalena Ewa, Katarzyna Kotulska, Piotr Pokarowski, Jakub Mieczkowski, Joanna Kucharska, Wieslawa Grajkowska, Maciej Roszkowski, Sergiusz Jozwiak, and Bozena Kaminska. "Novel Proteins Regulated by mTOR in Subependymal Giant Cell Astrocytomas of Patients with Tuberous Sclerosis Complex and New Therapeutic Implications." *The American Journal of Pathology* 176, no. 4 (April 2010): 1878–90.

Van Hengel, Jolanda, Petra D'Hooge, Bart Hooghe, Xunwei Wu, Louis Libbrecht, Rita De Vos, Fabio Quondamatteo, Martina Klempt, Cord Brakebusch, and Frans van Roy. "Continuous Cell Injury Promotes Hepatic Tumorigenesis in cdc42-Deficient Mouse Liver." *Gastroenterology* 134, no. 3 (March 2008): 781–92.

Villalonga, Priam, Rosa M. Guasch, Kirsi Riento, and Anne J. Ridley. "RhoE Inhibits Cell Cycle Progression and Ras-Induced Transformation." *Molecular and Cellular Biology* 24, no. 18 (September 2004): 7829–40.

Villanueva, Augusto, and Josep M. Llovet. "Targeted Therapies for Hepatocellular Carcinoma." *Gastroenterology* 140, no. 5 (May 2011): 1410–26.

Wennerberg, Krister, Marie-Annick Forget, Shawn M. Ellerbroek, William T. Arthur, Keith Burridge, Jeffrey Settleman, Channing J. Der, and Steen H. Hansen. "Rnd Proteins Function as RhoA Antagonists by Activating p190 RhoGAP." *Current Biology: CB* 13, no. 13 (July 1, 2003): 1106–15.

White, Colin D., Hema Khurana, Dmitri V. Gnatenko, Zhigang Li, Robert D. Odze, David B. Sacks, and Valentina A. Schmidt. "IQGAP1 and IQGAP2 Are Reciprocally Altered in Hepatocellular Carcinoma." *BMC Gastroenterology* 10 (2010): 125.

Wisse, E., D. Luo, D. Vermijlen, C. Kanellopoulou, R. De Zanger, and F. Braet. "On the Function of Pit Cells, the Liver-Specific Natural Killer Cells." *Seminars in Liver Disease* 17, no. 4 (1997): 265–86.

Xia, Wei, Jie Li, Liucun Chen, Baochun Huang, Shaohua Li, Guang Yang, Hongmei Ding, et al. "MicroRNA-200b Regulates Cyclin D1 Expression and Promotes S-Phase Entry by Targeting RND3 in HeLa Cells." *Molecular and Cellular Biochemistry* 344, no. 1–2 (November 2010): 261–66.

Xia, Hongwei, Mingxing Li, Liang Chen, Weibing Leng, Dandan Yuan, Xiaohui Pang, Liu Chen, Ronghui Li, Qiulin Tang, and Feng Bi. "Suppression of RND3 Activity by AES Downregulation Promotes Cancer Cell Proliferation and Invasion." *International Journal of Molecular Medicine* 31, no. 5 (May 2013): 1081–86.

Xiao, Helan, Xiao-Hui Bai, Andras Kapus, Wei-Yang Lu, Alan S. Mak, and Mingyao Liu. "The Protein Kinase C Cascade Regulates Recruitment of Matrix Metalloprotease 9 to Podosomes and Its Release and Activation." *Molecular and Cellular Biology* 30, no. 23 (December 2010): 5545–61.

Yan, C., R. H. Costa, J. E. Darnell, J. D. Chen, and T. A. Van Dyke. "Distinct Positive and Negative Elements Control the Limited Hepatocyte and Choroid Plexus Expression of Transthyretin in Transgenic Mice." *The EMBO Journal* 9, no. 3 (March 1990): 869–78.

Yue, X., X. Yang, X. Lin, T. Yang, X. Yi, Y. Dai, J. Guo, et al. "Rnd3 Haploinsufficient Mice Are Predisposed to Hemodynamic Stress and Develop Apoptotic Cardiomyopathy with Heart Failure." *Cell Death & Disease* 5 (2014): e1284.

Zambonin-Zallone, A., A. Teti, A. Carano, and P. C. Marchisio. "The Distribution of Podosomes in Osteoclasts Cultured on Bone Laminae: Effect of Retinol." *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 3, no. 5 (October 1988): 517–23.

Zhang, Y. J., W. Jiang, C. J. Chen, C. S. Lee, S. M. Kahn, R. M. Santella, and I. B. Weinstein. "Amplification and Overexpression of Cyclin D1 in Human Hepatocellular Carcinoma." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 196, no. 2 (October 29, 1993): 1010–16.

Zhao, Hui, Jianping Yang, Tianli Fan, Shenglei Li, and Xuequn Ren. "RhoE Functions as a Tumor Suppressor in Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Modulates the PTEN/PI3K/Akt Signaling Pathway." *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 33, no. 5 (October 2012): 1363–74.

Zhou, Jinfeng, Kai Li, Yong Gu, Bin Feng, Gui Ren, Liyun Zhang, Yafang Wang, Yongzhan Nie, and Daiming Fan. "Transcriptional up-Regulation of RhoE by Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition of Gastric Cancer Cells during Hypoxia." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 415, no. 2 (November 18, 2011): 348–54.

Zhu, Yajie, Jitao Zhou, Hongwei Xia, Xiangzheng Chen, Meng Qiu, Juan Huang, Surui Liu, et al. "The Rho GTPase RhoE Is a p53-Regulated Candidate Tumor Suppressor in Cancer Cells." *International Journal of Oncology* 44, no. 3 (March 2014): 896–904. doi:10.3892/ijo.2014.2245.

Zhu, Zixiang, Xiangle Zhang, Guoqing Wang, and Haixue Zheng. "Role of MicroRNAs in Hepatocellular Carcinoma." *Hepatitis Monthly* 14, no. 8 (August 2014): e18672.

Zucman-Rossi, Jessica. "Molecular Classification of Hepatocellular Carcinoma." *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 42 Suppl 3 (July 2010): S235–41.

CHAPITRE 7 - ANNEXES

▪ Publication n°1

Rnd3/RhoE: a tumor promoter or suppressor ?

Lisa Paysan*, Léo Piquet*, Frédéric Saltel et Violaine Moreau

* = Co-premiers auteurs

La protéine Rnd3 est une RhoGTPase atypique qui est impliquée dans les processus de croissance, de migration et d'apoptose dont la dérégulation peut conduire à la carcinogénèse. Plusieurs études ont permis de montrer que l'expression de la protéine Rnd3 est dérégulée dans de nombreux cancers. Il n'y a pas de consensus sur son niveau d'expression car Rnd3 peut être surexprimée ou sous-exprimée selon le contexte tumoral. Cependant, l'altération de son expression favorise toujours le développement tumoral ce qui implique que Rnd3 peut jouer un rôle pro ou anti-tumoral selon les cancers. En plus de cette variabilité d'expression dans les tumeurs, les mécanismes moléculaires impliqués dans la dérégulation de l'expression de Rnd3 sont également très différents selon le contexte tumoral. Par exemple, son expression peut être altérée par des micro-ARNs dans les cancers gastriques et colorectaux, ou alors par la voie de signalisation mTOR ou Notch1 respectivement dans les astrocytomes ou les carcinomes à cellules squameuses. La dérégulation de l'expression de Rnd3 participe notamment à l'invasion tumorale et à la formation de métastases dans la majorité des cancers. Elle est également souvent associée à un mauvais pronostic chez les patients. Rnd3 pourrait ainsi être utilisé comme un marqueur pronostic dans les cancers où son niveau d'expression est dérégulé, comme c'est déjà le cas dans le cancer du poumon. Elle pourrait également constituer une cible thérapeutique afin de diminuer l'agressivité et le développement métastatique des tumeurs.

Rnd3/RhoE: a tumor promoter or suppressor ?

Lisa Paysan*, Léo Piquet*, Frédéric Saltel and Violaine Moreau

INSERM, Physiopathologie du cancer du foie, U1053, F-33000 Bordeaux, France; Univ. Bordeaux, Physiopathologie du cancer du foie, U1053, F-33000 Bordeaux, France

* these authors contributed equally

Abstract

RhoGTPases, members of the Ras superfamily of small GTPases, are general modulators of cellular processes important for tumor biology. Among these proteins, Rnd3, an atypical RhoGTPase devoid of GTP hydrolytic activity, has recently been extensively studied for its putative role in tumorigenesis. Indeed, Rnd3 is implicated in processes, such as proliferation and migration, whose deregulation may lead to cancer development and metastasis. The aim of this review is to provide an overview of the data available about Rnd3 deregulation in cancers, its origin and consequences. There is no consensus about Rnd3 expression in cancers as this protein is differently altered according to the tumor context, but these alterations are always in favor of a pro-tumorigenic role. Thus, depending on the tumor types, it behaves either as a tumor suppressor, or as a tumor promoter. Interestingly, the deregulation of Rnd3 is often linked to patient poor outcome. Thus, Rnd3 may be used as a prognostic marker as exemplified in lung cancers and Rnd3 or Rnd3 pathway may represent a new putative therapeutic target.

Small GTP-binding proteins are signaling components that are important in converting extracellular stimuli into a wide range of cellular responses. Rho GTPases which are part of the Ras superfamily of GTPases control cell adhesion, cell cycle progression, cell migration, cell morphogenesis, gene expression and actin cytoskeleton dynamics. Therefore they play important roles in tumor biology. Genetic alterations to small GTPases underscore their important role. However, for a long time, in contrast with Ras, no gain- or loss- of function mutations were found in Rho GTPases in solid tumors. Recently, large-scale exome sequencing of tumors led to the discovery of recurrent mutations into Rho GTPase genes, such as gain of function mutations of *RAC1* in human sun-exposed melanomas (Hodis et al., 2012; Krauthammer et al., 2012) and mutations of *RHOA* in head and neck tumors (Lawrence et al., 2014) and in diffuse-type gastric cancers (Cancer Genome Atlas Research, 2014; Kakiuchi et al., 2014). In addition to the mutational status of those two members, most RhoGTPase function is perturbed by mechanisms that involve altered regulation and expression. This is the case of Rnd3/RhoE, an atypical member of the Rho family, which is not, so far, described as mutated in tumors, but for which the expression is altered in an increasing number of cancers.

1. Rnd3/RhoE, an atypical RhoGTPase member

Besides the well-known triad, Cdc42, Rac1 and RhoA, the RhoGTPase family actually harbors 20 members. Rnd3/Rho8/RhoE belongs to the Rnd sub-family that also comprises the closely related Rnd1/Rho6 and Rnd2/Rho7/RhoN proteins, which share 54%–63% identity pairwise (Nobes et al., 1998). Evolutionary history of the Rho family revealed that Rnd members emerged in chordates, suggesting that they evolved relatively recently (Boueux et al., 2007). Rnd proteins have structural, as well as, functional features which make it pertinent to classify them as atypical RhoGTPases (Aspenstrom et al., 2007). Rnd1 and Rnd3 have N- and C-terminal extensions of about 30 amino acids relative to Cdc42 (Nobes et al., 1998). Unlike the best-characterized Rho family members that are geranylgeranylated, Rnd proteins are predominantly farnesylated. Unlike canonical members of the Rho family that are regulated by switching between an inactive GDP-bound and an active GTP-bound form, Rnd proteins are constitutively bound to GTP. Indeed, as these proteins lack amino acids that are critical for GTP hydrolysis, they have no detectable GTPase activity. Accordingly, in its basal state Rnd3 is not cytosolic, but is predominantly associated with membranes (Foster et al., 1996). As a consequence, regulation of Rnd3 is controlled preferentially by the balance between transcription/translation and degradation, and/or by post-translational modifications such as phosphorylation, rather than by classical Rho regulators such as GEFs, GAPs, and GDIs (Goh and Manser, 2012; Riou et al., 2010). In addition, Rnd proteins were also found regulated through interactions with other proteins,

such as 14-3-3 (Riou et al., 2013) or effectors as Syx/PLEKHG5 (Goh and Manser, 2012). In contrast with its atypical regulation, Rnd3 has been implicated in functions commonly regulated by RhoGTPases such as remodeling of the actin cytoskeleton and in many basic cellular processes such as cell proliferation, differentiation, survival, motility and adhesion. Rnd3 is ubiquitously expressed (Foster et al., 1996; Nobes et al., 1998), thus the *in vivo* function of Rnd3 has been established with the development of knockout mice that lack Rnd3 expression (Mocholi et al., 2011). Rnd3 null mice died shortly after birth showing that Rnd3 is essential for postnatal development. In addition, Rnd3 ablation results in neuromotor impairment and neuromuscular alterations, suggesting a defect in the development of the nervous system (Mocholi et al., 2011). This has been confirmed *in vitro* using Rnd3-deficient hippocampal neurons that display a decrease of neurite and axon outgrowth and a delay in neuronal polarization (Peris et al., 2012). These defects were linked to the RhoA/ROCK signaling pathway. Indeed, Rnd3 was early described as a RhoA antagonist and involved in the regulation of actomyosin contractility. In addition to its role in neurons, Rnd3 was involved in smooth muscle contractility (Cario-Toumaniantz et al., 2003; Lartey et al., 2006) and cancer cell migration (Hidalgo-Carcedo et al., 2011; Pinner and Sahai, 2008). Rnd3 was also shown to regulate cell proliferation and survival, apparently independently of cytoskeleton remodeling (Pacary et al., 2013; Riou et al., 2010). Indeed, a recent *in vivo* study reported that Rnd3^{-/-} mice developed hydrocephalus due to the overgrowth of ependymal epithelia through up-regulation of Notch signaling (Lin et al., 2013). Thus, this may reflect a novel function of Rnd3 independent on its actin-based role. Thus, Rnd3 has been implicated in different processes required for cancer development, such as cell proliferation, differentiation, survival and motility. The aim of this review is to provide an overview of the data describing the de-regulation of Rnd3 in cancers and its consequence.

2. Rnd3/RhoE expression is differently altered in cancers

A growing number of studies described the alteration of Rnd3 expression and function in tumors. Rnd3 expression is clearly deregulated in a majority of cancers, but there is no consensus about the nature of its alteration. Interestingly, Rnd3 expression is differentially regulated in various cancers. Indeed, Rnd3 mRNA and protein are under-expressed in biopsies from prostate and gastric cancers (Bektic et al., 2005; Chen et al., 2011) and over-expressed in non-small cell lung (Cuiyan et al., 2007; Zhang et al., 2007) and pancreatic cancers. Thus, whereas Rnd3 over-expression is considered as an unfavorable prognostic factor in lung cancer, Rnd3 is also considered a tumor suppressor gene in prostate cancer. To address Rnd3 functions either as tumor suppressor or oncoprotein in specific cell types, an accurate description of the alteration of Rnd3 expression in the tumors is required. Thus,

it is important to make an overview of these deregulations and the way they have been stated. Indeed, the methods of analysis of gene expression and the numbers of studies and cases are key to achieve an exact description in the tumor context. Table I summarizes the data available about the deregulation of Rnd3 in various cancers and below is the description of the results obtained for each cancer type.

2.1 Brain tumors

Gliomas, arising from glial cells, are the most common intracranial malignant tumors in humans. Gliomas are categorized into grades I-IV based on the degree of malignancy, as determined by histopathological criteria. Grade IV glioblastoma multiforme are highly aggressive neoplasms which have an elevated invasive capacity, infiltrating diffusely into regions of normal brain. Rnd3 was early described to affect the proliferation of U87 glioblastoma cells (Poch et al., 2007). Rnd3 overexpression induced a decrease in the phosphorylation of the retinoblastoma protein, Rb and in the expression of cyclinD1 resulting in an inhibition of U87 cell cycle progression. Rnd3 expression was further shown to induce apoptosis in the same cell line. These results suggest a negative role of Rnd3 in glioblastoma development. However, Forsyth and collaborators recently found that expression of Rnd3 also increased migration and invasion of U87 cells *in vitro* and *in vivo*. Preliminary results from this group also found a significantly higher expression of Rnd3 in patients with highly invasive gliomas (Liacini et al., 2014). All together these results, that required to be consolidated, suggests that Rnd3 may play a role in the development of glioblastoma multiforme, promoting a potential switch from proliferative, non invasive tumors towards non proliferative and highly invasive tumors.

Rnd3 was also described to be up-regulated in the subependymal giant cell astrocytomas (SEGAs), a rare low-grade brain tumor often associated with tuberous sclerosis complex (Tyburczy et al., 2010). This latter disease is characterized by mutations in *TSC1* or *TSC2* genes responsible for mammalian target of rapamycin (mTOR) activity resulting in dysregulation of cell growth, abnormal differentiation and tumorigenesis. Rnd3 was found as one of the genes significantly up-regulated in SEGA versus control brain in a microarray analysis. Moreover, this upregulation of Rnd3 was found to be driven by mTOR activity as rapamycin treatment led to a decrease of Rnd3 expression in SEGA cells (Tyburczy et al., 2010). Thus, Rnd3 represents one of the candidate markers of SEGAs and, in contrary to glioblastomas, its expression is linked to the benign phenotype and relatively low invasiveness of these tumors.

2.2 Digestive Cancers

Colon cancers

Colorectal cancer (CRC) is a common malignant tumor, where the prognosis is directly correlated with the extent of tumor invasion and metastasis. Studies describing Rnd3 expression in CRC produced conflicting data. Indeed, two papers using both Chinese cohorts of patients reported, in an inapprehensible manner, opposite results. On one hand, Luo et al. (Luo et al., 2012b) demonstrated that Rnd3 act as a tumor suppressor gene in CRC. Using immunohistochemistry approach, Rnd3 was found to be significantly lower in CRC tissues (n=41) in comparison to normal tissues (n=49) and adenomas (n=41). Its expression further correlated negatively with miR-17 level found to be elevated in CRC. In vitro, miR-17 indeed targeted Rnd3 3'UTR and inhibiting Rnd3 reversed cell cycle arrest caused by inhibiting miR-17, demonstrating the functional link between miR-17 and Rnd3 (Luo et al., 2012b). On the other hand, in a cohort of 202 paired tissues, Zhou and collaborators found a significantly elevated expression level of Rnd3 in primary CRC compared with adjacent normal tissues (Zhou et al., 2013). Moreover, Rnd3 expression was significantly correlated with depth of invasion, lymph node metastasis and distant metastasis. This link between Rnd3 expression and invasiveness was further confirmed by transwell assay using SW620 CRC cell line. Most importantly, this study found that patients with CRC with strong Rnd3 expression had a 6.78-fold higher risk of relapse than those with CRC with negative staining. Consequently, disease-free and overall survivals were significantly poorer for patients with Rnd3-positive tumors than those with Rnd3-negative tumors. Thus, in striking contrast with the first study, Zhou and collaborators described Rnd3 expression as an independent prognostic marker for CRC patients. In both studies the large cases of tissues were analyzed by immunohistochemistry approach using two different antibodies and protocols, raising the importance of complementary approaches to confirm the deregulation of Rnd3 expression in patient samples. Another point is that in Luo et al. study, T1+T2 stage represented only 22% of the cases whereas in Zhou et al., it represented about 57% of the cases. In addition, the existence of distinct molecular subclasses of CRC may also explain this discrepancy. The microRNA miR200-b, which targets Rnd3 3'UTR was described as over-represented in TGF β RII-negative colorectal tumors (about 30% of CRC) when compared to TGF β RII-positive tumors, suggesting that Rnd3 may be down-regulated in these tumors (Fu et al., 2014). Work using CRC cell lines also demonstrated either a negative or no role of Rnd3 on cell proliferation (Table II). Thus, further work is required to clarify the level of Rnd3 expression and its role in colorectal cancer.

Gastric cancers

Although gastric cancer is the fifth most common malignancy in the world, it is the third leading cause of death (Fock, 2014). Overall incidence rates for gastric cancer have steadily declined over the past 50 years, particularly in developed countries, mainly due to anti-

Helicobacter pylori therapies. However, drug resistance to chemotherapy and development of metastases are the major causes of patient mortality.

Two recent studies demonstrated that Rnd3 expression is significantly higher in gastric cancer tissues as compared with normal gastric tissues (Chang et al., 2014; Feng et al., 2013) and even more in metastatic lymph node tissues (Feng et al., 2013). This up-regulation correlated with the differentiation grade and the prognostic of the patient, presenting Rnd3 as a prognostic marker and a metastatic-promoting gene for gastric cancer (Feng et al., 2013). In cultured gastric cells, Rnd3 expression was also linked to chemotherapy drug resistance. Indeed, the knockdown of Rnd3 enhanced the sensitivity of SGC7901/DDP cells, which are resistant to cisplatin (Chang et al., 2014), whereas its ectopic expression enhanced the resistance of the parental SGC7901 cells to several kinds of antitumor drugs (Li et al., 2009). Few studies further described the possible sources of Rnd3 deregulation in gastric tumor cells. The expression of Rnd3 was described to be regulated at the transcriptional level by Hif1alpha in response to hypoxia (Zhou et al., 2011) and at the post-transcriptional level by miR-200c (Chang et al., 2014) in gastric cancer cells. An additional study, that claims that Rnd3 is down-regulated in gastric cancer patient samples (data not available), also demonstrated that its expression might be regulated at the epigenetic level and subject to histone deacetylation (Chen et al., 2011). The role of Rnd3 in gastric cancer has also been addressed in functional studies. Gain of function experiments clearly demonstrated that Rnd3 increases the invasive capacities of various gastric cancer cell lines *in vitro* and *in vivo* (Feng et al., 2013; Zhou et al., 2011). The way Rnd3 promotes cell invasion in gastric cancer cells still requires some investigations, but Rnd3 up-regulation was linked to hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition (Zhou et al., 2011) and to CXCR4, receptor of the cytokine CXCL12 involved in metastasis development, increase (Feng et al., 2013). Altogether, most of the data presented Rnd3 as a pro-metastatic gene in the stomach cancer.

Liver cancer

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the main primary malignancy of the liver and one of the most common and aggressive cancers worldwide, causing more than 500,000 deaths annually (Nordenstedt et al., 2010). Work from three independent laboratories, including ours, highlighted the alteration of Rnd3 in human HCC (Grise et al., 2012; Luo et al., 2012a; Ma et al., 2012). Rnd3 was found to be down-regulated in the majority of human HCC samples (n=120, 71 and 99, respectively in Grise et al., 2012, Ma et al., 2013 and Luo et al., 2012) at both mRNA and protein levels. Interestingly, these studies are complementary as they were done in two different countries (China and France) suggesting that down-

regulation is not related to patient origin and not to HCC etiology. Indeed, among the various etiologies linked to HCC development, the most prominent is chronic hepatitis B virus infection in southern Asia and hepatitis C virus infection and chronic alcohol consumption in Europe as found in the studied cohorts. In addition, irrespective of the patient cohort and the method used to detect Rnd3 expression, Rnd3 expression was frequently downregulated (66.7%-85% of HCCs) and by a least 2 folds in tumor samples. Compared to primary hepatocytes or to normal cell line hepatocytes (HL-7702), Rnd3 expression was also found down-regulated in a wide-spread variety of HCC cell lines. Altogether these data strongly attested of the down-regulation of Rnd3 in liver tumors. A consensus about the involvement of Rnd3 in invasion of HCC cells and in metastasis development can also be made from the literature. In the French cohort a correlation between the low level of Rnd3 and the presence of satellite nodules, which are intrahepatic metastases was found (Grise et al., 2012), and in the Asian cohorts Rnd3 down-regulation was associated with shorter disease free survival (Luo et al., 2012a; Ma et al., 2013). Thus, low Rnd3 expression may be used as a poor prognostic factor for HCC patients. Reproducing Rnd3 down-expression using RNA interference in cultured cells demonstrated that Rnd3 knockdown led to an increase of HCC cell invasiveness. This result was robust as different groups showed it in various cell lines (Table II). However, the mode of invasion was slightly different according to the studied cell type. We found that Rnd3 KD in Hep3B HCC cells induced an epithelial-mesenchymal transition with loss of E-cadherin and miR-200b/c, expression of ZEB2 and activity of Rac/Cdc42 (Grise et al., 2012). On the other hand, Ng and collaborators found that Rnd3 KD in Chinese tumor-derived cell lines activated the RhoA/ROCK pathway favoring an amoeboid mode of migration (Ma et al., 2013). In terms of cell proliferation, the findings were even more confusing as, depending on the cell line, the impact of Rnd3 knockdown on cell growth was different (Table II). Indeed, loss of function of Rnd3 led to cell growth inhibition in Hep3B and Huh7 (Grise et al., 2012) and, on the contrary, to cell growth enhancement in HepG2 (Xia et al., 2013), whereas it has no impact in SMMC-7721 and BEL-7402 cell lines (Ma et al., 2013). Further work is required to better decipher the impact of Rnd3 on tumor hepatocyte proliferation. Thus, whatever its impact on cell cycle progression on liver tumor cells, at the opposite of gastric cancer, data demonstrated that Rnd3 is an anti-metastatic gene in hepatocellular carcinoma.

