



HAL
open science

Régulation de l'expression de Rnd3 dans les cellules tumorales

Leo Piquet

► **To cite this version:**

Leo Piquet. Régulation de l'expression de Rnd3 dans les cellules tumorales. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0272 . tel-01531834

HAL Id: tel-01531834

<https://theses.hal.science/tel-01531834>

Submitted on 2 Jun 2017

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 Science de la vie et de la santé
SPÉCIALITÉ Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Par Léo Piquet

**Régulation de l'expression de Rnd3 dans les
cellules tumorales**

Sous la direction du Dr. Violaine Moreau

Soutenue le 1^{er} décembre 2016 à Bordeaux

Membres du jury :

Dr. Violaine Moreau.....Directrice de thèse
Directrice de recherche, INSERM, BORDEAUX

Pr. Martin Teichmann.....Président du jury
Professeur des Universités, INSERM, BORDEAUX

Dr. Athanassia Sotiropoulos.....Rapporteur
Directrice de recherche, INSERM, PARIS

Dr. Cécile Gauthier-Rouvière.....Rapporteur
Directrice de recherche, CNRS, MONTPELLIER

Régulation de l'expression de Rnd3 dans les cellules tumorales

La protéine Rnd3 est un membre atypique de la famille des Rho GTPases. Dénuée d'activité GTPasique, elle est ainsi constitutivement sous forme active et liée au GTP. La régulation de cette protéine ne passe donc pas par le cycle classique des Rho GTPases mais par d'autres mécanismes transcriptionnels, post-transcriptionnels ou encore traductionnels. Dans le carcinome hépatocellulaire (CHC), Rnd3 est significativement sous-exprimée, et cette sous-expression procure un avantage invasif aux hépatocytes. Ce projet de thèse avait pour objectif de déterminer plus précisément les mécanismes à la base de la régulation de Rnd3 dans les cellules tumorales, et notamment les cellules dérivées de carcinome hépatocellulaire. Les travaux de cette thèse ont été divisés en deux axes principaux. Dans une première partie, la régulation de Rnd3 par la β -caténine a été étudiée. En effet, la β -caténine est retrouvée mutée dans plus d'un tiers des CHC, et la présence de mutations activatrices de la β -caténine corrèle avec un faible niveau d'expression de Rnd3 dans les CHC. L'établissement d'un modèle original dans les cellules de CHC, HepG2, a permis d'étudier indépendamment l'implication de la β -caténine sauvage et la β -caténine mutée dans la régulation d'expression de Rnd3. Ce modèle a permis de mettre en évidence une régulation différentielle de Rnd3 par les deux formes de la β -caténine, la forme sauvage régulant Rnd3 au niveau transcriptionnel, et la forme mutée régulant Rnd3 au niveau post-transcriptionnel. La deuxième partie de ce travail, qui constitue la partie principale du projet, s'est intéressée à la régulation de Rnd3 par la voie de mécanotransduction MRTF/SRF. L'activation de cette voie de signalisation est très intimement reliée à l'organisation du cytosquelette d'actine, et cette voie régule en retour l'expression de nombreux gènes impliqués dans la dynamique de l'actine. Les résultats obtenus ont permis de déterminer Rnd3 comme une nouvelle cible directe de la voie MRTF/SRF dans les cellules tumorales, et placent Rnd3 au centre d'une boucle de régulation de cette voie de mécanotransduction. L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce projet de thèse ont permis de mieux caractériser la régulation de l'expression de Rnd3 dans les cellules tumorales.

Regulation of Rnd3 expression in tumor cells

Rnd3 protein is an atypical member of the Rho GTPase family, devoid of GTPase activity and constitutively active and bound to GTP. Rnd3 regulation does not occur through the classical GTPase cycle but is achieved at transcriptional, posttranscriptional or translational level. Rnd3 is underexpressed in hepatocellular carcinoma (HCC), and this down-regulation increases HCC cell invasion and is linked to HCC progression. The aim of this thesis project was to better decipher the mechanisms involved in Rnd3 expression in tumor cells, and particularly in HCC cells. In a first part, Rnd3 regulation by β -catenin was studied. β -catenin is found mutated in one third of HCC, and activating β -catenin mutations in human HCC correlates with the lowest levels of Rnd3. An original model established in HepG2 cells allowed the study of the involvement of WT β -catenin versus mutated β -catenin in the regulation of Rnd3 expression.

Interestingly, our results demonstrated that both forms of β -catenin independently regulate Rnd3 mRNA expression. The WT β -catenin regulates Rnd3 at the transcriptional level, whereas the mutated β -catenin acts through the 3'UTR of Rnd3 mRNA. The second and main part of this thesis project was the study of the regulation of Rnd3 expression by the mechanotransduction pathway MRTF/SRF. The activation of this signaling pathway is tightly regulated by actin cytoskeleton, and the MRTF/SRF pathway directs in return the expression of a huge number of genes involved in actin dynamics. Our results uncovered Rnd3 as a new direct target of MRTF/SRF pathway in tumor cells. Indeed, upon actin dynamics changes, MRTF/SRF is able to bind Rnd3 promoter in order to favor its expression. As Rnd3 also acts as a regulator of the actin cytoskeleton, our results highlight Rnd3 at the center of a feedback loop of the MRTF/SRF mechanotransduction pathway. Taken together, all of the results obtained helped to better decipher the mechanisms of Rnd3 regulation in tumor cells.

Remerciements

Je n'aurais jamais pu effectuer ce travail de thèse sans un grand nombre de personnes, dont le soutien, la gentillesse, la bonne humeur et les précieux conseils m'ont accompagné au cours de ces trois années.

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Jean Rosenbaum de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, et de m'avoir conseillé tout au long de ma thèse.

Je remercie le Dr. Athanassia Sotiropoulos et le Dr Cécile Gauthier-Rouvière d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse, et le Professeur Martin Teichmann d'avoir accepté d'être un membre de mon jury de mi-thèse, puis d'être le président de mon jury de thèse. Je le remercie également d'avoir mis son laboratoire et son aide à ma disposition afin que je puisse réaliser certaines expériences. Je tiens également à remercier le Dr. Christine Varon pour ses précieux conseils au cours de mon jury de mi-thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma directrice de thèse, le Dr. Violaine Moreau. Elle a fait preuve de beaucoup de soutien et d'aide à mon égard. Ses très nombreux conseils, sa rigueur et sa culture scientifique m'ont permis d'évoluer en tant qu'apprenti-chercheur. Je la remercie également pour sa grande disponibilité et ses nombreuses qualités humaines. Enfin, un grand merci pour la relecture et la correction de ce manuscrit. Merci pour ces trois années, j'ai grandement apprécié travailler dans ton équipe.

Je remercie également le Dr Frédéric Saltel pour ses précieux conseils, aussi bien sur mes travaux de thèse que sur mon avenir professionnel.

Je remercie également tous les autres membres de l'équipe Moreau/Saltel pour leur bonne humeur et leur esprit d'équipe. C'était un plaisir de travailler avec vous au quotidien. Je remercie le Dr. Valérie Lagree-Bringtown pour son aide et ses conseils. Je remercie Claire Peanne pour sa gentillesse, et je lui souhaite le meilleur pour la suite. Je remercie le Dr. Aya Abouhammoud, que je n'ai pas côtoyé très longtemps, mais ce temps a suffi pour qu'elle démontre toute sa gentillesse et ses talents culinaires. Je remercie Gaëlle Lachiver pour sa gentillesse et les anecdotes personnelles qu'elle m'a racontées. Je remercie le Dr. Julie Di Martino pour les bons moments passés ensemble et pour la très grande quantité de churros que j'ai mangés. Je remercie le Dr. Zakaria Ezzhoukry pour sa bonne humeur et son humour au quotidien. Je tiens également à remercier le futur Dr. Elodie Henriet pour ses nombreux « Sérieux ! », pour son amour intense pour les knackis qui fait plaisir à voir, et pour ses trop rares démonstrations de saxophone... Je la remercie également pour sa grande gentillesse et je lui souhaite plein de bonnes choses pour la suite, et notamment pour son rôle de Vera dans le prochain film Scooby-Doo. Je tiens à particulièrement remercier le Dr. Lisa Paysan qui m'a formé à mon arrivée au laboratoire, qui m'a prodigué de nombreux conseils au cours de ma thèse et qui s'est toujours rendue disponible quand j'avais besoin de discuter, que ce soit du sujet de thèse ou de tout autre sujet. Je remercie grandement le Dr. Caroline Gest, pour la très grande aide qu'elle m'a apportée, et également d'avoir été une collègue et amie exceptionnelle tout au long de ces trois années. Je la remercie également d'avoir essayé de m'apprendre la prononciation typique normande, même si j'ai toujours préféré garder la prononciation française de référence, à savoir le bordelais...Je ne peux d'ailleurs pas parler de référence sans remercier le Dr. Fabien Binamé, qui n'a cessé de me répéter qu'il venait de la région de référence, mais qui est en réalité lui-même une personne de référence, par son soutien, sa gentillesse, ses dessins humoristiques et ses très nombreuses blagues capables de

redonner le sourire dans n'importe laquelle des situations. Et pour les prochaines fois où l'on se reverra, je tiens juste à lui rappeler de penser à sa serviette... Lisa, Caro, Fabien, je vous remercie tous les trois grandement pour tout ce que vous m'avez apporté. Je tiens également à remercier le futur Dr. Laure Magnan, non seulement pour les nombreux gâteaux qu'elle a préparés au cours de son stage de Master 2, mais surtout pour sa gentillesse, sa bonne humeur permanente et pour l'amie qu'elle est devenue. J'ai passé beaucoup de temps à la taquiner (qui a parlé d'un bac de glace ?), mais c'est parce que je l'apprécie énormément, et je lui souhaite le meilleur. Je tiens à remercier Margaux Sala pour sa très grande gentillesse et ses concerts au Connemara, et je lui souhaite la bienvenue dans l'équipe Moreau/Saltel. Je remercie Léa Bernaleau, venue faire son stage de licence dans l'équipe vers la fin de ma thèse et qui a été d'une grande aide afin que je puisse terminer les différentes expériences de ce projet de thèse. Je tiens enfin à remercier très chaleureusement un membre de l'équipe Moreau/Saltel, à savoir Terezinha Robbe. Je ne saurais la remercier assez pour toute l'aide précieuse qu'elle m'a apporté au cours de ma thèse. Je n'aurais jamais pu terminer cette thèse sans elle. Elle s'est toujours rendue disponible pour m'aider, et quand il ne s'agissait pas d'expérience, les nombreuses attentions qu'elle a eu à mon égard tels que ses délicieux gâteaux au chocolat m'ont permis d'envisager cette thèse un peu plus sereinement. Un grand merci à elle.

Je remercie également de nombreux membres des autres équipes pour leur gentillesse et les bons moments que l'on a passé ensemble, à l'intérieur mais également en dehors du labo. Merci au très prochainement Dr. Emilie Indersie pour m'avoir prouvé qu'on peut venir de master génétique et être une personne agréable, modeste et intelligente. Je la remercie également pour ses dégustations de donuts, et pour avoir révélé au laboratoire qu'il était possible d'avoir une crampe à la langue. Je remercie le futur Dr JoaQuim Javary d'être « régulièrement » venu jouer au football et pour tous les bons moments passés ensemble, et notamment cet anniversaire où sa fameuse soupe angevine lui a fait terminer la soirée avant qu'elle ait réellement commencée. Je remercie le Dr. Flora Cartier d'être aussi gentille et surtout dans son monde, ne change surtout pas. Je remercie la jeune Gaëlle Labrunie d'être une personne avec autant de qualités, même si elle m'a fait perdre un pari que j'aurai préféré gagner. Je remercie le futur Dr. Caroline Capdevielle pour m'avoir montré que l'expression rouge comme une tomate n'était pas qu'une expression, pour ses goûts musicaux et pour les nombreuses séances de badminton qu'elle a organisé pour le labo.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres des autres équipes, passés et présents, pour leur gentillesse et leurs nombreux conseils tout au long de ma thèse. Merci Dr. Véronique Veillat, Dr. Stéphanie Lhomond, Dr. Anne-Aurélien Raymond, Héléna Fazli, Angélique Desplat, Amani Ghousein, Dr Samira Benhamouche, Dr. Katarzyna Hooks, Nathalie Dugot-Senant, Nathalie Courtois, Véronique Neaud, Sarah Lesjean, Dr. Francis Sagliocco, Dr. Christophe Grosset, Dr. Eric Chevet, Dr. Charles Balabaud et Dr. Paulette Bioulac-Sage.

Je remercie également l'ensemble du personnel technique et administratif pour leur gentillesse et leur disponibilité. Merci Franck Pégrier, Cathy, Hélène Aouizerate, Gina Rasanjivelo, Virginie Rocher.

Je remercie tous les précieux amis avec qui j'ai passé de supers moments en dehors du laboratoire et qui m'ont permis d'évacuer la pression de la thèse. Je remercie Léa et Lucas, que je n'ai pas réussi à voir souvent au cours de la thèse mais qui sont de véritables amis. Merci à Camille de supporter en soirée les discussions de labo. Merci également à tous les

footballeurs, Thibault, Nico, Pipi, Jean William, Matthieu, Jacques, Antonin, Alan, Léa, Nestor, Josselin, les sessions du mercredi soir vont me manquer. Je tiens à particulièrement remercier Nestor Pallares Lupon, pour la découverte de l'Espagne et de Bujaraloz, pour les nombreux moments passés ensemble, pour m'avoir fait goûter les meilleures tortillas du monde, et sans qui ces trois dernières années auraient été bien plus difficiles. C'est promis, un jour je t'accompagnerai chasser le hérisson. Je remercie également Josselin « mollets d'acier » Galman, un ami de très longue date et dont le statut de grand chef d'entreprise ne l'a pas empêché d'être toujours présent afin que l'on passe de super moments ensemble. Merci aussi d'être un sniper d'élite sans qui la campagne de Halo aurait duré bien plus longtemps.

Je tiens à remercier tous les membres du master Biologie Cellulaire, Physiologie et Pathologie, merci de faire partie du Master BCPP, universellement reconnu comme le meilleur Master. J'aimerais remercier spécialement le futur Dr. Kévin Boyé, mon super binôme de master.

Je remercie l'ensemble de ma famille pour leur soutien et les bons moments passés ensemble.

Je tiens à grandement remercier mes parents, sans qui je n'aurais pas pu entreprendre ni terminer cette thèse. Ils ont fait preuve d'un énorme soutien, ont toujours été disponibles et ont répondu présents dès que j'avais le moindre besoin. Je tiens à les remercier pour tout ce qu'ils ont fait pour moi non seulement au cours de ces trois années de thèse, mais également depuis ma naissance. Merci d'être les parents que vous êtes.

Je remercie particulièrement l'ingénieur et futur Dr. Anne-Sophie Gary, pour sa gentillesse, son humour, son intelligence, son soutien, ses conseils, ses talents culinaires, sa beauté, son amour... Les raisons de la remercier sont trop nombreuses pour être entièrement énumérées ici, mais je tiens à lui dire qu'elle est en grande partie responsable de mon bonheur et de la personne que je suis aujourd'hui. Merci de m'avoir supporté à tout moment, même lors de mes périodes les plus pénibles, et de m'avoir aidé pendant la thèse et lors de la rédaction de ce manuscrit. Je te le redirai souvent au cours des nombreuses années qui nous attendent, mais saches que je t'aime mon Cacamour, tu es l'amour de ma vie et la chérie idéale. Merci également à toute sa famille pour la gentillesse dont ils font preuve à mon égard.

J'aimerais finir par remercier une personne qui représente beaucoup pour moi et que j'admire énormément, mon petit frère Numa Piquet. Depuis que tu es né, tu as fait de moi le frère le plus heureux du monde, et chaque jour où tu grandis ne cesse de confirmer ce sentiment. Tu es quelqu'un d'exceptionnel et j'ai une chance énorme d'être ton frère. Je n'ai pas toujours pu être présent au cours de ces trois ans, mais chaque moment partagé avec toi me fait un bien fou. J'en profite également pour remercier Léa, que tu as très bien choisi et qui est une personne d'une grande gentillesse et très agréable. Numa, je pourrais te remercier pour les matchs de tennis et de foot qu'on a faits ensemble, pour les parties de Xbox, pour les pizzas et les hamburgers qu'on a mangés, pour tous les matchs qu'on a regardés, ou pour plein d'autres raisons... mais je préfère simplement te remercier d'être le frère parfait. Merci mon frère que j'aime ! Ps : Non je rigole hein, en vrai tu es un gros boulet trop relou...^^

Table des matières

Chapitre I : Introduction	1
I- Le cytosquelette d'actine	1
1- Dynamique des filaments d'actine	1
2- Les fonctions de l'actine.....	2
3- Protéines associées à l'actine	3
A- Protéines de nucléation	4
B- Protéines de coiffe	6
C- Les protéines de fragmentation des filaments d'actine.....	8
D- Protéines de liaison aux monomères d'actine	9
E- Protéines impliquées dans les structures d'actine d'ordre supérieur.....	10
F- L'actine en tant que plateforme mécanique	11
G- Composés naturels ciblant l'actine	14
4- Voies de signalisation régulant la dynamique de l'actine.....	16
A- Les GTPases de la famille Rho	17
a- Membres de la famille des Rho GTPases	17
b- Régulation cyclique de l'activité des Rho GTPases	18
c- Fonctions biologiques des Rho GTPases	20
B- Récepteurs couplés aux protéines G	22
C- Récepteurs à activité tyrosine kinase	22
D- Voie des intégrines.....	23
E- Voie du TGF β	24
F- Voie de la E-cadhérine.....	26
G- Voie Wnt non canonique	26
5- Lien entre dynamique d'actine et transcription génique	27
A- Actine nucléaire	30
B- Voie de signalisation NF- κ B	30
C- Récepteurs nucléaires aux hormones.....	31
D- Réponse aux dommages à l'ADN, voies Nck et JMY	33
E- Protéines à domaine LIM.....	33
F- Voie de Mécanotransduction YAP/TAZ	34
G- Voie de mécanotransduction MRTF/SRF	39
II- Voies de mécanotransduction MRTF/SRF	42
1- Fonctions biologiques et moléculaires de SRF	42
A- Comparaison des co-activateurs de la famille TCF et MRTF.....	42
B- Les co-activateurs MRTFs	44

2-	Régulation de l'échange cytoplasme-noyau de MRTF par l'actine.....	46
3-	Régulateurs positifs et négatifs de l'activité de la voie MRTF/SRF.....	49
4-	Fonctions des gènes cibles de la voie MRTF/SRF	54
A-	Gènes contractiles et spécifiques du muscle	56
B-	Gènes modulant la dynamique de l'actine et la motilité cellulaire	57
C-	Rôle des micro ARNs dans la régulation de la voie MRTF/SRF	60
5-	Implication de la voie actine-MRTF/SRF en pathologie.....	62
A-	Maladies cardiovasculaires.....	62
B-	Cancers.....	63
6-	Découverte de nouvelles cibles potentielles de la voie MRTF/SRF	67
III-	La Rho GTPase atypique Rnd3	69
1-	Caractéristiques de Rnd3	69
2-	Régulation de Rnd3	70
A-	Régulation transcriptionnelle	70
B-	Régulation post-transcriptionnelle	72
C-	Régulation de Rnd3 au niveau protéique	73
3-	Fonctions biologiques de Rnd3.....	75
A-	Régulation du cytosquelette d'actine.....	75
B-	Polarité cellulaire dans le développement du système nerveux	77
C-	Apoptose et survie cellulaire	77
D-	Régulation du cycle cellulaire	79
E-	Différenciation cellulaire	81
F-	Implication dans le métabolisme glucidique	82
4-	Implication de Rnd3 en pathologie	82
A-	Rnd3 et développement.....	82
B-	Désordres cardiovasculaires	84
C-	Cancers.....	85
IV-	Le carcinome hépatocellulaire.....	87
1-	Epidémiologie.....	87
2-	Facteurs de risque	87
3-	Survenue et progression du carcinome hépatocellulaire	88
4-	Diagnostic et suivi des patients	89
5-	Traitements proposés	90
6-	Voies de signalisation impliquées.....	92
A-	Altérations génomiques	92
B-	TP53	94

C-	Voie de signalisation Wnt/ β -caténine	94
D-	Mutations dans le promoteur de TERT et autres voies de signalisation impliquées	96
7-	Classification des CHC	98
V-	Objectifs.....	101
Chapitre II-	Résultats	102
Partie I :	Régulation de Rnd3 par la β -caténine dans le carcinome hépatocellulaire	102
I-	Introduction et résultats préliminaires	102
1-	Lien entre Rnd3 et β -caténine dans le CHC humain	102
2-	Mise en place du modèle HepG2	103
3-	Caractérisation du modèle de double extinction de la β -caténine.....	104
II-	Interaction de la E-cadhérine avec la β -caténine	107
III-	Etude de la régulation transcriptionnelle de Rnd3 par la β -caténine	109
IV-	Etude de la régulation de la stabilité de l'ARNm de Rnd3 par la β -caténine	110
V-	Facteurs à l'origine de la régulation différentielle de Rnd3 par la β -caténine	112
Partie II-	La voie de signalisation MRTF/SRF régule les processus mécanosensibles à travers sa nouvelle cible Rnd3.	118
Chapitre III-	Discussion	155
Partie I-	Régulation de Rnd3 par la β -caténine	155
Partie II-	La voie de signalisation MRTF/SRF régule les processus mécanosensibles à travers sa nouvelle cible Rnd3.	160
Chapitre IV-	Conclusion générale	168
Chapitre V-	Références bibliographiques.....	170
Chapitre VI-	Annexes	201
Matériel et méthodes		201
I-	Culture cellulaire	201
II-	Transfections.....	201
1-	Transfection de plasmide	201
2-	Transfection de siARN.....	202
III-	Transduction lentivirale	203
IV-	Extraction protéique	203
V-	Western Blot	203
VI-	Immunoprécipitation.....	204
VII-	Pulldown RhoA actif	205
VIII-	Extraction d'ARN	206
IX-	RT-qPCR	206
X-	Immunofluorescence	208

XI-	Test de formation de sphéroïdes	208
XII-	Test d'étalement cellulaire.....	209
XIII-	Test rapporteur à la luciférase.....	209
XIV-	Mutagenèse dirigée	211
XV-	Immunoprécipitation de chromatine.....	211
XVI-	Analyses statistiques	214
	Publication 2 :.....	215
	Publication 3 :.....	228
	Publication 4 :.....	252
	Participation à des congrès	279

Liste des figures

Figure 1: Polymérisation d'actine selon le modèle du tapis-roulant	2
Figure 2: Les différentes fonctions de l'actine	3
Figure 3: Mode d'action de Arp2/3 et du facteur promoteur de nucléation WASP	5
Figure 4: Mode d'action de la formine.....	6
Figure 5: Représentation des protéines de coiffe Capz et Tropomoduline	7
Figure 6: Mode d'action de la cofiline.....	8
Figure 7: Compétition entre la profiline et la thymosine pour la liaison aux monomères d'actine	10
Figure 8: Protéines responsables des organisations complexes d'actine	11
Figure 9: La superfamille des myosines.....	12
Figure 10 : Interaction entre actine et membranes	13
Figure 11: Liaison entre actine et microtubules.....	14
Figure 12: Effet de composés naturels sur la dynamique de l'actine	16
Figure 13: Membres de la famille des Rho GTPases	18
Figure 14: Cycle de régulation des Rho GTPases.....	20
Figure 15: Exemple d'effecteurs des Rho GTPases	21
Figure 16: Interaction entre RTK et Rho GTPases	23
Figure 17: Exemple de régulation des structures d'actine par la relation intégrines-Rho GTPases	24
Figure 18: Relation entre TGF β et dynamique d'actine	25
Figure 19: Relation entre la E-cadhérine et l'actine.....	26
Figure 20: Voies de signalisation régulant l'actine à travers les Rho GTPases.....	27
Figure 21: Forces régulant l'environnement tridimensionnel des cellules.....	28
Figure 22: Senseurs du changement d'organisation de l'actine.....	29
Figure 23: Régulation de NF- κ B par l'organisation de l'actine	31
Figure 24: Rôle des protéines de liaison à l'actine dans l'activité du récepteur aux androgènes	32
Figure 25: Double rôle des protéines à domaine LIM	34
Figure 26: Voie Hippo/YAP/TAZ.....	35
Figure 27: Activation de YAP/TAZ par les filaments d'actine	37
Figure 28: Régulation de YAP/TAZ selon la force mécanique exercée.....	38
Figure 29: Régulation de la voie MAL/SRF	41
Figure 30: Comparaison des voies TCF-SRF et MRTF/SRF	43
Figure 31: Structure des membres de la famille de la myocardine.....	45
Figure 32: Régulation de l'organisation de l'actine par les Rho GTPases.....	47
Figure 33: Rôle de l'actine nucléaire dans la régulation des MRTFs	48
Figure 34: Régulation de la voie MRTF/SRF par la protéine STARS.....	50
Figure 35: Interaction SMAD-MRTF dans la transition épithélio-mésenchymateuse.....	52
Figure 36: Double régulation de la myocardine par GATA4.....	53
Figure 37: Facteurs régulant l'activité de la voie MRTF/SRF	54
Figure 38: Mécanisme de liaison à l'ADN des voies MRTF/SRF et TCF-SRF.....	56
Figure 39: Exemple de gènes régulés par la voie MRTF/SRF.....	59
Figure 40: Boucle de rétrocontrôle exercée par miR-133.....	60
Figure 41: Boucle de régulation des miR-143 et miR-145.....	61
Figure 42: Niveau d'expression de SRF, MKL1 et MKL2 dans les tissus tumoraux.....	66
Figure 43: Régulation de la migration par la voie MRTF/SRF.....	68
Figure 44: Comparaison du cycle des Rho GTPases classiques et de Rnd3.....	70
Figure 45: Liste de facteurs régulant l'expression de Rnd3	72
Figure 46: Fonctions biologiques de Rnd3.	75

Figure 47: Rôle de Rnd3 sur le cytosquelette d'actine	76
Figure 48: Régulateur de l'apoptose par Rnd3	79
Figure 49: Régulation du cycle cellulaire par Rnd3	81
Figure 50: Modèle expliquant la cause des arythmies fœtales.....	85
Figure 51: Niveau d'expression de Rnd3 dans les cancers	86
Figure 52: Survenue et progression du CHC.....	89
Figure 53: Mutations retrouvées dans le carcinome hépatocellulaire	93
Figure 54: Régulation de la voie Wnt/ β -caténine	95
Figure 55: Classification des groupes de carcinome hépatocellulaire	99
Figure 56: Corrélation entre la présence de mutation de la β -caténine et le niveau d'ARNm de Rnd3 dans le CHC.....	102
Figure 57: Modèle d'étude de la β -caténine dans les cellules HepG2	103
Figure 58: Immunomarquage de la β -caténine lors de l'inhibition de la forme sauvage et mutée	104
Figure 59: Vérification du modèle de découplage des deux formes de la β -caténine dans les cellules HepG2.....	105
Figure 60: Modèle de régulation de Rnd3 par la β -caténine	106
Figure 61: Interaction de la E-cadhérine avec la β -caténine.....	107
Figure 62: Validation de l'analyse de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine dans les cellules HepG2.....	109
Figure 63: Impact de l'extinction de la β -caténine sur l'activité du promoteur de Rnd3 dans les cellules HepG2.....	110
Figure 64: Effet de l'extinction de la β -caténine sur la stabilité de l'ARNm de Rnd3.....	111
Figure 65: Analyse GSEA de différentes voies de signalisation	113
Figure 66: Gènes impliqués dans la voie YAP/TAZ et dérégulés par l'inhibition de la β -caténine sauvage.....	114
Figure 67 : Gènes impliqués dans la voie MRTF/SRF et dérégulés par l'inhibition de la β -caténine sauvage.....	114
Figure 68: Modulation des voies MRTF/SRF et YAP/TAZ par la β -caténine	115
Figure 69: Modèle de régulation de Rnd3 par la β -caténine	117
Figure 70: Test rapporteur à la luciférase	209

Liste des abréviations

3'NT : extrémité 3' non traduite

ABP : actin binding protein

Actine-F : actine filamenteuse

Actine-G : actine globulaire

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adenosine di-phosphate

ADP-Pi : ADP-phosphate inorganique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adenosine tri-phosphate

BSA : bovine serum albumin

Cdc 42 : cell division control protein 42

CHC : carcinome hépatocellulaire

DLC : Deleted in Liver Cancer

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

dNTP : déoxynucléotide tri-phosphate

EMT : epithelial-mesenchymal transition

F-ABP : F-actin binding protein

F-ACAP : F-actin complex associated protein

G-ABP : G-actin binding protein

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

GTPase : guanosine tri-phosphatase

JAM : junctional adhesion molecules

kDa : kilo Dalton

KO : knock-out

LEF/TCF : lymphoide enhancer factor/T-cell factor

LIMK : LIM domain kinase

M : molaire

MAPK : mitogen activated protein kinase

mDia : Diaphaneous related formin

MEC : matrice extracellulaire

MLC : myosin light chain

MLCK : myosin light chain kinase

MLCP : myosin light chain phosphatase

MMP : matrix metalloproteinase

MRTF : myocardin-related transcription factor

PBS : phosphate buffered saline

Pb : paire de base

pH : potentiel hydrogène

PCR : polymerase chain reaction

Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

Ras : rat sarcoma

Rho : Ras homologous

RhoA : Ras homolog gene family, member A

ROCK : Rho-associated protein kinase

RPM : rotation par minute

RT : room temperature

RTK : récepteur à activité tyrosine kinase

SDS : sodium dodecyl sulfate

shRNA : short hairpin RNA

siRNA : small interfering RNA

SRE : serum response element

SRF : serum response factor

SVF : sérum de veau foetal

TBS : Tris-buffered saline

TCF : Ternary complex factor

TEMED : tetramethylethylenediamine

TGF- β : transforming growth factor beta

UA : unité arbitraire

WASP : Wiskott-Aldrich syndrom protein

WT : wild type

Chapitre I : Introduction

I- Le cytosquelette d'actine

Que ce soit durant le développement embryonnaire ou en tant que composant fonctionnel d'un organisme pluricellulaire, chaque cellule est en remodelage physique permanent, afin de modifier sa forme, sa structure, sa position et ses contacts avec les structures extracellulaires, parmi lesquelles les autres cellules. Ces changements requièrent de nombreuses dynamiques intracellulaires permettant d'aboutir à différents processus tels que la migration, l'adhérence, la contraction cellulaire (Olson & Nordheim, 2010).

Ces changements intracellulaires sont régulés par différents stimuli, aussi bien physiologiques que pathologiques, et font intervenir de nombreux acteurs moléculaires. Un des principaux acteurs de ce remodelage est le cytosquelette d'actine. En effet, de par son interaction avec d'autres protéines, les « actin-binding proteins » ou ABPs, et la régulation dynamique de sa polymérisation/dépolymérisation, le cytosquelette d'actine va réguler très finement la structure cellulaire et les différents processus évoqués précédemment.

1- Dynamique des filaments d'actine

L'actine est une protéine de 375 acides aminés, soit 42 kDa. C'est la protéine la plus abondante chez la plupart des eucaryotes. Cette protéine est très conservée et participe à plus d'interactions protéines-protéines que toute autre protéine connue. Les vertébrés expriment trois isoformes principaux de l'actine, à savoir les isoformes α retrouvés dans les muscles lisses, cardiaques et squelettiques, et les isoformes β et γ exprimés dans les cellules musculaires et non-musculaires (Dominguez & Holmes, 2011). Ces isoformes varient au niveau de quelques acides aminés seulement, principalement dans la région N-terminale (Herman, 1993).

Au sein des cellules, l'actine transite entre deux états, une forme monomérique globulaire (actine-G), et un état filamenteux (actine-F) constitué d'une succession de monomères d'actine-G polymérisés en filaments hélicoïdaux. Les monomères d'actine sont capables de fixer l'ADP et l'ATP et possèdent une activité ATPasique jouant un rôle dans la polymérisation de l'actine (Schmidt & Hall, 1998). L'actine filamenteuse possède une extrémité positive et

une extrémité négative, ce qui lui confère une polarité. Cette polarité est à l'origine du modèle du tapis roulant ou « treadmilling » (c'est-à-dire que l'actine polymérise plus rapidement à l'extrémité positive (ou barbed end) qu'à l'extrémité négative (pointed end) (Wegner, 1976)(*Figure 1*).

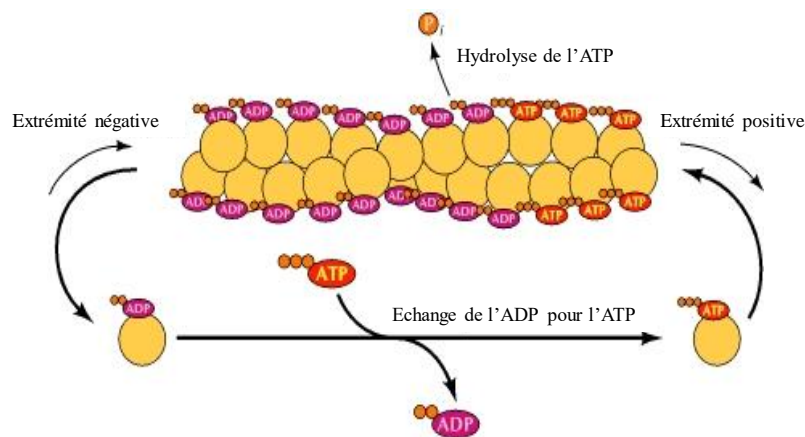


Figure 1: Polymérisation d'actine selon le modèle du tapis-roulant

L'actine filamenteuse présente une extrémité positive et une extrémité négative. Les monomères d'actine-G couplés à l'ATP s'associe préférentiellement à l'extrémité positive du filament d'actine, tandis qu'après hydrolyse de l'ATP en ADP, les monomères d'actine sont libérés préférentiellement à l'extrémité négative. (D'après Cooper, 2000)

2- Les fonctions de l'actine

La dynamique de polymérisation des filaments d'actine, ainsi que la présence de nombreuses protéines se liant à l'actine, va permettre de répondre à différents stimuli et ainsi va aboutir à de profondes modifications de la structure cellulaire, permettant la régulation de nombreuses fonctions (*Figure 2*).

L'actine permet en effet de réguler une grande variété de processus biologiques. Elle permet tout d'abord de réguler la morphologie cellulaire de par la formation de fibres de tension. Elle contrôle également la migration cellulaire, par la formation de structures impliquées dans la motilité cellulaire (lamellipodes, filopodes) et l'invasion par la dégradation de la matrice extracellulaire (podosomes, invadosomes) (Chhabra & Higgs, 2007). L'actine joue aussi un rôle dans le chimiotactisme et le mécanotactisme (Yan & Jin, 2012).

L'actine est également capable de contrôler l'interaction cellulaire avec l'environnement, soit avec la matrice extracellulaire en permettant l'interaction cellule-matrice, soit lors de l'adhésion cellule-cellule en régulant les jonctions cellulaires. Son rôle au niveau des jonctions va également lui permettre de réguler la polarité cellulaire.

L'actine est également impliquée dans les processus de trafic membranaire, au niveau du transport vésiculaire, ainsi que des phénomènes d'endocytose et d'exocytose. L'actine exerce aussi un rôle très important au niveau de la contraction des fibres musculaires.

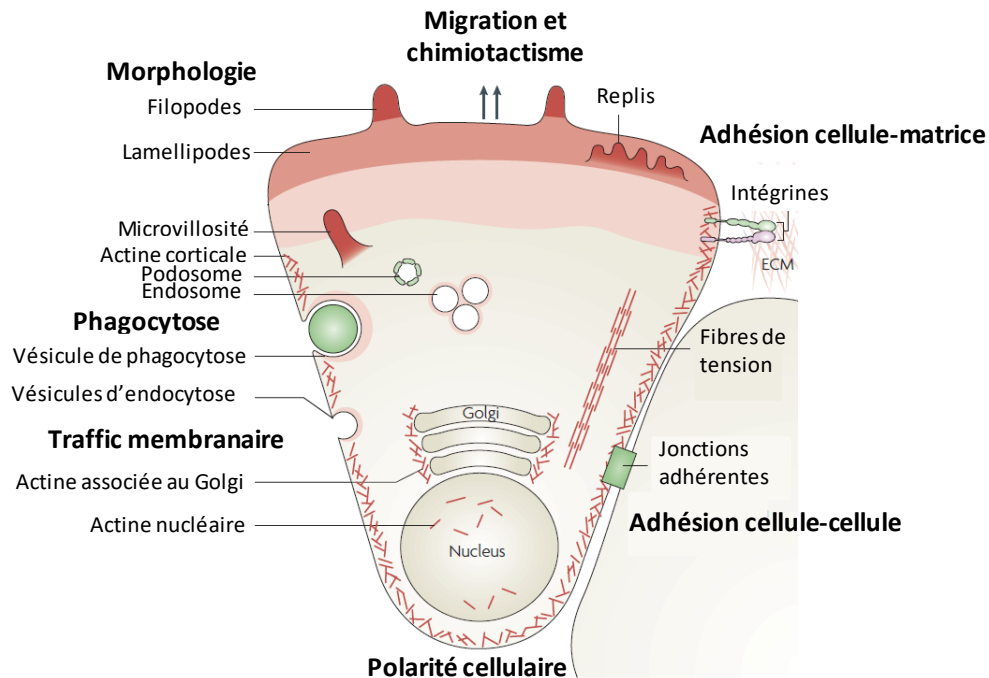


Figure 2: Les différentes fonctions de l'actine

L'actine (représenté ici en rouge) est impliquée dans de nombreuses structures cellulaires permettant la régulation d'un nombre important de fonctions (en gras) (D'après Olson and Nordheim, 2010)

Ces différents processus, finement régulés par la dynamique de l'actine, font intervenir de nombreux autres acteurs protéiques qui interagissent avec l'actine, les ABPs. Ces protéines s'associant à l'actine se comportent soit comme des composants de structures d'actine particulières, soit comme des plateformes de transduction de signal permettant le relais entre structure et activité transcriptionnelle. Il est donc important de connaître ces différentes molécules.

3- Protéines associées à l'actine

La polymérisation de l'actine monomérique en actine filamenteuse ainsi que l'organisation en structures plus complexes se fait par l'association des ABPs avec l'actine. Sans prendre en compte les isoformes, il a été dénombré plus de 160 protéines capables de se lier à l'actine (Dos Remedios et al., 2003; Maciver, 2004).

Ces protéines ont différentes caractéristiques et fonctions et peuvent donc par conséquent être classées en différentes sous-familles décrites dans les paragraphes suivants :

A- Protéines de nucléation

La première étape pour la formation de nouveaux filaments d'actine est la nucléation. L'association et la polymérisation des monomères d'actine sont énergétiquement non favorables avant qu'un noyau de trois monomères d'actine ne soit présent. Ainsi la présence de certaines protéines de liaison à l'actine est cruciale pour permettre une nucléation rapide des monomères d'actine-G.

Le complexe Arp2/3. Les premières protéines de nucléation identifiées ont été les protéines du complexe Arp2/3. Ce complexe est composé de sept sous-unités (ARPC1-5, Arp2, Arp3). Arp2 et Arp3 sont des protéines similaires à l'actine et miment la présence d'un dimère d'actine, ce qui favorise l'assemblage des monomères d'actine à l'extrémité positive et constitue ainsi un site de nucléation stable, le complexe Arp2/3 restant à l'extrémité négative du filament néoformé. Le complexe Arp2/3 est également capable de se lier à des filaments préexistants afin de générer un nouveau site de nucléation et de produire des filaments branchés, avec un angle de 70° entre les filaments (Chhabra & Higgs, 2007).

Après la découverte de ce complexe, il a rapidement été montré que celui-ci n'était pas suffisamment efficace par lui-même pour promouvoir la nucléation de l'actine. En effet, ce complexe a besoin de l'intervention de facteurs de promotion de la nucléation (ou nucleation promoting factors, NPFs). Différents NPFs ont donc été identifiés et peuvent être répartis en deux classes. Les NPFs de type I possèdent un domaine caractéristique VCA (domaine d'homologie à la verproline, aussi connu sous le nom de WH2), un domaine d'homologie à la cofiline (domaine central) et un domaine acide composé de trois motifs conservés permettant la liaison aux monomères d'actine-G et au complexe Arp2/3. Les NPFs de type I sont composés des protéines de la famille WASP (nommée ainsi car d'abord identifié comme protéine déficiente dans le syndrome Wiskott–Aldrich) , incluant WASP, WAVE, NWASP, WASH and JMY (Rotty et al, 2013)(*Figure 3*).

Les NPFs de type II sont composés de la cortactine et de HS1. Ils ne possèdent pas de domaine VCA complet, mais ils contiennent des domaines acides à leur extrémité permettant la liaison au complexe Arp2/3 ainsi que des répétitions en tandem qui lient l'actine filamentueuse. La cortactine n'active que faiblement le complexe Arp2/3 cependant il a été montré qu'elle se lie au filament d'actine nucléé par le complexe et prévient le débranchement, suggérant d'autres fonctions qu'une simple activation du complexe Arp2/3 (Weaver et al., 2001).

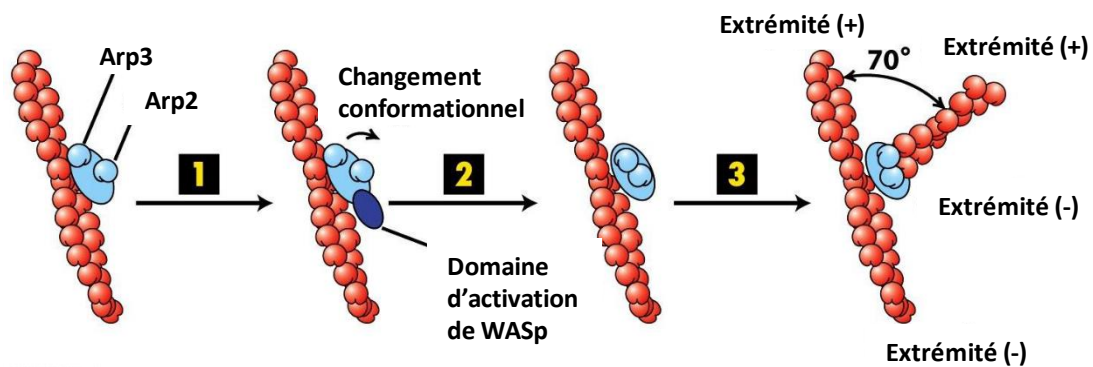


Figure 3: Mode d'action de Arp2/3 et du facteur promoteur de nucléation WASP

Le complexe Arp2/3 permet la nucléation et la formation d'un nouveau filament d'actine à partir d'un filament préexistant, en formant un angle de 70° entre les deux filaments. Le complexe a besoin de l'action de facteurs promoteurs de nucléation tels que WASP pour être efficace. (D'après Freeman, 2008)

Les formines. Les formines sont une famille de protéines identifiée plus récemment en tant que nucléateur de l'actine (**Figure 4**). Contrairement au complexe Arp2/3, les formines ne sont constituées que d'une chaîne polypeptidique à plusieurs domaines (Higgs, 2005). Les formines se dimérisent au niveau de leur domaine FH2 (formin homology 2). C'est ce domaine qui est responsable de la nucléation de l'actine, et les filaments d'actine nucléés par la formine ne sont pas branchés. Après la nucléation, la formine va rester associée à l'extrémité positive du nouveau filament d'actine en cours de polymérisation, activant ainsi l'élongation du filament en empêchant l'accès au filament d'actine par les protéines de coiffe. L'élongation des filaments d'actine médiée par la formine est en outre renforcée par l'interaction de la profiline avec le domaine FH1 de la formine (Kovar, 2006). Il existe différents isoformes de la formine (15 chez les mammifères, six chez la drosophile et *Caenorhabditis elegans*). Bien que toutes les formines possèdent des propriétés similaires à celles décrites précédemment, leur capacité d'activation varie grandement d'une formine à l'autre (Higgs, 2005). Il a de plus été montré que certaines formines assemblent, rompent ou dépolymérisent les filaments d'actine

(Chhabra & Higgs, 2006) . Actuellement, le mécanisme de régulation des formines le plus connu est une activation directe par les GTPases de la famille Rho (Wallar & Alberts, 2003).

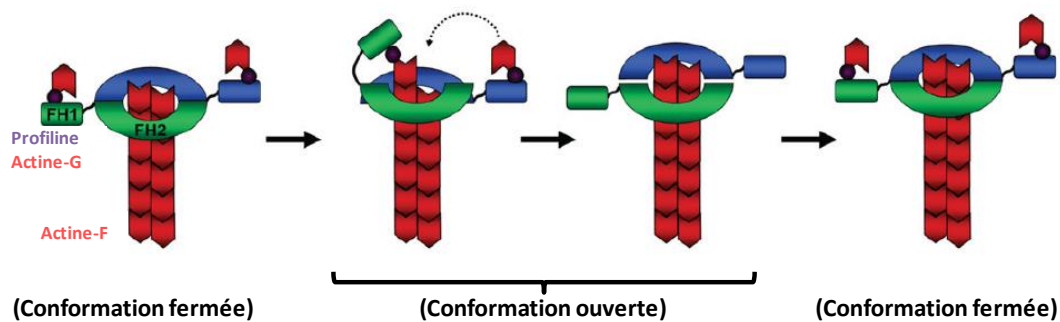


Figure 4: Mode d'action de la formine

Afin de permettre la nucléation et la polymérisation du filament d'actine, deux formines dimérisent au niveau de leur domaine FH2 tandis que le domaine FH1 va s'associer avec la profiline couplée à un monomère d'actine-G. La formine va ensuite ajouter l'actine monomérique sur le filament en cours de polymérisation, et se déplacer en suivant la croissance du filament d'actine. La conformation fermée de la formine empêche d'autres protéines de coiffe de s'associer à l'actine (D'après Campellone & Welch, 2010).