2.3 Lung Cancers

Lung cancer is the most common cancer among men in terms of both incidence and mortality worldwide and among women has the third highest incidence, and is second after breast cancer in mortality. Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the major histological

subgroup of lung cancer and its 5-year survival depends on the cancer type and stage. Rnd3 mRNA and protein were early shown to be overexpressed in NSCLC, and was correlated with an unfavorable prognostic in patients, suggesting that Rnd3 expression could be used as a prognostic marker in patients with NSCLC (Cuiyan et al., 2007; Zhang et al., 2007). In order to translate into clinical application prognostic biomarkers for NSCLC, David Jablons' lab selected and validated a prognostic model based on the expression of a limited number of genes. They first generated a 4-gene signature that was prognostic of long-term survival in patients with completely resected lung adenocarcinoma (Raz et al., 2008). This 4-gene signature included *RND3* in addition to *WNT3A*, *ERBB3* and *LCK*. Later on, the same group extended this signature and developed a qPCR-based 14-gene expression assay (Kratz et al., 2012). This signature was developed in a cohort of 361 patients and further validated in two other large cohorts of 433 and 1006 patients (Kratz et al., 2012). This practical molecular assay that worked only for non-squamous NSCLC, allowed the identification of patients with high risk of mortality after surgical resection. This robust signature, that predicted survival better than simple staging, was recently patented (US patent US20130059747 / European patent EP2726635A1) and developed as a kit for clinical use. This prognostic assay may help clinicians to adapt the chemotherapy to improve outcomes of their patients. Thus, even if no functional data was produced about Rnd3 impact in lung cancer cells, Rnd3 overexpression is linked to bad prognosis and cancer progression for NSCLC patients.

2.4 Skin cancer - Melanoma

Research in the past decades has provided us with insights into the molecular mechanisms that drive melanoma tumorigenesis and cancer progression. Notably mutations of Rac1 were found recently in about 9% of sun-exposed melanoma, but the most common mutation found in melanoma, is mutations in the serine/threonine kinase B-RAF. B-RAF mutations, resulting in the activation of the protein and the ERK/ERK1/2 pathway, are found in about 60% of melanomas. A study focused on delineating mutant B-RAF regulated targets involved in malignant traits identified Rnd3 as a candidate (Klein et al., 2008). Rnd3 was found as a downstream effector of the oncogene B-RAF-mediated reorganization of the actin cytoskeleton. Indeed, oncogenic activation of the B-RAF-MEK signaling pathway induced Rnd3 expression in WM793 melanoma cells (Klein et al., 2008). The use of PLX4720, which selectively inhibits B-RAF kinase activity, decreased thus Rnd3 expression using a pathway that required Forkhead transcription factor FOXD3 (Katiyar and Aplin, 2011). Interestingly, Rnd3 expression was linked to the acquisition of an invasive melanoma phenotype. In vitro, Rnd3 depletion in WM793 melanoma cells reduced the invasive behavior of melanoma tumor spheroids in a ROCK1/2 dependent manner (Klein and Aplin, 2009). This ability of Rnd3 to

regulate melanoma cell motility was also found dependent on PDK1 level in A375 melanoma cells, as PDK1 competed with Rnd3 for binding to ROCK1 (Pinner and Sahai, 2008). Following treatment, patients generally develop resistance to agents targeting mutant B-RAF. Reproducing this phenomenon in vitro, the resistant cell subpopulation was shown to retained the ability to invade in a 3D microenvironment. It appeared that B-RAF inhibition using drugs invokes a switch in the utilization of the Rnd3-RhoA signaling pathway. Down-regulation of Rnd3 expression and enhancement of RhoA activity participated in residual melanoma cell invasion following pharmaceutical B-RAF inhibition. Thus, the Rnd3-RhoA antagonistic function that regulates melanoma cell invasiveness may be targeted at various step of melanoma progression. Regarding cell growth, whereas Rnd3 silencing in MW793 cells has no impact on cell cycle progression and tumor cell growth (Klein and Aplin, 2009), ectopic expression of Rnd3 led to a decrease in BrdU positive cells and to an increase of apoptosis in A375 melanoma cells (Poch et al., 2007). Besides these numerous data obtained in human cultured cells, studies relating the level of Rnd3 in melanoma patient samples are still missing.

2.5 Prostate cancer

One of the first studies demonstrating that Rnd3 was de-regulated in tumors was published for prostate cancer in 2005 (Bektic et al., 2005). Rnd3 expression was significantly lower in malignant when compared to benign prostate tissue samples. In addition, prostatic carcinoma cell lines showed lower amount of Rnd3 protein than primary human prostate epithelial cells (Bektic et al., 2005). These data suggested that Rnd3 is constitutively expressed in the benign prostate and down-regulated during carcinogenesis of the prostate gland. In this study, Rnd3 was further described as a tumor suppressor gene in prostate cancer as its overexpression in DU-145 prostate carcinoma cells induced cell growth arrest and cell death. Indeed, ectopic expression of Rnd3 inhibited the expression of cyclin B1 and Cdc2, two proteins essential for the G2/M transition (Bektic et al., 2005). On the other hand, Rnd3 was found overexpressed, together with 14 other genes, in LNCaP-C4-2 cells, which are associated with a higher metastatic potential when compared to the parental LNCaP cells (Trojan et al., 2005). Altogether these data suggest that Rnd3 may be down-regulated in prostate carcinoma to allow tumor growth and a re-expression may occur to favor invasion and metastasis development. Other clinical and functional studies are required to confirm these statements.

2.6 Squamous cell carcinomas

Squamous epithelial cells composed the most superficial layer of the epithelium. Rnd3 expression was related to be de-regulated in various types of squamous cell carcinomas

(SCC). Rnd3 mRNA and protein levels were significantly downregulated in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and cell lines (Zhao et al., 2012). And Rnd3 expression was associated with the clinical staging and lymph node metastasis in patients. Functional studies in ESCC EC1 cell line demonstrated that downregulation of Rnd3 expression promoted cell proliferation, cell invasion and cell apoptosis through modulation of the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway (Zhao et al., 2012). Rnd3 was also implicated in squamous cell carcinomas that arise in skin epithelia. Rnd3 was found as a transcriptional target of activated Notch1, which is attenuated, through loss-of-function mutations in SCC cells (Zhu et al., 2014). Consequently, skin SCC showed a significant suppression of Rnd3 expression when compared to normal controls tissues. The suppression of Rnd3 expression resulted in an increased proliferation and the failure to commit to differentiation in keratinocytes, thus demonstrating that Rnd3 expression is key for cell fate decision in epithelial tissues (Zhu et al., 2014). Functional study in A431 squamous carcinoma cell line also implicated Rnd3 in collective cell migration, where Rnd3 is required for limiting actomyosin contractility at cell-cell contacts and favor collective cell invasion (Hidalgo-Carcedo et al., 2011). Thus, in this case loss of Rnd3 led to a defect in cell-cell adhesion and SCC cell collective invasion. Altogether these data demonstrated that alteration of Rnd3 expression in squamous epithelial cells might favor tumor development.

3. Overview

Rnd3 has a diverse expression pattern, depending on the cancer types (Table I and Figure 1). Rnd3 expression is decreased in prostate cancer and in hepatocellular and squamous cell carcinomas, whereas its expression is up-regulated in brain, gastric and lung cancers. But, in most of the cases, functional studies demonstrated that these alterations are in favor of a pro-tumorigenic role (Table II). Thus, depending on the tumor types, it behaves either as a tumor suppressor, or as a tumor promoter. This apparent controversy is probably linked to the origin and/or to the mutational status of the cancer cell. Whereas Rnd3 mRNA expression is ubiquitous in normal cells, its level of expression varies among tissues and was early shown to be particularly low in brain, pancreas, thymus, testis, and kidney (Foster et al., MCB96; Nobes et al., JCB98). Besides the transcript, the amount of Rnd3 protein may also be regulated according to the tissue of origin. Data about the expression levels of the Rnd3 protein in human organs are still missing. In addition to this variability of expression in the healthy human tissues, the variability in tumor types may additionally be due to the mutational status. Indeed, dysregulated pathways are specific to each tumor types. Thus, the sources of Rnd3 deregulation are multiple. As a rather good correlation between mRNA and protein levels is usually found in tumors (Cuiyan et al., 2007; Grise et al., 2012; Zhao et al., 2012), it is likely that Rnd3 deregulation may arise at a genomic, transcriptional or post-

transcriptional levels. Rnd3 expression was indeed found deregulated at the epigenetic level through histone deacetylation in gastric cancer cells (Chen et al., 2011). Moreover, as described herein, the alteration of Rnd3 expression also involves miRNA deregulation such as in colorectal or gastric cancers (Chang et al., 2014; Luo et al., 2012b), mTOR pathway in astrocytomas (Tyburczy et al., 2010) or Notch1 and Hif1a, respectively in squamous cell carcinomas and gastric cancers (Zhou et al., 2011; Zhu et al., 2014). However since the last few years, more and more studies described novel modes of regulation for Rnd3 either at the transcriptional, post-transcriptional or post-translational levels. These important data may give clues about the origin of Rnd3 deregulation in tumors. For example, p53 was shown to directly regulate Rnd3 transcription in response to DNA damage (Ongusaha et al., 2006). Due to the mutational status of p53 in various cancers, we may anticipate a p53-related alteration of Rnd3 expression in such tumor cells. However, to date no further study confirmed this link in human tumors.

The functions of Rnd3/RhoE in cancer development are complex, which is consistent with the wide range of cellular responses that it modulates. Certain cancer cells use this signaling pathway to antagonize cell proliferation and migration, whereas others can subvert this pathway to facilitate proliferation, survival and invasion. It is clear that opposite effects are found upon cancer types, but it is interesting to note that despite its up or down-regulation in tumors, Rnd3 expression is always linked to the promotion of cell invasion and metastasis with the exception of SEGAs. Indeed, reduced expression of Rnd3 in human hepatocellular carcinoma and sarcoma cells increases their invasiveness and metastatic potential, whereas in gastric cancers and glioma, this latter effect is due to the up-regulation of Rnd3. Its impact on cell proliferation is less clear, but the down-regulation of Rnd3 expression seems to be associated with an increase of cell growth and reciprocally. This is the case for prostate cancer, squamous cell carcinoma and glioblastoma. Another important aspect to explain the apparent contradictory result in various tumors is that Rnd3 expression may also be modulated upon the evolution of the tumor. Indeed, we may hypothesize that in some cancer cells, Rnd3 could be tightly regulated during cancer development. This could be the case in prostate cancer, where Rnd3 is firstly down-regulated in order to allow the tumor growth, and then overexpressed to favor invasion and metastasis development. This concept may also explain conflicting data obtained in colorectal cancers.

4. What's next? How may the field develop?

Rnd3 is clearly a gene of interest to address the mechanisms of carcinogenesis. However, further studies using well-defined cohorts of patients should help to better characterize its

level of expression and regulation in various cancers, especially in colorectal cancers where data are still conflicting. In light of non-small cell lung cancers, where Rnd3 is part of a robust 14-genes signature that predicted survival, independent prospective studies are needed to establish the prognostic value of Rnd3 expression for individual patients in other type of cancers. Indeed, given that Rnd3 is involved in invasion of most of tumors, it supports new opportunities for the development of prognostic tools in these cancers.

As an atypical member of the RhoGTPase family without GTPase activity, the regulation of Rnd3 does not occur through GEF, GAP and GDI, but rather by a regulation of the transcription/translation and degradation, and by post-translational modifications. Even if some Rnd3 regulators have been highlighted, there are still much to do to understand the origin of Rnd3 deregulation in cancers. Currently, the large scale sequencing of multiple cancer genomes is carried out, and may help to identify putative Rnd3 mutations. The understanding of the transcription factors and the pathways regulating Rnd3 is of particular interest to help the development of strategies to either inhibit or favor Rnd3 expression.

Rnd3 plays a dual role in cells; on one hand, it regulates cell proliferation, on the other hand, Rnd3 plays an important role in regulating metastasis and invasion. A more detailed investigation of these two roles of Rnd3 will be necessary to better understand the mechanism of carcinogenesis and tumor progression in patients. Indeed, the study of Rnd3 expression and function upon the different steps of cancer development is of interest. Finally, due to the early postnatal death of Rnd3 KO mice, development of mice with inducible or/and organ-specific KO is required to address the impact of Rnd3 loss in cancer development in adult mice. These new models may help to better define Rnd3 or the pathways regulated by Rnd3 as therapeutic markers.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Jean Rosenbaum (INSERM U1053, Bordeaux) for critical reading of the manuscript and support. L. Paysan is supported by a PhD fellowship from Région Aquitaine. L. Piquet is supported by a PhD fellowship from the SIRIC BRIO. F.S. is supported by grants from ANR-13-JJC-JSV1-0005. V.M. is supported by funding from “Equipe Labellisée Ligue Nationale contre le Cancer 2011”, “Association pour la Recherche sur le Cancer” and “Institut National du Cancer, PL-BIO2014”.

References

- Aspenstrom, P., A. Ruusala, and D. Pacholsky. 2007. Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho GTPases. *Experimental cell research*. 313:3673-3679.
- Bektic, J., K. Pfeil, A.P. Berger, R. Ramoner, A. Pelzer, G. Schafer, K. Kofler, G. Bartsch, and H. Klocker. 2005. Small G-protein RhoE is underexpressed in prostate cancer and induces cell cycle arrest and apoptosis. *The Prostate*. 64:332-340.
- Boueux, A., E. Vignal, S. Faure, and P. Fort. 2007. Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Molecular biology and evolution*. 24:203-216.
- Cancer Genome Atlas Research, N. 2014. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 513:202-209.
- Cario-Toumaniantz, C., G. Reillaudoux, V. Sauzeau, F. Heutte, N. Vaillant, M. Finet, P. Chardin, G. Loirand, and P. Pacaud. 2003. Modulation of RhoA-Rho kinase-mediated Ca²⁺ sensitization of rabbit myometrium during pregnancy - role of Rnd3. *The Journal of physiology*. 552:403-413.
- Chang, L., F. Guo, Y. Wang, Y. Lv, B. Huo, L. Wang, and W. Liu. 2014. MicroRNA-200c regulates the sensitivity of chemotherapy of gastric cancer SGC7901/DDP cells by directly targeting RhoE. *Pathology oncology research : POR*. 20:93-98.
- Chen, J., H. Zhou, Q. Li, M. Qiu, Z. Li, Q. Tang, M. Liu, Y. Zhu, J. Huang, N. Lang, Z. Liu, Y. Deng, S. Zhang, and F. Bi. 2011. Epigenetic modification of RhoE expression in gastric cancer cells. *Oncology reports*. 25:173-180.
- Cuiyan, Z., H. Jie, Z. Fang, Z. Kezhi, W. Junting, S. Susheng, F. Xiaoli, L. Ning, M. Xinhua, C. Zhaoli, S. Kang, Q. Bin, L. Baozhong, C. Sheng, X. Meihua, and H. Jie. 2007. Overexpression of RhoE in Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) is associated with smoking and correlates with DNA copy number changes. *Cancer biology & therapy*. 6:335-342.
- Feng, B., K. Li, H. Zhong, G. Ren, H. Wang, Y. Shang, M. Bai, J. Liang, X. Wang, and D. Fan. 2013. RhoE promotes metastasis in gastric cancer through a mechanism dependent on enhanced expression of CXCR4. *PloS one*. 8:e81709.
- Fock, K.M. 2014. Review article: the epidemiology and prevention of gastric cancer. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 40:250-260.
- Foster, R., K.Q. Hu, Y. Lu, K.M. Nolan, J. Thissen, and J. Settleman. 1996. Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Molecular and cellular biology*. 16:2689-2699.
- Fu, Y., X. Liu, N. Zhou, L. Du, Y. Sun, X. Zhang, and Y. Ge. 2014. MicroRNA-200b stimulates tumour growth in TGFBR2-null colorectal cancers by negatively regulating p27/kip1. *Journal of cellular physiology*. 229:772-782.
- Goh, L.L., and E. Manser. 2012. The GTPase-deficient Rnd proteins are stabilized by their effectors. *The Journal of biological chemistry*. 287:31311-31320.
- Grise, F., S. Sena, A. Bidaud-Meynard, J. Baud, J.B. Hiriart, K. Makki, N. Dugot-Senant, C. Staedel, P. Bioulac-Sage, J. Zucman-Rossi, J. Rosenbaum, and V. Moreau. 2012. Rnd3/RhoE Is down-regulated in hepatocellular carcinoma and controls cellular invasion. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 55:1766-1775.
- Hidalgo-Carcedo, C., S. Hooper, S.I. Chaudhry, P. Williamson, K. Harrington, B. Leitinger, and E. Sahai. 2011. Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6. *Nature cell biology*. 13:49-58.
- Hodis, E., I.R. Watson, G.V. Kryukov, S.T. Arold, M. Imielinski, J.P. Theurillat, E. Nickerson, D. Auclair, L. Li, C. Place, D. Dicara, A.H. Ramos, M.S. Lawrence, K. Cibulskis, A. Sivachenko, D. Voet, G. Saksena, N. Stransky, R.C. Onofrio, W.

- Winckler, K. Ardlie, N. Wagle, J. Wargo, K. Chong, D.L. Morton, K. Stemke-Hale, G. Chen, M. Noble, M. Meyerson, J.E. Ladbury, M.A. Davies, J.E. Gershenwald, S.N. Wagner, D.S. Hoon, D. Schadendorf, E.S. Lander, S.B. Gabriel, G. Getz, L.A. Garraway, and L. Chin. 2012. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*. 150:251-263.
- Kakiuchi, M., T. Nishizawa, H. Ueda, K. Gotoh, A. Tanaka, A. Hayashi, S. Yamamoto, K. Tatsuno, H. Katoh, Y. Watanabe, T. Ichimura, T. Ushiku, S. Funahashi, K. Tateishi, I. Wada, N. Shimizu, S. Nomura, K. Koike, Y. Seto, M. Fukayama, H. Aburatani, and S. Ishikawa. 2014. Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nature genetics*. 46:583-587.
- Katiyar, P., and A.E. Aplin. 2011. FOXD3 regulates migration properties and Rnd3 expression in melanoma cells. *Molecular cancer research : MCR*. 9:545-552.
- Klein, R.M., and A.E. Aplin. 2009. Rnd3 regulation of the actin cytoskeleton promotes melanoma migration and invasive outgrowth in three dimensions. *Cancer research*. 69:2224-2233.
- Klein, R.M., L.S. Spofford, E.V. Abel, A. Ortiz, and A.E. Aplin. 2008. B-RAF regulation of Rnd3 participates in actin cytoskeletal and focal adhesion organization. *Molecular biology of the cell*. 19:498-508.
- Kratz, J.R., J. He, S.K. Van Den Eeden, Z.H. Zhu, W. Gao, P.T. Pham, M.S. Mulvihill, F. Ziaei, H. Zhang, B. Su, X. Zhi, C.P. Quesenberry, L.A. Habel, Q. Deng, Z. Wang, J. Zhou, H. Li, M.C. Huang, C.C. Yeh, M.R. Segal, M.R. Ray, K.D. Jones, D.J. Raz, Z. Xu, T.M. Jahan, D. Berryman, B. He, M.J. Mann, and D.M. Jablons. 2012. A practical molecular assay to predict survival in resected non-squamous, non-small-cell lung cancer: development and international validation studies. *Lancet*. 379:823-832.
- Krauthammer, M., Y. Kong, B.H. Ha, P. Evans, A. Bacchiocchi, J.P. McCusker, E. Cheng, M.J. Davis, G. Goh, M. Choi, S. Ariyan, D. Narayan, K. Dutton-Regester, A. Capatana, E.C. Holman, M. Bosenberg, M. Sznol, H.M. Kluger, D.E. Brash, D.F. Stern, M.A. Materin, R.S. Lo, S. Mane, S. Ma, K.K. Kidd, N.K. Hayward, R.P. Lifton, J. Schlessinger, T.J. Boggon, and R. Halaban. 2012. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nature genetics*. 44:1006-1014.
- Lartey, J., A. Gampel, J. Pawade, H. Mellor, and A.L. Bernal. 2006. Expression of RND proteins in human myometrium. *Biology of reproduction*. 75:452-461.
- Lawrence, M.S., P. Stojanov, C.H. Mermel, J.T. Robinson, L.A. Garraway, T.R. Golub, M. Meyerson, S.B. Gabriel, E.S. Lander, and G. Getz. 2014. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*. 505:495-501.
- Li, K., Y. Lu, J. Liang, G. Luo, G. Ren, X. Wang, and D. Fan. 2009. RhoE enhances multidrug resistance of gastric cancer cells by suppressing Bax. *Biochemical and biophysical research communications*. 379:212-216.
- Liacini, A., D. Sanger, and P. Forsyth. 2014. Small G-protein Rnd3/RhoE is expressed in brain cancer and affects glioma morphology, motility and invasion. *Journal of Immunotherapy of Cancer*.
- Lin, X., B. Liu, X. Yang, X. Yue, L. Diao, J. Wang, and J. Chang. 2013. Genetic deletion of Rnd3 results in aqueductal stenosis leading to hydrocephalus through up-regulation of Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:8236-8241.
- Luo, H., Z. Dong, J. Zou, Q. Zeng, D. Wu, and L. Liu. 2012a. Down-regulation of RhoE is associated with progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Journal of surgical oncology*. 105:699-704.
- Luo, H., J. Zou, Z. Dong, Q. Zeng, D. Wu, and L. Liu. 2012b. Up-regulated miR-17 promotes cell proliferation, tumour growth and cell cycle progression by targeting the RND3

- tumour suppressor gene in colorectal carcinoma. *The Biochemical journal*. 442:311-321.
- Ma, W., C.C. Wong, E.K. Tung, C.M. Wong, and I.O. Ng. 2012. RhoE is frequently down-regulated in hepatocellular carcinoma (HCC) and suppresses HCC invasion through antagonizing the Rho/Rho-Kinase/Myosin phosphatase target pathway. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 57:152-161.
- Ma, W., C.C. Wong, E.K. Tung, C.M. Wong, and I.O. Ng. 2013. RhoE is frequently down-regulated in hepatocellular carcinoma (HCC) and suppresses HCC invasion through antagonizing the Rho/Rho-kinase/myosin phosphatase target pathway. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 57:152-161.
- Mocholi, E., B. Ballester-Lurbe, G. Arque, E. Poch, B. Peris, C. Guerri, M. Dierssen, R.M. Guasch, J. Terrado, and I. Perez-Roger. 2011. RhoE deficiency produces postnatal lethality, profound motor deficits and neurodevelopmental delay in mice. *PloS one*. 6:e19236.
- Nobes, C.D., I. Lauritzen, M.G. Mattei, S. Paris, A. Hall, and P. Chardin. 1998. A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *The Journal of cell biology*. 141:187-197.
- Nordenstedt, H., D.L. White, and H.B. El-Serag. 2010. The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 42 Suppl 3:S206-214.
- Ongusaha, P.P., H.G. Kim, S.A. Boswell, A.J. Ridley, C.J. Der, G.P. Dotto, Y.B. Kim, S.A. Aaronson, and S.W. Lee. 2006. RhoE is a pro-survival p53 target gene that inhibits ROCK I-mediated apoptosis in response to genotoxic stress. *Curr Biol*. 16:2466-2472.
- Pacary, E., R. Azzarelli, and F. Guillemot. 2013. Rnd3 coordinates early steps of cortical neurogenesis through actin-dependent and -independent mechanisms. *Nature communications*. 4:1635.
- Peris, B., S. Gonzalez-Granero, B. Ballester-Lurbe, J.M. Garcia-Verdugo, I. Perez-Roger, C. Guerri, J. Terrado, and R.M. Guasch. 2012. Neuronal polarization is impaired in mice lacking RhoE expression. *Journal of neurochemistry*. 121:903-914.
- Pinner, S., and E. Sahai. 2008. PDK1 regulates cancer cell motility by antagonising inhibition of ROCK1 by RhoE. *Nature cell biology*. 10:127-137.
- Poch, E., R. Minambres, E. Mocholi, C. Ivorra, A. Perez-Arago, C. Guerri, I. Perez-Roger, and R.M. Guasch. 2007. RhoE interferes with Rb inactivation and regulates the proliferation and survival of the U87 human glioblastoma cell line. *Experimental cell research*. 313:719-731.
- Raz, D.J., M.R. Ray, J.Y. Kim, B. He, M. Taron, M. Skrzypski, M. Segal, D.R. Gandara, R. Rosell, and D.M. Jablons. 2008. A multigene assay is prognostic of survival in patients with early-stage lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 14:5565-5570.
- Riou, P., S. Kjaer, R. Garg, A. Purkiss, R. George, R.J. Cain, G. Bineva, N. Reymond, B. McColl, A.J. Thompson, N. O'Reilly, N.Q. McDonald, P.J. Parker, and A.J. Ridley. 2013. 14-3-3 proteins interact with a hybrid prenyl-phosphorylation motif to inhibit G proteins. *Cell*. 153:640-653.
- Riou, P., P. Villalonga, and A.J. Ridley. 2010. Rnd proteins: multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression. *Bioessays*. 32:986-992.
- Trojan, L., A. Schaaf, A. Steidler, M. Haak, G. Thalmann, T. Knoll, N. Gretz, P. Alken, and M.S. Michel. 2005. Identification of metastasis-associated genes in prostate cancer by genetic profiling of human prostate cancer cell lines. *Anticancer research*. 25:183-191.

- Tyburczy, M.E., K. Kotulska, P. Pokarowski, J. Mieczkowski, J. Kucharska, W. Grajkowska, M. Roszkowski, S. Jozwiak, and B. Kaminska. 2010. Novel proteins regulated by mTOR in subependymal giant cell astrocytomas of patients with tuberous sclerosis complex and new therapeutic implications. *The American journal of pathology*. 176:1878-1890.
- Xia, H., M. Li, L. Chen, W. Leng, D. Yuan, X. Pang, L. Chen, R. Li, Q. Tang, and F. Bi. 2013. Suppression of RND3 activity by AES downregulation promotes cancer cell proliferation and invasion. *International journal of molecular medicine*. 31:1081-1086.
- Zhang, C., F. Zhou, N. Li, S. Shi, X. Feng, Z. Chen, J. Hang, B. Qiu, B. Li, S. Chang, J. Wan, K. Shao, X. Xing, X. Tan, Z. Wang, M. Xiong, and J. He. 2007. Overexpression of RhoE Has a Prognostic Value in Non-Small Cell Lung Cancer. *Annals of surgical oncology*. 14:2628-2635.
- Zhao, H., J. Yang, T. Fan, S. Li, and X. Ren. 2012. RhoE functions as a tumor suppressor in esophageal squamous cell carcinoma and modulates the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 33:1363-1374.
- Zhou, J., K. Li, Y. Gu, B. Feng, G. Ren, L. Zhang, Y. Wang, Y. Nie, and D. Fan. 2011. Transcriptional up-regulation of RhoE by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes epithelial to mesenchymal transition of gastric cancer cells during hypoxia. *Biochemical and biophysical research communications*. 415:348-354.
- Zhou, J., J. Yang, K. Li, P. Mo, B. Feng, X. Wang, Y. Nie, and D. Fan. 2013. RhoE is associated with relapse and prognosis of patients with colorectal cancer. *Annals of surgical oncology*. 20:175-182.
- Zhu, Z., K. Todorova, K.K. Lee, J. Wang, E. Kwon, I. Kehayov, H.G. Kim, V. Kolev, G.P. Dotto, S.W. Lee, and A. Mandinova. 2014. Small GTPase RhoE/Rnd3 is a critical regulator of Notch1 signaling. *Cancer research*. 74:2082-2093.

Figure Legends

Figure 1: Rnd3 expression is differently altered in cancers.

Rnd3 expression is either up or down-regulated in tumors. The impact of this alteration on cell proliferation and invasion is indicated based on functional data available.

Cancer type	Rnd3: up ou down?	Nb of tumors/control	Method of detection	Source of deregulation	Output	Refer ences
Glioma	Up	dna	dna	nd	Highly invasive tumors	[1]
Subependymal Giant Cell Astrocytomas	Up	10 T / 5 NT	qRT-PCR	mTOR activity due to mutations in TCS1&2 gene	Benign phenotype and low invasiveness	[2]
Colorectal cancer	Down	41 T / 49 NT 19 paired N/T tissues	IHC qRT-PCR	miR-17 up-regulation	nd	[3]
Colorectal cancer	Up	202 paired N/T tissues 6 paired N/T tissues	IHC WB	nd	Correlations with invasion and metastasis / independent prognostic marker	[4]
Gastric cancer	Up Up	90 paired N/T tissues 40 primary/metastases paired tissues	IHC on tissue array	nd	Correlations with differentiation grade and tumor staging / independent prognostic marker	[5]
Gastric cancer	Up	27 paired N/T tissues	qRT-PCR	miRNA-200c up- regulation	nd	[6]
Hepatocellular carcinoma	Down	120 T / 28 NT 27 paired N/T tissues	qRT-PCR WB, IHC	nd	Association with presence of intra-hepatic metastases	[7]
Hepatocellular carcinoma	Down	19 paired N/T tissues 99 T / 79 NT	qRT-PCR, WB IHC	nd	Association with shorter survival and poor prognosis / independent prognostic marker	[8]
Hepatocellular carcinoma	Down	71 paired N/T tissues 2 paired N/T tissues	qRT-PCR WB	nd	Association with shorter disease- free survival	[9]
Non-Small Cell Lung Cancer	Up	30 paired N/T tissues	qRT-PCR, IHC, WB	Correlation with DNA copy number changes	Association with smoking history	[10]
Non-Small Cell Lung Cancer	Up	115 T	IHC on tissue array	nd	Association with shorter survival / independent prognostic marker	[11]
Non-Small Cell Lung Cancer	Up	107 T	Micro-array	nd	Part of a 4-gene signature that predicts overall and disease-free survival.	[12]

Non-Small Cell Lung Cancer		361 T (training cohort) 433 T (validation cohort) 1006 T (validation cohort)	qRT-PCR	nd	Part of a 11-gene signature that identifies patients at high risk for mortality after surgical resection (patent US20130059747, patent EP2726635A1)	[13]
Prostate cancer	Down	20 T / 20 NT	qRT-PCR	nd	nd	[14]
Esophageal squamous cell carcinoma	Down	128 T	IHC, ISH	nd	Association with differentiation degree, clinical staging and lymph node metastasis	[15]
Oral or skin squamous cell carcinoma	Down	23 paired N/T tissues	qRT-PCR	Notch1 down-expression	Suppression of the differentiation potential	[16]

Table I. Rnd3 deregulation in cancers

nd, not determined; dna, data not available; paired N/T tissues, paired non-tumor versus tumor tissues; IHC, immunohistochemistry; ISH, in situ hybridization; WB, western-blot; qRT-PCR, quantitative real-time PCR.

1. Liacini, A., D. Sanger, and P. Forsyth, *Small G-protein Rnd3/RhoE is expressed in brain cancer and affects glioma morphology, motility and invasion*. Journal of Immunotherapy of Cancer, 2014(2(Suppl 1):O4).
2. Tyburczy, M.E., et al., *Novel proteins regulated by mTOR in subependymal giant cell astrocytomas of patients with tuberous sclerosis complex and new therapeutic implications*. Am J Pathol, 2010. **176**(4): p. 1878-90.
3. Luo, H., et al., *Up-regulated miR-17 promotes cell proliferation, tumour growth and cell cycle progression by targeting the RND3 tumour suppressor gene in colorectal carcinoma*. Biochem J, 2012. **442**(2): p. 311-21.
4. Zhou, J., et al., *RhoE is associated with relapse and prognosis of patients with colorectal cancer*. Ann Surg Oncol, 2013. **20**(1): p. 175-82.
5. Feng, B., et al., *RhoE promotes metastasis in gastric cancer through a mechanism dependent on enhanced expression of CXCR4*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e81709.
6. Chang, L., et al., *MicroRNA-200c regulates the sensitivity of chemotherapy of gastric cancer SGC7901/DDP cells by directly targeting RhoE*. Pathol Oncol Res, 2014. **20**(1): p. 93-8.
7. Grise, F., et al., *Rnd3/RhoE Is down-regulated in hepatocellular carcinoma and controls cellular invasion*. Hepatology, 2012. **55**(6): p. 1766-75.
8. Luo, H., et al., *Down-regulation of RhoE is associated with progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma*. J Surg Oncol, 2012. **105**(7): p. 699-704.

9. Ma, W., et al., *RhoE is frequently down-regulated in hepatocellular carcinoma (HCC) and suppresses HCC invasion through antagonizing the Rho/Rho-kinase/myosin phosphatase target pathway*. Hepatology, 2013. **57**(1): p. 152-61.
10. Cuiyan, Z., et al., *Overexpression of RhoE in Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) is associated with smoking and correlates with DNA copy number changes*. Cancer Biol Ther, 2007. **6**(3): p. 335-42.
11. Zhang, C., et al., *Overexpression of RhoE Has a Prognostic Value in Non-Small Cell Lung Cancer*. Ann Surg Oncol, 2007. **14**(9): p. 2628-35.
12. Raz, D.J., et al., *A multigene assay is prognostic of survival in patients with early-stage lung adenocarcinoma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(17): p. 5565-70.
13. Kratz, J.R., et al., *A practical molecular assay to predict survival in resected non-squamous, non-small-cell lung cancer: development and international validation studies*. Lancet, 2012. **379**(9818): p. 823-32.
14. Bektic, J., et al., *Small G-protein RhoE is underexpressed in prostate cancer and induces cell cycle arrest and apoptosis*. Prostate, 2005. **64**(4): p. 332-40.
15. Zhao, H., et al., *RhoE functions as a tumor suppressor in esophageal squamous cell carcinoma and modulates the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway*. Tumour Biol, 2012. **33**(5): p. 1363-74.
16. Zhu, Z., et al., *Small GTPase RhoE/Rnd3 is a critical regulator of Notch1 signaling*. Cancer Res, 2014. **74**(7): p. 2082-93.

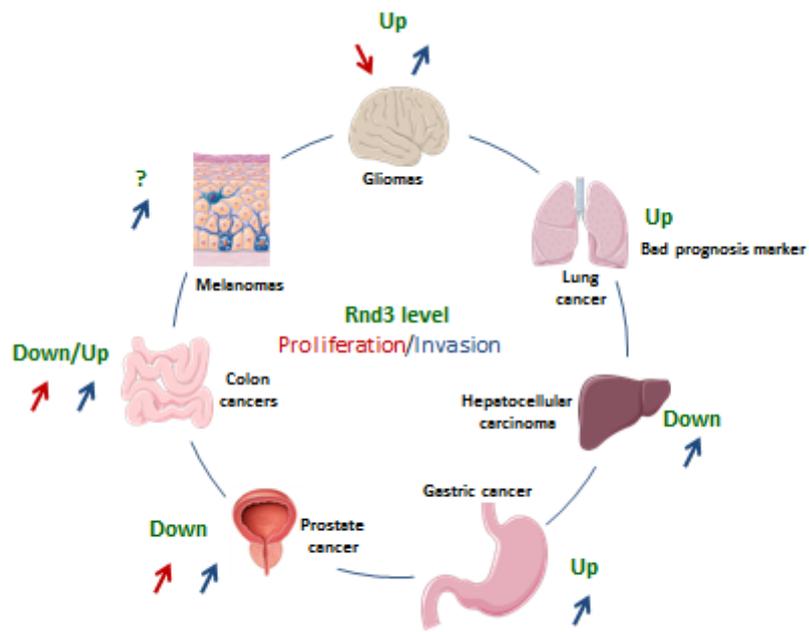
Cancer type	Cell line	Loss or Gain of function experiment	Output cell proliferation	on Output on cell invasion	Other output	References
Glioma	U87	Gain (overexpression)	Decrease	Increase	Induction of apoptosis	[1]
	U87	Gain (overexpression)	nd	Increase		[2]
	U251	Loss (siRNA)	nd	Decrease		
Colon carcinoma	T84	Gain (overexpression)	Decrease	nd	Induction of apoptosis	[1]
Colorectal cancer	Lovo	Loss (siRNA)	Increase	nd		[3]
	HCT116	Loss (siRNA)	Increase	nd		
		Loss (siRNA)	nd	Decrease		
	SW620	Gain (overexpression)	nd	Increase		[4]
	HCT116	Loss (siRNA)	No impact	nd		[5]
Gastric cancer	SGC7901	Gain (overexpression)	nd	nd	Multidrug resistance	[6]
	AGS, MKN28, KATOIII	Hypoxia-induced up-regulation	nd	Increase	Epithelial-mesenchymal transition	[7]
	SGC7901-NM,	Gain (overexpression)	No impact	Increase		[8]
	MKN45, MKN28	Gain (overexpression)		Increase		
	SGC7901-M	Loss (siRNA)	No impact	Decrease		
	SGC7901/DDP (resistant to cisplatin)	Loss (siRNA)	nd	nd	Drug sensitivity	[9]
Hepatocellular carcinoma	Hep3B, Huh7	Loss (siRNA)	Decrease	Increase	Epithelial-mesenchymal transition	[10]

			Gain (overexpression)		Decrease		
		SMMC-7721, BEL-7402	Loss (shRNA)	No impact	Increase	Membrane blebbing	
		PLC/PRF/5	Gain (overexpression)	nd	Decrease		[11]
		MHCC-97L	Loss (shRNA)	nd	Increase		
		HepG2	Loss (siRNA)	Increase	Increase		[12]
Melanoma		A375	Gain (overexpression)	Decrease		Induction of apoptosis	[1]
		WM793, WM115	Loss (shRNA)	No impact	Decrease		[13]
Prostate Cancer		DU-145	Gain (overexpression)	Increase	nd	Induction of apoptosis	[14]
		LNCaP vs LNCaP C4-2	Increase expression	nd	Increase		[15]
Sarcoma		Cen3tel	Loss		Increase		[16]
Esophageal squamous carcinomas	cell	EC1	Loss (siRNA)	Increase	Increase	Reduction of apoptosis	[17]
			Gain (overexpression)	Decrease	Decrease	Induction of apoptosis	
Skin squamous cell carcinoma		SCC4, SCC13, SCC15	Loss (siRNA)	Increase	nd	Inhibition of Notch1 signalling, inhibition of cell differentiation	[18]

Table II. Consequences of Rnd3 deregulation in cancers
nd, not determined; Bold = in vivo data

1. Poch, E., et al., *RhoE interferes with Rb inactivation and regulates the proliferation and survival of the U87 human glioblastoma cell line.* Exp Cell Res, 2007. **313**(4): p. 719-31.
2. Liacini, A., D. Sanger, and P. Forsyth, *Small G-protein Rnd3/RhoE is expressed in brain cancer and affects glioma morphology, motility and invasion.* Journal of Immunotherapy of Cancer, 2014(2(Suppl 1):O4).
3. Luo, H., et al., *Up-regulated miR-17 promotes cell proliferation, tumour growth and cell cycle progression by targeting the RND3 tumour suppressor gene in colorectal carcinoma.* Biochem J, 2012. **442**(2): p. 311-21.

4. Zhou, J., et al., *RhoE is associated with relapse and prognosis of patients with colorectal cancer*. Ann Surg Oncol, 2013. **20**(1): p. 175-82.
5. Fu, Y., et al., *MicroRNA-200b stimulates tumour growth in TGFBR2-null colorectal cancers by negatively regulating p27/kip1*. J Cell Physiol, 2014. **229**(6): p. 772-82.
6. Li, K., et al., *RhoE enhances multidrug resistance of gastric cancer cells by suppressing Bax*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **379**(2): p. 212-6.
7. Zhou, J., et al., *Transcriptional up-regulation of RhoE by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes epithelial to mesenchymal transition of gastric cancer cells during hypoxia*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **415**(2): p. 348-54.
8. Feng, B., et al., *RhoE promotes metastasis in gastric cancer through a mechanism dependent on enhanced expression of CXCR4*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e81709.
9. Chang, L., et al., *MicroRNA-200c regulates the sensitivity of chemotherapy of gastric cancer SGC7901/DDP cells by directly targeting RhoE*. Pathol Oncol Res, 2014. **20**(1): p. 93-8.
10. Grise, F., et al., *Rnd3/RhoE Is down-regulated in hepatocellular carcinoma and controls cellular invasion*. Hepatology, 2012. **55**(6): p. 1766-75.
11. Ma, W., et al., *RhoE is frequently down-regulated in hepatocellular carcinoma (HCC) and suppresses HCC invasion through antagonizing the Rho/Rho-kinase/myosin phosphatase target pathway*. Hepatology, 2013. **57**(1): p. 152-61.
12. Xia, H., et al., *Suppression of RND3 activity by AES downregulation promotes cancer cell proliferation and invasion*. Int J Mol Med, 2013. **31**(5): p. 1081-6.
13. Klein, R.M. and A.E. Aplin, *Rnd3 regulation of the actin cytoskeleton promotes melanoma migration and invasive outgrowth in three dimensions*. Cancer Res, 2009. **69**(6): p. 2224-33.
14. Bektic, J., et al., *Small G-protein RhoE is underexpressed in prostate cancer and induces cell cycle arrest and apoptosis*. Prostate, 2005. **64**(4): p. 332-40.
15. Trojan, L., et al., *Identification of metastasis-associated genes in prostate cancer by genetic profiling of human prostate cancer cell lines*. Anticancer Res, 2005. **25**(1A): p. 183-91.
16. Belgiovine, C., et al., *Reduced expression of the ROCK inhibitor Rnd3 is associated with increased invasiveness and metastatic potential in mesenchymal tumor cells*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e14154.
17. Zhao, H., et al., *RhoE functions as a tumor suppressor in esophageal squamous cell carcinoma and modulates the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway*. Tumour Biol, 2012. **33**(5): p. 1363-74.
18. Zhu, Z., et al., *Small GTPase RhoE/Rnd3 is a critical regulator of Notch1 signaling*. Cancer Res, 2014. **74**(7): p. 2082-93.



Paysan, Piquet et al., Figure 1

▪ **Publication n°2**

Discoidin domain receptor 1 controls linear invadosome formation via a Cdc42/Tuba pathway

Journal of cell biology, 2014

Amélie Juin*, Julie Di Martino*, Birgit Leitinger, Elodie Henriet, Anne-Sophie Gary, **Lisa Paysan**, Jeremy Bomo, Georges Baffet, Cécile Gauthier-Rouvière, Jean Rosenbaum, Violaine Moreau and Frédéric Saltel

* = Co-premiers auteurs

Des résultats précédemment obtenus au laboratoire ont montré que le collagène fibrillaire de type I induit la formation de structures d'invasion particulières, les invadosomes linéaires, qui ne dépendent pas de l'action des intégrines (Juin, 2012). Cette publication révèle que la formation et la fonction de ces structures sont médiées par le récepteur DDR1 (Discoidin Domain Receptor 1). De manière surprenante, l'activité kinase de DDR1 ainsi que l'expression de la kinase c-Src ne sont pas impliquées dans la formation ou l'activité de dégradation de ces structures. Les cibles impliquées en aval de DDR1 sont notamment la RhoGTPase Cdc42 et l'une de ses GEFs appelée Tuba qui se localisent toutes deux au niveau des invadosomes linéaires et sont nécessaires à leur formation.

Dans ce projet, j'ai réalisé des immunoprécipitations de la protéine DDR1 dans les lignées MDA-MB-231 et A549 pour essayer de co-immunoprécipiter la RhoGTPase Cdc42 et ainsi de montrer une interaction entre les deux partenaires.

Discoidin domain receptor 1 controls linear invadosome formation via a Cdc42–Tuba pathway

Amélie Juin,^{1,2*} Julie Di Martino,^{1,2*} Birgit Leitinger,³ Elodie Henriet,^{1,2} Anne-Sophie Gary,^{1,2} Lisa Paysan,^{1,2} Jeremy Bomo,⁴ Georges Baffet,⁴ Cécile Gauthier-Rouvière,⁵ Jean Rosenbaum,^{1,2} Violaine Moreau,^{1,2} and Frédéric Saltel^{1,2}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1053, F-33076 Bordeaux, France

²Université de Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France

³National Heart and Lung Institute, Imperial College London, London SW7 2AZ, England, UK

⁴Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1085, Institut de Recherche sur la Santé l'Environnement et le Travail (IRSET), Université de Rennes 1, 35043 Rennes, France

⁵Universités Montpellier 2 et 1, Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5237, 34293 Montpellier, France

Accumulation of type I collagen fibrils in tumors is associated with an increased risk of metastasis. Invadosomes are F-actin structures able to degrade the extracellular matrix. We previously found that collagen I fibrils induced the formation of peculiar linear invadosomes in an unexpected integrin-independent manner. Here, we show that Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1), a collagen receptor overexpressed in cancer, colocalizes with linear invadosomes in tumor cells and is required for their formation and matrix degradation ability. Unexpectedly, DDR1 kinase activity is not

required for invadosome formation or activity, nor is Src tyrosine kinase. We show that the RhoGTPase Cdc42 is activated on collagen in a DDR1-dependent manner. Cdc42 and its specific guanine nucleotide-exchange factor (GEF), Tuba, localize to linear invadosomes, and both are required for linear invadosome formation. Finally, DDR1 depletion blocked cell invasion in a collagen gel. Altogether, our data uncover an important role for DDR1, acting through Tuba and Cdc42, in proteolysis-based cell invasion in a collagen-rich environment.

Introduction

Type I collagen fibrils are present in tumors, where they were long considered to be a simple physical and structural barrier to inhibit tumor progression and metastasis. However, type I collagen is overexpressed in a large number of cancers, and, paradoxically, a high expression is correlated with an increased risk of metastasis, for instance in breast and lung cancers (Ramaswamy et al., 2003; Gilkes et al., 2013). Collagen overexpression is not the only factor involved in cancer progression. Indeed, the size, diameter, morphology, and cross-linking of type I collagen fibrils have an impact on tumor cell proliferation and metastatic growth (Levental et al., 2009; Cox et al., 2013). Moreover, type I collagen fibrils promote the activity of matrix metalloproteases (MMPs; Ruangpanit et al., 2001).

We previously discovered that type I collagen fibrils are powerful and physiological inducers of invadosomes, which are F-actin-rich structures able to degrade the ECM (Juin et al., 2012). The term invadosomes refers to podosomes in normal cells as well as to invadopodia in cancer cells. Both are matrix-degrading structures allowing matrix remodeling and cell invasion due to the activity of MMPs such as MMP2, MMP9, and MT1-MMP (Hoshino et al., 2013). Invadosomes in some cancers correlate with their ability to metastasize (Eckert et al., 2011). Moreover, invadosomes were recently involved in tumor cell extravasation and demonstrated to be a therapeutic target for metastasis (Leong et al., 2014). Invadosome formation, organization, and activation are controlled by RhoGTPases such as RhoA, Rac1, and Cdc42 (Moreau et al., 2003; Di Martino et al., 2014) and also by Src kinases (Tarone et al., 1985; Linder et al., 2000; Hauck et al., 2002). The invadosome basic module

*A. Juin and J. Di Martino contributed equally to this paper.

Correspondence to Violaine Moreau: violaine.moreau@inserm.fr; or Frédéric Saltel: frederic.saltel@inserm.fr

Abbreviations used in this paper: CMV, cytomegalovirus; DDR, Discoidin domain receptor; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GEF, guanine nucleotide-exchange factor; MMP, matrix metalloprotease; N-WASP, neuronal Wiskott–Aldrich Syndrome protein; RTK, receptor tyrosine kinase; SHG, second harmonic generation.

© 2014 Juin et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons license (Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

Supplemental Material can be found at:
<http://jcb.rupress.org/content/suppl/2014/11/20/jcb.201404079.DC1.html>

corresponds to a central F-actin core composed of actin-binding proteins like neuronal Wiskott–Aldrich Syndrome protein (N-WASP), the Arp2/3 complex, and cortactin, which is associated with scaffold proteins such as Tks5 (Destaing et al., 2011; Linder et al., 2011; Murphy and Courtneidge, 2011). This actin core may be surrounded by a ring of regulating proteins like integrins, vinculin, and talin. Invadosomes are found as individual items, aggregates, or organized into “rosettes” according to cellular models and context. They are constitutive in various cancer cells and in osteoclasts, but in most cell types they are absent in basal conditions, although inducible by various stimuli including cytokines (PDGF, VEGF, and TGF- β) or various compounds (phorbol esters, cytotoxic necrotizing factor 1, and sodium fluoride; Albiges-Rizo et al., 2009). Our recent data showed that type I collagen fibrils induce invadosome formation in most cell types tested, such as endothelial cells and fibroblasts. Moreover, type I collagen fibrils promoted a linear reorganization of invadopodia in cancer cell lines, which was associated with an increase in ECM-degrading activity. Invadosomes induced or reorganized by collagen I aligned along the collagen fibers, and we thus called them linear invadosomes. Two studies have confirmed the induction of linear invadosomes upon cell contact with collagen fibrils (Monteiro et al., 2013; Schachtner et al., 2013). Interestingly, although β 1 integrin family members are the major receptors for type I collagen (Leitinger, 2011) and are associated with classical invadosomes in many cell types, we found that they were not necessary for linear invadosome formation (Juin et al., 2012), raising the question about the ECM receptor involved.

Discoidin domain receptors (DDR) are a ubiquitously expressed family of receptors known to interact with collagens, in particular fibrillar collagens I–III (Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997). DDRs only bind collagens in their native physiological triple-helical conformation and do not recognize denatured collagens such as gelatin (Konitsiotis et al., 2008). The DDR receptor family belongs to the large group of receptor tyrosine kinases (RTKs) and is composed of two members, DDR1 and DDR2. Ligand interaction with DDRs promotes tyrosine autophosphorylation as with classical RTKs, although with very slow and persistent kinetics (Vogel et al., 1997). The DDRs are considered to be collagen sensors and act on tissue homeostasis, as well as on many cellular processes, including cell proliferation and differentiation, cell adhesion, cell migration, and invasion (Leitinger, 2014). These latter properties clearly connect them with cancer. Indeed, several recent studies show that the DDRs are often up-regulated in various cancers (for review see Valiathan et al., 2012). Notably, DDR1 was found overexpressed in lung and breast cancers (Barker et al., 1995; Ford et al., 2007), where a high expression level was correlated with a poor prognosis and metastasis formation (Yang et al., 2010; Valencia et al., 2012; Miao et al., 2013).

Because both DDR1 and collagen I are overexpressed in cancers and associated with metastasis development, and as type I collagen fibrils promote linear invadosome formation, we hypothesized that DDR1 could be the collagen I receptor involved in the formation of linear invadosomes and subsequent cellular invasion.