Autres nucléateurs. De nouveaux membres de la famille des nucléateurs d'actine ont été mis en évidence au cours des dernières années (Campellone et al., 2010; Renault et al., 2008). Ces membres contiennent trois ou plus motifs de liaison à l'actine comprenant des domaines WH2. Parmi ces facteurs, on retrouve la famille de protéines Spire, Cordon bleu et la Léiomodine. Le domaine WH2 est partagé avec les NPFs décrits précédemment, cependant ces nouveaux nucléateurs semblent incapables de lier le complexe Arp2/3, et leur domaine WH2 causerait la nucléation en regroupant ensemble un nombre plus ou moins important de monomères d'actine. Les protéines Spire possèdent quatre répétitions du domaine WH2 d'interaction avec l'actine, et peuvent ainsi lier quatre monomères d'actine (Dominguez & Holmes, 2011). De plus ces protéines sont capables de s'associer avec la formine. La protéine Cordon Bleu possède quant à elle trois domaines WH2 et favorise la polymérisation des filaments d'actine par son interaction avec une autre protéine, la profiline. (Husson et al., 2011). Les Léiomodines ont un seul domaine WH2 et sont capables de s'associer à la tropomyosine dans les cellules musculaires afin de réguler la polymérisation de l'actine (Chereau et al., 2008). Récemment, une étude de cristallographie a permis de mieux décrire et de comparer le mécanisme d'action des protéines Cordon bleu et Spire (Chen et al., 2013).

B- Protéines de coiffe

L'assemblage et le désassemblage de l'actine requiert un équilibre dynamique entre les monomères d'actine-G et les deux extrémités non équivalentes des filaments d'actine. Ainsi

la présence de protéines de coiffe, capables de se fixer aux extrémités des filaments d'actine, jouent un rôle prépondérant dans la régulation de cette dynamique (Dos Remedios et al., 2003). Nous allons nous intéresser ici aux deux protéines de coiffes les plus importantes qui se fixent aux extrémités différentes du filament d'actine, la protéine de coiffe CapZ se fixant à l'extrémité positive du filament d'actine, et la tropomoduline, se fixant à l'extrémité négative (Figure 5).

La protéine de coiffe CapZ agit sous forme d'hétérodimère constitué d'une sous-unité α et d'une sous-unité β structurellement semblable, et se lie fermement à l'extrémité positive du filament d'actine. En se fixant à l'extrémité positive du filament d'actine, CapZ va empêcher l'ajout de monomère d'actine à cette extrémité, ce qui va procurer une certaine stabilité aux filaments d'actine. En agissant ainsi, CapZ permet également de maintenir une réserve relativement stable de monomères d'actine, qui s'associeraient autrement très rapidement à l'actine filamenteuse et ne seraient plus disponibles dans les situations nécessitant une importante polymérisation d'actine (Dos Remedios et al., 2003; Pollard, 2016).

La tropomoduline est une protéine coiffant exclusivement l'extrémité négative des filaments d'actine. La tropomoduline s'enroule autour des trois monomères présents à l'extrémité négative du filament d'actine afin de bloquer la perte et l'ajout de monomères d'actine. L'activité de la tropomoduline peut être renforcée par son association avec la tropomyosine. De par son effet, la tropomyosine va aboutir à la polymérisation des filaments d'actine, l'extrémité positive responsable de la croissance du filament étant la seule disponible pour les mouvements d'actine.

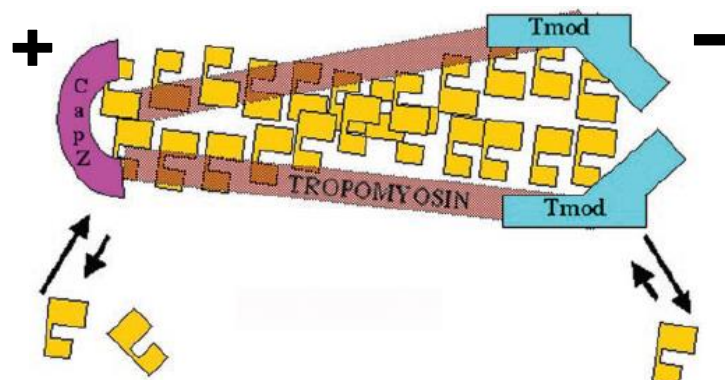


Figure 5: Représentation des protéines de coiffe Capz et Tropomoduline

La protéine de coiffe CapZ se lie à l'extrémité positive du filament d'actine, inhibant la polymérisation de celui-ci, tandis que la tropomoduline se lie à l'extrémité négative et empêche la libération des monomères d'actine et donc la réduction de la taille du filament (D'après Dos Remedios et al., 2003)

C- Les protéines de fragmentation des filaments d'actine

Au cours du temps, les filaments d'actine « vieillissent », et peuvent également parfois être trop nombreux au sein d'une cellule. Ainsi, il existe deux grandes familles de protéines capables de sectionner les filaments d'actine afin de réguler leur nombre et leur efficacité.

Ces deux familles de protéines se différencient par leur taille. La famille des petites cofilines, d'une taille d'environ 15 kDa, et les grandes protéines à multi-domaines de la famille des gelsolines.

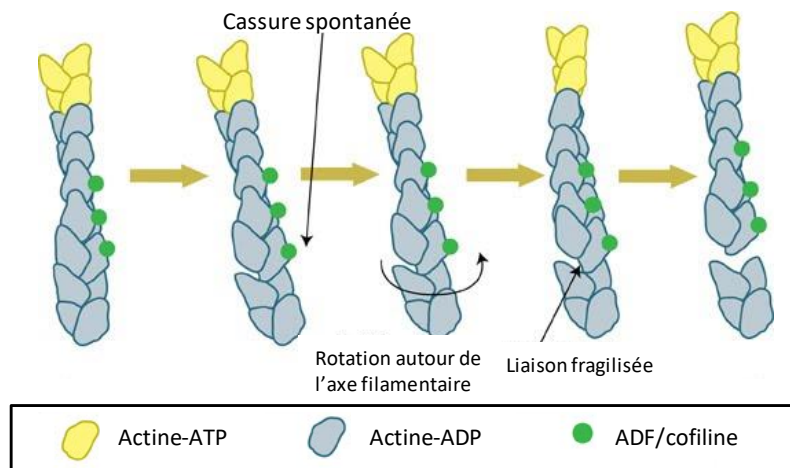


Figure 6: Mode d'action de la cofiline

La cofiline s'associe au filament d'actine couplé à l'ADP, induit une rotation et une segmentation du filament (D'après MBInfo Wiki contributors)

La cofiline (appelée aussi ADF/cofilin pour actin disassembling factor, car identifiée comme entraînant la dépolymérisation des filaments d'actine), se fixe préférentiellement au niveau des filaments d'actine couplés à l'ADP et non à l'ATP. En se fixant sur le filament d'actine, la cofiline va entraîner une rotation du filament d'actine qui va céder et se fragmenter sous la tension, ce qui aboutit à la réduction du filament d'actine (**Figure 6**). Il est intéressant de noter que dans le cas où un filament d'actine est entièrement recouvert de cofiline, il devient plus stable et ne se fragmente plus. Cela serait dû au fait que le filament devient souple s'il est recouvert de cofiline. Le niveau de cofiline lié à l'actine apparaît donc important pour la régulation du sectionnement du filament d'actine (Blanchoin et al, 2014). Chez l'homme, il existe trois isoformes dans la famille ADF/cofiline (Kanellos & Frame, 2016)

La famille des gelsolines contient huit membres qui contiennent de deux à six domaines gelsoline homologues (Silacci et al., 2004). L'activité des gelsolines est régulée par le calcium. En effet celui-ci permet de passer d'un état auto-inhibé de la gelsoline à un état

conformationnel stable permettant la liaison de la gelsoline à l'actine. Le mécanisme d'action de la gelsoline est similaire à celui de la cofiline, à savoir une association avec le filament d'actine afin de couper celui-ci. Il est à noter qu'après clivage, la gelsoline va rester associée à l'extrémité positive du filament clivé, ce qui en fait donc également une protéine de coiffe de l'actine (Burtnick et al, 2004)

D- Protéines de liaison aux monomères d'actine

Il n'existe pas simplement des protéines capables d'interagir avec l'actine sous sa forme filamenteuse. En effet certaines protéines sont capables de se lier aux monomères d'actine afin de favoriser leur association ou au contraire, de les séquestrer et d'empêcher par ce biais la polymérisation de l'actine. Ces protéines permettent ainsi un nouveau niveau de régulation de la dynamique d'actine. Les deux principales protéines se liant aux monomères d'actine sont la profiline et la thymosine $\beta 4$ (Figure 7).

La profiline est une petite protéine de 14 kDa environ, essentielle pour la viabilité de la majorité des eucaryotes. Cette protéine possède une très forte affinité pour les monomères d'actine-ATP ce qui fait que la majorité des monomères d'actine libres dans le cytoplasme sont liés à la profiline, excepté dans les cellules exprimant la thymosine $\beta 4$. La profiline va se lier aux monomères et inhiber par encombrement stérique la nucléation et l'élongation de l'extrémité négative des filaments, tout en permettant l'élongation de l'extrémité positive. La profiline a une faible affinité pour l'actine-ATP au niveau de l'extrémité positive des filaments, ce qui entraîne une dissociation rapide de cette protéine après liaison de son monomère associé. De plus, la profiline diminue l'affinité des monomères d'actine pour l'ADP et l'ATP, ce qui va catalyser la réaction d'échange nucléotidique entre l'ADP et l'ATP des monomères d'actine et ainsi les activer plus rapidement (Mockrin & Korn, 1980; Vinson et al, 1998).

La thymosine $\beta 4$ est un peptide de 43 acides aminés, originellement décrit comme l'hormone thymique, mais qui constitue également la protéine de liaison à l'actine la plus abondante dans certains types cellulaires tels que les leucocytes ou les plaquettes. Tout comme la profiline, la thymosine possède une forte affinité pour les monomères d'actine-ATP. Ainsi, très peu de monomères d'actine ne sont libres et coiffés d'aucune protéine. La thymosine agit en s'associant aux deux extrémités des monomères d'actine, empêchant ainsi

toute association de monomères et la polymérisation d'actine. Il existe une réelle compétition entre la profiline et la thymosine pour la liaison aux monomères d'actine (Irobi et al., 2004).

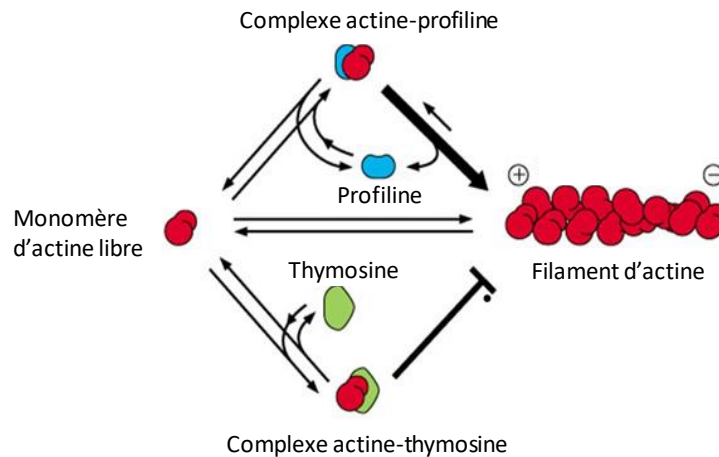


Figure 7: Compétition entre la profiline et la thymosine pour la liaison aux monomères d'actine
 La profiline et la thymosine $\beta 4$ ont une forte affinité pour les monomères d'actine, et la régulation de leur expression influera sur la polymérisation des filaments d'actine (D'après Pollard, 2016)

E- Protéines impliquées dans les structures d'actine d'ordre supérieur

Afin d'adopter de nombreuses formes et d'assurer de nombreuses fonctions, l'organisation de l'actine en réseaux plus complexes est nécessaire. Les différentes structures générées peuvent être non seulement responsable de l'aspect général de la cellule, comme par exemple avec la formation des microvilli, mais il peut aussi s'agir de structures plus transitoires reliées à une fonction particulière, comme la formation de filopodes impliqués dans la migration cellulaire. On peut différencier les protéines impliquées dans la formation de structures d'ordre supérieur selon deux catégories : les protéines responsables de la formation de faisceaux d'actine et les protéines de réticulation des filaments d'actine (Borrego-Diaz et al., 2006; Matsudaira, 1994) (**Figure 8**).

Les faisceaux d'actine caractérisent l'assemblage parallèle ou antiparallèle de différents filaments d'actine. Cette organisation est obtenue soit par des protéines qui possèdent deux domaines de liaison à l'actine et vont ainsi relier deux filaments, soit par des protéines multimériques, où chaque sous-unité ne contient qu'un seul domaine de liaison à l'actine. On peut également diviser les faisceaux d'actine en différentes catégories, selon s'ils sont plus ou moins lâches ou serrés. Cela dépend essentiellement de la protéine responsable du regroupement des faisceaux d'actine. Par exemple, la présence de deux domaines de

liaison à l'actine très rapprochés dans la fascine ou la fimbrine va aboutir à la formation de faisceaux d'actine serrés, tels que ceux retrouvés dans les microvilli. Au contraire, l' α -actinine qui ne possède qu'un domaine de liaison à l'actine et se dimérise afin de former les faisceaux d'actine va permettre la formation de structures plus relâchées, comme au niveau des fibres de tension.

La réticulation de l'actine est également assurée par des protéines ou des complexes protéiques contenant plusieurs domaines de liaison à l'actine, mais ces domaines sont en général séparés par une plus grande distance et permettent d'aboutir à une structure assez souple, qui permet la formation d'un vrai réseau d'actine. Parmi les protéines responsables de ces structures on peut citer la filamine qui agit sous forme de dimère, ou bien la spectrine qui est tétramérique. Certaines protéines monomériques peuvent également réticuler l'actine, comme la transgeline (Olson & Nordheim, 2011).

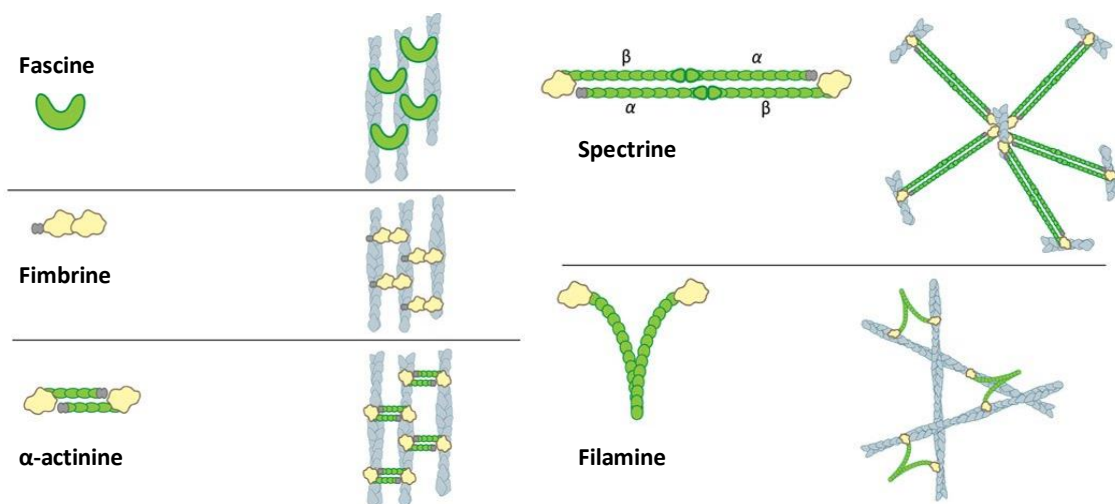


Figure 8: Protéines responsables des organisations complexes d'actine

Certaines protéines telles que la fascine, la fimbrine ou l' α -actinine permettent la formation de faisceaux d'actine tandis que d'autres protéines, souvent plus grandes ou plus lâches, telles que la spectrine et la filamine, vont réticuler l'actine en un véritable réseau. (D'après MBIInfo Wiki)

F- L'actine en tant que plateforme mécanique

Plutôt que de réguler la dynamique de l'actine ou de permettre la formation de structures d'actine particulières, certaines protéines vont utiliser l'actine comme un support physique pour leur mouvement, ou comme une route à suivre. Bien que certaines de ces protéines altèrent indirectement l'organisation de l'actine, ce n'est pas leur premier rôle. Ce type de

protéines peut être classé en trois catégories distinctes : les myosines, les protéines d'ancrage aux complexes membranaires et les protéines de liaison entre les différents éléments du cytosquelette.

Les myosines sont des moteurs moléculaires qui produisent un mouvement à travers l'hydrolyse de l'ATP. Par ce biais, l'actine sert de chemin à suivre pour les myosines. La structure générale des myosines est constituée de chaînes légères et de chaînes lourdes possédant des têtes capables de se lier à l'actine. Même si la myosine la plus connue est la myosine II qui contient deux têtes et est impliquée dans la contraction et la génération de force, plus de 17 classes de myosines ayant des fonctions diverses ont désormais été identifiées (Hodge et al, 2000)(**Figure 9**). Ces différentes myosines ont en commun d'utiliser l'actine comme moyen pour permettre divers processus tels que la contraction musculaire ou le déplacement de leur cargaison. En effet les myosines peuvent se lier et transporter différents éléments, que ce soit des membranes ou des vésicules, des filaments d'actine ou d'autres protéines. Il est important de noter qu'à l'exception de la myosine VI, les myosines

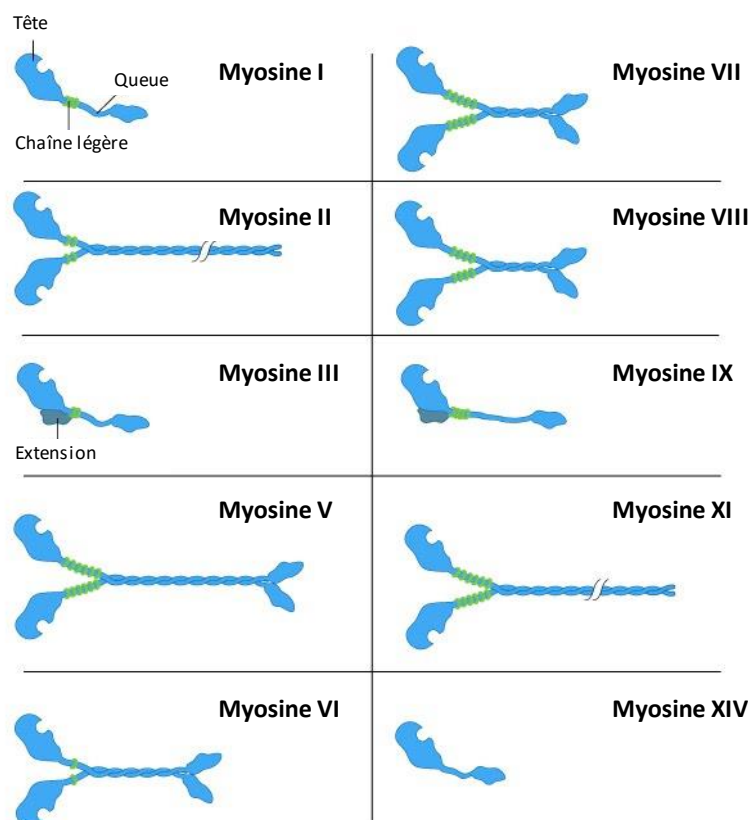


Figure 9: La superfamille des myosines

Exemple de différentes classes de myosines. Les myosines partagent un domaine de liaison à l'actine sur leur chaîne lourde, mais le reste de leur structure varie grandement d'une classe à l'autre. En bleu apparaissent les chaînes lourdes, en vert les chaînes légères. (D'après MBInfoWIKI)

se déplacent exclusivement de l'extrémité négative vers l'extrémité positive des filaments d'actine.

La diversité des structures que peut former l'actine nécessite la connexion de celle-ci avec d'autres éléments cellulaires. Cette connexion est réalisée par deux groupes que l'on peut subdiviser en deux catégories : les protéines permettant l'ancrage aux membranes ou aux protéines membranaires d'une part, et les protéines servant de lien entre les différents éléments du cytosquelette d'autre part.

Différentes protéines sont capables de relier l'actine aux éléments membranaires. La dystrophine et l'utrophine permettent la liaison de l'actine au dystroglycan, un récepteur membranaire (Clainche & Carlier, 2008; Rajakylä & Vartiainen, 2014), tandis que la taline et la vinculine sont capables de connecter les filaments d'actine aux intégrines et ainsi d'assurer le lien entre le cytosquelette d'actine et la matrice extracellulaire au niveau des adhésions focales (Clainche & Carlier, 2008). On trouve aussi de telles protéines au niveau des jonctions cellulaires, avec les protéines ZO-1 et ZO-2 dans les jonctions serrées reliant les claudines et les occludines à l'actine, et la β -caténine au niveau des jonctions adhérentes, assurant le lien entre cadhérine et actine (Figure 10). D'autres protéines telles que les annexines relient directement actine et membrane.

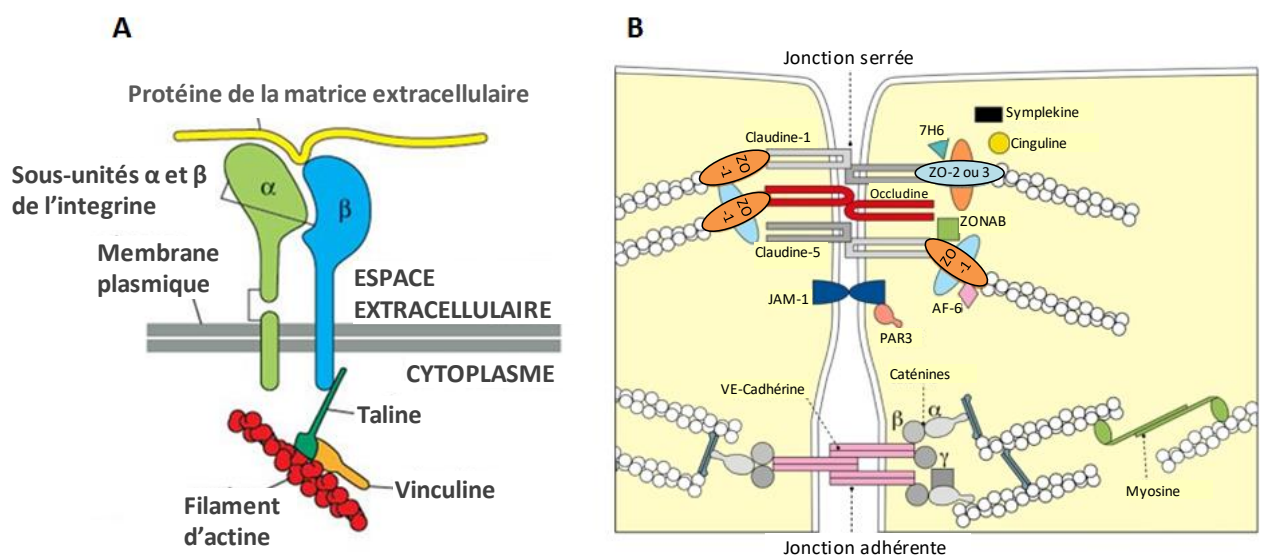


Figure 10 : Interaction entre actine et membranes

L'actine est capable de se lier aux membranes (A) par l'intermédiaire de la taline et la vinculine au niveau des adhésions focales et (B) au niveau des jonctions serrées par les protéines ZO, et des jonctions adhérentes par l' α -caténine et la β -caténine (D'après Förster, 2008).

Un nombre plus restreint de protéines permet de relier actine et autres éléments du cytosquelette, c'est-à-dire de relier l'actine aux microtubules ou aux filaments intermédiaires. La famille des plakines représente une grande partie de ces protéines. La spectraplakine tout d'abord est par exemple capable de relier actine et microtubules (Akhmanova & Steinmetz, 2015) (**Figure 11**). La dystonine a quant à elle été identifiée comme impliquée dans la liaison entre l'actine et les filaments intermédiaires (Y. Yang et al., 1996). Enfin, la plectine possède la capacité de relier l'actine non seulement aux microtubules mais également aux filaments intermédiaires (Winder, 2005). Ces protéines sont d'une grande importance afin de maintenir l'intégrité cellulaire mais également dans la transduction de signaux entre les différents éléments du cytosquelette.

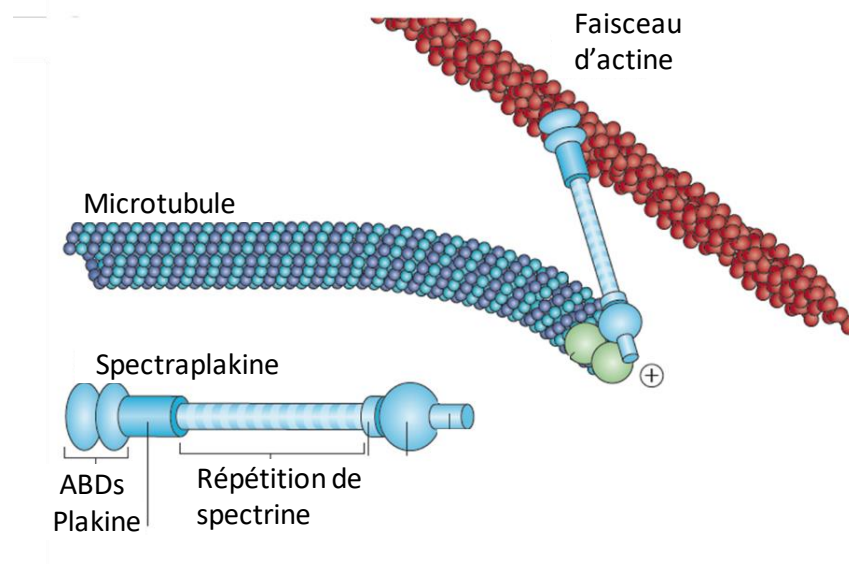


Figure 11: Liaison entre actine et microtubules

La spectraplakine est capable d'assurer la liaison entre les filaments d'actine et les microtubules. (D'après Akhmanova & Steinmetz, 2015)

G- Composés naturels ciblant l'actine

En dehors des protéines présentées précédemment, il existe divers composés produits par différents organismes qui peuvent réguler l'organisation du cytosquelette d'actine. Ces composés peuvent soit favoriser soit inhiber la polymérisation et la formation de filaments d'actine. En laboratoire, ces composés sont couramment utilisés afin de pouvoir moduler artificiellement la dynamique de l'actine, ce qui explique la nécessité de connaître l'action de ces composés.

Les cytochalasines tout d'abord sont des métabolites fongiques qui ont la capacité de se lier aux extrémités positives des filaments d'actine et de bloquer la polymérisation de l'actine

en empêchant l'ajout de nouveaux monomères d'actine. En inhibant la polymérisation, les cytochalasines ont la capacité de changer la morphologie cellulaire, d'inhiber la division cellulaire et même de déclencher l'apoptose (Haidle & Myers, 2004). Il existe de nombreuses cytochalasines. Bien que cela n'est pas été démontré pour toutes les cytochalasines, certaines comme la cytochalasine D ont également la capacité de se lier aux monomères d'actine et contribuent ainsi davantage à empêcher la polymérisation de l'actine (Goddettes & Frieden, 1986). Les cytochalasines possèdent également des fonctions indépendantes de leur rôle sur l'actine. Par exemple, la cytochalasine D inhibe la synthèse protéique (Ornelles, Fey, & Penman, 1986) tandis que la cytochalasine E prévient l'angiogenèse (Udagawa et al., 2000).

Les latrunculines sont des toxines produites par certaines éponges, notamment du genre *Negombata* et *Latrunculia*, d'où provient le nom. Au contraire des cytochalasines qui lient essentiellement les filaments d'actine, les latrunculines vont se lier aux monomères d'actine et ainsi prévenir la polymérisation des filaments. Dans les cellules, l'utilisation de la latrunculine va provoquer une perte des filaments d'actine (Yarmola et al, 2000).

La phalloïdine appartient à une classe de toxine appelées phallotoxines, extraite des champignons *Amanita phalloides* et *Amanita rubescens*. Ces champignons sont extrêmement dangereux pour l'homme. La phalloïdine a la capacité de se lier aux filaments d'actine et ainsi d'empêcher la dépolymérisation de ceux-ci. Couplée à un fluorophore, la phalloïdine est couramment utilisé en microscopie pour visualiser l'actine-F (J. A. Cooper, 1987).

La swinholide A, isolée de l'éponge marine *Theonella swinhoei*, est une toxine qui se lie aux monomères d'actine et qui va rapidement induire la fragmentation des fibres de stress (Bubb et al, 1995).

Enfin, la jaspilakolide est un peptide isolé de l'éponge *Jaspis Johnsoni* et, au contraire des composés précédents, est un inducteur de la polymérisation de l'actine. Son mode d'action passe par une fixation sur les filaments d'actine et une stimulation de la nucléation (Bubb et al, 2000)(*Figure 12*).

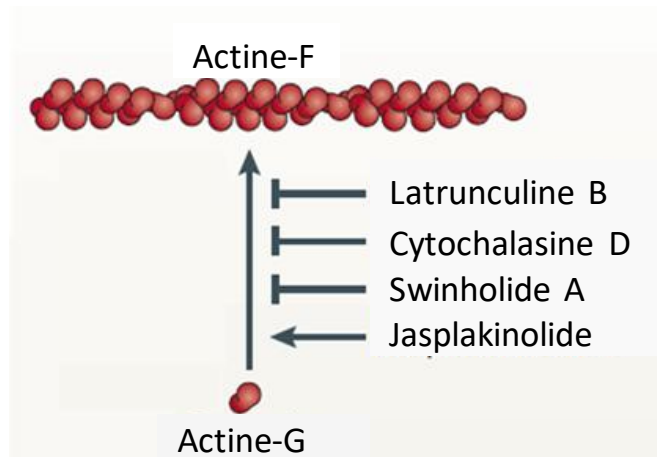


Figure 12: Effet de composés naturels sur la dynamique de l'actine

Différents composés naturels provenant de différents organismes ont un effet sur la polymérisation de l'actine. Même si leur mécanisme est différent, la latrunculine B, la cytochalasine D et la swinholide A inhibe la formation des filaments d'actine tandis que la jasplakinolide va favoriser cette formation (D'après Olson & Nordheim, 2010)

4- Voies de signalisation régulant la dynamique de l'actine

Comme décrit précédemment, l'actine est donc capable d'adopter de multiples formes au sein des cellules, afin de former des structures permettant de répondre à des fonctions cellulaires particulières. La régulation de la dynamique de l'actine passe par l'intervention des nombreuses protéines existantes capables de se lier à l'actine. Mais quels sont les signaux et les protéines responsables de la régulation de ces ABPs ?

Les cellules reçoivent des stimuli extracellulaires de nature très différentes. Il peut s'agir de facteurs solubles tels que les facteurs de croissance, les cytokines ou les hormones, qui interagissent avec des récepteurs de surface. Il peut aussi s'agir de stimuli provenant de l'interaction de la cellule avec la matrice extracellulaire. Enfin, les contacts entre cellules permettent également de générer ce type de signal. L'objectif de ces stimuli est de générer des changements dans l'organisation de l'actine à des sites spécifiques. La transduction de ces différents signaux se fait essentiellement à travers l'activité des Rho GTPases, dont les membres les plus connus sont les protéines RhoA, Rac1, et Cdc42 (Heasman & Ridley, 2008; Jaffe & Hall, 2005; Catherine D Nobes & Hall, 1995).

Une fois activées, ces Rho GTPases se lient à une variété d'effecteurs, incluant des protéines kinases (Z. Zhao & Manser, 2005), et certaines protéines de liaison à l'actine. Les conséquences de telles interactions sont l'activation ou l'inhibition, directe ou indirecte, de la polymérisation d'actine. Les différents constituants de la famille des Rho GTPases ainsi que

leurs fonctions spécifiques seront décrits dans une première partie, tandis que les parties suivantes auront pour objectif de présenter les différentes voies de signalisation qui aboutissent à la régulation des Rho GTPases et par conséquent à une modulation de la dynamique de l'actine.

A- Les GTPases de la famille Rho

a- Membres de la famille des Rho GTPases

Les protéines de la superfamille Ras sont de petites guanosine triphosphatases (GTPases) monomériques. On dénombre plus de 150 membres de cette superfamille chez l'homme. Sur la base de leur homologie de séquence et de leurs fonctions, les GTPases de la superfamille Ras sont classées en 5 différentes familles (Wennerberg et al., 2005).

On trouve tout d'abord la famille Ras, avec les protéines oncogéniques H-, K- et N-Ras qui sont les membres fondateurs de la superfamille Ras. Les protéines de cette famille sont largement étudiées et sont connues pour réguler l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire.

La famille Rab (Ras-like protein in brain) est impliquée dans la régulation du trafic intracellulaire des vésicules.

La famille Ran (Ras-like nuclear protein) n'est composée que d'une seule protéine qui est toutefois la petite GTPase la plus abondante au sein des cellules. Cette protéine est impliquée dans le transport nucléocytoplasmique des protéines et des ARNs. La protéine Ran régule aussi l'assemblage du fuseau mitotique, la réplication d'ADN ainsi que l'assemblage de l'enveloppe nucléaire.

Les protéines de la famille Arf (ADP-ribosylation factor) sont impliquées dans le transport des vésicules, au niveau de la formation des manteaux vésiculaires.

Enfin, les GTPases de la famille Rho (Ras homologous), auquel ce travail s'intéresse particulièrement, sont des régulateurs clés de l'organisation de l'actine, du cycle cellulaire et de l'expression génique (Etienne-Manneville & Hall, 2002). Chez l'homme, on dénombre 23 membres à l'intérieur de cette famille, également classés en 6 sous-familles en fonction de leur séquence : on trouve la sous-famille Rho (RhoA/B/C), la sous-famille Rac (Rac1/2/3 and RhoG), la sous-famille Cdc42 (Cdc42/G25K, TCL, TC10, Chp and Wrch), les Rnds (Rnd1/2/3),

RhoBTB (RhoBTB1/2/3), et la famille Miro (Miro 1/2); à noter qu'il existe trois autres membres n'appartenant à aucune sous-famille, il s'agit des protéines RhoD, Rif/RhoF et TTF/RhoH (Grise, Bidaud, & Moreau, 2009)(Figure 13).

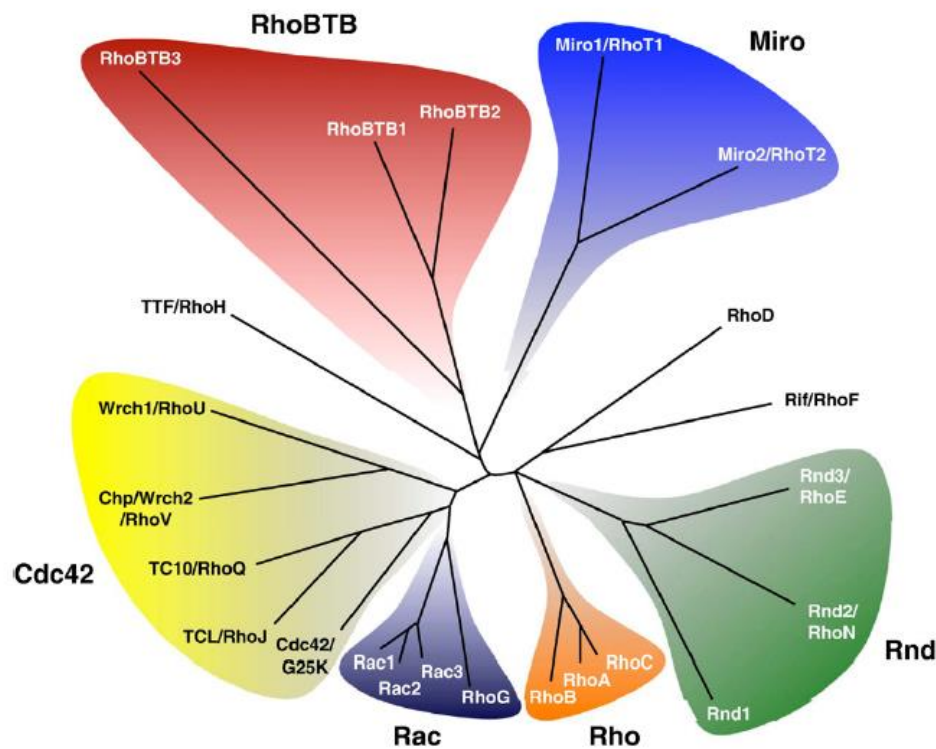


Figure 13: Membres de la famille des Rho GTPases

Les GTPases de la famille Rho sont classées en 6 sous-familles ; trois autres membres n'appartenant à aucune sous-famille (Grise et al., 2009)

b- Régulation cyclique de l'activité des Rho GTPases

Les GTPases de la famille Rho sont capables d'intégrer des signaux de nature variée qui sont transmis par des récepteurs membranaires (récepteurs aux cytokines, récepteurs impliqués dans l'adhésion comme les intégrines, récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques, récepteurs à activité tyrosine kinase sur lesquels se fixent les facteurs de croissance), et vont ensuite répondre à ces signaux en interagissant avec une grande variété de protéines, appelées les effecteurs, afin d'induire des voies de signalisation particulières.

Comme d'autres membres de la superfamille Ras, la plupart des Rho GTPases ont la particularité d'alterner entre un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP. Afin de réguler ce cycle, les Rho GTPases interagissent avec trois types de protéines régulatrices : les facteurs d'échange guanidique (GEFs) qui activent les Rho GTPases en catalysant l'échange du

GDP pour le GTP ; les protéines activatrices de l'activité GTPasique (GAPs) qui stimulent l'activité GTPasique intrinsèque des Rho GTPases et inhibent donc leur activité ; et enfin les inhibiteurs de la dissociation des nucléotides guanidiques (GDIs), qui inhibent l'hydrolyse des nucléotides et contribuent également à réguler la localisation membranaire ou cytoplasmique des Rho GTPases (Grise et al., 2009)(**Figure 14**).

Les Rho GTPases subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que l'ajout de groupements lipidiques à leur extrémité C-terminale, appelé prénylation. Cette prénylation implique l'ajout d'un groupement farnésyl ou géranylgeranyl au niveau du motif CAAX des Rho GTPases. Ce groupement lipidique permet la fixation des GDIs, qui permettent d'une part après la traduction de transporter les Rho GTPases au niveau des membranes, mais elles interagissent également avec les Rho GTPases une fois que celles-ci sont inactivées par les GAPs, et vont permettre l'extraction des Rho GTPases des membranes et leur séquestration dans le cytoplasme. En inhibant l'échange nucléotidique et la dégradation par le protéasome, les GDIs permettent ainsi d'avoir une réserve de Rho GTPases facilement activables (Hodge & Ridley, 2016). Il est important de noter que d'autres modifications post-traductionnelles telles que la palmitoylation, la sumoylation, l'ubiquitination et la phosphorylation sont également impliquées dans la régulation de l'activité et de la localisation des Rho GTPases. La palmitoylation de Rac1 augmente par exemple sa stabilité et son activité (Navarro-Lérida et al., 2012). A l'inverse, la phosphorylation de RhoA va améliorer son affinité pour les GDIs et ainsi faciliter son extraction membranaire et son inactivation (Lang et al., 1996). L'ubiquitination des Rho GTPases, autrement dit l'ajout de groupement ubiquitine permettant d'envoyer les Rho GTPases dans la voie de dégradation du protéasome, a été bien caractérisé pour les Rho GTPases Rac1 et RhoA, et serait le mécanisme prépondérant dans la dégradation des Rho GTPases (Deng & Huang, 2014). Rac1 est également la première Rho GTPase à avoir été identifiée comme cible de la sumoylation, qui permettrait le maintien de Rac1 dans un état actif (Castillo-Lluva et al., 2010).

Il existe six membres au sein de la famille Rho qui ne sont pas régulés par le cycle classique décrit précédemment. Il s'agit des protéines Rnd1, Rnd2, Rnd3, RhoH, RhoBTB1 et RhoBTB2. Ces protéines possèdent des mutations au niveau des acides aminés impliqués dans l'activité GTPasique des Rho GTPases, et sont ainsi en permanence liés au GTP et sous conformation active (Riou et al., 2010). La régulation de ces protéines ne fait pas intervenir les RhoGEFs et RhoGAPs, mais à lieu au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel ou post-traductionnel.

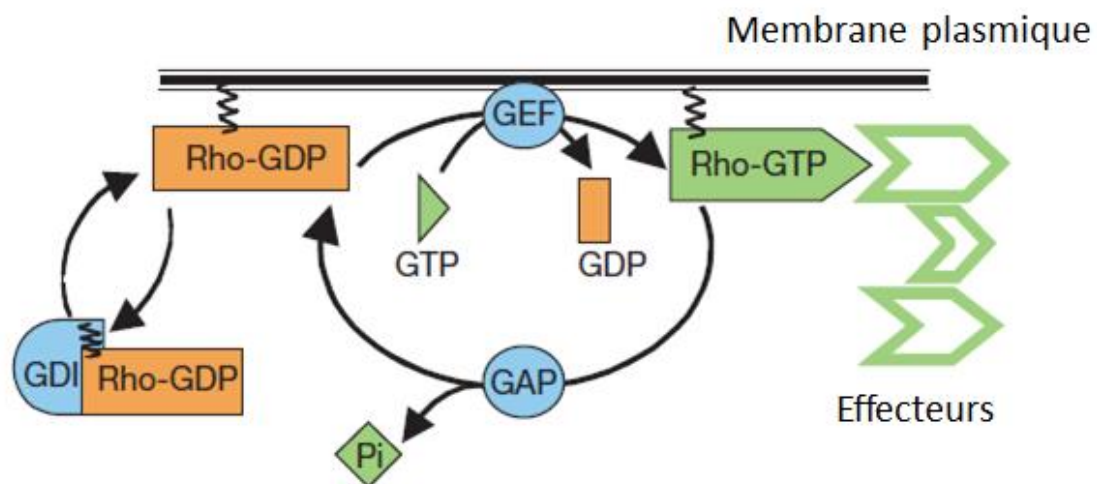


Figure 14: Cycle de régulation des Rho GTPases

Les Rho GTPases alternent entre un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP. Les protéines GEFs qui catalysent l'échange du GDP par le GTP, activent les Rho GTPases, tandis que les protéines GAPs les inactivent en favorisant l'activité GTPasique intrinsèque des Rho GTPases. Les GDIs régulent la localisation et la disponibilité des Rho GTPases (D'après Etienne-Manneville & Hall, 2002)

c- Fonctions biologiques des Rho GTPases

Les fonctions précises des Rho GTPases vont dépendre des effecteurs avec lesquels elles interagissent. Les effecteurs des Rho GTPases sont de trois types principaux : il peut s'agir de protéines kinases, de phospholipases ou de protéines d'échafaudage. Plus de 70 protéines effectrices des Rho GTPases sont répertoriées à ce jour (Bustelo et al., 2007)(**Figure 15**).

Parmi les membres de la famille Rho, les protéines RhoA, Rac1 et Cdc42 sont les plus étudiées. Les Rho GTPases sont des régulateurs clés de la dynamique de l'actine. RhoA favorise la formation de fibres de tension et l'assemblage des adhésions focales, Rac1 facilite la formation de lamellipodes et des replis membranaires (membrane ruffles). Enfin Cdc42 est impliqué dans la formation des microvillosités et des filopodes (Etienne-Manneville & Hall, 2002). Les effecteurs de ces trois Rho GTPases impliqués dans la polymérisation de l'actine

sont de nature différente. RhoA active la formine mDia1 qui facilite l'élongation du filament d'actine. RhoA, par son activation de ROCK, va permettre la formation de structures d'actine plus complexes telles que la formation de filaments acto-myosiques, à travers la phosphorylation et l'activation de MLC-2 (Kirsi Riento & Ridley, 2003).

Rac1 et Cdc42 vont quant à eux activer des membres de la famille WASP (Wiskott-Aldrich Syndrom protein), respectivement WAVE et WASP, qui vont aboutir à l'activation du nucléateur Arp2/3 et à la polymérisation de l'actine. Rac1 et Cdc42 permettent également l'activation d'autres formines. En complément de leur rôle direct sur la polymérisation de l'actine, Rac1 et Cdc42 activent les protéines de la famille PAK qui stimulent la protéine LIMK. Cette protéine inhibe la cofiline en la phosphorylant, ce qui contribue à la polymérisation de l'actine. LIMK peut aussi être activé par RhoA, à travers son action sur ROCK (Jaffe & Hall, 2005).

Cdc42 est impliqué dans la régulation de la polarité épithéliale à travers son interaction avec les protéines du complexe de polarité Par3/Par6/aPKC (Joberty et al., 2000).

Les Rho GTPases sont également impliquées dans la régulation des microtubules (Gundersen et al., 2005), du cycle cellulaire (Coleman et al., 2004), de l'endocytose et de l'exocytose (Ridley, 2001), et des adhésions cellulaires (Fukuhara et al., 2004; Noritake et al., 2004).