Results

DDR1 drives linear invadosome formation and activity

For this study, we selected breast cancer and lung cancer cell lines with high levels of DDR1 expression. We found that MDA-MB-231 and A549 cells, derived from human breast and lung cancers, respectively, express DDR1 (see Fig. 2 B and Fig. S2 A). We first analyzed the formation of invadopodia in these cells. As shown by dual F-actin/cortactin immunostaining on fluorescent gelatin, A549 cells do not form constitutive invadopodia, whereas MDA-MB-231 cells do (Fig. 1 A). Consequently, only MDA-MB-231 cells degrade gelatin in the in situ zymography assay. However, when seeded on collagen I fibrils, both cell types were able to form linear invadosomes (Fig. 1, B–D). These dynamic structures formed along collagen fibrils are composed of F-actin, cortactin, and Tks5, which are classical markers for invadosomes (Fig. 1, B and C; and Video 1). These results confirm our previous data demonstrating that type I collagen fibrils reorganized invadopodia from MDA-MB-231 cells into linear invadosomes (Juin et al., 2012). In addition, we show that type I collagen fibrils strongly induced linear invadosomes in cancer cells that do not exhibit constitutive invadopodia (Fig. 1 D). In MDA-MB-231 cells, the invadosome reorganization was also associated with an increase in the percentage of cells exhibiting these structures (Fig. 1 D) and was correlated with an increase in the global degradation activity of cells (Fig. S1 A). Altogether, we show that cancer cells expressing DDR1 can form linear invadosomes when plated on type I collagen fibrils and that contact with type I collagen fibrils increases the ability of the cells to degrade the ECM.

To investigate whether DDR1 played a role in linear invadosome formation, we analyzed DDR1 subcellular localization when cells were plated onto type I collagen fibrils. In order to do this, we transfected or infected MDA-MB-231 cells with either a DDR1-Flag construct or a DDR1-GFP lentiviral construct. We found that tagged DDR1 colocalized with linear invadosomes and type I collagen fibrils in MDA-MB-231 cells (Fig. 2 A). This result was confirmed with endogenous DDR1 when using an anti-DDR1 antibody in MDA-MB-231 and A549 cells (Fig. S1, B and C).

To determine DDR1 involvement in linear invadosome formation, we used an RNA interference strategy. Two to three distinct siRNAs were used to deplete DDR1 in both cell types (Fig. 2, B and C; and Fig. S2, A–C), and linear invadosomes were quantified upon plating on type I collagen fibrils. We found that depletion of DDR1 promoted a significant decrease in the percentage of cells able to form linear invadosomes in both cell types (Fig. 2, C and D; and Fig. S2, B and C). It also strongly decreased the number of linear invadosomes per cell (Fig. 2 E), altogether highlighting a major role of DDR1 in linear invadosome formation. To confirm these data, we performed a rescue experiment. We found that lentiviral-mediated expression of DDR1-GFP restored linear invadosome formation in cells transfected with a DDR1 siRNA, which is associated with a colocalization between Tks5 and DDR1 (Fig. S2, D and E). We have previously shown that

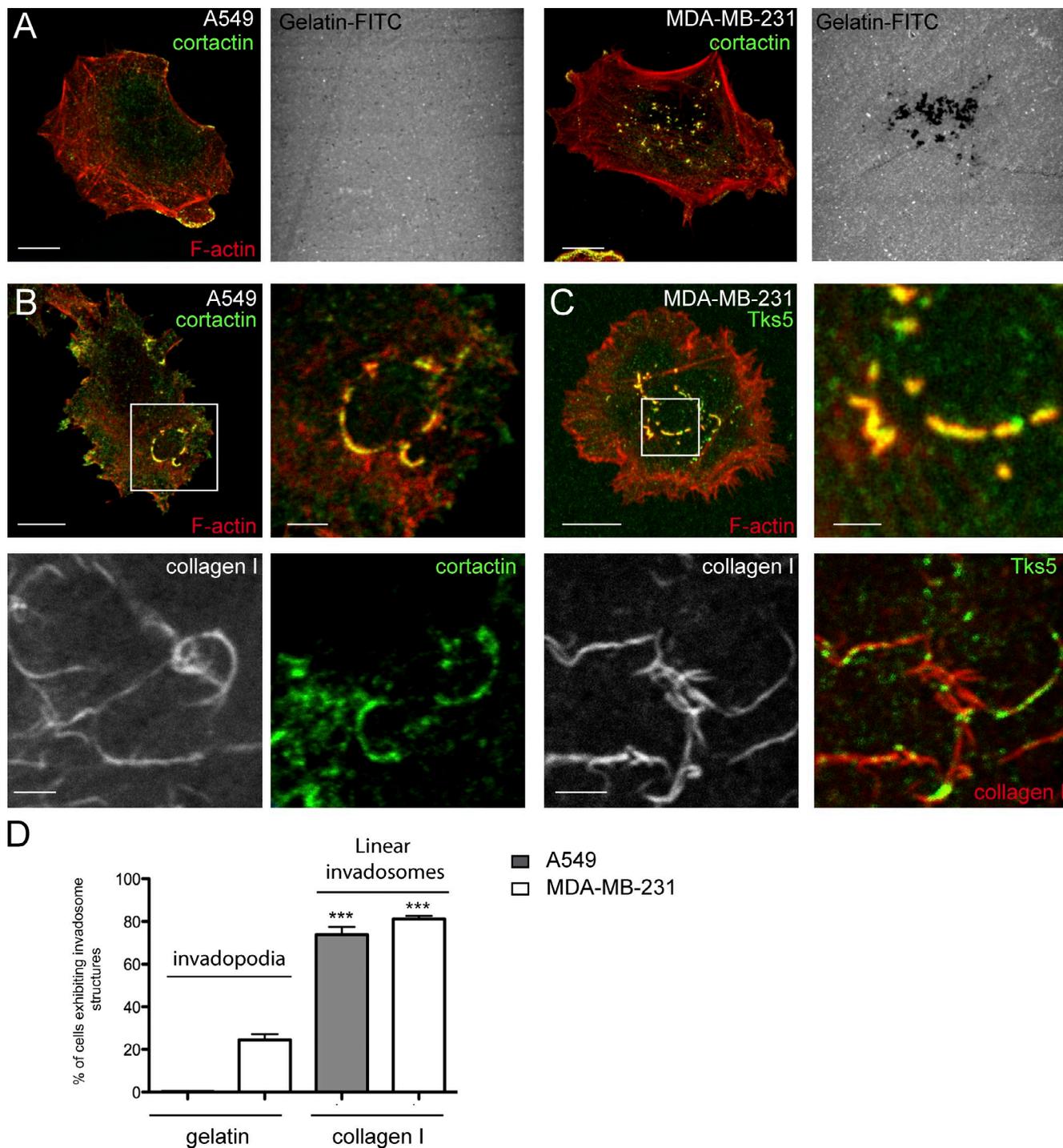


Figure 1. DDR1-expressing cells form linear invadosomes. (A) A549 (left) and MDA-MB-231 cells (right) were cultured on FITC-gelatin for 24 h. F-actin (red), cortactin (green), and degradation area (black) are shown. (B) A549 cells were seeded for 4 h on collagen I. (B, top) Colocalization of cortactin (green) and F-actin (red) at linear invadosomes. (B, bottom) Confocal images of linear invadosomes (cortactin, green) along collagen I fibrils (gray). (C) The same process was applied on MDA-MB-231 cells. (C, top) Colocalization of Tks5 (green) and F-actin (red) at linear invadosomes. (C, bottom) Confocal images of linear invadosomes (Tks5, green) along collagen I fibrils (gray and red in merge panel). Correlation coefficient of colocalization (collagen I/cortactin $r = 0.15$; collagen I/Tks5 $r = 0.28$; actin/cortactin $r = 0.30$; actin/Tks5 $r = 0.23$; $n = 10$). (D) Quantification of the percentage of A549 and MDA-MB-231 cells exhibiting invadopodia on gelatin versus linear invadosomes on collagen I. Values are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. ***, $P < 0.001$ as compared with plating on gelatin. Bars: (A) 5 μm ; (B and C, top left) 10 μm ; (B, enlarged panel on the top right) 3 μm ; (B, bottom; and C, top right and bottom) 2 μm .

collagen I-induced linear invadosomes were able to degrade not only gelatin but also collagen I fibrils themselves (Juin et al., 2012). Using second harmonic generation (SHG) microscopy

that allows collagen fibril visualization without any staining, we thus quantified the consequences of DDR1 depletion on collagen fibril degradation (Gailhouse et al., 2010). As

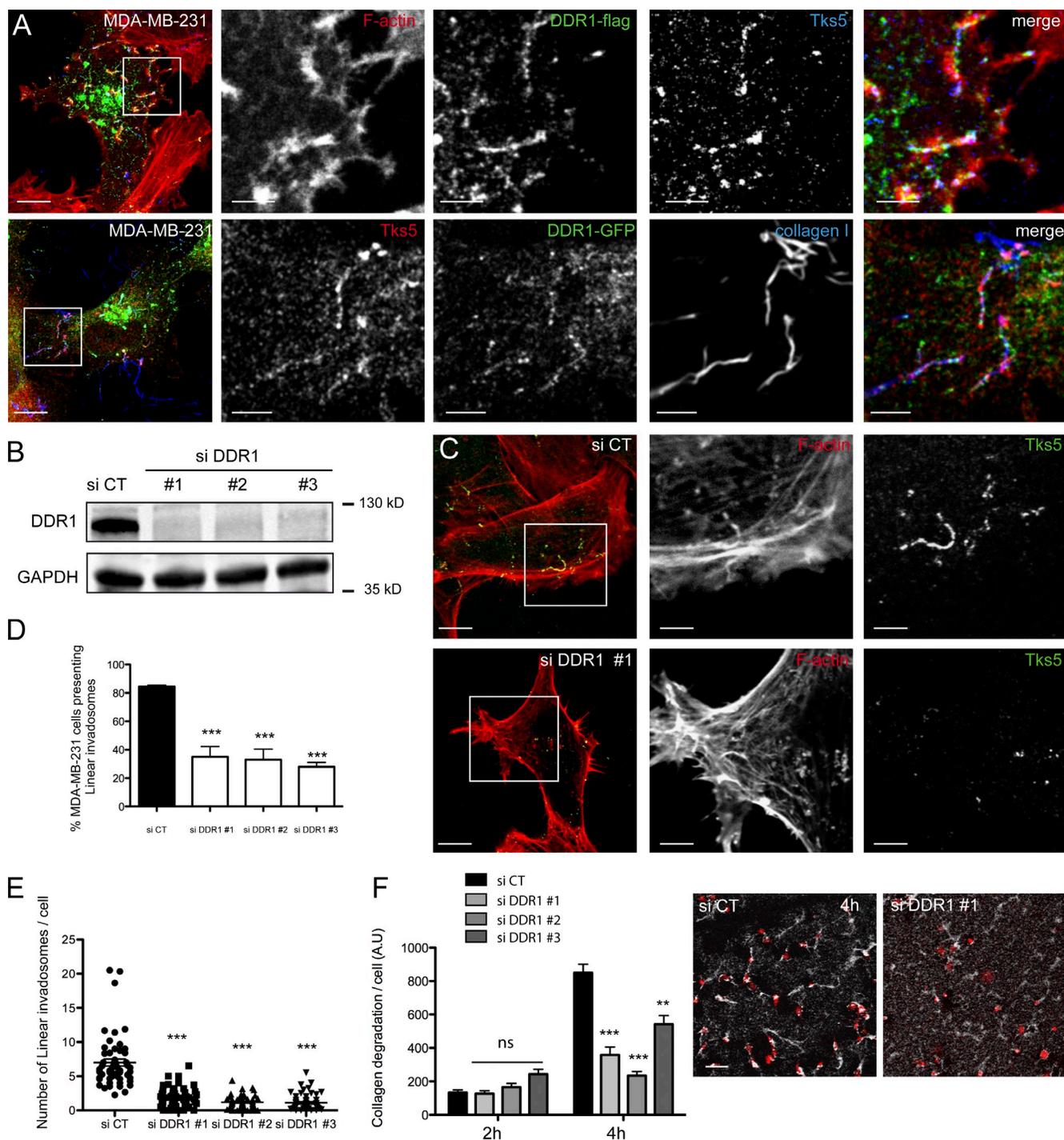


Figure 2. DDR1 localizes at linear invadosomes and is required for their formation. (A, top) MDA-MB-231 cells transiently transfected with DDR1-Flag were cultured for 4 h on collagen I. All channels of the boxed region are shown magnified on the right. F-actin (red) colocalizes with DDR1 (green) and Tks5 (blue) at linear invadosomes. (A, bottom) MDA-MB-231 cells stably expressing DDR1-GFP were cultured for 4 h on collagen I fibrils. Tks5 (red) colocalizes with DDR1 (green) and collagen I (blue). Correlation coefficient of colocalization: actin/DDR1 $r = 0.29$; DDR1/Tks5 $r = 0.11$; $n = 10$. (B) MDA-MB-231 cells were transfected with control (siCT) or three independent DDR1 siRNAs. DDR1 protein expression was analyzed by immunoblotting. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a loading control. (C) Cells transfected as in B were seeded for 4 h on collagen I. Shown are representative confocal images of MDA-MB-231 cells. Tks5 (green) and F-actin (red) are shown. Right panels show enlarged views of the boxed regions. Similar results were obtained with siDDR1 #2 and #3. (D–F) Down-regulation of DDR1 expression decreases the formation of linear invadosomes and their degradation activity. (D) Quantification of the percentage of MDA-MB-231 cells able to form linear invadosomes. Error bars represent the SEM ($n > 1,000$; three independent experiments; ***, $P < 0.001$ as compared with the control siRNA condition). (E) Quantification of the number of linear invadosomes per cell. Results are expressed as mean \pm SEM ($n > 500$; three independent experiments; ***, $P < 0.001$ as compared with the control siRNA condition). (F) Bar graph shows the amount of collagen I degraded per cell over the time. Error bars represent the SEM ($n = 60$ fields, three independent experiments; ns, not statically significant; ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.005$ as compared with the control siRNA condition). The right panel shows representative images of SHG collagen signals 4 h after seeding of control (siCT) or siDDR1 #1-transfected MDA-MB-231 cells. Cells are stained for Tks5 (red). Bars: (A and C, left panels) 5 μ m; (A and C, magnified panels on the right) 2 μ m; (E) 100 μ m.

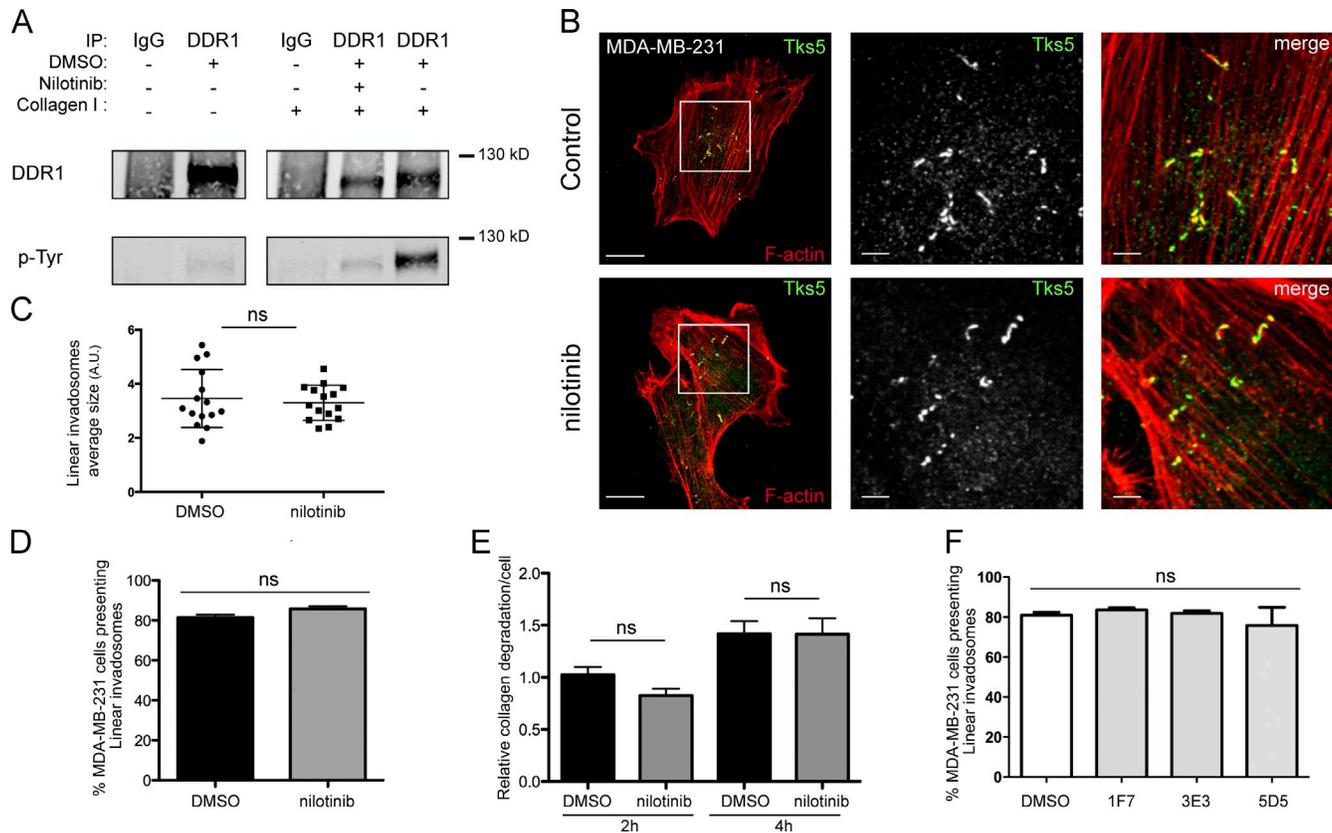


Figure 3. DDR1 kinase activity is not necessary for linear invadosome formation and degradation activity. (A) A549 cells were pretreated for 1 h with DMSO or 1 μ M nilotinib, then seeded for 4 h on collagen I. DDR1 was immunoprecipitated and its phosphorylation assessed with a phospho-tyrosine antibody. Nilotinib treatment efficiently reduced collagen-induced DDR1 phosphorylation (representative of three experiments). (B) MDA-MB-231 cells treated with DMSO or 1 μ M nilotinib were seeded on collagen I and fixed 4 h later. Shown are representative confocal images of MDA-MB-231 cells. Tks5 (green) and F-actin (red) are shown. Panels on the right show enlarged views of the boxed regions. Bars: (left) 10 μ m; (magnified panels on the right) 3 μ m. Correlation coefficient of colocalization: actin/Tks5 DMSO $r = 0.22$; nilotinib $r = 0.19$; $n = 10$. (C) The scatter plot represents the mean size of linear invadosomes in control and nilotinib conditions. $n = 15$ cells. There is no significant difference between the two conditions (ns, not statically significant). (D) Quantification of the percentage of cells forming linear invadosomes. Error bars represent the SEM ($n > 1,000$, three independent experiments). (E) Collagen degradation was monitored by SHG microscopy. The bar graph shows the amount of collagen I degraded per cell over time. Error bars represent the SEM ($n = 60$ fields, three independent experiments). (F) MDA-MB-231 cells were pretreated for 10 min with DMSO or the different blocking antibodies at 10 μ g/ml, then cultured for 4 h on collagen I. The antibodies target the discoidin-like domain, which is outside the collagen-binding site but required for signaling. Shown is the percentage of MDA-MB-231 cells able to form linear invadosomes after treatment. Values are mean \pm SEM of three independent experiments.

expected, the decrease of linear invadosome formation was correlated with a decrease in the cell capacity to degrade type I collagen fibrils (Fig. 2 F). Altogether, these results demonstrate the critical role of DDR1 in the formation and activity of type I collagen-induced invadosomes.

These results raised the question about a potential role of DDR1 in the formation and function of classical invadosomes. We thus silenced DDR1 in MDA-MB-231 and Huh6 cells, which both exhibit constitutive invadopodia. Interestingly, whereas we were not able to localize DDR1 at invadopodia, we found that decreasing DDR1 expression using two different siRNAs altered invadosome formation and decreased cell degradation capacity in MDA-MB-231 and Huh6 cells (Fig. S3).

DDR1 kinase activity is not required for linear invadosome formation and activity

As DDR1 is a tyrosine kinase receptor, we investigated the involvement of DDR1 kinase activity in linear invadosome formation and degradation function. To this end, we used nilotinib, developed as a Bcr-Abl kinase inhibitor but later shown to

inhibit DDR1 kinase activity highly efficiently (Day et al., 2008). We first confirmed using immunoprecipitation that type I collagen promoted DDR1 tyrosine phosphorylation and that nilotinib almost completely abrogated it (Fig. 3 A). We found however that nilotinib treatment did not affect linear invadosome formation (Fig. 3, B–D). Indeed, type I collagen stimulation was still able to reorganize F-actin along fibrils, and Tks5 remained associated with the structures (Fig. 3 B). As assessed by the quantification of the SHG (Fig. 3 E) or of the cleaved collagen antibody signal (Fig. S4), we also found that nilotinib treatment did not affect linear invadosome degradation activity.

Moreover, we used three independent monoclonal antibodies that block DDR1 autophosphorylation without interfering with collagen binding (Carafoli et al., 2012), and we obtained the same results (Fig. 3 F), demonstrating that linear invadosome formation and activity are indeed independent of DDR1 kinase activity. In the next part of this study, we thus aimed at understanding which signaling pathway is responsible for the role of DDR1 in linear invadosome formation.

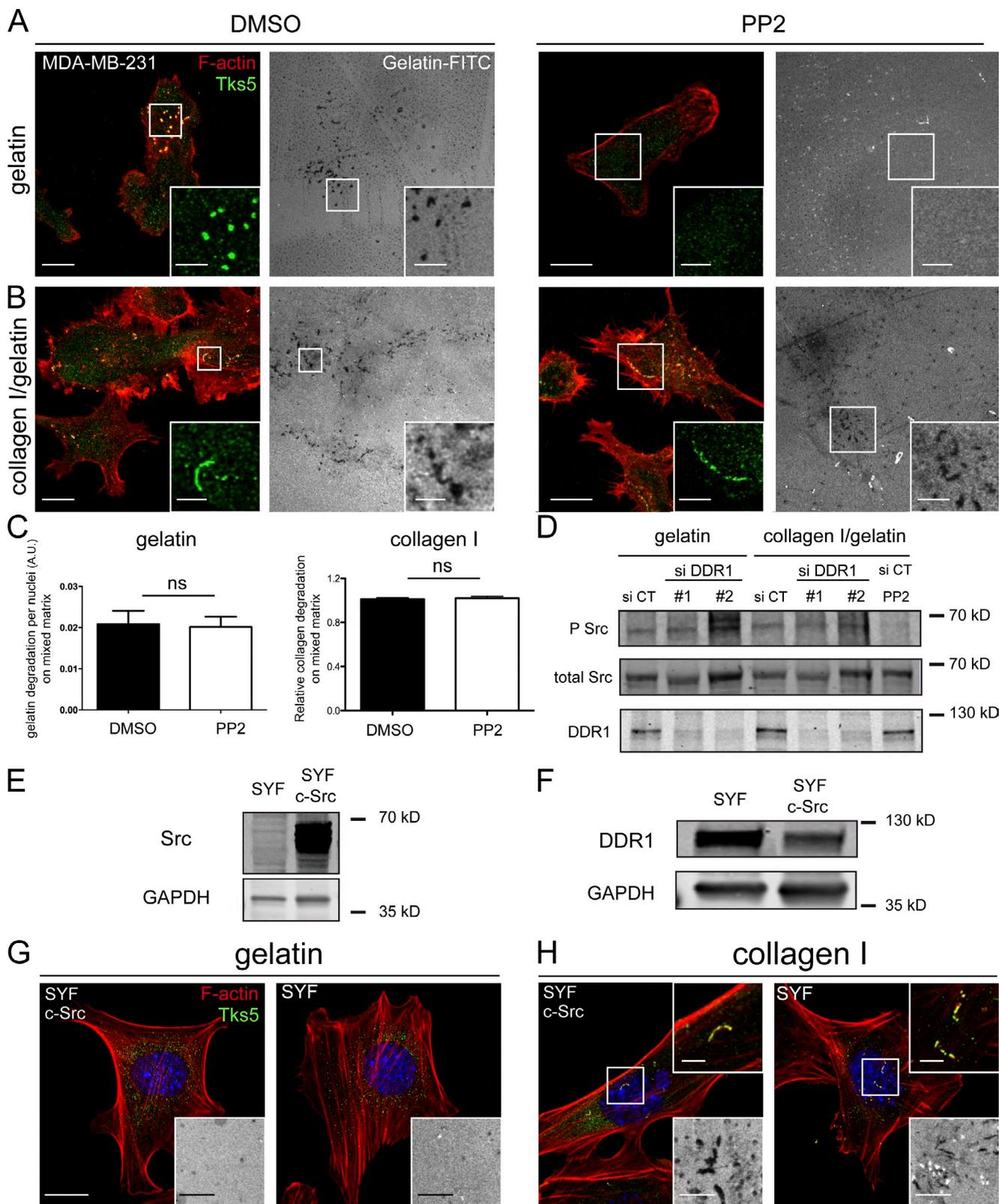


Figure 4. Linear invadosome formation and activity is independent of Src activity. (A and B) MDA-MB-231 cells were seeded on gelatin-FITC (top) or on a mixed matrix (collagen I/gelatin-FITC; bottom) and treated with 5 μ M PP2 (Src inhibitor) or DMSO (vehicle). Gelatin (gray), Tks5 (green), and F-actin (red) are shown. (C) Quantification of the degradation capacity of MDA-MB-231 cells seeded on a mixed gelatin/collagen I matrix treated or not treated with PP2. The left graph represents the gelatin area degraded per cell after 24 h. The right graph represents the amount of collagen degraded after 4 h ($n = 30$ fields). Data are shown as mean \pm SEM of three independent experiments. (D) MDA-MB-231 cells transfected with control (siCT) or two independent DDR1 siRNAs (DDR1 #1 and #2) were seeded on gelatin or collagen I and treated with PP2. Protein extracts were then analyzed by immunoblotting to determine phospho-Src, total Src, and DDR1 protein expression (representative of three experiments). (E and F) Western blots performed on SYF and SYF c-Src protein

c-Src is not involved in linear invadosome formation and activity

c-Src is well known as a key molecule implicated in the formation and activity of classical invadosomes (Tarone et al., 1985). Src inhibition or depletion is sufficient to abolish classical invadosome formation. In addition, c-Src has been shown to be required in DDR signaling for full phosphorylation after ligand binding (Dejmek et al., 2003; Yang et al., 2005). This prompted us to examine c-Src involvement in DDR1-induced linear invadosome formation. As expected, the c-Src inhibitor PP2 abolished invadopodia formation and degradation activity in MDA-MB-231 cells plated on gelatin (Fig. 4 A). Surprisingly, when MDA-MB-231 cells were seeded on type I collagen, or on a mixed matrix composed of gelatin associated with type I collagen fibrils, PP2 treatment had no impact on linear invadosome formation, on gelatin degradation (Fig. 4, B and C), or on type I collagen fibril degradation (Fig. 4 C). This latter finding is supported by the fact that the cleaved collagen signal was not modified upon PP2 treatment when compared with the control condition (Fig. S4).

Moreover, we demonstrated that DDR1 depletion did not modify c-Src phosphorylation whether cells were plated on gelatin or collagen I (Fig. 4 D). The lack of involvement of c-Src was confirmed using SYF cells, which do not express either Src, Yes, or Fyn, three members of the Src kinase family; and, as control, SYF-Src cells, which are the same cells that stably express c-Src (Fig. 4 E). We first confirmed that both cell lines express DDR1 (Fig. 4 F). We found that control and SYF cells do not exhibit invadopodia on gelatin (Fig. 4 G). However, when plated on a mixed matrix, SYF cells had the same potential as control cells to form linear invadosomes, and these invadosomes were fully active at degrading the matrix (Fig. 4 H). All these results show that c-Src is not involved in the formation or in the degradation activity of type I collagen-induced linear invadosomes.

Cdc42 is the main RhoGTPase involved in the formation of linear invadosomes

It is well established that RhoGTPases, principally RhoA, Rac1, and Cdc42, control actin cytoskeleton remodeling and invadosome formation (Linder et al., 2011). Using siRNAs targeting these three proteins, we investigated their respective involvement in linear invadosome formation. We used two distinct siRNAs per GTPase and first checked their efficiency by specifically depleting their corresponding targets (Fig. 5 A). We then measured their impact on linear invadosome formation. We found that only Cdc42 depletion had an impact on linear invadosome formation (Fig. 5, B and C). We then expressed constitutively active and inactive forms of Cdc42 in MDA-MB-231 cells seeded on type I collagen fibrils. We found that the constitutively active form of Cdc42, GFP-V12Cdc42, colocalized with linear invadosomes (Fig. 6 A), unlike the Cdc42 dominant-negative form, GFP-N17Cdc42 (Fig. 6 B). Moreover, we

found that expression of GFP-V12Cdc42 enhanced the ability of MDA-MB-231 cells to form linear invadosomes, whereas expression of GFP-N17Cdc42 had the opposite effect (Fig. 6 C). It has been shown that type I collagen fibrils can promote Cdc42 activation (Sato et al., 2003). We thus analyzed the activity level of Cdc42 in cells plated on type I collagen fibrils with or without depletion of DDR1. We first confirmed that type I collagen significantly promoted Cdc42 activation, and found that this effect of type I collagen was abolished in cells with DDR1 depletion (Fig. 6 D). This result was strengthened by the colocalization of DDR1 with the active form of Cdc42 (Fig. 6 E). In addition, using the Raichu Cdc42 biosensor (Itoh et al., 2002) on living cells seeded on type I collagen, we showed a signal corresponding to activated Cdc42 along collagen fibrils (69 hits with a high FRET ratio along collagen fibrils out of 79 cells observed; Fig. 6 F). All these data show that Cdc42 is involved in relaying the collagen I signal through DDR1 for the formation of linear invadosomes.

Tuba, a Cdc42-specific guanine nucleotide-exchange factor (GEF), is required for linear invadosome formation

To go further concerning the link between DDR1 and Cdc42, we searched for a GEF involved in Cdc42 activation upon type I collagen fibril induction. For this purpose, we performed an RNAi screen targeting 14 Cdc42-specific GEFs (Table S1) on cell ability to form linear invadosomes (Cook et al., 2014). Our screen revealed that the depletion of the GEF Tuba impacts on linear invadosome formation. Tuba is a Cdc42-specific GEF but also acts as a scaffold protein to link dynamin with actin regulatory proteins such as N-WASP. To confirm this result, we used two distinct siRNAs to deplete Tuba expression in MDA-MB-231 and A549 cells (Fig. 7, A and B). We demonstrated that Tuba depletion induces a decrease in cell ability to form linear invadosomes in both cell types (Fig. 7, A–C). In addition, we observed a colocalization between DDR1 and Tuba in linear invadosomes of DDR1-GFP-expressing cells that supports a link between these two molecules (Fig. 7 D). Thus, this is the first demonstration of the involvement of Tuba in invadosome formation. To address Tuba participation in classical invadopodia, we analyzed Tuba localization in MDA-MB-231 cells seeded on gelatin. Interestingly, Tuba did not colocalize with classical invadosomes while it was present on linear invadosomes (Fig. 7 E). These data suggest that DDR1 can recruit Tuba that can specifically activate Cdc42 to induce linear invadosome formation.

DDR1 depletion decreases cancer cell invasion capacities

DDR1 is known to be involved in cancer cell invasion and metastasis induction (Valiathan et al., 2012). Because type I collagen fibrils are part of the tumor microenvironment, we studied

extracts representing, respectively, protein expression of Src and DDR1. GAPDH was used as a loading control. (G and H) Confocal images of control cells (SYF c-Src) and SYF fibroblasts cultured on gelatin (G) or on a mixed matrix (gelatin/collagen I; H) for 24 h and processed for immunofluorescence staining (F-actin, red; Tks5, green; DAPI, blue). Insets on the bottom show gelatin-degraded pictures. Bars: (A, G, and H) 10 μ m; (A, insets) 7 μ m; (H, top insets) 2 μ m; (G and H, bottom insets) 10 μ m.

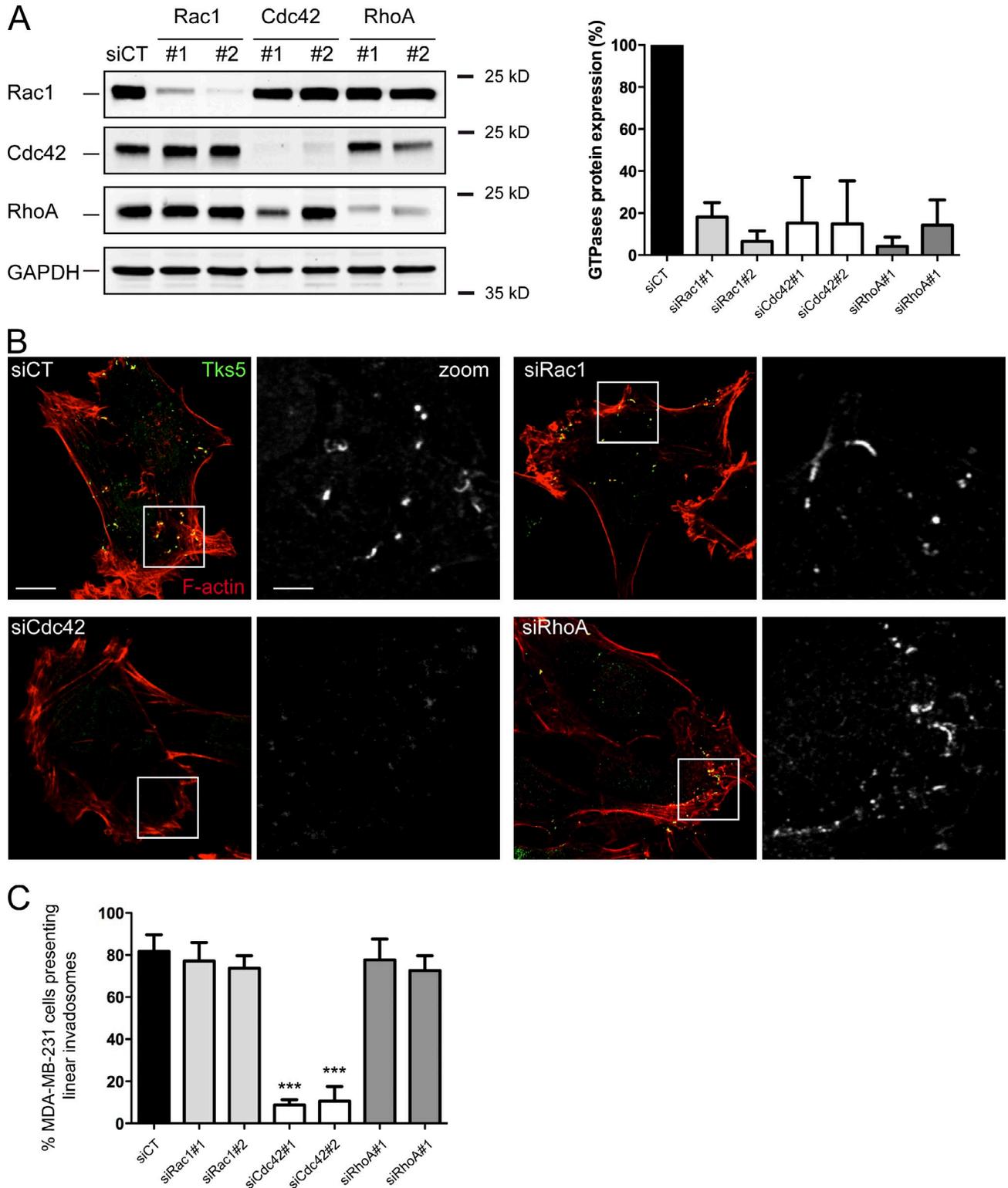


Figure 5. **Cdc42 drives linear invadosome formation via DDR1.** (A) Western blot analysis of MDA-MB-231 cells transfected with siRNA control (siCT) or two independent siRNAs targeting Rac1, Cdc42, or RhoA. GAPDH is used as a loading control. Three independent experiments were realized and quantified to demonstrate a specific effect on targeted RhoGTPase expression represented on the bar graph on the right. (B and C) MDA-MB-231 cells transfected as in A were cultured on collagen I for 4 h, fixed, and processed for immunofluorescence staining. (B) Representative confocal images of MDA-MB-231 cells transfected as in A. Tks5 (green) and F-actin (red) are shown. Panels on the right show enlarged views of the boxed regions. Bars: (left) 10 μ m; (enlarged panels on the right) 2.5 μ m. (C) The percentage of siRNA-transfected MDA-MB-231 cells able to form linear invadosomes was quantified. Error bars represent the SEM ($n > 1,000$, three independent experiments; ***, $P < 0.001$ as compared with the control siRNA condition [siCT]).

Downloaded from jcb.rupress.org on November 26, 2014

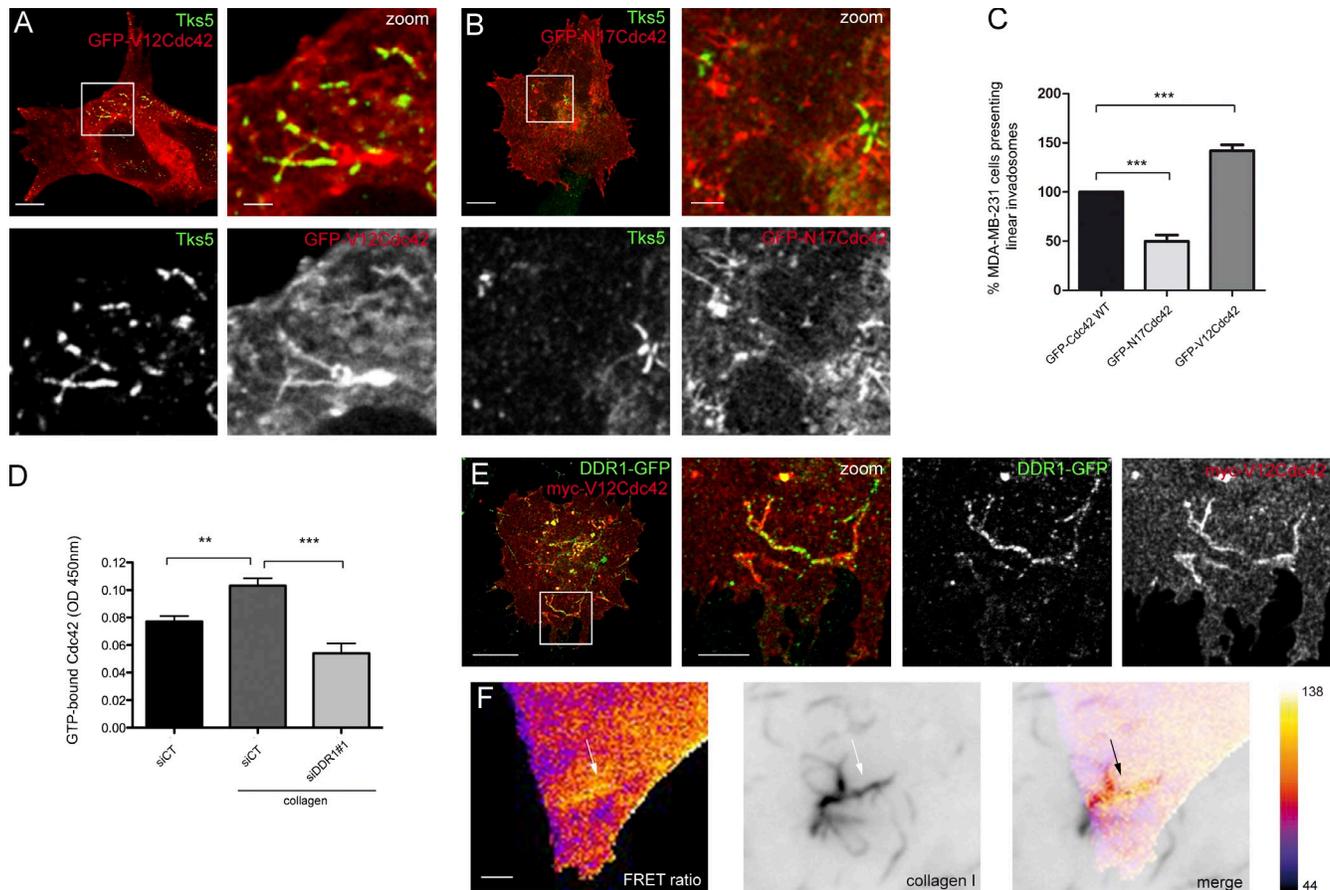


Figure 6. Activated Cdc42 colocalizes with linear invadosomes, DDR1, and collagen I fibrils. (A and B) MDA-MB-231 cells transiently transfected with GFP-V12Cdc42 or GFP-N17Cdc42 were cultured for 4 h on collagen I. Tks5 (green) colocalizes with GFP-V12Cdc42 (red) at linear invadosomes whereas GFP-N17Cdc42 (red) does not. Panels on the right show enlarged views of the boxed regions. Correlation coefficient of colocalization: Tks5/V12Cdc42 $r = 0.21$; Tks5/N17Cdc42 $r = -0.11$ ($n = 25$). (C) Quantification of the percentage of GFP-WT Cdc42-, GFP-V12Cdc42-, and GFP-N17Cdc42-transfected cells able to form linear invadosomes. Data are mean \pm SEM ($n > 500$, three independent experiments; ***, $P < 0.001$). (D) Active Cdc42 level was monitored in MDA-MB-231 cells treated as indicated. Data are mean \pm SEM, three independent experiments. **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.001$. (E) MDA-MB-231 stably expressing DDR1-GFP transiently transfected with myc-V12Cdc42 were seeded for 4 h on collagen I (DDR1-GFP, green; myc-V12Cdc42, red). Panels on the right show an enlarged view of the boxed region. Correlation coefficient of colocalization: DDR1/mycV12Cdc42 $r = 0.15$ ($n = 10$). (F) MDA-MB-231 cells were transfected with Raichu-Cdc42 and seeded on labeled collagen I. Shown are representative images: on the left, the pseudocolored ratio image generated from YFP/CFP ratio images represents the FRET ratio, which correlates with the Cdc42 activity (in yellow); and on the right, a collagen I image. Arrows represent colocalization of active probe and collagen I fibrils. Bars: (A and B, left) 5 μ m; (A and B, right) 2.5 μ m; (E, left) 7 μ m; (E, enlarged panels on the right) 2 μ m; (F) 3 μ m.

whether DDR1 was involved in the invasion of a 3D collagen gel by linear invadosome-bearing tumor cells. We first demonstrated that MDA-MB-231 cells were able to form linear invadosomes in a 3D collagen gel (Fig. 8 A). We further used an invasion assay (Lopez et al., 2005) consisting of a type I collagen gel polymerized into Boyden chambers. Gels were polymerized at a 1 mg/ml concentration of type I collagen at 37°C for 1 h. In this condition, cells need proteolysis to invade the gel according to the study of Wolf et al. (2013). Cells were seeded on top of the collagen gel and fixed after 1 h and 3 d. We confirmed that DDR1 depletion remained constant over the studied time frame (Fig. 8 B). Using quantitative confocal z-stack analysis (Fig. 8 C), we found that DDR1 depletion blocked the cell's ability to invade the collagen gel. In the control condition, approximately half of the cells were able to invade the gel (Fig. 8 D). In contrast, DDR1 down-regulation abolished cell invasion. Confocal analysis showed that after 3 d, most of

the DDR1-silenced cells remained stacked at the gel surface and did not enter into the gel (Fig. 8 E). To control that cells used a proteolysis-dependent mode of migration to invade the collagen gel, we used an MMP inhibitor, GM6001. We found that GM6001 totally blocked the cell's ability to penetrate the gel, demonstrating the MMP involvement in this process (Fig. S5, A and B). Consequently, GM6001 treatment abolished the cleaved collagen signal observed in the control condition (Fig. S5 C). As PP2 and nilotinib treatments did not inhibit type I collagen degradation in 2D (Fig. S4), we also checked for cell invasion in 3D in these conditions. PP2 treatment did not have an impact on cell invasion, whereas nilotinib treatment only induced a slight decrease in the cell capacity to invade the collagen gel (Fig. S5, A and B). These data demonstrate the crucial involvement of DDR1 in type I collagen matrix invasion, which we found to be MMP dependent and Src independent.

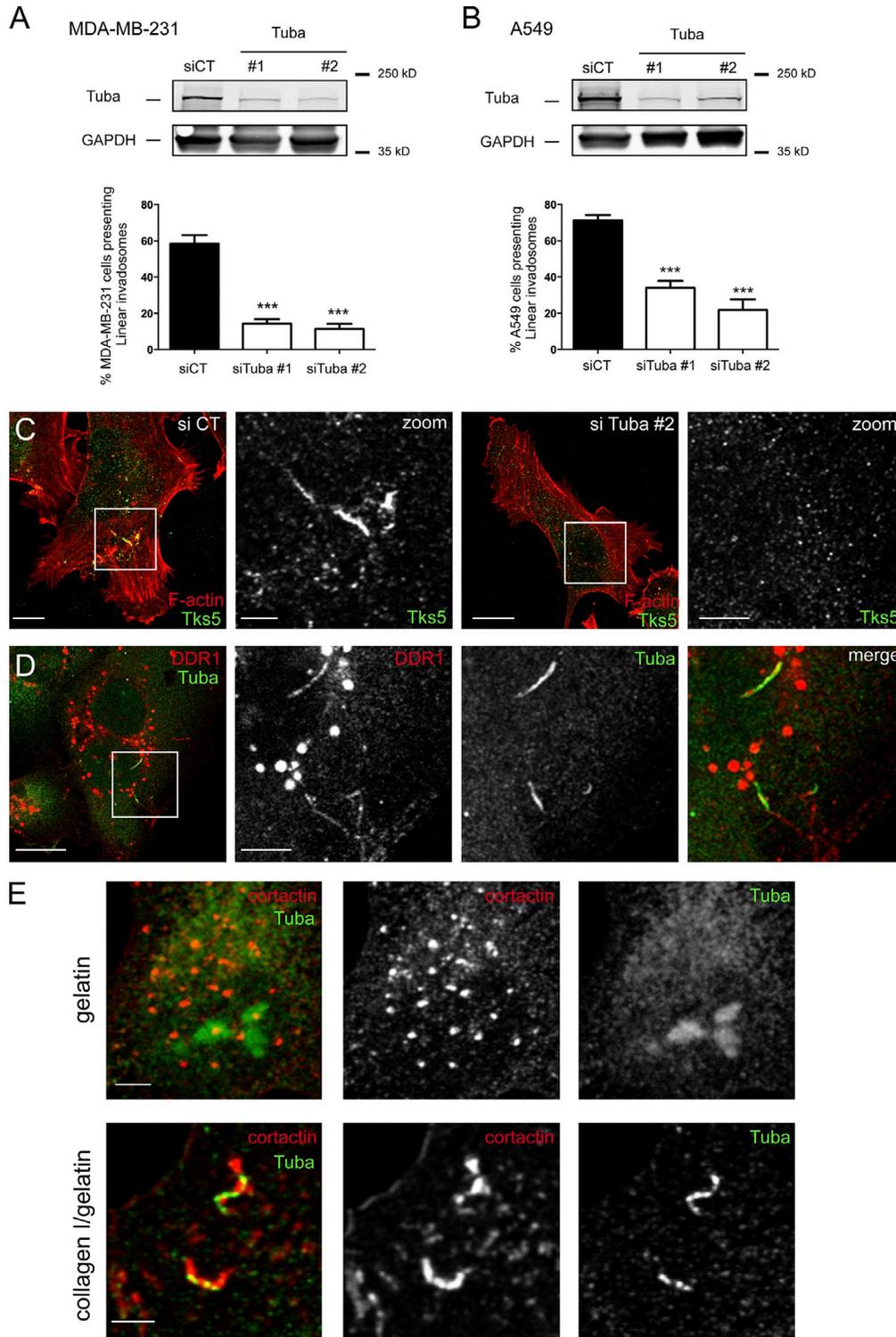


Figure 7. The GEF Tuba is specifically implicated in linear invadosome formation. (A and B) From left to right, MDA-MB-231 and A549 cells were transfected with control (siCT) or two independent Tuba siRNAs (Tuba #1 and #2). Tuba protein expression was analyzed by immunoblotting. GAPDH was used as a loading control. The graphs show quantification of the percentage of cells able to form linear invadosomes. Error bars represent the SEM ($n = 900$, three independent experiments; $***, P < 0.001$ as compared with the control siRNA condition). (C) MDA-MB-231 cells were treated as in A and seeded for 4 h on collagen I. Shown are representative confocal images of MDA-MB-231 cells. Tks5 (green) and F-actin (red) are shown. Panels on the right show enlarged views of the boxed regions. Similar results were obtained with siTuba #2. Tuba extinction decreases the capacity of cells to form linear invadosomes. (D) MDA-MB-231 cells stably expressing DDR1-GFP were seeded for 4 h on collagen I and fixed. Immunofluorescence with endogenous Tuba (green) and DDR1-GFP (red) was performed and reveals a colocalization of the GEF Tuba with DDR1. Right panels show enlarged views of the boxed region. Correlation coefficient of colocalization: DDR1/Tuba $r = 0.15$ ($n = 10$). (E) MDA-MB-231 cells were seeded on gelatin (top) or mixed matrix (collagen I/gelatin) for 24 h and 4 h, respectively, then processed for immunofluorescence staining (cortactin, red; Tuba, green). While Tuba is not present on classical invadosomes, it colocalizes with cortactin on linear invadosomes. Bars: (C, left) 5 μm ; (C, enlarged panels on the right) 2 μm ; (D, left) 10 μm ; (D, enlarged panels on the right) 3 μm ; (E) 3 μm .