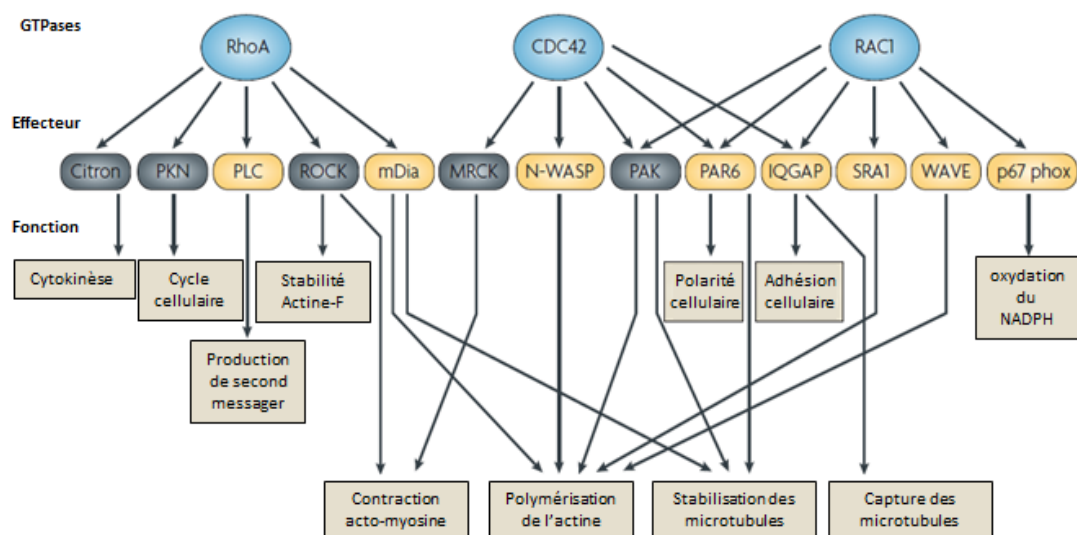


Figure 15: Exemple d'effecteurs des Rho GTPases

Les Rho GTPases interagissent avec une grande variété d'effecteurs, dont certains sont des protéines kinases (en gris). Ces interactions permettent de réguler de nombreux processus cellulaires (D'après Iden & Collard, 2008)

De par la grande variété de leurs effecteurs, les Rho GTPases ont un rôle important dans la régulation de la dynamique d'actine (Ridley, 2015). De plus, un grand nombre de voies de signalisation sont à l'origine de l'activation de ces Rho GTPases et influencent ainsi la dynamique de l'actine. Les paragraphes suivants ont pour objectif de présenter plus en détail ces voies de signalisation capables de réguler le cytosquelette d'actine à travers leur rôle sur les Rho GTPases.

B- Récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont une grande famille de récepteurs à sept domaines transmembranaires et capables de se coupler aux protéines G hétérotrimériques. Ces dernières permettent d'induire des modifications du cytosquelette d'actine en activant certaines Rho GTPases. Il est par exemple décrit que l'activation des RCPG va permettre la motilité cellulaire en activant RhoA et Cdc42, ce qui entraîne la modification de l'actine et la formation de fibres de tension et de filopodes (Cotton & Claing, 2009).

C- Récepteurs à activité tyrosine kinase

Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) sont des récepteurs transmembranaires monomériques, même si certains agissent en tant que multimères, tel que l'insuline. Chez l'homme, il existe 58 récepteurs à activité tyrosine kinase. Par conséquent, un grand nombre de molécules sont capables de se lier à ces récepteurs et de les activer. On pense par exemple à différents facteurs de croissance tels que l'EGF, le PDGF, le VEGF, ou encore les éphrines. La voie la plus connue de transduction de signal après l'activation de ces différents récepteurs est l'activation de la protéine Ras, une petite GTPase, qui va aboutir à la stimulation de la voie MAPK (protéines kinases activées par les mitogènes). Une autre voie de signalisation régulée par Ras après stimulation des RTK est la voie Pi3K/Akt.

En dehors de ces deux voies, il est intéressant de noter que plus de la moitié des récepteurs à activité tyrosine kinase identifiés sont capables d'interagir avec au moins une Rho GTPase (Schiller, 2006) (Figure 16). L'interaction entre les RTK et les Rho GTPases fait l'objet d'études fréquentes, et cette interaction aboutit parfois à la modulation du cytosquelette d'actine. Le récepteur à l'EGF (EGFR), a par exemple été décrit comme impliqué dans l'inactivation de la cofiline, induisant ainsi la polymérisation de l'actine et la formation de fibres de tension. Cela serait dû à une collaboration avec RhoA (Marcoux & Vuori, 2005). De même, certains récepteurs aux éphrines tel que Eph4 ont été décrit comme stimulant l'activité de RhoA, ce qui se traduit par la polymérisation d'actine et la croissance axonale (Harbott & Nobes, 2005; Sahin et al., 2005).

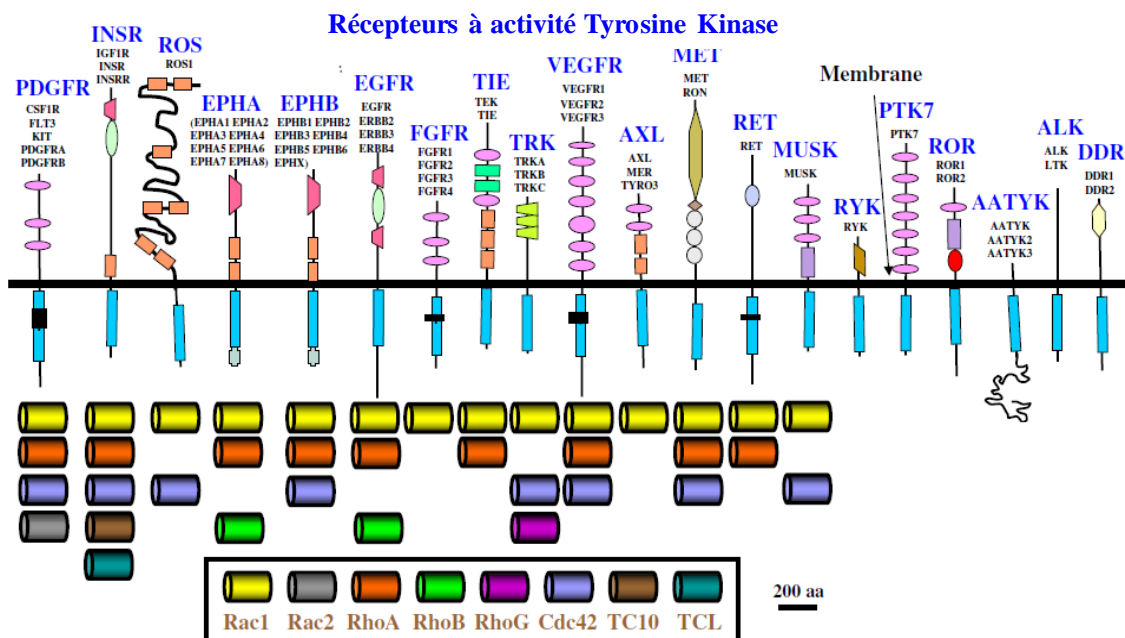


Figure 16: Interaction entre RTK et Rho GTPases

Un grand nombre de récepteurs à activité tyrosine kinase est capable d'activer au moins une Rho GTPase, suggérant ainsi la possibilité d'une modulation de l'actine à travers ces protéines (D'après Schiller, 2006)

D- Voie des intégrines

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires qui relient les cellules à la matrice extracellulaire. Ce sont les composants majoritaires des adhésions focales. Les intégrines permettent à la cellule de connaître la composition chimique et le statut mécanique de la matrice extracellulaire. Une fois activées, les intégrines régulent de nombreux phénomènes tels que le cycle cellulaire ou la motilité cellulaire. Le rôle des intégrines dans la modulation

du cytosquelette d'actine est bien connu. Les intégrines activées vont stimuler les protéines kinases SRC, ILK et FAK, ce qui entraîne l'activation de Rho GEF, protéines activant les Rho GTPases, et donc aboutit à la régulation de ces dernières, notamment RhoA et Rac1. Les Rho GTPases ainsi activées permettent la modulation du cytosquelette d'actine afin de réaliser différentes fonctions, telles que l'adhésion cellulaire, l'étalement (**Figure 17**) ou la migration (Huveneers & Danen, 2009).

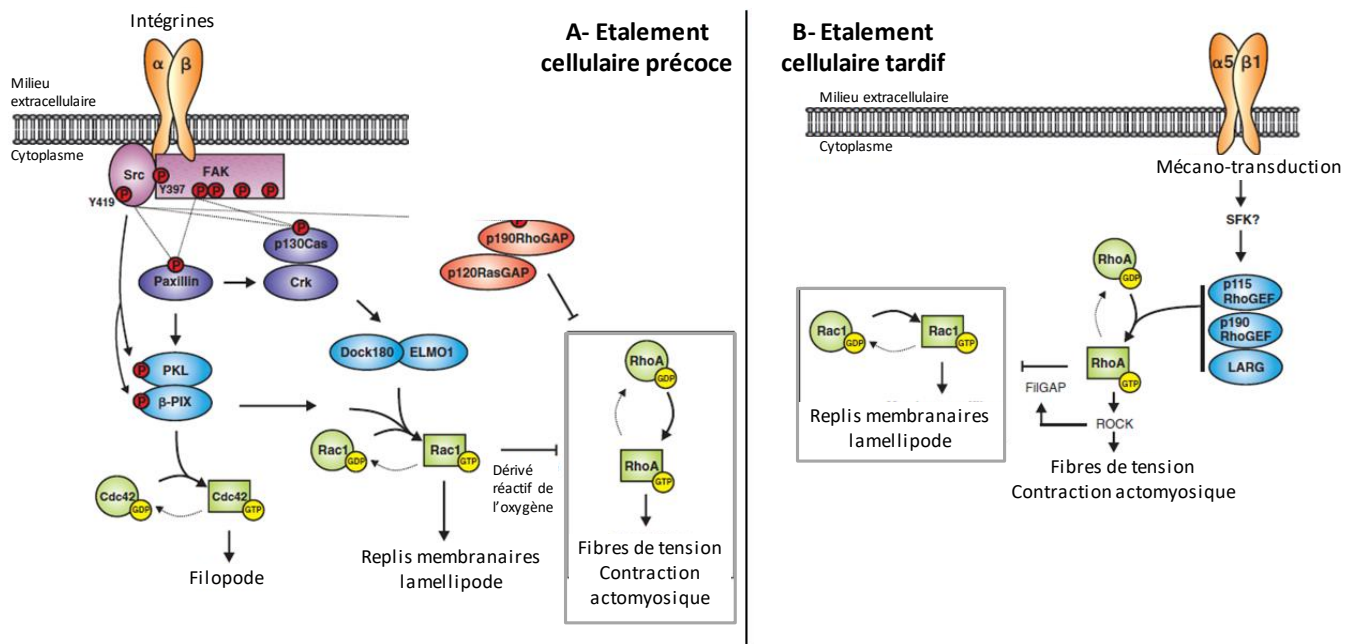


Figure 17: Exemple de régulation des structures d'actine par la relation intégrines-Rho GTPases
Les intégrines régulent l'actine à travers une action sur les Rho GTPases qui varie au cours de l'étalement cellulaire.

A-Au début de l'étalement, les intégrines activent les kinases Src et FAK qui vont par l'intermédiaire de Rho GEFs (en bleu), activer Rac1 et Cdc42. Cela va conduire à la formation de protrusions, de filopodes et de lamellipodes. RhoA est dans le même temps peu actif.

B- A la fin de l'étalement, les intégrines vont activer RhoA et diminuer l'activité de Rac1, ce qui entraîne la polymérisation de l'actine et la formation de fibres de tension (D'après Huveneers et Danen, 2009)

E- Voie du TGFβ

Le TGFβ (Transforming Growth Factor β) appartient à une superfamille de cytokines qui comprend le TGFβ, les activines et les BMPs (Bone Morphogenic Proteins). Ces ligands vont se fixer à des récepteurs hétérotétramériques à activité sérine/thréonine kinase. Dans le cadre du TGFβ et de son récepteur le TGFβR, la cytokine va se fixer sur un récepteur homodimérique TGFβR2. Cette fixation va permettre le recrutement d'un dimère de récepteur TGFβR1, qui va être phosphorylé par le TGFβR2 et ainsi permettre l'activation de la voie de signalisation du TGFβ. La transduction de signal passe par différentes protéines SMAD phosphorylées par le

récepteur et qui vont transloquer dans le noyau des cellules afin d'activer les gènes cibles de la voie. La superfamille des cytokines TGF β a été décrite comme impliquée dans de nombreuses fonctions, notamment dans le développement embryonnaire, mais également dans le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse qui induit un profond changement du cytosquelette, pour permettre le passage d'une cellule épithéliale à une cellule plus mésenchymateuse capable de migration et d'invasion, phénomène observé notamment lors de métastases (Xu et al., 2009).

En dehors de l'activation des SMAD, les récepteurs au TGF β sont également capables d'activer certaines Rho GTPases et ainsi réguler plus directement le cytosquelette d'actine. L'activation du TGF β R permet par exemple d'inhiber RhoA au niveau des jonctions serrées et ainsi permet la dépolymérisation des filaments d'actine. A l'inverse, le TGF β peut également

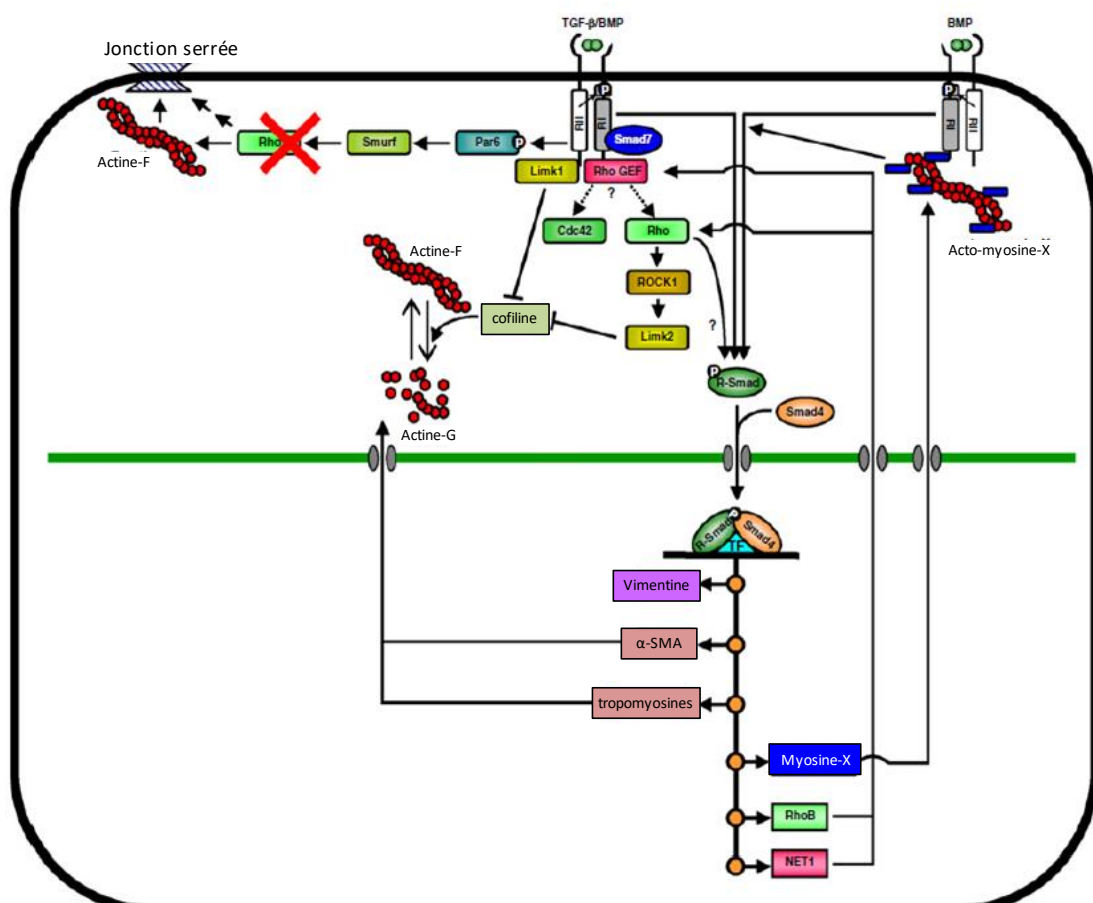


Figure 18: Relation entre TGF β et dynamique d'actine

Le TGF β est capable de réguler différentes Rho GTPases afin d'exercer une action sur le cytosquelette d'actine. Au niveau des jonctions serrées, le TGF β va inhiber RhoA afin de permettre la dépolymérisation des filaments d'actine. Au contraire, le TGF β active d'autres Rho GTPases telles que Cdc42, ce qui aboutit à l'inhibition de la cofiline et à la polymérisation de l'actine. Enfin, le TGF β , par son activation classique de la voie des SMADs, permet l'expression de RhoB qui va renforcer l'inhibition de la cofiline. (D'après Moustakas & Heldin, 2008)

activer Cdc42, ce qui va inhiber la cofiline et stimuler la polymérisation de l'actine. (Moustakas & Heldin, 2008)(*Figure 18*).

F- Voie de la E-cadhérine

Les jonctions cellulaires épithéliales de type jonctions adhérentes sont assurées par des interactions homophiliques entre les cadhérines épithéliales (E-cadhérines). Les E-cadhérines sont structurellement reliées au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire des caténines (Clainche & Carlier, 2008). La dissociation des jonctions cellulaires est systématiquement associée à une modulation de la dynamique de l'actine. Il a ainsi été montré que la dissociation des jonctions adhérentes, étape précoce de la transition épithélio-mésenchymateuse, aboutissait à l'activation de la Rho GTPase Rac1, et par le biais de cette protéine à la polymérisation des filaments d'actine (Busche et al, 2008)(*Figure 19*). De plus, il est également connu qu'au cours de l'EMT, la dissociation des jonctions cellulaires et la libération des caténines à laquelle elle aboutit va entraîner la polymérisation de l'actine (Perez-Moreno & Fuchs, 2006)

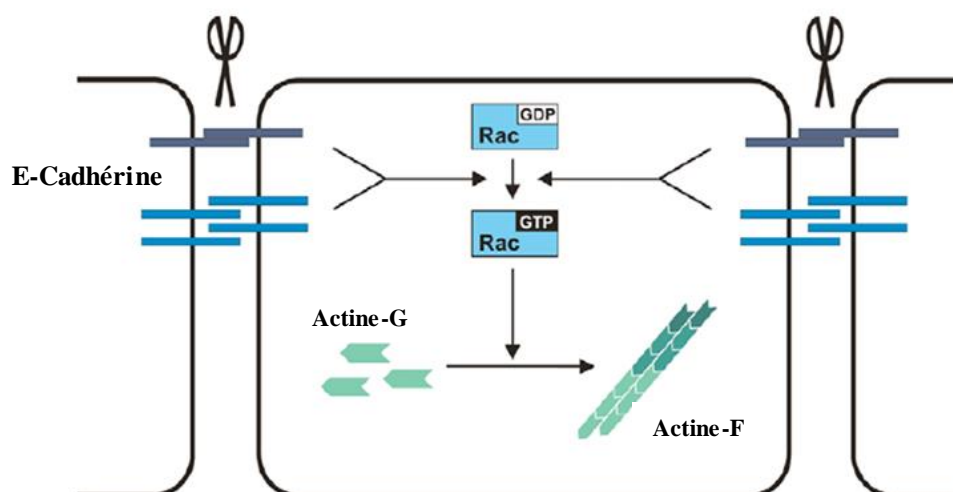


Figure 19: Relation entre la E-cadhérine et l'actine

La dissociation des jonctions cellulaires médiées par la E-cadhérine entraîne une activation transitoire de la Rho GTPase Rac1, qui induit ainsi la polymérisation de l'actine. (D'après Busche et al, 2008)

G- Voie Wnt non canonique

La voie Wnt non canonique, également appelée PCP (Planar-cell polarity pathway) est indépendante de la β -caténine. Cette voie a été initialement découverte chez *Drosophila melanogaster* comme impliquée dans le développement et l'organisation des tissus. Depuis, son rôle a été montré chez les vertébrés où elle va permettre des mouvements cellulaires

polarisés durant la gastrulation et l'organogenèse. Cette voie va utiliser la protéine Dishevelled pour moduler l'actine par l'intermédiaire des Rho GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 (Roszko, Sawada, & Solnica-Krezel, 2009; Winter et al., 2001).

Ainsi les différentes voies décrites précédemment permettent la régulation du cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de leur action sur les Rho GTPases (**Figure 20**). De plus en plus de publications font état du mécanisme inverse, c'est-à-dire que le statut de l'actine au sein d'une cellule va directement influencer certaines voies de signalisation et ainsi déclencher la transcription de gènes cibles de ces différentes voies. La partie suivante va présenter ces différentes voies et comment l'état de l'actine va influencer leur activité.

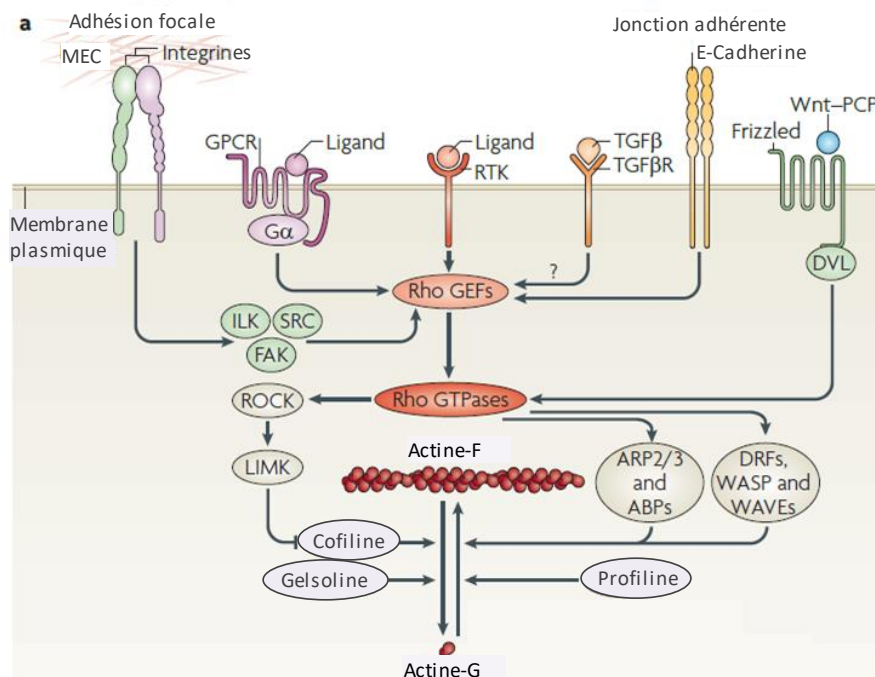


Figure 20: Voies de signalisation régulant l'actine à travers les Rho GTPases

De nombreux récepteurs permettent de moduler l'organisation de l'actine à travers un rôle sur les Rho GTPases. L'activation de ces Rho GTPases peut être directe (voie Wnt-PCP), passer par l'activation de Rho GEFs (RTK, RCPG, TGFβR, E-cadhérine) ou bien par des protéines intermédiaires telles que les kinases (voie des intégrines). (D'après Olson & Nordheim, 2010)

5- Lien entre dynamique d'actine et transcription génique

Au cours des dernières années, l'étude des voies de signalisations a fait l'objet de recherches intenses. Les mécanismes d'action des principaux facteurs de croissance commencent à être bien connus, de même que la transduction de signaux induits par les

principales interactions protéines-protéines. Cependant, la cellule ne répond pas uniquement à des stimuli chimiques. En effet, l'architecture tissulaire, l'organisation cellulaire de même que les forces mécaniques appliquées aux cellules constituent également un élément important qui va participer aux différentes réponses cellulaires. Les éléments participants à de tels signaux mécaniques sont les adhésions cellule-matrice extracellulaire, cellule-cellule, l'organisation du cytosquelette et les forces associées qui maintiennent les cellules dans une organisation spécifique (Provenzano et al., 2011)(**Figure 21**).

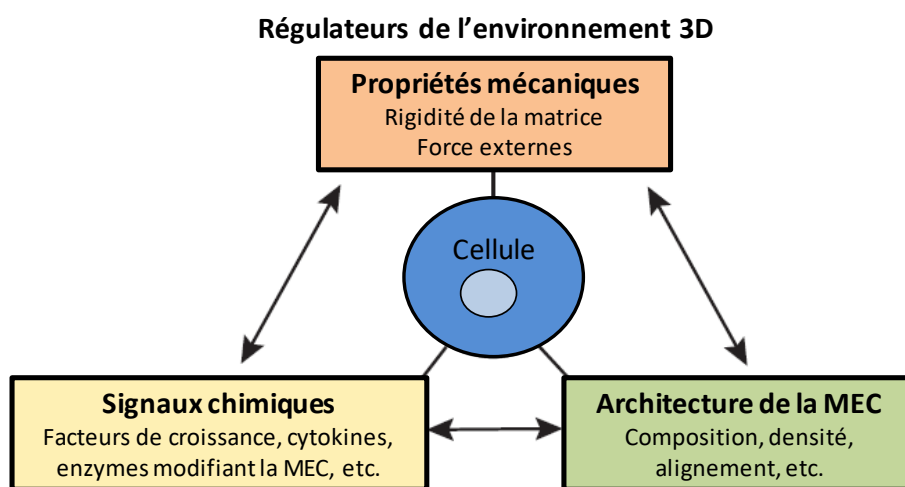


Figure 21: Forces régulant l'environnement tridimensionnel des cellules

Les cellules sont capables d'intégrer et de répondre à des signaux de natures variées, qu'il s'agisse de signaux chimiques, d'une architecture particulière de l'environnement extracellulaire ou des propriétés mécaniques intrinsèques de la cellule (D'après Provenzano et al., 2011)

Tous ces éléments permettent le contrôle de la prolifération cellulaire, de la migration, de la différenciation, et des propriétés générales des cellules et des tissus (Butcher et al, 2009; Discher et al, 2009; Jaalouk & Lammerding, 2009; Mammoto & Ingber, 2009; Provenzano et al., 2011; Wozniak & Chen, 2009).

Comme décrit dans la partie précédente, l'actine est régulée par un nombre important de voies de signalisation, et se retrouve associée à une grande variété de protéines. Tous ces éléments permettent de retrouver l'actine sous diverses formes au sein des cellules afin de répondre à différentes fonctions biologiques. Les protéines associées à l'actine n'ont pas simplement pour rôle de réguler son organisation. En effet, certaines de ses protéines vont se comporter comme des senseurs de l'état de l'actine, et en réponse à un changement d'organisation de celle-ci, vont permettre de transduire des signaux et ainsi de favoriser l'expression de certains gènes qui répondront à une organisation spécifique de l'actine. Les

mécanismes impliqués dans la détection et la réponse à un changement d'organisation de l'actine sont de différentes natures et peuvent être classés en deux catégories :

- D'une part, la régulation de l'actine nucléaire est directement capable d'influencer la transcription génique.

- D'autre part, certaines protéines de liaison à l'actine (ABPs) vont être capables de sentir un changement d'organisation de celle-ci. En effet, les ABPs sont variées et peuvent s'associer à l'actine dans le cytoplasme soit lorsque celle-ci est sous forme monomérique (on parle alors de G-ABP pour G-actin binding protein), soit lorsqu'elle est sous forme de filaments (F-ABP). Enfin, certaines protéines composent des structures complexes faisant intervenir l'actine (F-ACAP pour F-actin complex associated proteins) telles que celles retrouvées au niveau des adhésions focales. En réponse à une modification d'organisation du cytosquelette d'actine, ces différentes protéines vont pouvoir se localiser dans le noyau afin d'activer une réponse génique spécifique. (Olson & Nordheim, 2010)(Figure 22).

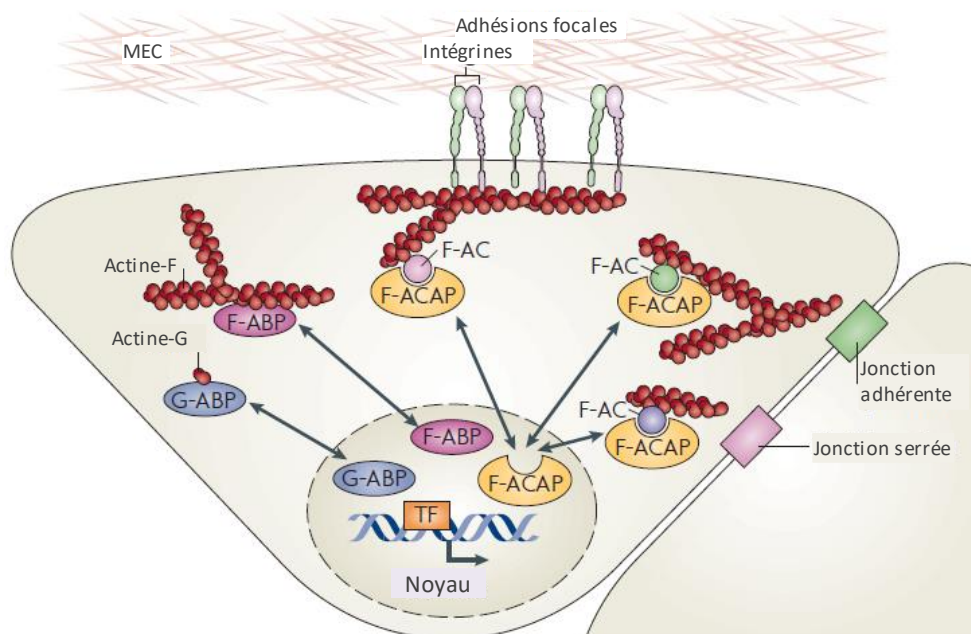


Figure 22: Senseurs du changement d'organisation de l'actine

Certaines protéines associées à l'actine peuvent sentir un changement d'organisation de celle-ci. Il peut s'agir de protéines liées aux monomères d'actine (G-ABP) ou de protéines liées aux filaments (F-ABP) ainsi que de protéines de complexes structuraux impliquant l'actine (F-ACAP) qui vont répondre aux différentes dynamiques d'actine en transitant dans le noyau et en activant des réponses géniques particulières (D'après Olson & Nordheim, 2010) .

Ainsi, les paragraphes suivant ont pour objectif de présenter les protéines et voies de signalisation capables de réagir à la dynamique de l'actine afin d'induire une réponse transcriptionnelle spécifique. Les deux derniers paragraphes de cette partie s'intéressent plus spécifiquement aux voies principalement responsables de la réponse aux stimuli mécaniques, à savoir les voies de mécanotransduction YAP/TAZ et MRTF/SRF, cette dernière étant au centre de mes travaux de thèse.

A- Actine nucléaire

Contrairement à la présence de l'actine dans le cytoplasme des cellules, la présence d'actine dans le noyau, aussi bien sous forme monomérique que de filaments, est longtemps restée controversée. Cependant, de nombreux papiers renseignent sur le rôle de l'actine nucléaire. Ce rôle est primordial et affecte l'activité transcriptionnelle générale des cellules. En effet, l'actine nucléaire est un composant essentiel des trois différentes ARN polymérases (classe I, II et III). En outre l'actine contribue au remodelage nucléaire de la chromatine dépendant de l'ATP. Enfin, l'actine est capable de se lier à différentes ribonucléoprotéines et ainsi de réguler la transcription génique. Ces différents processus font intervenir aussi bien l'actine monomérique que l'actine filamenteuse, et le niveau de chacune de ces formes va réguler ces phénomènes (Gieni & Hendzel, 2009; Zheng et al, 2009) . La mise en évidence d'une régulation dynamique de l'actine monomérique/filamenteuse au sein du noyau a permis de renforcer le rôle de l'actine nucléaire dans la transcription génique (Grosse & Vartiainen, 2013; Plessner & Grosse, 2015). De plus cette régulation nucléaire de l'actine participe directement à la régulation de la voie MRTF/SRF étudiée au cours de ma thèse (Baarlink et al., 2013). Ce phénomène fait intervenir la formine mDia.

B- Voie de signalisation NF- κ B

NF- κ B, pour nuclear factor-kappa B, est une protéine majoritairement impliquée dans la réponse immunitaire, la réponse au stress ainsi que dans la survie cellulaire. Cette protéine est capable de transloquer dans le noyau pour activer ses gènes cibles. En dehors des facteurs classiques permettant d'activer la voie NF- κ B (notamment les récepteurs TLR activés par différents stimuli), des régulateurs des dynamiques de l'actine ont été identifiés comme régulant cette voie. Dans les cellules endothéliales, la stimulation à la thrombine va activer RhoA, qui, en permettant la phosphorylation de la cofiline et donc son inhibition, va aboutir à

une polymérisation d'actine. Cette polymérisation d'actine va contribuer à la translocation de NF- κ B dans le noyau afin d'activer la transcription de ICAM-1, une protéine d'adhésion intercellulaire impliquée dans l'interaction entre leucocytes et cellules endothéliales (Fazal et al., 2009).

Il a également été montré que la disruption des jonctions cellulaires des cellules épithéliales, en entraînant une réorganisation du cytosquelette d'actine, allait provoquer l'activation de RhoA et ROCK. Cela provoque l'activation de la protéine kinase D (PDK1), qui stimule ensuite l'activité de NF- κ B. Les gènes cibles de cette voie ne sont pour l'heure pas connus (Cowell et al., 2009)(Figure 23). Il est important de noter que selon la lignée cellulaire utilisée, la disruption des jonctions cellulaires semble moduler différentes Rho GTPases afin d'aboutir à une réorganisation du cytosquelette d'actine et à la transcription génique.

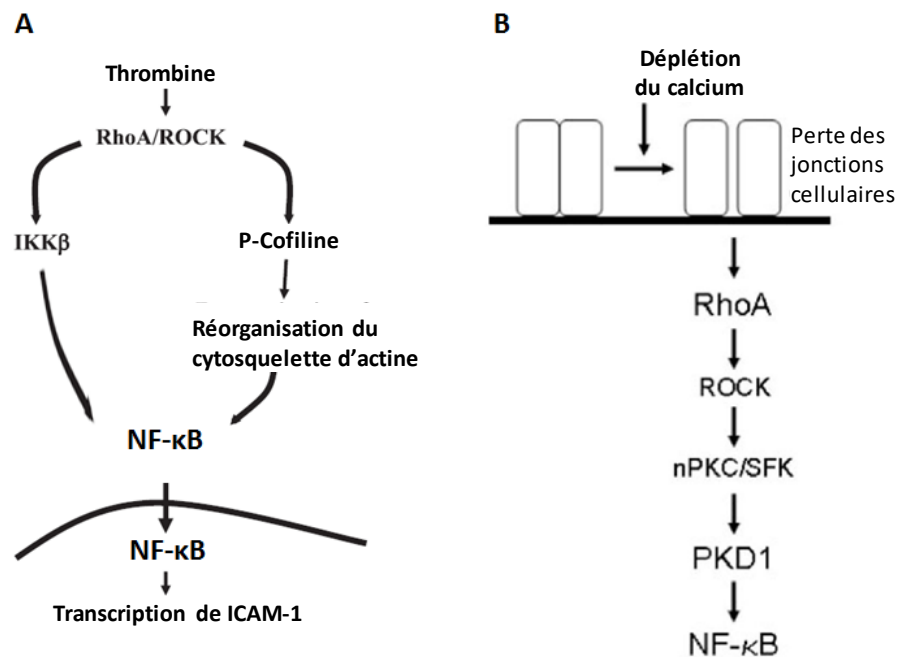


Figure 23: Régulation de NF- κ B par l'organisation de l'actine

La dynamique de l'actine régulent l'activité du NF- κ B dans différentes situations.

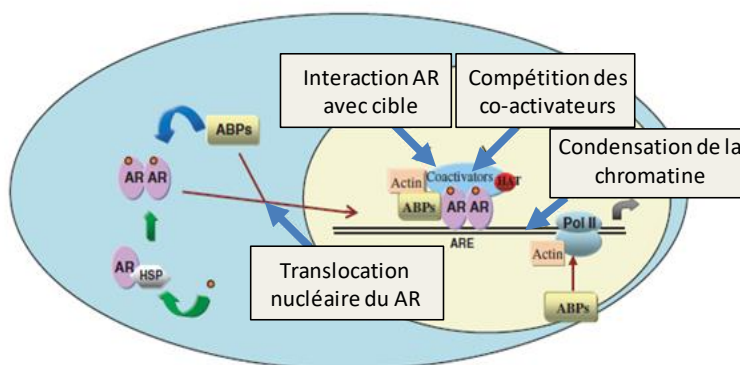
A- La polymérisation de l'actine induite par la thrombine dans les cellules endothéliales active le NF- κ B. (D'après Fazal et al,2009)

B- La perte des jonctions épithéliales modifie le cytosquelette d'actine et permet aussi l'activation de la voie NF- κ B. (D'après Cowell et al,2009)

C- Récepteurs nucléaires aux hormones

Les récepteurs nucléaires aux hormones sont une classe de protéines qui permettent de répondre aux hormones thyroïdiennes, stéroïdiennes ainsi qu'à quelques autres molécules. En réponse à ces hormones, les récepteurs interagissent avec d'autres protéines afin de

réguler l'homéostasie cellulaire, le développement et le métabolisme. De nombreux récepteurs nucléaires sont régulés par leur interaction avec des protéines de liaison à l'actine, parmi lesquels le récepteur aux estrogènes, le récepteur aux androgènes, le récepteur des hormones thyroïdiennes ainsi que le récepteur γ du peroxydome activé par la prolifération (Zheng et al., 2009). Le récepteur aux androgènes est le récepteur le plus étudié et dont les mécanismes d'action sont les plus connus. Ce récepteur contrôle l'expression de gènes régulant la prolifération, la croissance, la différenciation et la mort cellulaire (Baek et al., 2006; Wang et al., 2006). En l'absence de stimulation, le récepteur aux androgènes reste dans le cytoplasme et interagit avec les chaperonnes. Lors de la présence d'androgènes, ceux-ci vont se fixer sur le récepteur qui va se déplacer dans le noyau et, en présence de co-activateurs, va permettre la transcription des gènes cibles. Il est bien connu que le récepteur aux androgènes nécessite des protéines co-activatrices ou co-inhibitrices de transcription. Ce sont ces protéines qui vont d'ailleurs spécifier les gènes cibles de la voie. Durant les dernières années, de plus en plus de protéines de liaison à l'actine ont été identifiées comme interagissant avec le récepteur aux androgènes. Par exemple, la supervilline, une protéine qui permet la formation de faisceaux d'actine, facilite l'activation des gènes cibles du récepteur aux androgènes (Ting et al, 2002). La filamine, la transgeline ainsi que l' α -actinine possèdent également la capacité de se lier aux récepteurs aux androgènes (Zheng et al., 2009). L'actine



Protéine de liaison à l'actine (ABP)	Effet sur le récepteur aux androgènes (AR)
Gelsoline	Co-activateur
α -actinine 2	Co-activateur
Supervilline	Co-activateur
Filamine	Co-activateur
Filamine A	Co-répresseur
Transgeline	Co-répresseur

Figure 24: Rôle des protéines de liaison à l'actine dans l'activité du récepteur aux androgènes

Le récepteur aux androgènes (AR) est séquestré dans le cytoplasme en l'absence d'hormones. La présence de celles-ci va permettre la translocation du récepteur dans le noyau et l'activation de la voie, en collaboration avec d'autres protéines. De nombreuses protéines de liaison à l'actine (ABPs) régulent ce récepteur en activant ou inhibant sa translocation et son activité. (D'après Zheng et al., 2009)

et ses protéines associées jouent donc un rôle primordial dans l'activité des récepteurs nucléaires aux hormones (*Figure 24*).

D- Réponse aux dommages à l'ADN, voies Nck et JMY

Les stress génotoxiques induisent de profonds changements dans l'organisation de l'actine et déclenchent diverses réactions transcriptionnelles. Le traitement des cellules aux ultraviolets provoque ainsi des dommages de l'ADN qui vont entraîner diverses réponses. La protéine JMY (Junction mediating and regulator protein) est une protéine à double rôle. C'est en effet une protéine de liaison aux monomères d'actine qui est capable d'agir en tant que nucléateur d'actine, ce qui favorise la formation de filaments d'actine et régule la motilité cellulaire (Coutts et al., 2009). Mais dans certaines situations telles que le traitement aux ultraviolets, JMY transloque dans le noyau et va se comporter comme un co-activateur du complexe p53-p300 et permettre l'activation de gènes proapoptotiques. L'effet de nucléateur d'actine de JMY est moindre dans les cellules endommagées, au profit de son rôle transcriptionnel (Coutts et al., 2009; Zuchero et al, 2009).

Nck1 est une protéine adaptatrice impliquée dans la transduction de signaux provenant des récepteurs à activité tyrosine kinase. Il a été montré que cette protéine est capable de s'associer dans le cytoplasme aux protéines de la famille des septines. Ces protéines sont capables de s'associer à l'actine filamenteuse, et régulent des phénomènes tels que la division cellulaire en permettant la formation d'anneau d'actine. Lors d'un traitement aux ultraviolets, cela entraîne la modification du cytosquelette d'actine et la protéine Nck1 va ainsi se dissocier des septines, et se retrouver dans le noyau où elle va déclencher une réponse transcriptionnelle. L'activation de la réponse aux dommages à l'ADN requiert la fonction nucléaire de Nck1, bien que cette fonction ne soit pas clairement identifiée (Kremer et al., 2007).

Les deux mécanismes décrits précédemment permettent de mettre en évidence un nouveau type de relation entre cytosquelette d'actine et réponse transcriptionnelle, où cette relation permet de répondre aux stress génotoxiques.

E- Protéines à domaine LIM

Au niveau des adhésions focales, les intégrines assurent le relais entre matrice extracellulaire et cytoplasme.

Les protéines à domaine LIM (domaine Lin11, Isl1 et Meck3) interagissent avec les intégrines et les filaments d'actine et assurent diverses fonctions, telles que l'adhésion et la motilité cellulaire à travers leur interaction avec les intégrines, la transduction de signaux et la régulation de l'expression génique (Hervy et al., 2006; Kadrmas & Beckerle, 2004). Il existe de nombreuses protéines dans cette famille. Ces protéines ont la capacité de transiter dans le noyau afin d'activer une réponse transcriptionnelle (**Figure 25**). Le mécanisme de libération des adhésions focales de ces protéines ainsi que les gènes cibles sont peu connus, mais il y a de plus en plus d'évidences qui tendent à prouver que les protéines à domaine LIM se comportent comme des senseurs de l'état structural de l'actine, et qu'en réponse à une modification de l'organisation de celle-ci, certaines protéines à domaine LIM vont moduler l'expression génique en conséquence de cette modification (Kadrmas & Beckerle, 2004; Koch et al., 2012).

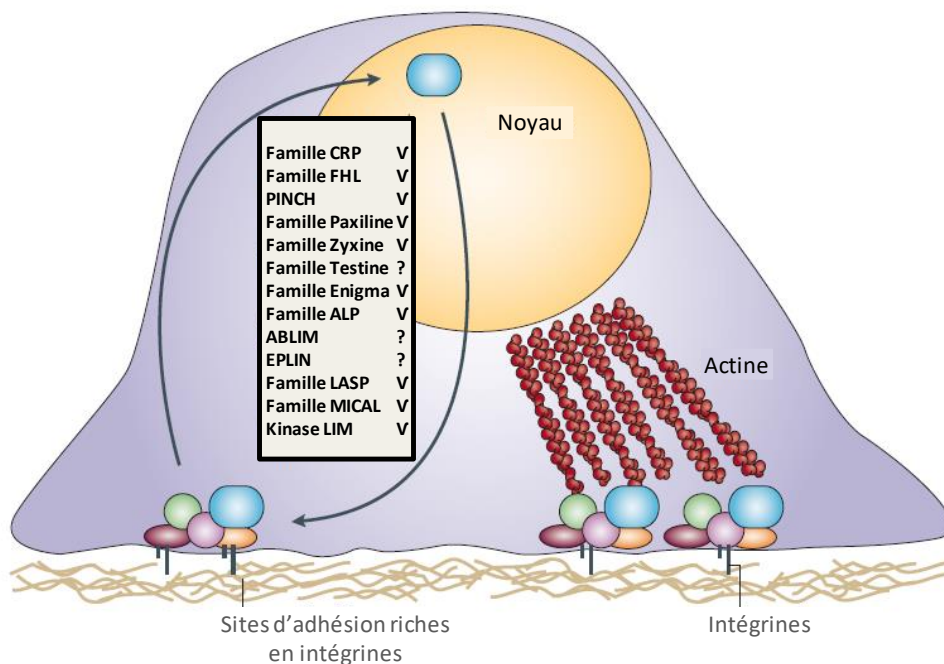


Figure 25: Double rôle des protéines à domaine LIM

Les protéines à domaine LIM s'associent avec les intégrines ainsi qu'avec les filaments d'actine. La majorité de ces membres possèdent également un rôle démontré dans la transcription génique (V), tandis que le reste des membres ont une activité nucléaire encore inconnu (?). Les protéines à domaine LIM se comporteraient comme des senseurs de l'état d'actine dans les cellules et déclencherait ainsi une réponse génique adaptée. (D'après Kadrmas & Beckerle, 2004, Koch et al., 2012)

F- Voie de Mécanotransduction YAP/TAZ

Les protéines YAP/TAZ ont initialement été identifiées comme membres de la voie Hippo/YAP/TAZ. Cette voie de signalisation régule la taille des organes et les capacités souches

des cellules en agissant sur la prolifération cellulaire et l'apoptose. *In vitro*, il s'agit d'un des mécanismes principaux responsable de l'inhibition de contact. La dérégulation de cette voie de signalisation est de plus en plus associée avec le développement de certains cancers (Pan, 2010). Les composants de la voie Hippo/YAP/TAZ ont initialement été identifiés chez la drosophile et sont évolutionnairement et fonctionnellement très conservés chez les mammifères. La voie Hippo/YAP/TAZ peut être divisée en trois parties différentes. La première partie en amont de la voie qui comprend les éléments régulateurs induisant l'activation de cette voie, les protéines kinases principales de la voie Hippo (le nom Hippo provient de la protéine Kinase identifiée chez la drosophile), et la machinerie transcriptionnelle.

Chez les mammifères, il existe quatre protéines kinases responsable de la régulation de cette voie, les protéines kinase Mst1/2 et Lats1/2. Deux autres protéines, SAV et Mob, agissent en tant qu'adaptateurs et activateurs de ces kinases. Mst1/2 forme un complexe avec SAV, et une fois activée ce complexe va phosphoryler et activer à son tour le complexe Lats1/2-Mob. La cible principale de ce complexe de kinases sont les co-activateurs de transcription YAP et TAZ. La phosphorylation de ces protéines par les kinases précédentes aboutit à leur séquestration dans le cytoplasme de par leur interaction avec les protéines 14-3-3, à une ubiquitination qui entraînera une dégradation de ces facteurs dépendante du protéasome. La

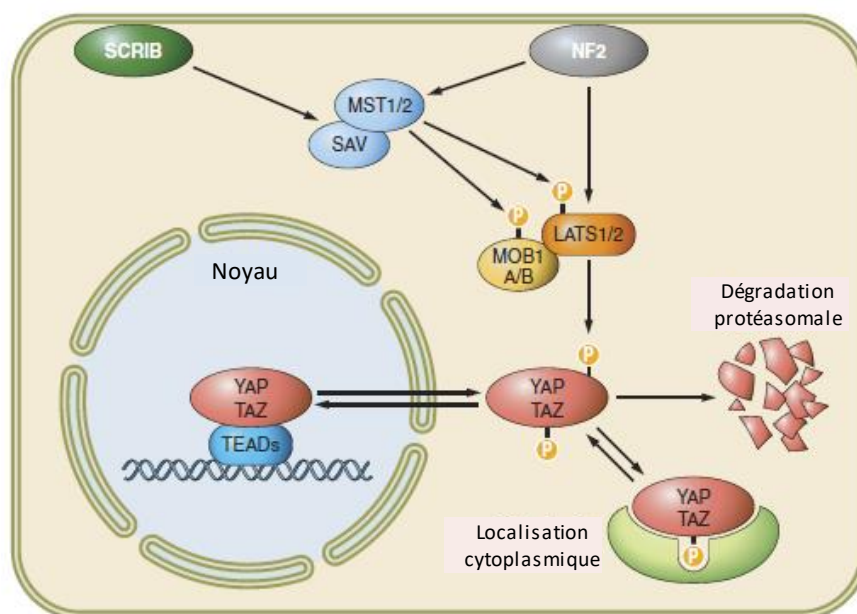


Figure 26: Voie Hippo/YAP/TAZ

En présence de protéines activatrices telles que NF2 ou Scribble (SCRIB), impliquées dans les complexes de polarité, les protéines kinases de la voie Hippo sont activées, permettant la phosphorylation de YAP/TAZ et leur dégradation par le protéasome. Si ces protéines ne sont pas phosphorylées, elles peuvent transiter dans le noyau, interagir avec les facteurs de transcription TEADs et ainsi permettre la transcription des gènes cibles (D'après Piccolo et al., 2014).

voie Hippo agit donc en régulant la disponibilité des protéines YAP et TAZ. Quand les protéines YAP/TAZ ne sont pas phosphorylées, elles transitent dans le noyau où elles interagissent avec les facteurs de transcription TEAD 1-4 (TEADs) et permettront l'activation de gènes cibles tels que CTGF, ITGB2, Gli2, Axl et la Survivine (Hong & Guan, 2012). En amont, cette voie est régulée notamment par les protéines de polarité telles que NF2 et Scribble (**Figure 26**).

La voie Hippo/YAP/TAZ est donc finement régulée, mais quels sont les éléments qui la définissent comme une voie de mécanotransduction ?

La voie YAP/TAZ permet aux cellules de répondre à différents signaux mécaniques. Ces signaux sont de différentes natures, qu'il s'agisse d'un changement de rigidité de la matrice extracellulaire, ou bien des forces de tensions exercées lors des contacts entre cellules. De même il peut s'agir de stimuli intracellulaires, tels que la génération de tension provoquée par la contraction du cytosquelette acto-myosique. Ainsi les cellules doivent pouvoir intégrer ces signaux et fournir une réponse adaptée.

Les premiers éléments qui ont mis en lumière le rôle de YAP/TAZ dans la réponse à un stimulus mécanique proviennent d'une étude qui a montré que lorsque des cellules sont cultivées sur une matrice rigide, YAP/TAZ se localisent dans le noyau et sont transcriptionnellement actifs, alors qu'ils sont cytoplasmiques et inactifs lorsque la matrice utilisée est plus souple (Dupont et al., 2011). L'étalement cellulaire a également un impact sur l'activité de ces protéines, celui-ci favorisant la localisation nucléaire et l'activité de YAP/TAZ (Wada et al, 2011). L'étude précise des voies de signalisation impliquées dans de telles réponses a permis de mettre en évidence le rôle de l'actine dans l'activité de YAP/TAZ.

En effet, lorsque les cellules peuvent s'étaler librement sur la matrice extracellulaire ou que celle-ci est rigide, les forces engendrées vont provoquer l'activation des intégrines qui vont transmettre des signaux intracellulaires. Ces signaux vont engendrer la formation de filaments d'actine et de fibres de tension, par l'activation des myosines et du complexe Rho/ROCK. Les fibres ainsi formées vont activer YAP/TAZ selon deux mécanismes. Tout d'abord, elles vont avoir une action directe sur YAP/TAZ et favoriser la translocation nucléaire de ces facteurs selon un mécanisme encore indéfini. Ensuite, les faisceaux contractiles d'actine inhibent également les kinases LATS1/2 et par conséquent la phosphorylation de

YAP/TAZ, qui se retrouvent donc libres de transiter dans le cytoplasme afin d'activer leurs gènes cibles (Halder, Dupont, & Piccolo, 2012; Wada et al., 2011)(Figure 27).

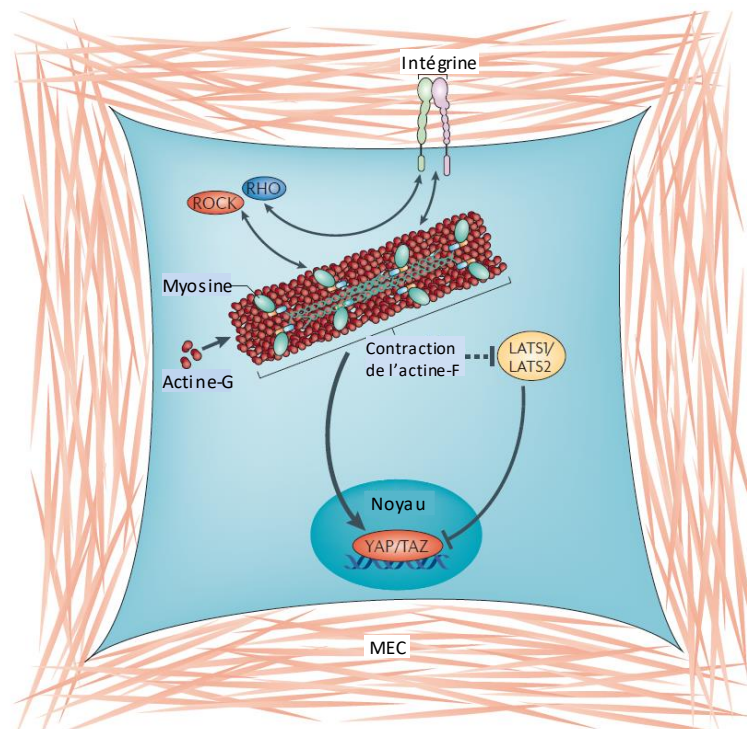


Figure 27: Activation de YAP/TAZ par les filaments d'actine

Lorsqu'une cellule est libre de s'étaler sur un substrat ou que celui-ci est rigide, cela active les intégrines qui activeront à leur tour la formation de faisceaux d'actine. Ces filaments d'actine permettront la translocation nucléaire et l'activation de YAP/TAZ par un mécanisme encore inconnu mais également en inhibant les kinases LATS1/2 et par ce biais la dégradation de YAP/TAZ (D'après Halder et al., 2012)

Un autre processus qui témoigne de la régulation de YAP/TAZ par la dynamique de l'actine est le processus d'inhibition de contact, et plus généralement les contacts entre cellules. Pour rappel, l'inhibition de contact est un mécanisme qui se déclenche lorsque les cellules sont nombreuses, entrent en contact et n'ont plus de place pour proliférer. Ce mécanisme a pour objectif d'inhiber la prolifération en réponse à ces contacts cellulaires. Le cytosquelette d'actine est relié aux jonctions cellulaires de types jonctions adhérentes et jonctions serrées. La transmission de forces mécaniques à travers ces jonctions lors de la maturation et des fonctions assurés par celles-ci sont indiscutables (Ganz et al., 2006; Yonemura et al., 2010). Lorsque les cellules commencent à établir des contacts, le système de jonctions E-cadhérine/caténine va entraîner l'activation de la voie Hippo, des protéines kinases LATS1/2 et par conséquent la phosphorylation et la dégradation de YAP/TAZ. Cependant ce mécanisme ne contribuerait qu'à 30% à l'inhibition de contact et à l'exclusion nucléaire de YAP/TAZ (Aragona et al., 2013). L'extinction de la E-cadhérine, de l' α -caténine et de LATS1/2 permet de prévenir cette inhibition. Ainsi la voie Hippo activée par les contacts

cellulaires contribue à diminuer l'activité de YAP/TAZ, mais laisse suffisamment de YAP/TAZ nucléaire pour que la prolifération continue. La majorité de l'exclusion nucléaire et de l'inhibition de l'activité YAP/TAZ passe par une autre voie. Il s'agit de l'organisation particulière de l'actine lors de l'établissement des contacts cellulaires qui va permettre l'inhibition efficace de YAP/TAZ. En effet, lorsque les cellules établissent des contacts, et forment une monocouche de cellules, chaque cellule individualisée va voir sa surface d'étalement réduire à cause du nombre total de cellules qui augmente. Ce phénomène va engendrer l'expression de protéines de coiffe des filaments d'actine (la protéine CapZ) ainsi que des protéines de fragmentation des filaments d'actine (gelsoline, cofiline)(Aragona et al., 2013; Gumbiner & Kim, 2014). Les filaments d'actine vont ainsi disparaître progressivement, ce qui va déclencher des processus similaires à ceux observés lorsqu'une cellule est déposée sur une matrice extracellulaire souple, à savoir une inhibition de YAP/TAZ par différents mécanismes, directs et méconnus ou indirects à travers une absence d'inhibition des protéines LATS1/2. Ces mécanismes constituent ainsi une sorte de contrôle d'organisation tissulaire des cellules épithéliales (Piccolo et al, 2014) (*Figure 28*).

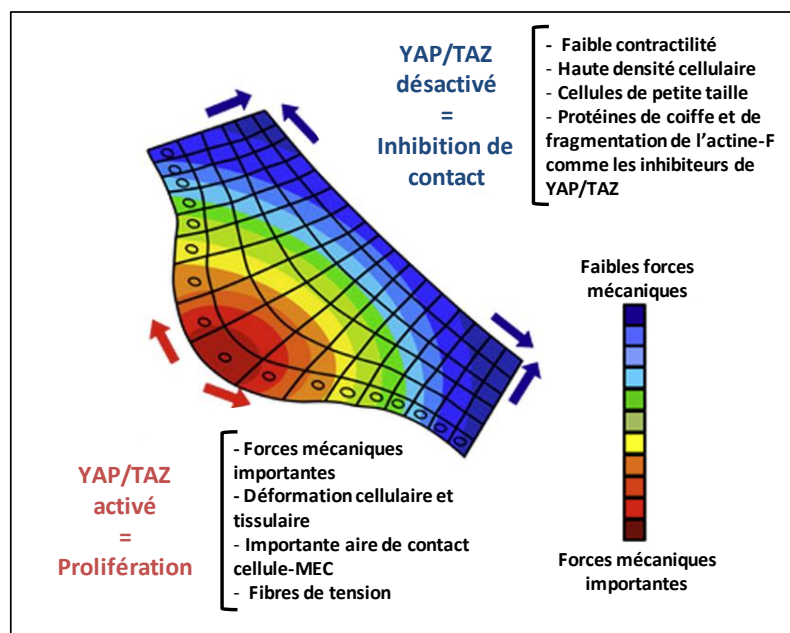


Figure 28: Régulation de YAP/TAZ selon la force mécanique exercée

La présence de jonctions cellulaires, des cellules de petite taille de même qu'une matrice extracellulaire souple entraîne l'inhibition de YAP/TAZ par perturbation des filaments d'actine. A l'inverse, une matrice rigide, une cellule bien étalée et des forces de tensions importantes aboutissent à la formation de faisceaux d'actine et par conséquent à l'activation de YAP/TAZ (D'après Aragona et al., 2013)

Il est intéressant de noter que le mécanisme d'inhibition de contact tout comme celui déclenché lorsqu'une cellule s'étale sur une matrice rigide ne dépend que partiellement de la voie Hippo, et qu'il s'agit en fait principalement d'une régulation par la dynamique de l'actine (Wada et al., 2011). De plus certaines études tendent à montrer que bien que l'activité de la voie YAP/TAZ dépende de l'organisation de l'actine, celle-ci n'est pas influencé simplement par le taux d'actine monomérique ou filamenteuse (Dupont et al., 2011; Halder et al., 2012) mais par des mécanismes plus complexes tels que ceux décrit précédemment.

G- Voie de mécanotransduction MRTF/SRF

La deuxième voie principale impliquée dans la réponse aux forces appliquées sur les cellules est la voie de mécanotransduction MRTF/SRF. Cette voie de signalisation faisant l'objet de mes travaux de thèse, elle sera présentée en détails dans la partie qui lui est consacrée. Cependant le paragraphe suivant a pour objectif de fournir une première vision globale de cette voie et de sa régulation.

La protéine SRF (serum response factor) est un facteur de transcription abondamment exprimé dans de nombreux types cellulaires (Norman et al., 1988; Shore & Sharrocks, 1995). Elle est codée par un seul gène et des homologues de cette protéine ont été retrouvés dans toutes les espèces où sa présence a été investiguée, de la levure à l'homme. Le facteur de transcription SRF va agir en tant qu'homodimère et se fixer avec une haute affinité et spécificité à une séquence d'ADN palindromique de type CC(A/T)₆GG, appelée boîte-CAR_G (Pellegrini et al., 1995; Treisman, 1986). SRF régule la transcription de nombreux gènes en réponse à différents stimuli et voies de signalisation (Miano et al., 2007; Philippar et al., 2004; Posern & Treisman, 2006; Selvaraj & Prywes, 2004; Sun et al., 2006). En s'associant à l'ADN, SRF va permettre le recrutement de différents cofacteurs. Les deux principaux cofacteurs de SRF connus sont les membres de la famille TCF (ternary complex factor) et les cofacteurs de la famille de la myocardine (la myocardine, ainsi que la protéine MRTF-A pour myocardin-related transcription factor, aussi appelé MAL ou MKL1, et MRTF-B/MKL2). La spécificité de ces différents cofacteurs sera discutée dans la partie suivante. Cependant il est important de préciser que ces deux types de cofacteurs vont répondre à des stimuli différents et ainsi permettre l'expression d'un panel de gènes spécifiques (Gineitis & Treisman, 2001). De plus,

il a été montré que TCFs et MRTFs présentent des interactions mutuellement exclusives avec SRF (Wang et al., 2004; Zaromytidou et al., 2006).

La relation de SRF avec les MRTFs et au sens plus général la voie actine-MRTF/SRF fait l'objet de ce travail. La myocardine, membre fondateur de la famille des MRTFs, est exprimée spécifiquement dans le système cardiovasculaire (Pipes et al., 2006; Wang et al., 2001). A l'inverse, les autres membres de cette famille ont une expression moins spécifique et plus diverse. De par leur homologie (Wang et al., 2002), le terme MRTFs sera utilisé pour désigner les différents membres de cette famille. L'étude de SRF a permis de montrer que cette protéine était d'une part régulée par les Rho GTPases (Hill et al., 1995), mais également par la dynamique de l'actine (Posern et al., 2002; Sotiropoulos et al., 1999). Ces éléments ont donné lieu de penser à un nouveau type de régulation de l'expression génique directement relié à l'organisation de l'actine. Par la suite, l'identification de la régulation des MRTFs, et de leur transition cytoplasme/noyau par les monomères d'actine, a permis de révéler pour la première fois un mécanisme direct de régulation de l'activité transcriptionnelle par le niveau d'actine monomérique (Miralles et al., 2003) .

En effet, contrairement à la voie YAP/TAZ, l'activité de la voie MRTF/SRF est directement reliée à l'état monomérique ou filamenteux de l'actine. La présence de monomères d'actine dans le cytoplasme des cellules va permettre leur association avec le cofacteur MRTF-A (MAL), et sa séquestration dans le cytoplasme. Ainsi MAL sera inactif en présence d'un taux élevé de monomères d'actine. Lors de la polymérisation de l'actine et de la diminution des monomères au profit de l'apparition de filaments d'actine, MAL va être libéré des monomères d'actine, et va pouvoir se déplacer dans le noyau, où il pourra interagir avec SRF et ainsi activer la transcription des gènes cibles de la voie (Miralles et al., 2003; Posern & Treisman, 2006)(**Figure 29**). A noter que l'import nucléaire des MRTFs fait intervenir les importines (Pawłowski et al., 2010).

MRTF-B serait régulé similairement tandis que la myocardine activerait de façon constitutive SRF (Pipes et al., 2006; Wang et al., 2001).

L'état organisationnel de l'actine, sous forme de monomères ou de filaments, peut être régulé par les Rho GTPases comme vu précédemment et influence directement l'activité de la voie MRTF/SRF. La partie suivante a pour objectif une description plus détaillée de la voie

MRTF/SRF, de ses fonctions, de sa régulation ainsi que de son implication dans certaines pathologies.

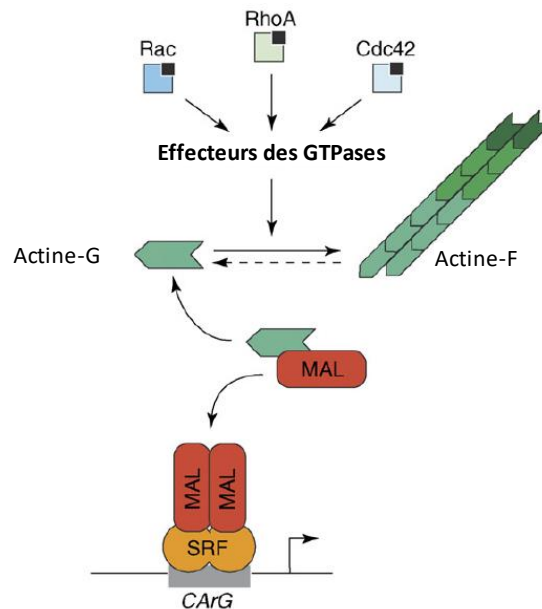


Figure 29: Régulation de la voie MAL/SRF

En présence de monomères d'actine, MAL (MRTF-A) est séquestré dans le cytoplasme. Lors de la polymérisation de l'actine (pouvant être induite par les Rho GTPases), la disparition des monomères d'actine au profit de filaments va permettre à MAL de se déplacer dans le noyau et d'interagir avec SRF pour activer la transcription des gènes cibles. (D'après Posern and Treisman, 2006)

II- Voies de mécanotransduction MRTF/SRF

1- Fonctions biologiques et moléculaires de SRF

La protéine SRF est un des membres fondateurs des protéines à domaine MADS (Mcm1 et Arg80 chez la levure, Agamous et Deficiens chez les plantes, SRF chez les mammifères). Il s'agit d'un facteur de transcription présent dans la majorité des espèces, bien qu'aucun orthologue de SRF n'est encore été identifié chez les bactéries. SRF agit en tant que dimère (Norman et al., 1988), et bien que l'activité de SRF soit régulée par différents cofacteurs, la séquence reconnue par SRF est toujours la boîte CARG, indépendamment du facteur associé. SRF serait capable de réguler l'expression de plus de 300 gènes (Olson & Nordheim, 2011). Les gènes cibles de SRF peuvent être classés en différentes catégories, et c'est le cofacteur associé à SRF qui va déterminer quelle catégorie spécifique de gènes est activée (Gineitis & Treisman, 2001; Miralles et al., 2003; Posern & Treisman, 2006). La régulation des gènes cibles de SRF permet de contrôler des fonctions variées au sein de l'organisme. SRF permet en effet de réguler, à travers ses gènes cibles, des processus biologiques variés tels que le cycle cellulaire (Gauthier-Rouvière et al., 1991; Shaposhnikov et al., 2013), l'apoptose (Schratt et al., 2004; Sisson et al., 2015), la croissance cellulaire (Pipes et al., 2006; Poser et al., 2000), la différenciation (Miano et al., 2003; Parmacek, 2007). Il a également été montré que SRF était impliqué dans le développement lors de la formation du mésoderme (Arsenian et al., 1998; Schratt et al., 2002) et dans le développement neuronal (Scandaglia et al., 2015) et sa délétion est donc létale chez la souris. SRF possède également un rôle dans l'activité du système immunitaire (Taylor & Halene, 2015) et SRF régule de nombreuses fonctions musculaires (Coletti et al., 2016).

Les nombreuses fonctions régulées par SRF relèvent partiellement de son rôle sur le cytosquelette d'actine (Schratt et al., 2002). Comme évoqué dans le paragraphe précédent, ce sont principalement les cofacteurs associés à SRF qui vont définir les gènes qui seront activés. Deux familles de cofacteurs de SRF ont été bien caractérisées, les cofacteurs de la famille TCF et les cofacteurs de la famille de la myocardine.

A- Comparaison des co-activateurs de la famille TCF et MRTF

Les protéines qui composent la famille TCF (ternary complex factor) sont les protéines Elk-1, SAP-1 et Net (aussi appelée SAP-2). Ces protéines possèdent un domaine Ets qui va leur

permettre de se fixer à l'ADN au niveau d'une séquence Ets adjacente à une séquence CArG. L'ensemble de la séquence CArG couplée à la séquence Ets vont constituer une région d'ADN appelée SRE (serum response element) propice à la fixation du complexe SRF-TCF. Les composants du complexe TCF sont activés par phosphorylation à travers la voie des MAP kinases (mitogen-activated protein kinases) (Treisman, 1994). La voie des MAP kinases est composée des protéines kinases Raf, MEK, Erk. Ces protéines répondent à une stimulation de la GTPase Ras, qui va ainsi déclencher une cascade de phosphorylation aboutissant à l'activation du complexe TCF (Buchwalter et al., 2004; Treisman, 1994).

Les mécanismes qui permettent d'activer le complexe TCF sont différents de ceux qui aboutissent à l'activation des protéines MRTFs. En effet, le complexe TCF peut être activé par un stimulus initial équivalent à celui qui active la voie MRTF/SRF, tel que le sérum (Gineitis & Treisman, 2001). Cependant une fois la voie activée, les mécanismes mis en place sont différents. Dans le cas du complexe TCF, c'est donc l'activation de la voie des MAP kinases qui permet l'activation de TCF et son association conséquente avec SRF, tandis que dans le cadre de la voie MRTF/SRF, c'est principalement l'organisation de l'actine qui régule l'activité du co-activateur MRTF (Gineitis & Treisman, 2001; Miralles et al., 2003; Sotiropoulos et al., 1999)(Figure 30).

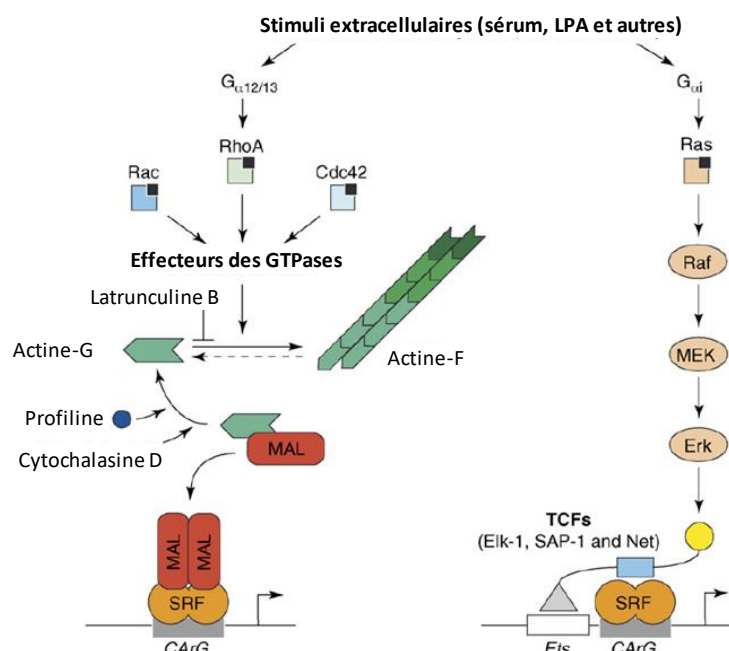


Figure 30: Comparaison des voies TCF-SRF et MRTF/SRF

Les voies MRTF/SRF et TCF-SRF peuvent être activées par un même stimulus initial tel que le sérum. Mais ensuite, l'activation de TCF va dépendre de l'activation de Ras et de la voie des MAP kinases, tandis que la voie MRTF/SRF dépend de l'organisation de l'actine, régulée par les Rho GTPases Rac1, RhoA et Cdc42 (D'après Posern & Treisman, 2006)

Il est important de noter que le site de fixation à SRF du complexe TCF entre en compétition avec celui des MRTFs. En effet, ces deux domaines de fixation à SRF seraient mutuellement exclusifs, et un complexe ne pourrait pas se fixer en présence de l'autre (Miralles et al., 2003; Selvaraj & Prywes, 2004; Zaromytidou et al., 2006).

De plus, certaines études tendent à montrer que l'activation de la voie TCF-SRF aboutit également à une régulation de la voie MRTF/SRF. En effet il a été montré que la voie Ras-MAP kinases activée aboutit à la phosphorylation de MAL, favorisant son export nucléaire et son interaction avec les monomères d'actine, et par ce biais son inactivation (Miralles et al., 2003; Muehlich et al., 2008; Wang et al., 2004).

La voie TCF-SRF est essentiellement activée afin de permettre la transcription des gènes précoces (ou immediate-early genes, gènes dont la transcription ne requiert pas la synthèse de protéines intermédiaires), tels que c-fos ou Egr-1, principalement impliqués dans les phénomènes de différenciation, croissance et prolifération (Esnault et al., 2014; Lee et al., 2010; Vickers et al., 2004). La voie MRTF/SRF est plus précisément décrite ci-dessous.

B- Les co-activateurs MRTFs

En dehors du complexe TCF, une nouvelle famille de co-activateurs a été découverte et caractérisée. Il s'agit de la famille des facteurs de transcription MRTFs. L'identification du mécanisme de régulation de cette famille de protéines a été permise grâce à la découverte initiale que la régulation de l'activité de SRF pouvait non seulement être influencée par le complexe TCF, mais également par un nouveau mécanisme, à savoir la dynamique de l'actine (Sotiropoulos et al., 1999). C'est cette étude qui a permis d'identifier le mécanisme selon lequel la présence de monomères d'actine dans le cytoplasme va séquestrer un facteur X (à l'époque les facteurs MRTFs n'étaient pas identifiés). Ainsi la polymérisation de l'actine engendre la libération de ce facteur et sa translocation nucléaire lui permettra d'interagir avec SRF pour activer la transcription des gènes cibles. Ce facteur X s'est ainsi révélé être la famille des MRTFs (Miralles et al., 2003).

La myocardine est le membre fondateur de cette famille. On la retrouve spécifiquement dans les cellules musculaires du système cardiovasculaire. Cette protéine peut être codée par deux ARN messagers (ARNm) différents provenant d'un épissage alternatif, et permettant

l'expression d'un isoforme court retrouvé dans le muscle lisse, et d'un isoforme long retrouvé dans le tissu musculaire cardiaque (Wang et al., 2001; Wang et al., 2004).

Il existe deux autres membres dans cette famille, la protéine MAL (aussi appelée MRTF-A, MKL1 ou BSAC) et la protéine MRTF-B (MKL2, MAL16). L'expression de ces protéines est beaucoup plus répandue et ubiquitaire que celle de la myocardine. La myocardine partage des homologies avec MRTF-A et MRTF-B, ainsi que des domaines conservés (*Figure 31*).

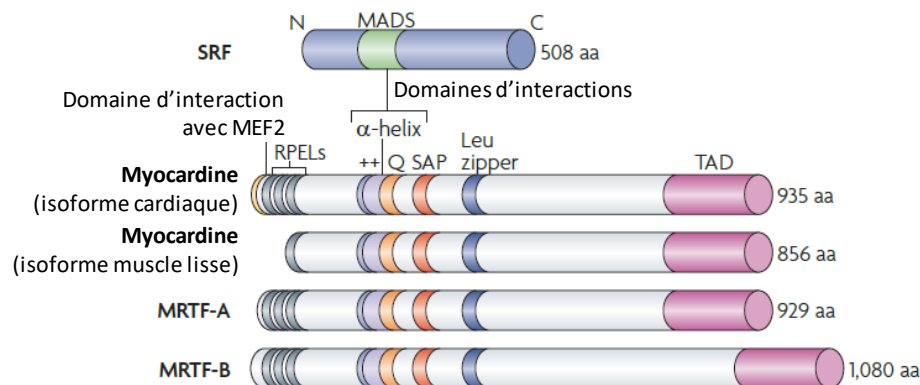


Figure 31: Structure des membres de la famille de la myocardine

Il existe quatre membres dans la famille de la myocardine, deux myocardines musculaires, chacune spécifique du muscle lisse ou cardiaque, ainsi que MRTF-A et MRTF-B dont l'expression est beaucoup plus répandue. Ces différentes protéines possèdent des homologies de séquence avec un domaine d'activation de la transcription (TAD), un domaine de dimérisation Leucine zipper, un domaine d'interaction avec SRF et des motifs répétés RPEL) (D'après Olson & Nordheim, 2010)

En partie N-terminale de ces protéines, on trouve trois domaines RPEL qui permettent l'association avec les monomères d'actine, résultant en la séquestration des MRTFs dans le cytoplasme (Guettler et al., 2008; Miralles et al., 2003; Posern et al., 2002)(*Figure 31*). Il est intéressant de noter que la myocardine contient des motifs RPEL divergents qui ne lient pas efficacement l'actine. Ainsi, la myocardine est en permanence nucléaire et n'est pas sensible aux différents stimuli modulant la dynamique de l'actine. L'association de la myocardine avec SRF et son activité sont donc constitutives (Kuwahara et al., 2005; Wang et al., 2001). Cependant les MRTFs agissent en tant qu'homo- et hétérodimères. Ainsi il a été suggéré que la myocardine peut s'associer à un autre MRTF, ce qui faciliterait l'interaction entre SRF et les boîte CARG dans les gènes musculaires. La myocardine pourrait ainsi être partiellement soumise à la régulation médiée par la dynamique de l'actine, et notamment la présence de monomères d'actine (Wang et al., 2003).

On trouve ensuite au sein de ces protéines un domaine d'interaction avec SRF constitué d'une région basique et d'une région riche en acide glutamique adjacente. Un domaine de

dimérisation Leucine zipper est également présent dans ces protéines, et l'extrémité C-terminale de celles-ci va contenir un domaine d'activation de la transcription (TAD).

Des études de KO (knockout) des gènes de la myocardine et des MRTFs ont permis de montrer leurs rôles importants *in vivo*, dans différents types cellulaires et à différentes étapes du développement. La majorité des phénotypes mutants obtenus ont révélé des anomalies principalement dans la régulation de gènes régulés par SRF et impliqués dans la contractilité ou la régulation du cytosquelette, altérant les fonctions motiles (Huang et al., 2008; Huang et al., 2009; Li et al., 2003). Ainsi la délétion de la myocardine n'est pas viable et entraîne la mort précoce des embryons.

La délétion totale de MRTF-A chez la souris est viable, mais les femelles sont incapables d'allaiter leur progéniture en raison d'un défaut dans les cellules myoépithéliales mammaires (Li et al., 2006; Y. Sun et al., 2006). A l'inverse, la délétion totale de MRTF-B entraîne une létalité embryonnaire en raison de défauts cardiovasculaires, tels qu'une organisation anormale du réseau artériel, une organisation des ventricules altérée ainsi qu'un myocarde aux parois trop fines (Oh et al., 2005).

La suite de cette partie se consacre uniquement sur la voie MRTF/SRF car c'est celle-ci qui fait l'objet de mon travail de thèse.

2- Régulation de l'échange cytoplasme-noyau de MRTF par l'actine

Il est bien défini que les MRTFs sont des facteurs à la localisation dynamique qui alterne entre cytoplasme et noyau. Comme discuté dans les parties précédentes, l'état monomérique ou filamentueux de l'actine constitue la première étape de régulation de la localisation et donc de l'activité des MRTFs (Miralles et al., 2003; Posern et al., 2004; Posern et al., 2002). Plus en amont de la voie, la signalisation MRTF/SRF est principalement médiée par l'activité des Rho GTPases (Hill et al., 1995) qui permettent la transition entre actine monomérique et filamenteuse. D'un point de vue mécanistique, il a été montré que la polymérisation de l'actine favorisée par les Rho GTPases serait réalisée à travers deux voies parallèles et synergiques. D'une part, la voie ROCK-LIM kinase-cofiline qui permet la stabilisation des filaments d'actine en inhibant la cofiline (Geneste et al., 2002; Sotiropoulos et al., 1999), et

d'autre part la voie mDia (protéine Diaphanous, de la famille des formines) qui permet la polymérisation des filaments d'actine (Copeland & Treisman, 2002; Miralles et al., 2003)(*Figure 32*).

Il est important de préciser que même si ce double mécanisme d'activation a été mis en évidence dans le cadre d'une activation de RhoA, l'action connue des autres Rho GTPases telles que Rac1 et Cdc42 sur le cytosquelette d'actine permet aisément de suggérer que leur mécanisme d'action est similaire (Geneste et al., 2002).

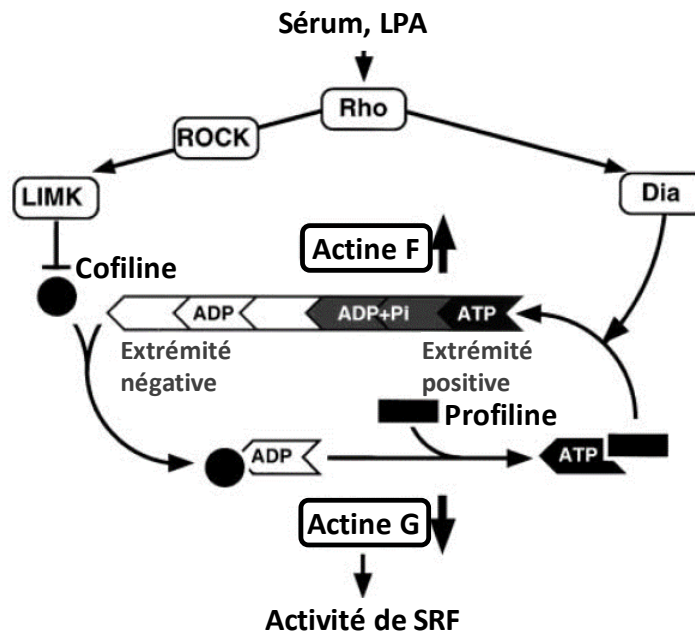


Figure 32: Régulation de l'organisation de l'actine par les Rho GTPases

La polymérisation de l'actine est régulée par les Rho GTPases selon deux voies parallèles, la première permettant la stabilisation des filaments d'actine en inhibant la cofiline à travers la voie ROCK/LIMK, et la deuxième favorisant la polymérisation de l'actine à travers l'action des protéines Diaphenous. (D'après Geneste et al., 2002)

Cependant, l'actine cytoplasmique n'est pas la seule à réguler l'activité des MRTFs. En effet, il a été montré que l'actine nucléaire monomérique régule aussi ces co-activateurs de SRF, et ce en ayant de multiples actions (Vartiainen et al., 2007). Un des rôles des monomères d'actine nucléaires est de favoriser l'export nucléaire des MRTFs. En outre, les monomères d'actine nucléaires séquestrent les facteurs MRTFs, selon le modèle cytoplasmique, et ainsi les empêchent d'interagir avec SRF. Lors d'une stimulation, l'export nucléaire des MRTFs va diminuer, ce qui va entraîner une accumulation de ces facteurs dans le noyau. Cette accumulation couplée à une diminution de l'actine nucléaire monomérique va aboutir à l'activation de la voie MRTF/SRF (Vartiainen et al., 2007)(*Figure 33*).

La présence d'une polymérisation de l'actine nucléaire a également été démontrée. Cette polymérisation nucléaire contribue à l'activation de la voie MRTF/SRF et dépend des formines (Baarlink et al., 2013).

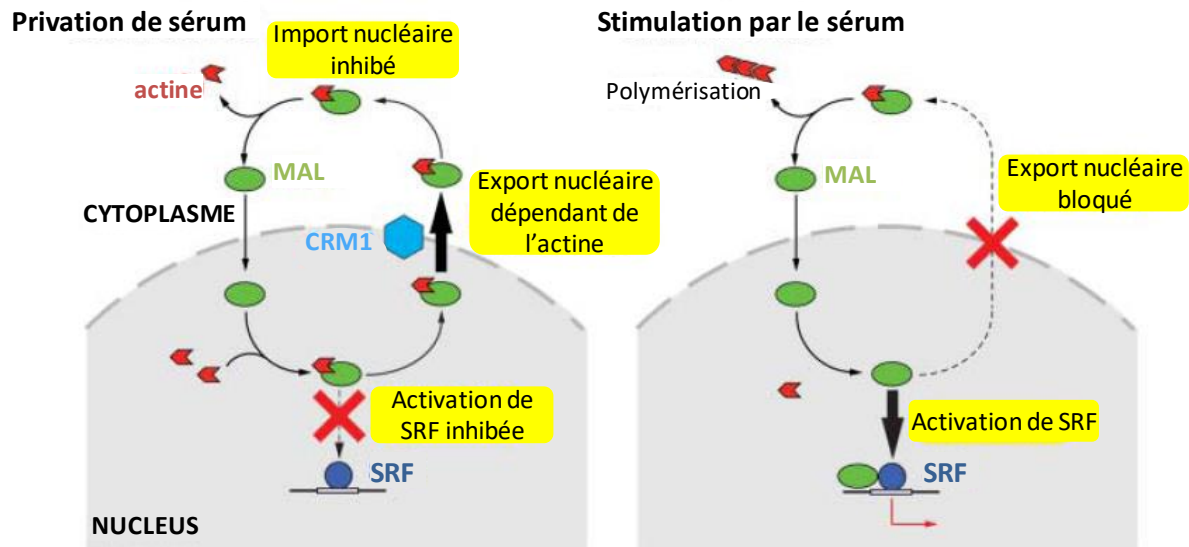


Figure 33: Rôle de l'actine nucléaire dans la régulation des MRTFs

L'actine nucléaire joue un double rôle dans la régulation des MRTFs (seul MAL est représenté ici). En absence de stimulation, l'actine nucléaire va interagir avec MAL et le séquestrer en empêchant son association avec SRF. D'autre part l'actine associée à MAL va favoriser son export nucléaire, en collaboration avec les exportines (Crm1). Lors d'une stimulation, l'export nucléaire est bloqué, et l'accumulation de MAL dans le noyau va diminuer son interaction avec l'actine et ainsi permettre l'activation de la voie MRTF/SRF (D'après Vartiainen et al., 2007)

La phosphorylation de MRTF par la voie des MAP kinases favorise l'export nucléaire de MRTF et ainsi inhibe la voie MRTF/SRF. Il a été montré que cette action est médiée par un renforcement de l'interaction entre MRTF et actine monomérique nucléaire (Muehlich et al., 2008). Récemment, le rôle positif et négatif de la phosphorylation de MRTF sur sa localisation cellulaire et son activité, a été discuté plus en détail (Panayiotou et al., 2016).

Le gène de l'actine est une cible directe de la voie MRTF/SRF (Esnault et al., 2014). Ainsi, il apparaît évident que l'actine est au centre d'une boucle de régulation de la voie MRTF/SRF. La stimulation de la voie par les Rho GTPases aboutit à une polymérisation de l'actine et à une activation de la voie MRTF/SRF. Cette activation engendre une synthèse de monomères d'actine et de certaines protéines associées à l'actine. Cette synthèse va augmenter la quantité de monomères d'actine présents dans le cytoplasme et le noyau, ce qui aura pour conséquence d'augmenter l'export nucléaire des MRTFs et de fournir une

réétention efficace de ces facteurs dans le cytoplasme. La voie se retrouvera ainsi inhibée par cette boucle de rétrocontrôle.

La transition nucléo-cytoplasmique des MRTFs est donc à la base de la régulation de cette voie dépendante de l'actine. Il est important de préciser que ces mécanismes sont particulièrement décrits dans des cellules musculaires ou des fibroblastes. Dans les cellules neuronales, le taux de MRTFs nucléaires est élevé même en absence de stimulation. Dans ces cellules, l'étude des protéines régulant l'activité des MRTFs a son importance. Certaines études ont montré le rôle de la phosphorylation de MRTF (Kalita et al., 2006) et de la présence d'actine nucléaire (Stern et al., 2009) dans la régulation de la voie MRTF/SRF dans les cellules neuronales.

3- Régulateurs positifs et négatifs de l'activité de la voie MRTF/SRF

En dehors des complexes TCF et MRTF, il existe de nombreux cofacteurs de SRF qui vont par leur action moduler la voie de signalisation MRTF/SRF. Certains de ces cofacteurs vont avoir un effet positif sur la voie MRTF/SRF tandis que d'autres vont l'inhiber.

La protéine STARS (striated muscle activator of Rho dependent signalling, aussi appelée ABRA) qui est surexprimée dans les cardiomyopathies, est une protéine de liaison aux monomères d'actine localisée au niveau des sarcomères. L'expression de STARS et son association avec les monomères d'actine entraîne la libération du facteur MRTF-A qui va pouvoir s'associer avec SRF et déclencher la réponse transcriptionnelle adaptée. Ainsi, dans les cellules musculaires, STARS agit en synergie avec MRTF-A pour stimuler l'activité de SRF (Kuwahara et al., 2007)(*Figure 34*).

La famille de protéines à homéodomaine Nkx2-5 est fortement impliquée dans la différenciation cellulaire et l'expression de gènes spécifiques d'un tissu particulier. Il a été montré que cette protéine agit comme un co-facteur positif de SRF en stimulant la transcription de l' α -actine dans le muscle (Chen & Schwartz, 1996).

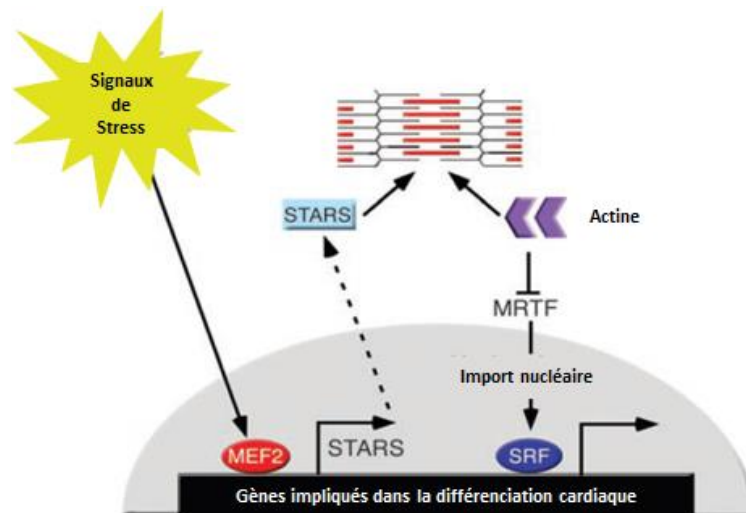


Figure 34: Régulation de la voie MRTF/SRF par la protéine STARS

Dans les cellules musculaires, l'expression de la protéine STARS va promouvoir son association avec les monomères d'actine au niveau des sarcomères, ce qui va libérer le facteur MRTF afin que celui interagisse dans le noyau avec SRF et déclenche la transcription de gènes impliqués dans la différenciation musculaire (D'après Kuwahara et al., 2007)

GATA4, un membre de la famille de protéines à doigts de zinc GATA, a également fait l'objet d'études qui ont montré que cette protéine agit en synergie avec SRF afin de déclencher l'expression de gènes impliqués dans la différenciation musculaire (Belaguli et al., 2000; Sepulveda et al., 2002) .

Les protéines à domaine LIM CRP1 et CRP2 (cystein-rich protein), connues pour leur rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine, possède également un rôle dans la transcription médiée par SRF. Lors des étapes précoces de la différenciation musculaire, ces protéines sont capables de se localiser dans le noyau où elles formeront un complexe transcriptionnel avec SRF pour permettre l'expression des gènes de différenciation (Chang et al., 2003).

Certains cofacteurs de SRF n'agissent pas comme des activateurs mais comme des inhibiteurs de la voie MRTF/SRF. C'est par exemple le cas d'une autre protéine à domaine LIM, la protéine Fhl2. Cette protéine est très exprimée dans les cellules cardiaques, et son expression est médiée par l'activation de RhoA et la fixation conséquente de SRF sur son promoteur. Une fois que cette protéine est exprimée, elle va se comporter comme un modulateur transcriptionnel de SRF et rentrer en compétition avec MRTF-A pour la liaison avec SRF. Ainsi l'expression de Fhl2, cible directe de MRTF/SRF, aboutit *in fine* à l'inhibition de cette voie (Philippart et al., 2004).

La protéine Hop, une protéine à homéodomaine, est aussi impliquée dans la modulation de la voie MRTF/SRF au cours de la différenciation cardiaque. Cette protéine entre en compétition avec SRF pour la liaison avec les MRTFs, ce qui limite l'activation de la voie MRTF/SRF. La délétion de cette protéine aboutit à un déséquilibre entre la prolifération des cardiomyocytes et la différenciation cardiaque induite par la voie MRTF/SRF, ce qui entraîne de profonds troubles de la morphologie cardiaque (Chen et al., 2002; Shin et al., 2002).

D'autres cofacteurs négatifs de la voie MRTF/SRF sont les protéines Msx (Hayashi et al., 2006), l'histone déacétylase HDAC4 (Davis et al., 2003) et la protéine Klf4 (Kruppel-like factor 4)(Y. Liu et al., 2005).