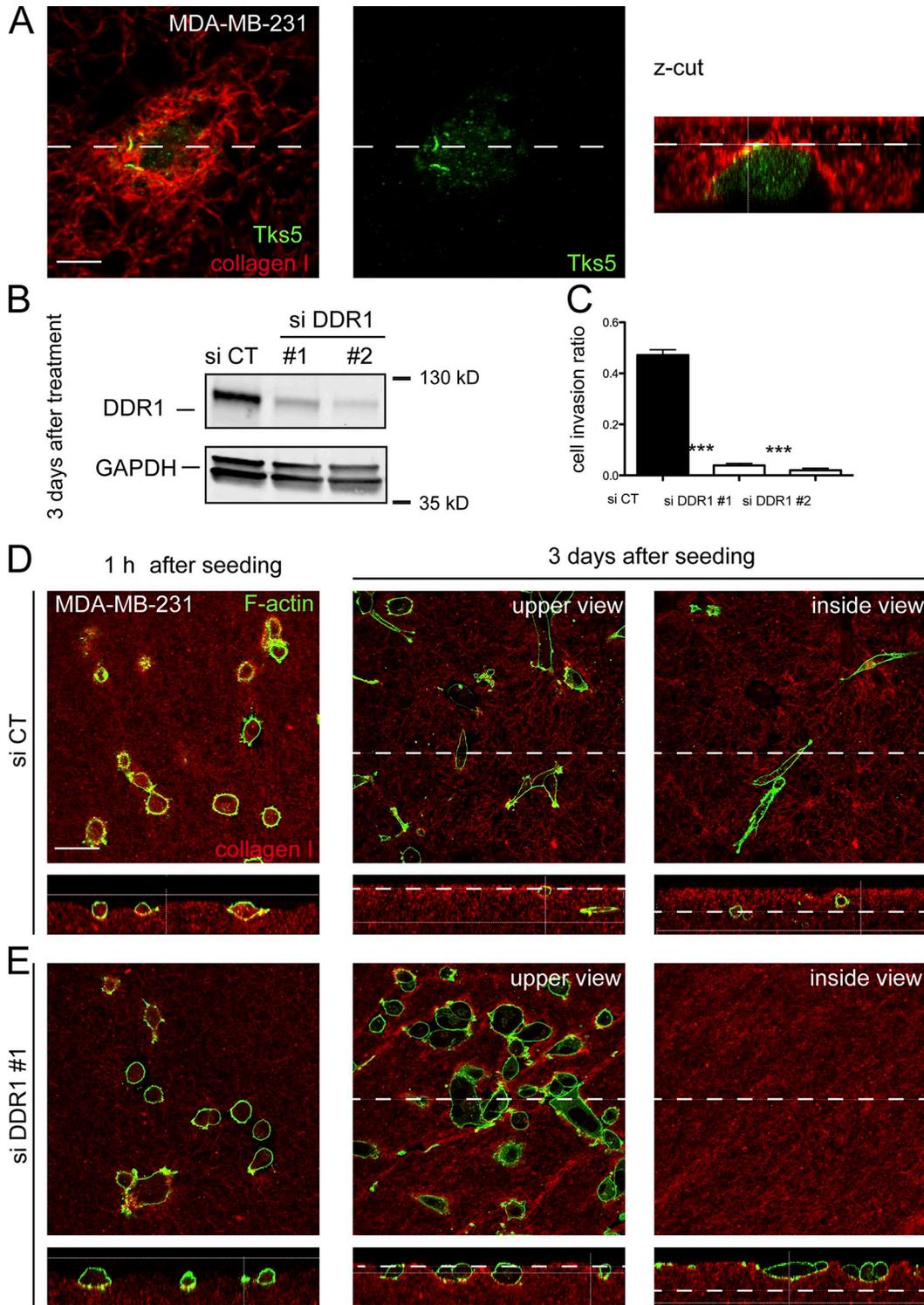


Figure 8. DDR1 is required for invasion of invadosome-bearing cells in 3D collagen matrix. (A) MDA-MB-231 cells were placed for 4 h into a 3D collagen gel (red), fixed, and processed for immunofluorescence staining (Tks5, green). The z-cut section is shown on the right. The broken line on the left panel corresponds to the focal plane shown in the z-cut section. (B) DDR1 expression in MDA-MB-231 cells transfected with control siRNA (siCT) or two siRNAs targeting DDR1 (siDDR1 #1 and #2) was monitored 3 d after cell seeding (anti-DDR1 [D1G6]; Cell Signaling Technology). (C–E) MDA-MB-231 cells transfected as in B were seeded for an invasion assay and allowed to invade the collagen matrix for 1 h or 3 d. Z confocal optical sections were taken. (C) Assays were quantified by measuring an invasion index. The bar graph represents the ratio of the number of MDA-MB-231 cells penetrating the collagen gel/number of seeded cells. Data are expressed as mean \pm SEM (three independent experiments). ***, $P < 0.001$ as compared with control siRNA (siCT). (D and E) Representative confocal images of MDA-MB-231 cells transfected with control siRNA (siCT) or siRNA targeting DDR1 seeded on collagen I fibrils. F-actin, green; collagen I fibrils, red. Images were taken 1 h (left) or 3 d after seeding (middle and right). Top panels correspond to focal planes whereas bottom panels represent matched z-cut sections. The broken lines on the bottom panel correspond to focal planes. 1 h after seeding, MDA-MB-231 cells transfected with control or siDDR1 #1 are on the top of the gel. 3 d later, control MDA-MB-231 cells deeply invaded the collagen plug (D, right), whereas DDR1-depleted cells were still on the top of the collagen plug (E, right). Bars: (A) 5 μ m; (D and E) 50 μ m.

Downloaded from jcb.rupress.org on November 26, 2014

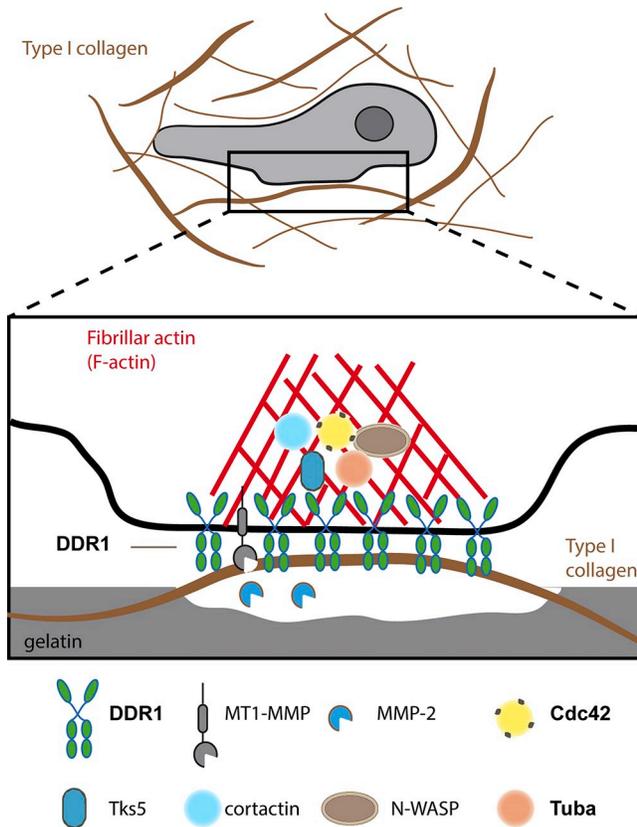


Figure 9. **DDR1 controls linear invadosome formation via Tuba-dependent Cdc42 activation.** Schematic representation of linear invadosome architecture and molecular composition. When cells are seeded on fibrillar type I collagen, DDR1 is activated along the fibrils, leading to the activation of Cdc42 via Tuba GEF and recruiting classical components of invadopodia such as N-WASP, cortactin, and scaffold protein Tks5 to form linear invadopodia. Linear invadopodia are able to degrade extracellular matrix elements via MT1-MMP and MMP2 (Juin et al., 2012).

Discussion

This study has revealed the link between the collagen receptor DDR1 associated with the development of metastasis, and invadosomes, which are protrusive F-actin structures used by tumor cells to degrade the ECM and promote invasion. Herein, we confirmed our previous findings showing the importance of type I collagen fibrils as powerful invadosome inducers (Juin et al., 2012) and extend them to cancer cells. Most cell types are able to form linear invadosomes, including endothelial cells, fibroblasts, cancer cells, Src-transformed cells (Juin et al., 2012), or, as shown by another group, megakaryocytes (Schachtner et al., 2013). We demonstrated that the simple contact of cancer cells with type I collagen fibrils can promote formation of linear invadosomes and consequently activate their capacity to degrade the ECM. In the case of cancer cells constitutively exhibiting invadopodia, type I collagen fibrils induced their reorganization into linear invadosomes, increased the percentage of cells presenting linear invadosomes as compared with classical invadopodia, and also increased the capacity of the cells to degrade the ECM. Owing to their capacity to localize the degradation machinery along fibrils, linear invadosomes could

be implicated in the proteolytic breakdown of the ECM, which favors invasive migration, either in physiological conditions such as angiogenesis, or in pathological situations such as cancer. Thus, there is a great interest in developing our understanding of the molecular pathways required for the formation and function of linear invadosomes.

Although integrins are required for the formation and activity of classical invadosomes (Destaing et al., 2010; Beaty et al., 2013), we found that they are not necessary for linear invadosome formation (Juin et al., 2012), thus raising the question of the identity of the collagen receptor responsible for their formation. Four major classes of vertebrate transmembrane receptors are known to interact directly with the native collagen triple helix: collagen-binding $\beta 1$ integrins, DDRs, glycoprotein VI (GPVI), and leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1; Hidalgo-Carcedo et al., 2011; Leitinger, 2011). Our own data eliminated $\beta 1$ integrins (Juin et al., 2012). Because GPVI is present only on platelets and LAIR-1 on leukocytes, we turned our attention to the DDRs, which are ubiquitously expressed.

We found that DDR1 colocalized within linear invadosomes, and, using a RNAi approach, found that it was involved in their formation and in their ability to degrade type I collagen fibrils. These results establish DDR1 as the collagen I receptor required for linear invadosome formation (Fig. 9) and raise the question of DDR1's role in classical invadosomes. We showed that DDR1 depletion decreased classical invadosome formation and activity. Importantly, the effect of DDR1 on classical invadosomes was observed on gelatin, which is not known as a DDR1 substrate. Accordingly, we were unable to colocalize DDR1 with classical invadosomes. However, these data suggest an involvement of DDR1 in classical invadopodia. Because DDR1 controls integrin activation (Xu et al., 2012), it could modulate invadosome formation and activation directly or indirectly. Moreover, DDR1 and integrins present common signaling pathways, which suggests a cooperative action to form classical invadosomes (Shintani et al., 2008).

Because DDR1 is an RTK, we investigated the role of its kinase activity in invadosome formation. We demonstrated, using nilotinib as an inhibitor as well as blocking antibodies, that DDR1 kinase activity is not necessary for the formation of linear invadosomes. This is in agreement with our previous observations. Indeed, we found that linear invadosomes already appear within 10 min of cell seeding on type I collagen, a kinetic that is not compatible with DDR autophosphorylation, a slow process requiring >30 min before being detectable (Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997; Juin et al., 2012). Interestingly, it was previously shown that the role of DDR1 in promoting collective migration was also independent of its kinase activity (Hidalgo-Carcedo et al., 2011). In our hands, the lack of requirement for c-Src activity, demonstrated with both a pharmacological antagonist and the use of SYF cells, is also in line with these findings because it was shown that c-Src was necessary for the full DDR phosphorylation (Dejmeck et al., 2003; Yang et al., 2005). In addition, although c-Src has been historically associated with invadosomes, our data show that collagen I-induced invadosomes are independent of c-Src

activity. Thus, linear invadosomes are the first described c-Src kinase-independent invadosomes.

How then does DDR1 signal for invadosome formation? As the RhoGTPases RhoA, Rac1, and Cdc42 have been largely involved in invadosome formation and organization, we investigated their role in DDR1-dependent linear invadosome formation. We clearly showed that only Cdc42 is involved. This is supported by the drastic effect of Cdc42 silencing, the blockage of collagen I-induced Cdc42 activation in cells transfected with DDR1 siRNAs, and the localization of the active form of Cdc42 (GFP-V12Cdc42 protein and Cdc42 biosensor) at linear invadosomes. Conversely, the GFP-N17Cdc42 dominant-negative form decreased the cell's ability to form linear invadosomes on collagen and did not colocalize with linear invadosomes. Most invadosome models are controlled and regulated by several Rho-GTPases. Our results are thus important, as only very few models have been described so far in which only Cdc42 and not RhoA or Rac1 are implicated in invadosome formation. This specificity of linear invadosomes, together with their restricted molecular composition, which we reported previously (Juin et al., 2012), supports the idea that collagen-induced invadosomes correspond to a minimal form of invadosomes (Di Martino et al., 2014). Intriguingly, another study showed that overexpression of tagged forms of DDR1 in MDCK cells decreased Cdc42 activation by collagen (Yeh et al., 2009). The reason for this discrepancy is unclear, but it may be relevant to explain why MDCK cells are unable to form linear invadosomes and to degrade the ECM upon collagen stimulation (unpublished data).

Altogether, our data demonstrated that collagen I-induced invadosomes rely on a DDR1, Cdc42-dependent pathway (Fig. 9). We further identified Tuba as the major Cdc42GEF involved in linear invadosome formation. Several other Cdc42GEFs such as FGD1 or Vav1 were shown to be involved in invadopodia formation (Ayala et al., 2009; Razidlo et al., 2014), but this is the first demonstration of the involvement of Tuba. Moreover, Tuba colocalized with DDR1 into linear invadosomes but not with classical invadosomes, which allowed us to identify Tuba in addition to DDR1 as a specific marker of linear invadosomes. Tuba is a 177-kD protein containing four SH3 domains in its N terminus: a central GEF domain, followed by a BAR domain and two SH3 domains in the C terminus (Cestra et al., 2005; Xu et al., 2012). The involvement of Tuba is in line with the involvement of N-WASP in linear invadosomes, as Tuba was shown to be involved in N-WASP-dependent cytoskeletal rearrangements (Salazar et al., 2003; Kovacs et al., 2006). Though we describe here the involvement of Tuba in MDA-MB-231 and in A549 cells, it is now clear that each cancer cell expresses its own pattern of GEFs among the 70 RhoGEFs in the human genome, (Cook et al., 2014; Razidlo et al., 2014), which suggests that other GEFs may also be involved in linear invadosome formation according to the cell type. In addition, the link between DDR1 and Tuba is probably not direct, as we were not able to show an interaction between both proteins. Indeed, other DDR1-interacting proteins could also be involved. For instance, on one hand several studies have identified DDR1 partners previously linked to the invadosome machinery (Murphy and Courtneidge, 2011), like PYK2 (Shintani et al., 2008), Nck2

(Koo et al., 2006), and PI3K (Dejmek et al., 2003), whereas others found DDR1-interacting partners that bind DDR1 regardless of its phosphorylation status, like Syk (Dejmek et al., 2005), E-cadherin (Hidalgo-Carcedo et al., 2011), and the Par3/Par6 cell polarity proteins (Hidalgo-Carcedo et al., 2011). Further studies will tell if these proteins are involved in the role of DDR1 on linear invadosome formation and activation.

In our study, we confirmed the role of DDR1 in cell invasion. However, interestingly, we established that inhibition of Src with PP2 or of DDR1-kinase activity with nilotinib did not affect drastically type I collagen degradation and cell invasion. This differs from the findings from other studies showing an impact of PP2 treatment on cell invasion (Angers-Loustau et al., 2004). This point could be explained by the conditions used to perform these assays such as the use of a non-type I collagen matrix, the collagen source, or the absence of serum starvation. It is clear that the kinase activity of the receptor is crucial for DDR1 signaling that promotes, for example, cell proliferation. But we demonstrated here that cells can sense type I fibrils and start a degradation process independent of its kinase activity and in the absence of a requirement for c-Src.

Thus, upon contact with type I fibers, DDR1 is able to recruit the actin machinery associated with a strong matrix degradation activity. Although the proteolytic mechanisms used by linear invadosomes are still being investigated, a recent study has shown that the Scar homologue (WASH) and the exocyst complex are involved in delivering MT1-MMP-positive late endosomes focally to linear invadosomes (Monteiro et al., 2013). It is well known that MMPs, such as pro-MMP2, can be activated by the culture of cells on fibrillar collagen I (Azzam and Thompson, 1992; Ruanganpanit et al., 2001) in an MT1-MMP-dependent manner (Takino et al., 2004). Thus, we propose that DDR1 is the sensor used by tumor cells to interact with fibrillar collagen I, leading to the organization of invadosomes that concentrate the proteolytic machinery of the cells to facilitate invasiveness. Because of its capacities to stimulate cell invasion and its overexpression in different cancers, DDR1 should be a good target for the prevention of metastasis.

Materials and methods

Antibodies, reagents, and constructs

Nilotinib, anti-Tks5 (rabbit, M-300), anti-DDR1 (rabbit, C-20), anti-GAPDH (mouse, FL-335), anti-myc (mouse, 9E10), and anti-RhoA (mouse, 26C4) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. Mouse anti-DDR1 monoclonal antibodies (1F7, 1F10, 3E3, and 5D5) were provided by B. Leitinger (National Heart and Lung Institute, Imperial College London, London, England, UK) and produced as described previously (Carafoli et al., 2012). Mouse anti- β -actin (clone AC-15), anti-tubulin (T6074), and anti-Flag (clone M2) antibodies were purchased from Sigma-Aldrich. We also used anti-DDR1 (rabbit, D1G6) from Cell Signaling Technology. Anti-cortactin (mouse, p80/85), anti-Rac1 (mouse, 23A8), anti-Src CT (rabbit, clone NL19), anti-phospho-Src (mouse, Tyr416), and anti-phosphotyrosine (mouse, 4G10) antibodies and GM6001 were purchased from EMD Millipore. Anti-Cdc42 (mouse, clone 44) antibody was purchased from BD. PP2 was from Abcam. Anti-collagen type I cleavage site antibody (rabbit, Col1 3/4 short C) was purchased from immunoGlobe. Rabbit polyclonal anti-Tuba antibody was provided by P. De Camilli (Yale University, New Haven, CT; Salazar et al., 2003; Cestra et al., 2005). Secondary antibodies FluorProbes 488, 547H, and 647H anti-rabbit and anti-mouse antibodies were purchased from Interchim. F-actin was stained with Phalloidin-FluorProbes 647, 547H, 488, or 405 (Interchim). Hoechst 34580 (Invitrogen) was used to

stain nuclei. To visualize the collagen I network, we labeled 0.4 mg/ml fibrillar collagen I with 10 µg/ml Alexa Fluor 546 or 647 carboxylic acid succinimidyl ester (Invitrogen).

pDDR1-Flag construct was provided by M. Bendeck (Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada). Human DDR1 full length fused to flag sequence was cloned in pcDNA3.1/Zeo (-) using EcoRI-BamHI cloning sites, placed under the control of a cytomegalovirus (CMV) promoter. pEGFP-Cdc42 WT, pEGFP-V12Cdc42, myc-V12-Cdc42, and pEGFP-N17Cdc42 have been described previously (Moreau et al., 2003). GFP-Cdc42-tagged constructs were cloned in pEGFP-C1 using BglIII-KpnI cloning sites and placed under the control of a CMV promoter. pLVX-EF1α-DDR1-acGFP was constructed from pcDNA3.1/zeo-DDR1-myc (provided by G.D. Longmore, ICCE Institute, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO; Zhang et al., 2013) by subcloning DDR1 full length under the control of an EF1α promoter into pLVX-EF1α-acGFP-N1 (Takara Bio Inc.) using Afel and BamHI restriction sites. pRaichu-Cdc42 was provided by M. Matsuda (Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto, Japan; Aoki and Matsuda, 2009). pRaichu-Cdc42 was derived from the pCAGGS eukaryotic expression vector and encoded a chimeric protein, Raichu-Cdc42. pLifeact-mRuby lentiviral vector was obtained by subcloning Lifeact-mRuby from pmRFP-mRuby-Lifeact, provided by R. Wedlich-Soldner (Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany; Riedl et al., 2010), using BglII and SpeI restriction sites in pRRLsin-MND-MCS-WPRE lentiviral plasmid, placed under the control of an MND promoter. pTks5-GFP was provided by S.A. Courtneidge (Sanford-Burnham Medical Research Institute, La Jolla, CA). Human Tks5 was cloned in pcDNA3.1/Zeo (-) using XhoI-Kpn I cloning sites, placed under the control of a CMV promoter.

Cell culture

MDA-MB-231 cells (human breast cancer cell line) were from American Type Culture Collection and were maintained in L-15 medium and Glutamax-I (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum and 100 U/ml penicillin-streptomycin (Invitrogen). A549 (human lung adenocarcinoma cell line) were from Sigma-Aldrich, provided by F. Delom (INSERM, Bordeaux, France), and SYF and SYF c-Src fibroblasts were from A. Wiedmann (INRA Val de Loire, Tours, France; Klinghoffer et al., 1999). Huh6 cells (human hepatoblastoma cell line) were provided by C. Perret (Cochin Institute, Paris, France). A549 and SYF cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with 4.5 g/liter glucose Glutamax-I (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (Pan Biotech GmbH) and 100 U/ml penicillin-streptomycin (Invitrogen). The Huh6 cell line was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with 1 g/liter glucose Glutamax-I (Invitrogen) supplemented as with A549 cells.

Transfections and infections

siRNA oligonucleotides (100 nM) were transfected with Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The siRNA sequences for human DDR1 were as follows: DDR1 #1, 5'-GAAUGUCGCUUCCGGCGUGUU-3'; DDR1 #2, 5'-GAGCGUCUGUCGCGGUAUU-3' according to published sequences (Hidalgo-Carcedo et al., 2011). DDR1 #3 (SI05130706; QIAGEN) targets the 3' UTR of DDR1 mRNA. The antisense strand siRNA was targeted against GTPases using the 21-nucleotide sequences 5'-AAGAAGTCAGCATTCTGTC-3' for hRhoA #1, 5'-AAGTCTTAATTTGCTTTCC-3' for hRac1 #1, and 5'-AAGATAACTCACCCTGTCCA-3' for hCdc42 #1 according to published sequences (Deroanne et al., 2003); 5'-AAGGAGATTGGTGCTGTA AAA-3' for hRac1 #2 as previously published (Grise et al., 2012); and 5'-AGGTGGATGGAAGCAGGTA-3' for hRhoA #2 and 5'-GAGATGACCCCTACTATTG-3' for hCdc42 #2. A control siRNA targeted against luciferase (CT) 5'-CGTACGCGGAATAC-TTCCA-3' was purchased from Eurofins MWG Operon, Inc. siRNAs used for the GEF screen were purchased from QIAGEN and are referenced in Table S1. The second siRNA sequence for human Tuba was as follows: Tuba #2, 5'-GAGCUUGAGGGAACAUAACAAGAUUU-3', as previously published (Rajabian et al., 2009). For transient transfection of MDA-MB-231 cells, the Amaxa Nucleofector kit V (Amaxa Inc.), JET PRIME (PolyPlus; Ozyme), or Lipofectamine 2000 (Invitrogen) was used according to the manufacturer's instructions. 5 µg of DNA was added per well of a six-well plate. Cells were allowed to grow 24 h after transfection before use.

For the rescue experiment, cells were transfected with siRNA DDR1 #3 to silence endogenous DDR1 as described in the same paragraph. 2 d after, siRNA DDR1-expressing cells were infected with lentivirus particles expressing DDR1-GFP at a multiplicity of infection of 2.5 and selected using puromycin antibiotic at a concentration of 1 µg/ml. The rescue was observed comparing the proportion of cells able to form linear invadosomes

in cells receiving siRNA control to siRNA DDR1 only and siRNA DDR1 + DDR1-GFP. To generate the MDA-MB-231 cell line stably expressing Lifeact-mRuby, cells were transduced at a multiplicity of infection of 10.

Cdc42 activity assay

To detect GTP-active bound Cdc42, MDA-MB-231 transfected with CT or DDR1 #1 siRNA were cultured for 2 h on type I collagen fibrils or overnight on plastic. 50 µg of protein was subjected using the G-LISA Cdc42 Activation Assay Biochem kit (Cytoskeleton, Inc.) according to the manufacturer's instructions.

Gelatin degradation assay

Coverslips were coated with Oregon green gelatin (Invitrogen), fixed with 0.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences), and washed three times with PBS (Invitrogen). Cells were seeded on coated coverslips and incubated overnight before fixation and staining.

Immunofluorescence and imaging

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde, pH 7.2, for 10 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min, and incubated with various antibodies. Cells were imaged with an SP5 confocal microscope (Leica) using a 63x/NA 1.4 Plan Neofluor objective lens. To prevent contamination between fluorochromes, each channel was imaged sequentially using the multitrack recording module before merging.

Collagen polymerization, linear invadosome quantification, and collagen degradation

Collagen polymerization and linear invadosome quantifications were made as described previously (Jain et al., 2012). In brief, collagen was diluted at 0.5 mg/ml in DPBS 1x, then polymerized for 4 h at 37°C before cell seeding. Cells were seeded for 4 h on collagen before fixation. Confocal images of isolated cells were obtained using an SP5 confocal microscope (Leica) using a 63x/NA 1.4 Plan Neofluor objective lens. Cell surface area was measured upon phalloidin staining, and Tks5 staining was used as a marker for linear invadosomes. We used a custom macro ([macros 1-3](#), available as supplemental files) with ImageJ software (W. Rasband, National Institutes of Health) that allowed measurement of all required parameters of linear invadosomes: number, size (using the Feret diameter, the longest distance between any two points), and area (A.U.). Collagen degradation using the anti-collagen type I cleavage site antibody (rabbit, Col1 3/4 short C) was done using a custom macro (see supplemental files) with ImageJ.