En dehors des facteurs qui s'associent avec SRF, la famille MRTF possède aussi des cofacteurs qui vont permettre de réguler la voie MRTF/SRF, parfois positivement, parfois négativement. Les histones acétyltransférases comme p300 ou CBP (CREB-binding protein) appartiennent à la famille des cofacteurs de MRTF qui vont activer la voie MRTF/SRF. En effet, p300 permet de renforcer l'activité promyogénique de la myocardine dans les cellules musculaires lisses en s'associant avec le domaine de transactivation (TAD) de la myocardine (Cao et al., 2005). Selon le même principe, la protéine CBP va permettre l'induction du facteur proangiogénique CCN1 grâce à son association avec MRTF-A (Hanna et al., 2009). A l'inverse, les histones déacétylases de classe II, également par une interaction directe avec la myocardine sur un domaine impliqué dans la fixation à SRF, vont inhiber la transcription des gènes spécifiques du muscle lisse. Ainsi, dans ce contexte, la famille des MRTF est réellement au cœur de la régulation de l'expression des gènes du muscle lisse, en intégrant des signaux positifs ou négatifs pour l'acétylation des histones (Cao et al., 2005).

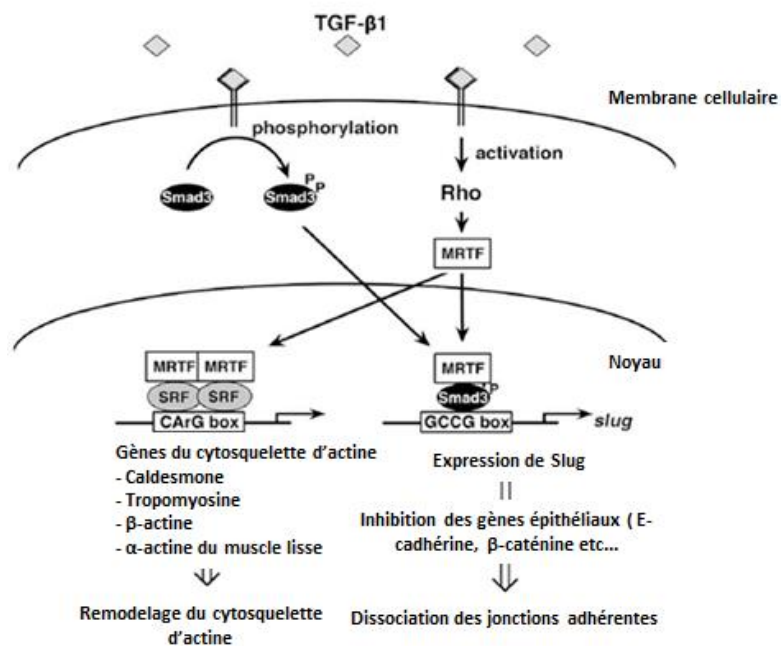


Figure 35: Interaction SMAD-MRTF dans la transition épithélio-mésenchymateuse

Le traitement au TGF-β1 entraîne l'activation de deux voies parallèles qui vont favoriser l'EMT. Tout d'abord, la voie des SMAD va s'activer, ce qui provoque l'association de SMAD3 avec MRTF et va permettre l'expression de slug. D'autre part, les Rho GTPases sont également activées, et par leur rôle sur l'actine vont permettre la stimulation de la voie MRTF/SRF. (D'après Morita et al., 2007)

La famille des MRTFs est aussi capable de s'associer avec les protéines SMADs. Le traitement de cellules MDCK par le TGF-β aboutit au phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), c'est-à-dire la perte des caractères épithéiaux et l'apparition d'un phénotype mésenchymateux, davantage propice à la migration et l'invasion. Une des étapes précoces de l'EMT est la disparition des jonctions cellulaires par perte des protéines associées telles que la E-cadhérine. Une étude a montré que lors du traitement au TGF-β1, il y a association entre SMAD3 et les MRTFs, et que cette interaction va permettre la fixation de SMAD sur une séquence d'ADN permettant l'expression de la protéine slug, impliquée dans la diminution de la E-cadhérine. Cette activation a lieu en parallèle de l'activation de la voie MRTF/SRF, également sensible au traitement TGF-β1 (Morita et al., 2007)(Figure 35). Cette interaction entre SMAD3 et MRTF est également impliquée dans la différenciation musculaire (Qiu et al., 2005).

La protéine GATA4, évoqué précédemment pour son action synergique avec SRF, est également au centre d'une régulation très précise de l'activité de la myocardine lors de la différenciation cellulaire. En effet GATA4 possède deux domaines d'interaction avec la myocardine. Le premier domaine, situé dans son domaine de transactivation, va entraîner l'inhibition de l'interaction de la myocardine avec SRF. Le domaine de liaison à l'ADN peut lui aussi se fixer à la myocardine mais il va quant à lui permettre l'activation de la voie myocardine-SRF. Ainsi les différentes interactions entre GATA4 et la myocardine permettent une régulation fine de l'expression des gènes impliqués dans la différenciation musculaire (Oh et al., 2004)(*Figure 36*).

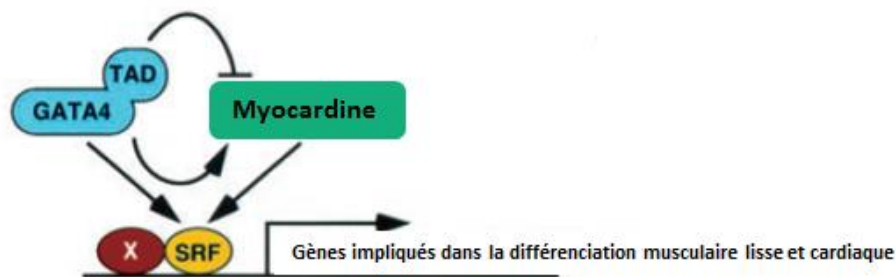


Figure 36: Double régulation de la myocardine par GATA4

GATA4 possède deux domaines de liaison à la myocardine. Le domaine de transactivation (TAD) est responsable de la répression de la myocardine tandis que le domaine de liaison à l'ADN de GATA4 permet la fixation et l'activation de la myocardine. (D'après Oh et al., 2004)

La protéine FOXO4 possède aussi la capacité de se lier à la myocardine et de l'inhiber (Pipes et al., 2006).

La filamine A est également un régulateur postif de la voie MRTF/SRF et vient contrebalancer l'effet inhibiteur des monomères d'actine sur cette voie de signalisation, en s'associant aux filaments d'actine et aux MRTFs (Kircher et al., 2015).

En entrant en compétition avec les MRTFs pour la fixation aux monomères d'actine, la thymosine β 4 est un activateur de la voie MRTF/SRF (Morita & Hayashi, 2013).

Enfin, afin de réaliser diverses études, certains composés modulant l'organisation des filaments d'actine ont directement été utilisés comme activateur ou inhibiteur de la voie MRTF. Leur effet positif ou négatif sur cette voie dépend directement des modifications qu'ils induisent sur l'actine. Par exemple, la jasplakinolide qui favorise la formation des filaments d'actine va stimuler la voie MRTF/SRF. De même, la cytochalasine D est un activateur de cette voie bien qu'elle induise la fragmentation des filaments en monomères. Cependant cette

drogue reste liée aux monomères et empêche l'interaction de ceux-ci avec toute autre molécule, et les MRTFs se retrouvent donc libres de transloquer dans le noyau. La latrunculine, au contraire, est utilisée comme un inhibiteur de la voie MRTF/SRF, l'apparition des monomères d'actine qu'elle favorise entraînant la séquestration cytoplasmique des MRTFs.

Protéine	Effet sur la voie MRTF/SRF
STARS	Activateur
Nkx2-5	Activateur
GATA4	Activateur/ Inhibiteur
CRP1/CRP2	Activateur
FHL2	Inhibiteur
Msx	Inhibiteur
HDAC4	Inhibiteur
Klf4	Inhibiteur
Hop	Inhibiteur
P300/CBP (histones acétyltransférases)	Activateur
HDAC (histones désacétylases) de classe II	Inhibiteur
SMAD3	Activateur
FOXO4	Inhibiteur
Filamine A	Activateur
Thymosine β 4	Activateur
Jasplakinolide	Activateur
Cytochalasine D	Activateur
Latrunculine	Inhibiteur

Figure 37: Facteurs régulant l'activité de la voie MRTF/SRF

De nombreux facteurs sont capables de réguler positivement ou négativement l'activité de la voie MRTF/SRF

La combinaison de l'ensemble de ces facteurs résumés (**Figure 37**) ainsi que la régulation fine de la dynamique de l'actine vont permettre à la voie MRTF/SRF de réguler de nombreux gènes. L'étude des gènes cibles de la voie MRTF/SRF fait l'objet de la prochaine partie.

4- Fonctions des gènes cibles de la voie MRTF/SRF

L'ensemble des gènes cibles de la voie MRTF/SRF ont en commun de posséder au sein de leur promoteur au moins une séquence CArG (CC(A/T)₆GG) qui va permettre la fixation de SRF. Afin de déterminer quelles sont les cibles de SRF, de nombreuses études ont été réalisées,

qu'elles soient de l'ordre de la caractérisation de gènes candidats, d'études génomiques globales dans des conditions d'extinction de SRF ou alors d'études de bioinformatique afin d'identifier des candidats potentiellement cibler par SRF, car possédant dans leur promoteur une séquence analogue à la boîte CA₂G (Philippart et al., 2004; Schratt et al., 2002; Selvaraj & Prywes, 2004; Sun et al., 2006).

D'autres études ont utilisé la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ou ChIP, chromatin immunoprecipitation) afin d'étudier les gènes régulés par SRF (Cooper et al., 2009; Esnault et al., 2014). Ces études ont permis d'aboutir à la découverte de plusieurs centaines de gènes régulés par SRF. De plus, il existe clairement une opposition entre les gènes régulés par l'interaction de SRF avec le complexe TCF et les gènes régulés par la voie MRTF/SRF. En effet, la fixation de MRTF à SRF ainsi qu'à l'ADN est interdépendante, et implique le déplacement du nucléosome afin de permettre l'accès à l'ADN de ces deux facteurs. La voie MRTF/SRF est principalement impliquée dans l'expression de gènes inductibles en réponse à une stimulation telle que le sérum. La grande majorité des gènes cibles de MRTF est également une cible de SRF, ce qui laisse à penser que MRTF régule l'expression génique principalement au travers de la voie MRTF/SRF (Esnault et al., 2014). A l'inverse, le complexe TCF est capable d'activer de nombreuses cibles indépendamment de la voie SRF. De plus, la stimulation de la voie TCF-SRF passe par une activation du complexe TCF qui va se fixer sur l'ADN au niveau d'une séquence adjacente à la CA₂G box (*Figure 38*). Dans cette voie, SRF est déjà fixé sur ces cibles au niveau de la boîte CA₂G, et la stimulation de la voie va simplement permettre l'interaction de SRF avec TCF. Au contraire du complexe MRTF/SRF, la voie TCF-SRF est principalement impliquée dans l'expression de gènes constitutivement actifs, c'est-à-dire ne nécessitant pas une stimulation préalable de la voie.

Deux grandes classes de gènes cibles de SRF peuvent être identifiées. La première classe va correspondre aux gènes ayant une réponse cellulaire rapide et immédiate, impliqués dans les fonctions dynamiquement régulées telle que la croissance cellulaire ou le cycle cellulaire avec la transition G₀-G₁. Ces fonctions reposent sur l'expression de gènes précoces (immediate-early genes) principalement dépendants du complexe TCF-SRF (Treisman, 1990 ; Buchwalter et al., 2004; Shaw et al., 1989). Parmi ces gènes, on retrouve c-fos, egr-1, pip92 et JunB.

La deuxième classe de gènes va correspondre aux gènes régulés par l'interaction de SRF avec les MRTFs. Ces gènes se regroupent principalement en trois sous-catégories :

- les gènes spécifiques du muscle ou des fonctions contractiles
- les gènes impliqués dans la régulation du cytosquelette d'actine
- les gènes codant pour des miARNs.

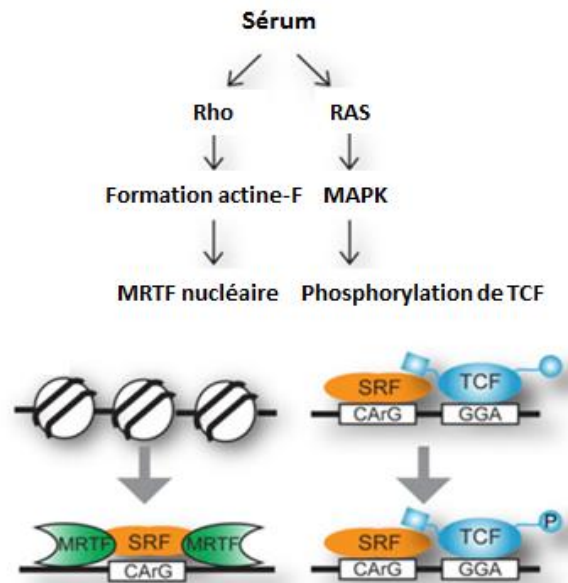


Figure 38: Mécanisme de liaison à l'ADN des voies MRTF/SRF et TCF-SRF

Lors d'une stimulation par le sérum, l'activation des Rho GTPases ou de la voie des MAP kinases active respectivement la translocation nucléaire de MRTF ou la phosphorylation de TCF. Dans le cadre de la voie MRTF/SRF, la translocation de MRTF permet son interaction avec SRF, le déplacement du nucléosome et la fixation interdépendante de ces deux facteurs sur l'ADN. A l'inverse le TCF activé interagit avec SRF pré-lié à l'ADN (D'après Clark & Graves, 2014)

A- Gènes contractiles et spécifiques du muscle

Une grande majorité des gènes spécifiques du tissu musculaire sont contrôlés par les boîtes CArG et SRF. Comme évoqué à plusieurs reprises précédemment, la myocardine, membre de la famille des MRTFs, spécifiquement exprimée dans les tissus musculaires, joue un rôle très important dans l'expression des gènes spécifiques du muscle lisse par son interaction avec SRF (Li et al., 2006; Z. Wang et al., 2003). Par exemple, la myocardine est impliquée dans la transcription efficace des gènes de l' α -actine, de différentes myosines et du gène SM22 α (Chen et al., 2002; Yoshida et al., 2003). En outre, et de façon intéressante, il a été montré que la transfection de MRTF-A dans des cellules souches embryonnaires et ainsi non-musculaires était suffisante pour déclencher la transcription de gènes dépendants du

muscle lisse (Du et al., 2004). Cette étude soulève la question de pourquoi les MRTFs, exprimés dans de nombreux types cellulaires, ne déclenchent pas en permanence l'expression de gènes spécifiques du muscle lisse. Il semblerait que le niveau de MRTFs endogène soit régulé efficacement par la dynamique de l'actine, alors que la surexpression forcée de ces protéines ne serait plus soumise à la régulation de l'actine, ce qui déclencherait de tels programmes transcriptionnels inadaptés au type cellulaire d'origine.

Les MRTFs sont également nécessaires pour la différenciation du muscle squelettique. En effet, la génération d'un KO conditionnel de SRF dans le muscle squelettique entraîne la formation de fibres musculaires incapables de se développer correctement. De plus, les souris ainsi générées ne sont pas viables et meurent précocement, à cause de sévères hypoplasies musculaires. Le phénotype myopathique de ces souris est similaire à celui de souris exprimant une construction codant pour une forme dominante-négative de MRTF. Cette étude révèle donc la grande importance de la voie MRTF/SRF dans la croissance du muscle squelettique et de sa maturation *in vivo* (Li et al., 2005).

Enfin, de nombreuses études insistent sur l'importance de cette voie dans les fonctions contractiles du muscle. En effet, les expériences d'inactivation de gènes dans de nombreuses espèces, allant d'eucaryotes unicellulaires à la souris, ont permis de démontrer que la perte de SRF était incompatible avec la vie. Mais contrairement à l'idée initiale que SRF est requis pour une prolifération et une croissance normale, son action se situe davantage dans l'expression de gènes contractiles et impliqués dans la biologie du cytosquelette d'actine. Plus de la moitié des gènes régulés par la voie MRTF/SRF seraient ainsi impliqués dans la machinerie de contraction et de régulation du cytosquelette, et la perte de cette contractilité par l'inactivation de la voie MRTF/SRF aboutit à de nombreuses pathologies (Miano, 2015; Miano et al., 2007).

B- Gènes modulant la dynamique de l'actine et la motilité cellulaire

Les gènes cibles de la voie MRTF/SRF régulent de nombreuses protéines dont les fonctions sont reliées au cytosquelette d'actine. Ces gènes peuvent être impliqués dans la structure de l'actine (tel que le gène codant pour l'actine elle-même), mais également des effecteurs impliqués dans le renouvellement des filaments d'actine (la cofiline en est un bon exemple),

et enfin des gènes régulant la dynamique de l'actine (telle que la taline et la cofiline). Ces gènes sont nombreux, et permettent d'assurer de nombreuses fonctions biologiques. Ils contribuent au développement lors de la formation du mésoderme (Arsenian et al., 1998), assurent le fonctionnement de l'appareil contractile afin de permettre la contraction musculaire et le tonus vasculaire (Miano et al., 2007), de même que l'adhésion à la matrice extracellulaire et le remodelage tissulaire (Schratt et al., 2002). Une liste non exhaustive des gènes cibles de la voie MRTF/SRF est représentée (*Figure 39*) (Olson & Nordheim, 2010).

L'identification des gènes cibles de SRF et dont l'expression est également dépendante des protéines MRTFs a été permise grâce à l'utilisation de composés permettant l'activation de la voie MRTF. On pense à la cytochalasine D qui permet la fragmentation des filaments d'actine, mais en restant liée aux monomères d'actine et les rendant indisponibles pour toute autre interaction, permet l'activation de la translocation nucléaire des MRTFs ; ou au contraire à la latrunculine qui va permettre l'apparition de monomères capables de séquestrer les MRTFs dans le cytoplasme et ainsi inhiber leur activité. L'utilisation de ces composés, couplée à une approche d'analyse globale, telle que la mise en place d'expériences de CHIP-seq (expérience d'immunoprécipitation de la chromatine suivie d'une analyse par séquençage) a permis l'identification de nombreuses cibles directes et spécifiques de la voie MRTF/SRF, telles que les intégrines $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\alpha 9$, $\beta 1$, la taline, la vinculine ou encore le syndécan 2 et 4 (Miano et al., 2007 ;Esnault et al., 2014; Medjkane et al., 2009; Selvaraj & Prywes, 2004). L'implication de la voie MRTF/SRF dans l'expression et la fonction de ces protéines est directe, l'inhibition de cette voie aboutissant à une perte des adhésions focales et à une organisation du cytosquelette anarchique dans les cellules souches embryonnaires (Schratt et al., 2002).

Les cibles de la voie MRTF/SRF impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine étant nombreuses, la caractérisation de ces protéines, et de leur fonction requiert des investigations.

Gène	Protéine	Fonction
Composants des structures d'actine		
ACTA1	Actine, alpha1	Structure du microfilament d'actine
ACTA2	Actine, alpha 2	Structure du microfilament d'actine
ACTB	Actine, beta	Structure du microfilament d'actine
ACTG1	Actine, gamma 1	Structure du microfilament d'actine
ACTG2	Actine, gamma 2	Structure du microfilament d'actine
ITGB1	Intégrine, beta 1	Composant des adhésions focales
MYH11	Chaîne lourde de myosine, 11	Structure de l'actomyosine
MYH9	Chaîne lourde de myosine, 9	Structure de l'actomyosine
MYL9	Chaîne légère de myosine, 9	Structure de l'actomyosine
Effecteurs du renouvellement de l'actine		
ACTR3 (ARP3)	ARP3 (protéine relié à l'actine 3)	Renouvellement et branchement des microfilaments d'actine
CFL1	Cofiline 1	Renouvellement des microfilaments
GSN	Gelsoline 1	Renouvellement des microfilaments
VIL1	Villine 1	Réorganisation des microfilaments d'actine
SVIL	Supervilline	Réorganisation des microfilaments d'actine
Protéines influençant la dynamique de l'actine		
CTGF	Facteur de croissance tu tissu conjonctif	Protéine de la matrice extracellulaire, ligand de l'intégrine et modulateur des capacités migratoires
CYR61 (CCN1)	Protéine riche en cystéine 61	Protéine de la matrice extracellulaire, ligand de l'intégrine et modulateur des capacités migratoires
FHL1/FHL2	Protéines à domaine LIM FHL1 et FHL2	Voie de signalisation en aval des jonctions adhérentes
FLNA	Filamine A	Voie de signalisation des intégrines
MMP9	Métalloprotéase matricielle 9	Migration cellulaire et remodelage de la matrice extracellulaire
MYLK	Kinase des chaînes légères de myosine	Régulation de l'actomyosine
SRF	Facteur de réponse au sérum	Régulation transcriptionnelle
TLN1	Taline 1	Voie de signalisation des intégrines

Figure 39: Exemple de gènes régulés par la voie MRTF/SRF

Les gènes régulés par la voie MRTF/SRF peuvent être classés en trois catégories selon qu'ils régulent la structure de l'actine, son renouvellement ou sa dynamique. Pour chaque exemple de gène, le nom de la protéine correspondante et la fonction associée sont indiqués. (D'après Olson & Nordheim, 2010)

C- Rôle des micro ARNs dans la régulation de la voie MRTF/SRF

Le nombre d'études relayant un rôle des micro ARNs (miARNs) dans la régulation de la voie MRTF/SRF ne cesse d'augmenter. Le rôle de ces miARNs serait de réguler très finement le contrôle de l'expression des gènes spécifiques du muscle, des gènes impliqués dans la dynamique de l'actine et dans la réponse au stress en exerçant un rétrocontrôle sur la voie MRTF/SRF (Niu et al., 2007).

Dans les cellules cardiaques, la voie MRTF/SRF permet l'expression de nombreux gènes impliqués dans la différenciation musculaire. En parallèle de ces gènes, l'expression de certains miARNs tels que miR-1 et miR133 est aussi activée. Parmi les cibles de miR133, on retrouve SRF qui va donc être inhibé par une de ces cibles directes. Cette boucle de rétrocontrôle va permettre de contrôler l'expression des gènes impliqués dans la différenciation musculaire au cours du développement (Liu et al., 2008)(Figure 40).

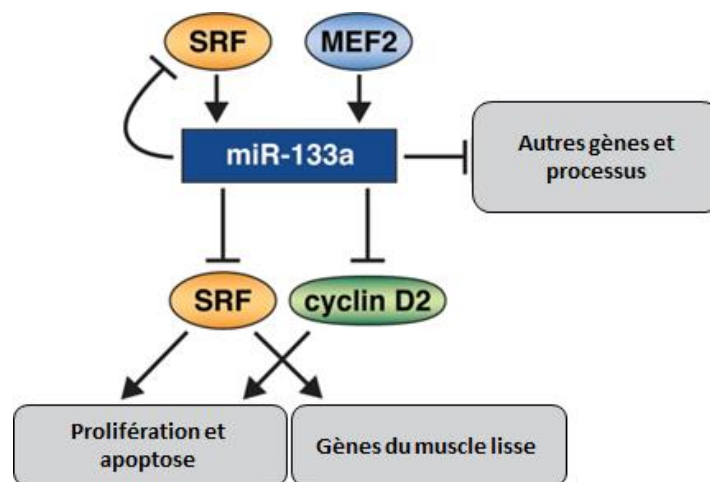


Figure 40: Boucle de rétrocontrôle exercée par miR-133

Dans les cellules musculaires, SRF active l'expression de gènes spécifiques du muscle, tout en activant l'expression de miR-133. Ce miARN va exercer une boucle de rétrocontrôle sur SRF et ainsi finement réguler la différenciation musculaire au cours du développement (D'après Liu et al., 2008)

Un autre exemple de boucle de rétrocontrôle exercée par certains ARN interférents sur la voie de signalisation MRTF/SRF est la régulation du cytosquelette d'actine.

MiR-143 et miR145 sont deux ARN interférents codés par un ARNm bicistronique, et dont l'expression est contrôlée par la voie MRTF/SRF. Les souris transgéniques n'exprimant pas ces miARNs sont viables, cependant elles présentent un défaut de tonus vasculaire et une incapacité de remodelage des vaisseaux sanguins en réponse à des blessures (Xin et al., 2009). Ces défauts seraient dus à une régulation anormale de protéines permettant l'organisation du cytosquelette d'actine, rendant les souris mutantes insensibles à la déformation de la paroi

vasculaire. Par exemple, ces miARNs ciblent l'adducine 3, protéine de coiffe des filaments d'actine empêchant la polymérisation de ces filaments. Slingshot 2 est également régulée par ces miARNs, et assure la motilité cellulaire et la réorganisation des filaments d'actine en déphosphorylant et activant la cofiline. miR145 est également impliqué dans l'inhibition de KLF4 et KLF5, protéines inhibant SRF, ainsi que dans l'inhibition des protéines SlitRobo, qui sont des protéines inhibitrices de la polymérisation de l'actine et de la Rho GTPase Cdc42. Enfin ces miARNs ciblent et inactivent directement MRTF-B, protéine activant leur expression.

Ainsi, ces ARN interférents sont au centre d'une organisation spatio-temporelle précise de l'activité MRTF/SRF. Leur perte comme évoqué précédemment entraîne des conséquences majeures sur la dynamique de l'actine et le tonus vasculaire (Xin et al., 2009)(**Figure 41**).

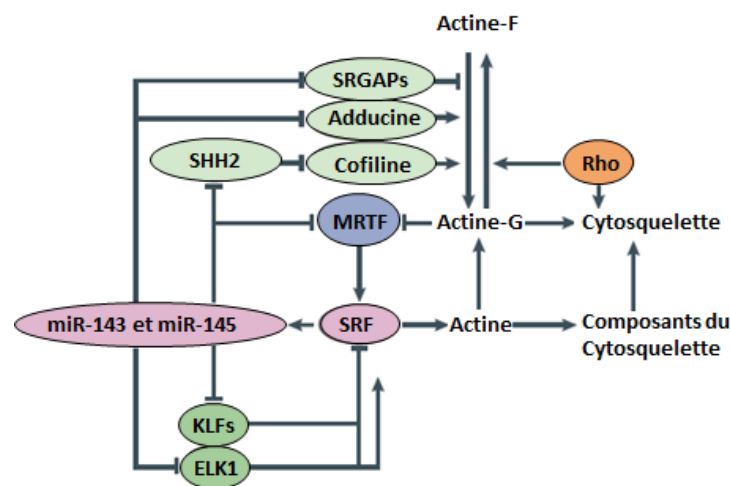


Figure 41: Boucle de régulation des miR-143 et miR-145

L'expression de miR-143 et miR-145 est stimulée par la voie MRTF/SRF. Ces miARNs sont au centre d'une boucle de régulation de la voie MRTF/SRF en réprimant l'expression de nombreuses cibles telles que les protéines SlitRobo (SRGAPs), Slingshot2 (SHH2), l'adducine 3 ou KLF4 et KLF5 (D'après Xin et al., 2009)

MiR-486 a également été décrit comme au centre d'une boucle de rétrocontrôle de la voie MRTF/SRF (Small et al., 2010).

Ainsi, comme observé au cours de cette partie, la voie de signalisation MRTF/SRF régule de nombreuses protéines mais est aussi très finement régulée. La perturbation de cette voie est à l'origine de diverses pathologies décrites dans la partie suivante.

5- Implication de la voie actine-MRTF/SRF en pathologie

La voie de signalisation MRTF/SRF est au cœur de la relation entre dynamique d'actine et transcription génique. De nombreuses fonctions motiles et structurales des cellules se reposent donc sur le fonctionnement correct de cette voie. Des études *in vitro* et *in vivo* de délétion de SRF ou des MRTFs spécifiquement dans certains types cellulaires ont permis de mettre en évidence l'implication de la voie MRTF/SRF dans certaines pathologies. La voie MRTF/SRF a notamment été démontrée comme impliquée dans deux principales catégories de maladies qui seront discutées dans la partie suivante et qui représentent des enjeux majeurs en santé humaine, à savoir les maladies cardio-vasculaires et le cancer.

A- Maladies cardiovasculaires

La voie MRTF/SRF est connue pour réguler de nombreux gènes impliqués dans la différenciation musculaire au cours du développement mais également dans la fonction musculaire et contractile par sa régulation dynamique du cytosquelette d'actine et de ses composants. Ainsi, il n'est pas surprenant de retrouver cette voie au centre des fonctions musculaires telles que la transduction de force ou la mécanotransduction dans les cellules musculaires, et ainsi de retrouver son expression et son activité dérégulée dans de nombreux modèles de pathologies cardiovasculaires. Lors du remodelage du cœur dans des modèles pathologiques d'hypertrophie et d'arrêt cardiaque, les gènes cibles de la voie MRTF/SRF sont dérégulés. La myocardine et la protéine STARS (un modulateur positif de l'activité transcriptionnelle de SRF décrit page 44) sont surexprimés dans les cardiomyopathie et l'hypertrophie cardiaque (Kawahara et al., 2007; Torrado et al., 2003; Xing et al., 2006). La caspase 3 a été identifiée comme importante dans des modèles de cœur défaillant pouvant conduire à l'arrêt cardiaque. L'action de la caspase 3 serait de cliver SRF, ce qui entraînerait la génération d'une forme dominante-négative de SRF et conduirait à la diminution d'expression des gènes impliqués dans l'organisation du sarcomère (Chang et al., 2003). Ainsi la génération de cette forme particulière de SRF permet de montrer qu'une telle surexpression est pathologique. La voie MRTF/SRF est donc importante dans le maintien de l'homéostasie cardiaque.

Il y a quelques années, la myocardine et SRF ont été identifiés comme surexprimés dans les petites artères cérébrales au cours de la maladie d'Alzheimer. Ces protéines ont un rôle

dans la progression de la maladie en augmentant l'hypercontractilité artérielle, à travers l'expression des gènes cibles de SRF et spécifiques du muscle lisse. La surexpression de ces protéines aboutit à la diminution du flux sanguin cérébral (Chow et al., 2007).

SRF est aussi un régulateur central du phénotype des cellules musculaires lisses en réponse à une blessure. Durant l'athérosclérose (perte d'élasticité des vaisseaux) et la resténose (caractérisée par une diminution du diamètre vasculaire), la voie MRTF/SRF est inhibée, ce qui conduit à une prolifération excessive des cellules musculaires lisses dans la paroi vasculaire (Owens et al., 2004).

En outre, au cours du phénomène de dédifférenciation des cellules musculaires lisses observé *in vivo* à la suite d'une blessure, la protéine KLF4 et le facteur de transcription Foxo4 sont surexprimés. Cette surexpression entraîne d'une part l'inhibition de l'expression de la myocardine, mais également l'inhibition de la transcription dépendante de la voie MRTF/SRF. Les gènes spécifiques du muscle lisse se retrouvent donc moins exprimés, ce qui aboutit au phénomène de dédifférenciation, également observé *in vitro* par un traitement au PDGF (platelet derived growth factor) (Liu et al., 2005).

Enfin, la myocardine et SRF ont également un impact sur des pathologies cérébrales par l'intermédiaire de leur rôle sur les vaisseaux sanguins. Ces protéines contrôlent dans les vaisseaux cérébraux la clairance du peptide amyloïde β . Lors du développement de la maladie d'Alzheimer, la surexpression de la voie MRTF/SRF entraîne la surexpression de la protéine SREBP2, impliquée dans l'inhibition du récepteur de clairance LRP2. Ainsi la clairance du peptide n'est pas assurée correctement lors de la surexpression de la voie MRTF/SRF ce qui contribue au développement et à la progression de la maladie d'Alzheimer (Bell et al., 2009). La surexpression de gènes contractiles cibles de la voie MRTF/SRF a aussi été impliquée dans le développement de cette maladie, en augmentant l'hypercontractilité des artères cérébrales (Chow et al., 2007).

B- Cancers

Une causalité directe entre la dérégulation de la voie actine-MRTF/SRF et le développement de cancers n'a pas encore été démontrée, cependant certains éléments identifient cette voie comme impliquée dans la carcinogenèse et la progression tumorale.

Dans la leucémie mégacaryoblastique aigue de l'enfant (infant acute megakaryoblastic leukaemia, AMKL), une translocation chromosomique t(1 ;22)(p13 ;q13), dans laquelle le gène MRTF-A est fusionné au gène OTT (RBM15) est associée à un mauvais pronostic. La protéine recombinante OTT-MAL est constitutivement nucléaire et active SRF en permanence, sans être soumise à une quelconque régulation du cytosquelette d'actine (Descot et al., 2008; Sawada et al., 2008). De plus, OTT-MAL va activer la transcription de la protéine RBP Jk (recombination signal binding protein), normalement régulée par la voie Notch. La surexpression de cette protéine liée à la présence de OTT-MAL cause une mégacaryopoïèse anormale (la mégacaryopoïèse étant le processus permettant la production de plaquettes) (Mercher et al., 2009).

La myocardine a été identifiée comme un gène suppresseur de tumeur, cette protéine étant sous-exprimée dans certains sarcomes mésoenchymateux (Milyavsky et al., 2007). A l'inverse, on retrouve une surexpression de la myocardine dans le léiomyosarcome (Pérot et al., 2009). Dans le cancer de la prostate, l'activité des récepteurs aux androgènes est à l'origine d'une surexpression de SRF, qui va activer l'expression d'une de ces cibles directes FHL2. L'expression de SRF ainsi que de FHL2 est associée à un mauvais pronostic, et la perte de SRF suffit à inhiber la prolifération des cellules tumorales (Heemers et al., 2007).

Dans le cancer du sein, la voie Hippo est dérégulée, ce qui aboutit à une activation anormale de la voie YAP/TAZ. Il a été montré dans des lignées de cellules dérivées du cancer du sein que cette surexpression favorise la migration, l'invasion et la tumorigénèse. La surexpression de YAP/TAZ est directement corrélée à l'expression de la protéine HRG1 (Heregulin 1). Mécanistiquement, la voie MRTF/SRF a été identifiée comme une cible de HRG1, et c'est l'activation de la voie MRTF/SRF dans ces cellules qui aboutit à l'activation de la voie YAP/TAZ, TAZ étant une cible directe de la voie MRTF/SRF (Liu et al., 2016). D'autres éléments vont en faveur d'un rôle promoteur de tumeur de MRTF/SRF dans le cancer du sein (Hermann et al., 2016; Hu et al., 2011).

La protéine DLC-1 (deleted in liver cancer 1) est un suppresseur de tumeur dont l'allèle est perdu dans 50% des cancers du foie, du sein et du poumon, et dans 70% des cancers du colon. Une étude récente a permis d'identifier la voie MRTF/SRF comme médiateur de l'activité induite par la perte de DLC1 dans des cellules de cancers du foie et du sein. En effet, les protéines MRTF-A et MRTF-B se retrouvent constitutivement nucléaires et actives dans les

cellules dans lesquelles la protéine DLC1 est absente. Ainsi la voie MRTF/SRF semble médier la transformation tumorale des cellules déficientes en DLC1, la suppression des MRTFs dans ces cellules suffisant pour inhiber la migration, la prolifération et la croissance de ces cellules (Muehlich et al., 2012).

De façon plus générale, l'implication de la voie MRTF/SRF dans la régulation de la dynamique de l'actine et des fonctions motiles des cellules place cette voie au cœur du phénomène de métastase. La délétion de MRTF ou de SRF suffit à inhiber l'adhésion, l'étalement, la migration et l'invasion de cellules tumorales métastatiques, comme identifié dans une étude expérimentale *in vivo* (Medjkane et al., 2009).

Un autre élément qui supporte le rôle de la voie MRTF/SRF dans le processus de métastase est le fait que la protéine SCAI (suppressor of cancer cell invasion) inhibe la voie MRTF/SRF. Dans différentes lignées cellulaires testées, l'expression de l'intégrine $\beta 1$ favorise l'invasion cellulaire et cette protéine est surexprimée lorsque la protéine SCAI est absente. L'intégrine $\beta 1$ est une cible directe de la voie MRTF/SRF, et la présence de SCAI suffit à inhiber la voie MRTF/SRF, l'expression de cette intégrine et également le processus d'invasion cellulaire (Brandt et al., 2009).

Même si le niveau d'expression des protéines SRF et MRTFs dans les tissus tumoraux n'est pas clairement renseigné et requiert de plus amples investigations sur de larges cohortes de patients, l'analyse des données *Oncomine* et *Human Protein Atlas* permet de dire que les composants de cette voie semblent dans l'ensemble surexprimés lors du développement tumoral, même si ce n'est pas le cas dans tous les tissus et patients observés (**Figure 42**).

A-SRF

Tissue	Cancer staining	Protein expression of normal tissue	Tissue	Cancer staining	Protein expression of normal tissue
Breast cancer			Melanoma		
Carcinoid			Ovarian cancer		
Cervical cancer			Pancreatic cancer		
Colorectal cancer			Prostate cancer		
Endometrial cancer			Renal cancer		
Glioma			Skin cancer		
Head and neck cancer			Stomach cancer		
Liver cancer			Testis cancer		
Lung cancer			Thyroid cancer		
Lymphoma			Urothelial cancer		

B- MRTF-A (MKL1)

Tissue	Cancer staining	Normal tissue staining	Tissue	Cancer staining	Normal tissue staining
Breast cancer			Melanoma		
Carcinoid			Ovarian cancer		
Cervical cancer			Pancreatic cancer		
Colorectal cancer			Prostate cancer		
Endometrial cancer			Renal cancer		
Glioma			Skin cancer		
Head and neck cancer			Stomach cancer		
Liver cancer			Testis cancer		
Lung cancer			Thyroid cancer		
Lymphoma			Urothelial cancer		

C- MRTF-B (MKL2)

Tissue	Cancer staining	Protein expression of normal tissue	Tissue	Cancer staining	Protein expression of normal tissue
Breast cancer			Melanoma		
Carcinoid			Ovarian cancer		
Cervical cancer			Pancreatic cancer		
Colorectal cancer			Prostate cancer		
Endometrial cancer			Renal cancer		
Glioma			Skin cancer		
Head and neck cancer			Stomach cancer		
Liver cancer			Testis cancer		
Lung cancer			Thyroid cancer		
Lymphoma			Urothelial cancer		

Figure 42: Niveau d'expression de SRF, MKL1 et MKL2 dans les tissus tumoraux

De façon générale, le niveau d'expression des protéines SRF (A), MRTF-A (MKL1, (b)) et MRTF-B (MKL2(C)) semble supérieur dans les tissus tumoraux comparés aux tissus normaux. Source : *Human Protein Atlas* (le blanc indique une faible expression, tandis que plus le bleu est foncé, plus l'expression est forte)

6- Découverte de nouvelles cibles potentielles de la voie

MRTF/SRF

Comme présenté tout au long de cette partie, la voie MRTF/SRF est impliquée dans l'expression de nombreuses protéines, et dans la régulation de nombreux processus biologiques (différenciation tissulaire, régulation de la dynamique de l'actine) et pathologiques (maladies cardiovasculaires, cancers). Les différentes études globales qui ont été menées ont permis d'identifier une grande variété de protéines potentiellement régulées par la voie MRTF/SRF et qui réguleraient ces différents processus (Esnault et al., 2014; Philippar et al., 2004; Schratt et al., 2002; Selvaraj & Prywes, 2004; Sun et al., 2006).

Il est important de caractériser les cibles de la voie MRTF/SRF afin de savoir dans quels processus elles sont impliquées, ce qui permettrait potentiellement la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques. Par exemple, la caractérisation de trois cibles de la voie MRTF/SRF, l'intégrine $\alpha 5$, la plakophiline 2 et la protéine à domaine LIM FHL1 ont permis de comprendre comment la voie MRTF/SRF va réguler la migration de cellules non-invasives (Leitner et al., 2011). Cette étude a également permis de comprendre la régulation différentielle et en apparence opposée entre des cellules tumorales invasives dans lesquelles la voie MRTF/SRF favorise la migration, et des cellules non invasives dans lesquelles la voie MRTF/SRF inhibe ce processus à travers les protéines précédemment citées. La voie MRTF/SRF régule ainsi la migration des cellules dans une gamme d'expression précise. La surexpression de cette voie dans des cellules tumorales non adhérentes entraînerait une augmentation de l'adhésion propice à une augmentation du phénomène de migration, tandis que la voie MRTF/SRF serait un frein pour la migration dans des cellules déjà adhérentes telles que les cellules épithéliales ou fibroblastiques, l'activation des gènes cibles de la voie MRTF/SRF entraînant une adhésion trop importante des cellules, ce qui inhibe la migration de telles cellules (Leitner et al., 2011) (*Figure 43*).

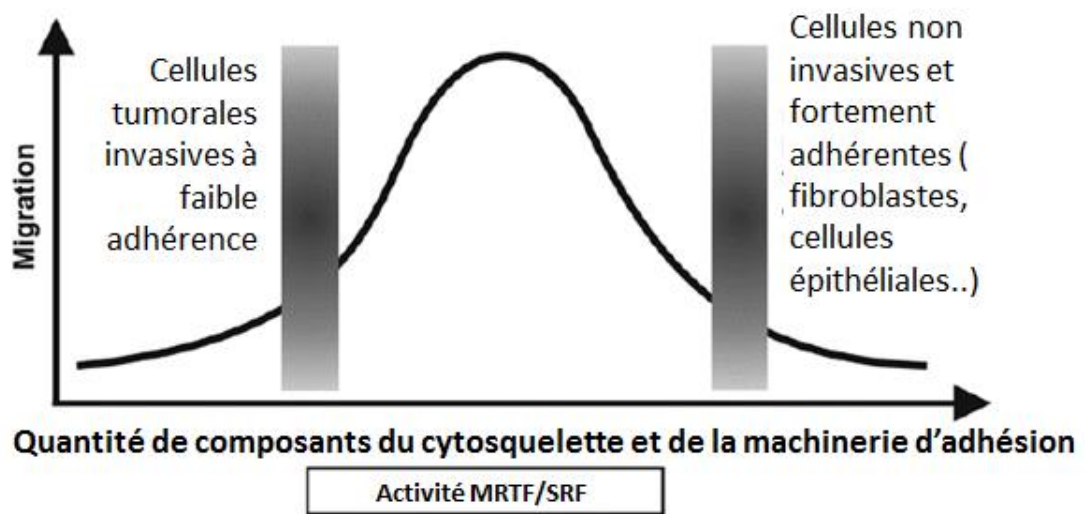


Figure 43: Régulation de la migration par la voie MRTF/SRF

La voie MRTF/SRF régule la migration cellulaire différemment selon le type cellulaire dans lequel elle est activée. Dans des cellules à faible capacité d'adhésion telles que les cellules tumorales, l'activation de la voie MRTF/SRF permet l'expression de protéines d'adhésion et de régulation du cytosquelette favorisant la migration, tandis que la voie MRTF/SRF constitue un frein à la migration dans des cellules non invasives et adhérentes telles que les fibroblastes ou les cellules épithéliales. (D'après Leitner et al., 2011)

La caractérisation des cibles de MRTF/SRF a donc un réel intérêt. Le travail réalisé au cours de ma thèse s'inscrit dans cette optique, à savoir la caractérisation d'une cible potentielle de la voie MRTF/SRF, la Rho GTPase atypique Rnd3. Différentes études de bioinformatique (Sun et al., 2006) et d'approche globale (Cooper et al., 2009) ont permis d'identifier la présence d'une boîte CARG permettant potentiellement la régulation de l'expression de Rnd3 par la voie MRTF/SRF. La protéine Rnd3 est une Rho GTPase atypique et les propriétés et fonctions biologiques de cette protéine font l'objet de la prochaine partie.

III- La Rho GTPase atypique Rnd3

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé aux relations entre la voie de signalisation MRTF/SRF et la Rho GTPase atypique Rnd3. La partie suivante a pour objectif de décrire plus en détail Rnd3, ses caractéristiques, sa régulation, ses fonctions ainsi que son implication en pathologie.

1- Caractéristiques de Rnd3

La protéine Rnd3, aussi appelée RhoE, Arhe ou Rho8, appartient aux GTPases de la superfamille Ras, à la famille Rho, et même plus précisément à la sous-famille des protéines Rnd. Ces protéines ont évolué relativement tardivement (Riou et al., 2010). Rnd3 a été identifiée pour la première fois en 1996 (Foster et al., 1996) grâce à sa capacité d'interaction avec p190 RhoGAP, une GAP de RhoA. L'expression de Rnd3 est ubiquitaire, tandis que Rnd1 est principalement exprimée dans le foie et le cerveau, et Rnd2 est retrouvée dans le cerveau et les testicules (Goh & Manser, 2012). Rnd3, tout comme les autres membres de la famille Rnd, Rnd1 et Rnd2, présente la caractéristique de ne pas posséder d'activité GTPasique. Les acides aminés responsables de l'activité d'hydrolyse du GTP sont modifiés dans cette famille de protéines. En effet, les acides aminés en position 17,64 et 66, responsables de cette activité, sont tous remplacés par des sérines dans Rnd3. De façon intéressante, la substitution de ces sérines par les acides aminés normalement présents dans les protéines Ras et Rho (Gly-17, Ala-64 et Gln-66) suffit à restaurer l'activité d'hydrolyse du GTP (Foster et al., 1996).

Rnd3, tout comme Rnd1 et Rnd2, n'est donc pas régulée par le cycle classique des Rho GTPases, et n'alterne pas entre un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP. De plus, les RhoGEFs et RhoGAPs, de même que les RhoGDIs, n'ont pas d'effet sur Rnd3 (Riou et al., 2010). Rnd3 est ainsi constamment sous forme active et liée au GTP (*Figure 44*). La régulation de Rnd3 est donc dépendante d'autres protéines, et de nombreuses publications renseignent sur une régulation de Rnd3 à différents niveaux, que ce soit au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel ou post-traductionnel.

Les Rho GTPases présentent des localisations variées au sein des cellules, et ces localisations sont majoritairement régulées par leur séquence C-terminale (Adamson et al., 1992) et les modifications post-traductionnelles qu'elles subissent. Rnd3 a été décrite comme

farnésylée et principalement associée aux membranes (Foster et al., 1996; Roberts et al., 2008), cependant Rnd3 est aussi retrouvée dans le complexe golgien (Riento & Ridley, 2003). Enfin, l'interaction de certaines protéines telle que la protéine 14-3-3 avec le groupe farnésyl de Rnd3 va assurer une localisation cytoplasmique à cette protéine (Riou et al., 2010).

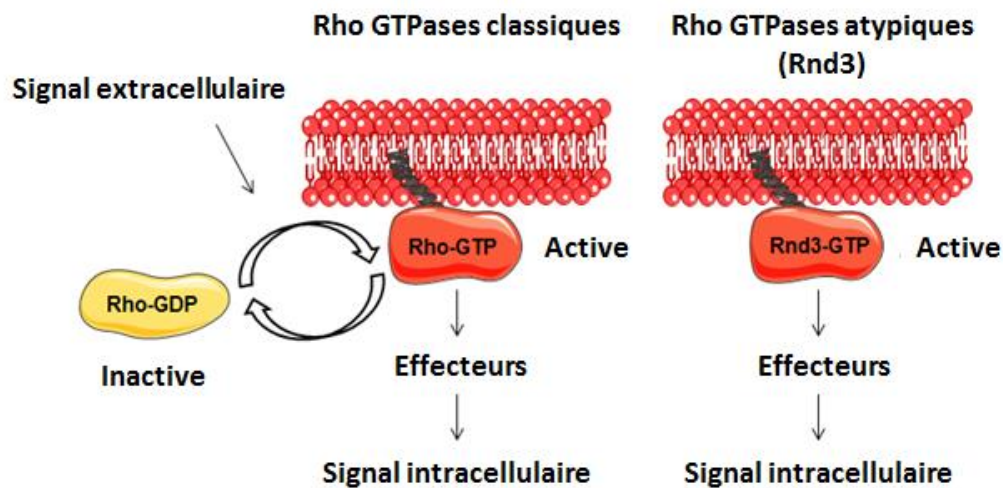


Figure 44: Comparaison du cycle des Rho GTPases classiques et de Rnd3

Contrairement aux Rho GTPases classiques telles que RhoA, Rac1 et Cdc42 qui alternent entre un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP, les Rho GTPases atypiques comme Rnd3 sont constitutivement actives et liées au GTP. La régulation de ces protéines passe donc par d'autres processus

2- Régulation de Rnd3

Rnd3 ne suit donc pas le cycle classique de régulation des Rho GTPases et sa régulation s'effectue ainsi à d'autres niveaux. Au cours de cette partie, nous allons voir quels sont les mécanismes transcriptionnels, post-transcriptionnels, de même que les interactions de Rnd3 avec d'autres protéines, qui permettent d'aboutir à une régulation du niveau d'expression et de la localisation de Rnd3.

A- Régulation transcriptionnelle

De nombreuses études permettent de démontrer la présence d'une régulation transcriptionnelle de Rnd3 (Riento et al., 2005; Riou et al., 2010). Rnd3 est exprimée 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 (Nobes et al., 1998). Ainsi, la régulation transcriptionnelle de Rnd3 va faire

intervenir de nombreux facteurs de transcription qui vont être très variables selon le type cellulaire (*Figure 45*).

Dans un même type cellulaire, différents facteurs peuvent réguler la transcription de Rnd3 de manière opposée. Ainsi, dans des cellules de cancer de la prostate, MIC-1, un membre de la famille des facteurs de croissance du TGF- β , diminue la transcription de Rnd3 (Liu et al., 2003). A l'inverse, le facteur de transcription NF κ B va quant à lui permettre l'augmentation du niveau d'ARNm de Rnd3 (Nadiminty et al., 2010) dans les cellules de cancer de la prostate.

Un même facteur de transcription est également capable d'avoir différents effets sur la transcription de Rnd3 selon le type cellulaire. C'est par exemple le cas d'une hormone, l'oestradiol, qui permet de stimuler l'expression de Rnd3 dans les cellules musculaires lisses de l'intestin (Shimomura et al., 2009), alors qu'elle diminue son expression dans les cellules de cancer de la prostate (Bektic et al., 2005). D'autres hormones sont capables de réguler Rnd3, telles que les hormones de type urocortine, impliquées dans la protection du myocarde, qui permettent de stimuler directement l'expression de Rnd3 (Barry et al., 2010).

La transcription de Rnd3 peut également être régulée en réponse à des stimuli externes. Le traitement aux ultraviolets, tout d'abord, permet d'augmenter la transcription de Rnd3 afin de permettre la survie cellulaire et de lutter contre l'apoptose induite par ce traitement. Cette stimulation de l'expression de Rnd3 passe par des mécanismes dépendants (Ongusaha et al., 2006), et indépendants de p53 (Boswell et al., 2007; Shurin et al., 2008). De même, L'hypoxie, par l'intermédiaire du facteur de transcription HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α), va stimuler l'expression de Rnd3 dans des cellules gastriques cancéreuses (Zhou et al., 2011). La compression mécanique de cellules musculaires entraîne une augmentation d'expression de Rnd3, qui aboutit à une inhibition de la formation des fibres de tension (de Araujo et al., 2014), ce qui permet de mettre en évidence que la régulation de Rnd3 est directement influencée par les forces appliquées sur les cellules et ainsi par la mécanotransduction.

De nombreux autres facteurs sont capables de réguler la transcription de Rnd3 (Jie et al., 2016). Ainsi, les modifications épigénétiques (Ji Chen et al., 2011), l'AMP cyclique (Collett et al., 2012), l'entérotoxine B staphylococcique (Ionin et al., 2008), l'éthanol (Guasch et al., 2007), le récepteur au PDGF de type PDGFR β (Ball et al., 2007), certaines drogues de type méthamphétamine et cocaïne (Marie-Claire et al., 2007), la proenzyme FVII (zymogène sérine-

protease Factor VII) (Camerer et al., 2000), le facteur Foxd3 (Katiyar & Aplin, 2011), Nanog (Zhou et al., 2013), la voie mTOR (Tyburczy et al., 2010), Notch1 (Zhu et al., 2014) et la protéine AES (amino-terminal enhancer of split) (Xia et al., 2013) régulent également la transcription de Rnd3.

Ainsi, de par son expression ubiquitaire, Rnd3 est régulée au niveau transcriptionnel par de nombreux facteurs dont une liste est représentée (**Figure 45**). De nouveaux facteurs de transcription capables de réguler Rnd3 sont régulièrement découverts. Cependant, il existe aussi une régulation de Rnd3 à d'autres niveaux tel qu'au niveau post-transcriptionnel. Cette régulation implique principalement des miARNs.

Facteur de transcription	Effet sur la transcription de Rnd3	Références
p53	Activateur	Zhu et al., 2014/ Ongusaha et al., 2006
MIC-1	Répresseur	Liu et al., 2003
NFκB	Activateur	Nadiminty et al., 2010
HIF-1α	Activateur	Zhou et al., 2011
FOXD3	Répresseur	Katiyar et al., 2011
Nanog	Répresseur	Zhou et al., 2013
Notch1	Activateur	Zhu et al., 2014
AES	Activateur	Xia et al., 2013
mTOR	Activateur	Tyburczy et al., 2010
Ascl1	Activateur	Pacary et al., 2011
c/EBPδ	Répresseur	Wiejak et al., 2013
CREB	Activateur	Lesiak et al., 2013
B-Raf	Activateur	Klein et al., 2008
Oestradiol	Répresseur/Activateur	Bektic et al., 2004/ Shimomura et al., 2009

Figure 45: Liste de facteurs régulant l'expression de Rnd3

Au niveau transcriptionnel, la régulation de Rnd3 fait intervenir de nombreux facteurs dont ceux présentés dans cette liste. Pour chaque facteur, l'impact sur Rnd3 est indiqué (D'après Jie et al., 2016)

B- Régulation post-transcriptionnelle

Les microARNs (miRs) sont de petits ARNs non codants d'environ 22 nucléotides. Ces miARNs vont cibler des ARNm au niveau d'une séquence complémentaire. Les extrémités non traduites des gènes (séquences NT) sont les zones les plus fréquemment ciblées par les miARNs. Rnd3 possède une longue séquence 3'NT de 1792 nucléotides contenant des sites de

fixation pour de nombreux miARNs, prédits par les outils de prédiction tels que miRWalk ou Targetscan.

Le traitement au TGF- β permet par exemple de diminuer l'expression de Rnd3 dans les fibroblastes par l'intermédiaire d'un miARN. En effet, ce traitement entraîne l'expression d'un miARN particulier, le miR-200b, qui va directement cibler la partie 3'NT de l'ARNm de Rnd3 et ainsi diminuer son expression (Tong et al., 2014). L'impact de cette diminution d'expression de Rnd3 est l'augmentation de la prolifération des fibroblastes traités par le TGF- β . La régulation de Rnd3 par le miR-200b a également été montrée dans les cellules HeLa (W. Xia et al., 2010) et les cellules dérivées de cancer colorectal (Fu et al., 2014). Le miR-200c, qui appartient à la même famille que le miR-200b, a également été identifié comme pouvant cibler Rnd3 (Hurteau et al., 2006). Dans les cancers colorectaux, le miR-17 inhibe également Rnd3, ce qui favorise la croissance tumorale (Luo, Zou, et al., 2012). Dans le carcinome hépatocellulaire, miR-128 va cibler et favoriser la dégradation de Rnd3 (X. Guo et al., 2014). Enfin, miR-503 va cibler et réguler Rnd3 dans les cellules A549/DDP, dérivés de cancer du poumon et résistantes à la cisplatine.

Ainsi, une telle régulation de Rnd3 par les miARNs semble être à l'origine de la sous-expression de Rnd3 observée dans de nombreux cancers.

C- Régulation de Rnd3 au niveau protéique

Un élément important qui a permis la compréhension de la régulation de Rnd3 est la découverte que Rnd3 peut être phosphorylé. La phosphorylation de Rnd3 va permettre la régulation de sa localisation et de sa stabilité (Riento et al., 2005). Rnd3 peut être phosphorylé par au moins deux protéines à activité sérine/thréonine kinase, ROCK1 et la PKC α . La phosphorylation de Rnd3 par ces protéines va entraîner le changement de localisation de Rnd3 de la membrane au cytoplasme, et améliorer sa stabilité en la protégeant de la dégradation protéosomale (Riento et al., 2003; Riento et al., 2006).

Une autre modification post-traductionnelle qui aboutit à la régulation de Rnd3 est son ubiquitination. En effet, il a été montré que la protéine Skp2 permet le recrutement de Rnd3 au sein du complexe d'ubiquitination SCF (contenant les protéines Skp1, Cullin et F-box protein), ce qui va provoquer l'ubiquitination de Rnd3 et va cibler cette protéine pour la voie de dégradation protéosomale au cours du cycle cellulaire (Lonjedo et al., 2013).

Afin d'assurer sa régulation au niveau protéique, Rnd3 est également capable d'interagir avec de nombreuses autres protéines. Parmi ces protéines, l'interaction de Rnd3 avec ses effecteurs P190RhoGAP et Syx permet sa stabilisation (Goh & Manser, 2012). Rnd3 interagit aussi avec les protéines 14-3-3, ce qui entraîne son extraction membrane et sa relocalisation dans le cytoplasme, et va inhiber son activité (Riou et al., 2013). La protéine Plexin-B2, un récepteur membranaire de surface à la sémaphorine, entre en compétition avec P190RhoGAP pour interagir avec Rnd3 et inhiber son activité (Azzarelli et al., 2014).

L'ensemble des mécanismes régulant l'expression, la localisation et l'activité de Rnd3 vont lui permettre de réguler précisément de nombreuses fonctions biologiques qui vont être présentées dans la prochaine partie.

3- Fonctions biologiques de Rnd3

Rnd3 régule un grand nombre de protéines. Cette régulation permet à Rnd3 d'être impliquée dans de nombreux processus biologiques qui font l'objet de cette partie (**Figure 46**).

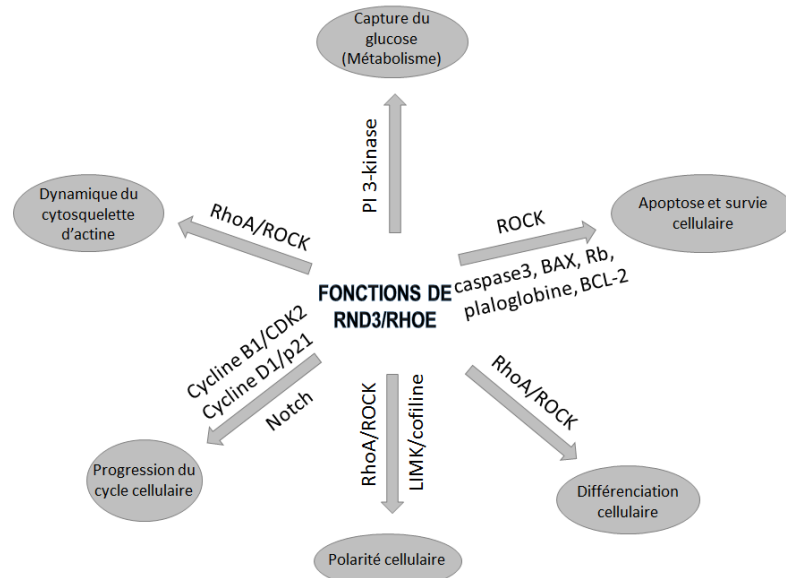


Figure 46: Fonctions biologiques de Rnd3

Rnd3, par sa régulation de nombreuses protéines, est impliquée dans la régulation de fonctions biologiques diverses et variées (D'après Paysan et al., 2016).

A- Régulation du cytosquelette d'actine

Rnd3 est un régulateur important de la dynamique de l'actine. En effet, Rnd3 est à l'origine d'un mécanisme d'inhibition des fibres de tension, identifié dans les cellules épithéliales MDCK (Madin-Darby canine kidney) et dans des macrophages (Bac1.2F5), dans lequel ROCK1 et Rnd3 interagissent, ce qui prévient la phosphorylation et l'activation des cibles de ROCK1 telle que la chaîne légère de myosine MLC-2 (Guasch et al., 1998). Ce mécanisme a rapidement été confirmé dans des fibroblastes (Nobes et al., 1998). Rnd3 n'est cependant pas capable d'interagir avec ROCK2. Rnd3 se comporte ainsi comme l'antagoniste principal de la voie RhoA/ROCK1 (Guasch et al., 1998)(**Figure 47**). En effet, en complément de son action sur ROCK1, Rnd3 est aussi capable d'interagir et d'activer p190RhoGAP, ce qui conduit à l'inhibition de la voie RhoA/ROCK1. Rnd3 est également capable de se fixer sur Styx et de l'inhiber, ce qui renforce l'inhibition de la voie RhoA/ROCK (Goh & Manser, 2010). La surexpression de Rnd3 entraîne la disparition des fibres de tension, et une morphologie arrondie des cellules, d'où provient le nom de la famille Rnd (round).

Il est important de noter que l'effet de Rnd3 sur le cytosquelette d'actine semble très dépendant du type cellulaire identifié, l'expression de Rnd3 dans les cellules endothéliales favorisant la formation de fibres de tension (Gottesbühren et al., 2013). De même, l'antagonisme entre Rnd3 et RhoA n'est pas universel, comme dans les neurones corticaux où Rnd3 stimule l'activité de RhoA (Azzarelli et al., 2014).

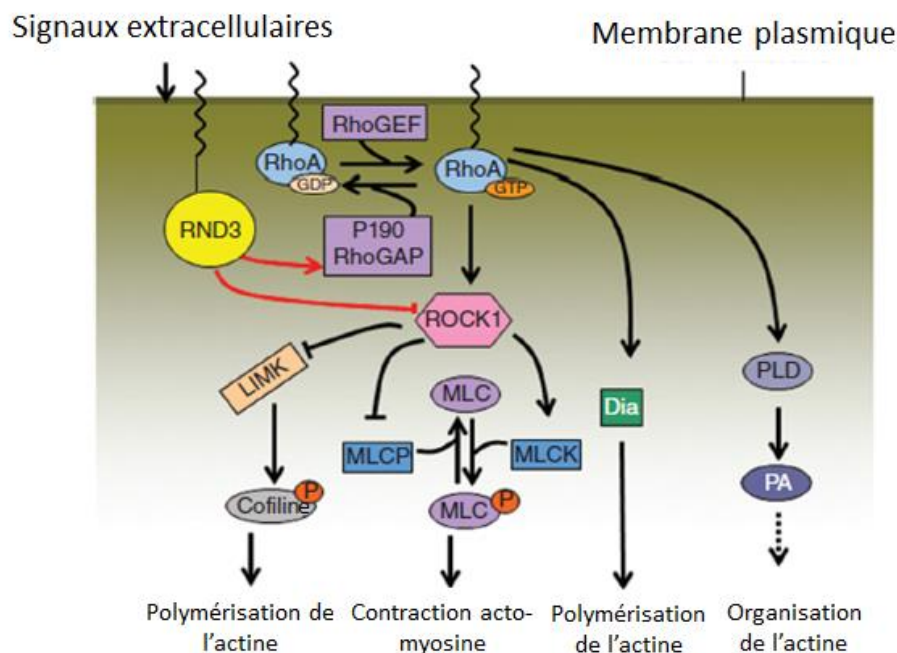


Figure 47: Rôle de Rnd3 sur le cytosquelette d'actine

Rnd3 joue un rôle sur le cytosquelette d'actine en étant l'antagoniste principal de la voie RhoA/ROCK1. Rnd3 peut se fixer sur ROCK1 et l'inhiber, ou bien activer p190RhoGAP ce qui va conduire à l'inhibiteur de RhoA. Par ces actions, l'expression de Rnd3 entraîne la perte des fibres de stress. (D'après Jie et al., 2016)

La régulation du cytosquelette d'actine par Rnd3 trouve son importance dans des processus variés tels que la relaxation musculaire (Cario-Toumaniantz et al., 2003), ou la fusion myoblastique (Fortier et al., 2008). Rnd3 est aussi primordial dans le processus de résorption osseuse, en régulant la formation des podosomes par son action sur la voie ROCK/cofiline (Georgess et al., 2014).

Dans les cellules cancéreuses, le rôle de Rnd3 sur le cytosquelette d'actine va influencer différents processus selon le type cellulaire d'origine. Dans les cellules Con8 (cellules tumorales épithéliales mammaires), Rnd3 va réguler la formation des jonctions cellulaires (Rubenstein et al., 2005). Dans les cellules de mélanome mutées pour B-RAF, Rnd3 constitue un régulateur clé de l'organisation de l'actine et des adhésions focales dépendante des oncogènes (Klein et al., 2008). Mais l'impact de Rnd3 sur le cytosquelette d'actine va

principalement concerner les phénomènes de migration et d'invasion. Une nouvelle fois, selon le type cellulaire, Rnd3 va favoriser la migration et l'invasion (Klein & Aplin, 2009) ou au contraire l'inhiber (Gadea et al., 2007; Grise et al., 2012). Le rôle de Rnd3 dans les cancers sera discuté plus en détail dans la partie correspondante.

B- Polarité cellulaire dans le développement du système nerveux

Les neurones et les cellules gliales sont les composants majoritaires du système nerveux central. Au cours du développement et lorsque les neurones s'assemblent afin de créer un réseau complexe permettant la propagation des signaux, la régulation spatiotemporelle de la polarité cellulaire est essentielle. Cette polarité nécessite la régulation des éléments du cytosquelette, et notamment du cytosquelette d'actine et des microtubules (Witte & Bradke, 2008). Rnd3 est impliqué dans différents processus au cours du développement du système nerveux. Des études *in vivo* ont montré l'importance de Rnd3 pour la migration des neurones corticaux. Une perte de Rnd3 entraîne une accumulation d'actine filamenteuse dans les neurones et un défaut de migration des neurones bipolaires (Li & Anton, 2011). La perturbation de l'expression de Rnd3 entraîne également des défauts de distribution des neurones corticaux, et un mauvais couplage des processus de neurogenèse et de migration neuronale au cours du développement (Pacary et al., 2011). La formation des synapses dans l'hippocampe requiert une expression correcte de Rnd3. En effet, des neurones de l'hippocampe privés de Rnd3 vont présenter une réduction de la longueur totale et du nombre de neurites, une réduction dans la taille des axones ainsi qu'un retard de polarisation, probablement dû à une régulation anormale de la voie RhoA/ROCK/LIMK/cofiline (Lesiak et al., 2013; Peris et al., 2012). Dans les cellules gliales, Rnd3 va réguler l'organisation du fuseau mitotique et des jonctions adhérentes en inhibant la polymérisation excessive d'actine (Pacary et al., 2013). Ainsi le rôle de Rnd3 au cours du développement neuronal passe par des processus dépendants de l'actine, mais aussi indépendants, en jouant plutôt sur l'expression des cyclines (Pacary et al., 2013). Une meilleure compréhension du rôle de Rnd3 dans le développement neuronal permettrait d'aboutir à une meilleure compréhension des pathologies neuronales.

C- Apoptose et survie cellulaire

En réponse à un stress génotoxique, la protéine p53 joue un rôle central dans la régulation de la survie cellulaire et de l'apoptose. Il a été montré que Rnd3 est une cible de p53 qui va favoriser la survie cellulaire en inhibant l'apoptose médiée par ROCK1 (Ongusaha et al., 2006; Y. Zhu et al., 2014). En réponse à de nombreux agents provoquant des dommages à l'ADN, l'expression de Rnd3 est induite, ce qui provoque le désassemblage des fibres de tension d'actine. La délétion de Rnd3 prévient non seulement ce désassemblage, mais favorise également l'apoptose (Ongusaha et al., 2006). Cependant il est important de noter que l'inhibition de l'activité de ROCK ne protège pas de l'apoptose dans tous les types cellulaires, ce qui induit l'implication de différents facteurs dans la régulation de ce processus d'apoptose (Croft & Olson, 2011). Une étude a montré que l'augmentation de caspase-3 entraîne le clivage de ROCK1 (160kDa) en une forme plus courte de 130 kDa dans le cœur. La surexpression de cette forme clivée de ROCK1 provoque l'apoptose des cardiomyocytes et contribue à l'apparition d'arrêts cardiaques (Chang et al., 2006). Dans des modèles de souris, il a été montré que la délétion de Rnd3 aboutit à une hyperactivation de ROCK1, qui entraîne l'apoptose des cardiomyocytes et l'arrêt cardiaque chez ces souris (Yue et al., 2014). La génération de modèle souris haploinsuffisante pour Rnd3 (Rnd3^{+/-}) a permis de montrer que ROCK1 n'était pas la seule voie impliquée dans l'induction de l'apoptose dans les souris délétées pour Rnd3. Il a de plus été proposé que dans des kératinocytes irradiés par des rayons UVB, la surexpression de Rnd3 inhibe l'apoptose indépendamment du statut de p53 et de ROCK1, suggérant d'autant plus des mécanismes indépendants de ces deux voies de signalisation (Boswell et al., 2007). D'autres éléments ont renforcé cette idée de régulation de l'apoptose par Rnd3 d'une manière cellule et microenvironnement dépendante. Dans de nombreuses cellules cancéreuses telles que les cellules de glioblastome U87, les cellules de cancer du côlon T84 et les cellules de mélanomes A375, l'expression forcée de Rnd3 induit l'apoptose probablement à travers l'inactivation de la protéine rétinoblastome (Rb) (Poch et al., 2007). Cette même expression forcée de Rnd3 dans des cellules de cancer de la prostate DU-145 où Rnd3 n'est pas exprimée aboutit également au phénomène d'apoptose en induisant la caspase 3 (Bektic et al., 2005). Un mécanisme alternatif suggéré est que l'expression de Rnd3 induit un phénotype arrondi des cellules, qui se détachent ainsi de la matrice, ce qui va provoquer l'apoptose induite par le phénomène d'anoikis (Chiarugi & Giannoni, 2008). Dans des cellules ESCC (esophageal squamous cell carcinoma), Rnd3 stimule l'apoptose en induisant la protéine pro-apoptotique Bax tout en inhibant la protéine anti-

apoptotique Bcl-2 (Zhao et al., 2012). A l'inverse Rnd3 est également capable d'inhiber l'apoptose en inhibant l'expression de Bax dans des cellules de cancer gastrique (Li et al., 2009). Dans ces cellules, l'activation de la voie PTEN/PI3K/p-Akt aurait également un rôle dans l'induction de l'apoptose. Enfin, il a été suggéré que Rnd3 pouvait également régulé l'apoptose à travers son rôle sur la plakoglobine (Ryan et al., 2012). Ainsi, selon le type cellulaire et le stimulus, Rnd3 favoriserait ou inhiberait le processus d'apoptose et la survie cellulaire. Cependant, les mécanismes à l'origine de ces effets sont encore peu connus (*Figure 48*).

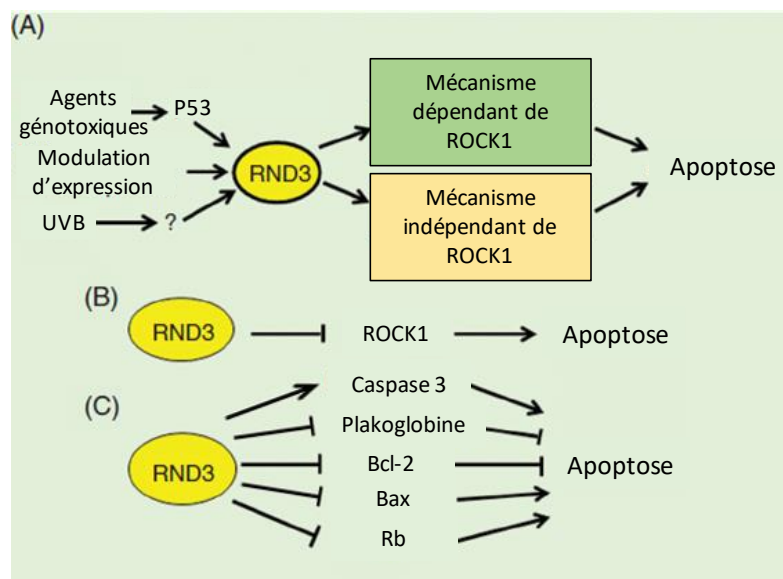


Figure 48: Régulation de l'apoptose par Rnd3

(A) Rnd3 régule l'apoptose selon des mécanismes dépendants et indépendants de ROCK1. (B) En inhibant ROCK1, Rnd3 va inhiber l'apoptose et favoriser la survie cellulaire. (C) Rnd3, à travers d'autres mécanismes, est également capable de réguler l'apoptose. Selon le type cellulaire et le stimulus, Rnd3 peut favoriser ou inhiber l'apoptose. (D'après Jie et al., 2016)

D- Régulation du cycle cellulaire

La progression à travers le cycle cellulaire représente une série d'évènements permettant à une cellule de se diviser et ainsi de se dupliquer. Les protéines primordiales dans la régulation du cycle cellulaire sont les cyclines et les protéines kinases dépendantes des cycline (CDKs) (Nigg, 1995). La famille des cyclines est impliquée dans la régulation de la majorité des évènements survenant au cours du cycle cellulaire. Cette famille est capable de se lier à quatre CDKs différentes : CDK2, CDK4, CDK5 et CDK6.

Une première étude a montré que l'expression de Rnd3 dans des fibroblastes 3T3 aboutit à l'accumulation de cellules en phase G1. De plus, des cellules quiescentes surexprimant Rnd3 ne parviennent pas à progresser à travers la phase G1/S en réponse à une stimulation par du

sérum, censé faire repartir ces cellules dans le cycle cellulaire. L'arrêt du cycle cellulaire induit par Rnd3 est dû à une inhibition de l'expression des protéines cycline D1 et p21 selon un mécanisme indépendant de l'action de Rnd3 sur la voie RhoA/ROCK (Villalonga et al., 2004)(*Figure 49*). La diminution d'expression de la cycline D1 provoque son incapacité à phosphoryler la protéine du rétinoblastome et ainsi inhibe l'activation des facteurs de transcription E2F qui sont nécessaires à l'entrée en phase S (Poch et al., 2007). La régulation de l'expression de la cycline D1 par Rnd3 n'a pas lieu au niveau transcriptionnel, mais est au contraire effectuée au niveau traductionnel, Rnd3 inhibant la phosphorylation du facteur 4E-BP1. Ce facteur interagit avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4E, et l'inhibe tant qu'il n'est pas phosphorylé. Ainsi, l'inhibition de la phosphorylation de 4E-BP1 par Rnd3 diminue la traduction de la cycline D1 (Riou et al., 2010; Villalonga et al., 2009). De façon intéressante, la surexpression de la cycline D1 ne suffit pas à restaurer un cycle cellulaire normal dans des cellules où Rnd3 surexprimé provoque un arrêt du cycle cellulaire (Villalonga et al., 2004). La régulation de Rnd3 est finement régulée au cours du cycle cellulaire, et c'est la dégradation de Rnd3 par la voie du protéasome, médiée par la protéine Skp2 et l'ubiquitination de Rnd3 à la transition G1/S, qui va permettre la progression du cycle cellulaire dans les cellules Hela et dans les cellules dérivées de glioblastome U87 (Lonjedo et al., 2013).

Dans les cellules dérivées de cancer de la prostate DU-145, la surexpression de Rnd3 inhibe l'expression de Cdc2 et de la cycline B1, ce qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Bektic et al., 2005). Durant la différenciation des kératinocytes, qui coïncide avec une sortie du cycle cellulaire, Rnd3 est transitoirement surexprimée. De plus, l'inhibition de Rnd3 provoque une hyperprolifération des kératinocytes (Liebig et al., 2009). Enfin, Rnd3 peut inhiber la transformation induite par l'oncogène Ras, et cela pourrait passer par une inhibition du cycle cellulaire (Villalonga et al., 2004). Tous ces éléments tendent à prouver que Rnd3 affecte le cycle cellulaire à différents niveaux et en impliquant une grande variété de protéines. De plus, l'effet de Rnd3 sur le cycle cellulaire et la prolifération varie grandement selon le type cellulaire (Riou et al., 2010).

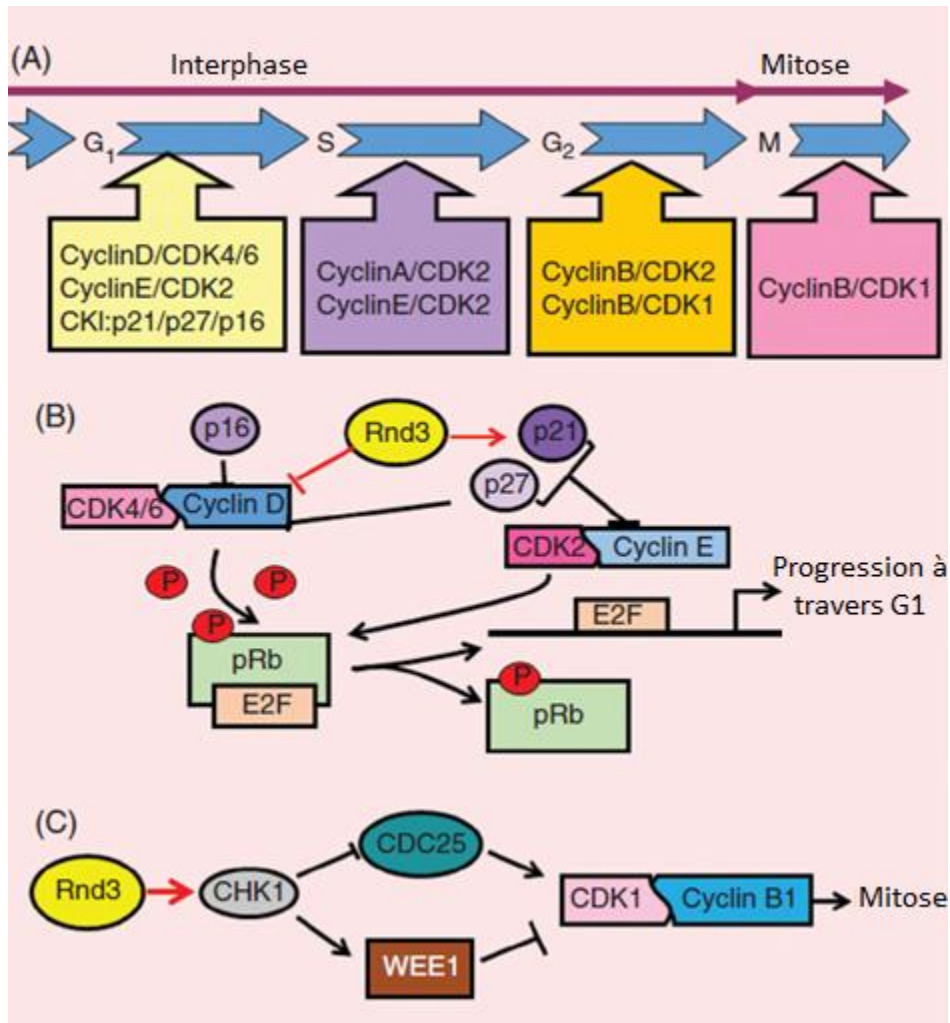


Figure 49: Régulation du cycle cellulaire par Rnd3

(A) La transition entre les différentes phases du cycle cellulaire est régulée par les cyclines et les protéines kinases dépendantes des cyclines (CDKs). (B) Rnd3 est capable d'arrêter le cycle cellulaire en phase G₁ en inhibant l'expression de la cycline D1 et de p21. (C) En atténuant l'expression de la cycline B1 et de CDK1, Rnd3 peut arrêter le cycle cellulaire en phase G₂/M (D'après Jie et al., 2016)

E- Différenciation cellulaire

Au cours de la différenciation cellulaire, une variation d'expression de Rnd3 a été observée dans de nombreux modèles. Par exemple, le niveau d'ARNm de Rnd3 est 9,4 fois plus important dans le tissu mammaire très différencié (Lob3) de femmes ayant déjà accouché, en comparaison de tissu mammaire non différencié (Lob1) de femmes n'ayant jamais accouché, suggérant que l'expression de Rnd3 varie au cours de la différenciation lobulaire mammaire (Guo et al., 2003). La formation de myotubes multinucléés nécessite la différenciation et la fusion de cellules myoblastiques squelettiques. La surexpression de Rnd3 avec l'inhibition de l'activité de la voie RhoA/ROCK qui s'en suit est fondamentale pour permettre la fusion myoblastique et ainsi participe au processus de différenciation musculaire (Fortier et al.,

2008). L'expression de Rnd3 et l'inhibition de l'activité de RhoA est également un prérequis pour la différenciation myogénique de myoblastes C2C12 de souris (Mei et al., 2011). Dans un modèle de fusion cytotrophoblastique, le traitement des cellules BeWo (cellules de choriocarcinome) par un analogue de l'AMP cyclique provoque la surexpression de Rnd3 qui coïncide avec l'apparition de cette fusion cytotrophoblastique. L'extinction de Rnd3 diminue ce phénomène, ce qui suggère de nouveau un rôle de Rnd3 dans ce processus de différenciation (Collett et al., 2012). Rnd3 a également été impliquée dans la différenciation des kératinocytes, son expression étant transitoirement augmentée durant ce processus, et la délétion de Rnd3 dans ces mêmes cellules entraînant une hyperprolifération et un retard de différenciation (Liebig et al., 2009). De même, les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques (LSEC) mises en culture subissent un processus de dédifférenciation, et cela est associé à une diminution du niveau de Rnd3 entraînant une augmentation des fibres de tension, en comparaison de la situation dans des LSECs fraîchement isolées (Géraud et al., 2010). A l'inverse, l'expression de Rnd3 est diminuée au cours de la différenciation des cellules épithéliales intestinales de rat (María Vieites et al., 2008). Les mécanismes de différenciation cellulaire impliquant Rnd3 ne sont pas réellement définis, et le fait que Rnd3 soit parfois sous-exprimée et parfois surexprimée au cours de la différenciation rend son étude compliquée. Cela requiert une régulation spatio-temporelle de Rnd3 très précise et nécessite de faire appel à des technologies émergentes telles que le système CRISPR/Cas9 ou certains modèles de cellules souches.

F- Implication dans le métabolisme glucidique

Très peu de données sont disponibles concernant l'implication de Rnd3 dans le métabolisme glucidique. Cependant un article suggère que l'absorption du glucose dépendrait de Rnd3 et de sa régulation de la PI 3-kinase (PI3K) (Chun et al., 2008). Ainsi cela laisse penser que Rnd3 joue également un rôle dans le métabolisme glucidique.

4- Implication de Rnd3 en pathologie

A- Rnd3 et développement

Afin d'étudier l'impact de Rnd3 dans le développement, des modèles animaux ont été générés. Le premier modèle à avoir été généré est un modèle de knock-out constitutif de Rnd3 dans les cellules souches embryonnaires, selon la technique de « gene trapping » (Lexicon

Pharmaceuticals). Pour cela, un vecteur rétroviral contenant 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, a été utilisé. L'insertion de ce vecteur au niveau de l'intron 2 du gène *RND3* va provoquer un arrêt de transcription de l'ARNm après le signal poly(A) et va ainsi générer une protéine Rnd3 tronquée ne possédant que les deux premiers exons. Les souris Rnd3 KO homozygotes pour Rnd3 présente un retard de croissance et une très forte létalité post-natale, et les souris ne survivent pas au-delà de trente jours (Mocholí et al., 2011). Le développement du système nerveux de ces souris est anormal, et les nombreuses altérations neuromusculaires observées entraînent des déficits moteurs et neurocomportementaux, expliqués notamment par un nombre de neurones moteurs et de neurites plus faibles ainsi que par un retard de polarisation neuronale et une réduction de la croissance axonale (Mocholí et al., 2011; Peris et al., 2012). Les effets observés dans ce modèle de KO de Rnd3 seraient dus à la voie de signalisation RhoA/ROCK/LIMK/Cofiline, l'utilisation d'un inhibiteur de ROCK permettant de corriger certains caractères du phénotype tels que le nombre et la longueur des neurites (Peris et al., 2012). D'un point de vue global, les organes ne présentent pas d'anomalie particulière, mis à part une diminution de taille et de poids directement proportionnelle au retard de croissance des animaux. Deux autres études ont utilisé ce modèle animal afin de mettre en évidence l'importance de Rnd3 dans le développement du bulbe olfactif ainsi que dans le développement et la fonction des gonades mâles (Ballester-Lurbe et al., 2015; Gómez et al., 2014).

Un deuxième modèle murin a également été généré selon la même technique de « gene trapping »(Lin et al., 2013). Dans ce modèle, le vecteur rétroviral inséré dans l'intron 2 du gène *RND3* contient notamment une cassette d'expression lacZ et une séquence IRES, ce qui va également permettre d'aboutir à la génération d'une protéine tronquée. Les souris générées à l'aide de ce modèle présentent une hydrocéphalie obstructive ainsi qu'une sténose de l'aqueduc du mésencéphale. Ce phénotype est expliqué par l'activation de la voie Notch dans ces souris, la délétion de Rnd3 entraînant l'accumulation de la protéine NICD (notch intracellular domain), celle-ci ne pouvant plus interagir avec Rnd3 et étant ainsi protégée de la dégradation protéosomale.

B- Désordres cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de décès à travers le monde (“WHO | The top 10 causes of death,” 2016). Cela implique donc la nécessité de trouver des solutions thérapeutiques à ces maladies. Certaines études font état d’une relation entre Rnd3 et des troubles cardiovasculaires. Une analyse de microarray a par exemple montré que la surexpression de Rnd3 était impliquée dans la protection du cœur lors de l’ischémie/reperfusion du myocarde chez le rat (Barry et al., 2010). Une autre analyse de microarray a révélé la sous-expression de Rnd3 dans des patients souffrant d’insuffisance cardiaque. Ces premières études ont ainsi suggéré une association entre Rnd3 et les désordres cardiovasculaires, cependant elles ne permettaient pas de fournir une explication mécanistique à cette relation. Récemment, la relation directe entre la perte de Rnd3 et un trouble cardiovasculaire a été établi à l’aide d’un modèle animal. Rnd3 étant sous-exprimé dans les patients souffrant d’insuffisance cardiaque, l’impact de Rnd3 dans les cardiomyopathies a été évalué à l’aide du deuxième modèle de KO de Rnd3 décrit dans la partie précédente. Les souris Rnd3 KO hétérozygotes vont présenter une hyperactivation de ROCK1 qui va prédisposer ces souris aux stress hémodynamiques (surcharge de pression sanguine), et qui va les faire développer des insuffisances cardiaques caractérisés par une forte apoptose (Yue et al., 2014). Cependant l’application d’un inhibiteur de ROCK1, le fasudil, ou le knock-out de ROCK1 chez des souris haploinsuffisante pour Rnd3 (Rnd3 +/- ROCK1 -/-) ne permet de restaurer que partiellement le phénotype observé chez les souris sauvages, ce qui laisse penser que la perte de Rnd3 entraîne l’activation d’autres voies en parallèle de ROCK1 afin d’entraîner l’apparition d’insuffisance cardiaque (Yue et al., 2014).

En parallèle de son rôle dans la survenue de désordres cardiovasculaires chez la souris adulte, la perte de Rnd3 peut aussi être reliée à des désordres cardiovasculaires au stade embryonnaire. En effet, les souris KO pour Rnd3 présentent une létalité importante au stade embryonnaire E11.5. Il a été montré que les cœurs des souris KO présentent des arythmies fœtales. D’un point de vue mécanistique, la perte de Rnd3 provoque une diminution de l’ubiquitination du récepteur β 2-adrénergique (β 2AR) et par conséquent une accumulation de ce récepteur. Cette accumulation entraîne l’activation de la voie de signalisation de la protéine kinase A (PKA), qui résulte en une dysfonction du récepteur à la ryanodine (RyR2) impliqué dans la libération calcique, et aboutit en des arythmies fœtales (Yang et al., 2015)(*Figure 50*).

Ainsi, tous ces éléments témoignent de l'importance de Rnd3 dans la protection du myocarde, aussi bien au stade adulte qu'au stade embryonnaire.

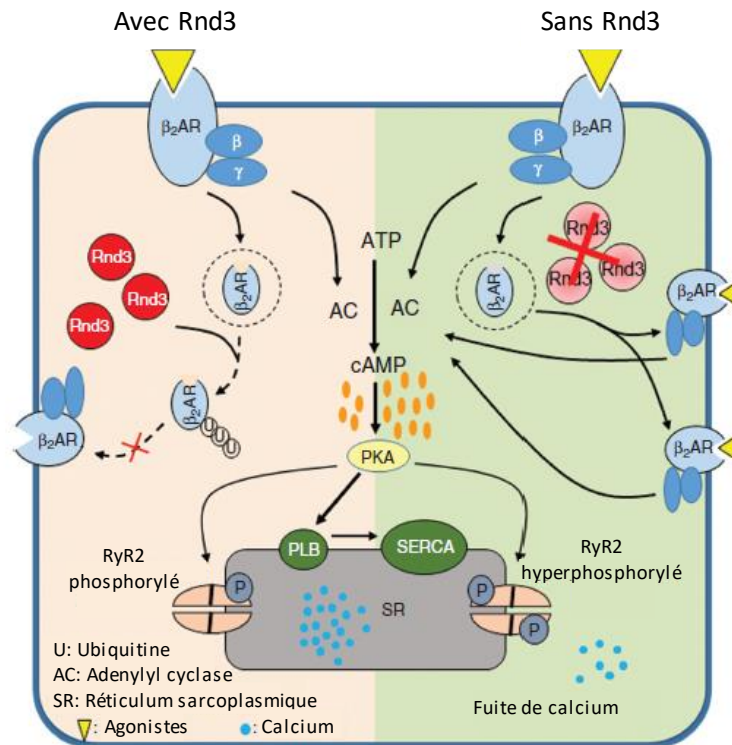


Figure 50: Modèle expliquant la cause des arythmies fœtales

En présence de Rnd3, le récepteur β_2AR est ubiquitiné et dégradé pour ne pas être activé en permanence. Cela permet à la PKA d'être modérément active et d'assurer des échanges calciques fonctionnels. En absence de Rnd3, le récepteur β_2AR s'accumule, ce qui entraîne une hyperactivation de la PKA, un dysfonctionnement du récepteur RyR2 et ainsi des fuites calciques à l'origine des arythmies fœtales. (D'après Jie et al., 2016)

C- Cancers

De par son important rôle de régulation du cytosquelette d'actine et des phénomènes de migration, d'invasion, de croissance et d'apoptose, Rnd3 joue un rôle important dans les tumeurs. Cependant, selon le cancer et le type cellulaire étudié, le niveau d'expression de Rnd3 va varier (**Figure 51**). Ainsi, Rnd3 est considéré soit comme un suppresseur de tumeur, soit comme un oncogène. L'implication de Rnd3 dans le développement du cancer, et les divergences observées au sein des différents cancers font l'objet d'une publication réalisée au cours de ma thèse. Il s'agit d'une revue qui établit pour chaque cancer les données connues, et les méthodes d'obtention de ces données afin de faire un point sur l'état de l'art concernant

Rnd3 dans le cancer. Ainsi, la revue insérée en annexe permet de discuter du rôle de Rnd3 dans le cancer, qui ne sera donc pas discuté ici.