SHG imaging of collagen fibers and quantification

The SHG imaging system consists of a confocal TCS SP2 scanning head (Leica) mounted on an inverted microscope (DMIRE2; Leica) and equipped with a MAITAI femtosecond laser (Spectra Physics). A 10x dry objective lens (NA 0.4; Leica) was used for applying an 820-nm excitation to the sample. The SHG signal was collected in the forward direction using the condenser (S1, NA = 0.9-1.4; Leica), and the two-photon-excited fluorescence (TPEF) was epi-collected in the backward direction. IRSP 715 band-pass and 410-nm infrared (IR) filters (10-nm full width at half-maximum [FWHM]) were placed before the photomultiplier tube.

All image analysis was performed with the ImageJ software, using a custom macro (see supplemental files). For collagen quantification, SHG images were thresholded and the mean pixel numbers corresponding to collagen were converted to square micrometers, multiplying by a factor of 8.583 and taking into account the point spread function of the objective. For cell counts, the TPEF images were thresholded and watersheded before performing the "Analyze Particles" function.

Invasion assay

The invasion assay was adapted from Lopez et al. (2005). 1 mg/ml type I rat tail collagen (BD) was used. Costar Transwell inserts (8-µm pore; Corning) and gels were allowed to polymerize at 37°C for 1 h. Collagen gel matrices were then hydrated with DMEM (Life Technologies) supplemented with 50% fetal bovine serum (Biomedica) for 4 h. Cells were washed twice in serum-free medium, trypsinized, counted, placed in the upper chamber of the Transwell insert, and allowed to invade for the indicated time points. After invasion, the Transwell inserts were removed from the plate and the quantity of invading cells into the gel matrix was determined by F-actin staining.

Western blotting and immunoprecipitation

Cells were lysed in radio-immunoprecipitation assay buffer (25 mM Tris HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL, 1% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS), sonicated, incubated at 95°C for 5 min, and loaded onto a

10% or 12% SDS-PAGE gel. Proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane (Sigma-Aldrich), blocked with 5% bovine serum albumin, and probed with primary antibody overnight. Membranes were then washed and incubated with the corresponding secondary antibody, and signals were acquired and quantified with the Odyssey system (LI-COR Biosciences).

Biosensor assay and FRET analysis

Raichu-Cdc42 biosensor was used for FRET imaging to measure Cdc42 activity (Aoki and Matsuda, 2009). MDA-MB-231 cells transfected with the biosensor were plated in μ -Dish 35 mm, high glass bottom plates (Ibidi) coated with type I collagen. 2 h later, living cells were imaged using an inverted microscope (TE Eclipse; Nikon) equipped with a motorized heated and CO₂-regulated incubator. Images were taken using a Nikon 100x Plan-Apochromat VC 1.4 oil objective lens and captured with an EM charge-coupled device (CCD) camera (C9100-13, Imagem; Hamamatsu Photonics) controlled by the MetaMorph 7.0 software. A ratio image of YFP/CFP was created to represent FRET efficiency, which correlated with the activities of the G proteins. Pseudocolored ratio images were generated from images of CFP and FRET channels, as described previously (Hodgson et al., 2006). For quantification, the frequency of colocalization between active probe and collagen I fibrils was observed and presented as the number of cells presenting active probe on collagen I fibrils per number of cells observed (two independent experiments).

Video microscopy

MDA-MB-231 cells stably expressing Lifeact-mRuby were transfected with pTks5-GFP construction. The next day after transfection, cells were plated on 14-mm glass-bottom dishes, No. 1.5 thickness (MatTek) before being coated with 633 fluorescent collagen type I. Cells were imaged 2 h after seeding, with or without PP2 in DMEM 4.5 g/liter glucose, Hepes, no phenol red, and 10% fetal calf serum at 37°C without CO₂. A picture was taken every 4 min for 1 h with a confocal microscope (SP5; Leica).

Colocalization quantification

For colocalization quantification, we used Co-localization Finder Version 1.2 from C. Laumonnerie and J. Mutterer (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Strasbourg, France) on ImageJ version 1.48. Results were presented as the mean of 10 fields quantified.

Statistical tests

Data were reported as the mean \pm SEM of at least three experiments. Statistical significance ($P < 0.05$ or less) was determined using a paired *t* test or analysis of variance (ANOVA) as appropriate and performed with GraphPad Prism software (GraphPad Software).

Online supplemental material

Fig. S1 demonstrates the impact of type I collagen fibrils on cell degradation activity and confirms the DDR1 localization with linear invadosomes. Fig. S2 reveals DDR1 involvement in linear invadosome formation in A549 cells and shows a rescue experiment on cells depleted for DDR1 and infected with DDR1-GFP. Fig. S3 describes the DDR1 role in classical invadosome formation and activity. Figs. S4 and S5 demonstrate that the role of DDR1 in collagen degradation and cell invasion is MMP dependent but Src independent. Table S1 contains the list of siRNAs tested to screen for GEFs involved in linear invadosome formation. Video 1 shows the dynamics of Tks5-GFP and F-actin on MDA-MB-231 cells seeded on labeled type I collagen fibrils. ImageJ macros 1 and 2 were used to determine the number and the size of linear invadosomes per cell and collagen degradation. ImageJ macro3 was used to quantify SHG signal. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201404079/DC1>.

We are grateful to Dr. A. Wiedmann and Dr. C. Perret for the SYF and Huh4 cell lines, respectively. We thank Drs. S. Courtneidge, P. De Camilli, M. Bendeck, R. Wedlich-Soeldner, G. Longmore, and M. Matsuda for constructs. We thank the Bordeaux Imaging Center for help with fluorescence quantification (BIC) and P. Chavrier and A. Blangy for helpful discussions.

A. Juin is supported by a predoctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. J. Di Martino is supported by a PhD fellowship from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale/Région Aquitaine. L. Paysan is supported by a PhD fellowship from Région Aquitaine. E. Henriët is supported by a PhD from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. This work was supported by grants from ANR-13-JCJSV1-0005, l'AFEF (Association Française pour l'Étude du Foie), La Ligue Nationale contre le Cancer, and Association pour la Recherche sur le Cancer. V. Moreau and J. Rosenbaum are supported by funding

from Equipe Labellisée Ligue Nationale contre le Cancer 2011 and Grant Institut National du Cancer - Direction Générale de l'Offre de Soins - Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 6046.

The authors declare no competing financial interests.

Submitted: 14 April 2014

Accepted: 21 October 2014

References

- Albiges-Rizo, C., O. Destaing, B. Fourcade, E. Planus, and M.R. Block. 2009. Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes, and focal adhesions. *J. Cell Sci.* 122:3037–3049. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.052704>
- Angers-Loustau, A., R. Hering, T.E. Werbowetski, D.R. Kaplan, and R.F. Del Maestro. 2004. SRC regulates actin dynamics and invasion of malignant glial cells in three dimensions. *Mol. Cancer Res.* 2:595–605.
- Aoki, K., and M. Matsuda. 2009. Visualization of small GTPase activity with fluorescence resonance energy transfer-based biosensors. *Nat. Protoc.* 4:1623–1631. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.175>
- Ayala, I., G. Giacchetti, G. Caldieri, F. Attanasio, S. Mariggiò, S. Tetè, R. Polishchuk, V. Castronovo, and R. Buccione. 2009. Fociogenesis dysplasia protein Fgd1 regulates invadopodia biogenesis and extracellular matrix degradation and is up-regulated in prostate and breast cancer. *Cancer Res.* 69:747–752. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1980>
- Azzam, H.S., and E.W. Thompson. 1992. Collagen-induced activation of the M(r) 72,000 type IV collagenase in normal and malignant human fibroblastoid cells. *Cancer Res.* 52:4540–4544.
- Barker, K.T., J.E. Martindale, P.J. Mitchell, T. Kamalati, M.J. Page, D.J. Phippard, T.C. Dale, B.A. Gusterson, and M.R. Crompton. 1995. Expression patterns of the novel receptor-like tyrosine kinase, DDR, in human breast tumours. *Oncogene.* 10:569–575.
- Beatty, B.T., V.P. Sharma, J.J. Bravo-Cordero, M.A. Simpson, R.J. Eddy, A.J. Koleske, and J. Condeelis. 2013. β 1 integrin regulates Arg to promote invadopodial maturation and matrix degradation. *Mol. Biol. Cell.* 24:1661–1675. S1–S11. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E12-12-0908>
- Carafoli, F., M.C. Mayer, K. Shiraiishi, M.A. Pecheva, L.Y. Chan, R. Nan, B. Leitinger, and E. Hohenester. 2012. Structure of the discoidin domain receptor 1 extracellular region bound to an inhibitory Fab fragment reveals features important for signaling. *Structure.* 20:688–697. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2012.02.011>
- Cestra, G., A. Kwiatkowski, M. Salazar, F. Gertler, and P. De Camilli. 2005. Tuba, a GEF for CDC42, links dynamin to actin regulatory proteins. *Methods Enzymol.* 404:537–545. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)04047-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(05)04047-4)
- Cook, D.R., K.L. Rossman, and C.J. Der. 2014. Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene.* 33:4021–4035. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2013.362>
- Cox, T.R., D. Bird, A.M. Baker, H.E. Barker, M.W. Ho, G. Lang, and J.T. Erler. 2013. LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis. *Cancer Res.* 73:1721–1732. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2233>
- Day, E., B. Waters, K. Spiegel, L. Alnadaf, P.W. Manley, E. Buchdunger, C. Walker, and G. Jarai. 2008. Inhibition of collagen-induced discoidin domain receptor 1 and 2 activation by imatinib, nilotinib and dasatinib. *Eur. J. Pharmacol.* 599:44–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.10.014>
- Dejmek, J., K. Dib, M. Jönsson, and T. Andersson. 2003. Wnt-5a and G-protein signaling are required for collagen-induced DDR1 receptor activation and normal mammary cell adhesion. *Int. J. Cancer.* 103:344–351. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.10752>
- Dejmek, J., K. Leandersson, J. Manjer, A. Bjartell, S.O. Emdin, W.F. Vogel, G. Landberg, and T. Andersson. 2005. Expression and signaling activity of Wnt-5a/discoidin domain receptor-1 and Syk plays distinct but decisive roles in breast cancer patient survival. *Clin. Cancer Res.* 11:520–528.
- Deroanne, C., V. Vouret-Craviari, B. Wang, and J. Pouyssegur. 2003. EphrinA1 inactivates integrin-mediated vascular smooth muscle cell spreading via the Rac/PAK pathway. *J. Cell Sci.* 116:1367–1376. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00308>
- Destaing, O., E. Planus, D. Bouvard, C. Oddou, C. Badowski, V. Bossy, A. Raducanu, B. Fourcade, C. Albiges-Rizo, and M.R. Block. 2010. β 1A integrin is a master regulator of invadosome organization and function. *Mol. Biol. Cell.* 21:4108–4119. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E10-07-0580>
- Destaing, O., M.R. Block, E. Planus, and C. Albiges-Rizo. 2011. Invadosome regulation by adhesion signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23:597–606. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2011.04.002>
- Di Martino, J., L. Paysan, C. Gest, V. Lagrée, A. Juin, F. Saltel, and V. Moreau. 2014. Cdc42 and Tks5: A minimal and universal molecular signature

- for functional invasomes. *Cell Adhes. Migr.* 8:280–292. <http://dx.doi.org/10.4161/cam.28833>
- Eckert, M.A., T.M. Lwin, A.T. Chang, J. Kim, E. Danis, L. Ohno-Machado, and J. Yang. 2011. Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis. *Cancer Cell.* 19:372–386. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.036>
- Ford, C.E., S.K. Lau, C.Q. Zhu, T. Andersson, M.S. Tsao, and W.F. Vogel. 2007. Expression and mutation analysis of the discoidin domain receptors 1 and 2 in non-small cell lung carcinoma. *Br. J. Cancer.* 96:808–814. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6603614>
- Gailhouste, L., Y. Le Grand, C. Odin, D. Guyader, B. Turlin, F. Ezan, Y. Désille, T. Guilbert, A. Bessard, C. Frémin, et al. 2010. Fibrillar collagen scoring by second harmonic microscopy: a new tool in the assessment of liver fibrosis. *J. Hepatol.* 52:398–406. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2009.12.009>
- Gilkes, D.M., P. Chaturvedi, S. Bajpai, C.C. Wong, H. Wei, S. Pitcairn, M.E. Hubbi, D. Wirtz, and G.L. Semenza. 2013. Collagen prolyl hydroxylases are essential for breast cancer metastasis. *Cancer Res.* 73:3285–3296. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3963>
- Grise, F., S. Sena, A. Bidaud-Meynard, J. Baud, J.B. Hiriart, K. Makki, N. Dugot-Senant, C. Stadel, P. Bioulac-Sage, J. Zucman-Rossi, et al. 2012. Rnd3/RhoE Is down-regulated in hepatocellular carcinoma and controls cellular invasion. *Hepatology.* 55:1766–1775. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.25568>
- Hauck, C.R., D.A. Hsia, D. Ilic, and D.D. Schlaepfer. 2002. v-Src SH3-enhanced interaction with focal adhesion kinase at $\beta 1$ integrin-containing invadopodia promotes cell invasion. *J. Cell. Chem.* 277:12487–12490. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C100760200>
- Hidalgo-Carcedo, C., S. Hooper, S.I. Chaudhry, P. Williamson, K. Harrington, B. Leitinger, and E. Sahai. 2011. Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6. *Nat. Cell Biol.* 13:49–58. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2133>
- Hodgson, L., P. Nalbant, F. Shen, and K. Hahn. 2006. Imaging and photobleach correction of Mero-CBD, sensor of endogenous Cdc42 activation. *Methods Enzymol.* 406:140–156. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)06012-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(06)06012-5)
- Hoshino, D., K.M. Branch, and A.M. Weaver. 2013. Signaling inputs to invadopodia and podosomes. *J. Cell Sci.* 126:2979–2989. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.079475>
- Itoh, R.E., K. Kurokawa, Y. Ohba, H. Yoshizaki, N. Mochizuki, and M. Matsuda. 2002. Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol. Cell. Biol.* 22:6582–6591. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.22.18.6582-6591.2002>
- Juin, A., C. Billotet, V. Moreau, O. Destaing, C. Albiges-Rizo, J. Rosenbaum, E. Génot, and F. Saltel. 2012. Physiological type I collagen organization induces the formation of a novel class of linear invasomes. *Mol. Biol. Cell.* 23:297–309. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E11-07-0594>
- Klinghoffer, R.A., C. Sachsenmaier, J.A. Cooper, and P. Soriano. 1999. Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO J.* 18:2459–2471. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/18.9.2459>
- Konitsiotis, A.D., N. Raynal, D. Bihan, E. Hohenester, R.W. Farndale, and B. Leitinger. 2008. Characterization of high affinity binding motifs for the discoidin domain receptor DDR2 in collagen. *J. Biol. Chem.* 283:6861–6868. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M709290200>
- Koo, D.H., C. McFadden, Y. Huang, R. Abdulhussein, M. Friese-Hamim, and W.F. Vogel. 2006. Pinpointing phosphotyrosine-dependent interactions downstream of the collagen receptor DDR1. *FEBS Lett.* 580:15–22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2005.11.035>
- Kovacs, E.M., R.S. Makar, and F.B. Gertler. 2006. Tuba stimulates intracellular N-WASP-dependent actin assembly. *J. Cell Sci.* 119:2715–2726. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.03005>
- Leitinger, B. 2011. Transmembrane collagen receptors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27:265–290. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154013>
- Leitinger, B. 2014. Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 310:39–87. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800180-6.00002-5>
- Leong, H.S., A.E. Robertson, K. Stoletov, S.J. Leith, C.A. Chin, A.E. Chien, M.N. Hague, A. Ablack, K. Carmine-Simmen, V.A. McPherson, et al. 2014. Invadopodia are required for cancer cell extravasation and are a therapeutic target for metastasis. *Cell Reports.* 8:1558–1570. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.050>
- Levental, K.R., H. Yu, L. Kass, J.N. Lakins, M. Egeblad, J.T. Ertler, S.F. Fong, K. Csizsar, A. Giaccia, W. Weninger, et al. 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell.* 139:891–906. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.027>
- Linder, S., K. Hüfner, U. Wintergerst, and M. Aepfelbacher. 2000. Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *J. Cell Sci.* 113:4165–4176.
- Linder, S., C. Wiesner, and M. Himmel. 2011. Degrading devices: invasomes in proteolytic cell invasion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27:185–211. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154216>
- Lopez, J.I., T.D. Camenisch, M.V. Stevens, B.J. Sands, J. McDonald, and J.A. Schroeder. 2005. CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression. *Cancer Res.* 65:6755–6763. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0863>
- Miao, L., S. Zhu, Y. Wang, Y. Li, J. Ding, J. Dai, H. Cai, D. Zhang, and Y. Song. 2013. Discoidin domain receptor 1 is associated with poor prognosis of non-small cell lung cancer and promotes cell invasion via epithelial-to-mesenchymal transition. *Med. Oncol.* 30:626. <http://dx.doi.org/10.1007/s12032-013-0626-4>
- Monteiro, P., C. Rossé, A. Castro-Castro, M. Irondele, E. Lagoutte, P. Paul-Gilloteaux, C. Desnos, E. Formstecher, F. Darchen, D. Perrais, et al. 2013. Endosomal WASH and exocyst complexes control exocytosis of MT1-MMP at invadopodia. *J. Cell Biol.* 203:1063–1079. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201306162>
- Moreau, V., F. Tatin, C. Varon, and E. Génot. 2003. Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol. Cell. Biol.* 23:6809–6822. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.23.19.6809-6822.2003>
- Murphy, D.A., and S.A. Courtneidge. 2011. The ‘ins’ and ‘outs’ of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12:413–426. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3141>
- Rajabian, T., B. Gavicherla, M. Heisig, S. Müller-Altmack, W. Goebel, S.D. Gray-Owen, and K. Ireton. 2009. The bacterial virulence factor InlC perturbs apical cell junctions and promotes cell-to-cell spread of *Listeria*. *Nat. Cell Biol.* 11:1212–1218. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1964>
- Ramaswamy, S., K.N. Ross, E.S. Lander, and T.R. Golub. 2003. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat. Genet.* 33:49–54. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1060>
- Razidlo, G.L., B. Schroeder, J. Chen, D.D. Billadeau, and M.A. McNiven. 2014. Vav1 as a central regulator of invadopodia assembly. *Curr. Biol.* 24:86–93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.11.013>
- Riedel, J., K.C. Flynn, A. Raducanu, F. Gärtner, G. Beck, M. Bösl, F. Bradke, S. Massberg, A. Aszodi, M. Sixt, and R. Wedlich-Söldner. 2010. Lifeact mice for studying F-actin dynamics. *Nat. Methods.* 7:168–169. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth0310-168>
- Ruangpanit, N., D. Chan, K. Holmbeck, H. Birkedal-Hansen, J. Polarek, C. Yang, J.F. Bateman, and E.W. Thompson. 2001. Gelatinase A (MMP-2) activation by skin fibroblasts: dependence on MT1-MMP expression and fibrillar collagen form. *Matrix Biol.* 20:193–203. [http://dx.doi.org/10.1016/S0945-053X\(01\)00135-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0945-053X(01)00135-4)
- Salazar, M.A., A.V. Kwiatkowski, L. Pellegrini, G. Cestra, M.H. Butler, K.L. Rossman, D.M. Serna, J. Sondek, F.B. Gertler, and P. De Camilli. 2003. Tuba, a novel protein containing bin/amphiphysin/Rvs and Dbl homology domains, links dynamin to regulation of the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 278:49031–49043. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M308104200>
- Sato, K., S. Hattori, S. Irie, and S. Kawashima. 2003. Spike formation by fibroblasts adhering to fibrillar collagen I gel. *Cell Struct. Funct.* 28:229–241. <http://dx.doi.org/10.1247/csf.28.229>
- Schachtner, H., S.D. Calaminus, A. Sinclair, J. Monypenny, M.P. Blundell, C. Leon, T.L. Holyoake, A.J. Thrasher, A.M. Michie, M. Vukovic, et al. 2013. Megakaryocytes assemble podosomes that degrade matrix and protrude through basement membrane. *Blood.* 121:2542–2552. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-07-443457>
- Shintani, Y., Y. Fukumoto, N. Chaika, R. Svoboda, M.J. Wheelock, and K.R. Johnson. 2008. Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1. *J. Cell Biol.* 180:1277–1289. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200708137>
- Shrivastava, A., C. Radziejewski, E. Campbell, L. Kovac, M. McGlynn, T.E. Ryan, S. Davis, M.P. Goldfarb, D.J. Glass, G. Lemke, and G.D. Yancopoulos. 1997. An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol. Cell.* 1:25–34. [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80004-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80004-0)
- Takino, T., H. Miyamori, Y. Watanabe, K. Yoshioka, M. Seiki, and H. Sato. 2004. Membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates collagen-dependent mitogen-activated protein/extracellular signal-related kinase activation and cell migration. *Cancer Res.* 64:1044–1049. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-1843>
- Tarone, G., D. Cirillo, F.G. Giancotti, P.M. Comoglio, and P.C. Marchisio. 1985. Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp. Cell Res.* 159:141–157. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-4827\(85\)80044-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-4827(85)80044-6)

- Valencia, K., C. Ormazábal, C. Zandueta, D. Luis-Ravelo, I. Antón, M.J. Pajares, J. Agorreta, L.M. Montuenga, S. Martínez-Canarias, B. Leitinger, and F. Lecanda. 2012. Inhibition of collagen receptor discoidin domain receptor-1 (DDR1) reduces cell survival, homing, and colonization in lung cancer bone metastasis. *Clin. Cancer Res.* 18:969–980. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1686>
- Valiathan, R.R., M. Marco, B. Leitinger, C.G. Kleer, and R. Fridman. 2012. Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 31:295–321. <http://dx.doi.org/10.1007/s10555-012-9346-z>
- Vogel, W., G.D. Gish, F. Alves, and T. Pawson. 1997. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol. Cell.* 1:13–23. [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80003-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80003-9)
- Wolf, K., M. Te Lindert, M. Krause, S. Alexander, J. Te Riet, A.L. Willis, R.M. Hoffman, C.G. Figdor, S.J. Weiss, and P. Friedl. 2013. Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *J. Cell Biol.* 201:1069–1084. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201210152>
- Xu, H., D. Bihan, F. Chang, P.H. Huang, R.W. Farndale, and B. Leitinger. 2012. Discoidin domain receptors promote $\alpha1\beta1$ - and $\alpha2\beta1$ -integrin mediated cell adhesion to collagen by enhancing integrin activation. *PLoS ONE.* 7:e52209. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0052209>
- Yang, K., J.H. Kim, H.J. Kim, I.S. Park, I.Y. Kim, and B.S. Yang. 2005. Tyrosine 740 phosphorylation of discoidin domain receptor 2 by Src stimulates intramolecular autophosphorylation and Shc signaling complex formation. *J. Biol. Chem.* 280:39058–39066. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M506921200>
- Yang, S.H., H.A. Baek, H.J. Lee, H.S. Park, K.Y. Jang, M.J. Kang, D.G. Lee, Y.C. Lee, W.S. Moon, and M.J. Chung. 2010. Discoidin domain receptor 1 is associated with poor prognosis of non-small cell lung carcinomas. *Oncol. Rep.* 24:311–319.
- Yeh, Y.C., C.Z. Wang, and M.J. Tang. 2009. Discoidin domain receptor 1 activation suppresses $\alpha2\beta1$ integrin-dependent cell spreading through inhibition of Cdc42 activity. *J. Cell. Physiol.* 218:146–156. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.21578>
- Zhang, K., C.A. Corsa, S.M. Ponik, J.L. Prior, D. Piwnica-Worms, K.W. Eliceiri, P.J. Keely, and G.D. Longmore. 2013. The collagen receptor discoidin domain receptor 2 stabilizes SNAIL1 to facilitate breast cancer metastasis. *Nat. Cell Biol.* 15:677–687. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2743>

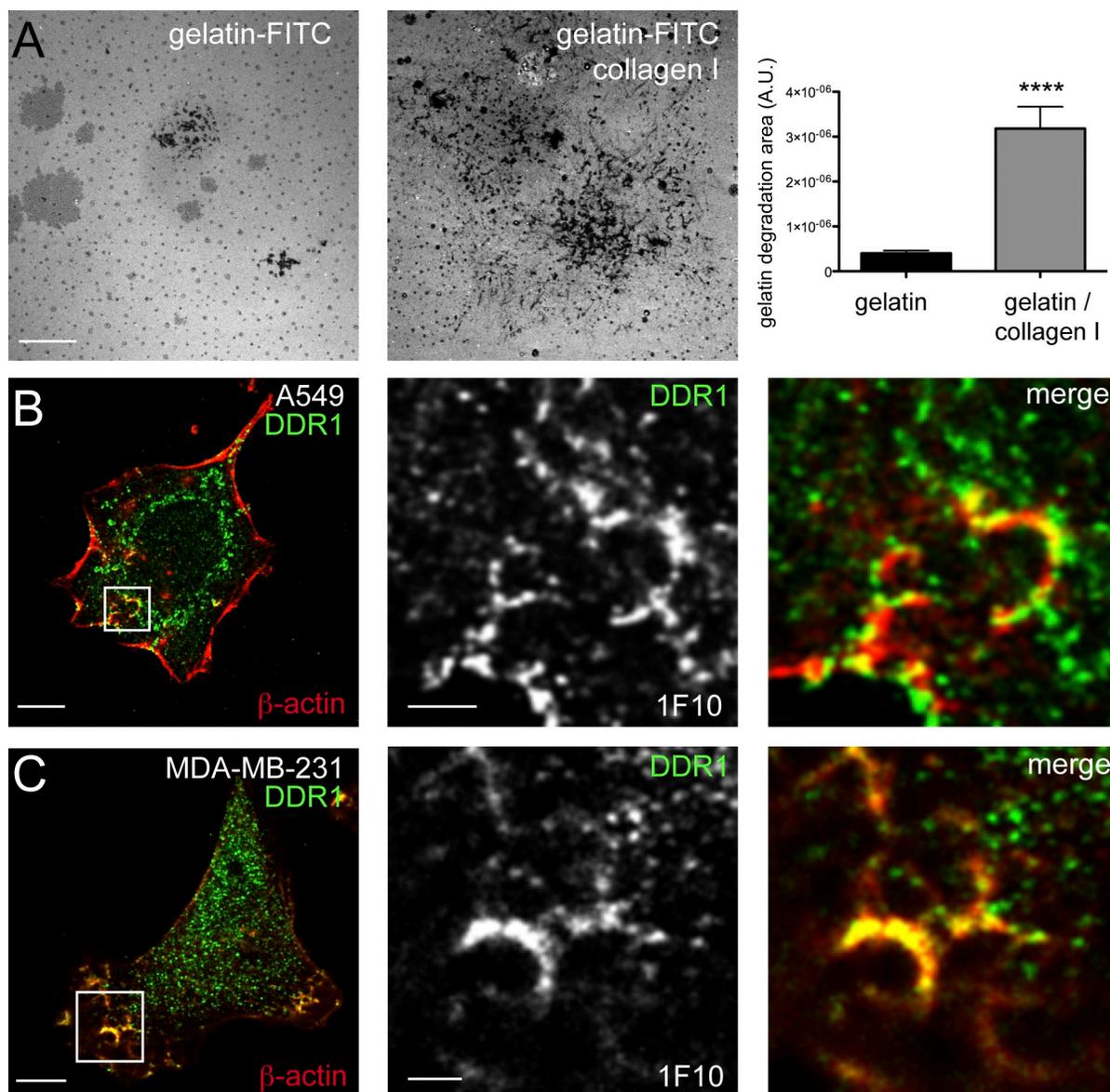
Juin et al., <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201404079/DC1>

Figure S1. Collagen I promotes a matrix degradation increase and DDR1 localization at linear invadosomes. (A) Collagen I increases the degradation activity of cells. MDA-MB-231 cells were seeded for 24 h on gelatin or on a mixed gelatin/collagen I matrix. Shown are representative confocal images of gelatin (gray) after degradation. The bar graph shows quantification of the gelatin degradation. Values are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments ($n = 30$ fields). ****, $P < 0.0001$. (B and C) DDR1 localizes at linear invadosomes. A549 (B) and MDA-MB-231 (C) cells were cultured for 4 h on collagen I, fixed with MetOH, and processed for immunofluorescence staining. DDR1 (green; anti-DDR1, 1F10) colocalizes with β -actin (red). Right panels show enlarged views of the boxed regions. Bars: (A) 50 μ m; (B and C, left) 5 μ m; (B and C, right) 2 μ m.