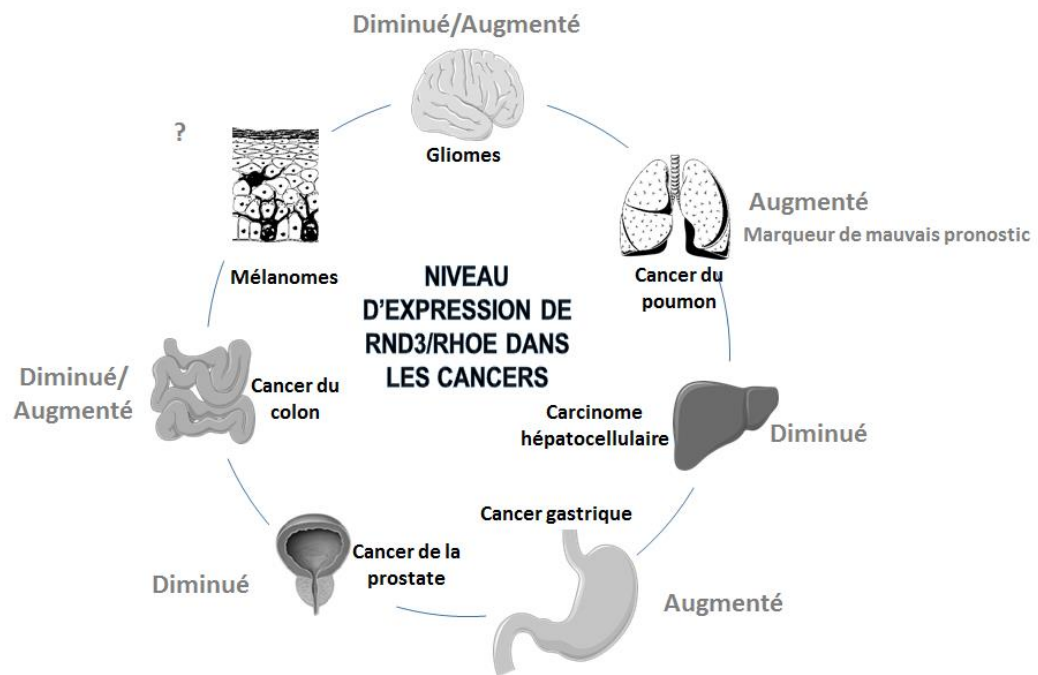


Figure 51: Niveau d'expression de Rnd3 dans les cancers

En fonction de l'organe d'origine, Rnd3 est parfois retrouvée surexprimée, parfois sous exprimée dans le cancer associé. (D'après Paysan et al., 2016)

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressé à la relation entre la voie de signalisation MRTF/SRF et la protéine Rnd3, dans un contexte de cellules tumorales. J'ai principalement travaillé avec des cellules issues de carcinome hépatocellulaire, la prochaine partie s'intéresse donc au carcinome hépatocellulaire et à ses caractéristiques.

IV- Le carcinome hépatocellulaire

1- Epidémiologie

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la plus importante tumeur primaire du foie (Yang & Roberts, 2010). Il s'agit du sixième type de cancer le plus fréquent dans le monde, et représente la deuxième cause de mortalité liée au cancer (Chhaniwal et al., 2015). Le carcinome hépatocellulaire a un taux d'apparition de deux à quatre fois plus élevé chez l'homme que chez la femme. Le nombre de nouveaux cas à apparaître chaque année est estimé à un demi-million, dont 85% dans des pays en développement (Globocan, 2012). L'âge moyen de diagnostic est de 65 ans, bien que celui-ci soit de plus en plus précoce de par la plus grande fréquence des procédures diagnostiques, notamment dans les pays en développement. Durant les vingt dernières années, le nombre de nouveaux cas de CHC a triplé aux Etats-Unis et il est estimé à 33190 nouveaux cas en 2014 (Waghray, 2015). L'incidence du carcinome hépatocellulaire continue de grimper, tandis que la survie moyenne à 5 ans reste faible. Cet important taux de morbidité est lié à un diagnostic tardif, à de fort taux de récurrence post-opératoire, à l'apparition de métastases ainsi qu'à l'absence de traitement thérapeutique efficace.

2- Facteurs de risque

La présence d'une cirrhose hépatique préexistante représente le principal facteur de risque pour le développement de CHC, 80 à 90% des individus atteints de CHC présentant une cirrhose (Toshiya Chiba et al., 1996). L'incidence annuelle de CHC chez les patients atteints de cirrhose est importante, avec un taux allant de 1 à 6%. Bien qu'il existe d'importantes variations dans l'étiologie du CHC à travers le monde, l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) ou de l'hépatite C (VHC) représente la majorité des cas de CHC à travers le monde (El-Serag et al., 2007). La plus importante incidence de CHC liée à la présence de VHB est en Asie de l'Est et en Afrique subsaharienne, où plus de la moitié des cas de carcinome hépatocellulaire sont liés à ce virus. A l'inverse, en Amérique du Nord, en Europe et au Japon, la principale cause de CHC a pendant longtemps été l'infection par le virus de l'hépatite C. En effet, dans ces régions, l'incidence annuelle du CHC est de 1 à 4% des individus ayant une cirrhose induite par le VHC (Bruix et al., 2011). Cependant, au cours des dernières années, de nouveaux traitements antiviraux ont été mis en place, et semble faire preuve d'une grande

efficacité dans l'élimination du VHC et de ses complications (Wirth & Manns, 2016). Ainsi, dans l'avenir, le nombre de CHC liés au VHC tendra à diminuer.

L'alcool représente également un facteur de risque pour l'apparition du CHC, tout comme l'obésité et le diabète (Wang et al., 2012; Welzel et al., 2013). Ces trois facteurs représentent des risques indépendants d'apparition du CHC, mais en synergie avec l'infection par le VHB ou le VHC, le risque d'apparition du CHC est augmenté, il est ainsi cent fois plus important chez des patients obèses et infectés par un virus. De plus, le nombre de composantes du syndrome métabolique corrèle directement avec l'augmentation du risque d'apparition du CHC (Turati et al., 2013). A l'inverse du VHC, le syndrome métabolique et ses complications (stéatose hépatique non alcoolique NAFLD et stéato-hépatite non alcoolique NASH) est un syndrome émergent et la proportion de CHC liés à ce syndrome est en augmentation (Starley et al., 2010; Turati et al., 2013).

Il existe également d'autres facteurs de risques moins connus, telle que l'aflatoxine B1 qui contamine les aliments dans les pays en développement, le déficit en alpha 1-antitrypsine, l'hémochromatose héréditaire, l'hépatite auto-immune, la cirrhose biliaire primaire, ainsi que la maladie de Wilson, une maladie génétique liée à une accumulation de cuivre dans l'organisme et qui se manifeste par des atteintes du système nerveux et du foie.

3- Survenue et progression du carcinome hépatocellulaire

D'un point de vue physiopathologique, il faut distinguer deux situations : la présence ou l'absence d'une cirrhose hépatique préexistente. En cas d'absence de cirrhose, le mécanisme carcinogénique le mieux décrit est celui du virus de l'hépatite B (Bréchet et al., 2000). C'est l'intégration du génome viral dans celui de l'hépatocyte et l'expression de la protéine HBx qui vont être à l'origine des altérations génétiques conduisant au cancer. Un autre mécanisme carcinogénique bien connu est celui de la mutation de la protéine p53 induite par l'aflatoxine, un flavonoïde de l'arachide responsable d'un grand nombre de CHC sur foie sain en Afrique et en Asie (Okuda, 2002).

En présence d'une cirrhose, l'apparition du CHC semble provenir de nombreuses altérations chromosomiques induites par les nombreux cycles de nécrose/régénération hépatique survenant au cours de la cirrhose. La cirrhose est caractérisée par la formation de nodules hépatiques anormaux entourés d'une matrice de collagène. Ces nodules vont ensuite former des nodules hyperplasiques puis des nodules dysplasiques, qui finiront par donner un carcinome hépatocellulaire. Certaines défaillances des mécanismes de réparation de l'ADN semblent également être impliquées. Au cours de la cirrhose, on observe un raccourcissement des télomères. La réactivation de la télomérase a été associée avec la carcinogenèse hépatique. L'instabilité génomique et la perte ou mutation de p53 sont également des caractéristiques de l'hépatocarcinogenèse (Farazi & DePinho, 2006) (Figure 52). Il est admis que la perte ou la mutation de p53 interviennent durant la progression vers le CHC, cependant de nombreuses évidences suggèrent que la modification de p53 pourrait également intervenir dans les stades initiaux de la carcinogenèse hépatique.

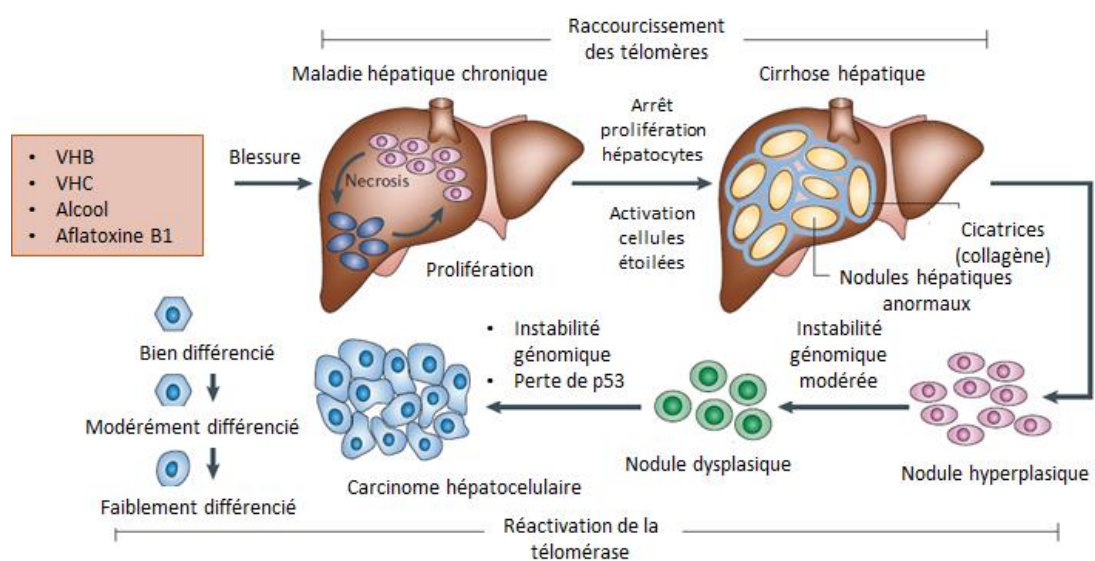


Figure 52: Survenue et progression du CHC

Suite à l'exposition à des facteurs de risque, le foie va développer des maladies hépatiques chroniques qui vont évoluer vers la cirrhose hépatique. La formation de nodules hépatiques anormaux et les nombreux cycles de nécrose/prolifération vont entraîner une instabilité chromosomique, à l'origine du carcinome hépatocellulaire. La réactivation de la télomérase est une autre caractéristique du carcinome hépatocellulaire. (D'après Farazi & DePinho, 2006)

4- Diagnostic et suivi des patients

L'examen principal de dépistage du carcinome hépatocellulaire chez les patients cirrhotiques est l'échographie. Cet examen peu onéreux, possède une sensibilité de 71% pour

les tumeurs de 1 cm de diamètre. Cependant seulement 50% des nodules de 1 cm détectés dans un foie cirrhotique sont réellement des CHC (Caturelli et al., 2002). Pour des nodules supérieurs à 3cm, la spécificité augmente à 95% (Okano et al., 2001). La fréquence de suivi recommandée est de 6 mois et ne doit pas excéder cette période, le temps de doublement tumoral étant estimé entre 4 et 12 mois.

Le dosage de l'alpha-foeto-protéine (AFP) sérique n'est pas utilisé comme moyen de dépistage à cause de ses mauvaises spécificités et sensibilités, et d'une valeur prédictive positive très faible (Sherman et al., 2001). Dans 80% des CHC de petite taille, la valeur de l'AFP est normale. Son intérêt se situe surtout dans le suivi thérapeutique de patients traités lorsque la valeur de départ est importante.

Le diagnostic histologique du CHC repose sur la ponction-biopsie. Dans le cas d'un foie supposé non cirrhotique, la réalisation d'une ponction-biopsie est indispensable au diagnostic du CHC. En présence d'une cirrhose, une ponction du foie est souvent réalisée. Cependant, lorsque des critères radiologiques et biologiques sont rencontrés, la ponction n'est pas indispensable et même parfois contre indiquée lorsque un traitement chirurgical curatif est envisagé, en raison de la présence d'un risque d'essaiage au cours de la ponction (Durand et al., 2001).

Il existe également un diagnostic non invasif qui repose principalement sur des examens radiobiologiques. La tomodensitométrie spiralée (TDM) avec injection de produit de contraste est l'examen de diagnostic le plus répandu. Dans certains pays tel que la Belgique, l'imagerie par résonance magnétique (IRM), légèrement plus sensible, est plus disponible et elle est donc préférée. L'échographie Doppler est une autre technique qui peut être utilisée pour le diagnostic non invasif des patients (Borbath, 2010). Ces différentes techniques permettent de détecter une hypervascularisation au niveau de la tumeur, le CHC étant dans la majeure partie des cas une tumeur hypervascularisée.

5- Traitements proposés

Au niveau du traitement des patients atteints de CHC, la transplantation, la résection chirurgicale et les traitements percutanés représentent les seuls traitements curatifs disponibles à l'heure actuelle. La transplantation hépatique est considérée comme le

traitement de choix du CHC développé sur foie cirrhotique, car elle permet la résection complète de la tumeur et du foie cirrhotique sous-jacent, qui est pré-néoplasique. Les critères « de Milan » établis en 1996 (tumeur unique inférieure à 5cm, ou présence de trois tumeurs chacune inférieure à 3cm de diamètre) permettent une survie à 5 ans de 70% (Mazzaferro et al., 1996). La transplantation n'est cependant accessible qu'à 10-15% des patients du fait de contre-indications telles qu'un âge supérieur à 65 ans, ou de la présence de co-morbidités associées. De plus, du fait de la pénurie de greffons, les délais d'attente sont relativement élevés.

La résection chirurgicale constitue le traitement de référence pour les CHC développés sur foie non cirrhotique. En cas de cirrhose, l'efficacité de la résection chirurgicale est limitée par deux facteurs. Tout d'abord, le risque de survenue d'une insuffisance hépatocellulaire parfois fatale en cas de résection étendue ou d'une fonction hépatique de départ défailante. D'autre part, la présence de récurrences systématiques liées aux métastases intra-hépatiques ou au développement de nouveaux CHC. La récurrence tumorale, fréquente, est la cause principale de décès des patients (Imamura et al., 2003). Des facteurs permettant de prédire la survenue de récurrence ont été identifiés. Ils sont liés aux caractéristiques de la tumeur (taille supérieure à 5 cm, caractère infiltrant, présence de nodules satellites, envahissement micro-vasculaire, taux élevé d'AFP, absence de capsule tumorale, degré de différenciation, hépatopathie sous-jacente).

Pour les raisons énoncées précédemment, telles que la présence d'une cirrhose avancée, de co-morbidité ou la pénurie de greffons, seule une minorité de patients ont accès à la transplantation ou à la résection. Pour les autres, certains traitements de destruction tumorale par voie percutanée sont développés. L'injection d'alcool absolu en intra-tumorale est utilisée et permet une survie de l'ordre de 50% à 5 ans pour des tumeurs inférieures à 3 cm (Borbath, 2010; Yamamoto et al., 2001). Cependant son efficacité diminue fortement si la taille de la tumeur augmente (Livraghi et al., 1995). Les contre-indications sont essentiellement l'accessibilité à la tumeur et la présence d'ascite. La présence de récurrence est égale à celle observée en chirurgie. Une autre technique de traitement curatif percutané est la radiofréquence, qui consiste en une destruction par la chaleur de la tumeur obtenue par l'introduction d'une aiguille électrode et qui permet de générer une zone nécrotique d'environ 5 cm. Ce traitement ne nécessite qu'une ou deux séances. Ce traitement possède quelques

contre-indications supplémentaires telles que la proximité des voies biliaires ou des organes digestifs. Cependant, cette technique présente un taux de récives plus faible (Livraghi et al., 2000).

La découverte tardive de CHC ne permet pas l'accès à un quelconque traitement curatif et entraîne la mise en place de traitements essentiellement palliatifs. Dans ce cas, il peut s'agir de chimio-embolisation artérielle permettant de ralentir l'évolution du CHC, en profitant de l'hypervascularisation de ces tumeurs rendant le traitement plus efficace.

En terme de chimiothérapie, le sorafénib, une petite molécule qui cible plusieurs protéines à activité tyrosine-kinase, et qui possède des capacités anti-angiogéniques et anti-prolifératives, est devenu le standard thérapeutique chez les malades avec CHC avancé. Le sorafénib permet une survie sans progression de l'ordre de 46 semaines comparée à 34 semaines sans traitement (Bruix et al., 2012). Malgré sa faible efficacité, le sorafénib est le seul traitement ciblé de référence pour le CHC. A l'inverse, aucun traitement hormonal, que ce soit le tamoxifène, l'octréotide ou les anti-androgènes, n'a un effet positif sur la survie sans progression (Borbath, 2010).

6- Voies de signalisation impliquées

Au cours du développement et de la progression du carcinome hépatocellulaire, un grand nombre d'altérations génétiques et épigénétiques vont avoir lieu, ce qui va entraîner la perturbation de nombreuses voies de signalisation et va contribuer à la mise en place de nombreux types de carcinome hépatocellulaire. Ces différentes altérations font l'objet de cette partie.

A- Altérations génomiques

La comparaison à grande échelle d'échantillons de CHCs et d'échantillons non tumoraux a permis de mettre en évidence la présence d'une instabilité chromosomique et des séquences microsatellites dans le CHC

Les bras chromosomiques les plus fréquemment délétés dans le CHC sont les bras 1p, 4q, 6q, 8p, 9p 13q, 16p, 16q et 17p. A l'inverse, les gains chromosomiques ont généralement lieu sur les bras 1q, 6p, 8q et 17q (Thorgerirsson & Grisham, 2002). Ces gains et pertes ne sont pas proportionnels à la taille de la tumeur, d'autant plus que chaque CHC présente de multiples réarrangements chromosomiques qui s'accumulent au cours des proliférations successives (Wilkens et al., 2002). La sensibilité des méthodes d'analyse du génome permet d'utiliser ces altérations génomiques afin de savoir si la tumeur observée est une récurrence ou s'il s'agit d'une nouvelle tumeur primaire. En outre, l'analyse de ces réarrangements chromosomiques a permis de mettre en évidence dans le CHC la perte ou la mutation de gènes suppresseurs de tumeur tel que le gène *TP53* (p53), le gène *RB1* (codant la protéine du rétinoblastome Rb), le gène *CDKN2A* (p16ink4a) et le gène du récepteur IGF-2R (insulin-like growth factor-2 receptor) (De Souza et al., 1995; Edamoto et al., 2003; Liew et al., 1999). A l'inverse, des mutations gain de fonction ont également été observées, notamment dans le gène de la β -caténine (*CTNNB1*) (Laurent-Puig & Zucman-Rossi, 2006) (Figure 53).

Principaux oncogènes activés par mutation dans le CHC (hors lignées cellulaires)			Principaux gènes suppresseurs de tumeurs inactivés par mutation dans le CHC (hors lignées cellulaires)		
Oncogène	Protéine	CHC muté (%)	Suppresseur de tumeurs	Protéine	CHC muté (%)
CTNNB1	β -caténine	5-50%	TP53	p53	10-61%
HRAS	Proto-oncogène Ras	<3-5%	CDKN2A	Inhibiteur de CDK 2A (p16INK4)	10-60%
KRAS			AXIN1	Axine 1	5-25%
NRAS			AXIN2	Axine 2	3-10%
IL6ST	Gp130 (glycoprotéine)	<3%	HNF1A	Facteur nucléaire hépatocytaire 1a	<3%
PIK3CA	Phosphoinositide-3-kinase	<3%	RB1	Rétinoblastome 1	<11%
MET	Proto-oncogène MET (récepteur au facteur de croissance hépatique)	<1-5%	SMAD2-4	Membres de la famille SMAD 2 et 4	<10%
CSF-1R	Récepteur au CSF (colony stimulating factor 1 receptor)	2 mutations	PTEN	Homologue de la phosphatase et de la tensine	<5-10%
			IGF2R	Récepteur au facteur de croissance Insulin-like	0-13%
			STK11	Protéine kinase sérine/thréonine 11	1 mutation

Figure 53: Mutations retrouvées dans le carcinome hépatocellulaire

De nombreux gènes suppresseurs de tumeurs et oncogènes sont retrouvés mutés dans le CHC. Parmi ces gènes, TP53 est le suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté et inactivé, tandis que le gène de la β -caténine CTNNB1 est l'oncogène subissant le plus souvent une mutation activatrice. (D'après Zucman-Rossi, 2010)

B- TP53

Le gène *TP53* code pour la protéine p53 qui joue un rôle primordial dans la réponse aux dommages à l'ADN, en régulant le cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN ainsi que la sénescence. Il n'est donc pas surprenant de retrouver ce gène suppresseur muté dans un grand nombre de CHC. En effet, le gène TP53 est le gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment retrouvé muté dans le CHC (Jessica Zucman-Rossi, 2010). L'aflatoxine B1 est un mutagène important de TP53 et cause la mutation R249S (une arginine est remplacée par une sérine). La mutation de TP53 par l'aflatoxine est accélérée par la présence du virus de l'hépatite B (Kirk et al., 2005). Chez les patients exposés à l'aflatoxine, la protéine p53 est retrouvée mutée dans 50% des cas, alors que ce taux n'est que de 20 % dans les régions où l'aflatoxine est absente. De fortes corrélations ont été établies entre la présence de la mutation R249S et le risque développement de carcinome hépatocellulaire, mais également de survenue de récurrence après résection chirurgicale (Sheen et al., 2003 ; Woo et al., 2011).

C- Voie de signalisation Wnt/ β -caténine

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine est majoritairement connue pour son rôle fondamental au cours du développement pendant l'embryogenèse, où elle va permettre les processus de différenciation, prolifération, et d'apoptose. Au sein des cellules, la β -caténine va exercer un double rôle. Elle possède en effet un rôle structural au niveau des jonctions adhérentes, en s'associant à la E-cadhérine et en assurant la liaison avec l'actine par l'intermédiaire de l' α -caténine. Mais la β -caténine exerce également un rôle transcriptionnel dans le noyau. La régulation des fonctions de la β -caténine fait intervenir le ligand Wnt. En absence de ce ligand, la β -caténine non engagée dans les jonctions cellulaires forme un complexe multiprotéique composé des protéines adaptatrices APC (adénomatoses polyposis coli) et Axin1, de deux sérines/thréonines kinases GSK3 β (glycogène synthase kinase) et CK1 α (caseine kinase), ainsi que de la protéine PP2A. La protéine CK1 α va initier la phosphorylation de la β -caténine, ce qui va ensuite permettre une cascade de phosphorylation par la protéine GSK3 β . La β -caténine ainsi phosphorylée va devenir un substrat d'une ubiquitine ligase appelée β -TRCP (transducing repeat containing protein), va être ubiquitinée et dégradée par le protéasome. Ainsi, en absence de ligand Wnt, la β -caténine ne peut pas exercer son activité

transcriptionnelle et seule la fonction structurale au niveau des jonctions est assurée. En présence de ligand Wnt, les récepteurs Frizzled et leurs corécepteurs LRP5/6 vont être activés, ce qui va permettre le recrutement cytoplasmique de la protéine DVL (Dishevelled). Cette protéine ainsi activée va entraîner la phosphorylation des corécepteurs LRP5/6 par la GSK3 β ainsi que par une caséine kinase membranaire (CK1 γ). Cette phosphorylation va créer un site d'affinité pour l'axine 1, qui va ainsi être séquestrée au niveau des récepteurs, et va par conséquent libérer la β -caténine de son complexe de dégradation. La β -caténine libre va alors pouvoir transloquer dans le noyau où elle pourra se lier aux facteurs de transcription LEF (lymphoïd enhancer factor) et TCF (T-cell factor) et ainsi activer la transcription de gènes cibles tels que myc, la cycline D1 et COX2 (Clevers et al., 2006; Kikuchi, 2000)(**Figure 54**).

Le gène de la β -caténine *CTNNB1* est l'oncogène le plus fréquemment muté dans le carcinome hépatocellulaire. Il peut en effet être retrouvé muté dans 20 à 50% des CHC (Jessica Zucman-Rossi, 2010). La mutation de ce gène aboutit à une activation constitutive de la voie Wnt/ β -caténine, indépendamment de la présence ou non du ligand Wnt. Les mutations de la β -caténine vont cibler principalement les sites de phosphorylation de la β -caténine par GSK3 β et empêcher cette phosphorylation, empêchant ainsi la dégradation protéosomale de la β -caténine. En complément des mutations directes du gène *CTNNB1*, d'autres mutations ont été

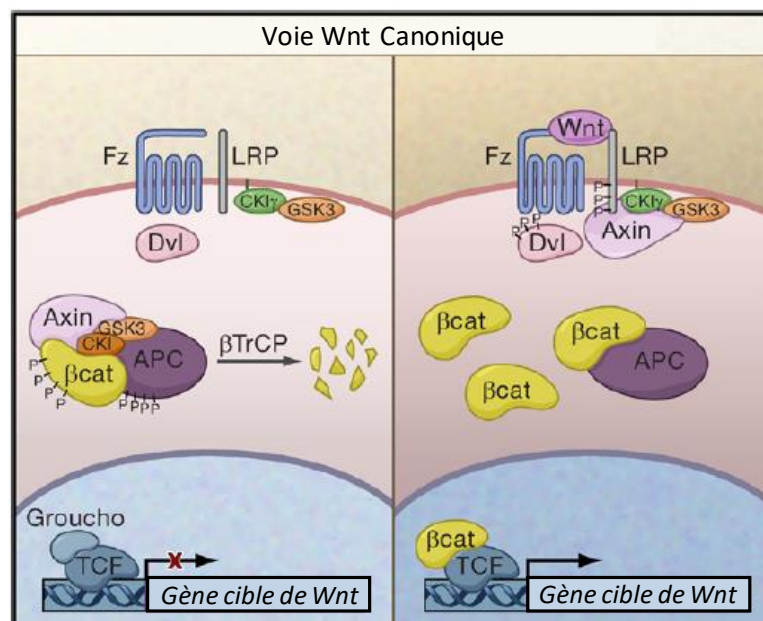


Figure 54: Régulation de la voie Wnt/ β -caténine

En absence du ligand Wnt, la β -caténine est séquestrée dans le cytoplasme par un complexe qui entraîne sa phosphorylation et sa dégradation par le protéasome. En présence du ligand Wnt, la β -caténine va être libérée de ce complexe et va pouvoir aller dans le noyau pour activer les gènes cibles de la voie. (D'après Clevers et al., 2006)

décrites pour les protéines du complexe associé à la β -caténine telle que l'axine, ce qui entraîne également une activation de la voie par un défaut de dégradation de la β -caténine (Cavard et al., 2008; Zucman-Rossi et al., 2007). Un modèle animal a été établi chez la souris dans lequel le gène APC est inactivé spécifiquement dans le foie. Ce modèle entraîne le développement de CHC, confirmant le rôle de la voie Wnt/ β -caténine dans le carcinome hépatocellulaire (Colnot et al., 2004). Il semblerait que l'activation constitutive de cette voie dans le carcinome hépatocellulaire permette de maintenir un état « souche » des cellules du CHC, caractérisé par la prolifération et l'immortalité cellulaire, et qui pourrait ainsi être représentatif des cellules souches cancéreuses (Chiba et al., 2006).

D- Mutations dans le promoteur de TERT et autres voies de signalisation impliquées

Des études récentes ont identifié des mutations dans le gène *TERT* (telomerase reverse transcriptase) comme étant un événement précoce du développement du CHC (Nault et al., 2014; Schulze et al., 2015). Les mutations dans le promoteur de *TERT* sont retrouvées dans 60 % des CHCs et sont associées à une augmentation d'expression de la télomérase (Zucman-Rossi et al., 2015). Une cause de la mutation du promoteur de *TERT* et l'insertion du virus AAV2, également capable de s'intégrer dans le promoteur d'autres gènes et contribuant au développement du CHC (Nault et al., 2015). Ainsi, d'après ces résultats récents, la mutation du promoteur de *TERT* est maintenant considérée comme un nouveau marqueur prédictif de la transformation de lésions précancéreuses en CHC.

En dehors des mutations dans le promoteur de *TERT*, du gène *TP53* (le suppresseur de tumeur le plus muté dans le CHC) et du gène *CTNNB1* (l'oncogène le plus activé dans le CHC), d'autres voies de signalisation ont été impliquées dans le CHC, même si c'est le cas dans une moindre mesure.

Le TGF- β est une cytokine impliquée dans de nombreuses fonctions telle que la différenciation cellulaire, la croissance, la migration, l'apoptose, l'adhésion, la survie ainsi que l'immunité (Derynck et al., 2001). Il a été montré que le récepteur IGF-2R est un suppresseur de tumeur qui, une fois activé par l'IGF-2, permet l'activation de la voie du TGF- β , ce qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire. Des mutations inactivatrices de IGF-2R aboutissant à

l'inactivation de la voie du TGF- β et donc à une prolifération cellulaire ont été observées dans les phases précoces du CHC (Breuhahn et al., 2004 ; Kumar et al., 2011). De plus, des analyses immunohistochimiques ont montré une réduction du TGF- β corrélée à une augmentation du marqueur souche IL-6 (interleukin 6) dans des échantillons de CHC. Ces données indiquent un lien étroit entre l'interleukine 6 qui est un marqueur important des cellules souches, et la disruption de la voie de signalisation du TGF- β dans le CHC (Tang et al., 2008).

Myc est un oncogène très important dont l'expression est augmentée dans de nombreux types de cancer. Bien que 30 % des CHC montrent une augmentation de l'expression de myc due à l'activation de la voie Wnt/ β -caténine (Chan et al., 2004), son augmentation d'expression est aussi attribuée à l'activation de sa transcription en raison du phénomène d'amplification chromosomique de son locus (Wilkins et al., 2004). Myc contribuerait au développement du CHC en induisant l'expression de la télomérase. Ce phénomène permettrait de s'affranchir du phénomène de sénescence (Wu et al., 1999).

La voie PI3K/PTEN/Akt est également impliquée dans le CHC. L'activation de Akt est médiée par l'activation de récepteurs à activité tyrosine kinase, ou plus rarement par l'activation constitutive de la PI3-kinase ou la perte de PTEN (phosphatase and tensin homolog). PTEN est un gène suppresseur de tumeur et la protéine PTEN se comporte comme un inhibiteur de Akt. La perte de PTEN associée à l'activation de Akt est retrouvée dans de nombreux cas de CHC, bien que la proportion de mutations varie de façon importante selon l'origine du patient. Les patients asiatiques sont ceux chez qui le taux de mutation est le plus élevé, avec une mutation retrouvée dans 40 à 60 % des CHC. Dans le reste du monde, le taux de mutation est beaucoup plus faible (Hu et al., 2003; Zucman-Rossi, 2010). Akt est impliquée dans des processus divers tels que la survie cellulaire, la croissance cellulaire, l'apoptose et la différenciation cellulaire. La dérégulation de cette protéine a été impliquée dans de nombreux types de cancer. Dans le carcinome hépatocellulaire, le rôle de Akt n'est pas clairement confirmé, mais son activation corrèle avec les CHC les plus agressifs (Nakanishi et al., 2005). De façon intéressante, dans les cellules souches intestinales, l'activation de Akt est associée à l'activation de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine, suggérant ainsi une interaction entre ces deux voies de signalisation pour favoriser la carcinogénèse (He et al., 2007).

Ainsi, de nombreuses voies sont dérégulées dans le CHC. L'analyse de grandes quantités de CHC ont permis d'établir une classification des CHC en fonction des voies de signalisation dérégulées et des gènes retrouvés mutés.

7- Classification des CHC

Il y a une dizaine d'années, la caractérisation des nombreux prélèvements de CHC par les techniques d'analyse d'expression à haut débit (microarrays) a permis l'établissement de différents groupes de tumeurs définis par la dérégulation spécifique de certains gènes ou voies de signalisation et a ainsi permis d'établir une classification transcriptomique des CHC. L'analyse transcriptomique globale de 120 tumeurs de CHC (dont le prélèvement a été effectué en France) associée à une caractérisation des altérations génétiques et à des paramètres cliniques a permis d'établir une liste de six différents sous-groupes de CHC, appelés groupes G1 à G6 (Boyault et al., 2007)(*Figure 55*). Le principal paramètre à l'origine de cette classification est le statut chromosomique, c'est-à-dire la présence ou non d'une instabilité ou au contraire d'une stabilité chromosomique. Les tumeurs des groupes G1 à G3 présentent une instabilité chromosomique tandis que celles des groupes G4 à G6 présentent des chromosomes stables. Ensuite, l'analyse des altérations génétiques et des voies de signalisation dérégulées permet d'affiner cette classification. Les tumeurs du groupe G1 sont principalement caractérisées par une surexpression de gènes exprimés dans le foie fœtal et contrôlés par l'empreinte parentale. La voie Akt est également activée dans ces tumeurs. Les CHC liés au virus de l'hépatite B, et contenant des mutations du gène *TP53* et *PIK3CA* (codant la PI3-kinase) sont classés dans le groupe G2. Les tumeurs du groupe G3 sont mutées pour *TP53* mais ne présentent pas d'infection par le virus de l'hépatite B. Ces tumeurs présentent une surexpression des gènes contrôlant le cycle cellulaire. Les tumeurs du groupe G4 représentent un groupe de tumeurs hétérogènes, comprenant les carcinomes mutés pour TCF1 (aussi appelé HNF1), un facteur de transcription impliqué dans l'expression de nombreux gènes spécifiques du foie. Les tumeurs des groupes G5 et G6 correspondent aux tumeurs présentant des mutations pour la β -caténine et sont ainsi caractérisées par une activation de la voie Wnt/ β -caténine. Le groupe G6 est composé des tumeurs présentant des nodules satellites, une activation plus importante de la voie Wnt/ β -caténine et également une sous-expression de la E-cadhérine. A noter que les tumeurs présentant des mutations sur le gène de l'*Axin1* se classent dans les groupes G1 et G2.

La classification ainsi établie a permis pour la première fois d'envisager le développement de stratégies thérapeutiques ciblées. En effet, la voie Akt est, par exemple, spécifiquement activée dans les groupes G1 et G2, tandis que les mutations de la β -caténine sont restreintes aux groupes G5 et G6 (Figure 55). Une signature de 16 gènes a de plus été établie afin de permettre une classification efficace à l'intérieur de ces six différents groupes (Boyault et al., 2007).

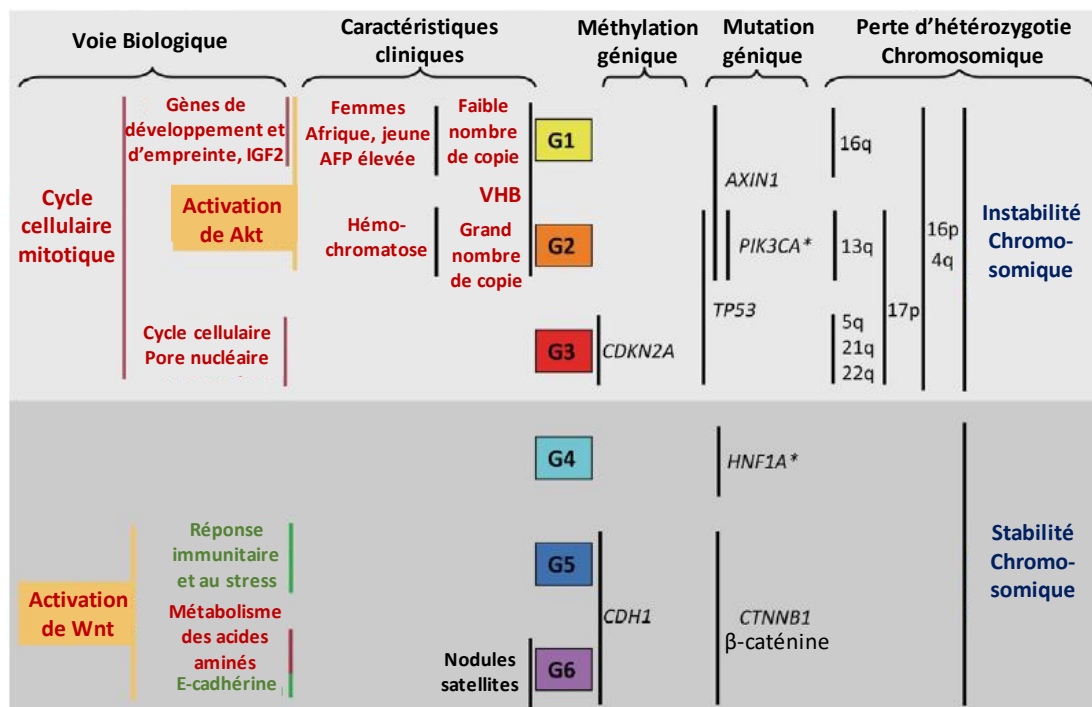


Figure 55: Classification des groupes de carcinome hépatocellulaire

L'analyse de données transcriptomiques conjuguée à l'analyse des altérations génomiques et des paramètres cliniques a permis l'établissement de six sous-groupes de carcinome hépatocellulaire. (Jessica Zucman-Rossi, 2010)

Depuis cette classification réalisée en 2007, d'autres analyses transcriptomiques ont été réalisées et ont permis de mettre en évidence une grande variété de CHC reflétée par un grand nombre de sous-groupes possédant une signature moléculaire spécifique. Malgré des différences au niveau des facteurs de risques présents, de l'origine géographique ou du grade de la tumeur, certaines signatures moléculaires et sous-groupes ont pu être identifiés de façon récurrente. En 2009, une « méta-analyse biostatistique » a été réalisée dans l'optique de rassembler les résultats de 9 transcriptomes et d'établir une classification globale et mondiale du CHC. De ce travail est ressortie une classification en trois grands groupes, S1, S2 et S3. Le groupe S1 est caractérisé par une activation de la voie Wnt/ β -caténine et indique une influence du TGF- β dans l'activation de la voie Wnt, le groupe S2 représente une activation de

myc, de Akt et de la prolifération cellulaire et enfin le groupe S3 associé à un maintien de la différenciation des hépatocytes regroupe les tumeurs mutées sur le gène de la β -caténine (Hoshida et al., 2009). Cette analyse groupée globale représente le premier pas dans l'établissement d'une classification consensuelle mondiale.

Ces dernières années, de nouvelles études de séquençage global ont permis de renforcer les données obtenues et d'affiner certains modèles, en reliant par exemple des altérations spécifiques à une étiologie particulière ou en découvrant de nouvelles altérations, notamment la présence de mutations dans le promoteur de *TERT* (Nault et al., 2014; Schulze et al., 2015) ou dans les régulateurs de la chromatine (Fujimoto et al., 2012).

L'établissement d'une classification universelle des CHCs doit permettre la mise en place efficace de stratégies de thérapie ciblée. En effet, cette classification doit permettre de prédire l'effet des nouveaux composés à visée thérapeutique sur les différents groupes de CHC, de par la connaissance approfondie des voies de signalisation et des altérations génomiques impliquées dans chaque groupe de CHC.

V- Objectifs

La protéine Rnd3 est un membre atypique de la famille Rho, dépourvue d'activité GTPasique et maintenue en permanence sous forme active et liée au GTP. La fonction principale de Rnd3 est la régulation du cytosquelette d'actine, notamment à travers son action antagoniste sur la voie RhoA/ROCK. La régulation de Rnd3 ne passe pas par le cycle classique des Rho GTPases mais par d'autres mécanismes transcriptionnels, post-transcriptionnels ou encore traductionnels.

L'expression de cette protéine a été décrite comme dérégulée dans de nombreux cancers. Dans le carcinome hépatocellulaire (CHC), Rnd3 est significativement sous-exprimée, et cette sous-expression procure un avantage invasif aux hépatocytes. Ce projet de thèse avait pour objectif de déterminer plus précisément les mécanismes à la base de la régulation de Rnd3 dans les cellules tumorales, et notamment les cellules dérivées de carcinome hépatocellulaire. Dans cette optique, ce projet de thèse s'est articulé autour de deux axes.

La β -caténine est retrouvée mutée dans plus d'un tiers des CHC, et la présence de mutations activatrices de la β -caténine corrèle avec un faible niveau d'expression de Rnd3. La première partie de ce projet de thèse était donc centrée sur l'étude la régulation de Rnd3 par la β -caténine. L'objectif de cette partie était notamment d'étudier indépendamment la régulation de Rnd3 par la forme sauvage et mutée de la β -caténine. Un modèle original, établi au laboratoire, a été utilisé afin de déterminer si les mécanismes et facteurs impliqués dans la régulation de Rnd3 par chacune des formes de la β -caténine étaient de même nature.

La deuxième et principale partie de ce projet de thèse a consisté en l'étude de la régulation de Rnd3 par la voie de mécanotransduction MRTF/SRF. Cette voie de signalisation est régulée par l'organisation du cytosquelette d'actine, et dirige en retour l'expression de nombreux gènes impliqués dans la régulation de la dynamique de l'actine. Rnd3 est impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine et des processus associées. De plus, un site potentiel de fixation de SRF a été suggéré dans le promoteur de Rnd3. L'objectif de ces travaux était donc de déterminer si Rnd3 est une nouvelle cible de la voie MRTF/SRF et, le cas échéant, quel était l'impact fonctionnel d'une telle régulation.

Chapitre II- Résultats

Partie I : Régulation de Rnd3 par la β -caténine dans le carcinome hépatocellulaire

I- Introduction et résultats préliminaires

La β -caténine assure un double rôle au sein des cellules. Elle possède un rôle structural en médiant l'adhésion inter-cellulaire au niveau des jonctions adhérentes, et elle possède également un rôle transcriptionnel en tant que membre de la voie de signalisation Wnt. L'activation anormale de la voie Wnt/ β -caténine a souvent été décrite dans de nombreux cancers. Dans le carcinome hépatocellulaire, des mutations activatrices de la β -caténine sont observées dans 18 à 41 % des tumeurs (Cavard et al., 2008).

1- Lien entre Rnd3 et β -caténine dans le CHC humain

Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire suggère que Rnd3 serait une nouvelle cible de la β -caténine dans le carcinome hépatocellulaire. Pour rappel, une étude du laboratoire a montré que Rnd3 était sous-exprimée dans le carcinome hépatocellulaire et que cette sous-expression procurait un avantage invasif aux hépatocytes (Grise et al., 2012). De plus, la sous-expression de Rnd3 a été associée à un mauvais pronostic dans le carcinome hépatocellulaire (Luo et al., 2012; Ma et al., 2013). Une analyse transcriptomique a permis de montrer que le niveau de Rnd3 était significativement plus faible dans les tumeurs mutées

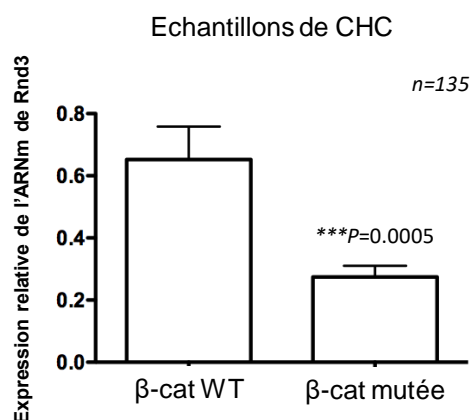


Figure 56: Corrélation entre la présence de mutation de la β -caténine et le niveau d'ARNm de Rnd3 dans le CHC

Le niveau d'ARNm de Rnd3 est significativement plus faible dans les tumeurs mutées pour la β -caténine, en comparaison des tumeurs non mutées. (Collaboration avec le Dr. J. Zucman-Rossi ; n=135 ; *** P < 0,0005

pour la β -caténine en comparaison des tumeurs non mutées (collaboration avec le Dr. J. Zucman-Rossi, INSERM U1162, Paris)(*Figure 56*). De plus, l'extinction de la β -caténine dans des cellules de CHC aboutit à l'augmentation du niveau d'ARNm de Rnd3 ($P < 0,01$; $n=3$). Ces résultats suggèrent que Rnd3 serait une nouvelle cible négative de la β -caténine dans le CHC.

2- Mise en place du modèle HepG2

Les tumeurs mutées pour la β -caténine représente près de un tiers des carcinomes hépatocellulaires (CHC). Dans ces tumeurs, les mutations de la β -caténine sont le plus souvent présentes au stade hétérozygote c'est-à-dire que la forme sauvage et mutée de la β -caténine coexistent au sein des cellules. S'il est clair que la forme mutée de la β -caténine est oncogénique, la β -caténine sauvage pourrait jouer un rôle dans le processus oncogénique, de par son rôle structural et son appartenance aux voies de mécanotransduction. L'objectif de ce projet était donc de comprendre comment chaque forme de la β -caténine régule Rnd3 dans les hépatocytes tumoraux.

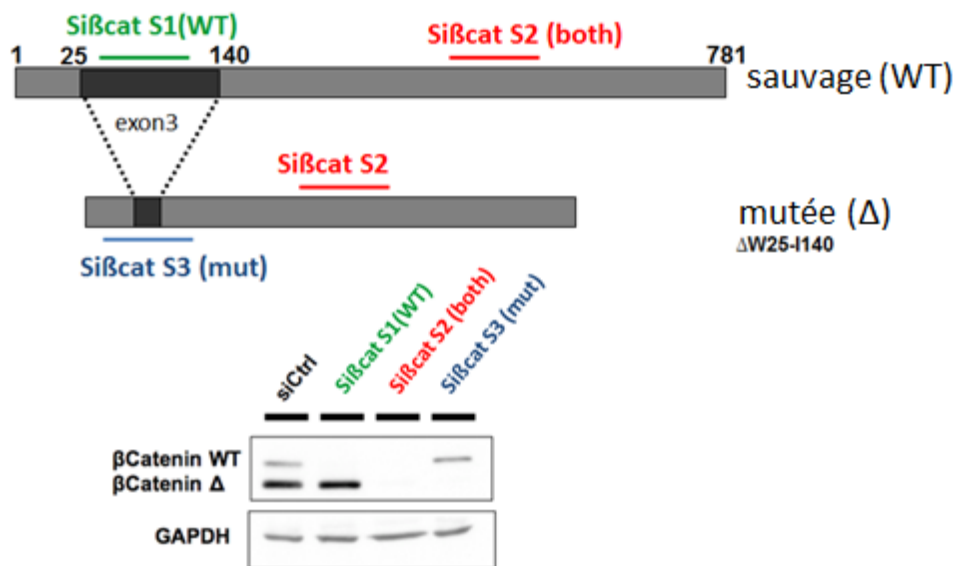


Figure 57: Modèle d'étude de la β -caténine dans les cellules HepG2

Le design de trois siARN spécifiques permet d'étudier indépendamment les différentes formes de la β -caténine

Afin de pouvoir étudier indépendamment chaque forme de la β -caténine, un modèle a été développé au laboratoire dans les cellules HepG2 (*Figure 57*). Ces cellules ont la particularité de posséder deux allèles différents pour la β -caténine, un allèle codant la β -caténine sauvage et l'autre allèle codant une β -caténine constitutivement active car possédant une large délétion dans la région de phosphorylation par la GSK3 responsable de son inhibition (de La Coste et

al., 1998). Ainsi, par le design de trois siARN spécifiques, l'étude indépendante des deux formes de la β -caténine a été rendue possible. Un siARN va se lier à la zone délétée dans la β -caténine mutée et permet donc d'éteindre seulement la β -caténine sauvage, un autre siARN se fixe en dehors de cette délétion et éteint donc les deux formes de la β -caténine, et enfin le dernier siARN se fixe au niveau de la jonction entre les deux zones délétées, et permet donc de cibler spécifiquement la β -caténine mutée (*Figure 57*).