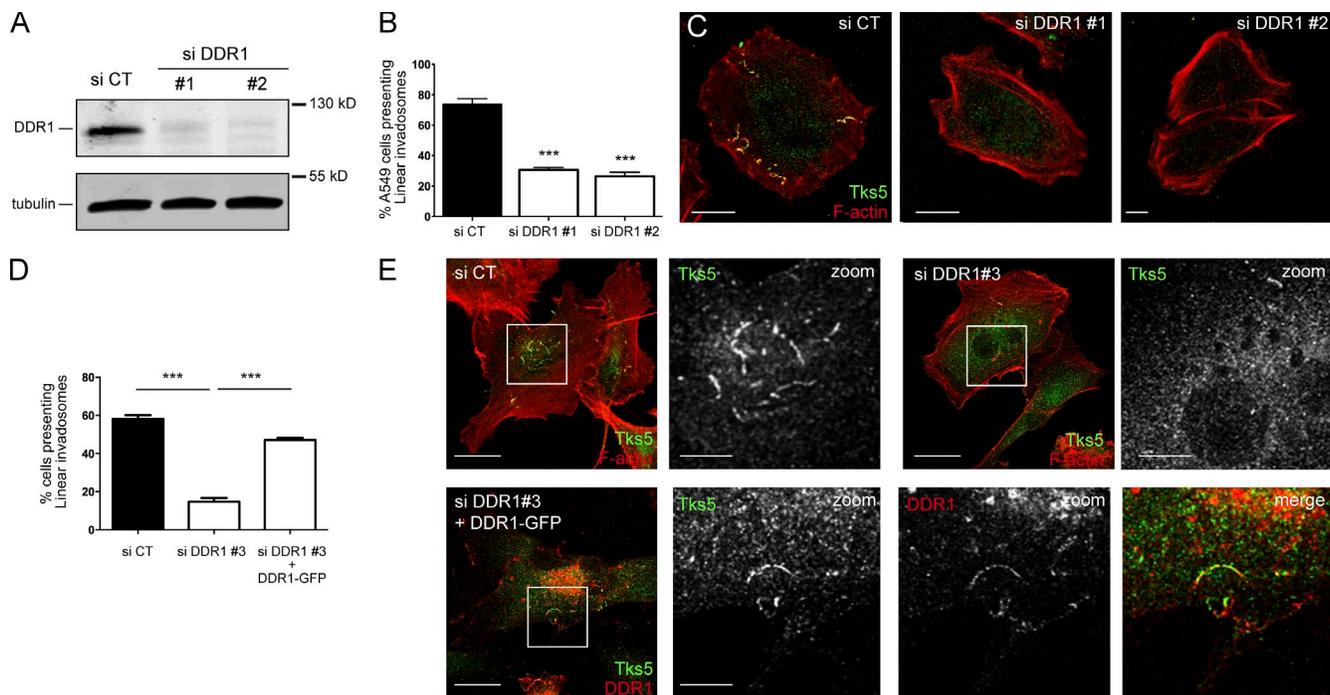


Figure S2. DDR1 is required for linear invadosome formation in A549 cells, and its rescue restores cell capacity to form linear invadosomes. (A) A549 cells were transfected with control siRNA (siCT) or two independent siRNAs targeted against DDR1 (siDDR1 #1 and siDDR1 #2). DDR1 depletion was analyzed by immunoblotting (anti-DDR1 [D1G6]; Cell Signaling Technology). Tubulin was used as a loading control. (B and C) Cells treated as in A were seeded for 4 h on collagen I, fixed, and stained for Tks5 (green) and F-actin (red). The bar graph (B) represents the percentage of cells presenting linear invadosomes. Data are mean \pm SEM ($n > 500$, three independent experiments). ***, $P < 0.001$ as compared with the control (siCT) condition. (C) Representative confocal images of A549 cells. DDR1 depletion severely impairs linear invadosome formation in A549 cells. (D and E) Rescue experiment. MDA-MB-231 cells were transfected with control siRNA (siCT) or siDDR1 #3. 2 d after transfection, cells were infected with lentiviruses expressing DDR1-GFP to rescue DDR1 activity. Cells were seeded for 4 h on collagen I and processed for immunofluorescence stainings. The bar graph represents the percentage of cells able to form linear invadosomes. Error bars represent the SEM ($n = 900$; three independent experiments; ***, $P < 0.001$ as compared with the control [siCT] condition; ***, $P < 0.001$ as compared with the si DDR1 #3 + DDR1-GFP condition). Shown are confocal images of cells stained for F-actin (red, top), Tks5 (green; top), DDR1-GFP (red, bottom), or Tks5 (green, bottom). Panels on the right show enlarged views of the boxed regions. Bars: (C) 5 μ m; (E, left) 10 μ m; (E, magnified panels on the right) 3 μ m.

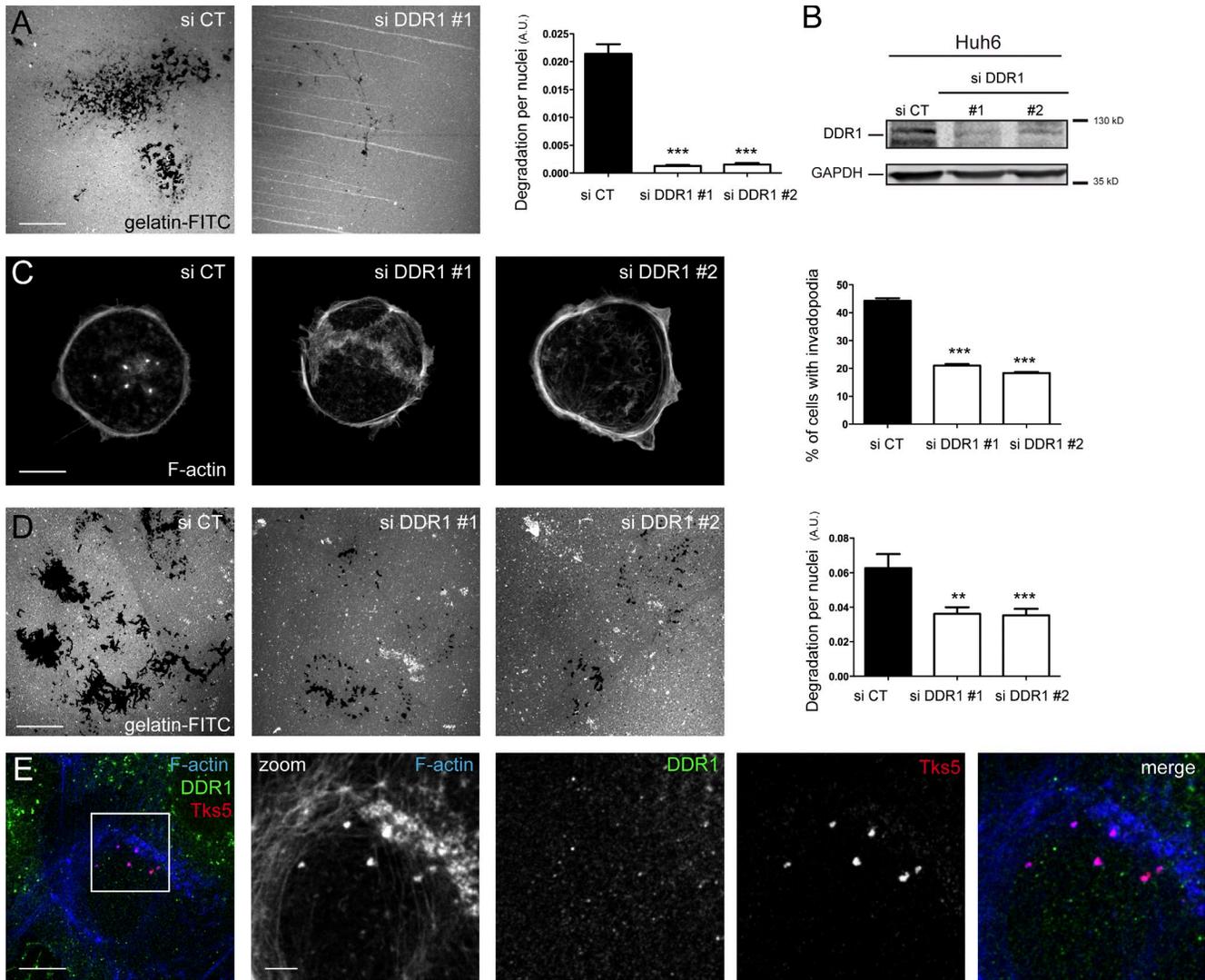


Figure S3. DDR1 depletion induces a decrease in the number of cells forming invadopodia and associated degradation activity. (A) MDA-MB-231 cells were transfected with control siRNA (siCT), siDDR1 #1, or siDDR1#2 and seeded for 24 h on fluorescent gelatin matrix. Shown are representative confocal images of degraded gelatin area. The bar graph represents quantification of degradation area per nuclei (A.U., arbitrary units). Error bars represent the SEM ($n = 120$ fields, three independent experiments; ***, $P < 0.001$ as compared with the control condition). (B) Huh6 cells were treated as in A, and protein extracts were analyzed by immunoblotting to determine DDR1 protein expression (anti-DDR1; cell signaling). GAPDH was used as loading control. (C) Huh6 cells were transfected as in A, seeded for 24 h on fluorescent gelatin matrix, and processed for immunofluorescence staining (F-actin; red). The bar graph on the right represents quantification of the percentage of Huh6 cells presenting invadopodia. Error bars represent the SEM ($n = 900$ cells, three independent experiments; ***, $P < 0.001$ as compared with the control condition). (D) Huh6 cells were treated as in A and seeded for 24 h on fluorescent gelatin. Shown are representative confocal images of degraded gelatin area in each siRNA condition. The bar graph represents quantification of degradation area per nuclei (A.U.). Error bars represent the SEM ($n = 120$ fields, three independent experiments). (E) Huh6 cells stably expressing DDR1-GFP were seeded for 24 h on gelatin and processed for immunofluorescence staining. Left: F-actin, blue; Tks5, red; and DDR1, green. Panels on the right show enlarged views of the boxed region. Bars: (A) 30 μm ; (C) 10 μm ; (D) 30 μm ; (E, left) 5 μm ; (E, enlarged panels on the right) 3 μm .

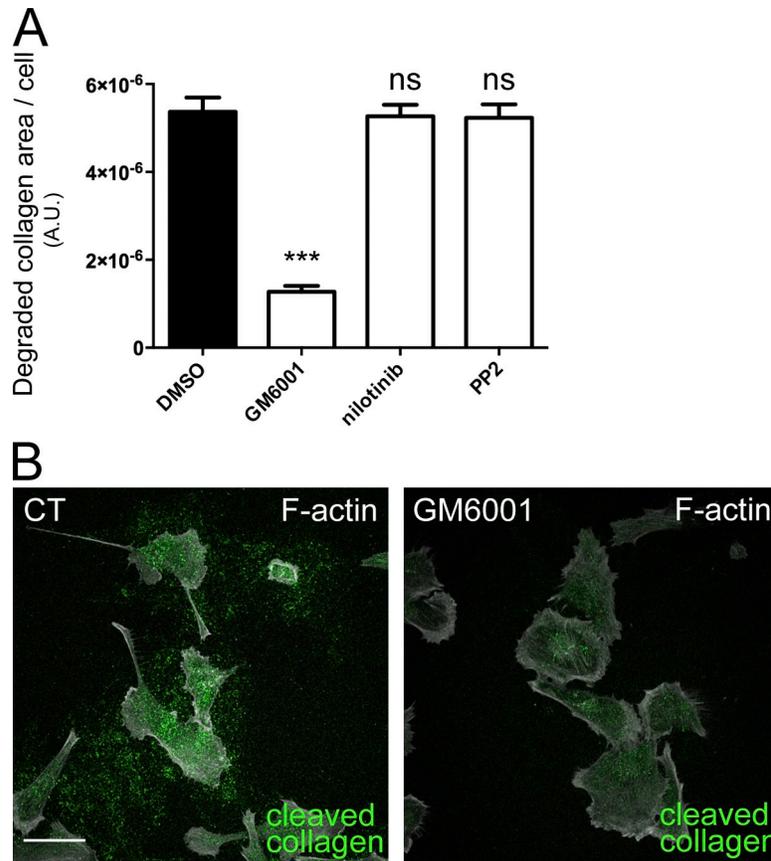


Figure S4. **The impact of metalloprotease, DDR1 activity, and Src inhibitors on degradation of collagen I.** (A) MDA-MB-231 cells were treated with 5 μ M GM6001, 1 μ M nilotinib (1 h of pretreatment with this inhibitor), or 5 μ M PP2 and seeded for 4 h on collagen I. Cells were fixed and stained with an anti-collagen type I cleavage site (Col1 3/4 C) antibody. The bar graph represents the quantification of the degraded collagen area per cell (A.U., arbitrary units). Error bars represent the SEM ($n = 90$ fields, three independent experiments; ***, $P < 0.001$ as compared with the control condition [DMSO treatment]). (B) Shown are cells treated as in A with GM6001 (cleaved collagen, green; F-actin, gray). Bar, 20 μ m.

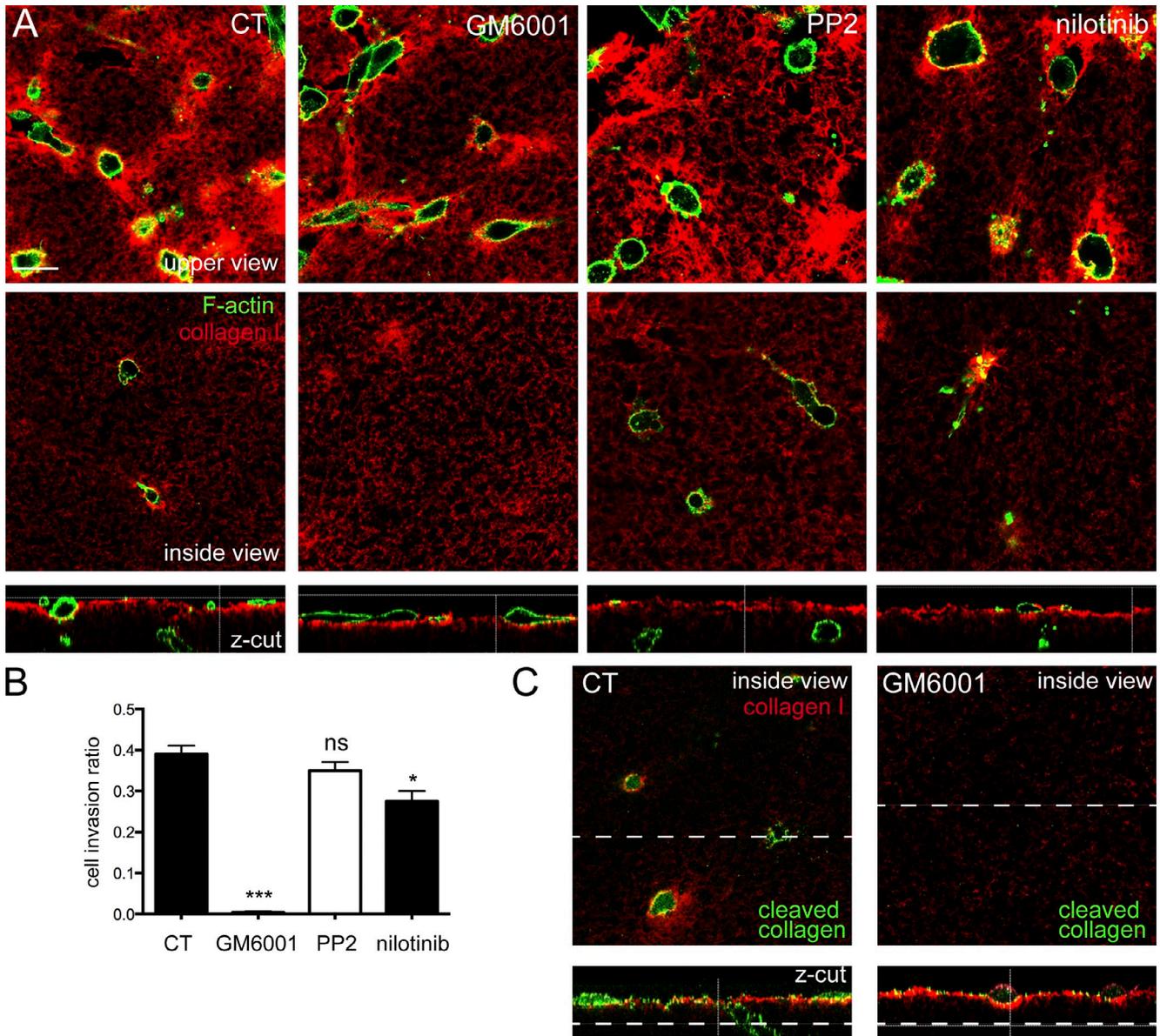
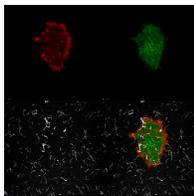


Figure S5. **The effect of metalloprotease, Src, and DDR1 kinase activity inhibitors on cell invasion in a 3D collagen matrix.** (A) MDA-MB-231 cells were seeded on the top of a 3D collagen gel labeled with 546-succinimidyl-ester (red). Indicated drugs were added 1 h after seeding and cells were incubated for 3 d, fixed, and processed for immunofluorescence staining (F-actin, green). Top panels, upper view of the gel; middle panels, inside view; bottom panels, z-cut. From left to right: DMSO-treated cells (control, vehicle), GM6001 5 μ M, PP2 5 μ M, and nilotinib 1 μ M. (B) Quantification of the cell invasion index of the experiment described in A. The bar graph represents the ratio of the number of MDA-MB-231 cells penetrating the collagen gel/number of cells seeded. Data are expressed as mean \pm SEM (three independent experiments). ***, $P < 0.001$; *, $P < 0.05$ as compared with the control condition (DMSO). (C) MDA-MB-231 cells were seeded on a 3D collagen gel labeled with 546-succinimidyl-ester (red), as in A, treated with DMSO (control) or GM6001 and processed for immunofluorescence staining (cleaved collagen, green). Shown are representative confocal images of the inside view (top) and the z-cut (bottom). Note that in the control condition, the cleaved collagen staining shows the path generated by the cells inside the collagen gel (visible on the z-cut), whereas no signal is found upon MMP inhibition. Bars, 50 μ m.

Table S1. List of siRNA tested to screen for GEFs involved in linear invadosome formation

siRNA use	NCBI gene symbol	Gene description	siRNA target sequence 5'-3'	Origin	
GEF screen	ARHGEF37	Rho GEF 37	SI03205825	QIAGEN	
	ARHGEF38	Rho GEF 38	SI00396781	QIAGEN	
	ARHGEF4	Rho GEF 4	SI00110411	QIAGEN	
	ARHGEF9	Cdc42 GEF 9	SI04138498	QIAGEN	
	DNMBP #1	Dynamin binding protein (Tuba)	SI04220237	QIAGEN	
	DNMBP #2	Dynamin binding protein (Tuba)	GAGCUUGAGGGAACAUAAGAUAUU	Eurofins MWG Operon, Inc.	
	FARP2	FERM, RhoGEF, and pleckstrin domain protein 2	SI00384769	QIAGEN	
	FARP2	FERM, RhoGEF, and pleckstrin domain protein 2	SI04332370	QIAGEN	
	FGD1	FYVE, RhoGEF, and PH domain containing 1	SI00386568	QIAGEN	
	FGD1	FYVE, RhoGEF, and PH domain containing 1	SI05044494	QIAGEN	
	FGD2	FYVE, RhoGEF, and PH domain containing 2	SI00386603	QIAGEN	
	FGD3	FYVE, RhoGEF, and PH domain containing 3	SI04211130	QIAGEN	
	FGD4	FYVE, RhoGEF, and PH domain containing 4	SI00386652	QIAGEN	
	ITSN1	Intersectin 1 (SH3 domain protein)	SI04161136	QIAGEN	
	ITSN1	Intersectin 1 (SH3 domain protein)	SI05030865	QIAGEN	
	ITSN2	Intersectin 2	SI00086779	QIAGEN	
	PLEKHG2	Pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 2	SI00686910	QIAGEN	
	SPATA13	Spermatogenesis associated 13	SI04177103	QIAGEN	
	Others	DDR1 #1	DDR1	GAAUGUCGCUUCCGGCGUGUU	Eurofins MWG Operon, Inc.
		DDR1 #2	DDR1	GAGCGUCUGUCUGCGGUAUU	Eurofins MWG Operon, Inc.
DDR1 #3		DDR1	SI05130706	QIAGEN	
CDC42 #1		Cell division control protein 42 homologue	AAGATAACTCACCCTGTCCA	Eurofins MWG Operon, Inc.	
CDC42 #2		Cell division control protein 42 homologue	GAGATGACCCCTCTACTATTG	Eurofins MWG Operon, Inc.	
RAC1 #1		Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	AAGTTCTTAATTTGCTTTTCC	Eurofins MWG Operon, Inc.	
RAC1 #2		Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	AAGGAGATTGGTCTGTAAAA	Eurofins MWG Operon, Inc.	
RHOA #1		Ras homolog gene family, member A	AAGAAGTCAGCATTTCTGTC	Eurofins MWG Operon, Inc.	
RHOA #2		Ras homolog gene family, member A	AGGTGGATGAAAGCAGGTA	Eurofins MWG Operon, Inc.	
GL2		Luciferase	CGTACGCGAATACTTCGA	Eurofins MWG Operon, Inc.	



Video 1. **Localization and dynamics of Tks5-GFP and F-actin on MDA-MB-231 cells seeded on labeled type I collagen fibrils.** MDA-MB-231 cells constitutively expressing p115act-mRuby (red) and transfected with Tks5-GFP (green) were seeded on type I collagen fibrils labeled with 633-succinimidyl-ester (gray). Images were analyzed by time-lapse confocal microscopy using a laser-scanning confocal microscope (SP5 confocal microscope; Leica). Frames were taken every 4 min for 2 h.

ImageJ macros 1 and 2 were used to determine the number and the size of linear invadosomes per cell and collagen degradation.

ImageJ macro 3 was used to quantify SHG signal.

All three files are available as a ZIP file.