3- Caractérisation du modèle de double extinction de la β -caténine

La caractérisation de ce modèle a débuté par une analyse de la localisation de la β -caténine dans les cellules HepG2, en condition d'extinction des différentes formes de la β -caténine par les trois siARNs décrits précédemment. Cette expérience a permis de montrer qu'en situation contrôle, la β -caténine est localisé non seulement au niveau des jonctions cellulaires, mais également dans le cytoplasme et le noyau des cellules. Cette localisation variée lui permet d'assurer ses fonctions structurale et transcriptionnelle. L'extinction de la β -caténine sauvage semble essentiellement perturber les jonctions cellulaires, tandis que l'extinction de la β -caténine mutée entraîne essentiellement une diminution du marquage cytoplasmique et nucléaire de la β -caténine (*Figure 58*).

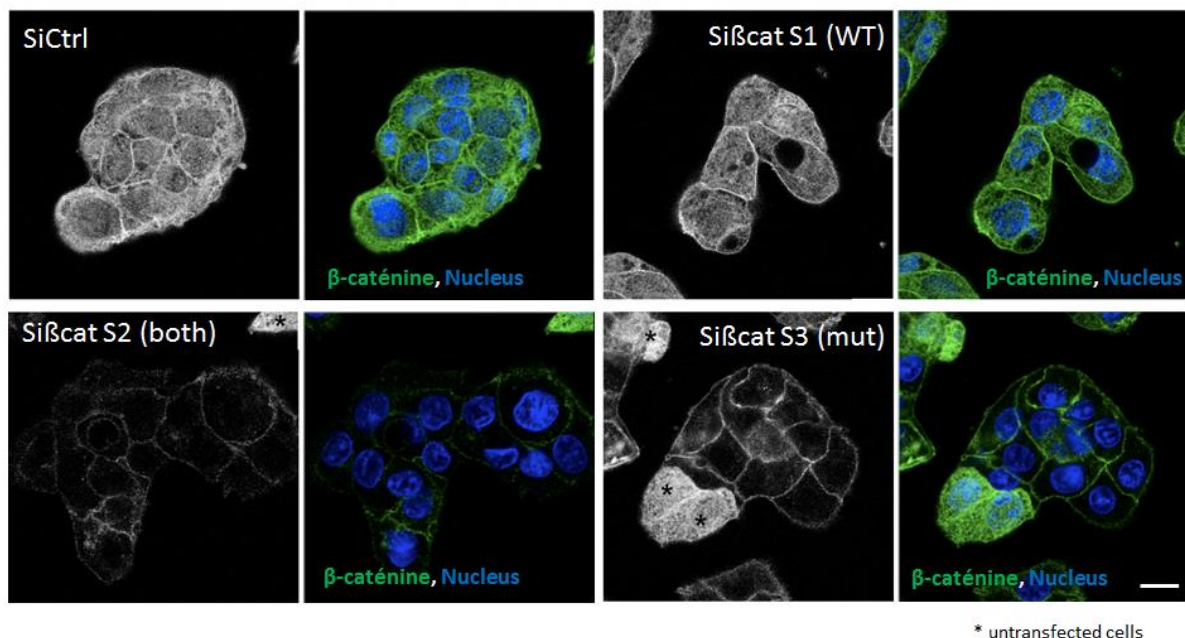


Figure 58: Immunomarquage de la β -caténine lors de l'inhibition de la forme sauvage et mutée
 Les cellules HepG2 ont été traitées avec les siARNs ciblant les différentes formes de la β -caténine. Une immunofluorescence a permis de révéler la localisation de la β -caténine dans ces différentes conditions. Barre d'échelle : 20 μ m

Une caractérisation plus poussée de ce modèle a montré que l'expression des cibles transcriptionnelles connues de la β -caténine (telles que LGR5/GPR49, l'axine 2 ou l'arginase) est essentiellement médiée par la β -caténine mutée. En effet, seule l'extinction de cette forme de la β -caténine aboutit à une diminution de l'ARNm de ces cibles. A l'inverse, la fonction structurale semble essentiellement supportée par la β -caténine sauvage, les jonctions adhérentes médiées par la E-cadhérine étant seulement déstabilisée par extinction de la β -caténine sauvage. Ce modèle permet donc bien de découpler et d'étudier indépendamment les deux fonctions de la β -caténine (Figure 59). Ce résultat est cohérent avec la localisation de la β -caténine décrite précédemment.

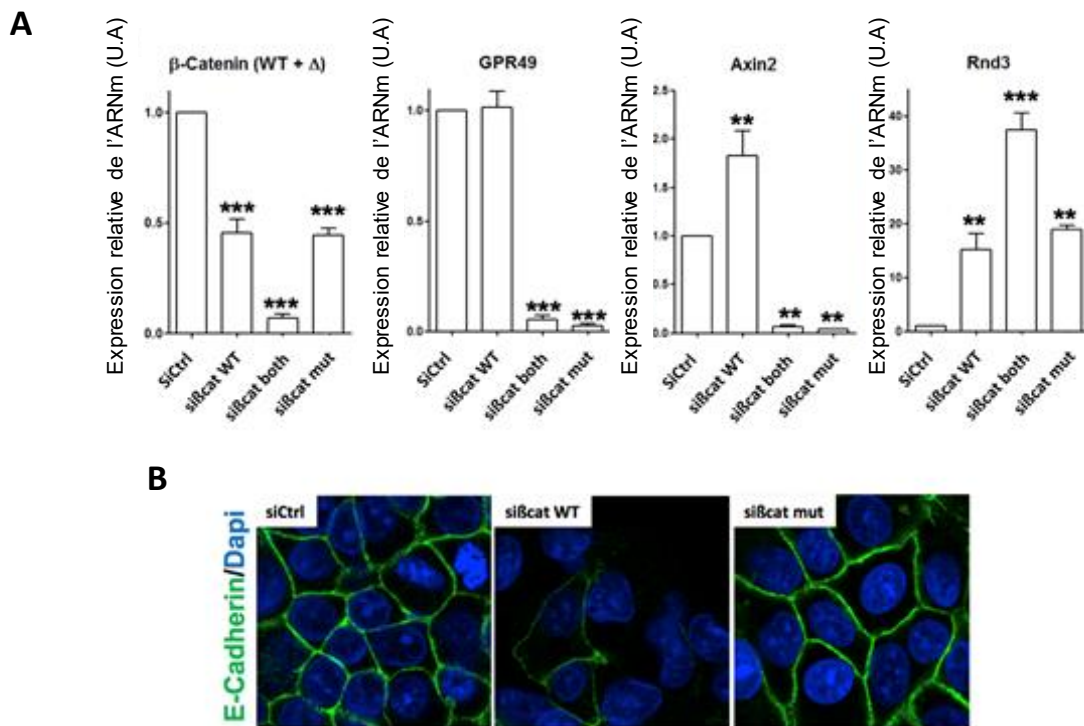


Figure 59: Vérification du modèle de découplage des deux formes de la β -caténine dans les cellules HepG2

(A) L'expression des cibles transcriptionnelles connues de la β -caténine est essentiellement médiée par l'allèle mutée tandis que (B) la fonction structurale est essentiellement médiée par la β -caténine sauvage, les jonctions adhérentes étant perturbées seulement lors de l'extinction de l'allèle sauvage.

Les deux formes de la β -caténine sont toutefois capables d'inhiber l'expression de Rnd3. (n=3/4)** P < 0,01 ; *** P < 0,001

En outre, l'utilisation de ce modèle a permis de montrer que l'extinction de la β -caténine mutée, mais également de la β -caténine sauvage, aboutissait toutes deux à une augmentation de l'ARNm de Rnd3 d'un facteur environ 20. De plus, l'extinction simultanée des deux allèles de la β -caténine aboutit à une augmentation de l'ARNm de Rnd3 d'un facteur environ 40, suggérant que Rnd3 est réprimé indépendamment par les deux formes de la β -caténine dans

les cellules HepG2 (*Figure 59*). A noter qu'il a été montré au laboratoire que l'extinction des deux formes de la β -caténine aboutit également à une surexpression du niveau protéique de Rnd3.

Ainsi ce modèle a permis de confirmer Rnd3 comme une nouvelle cible négative de la β -caténine. De plus, les deux formes de la β -caténine sont capables d'inhiber Rnd3. L'objectif de ce projet est donc de déterminer la régulation différentielle de Rnd3 par les deux formes de la β -caténine (*Figure 60*). D'après les données présentées précédemment, l'hypothèse de départ était que la régulation de Rnd3 par la β -caténine sauvage et mutée fait intervenir des facteurs différents. La régulation de Rnd3 par la β -caténine jouant sur le niveau d'ARNm de Rnd3, plusieurs hypothèses ont été émises. En effet, la régulation de Rnd3 par la β -caténine peut avoir lieu au niveau transcriptionnel et ainsi faire intervenir des facteurs de transcription, mais il peut également s'agir d'une régulation de la stabilité de l'ARNm de Rnd3, auquel cas l'étude de miARN ou de protéines liant l'ARNm de Rnd3 pourrait se révéler d'un intérêt particulier. Les deux hypothèses ont été étudiées.

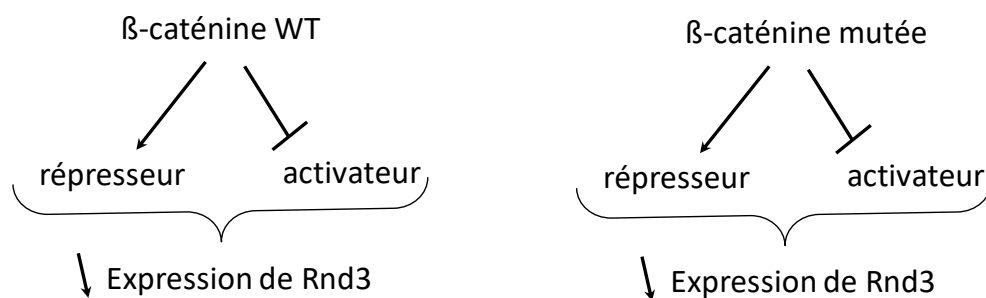


Figure 60: Modèle de régulation de Rnd3 par la β -caténine

Les deux formes de la β -caténine sont capables de réguler Rnd3. Cette régulation peut soit jouer sur des activateurs, soit sur des inhibiteurs, afin de diminuer l'expression de Rnd3. Le mécanisme d'action des deux formes de la β -caténine peut être similaire, mais il peut également s'agir de mécanismes distincts.

II- Interaction de la E-cadhérine avec la β -caténine

Avant d'étudier le mécanisme de régulation de Rnd3 par les deux formes de la β -caténine, une caractérisation de ces deux formes dans notre modèle, à savoir les cellules HepG2, était nécessaire. Dans cette optique, la capacité des deux formes de la β -caténine à interagir avec la E-cadhérine a été étudiée. En effet, bien que la fonction structurale de la β -caténine semble essentiellement médiée par la forme sauvage, la question a été de savoir si la β -caténine mutée est capable d'interagir avec la E-cadhérine et donc de tout de même posséder une composante structurale. Pour cela, une expérience de co-immunoprécipitation a été mise en place. Un anticorps dirigé contre la E-cadhérine a été utilisé pour l'immunoprécipitation. Puis la révélation de la β -caténine a permis d'étudier quelles formes de la β -caténine étaient capables d'interagir avec la E-cadhérine (*Figure 61*).

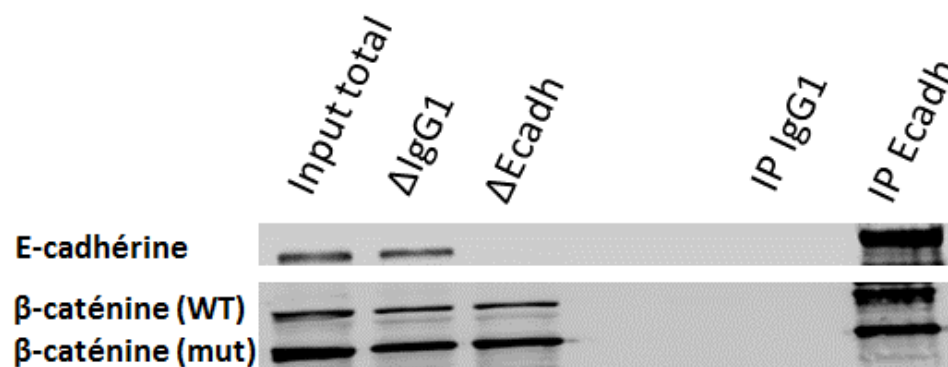


Figure 61: Interaction de la E-cadhérine avec la β -caténine

Les deux formes de la β -caténine sont capables d'interagir avec la E-cadhérine. Les Δ correspondent aux échantillons récupérés après immunoprécipitation et non fixés sur les billes. L'anticorps IgG1 a été utilisé en tant que contrôle négatif.

Ainsi, les deux formes de la β -caténine sont capables d'interagir avec la E-cadhérine. Ce résultat met en évidence que les fonctions portées par la β -caténine sauvage et mutée ne sont pas exclusives. La localisation de la β -caténine décrite (*Figure 58*) est cohérente avec ce résultat. En effet, même si la fonction structurale de la β -caténine semble essentiellement médiée par la forme sauvage, et la fonction transcriptionnelle par la forme mutée, un marquage des jonctions cellulaires est toujours observable lors de l'inhibition de la β -caténine sauvage, et un marquage nucléaire de la β -caténine lors de l'extinction de la β -caténine mutée peut aussi être observé. Cela suggère une composante transcriptionnelle de la β -caténine sauvage et une composante structurale de la β -caténine mutée (ce qui est cohérent avec les

résultats de l'immunoprécipitation, à savoir que la β -caténine mutée est également capable d'interagir avec la E-Cadhérine au niveau des jonctions adhérentes). Ces éléments aideront à la découverte de nouveaux facteurs régulés par les deux formes de la β -caténine et responsables de la régulation de Rnd3.

III- Etude de la régulation transcriptionnelle de Rnd3 par la β -caténine

Afin d'évaluer si la β -caténine est effectivement capable de réguler Rnd3 au niveau transcriptionnel, des expériences de gènes rapporteurs ont été réalisées à l'aide de plasmides couplés à la luciférase. La première étape a été de vérifier que l'activité transcriptionnelle de la β -caténine était bien analysable par les tests rapporteurs à la luciférase. Pour cela, après transfection des différents siARN ciblant la β -caténine, deux constructions rapportrices ont été utilisées. La construction TOP-Flash comprend quatre sites de fixation aux protéines LEF/TCF reconnus par la β -caténine active et couplés au gène de la luciférase, et la construction FOP-Flash, qui comprend des mutations dans ces sites. La normalisation du résultat obtenu avec le plasmide TOP-Flash par rapport au FOP-Flash permet de renseigner sur l'activité de la β -caténine (*Figure 62*).

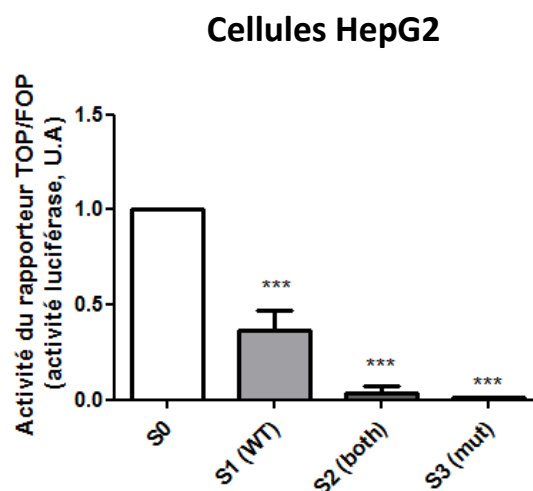


Figure 62: Validation de l'analyse de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine dans les cellules HepG2

Les cellules HepG2 sont traitées avec les siARN ciblant les différentes formes de la β -caténine. L'utilisation de ces siARNs diminue la luminescence émise par le plasmide TOP-Flash rapporteur de l'activité de la β -caténine, et valide ainsi l'utilisation des siARN pour étudier leur effet sur la transcription de Rnd3. (n=3) *** P < 0,001, ANOVA

Cette expérience permet de voir que l'extinction de la β -caténine aboutit à une diminution de l'activité du plasmide rapporteur de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine. Ainsi, les siARN dirigés contre la β -caténine peuvent être utilisés pour analyser l'impact de la β -caténine sur la transcription de sa nouvelle cible potentielle Rnd3. Il est intéressant de noter que la β -caténine sauvage est également capable de diminuer l'activité transcriptionnelle mesurée, suggérant ainsi que la β -caténine mutée n'est pas exclusivement responsable de l'activité

transcriptionnelle mais que cette fonction est aussi assurée par la β -caténine sauvage, même si cela est le cas à un degré moindre.

L'impact de l'extinction de la β -caténine sur l'activité du promoteur de Rnd3 a donc été évalué après traitement par les trois différents siARNs ciblant la β -caténine, à l'aide du plasmide rapporteur Rnd3-Luc, contenant une partie du promoteur de Rnd3 (-1759 ; +248) couplée à la luciférase (**Figure 63**).

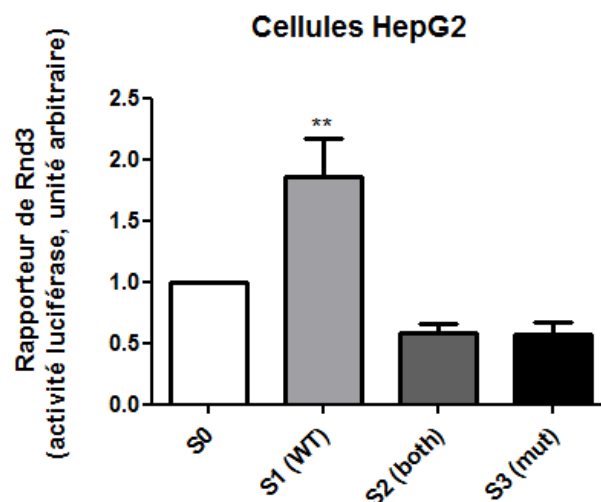


Figure 63: Impact de l'extinction de la β -caténine sur l'activité du promoteur de Rnd3 dans les cellules HepG2
Les cellules HepG2 sont traitées avec les siARN ciblant les différentes formes de la β -caténine. Un test luciférase est ensuite effectué pour évaluer l'activité du promoteur de Rnd3. Seule l'extinction de la β -caténine sauvage augmente la transcription de Rnd3. (n=3) ** P < 0,01, ANOVA

L'analyse des résultats se révèle intéressante et montre que la β -caténine sauvage, mais pas la β -caténine mutée, est capable de réguler la transcription de Rnd3, ou pour être plus précis l'activité du promoteur de Rnd3 couplé à la luciférase et utilisé comme gène rapporteur. En effet, seule l'extinction de la forme sauvage de la β -caténine va aboutir à une augmentation de l'activité du promoteur de Rnd3. Ainsi, ce résultat est le premier élément qui vient confirmer l'hypothèse initiale de régulation différentielle de Rnd3 par les deux formes de la β -caténine.

IV- Etude de la régulation de la stabilité de l'ARNm de Rnd3 par la β -caténine

La β -caténine mutée n'influençant pas l'activité du promoteur de Rnd3, il est possible que la régulation de Rnd3 par cette forme de la β -caténine passe par une régulation de la stabilité de son ARNm. Afin d'étudier la stabilité de l'ARNm de Rnd3, nous nous sommes intéressés à

la partie 3'NT (non traduite) de Rnd3, cette partie étant souvent la cible des miARNs ou des protéines liant l'ARN. Ainsi, l'étude de l'importance de la partie 3'NT pour la régulation de Rnd3 par la β -caténine a été réalisée à l'aide d'une construction composée de la partie 3'NT de Rnd3 couplée à la GFP. En situation basale, la partie 3'NT de Rnd3 n'est pas réprimée, ce qui entraîne la traduction de la GFP. Si la partie 3'NT de Rnd3 se trouve inhibée, cela va diminuer la traduction de la GFP. Par mesure de la quantité de GFP présente par Western Blot, la régulation de la partie 3'NT de Rnd3 et donc son importance pour la régulation de Rnd3 par la β -caténine, sera directement renseignée. L'importance de la partie 3'NT de l'ARNm de Rnd3 a donc été étudiée par cette technique, lors de la transfection des différents siARN ciblant la β -caténine. Pour chaque expérience, le niveau de la GFP mesuré a été normalisé par rapport à celui obtenu par une construction simplement composée de la GFP sans séquence 3'NT, et n'étant donc pas influencée par le niveau de la β -caténine (Figure 64).

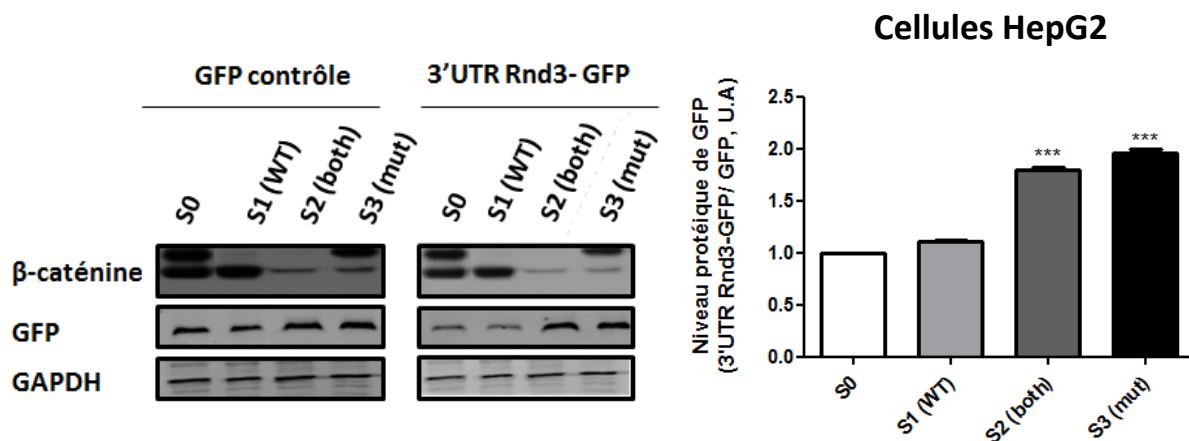


Figure 64: Effet de l'extinction de la β -caténine sur la stabilité de l'ARNm de Rnd3

L'inhibition de la β -caténine mutée augmente la stabilité de l'ARNm de Rnd3, comme reflété par la quantité de GFP produite qui est augmentée lorsque la forme mutée de la β -caténine est inhibée. A l'inverse, la forme sauvage de la β -caténine n'a pas d'effet. (n=3) *** P < ,001, ANOVA

La situation obtenue avec cette expérience est l'inverse de celle obtenue lors de l'analyse de la transcription de Rnd3. En effet, la partie 3'NT de l'ARNm de Rnd3 n'est pas influencée par la β -caténine sauvage, la quantité de GFP produite étant similaire lors de l'inhibition de la β -caténine sauvage. Par contre l'inhibition de la β -caténine mutée entraîne une augmentation de la quantité de GFP produite. Ainsi, ce résultat signifie que la β -caténine mutée va réguler Rnd3 au niveau de la partie 3'NT de son ARNm.

L'hypothèse de départ est donc confirmée, à savoir que la régulation de Rnd3 par la β -caténine sauvage et mutée fait intervenir des facteurs différents. Ainsi, la β -caténine sauvage va jouer sur l'activité du promoteur de Rnd3 tandis que la β -caténine mutée va réguler la partie 3'NT de l'ARNm de Rnd3.

V- Facteurs à l'origine de la régulation différentielle de Rnd3 par la β -caténine

Afin d'obtenir une image globale des gènes régulés par les deux allèles de la β -caténine, une analyse transcriptomique a été réalisée au laboratoire à partir des cellules HepG2 transfectées avec les différents allèles ciblant la β -caténine. Cette analyse a été réalisée à la plateforme « Biopuces et Séquençage » de l'IGBMC (Strasbourg), en triplicat pour chacune des quatre conditions (S0, S1(WT), S2(both) et S3(mut)), à l'aide de puces Affimetrix (GeneChip®). Grâce à cette analyse, le laboratoire a désormais à disposition l'ensemble des gènes dérégulés par l'absence de chacune des formes de la β -caténine.

Comme expliqué précédemment, chacune des formes de la β -caténine semble réguler Rnd3 par un mécanisme et des facteurs différents. Ainsi l'analyse des facteurs régulés par la β -caténine sauvage et la β -caténine mutée a été réalisée de manière indépendante.

Dans les cellules HepG2, c'est la β -caténine sauvage qui assure essentiellement la fonction structurale, en reliant l'E-cadhérine et l'actine au niveau des jonctions adhérentes. Les jonctions adhérentes ainsi reliées au cytosquelette d'actine vont se comporter comme des mécanosenseurs, capables de sentir les forces exercées sur les cellules et de contrôler en réponse différents processus tels que la différenciation, la migration ou la division cellulaire (Mammoto & Ingber, 2009). Cette régulation est principalement obtenue à travers la modulation de l'expression génique en réponse à un changement d'activité de certains facteurs de transcription. L'hypothèse émise au laboratoire est que l'extinction de la β -caténine sauvage va perturber les jonctions adhérentes et ainsi modifier les forces mécaniques intracellulaires, aboutissant à la modulation des voies de mécanotransduction. Ces voies ont été détaillées précédemment, et sont principalement représentées par la voie MRTF/SRF et la voie YAP/TAZ. Ces deux voies sont effectivement modulées en réponse à des stimuli mécaniques (Mendez & Janmey, 2012).

De façon intéressante, une analyse GSEA (Gene set enrichment analysis) a été réalisée à partir du transcriptome et a révélé que ces voies de signalisation sont retrouvées significativement surexprimées lors du traitement par le siARN ciblant la β -caténine sauvage (**Figure 65**).

Voies de signalisation	P-value nominale
NFkB_Park	0.6510204
Notch repressed_A_Mazzone	0.0292134*
SRFMAL_Descot	0.0251046*
IGF1_Rajski	0.9089069
IL2_Netpath	0.4028056
IL4_Netpath	0.4489796
induced by YAP_Zhang	0.0044642*
induced by YAP in 3T3_Zhao	0.0041841*

Figure 65: Analyse GSEA de différentes voies de signalisation

Ce tableau représente l'enrichissement de différentes voies de signalisation lors d'un traitement par le siARN ciblant la β -caténine sauvage. * représente un enrichissement significatif. Ainsi, le profil d'expression génique en présence du siARN dirigé contre la β -caténine sauvage va montrer un enrichissement significatif des voies YAP/TAZ et MRTF/SRF.

L'activité de la voie YAP/TAZ est reliée à la transduction de signaux mécaniques et provenant du cytosquelette. De plus, il a été montré que la voie YAP/TAZ était régulée par les contacts inter-cellulaires (Zhao et al., 2007). En effet, à faible densité, la voie Hippo est inactive, ce qui permet à YAP/TAZ de se localiser dans le noyau et d'activer la transcription de gènes cibles en collaboration avec les facteurs de transcription tels que les protéines TEADs. A confluence, la voie Hippo va être active et inhiber YAP/TAZ. Ainsi, il est possible que l'altération des jonctions cellulaires induite par l'inhibition de la β -caténine sauvage dans les cellules HepG2 résulte en l'activation de la voie YAP/TAZ. Une étude récente a montré l'interaction entre la voie Wnt/ β -caténine et la voie YAP/TAZ et montre que la voie YAP/TAZ est responsable d'une partie de la réponse transcriptionnelle de la voie Wnt. De plus, la délétion de la β -caténine sauvage suffit à activer la voie YAP/TAZ (Azzolin et al., 2012).

Ainsi, à partir des résultats du transcriptome, les gènes dérégulés par l'inhibition de la β -caténine sauvage et reliés à la voie YAP/TAZ ont été cherchés. En plus des protéines TEAD1 et TEAD2, des cibles connues de la voie YAP/TAZ ont été identifiées, telles que CYR61, CTGF, AMOTL2 et ANKRD1 et sont surexprimées par inhibition de la β -caténine sauvage (**Figure 66**).

Groupe de sondes	Nom du gène	Siβcat WT	Siβcat both	Siβcat mut
16722189	TEAD1	0.001	ns	0.027
16874273	TEAD2	0.030	0.000	0.011
16666738	CYR61	0.002	ns	0.003
17023646	CTGF	0.023	ns	0.003
16959441	AMOTL2	0.004	0.022	0.033
16716478	ANKRD1	0.001	0.017	0.002
16689828	AHRGAP29	0.023	ns	ns
16862439	AXL	0.011	0.005	0.014

Figure 66: Gènes impliqués dans la voie YAP/TAZ et dérégulés par l'inhibition de la β-caténine sauvage
 Une liste conséquente de gènes impliqués dans la voie YAP/TAZ sont surexprimés par inhibition de la β-caténine sauvage. Les couleurs rouges et vertes indiquent respectivement des gènes surexprimés et sous-exprimés.

De même, l'étude du transcriptome a permis d'identifier de nombreux gènes impliqués dans la voie MRTF/SRF et dont l'expression est surexprimée par inhibition de la β-caténine sauvage, tels que ACTA1, ACTA2, VCL, TPM1, ITGA5, MYH9 et PKP2. L'expression de MRTF-A (MKL1/MAL) est de plus elle-même directement augmentée dans cette condition (*Figure 67*). L'activité de la voie MRTF/SRF est directement relié à l'organisation de l'actine. Il a de plus été montré que la disruption des jonctions cellulaires aboutit à une activation de la voie MRTF/SRF (Busche et al., 2008). La β-caténine assurant le lien entre les jonctions adhérentes et le cytosquelette d'actine, il est aisé d'imaginer que la perturbation de la β-caténine va influencer la voie MRTF/SRF et son activité à travers une modification du cytosquelette d'actine.

Groupe de sondes	Nom du gène	Siβcat WT	Siβcat both	Siβcat mut
16935290	MKL1	0.000	ns	0.026
16700274	ACTA1	0.052	ns	0.014
16716350	ACTA2	0.005	ns	ns
16706200	VCL	0.004	0.016	ns
16801789	TPM1	0.007	ns	0.005
16765558	ITGA5	0.015	ns	0.038
16934491	MYH9	0.015	0.004	ns
16763032	PKP2	0.025	0.003	0.005

Figure 67 : Gènes impliqués dans la voie MRTF/SRF et dérégulés par l'inhibition de la β-caténine sauvage
 Comme pour la voie YAP/TAZ, une liste conséquente de gènes impliqués dans la voie MRTF/SRF sont surexprimés par inhibition de la β-caténine sauvage. Les couleurs rouges et vertes indiquent respectivement des gènes surexprimés et sous-exprimés.

L'étude des voies MRTF/SRF et YAP/TAZ dans le cadre de la régulation de Rnd3 a un réel intérêt et se justifie par plusieurs arguments. D'une part et comme expliqué précédemment, ces deux voies de signalisation sont impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine et de ses processus associés. Rnd3, en tant que Rho GTPase, est également impliquée dans la régulation de ces processus. Un lien entre ces voies de

signalisation et Rnd3 et donc facilement imaginable. Mais surtout, des séquences potentielles de fixation de TEAD et de SRF (Sun et al., 2006) ont été trouvées dans le promoteur de Rnd3, justifiant l'étude de sa régulation par ces deux voies de mécanotransduction.

Ainsi, afin de savoir si la voie MRTF/SRF et YAP/TAZ sont effectivement régulées par la β -caténine sauvage et pourraient être à l'origine de la régulation de Rnd3 par cette forme de la β -caténine, des expériences de gènes rapporteurs ont été réalisées dans les cellules HepG2. Ces expériences ont été réalisées à l'aide de différents plasmides rapporteurs: le plasmide p3DA-luc contenant en amont de la luciférase une séquence composée de trois copies du site de fixation de SRF et renseignant ainsi sur l'activité de la voie MRTF/SRF (Geneste et al., 2002) ; le plasmide contrôle p2MA-luc dérivé du précédent mais contenant des mutations au niveau des sites de fixation de SRF et permettant de normaliser les résultats ; et enfin le plasmide 8xGTIIC-luc contenant 8 sites TEAD où se fixe YAP/TAZ et donc rapporteur de l'activité de cette voie de signalisation. Les expériences ont été réalisées après inhibition des différentes formes de la β -caténine par les siARNs correspondant (*Figure 68*).

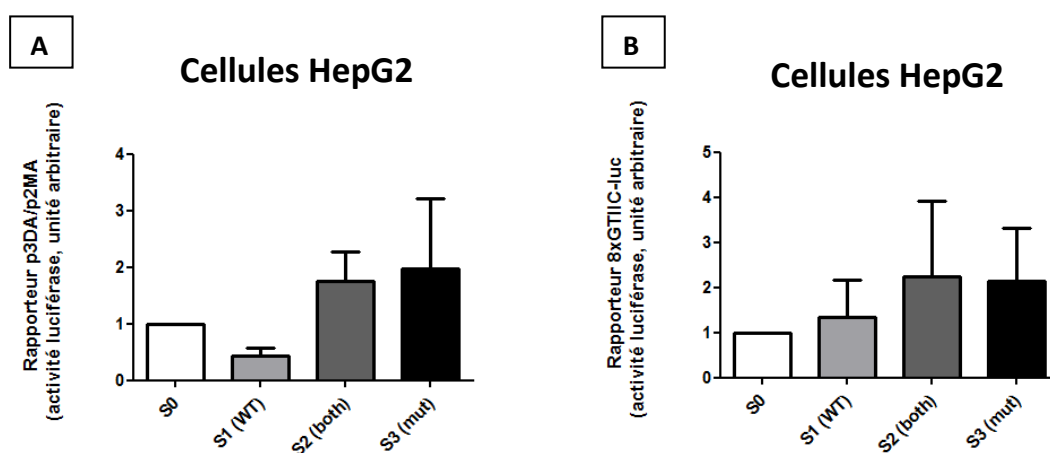


Figure 68: Modulation des voies MRTF/SRF et YAP/TAZ par la β -caténine

les cellules HepG2 sont traitées par les siARN ciblant les différentes formes de la β -caténine puis un test luciférase est effectué à l'aide des rapporteurs de l'activité de SRF (p3DA/p2MA) et de l'activité YAP/TAZ (8xGTIIC). La voie MRTF/SRF (A) et YAP/TAZ (B) ne semblent pas influencées par l'inhibition des différentes formes de la β -caténine. (n=3), ANOVA

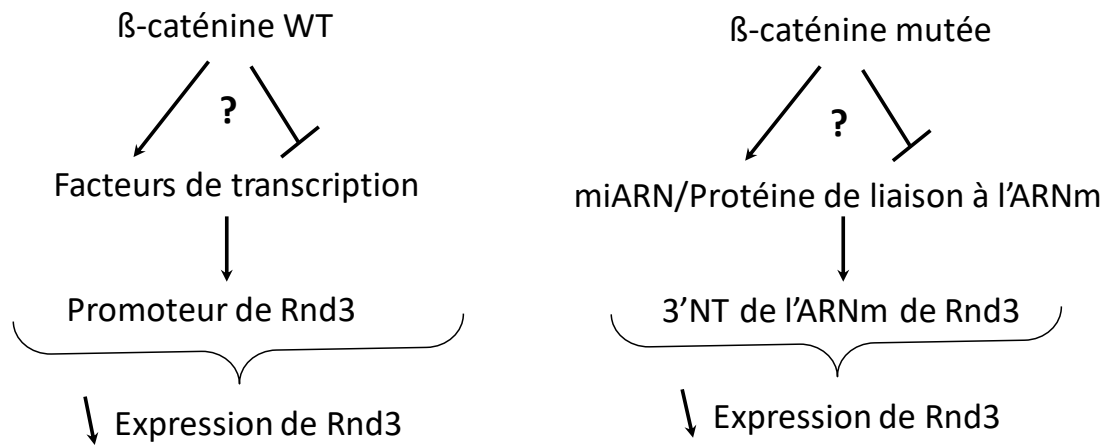
Malgré des données préliminaires assez robustes, l'activité transcriptionnelle de la voie MRTF/SRF et YAP/TAZ ne semble pas influencée par l'inhibition des différentes formes de la β -caténine. Ainsi, ces deux voies de signalisation ne semblent pas être à l'origine de la régulation de Rnd3 par la β -caténine sauvage. Cependant, en raison des arguments en faveur

de la régulation de Rnd3 par les voies de mécanotransduction, l'analyse de la relation entre Rnd3 et ces voies de signalisation, et notamment la voie MRTF/SRF, a été effectuée indépendamment du rôle de la β -caténine.

L'étude de la régulation de Rnd3 par la voie de mécanotransduction MRTF/SRF a ainsi constitué la partie principale de mon travail de thèse et sera présentée en détail dans la partie suivante.

En ce qui concerne la régulation de Rnd3 par la β -caténine mutée, celle-ci n'a donc pas lieu au niveau transcriptionnel mais joue plutôt sur l'ARNm de Rnd3. En effet la β -caténine mutée inhiberait Rnd3 en ciblant le 3'NT de son ARNm. Ainsi, parmi les données obtenues par le transcriptome, les protéines liant l'ARN et les miARNs dérégulés par le siARN ciblant la β -caténine mutée se révèlent d'un intérêt tout particulier. L'étude de ces cibles est très préliminaire, cependant une première liste de miARNs dérégulés par l'inhibition de la β -caténine mutée a été établie et requiert de futures investigations. Dans un premier temps, il faudra analyser parmi cette première liste quels sont les miARNs capables de cibler Rnd3, à l'aide d'outils bio-informatiques tels que miRWalk ou Targetscan. En effet, les miARNs dérégulés par la β -caténine et capables de cibler Rnd3 sont les plus susceptibles d'assurer la régulation de Rnd3 dépendante de la β -caténine, au niveau de son ARNm. A noter cependant que l'augmentation de l'ARNm de Rnd3 observée par inhibition de la β -caténine mutée peut non seulement être due à une diminution d'expression d'un miARN ciblant directement Rnd3, mais également à la surexpression d'un miARN ciblant un inhibiteur de Rnd3, auquel cas l'action du miARN serait plus indirecte. Dans un second temps, il faudra réaliser une étude globale et précise du miRnome afin d'obtenir une liste complète des miARNs impliqués dans la régulation de Rnd3 dépendante de la β -caténine.

Ainsi, les différents résultats présentés permettent de dire que les deux formes de la β -caténine sont capables de réguler Rnd3. Cependant, la β -caténine sauvage inhibe Rnd3 en jouant sur l'activité du promoteur de Rnd3, tandis que la β -caténine mutée semble inhiber Rnd3 en jouant sur la stabilité de son ARNm (*Figure 69*). En outre, les tests de gènes rapporteurs n'ont pas permis de confirmer que les voies YAP/TAZ et MRTF/SRF étaient impliquées dans la régulation de Rnd3 dépendante de la β -caténine. Ainsi, d'autres protéines et voies de signalisation doivent entrer en jeu pour la régulation de Rnd3 dépendante de la β -caténine.



➤ Mécanisme transcriptionnel ➤ Mécanisme post-transcriptionnel

Figure 69: Modèle de régulation de Rnd3 par la β-caténine

Les résultats obtenus permettent d'affiner le modèle de régulation de Rnd3 par la β-caténine. La β-caténine sauvage régule Rnd3 au niveau transcriptionnel en jouant sur l'activité de son promoteur, tandis que la β-caténine mutée joue sur l'ARNm de Rnd3.

Partie II- La voie de signalisation MRTF/SRF régule les processus mécanosensibles à travers sa nouvelle cible Rnd3.

Le comportement cellulaire est influencé par de nombreux facteurs, qu'il s'agisse de signaux chimiques ou des propriétés mécaniques de l'environnement cellulaire. La voie de signalisation MAL-SRF est une voie de mécanotransduction connue pour assurer la traduction des forces physiques et des tensions mécaniques exercées sur la cellule en une réponse transcriptionnelle adaptée. Les Rho GTPases sont capables de moduler l'activité de cette voie à travers la régulation du cytosquelette d'actine, et de nombreuses cibles de la voie MAL-SRF sont impliquées dans la régulation de ce cytosquelette. Ainsi, le niveau d'actine est maintenu à l'aide d'une boucle de rétrocontrôle, où la dynamique de l'actine régule la voie de signalisation MAL-SRF impliquée dans l'expression des composants du cytosquelette.

L'objectif de ce projet était d'évaluer et de caractériser le rôle de la voie MAL-SRF dans la régulation de Rnd3, un membre atypique de la famille Rho impliqué dans la régulation du cytosquelette d'actine.

Les résultats obtenus ont permis de caractériser Rnd3 à la fois comme une nouvelle cible transcriptionnelle directe de cette voie, mais également comme une cible indirecte. Les expériences réalisées ont montré que la modulation de la voie MAL-SRF régule l'expression de Rnd3, et que cette expression influence en retour l'activité de cette voie de mécanotransduction. De plus, certains processus mécanosensibles régulés par la voie MAL-SRF, telles que l'étalement cellulaire ou la formation de sphéroïdes, sont dépendants de Rnd3. L'ensemble des résultats obtenus indiquent que Rnd3 se comporte comme une cible de la voie MAL-SRF ayant un rôle primordial dans la boucle de rétrocontrôle décrite entre la voie MAL-SRF et l'organisation du cytosquelette d'actine.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication actuellement soumise, qui est présentée dans les pages suivantes.

MAL-SRF pathway regulates mechanosensitive processes via its novel target Rnd3/RhoE

Léo Piquet^{1,2}, Terezinha Robbe^{1,2}, Stéphanie Rosciglione^{1,2,#}, Frédéric Saltel^{1,2}, and Violaine Moreau^{1,2,*}

(1) INSERM, UMR1053 Bordeaux Research In Translational Oncology, BaRITOn, F-33000 Bordeaux, France; (2) Univ. Bordeaux, UMR1053 Bordeaux Research In Translational Oncology, BaRITOn, F-33000 Bordeaux, France.

present address:

*Corresponding author

Phone: +33 (0)5 57 57 12 72. Fax: +33 (0)5 56 51 40 77. E-mail: violaine.moreau@inserm.fr

Number of words: 7685

Running title: Rnd3 is a target of MAL-SRF

Key words: RhoGTPases, mechanotransduction, MAL-SRF, actin, Rnd3/RhoE

Summary statement: This paper addresses the involvement of the atypical Rho GTPase Rnd3/RhoE in MAL-SRF dependent mechanisms.

ABSTRACT (180 words max)

Cell behaviour is influenced by various factors, including chemical signals and mechanical properties of the surrounding environment. The MAL-SRF pathway is a mechanotransduction pathway that is well described to assure the translation of physical forces and mechanical tensions into a transcriptional response. Rho GTPases can modulate the activity of this pathway through the regulation of the actin cytoskeleton and many MAL-SRF target genes are involved in the regulation of actin. Thus, actin homeostasis in cells is maintained by a feedback loop where actin dynamics control the MAL-SRF pathway involved in the expression of cytoskeletal components. Here, we show that Rnd3, an atypical member of the Rho family, is both a direct transcriptional and indirect MAL-SRF target. We show that MAL-SRF modulation regulates Rnd3 expression that can affect MAL-SRF pathway activity in return. We demonstrate that this novel MAL-SRF target is required in mechanosensitive mechanisms such as cell spreading and spheroid formation. These results indicate that Rnd3 is a MAL-SRF target that may play a key role in the feedback loop described between the MAL-SRF pathway and the organisation of the actin cytoskeleton.

INTRODUCTION

Mechanical cues that occur upon cell interaction with the extracellular matrix (through integrins) or neighbouring cells (through cadherins) are now well known to regulate many cellular processes through activation of mechanotransduction pathways (Mendez and Janmey, 2012). This allows cells to sense and respond to the mechanical properties of their surrounding environment in addition to biochemical signals as growth factors. Within the cells, the information is integrated by the intracellular cytoskeleton that assures the translation of physical forces and mechanical tensions into a transcriptional response and the activation of signalling pathways. Thus, both intra- and inter-cellular communications coordinate various cellular activities that direct proliferation, migration and differentiation (Mammoto and Ingber, 2009). The actin cytoskeleton is a key effector of these inside-out and outside-in mechanotransduction events and the MAL-SRF pathway is one of the major pathways involved (Mendez and Janmey, 2012; Olson and Nordheim, 2010). MAL (megakaryocytic acute leukemia), also known as MKL1 (megakaryoblastic leukemia 1) or MRTF1 (myocardin-related transcription factor-1) is a transcriptional coactivator of the transcription factor SRF (serum response factor). MAL activity is controlled by the availability of G-actin, whose binding to MAL inhibits its nuclear import, enhances its nuclear export and consequently represses transcription of SRF target genes (Miralles et al., 2003). SRF directs the expression of its target genes by binding with high affinity to the serum response element CC[A/T]₆GG also referred as CArG-box. MAL-SRF target genes consist of adhesion- and contractility-related genes i.e. genes involved in several aspects of the cytoskeleton biology, such as actin dynamics and cell contraction, including actin itself (Esnault et al., 2014; Sun et al., 2006). Consequently, actin homeostasis in cells is maintained by a feedback loop where actin dynamics control the MAL-SRF pathway involved in the expression of cytoskeletal components. Therefore, signals that modulate actin polymerisation could impact on the activity of MAL-SRF pathway. This has been well documented for RhoGTPases (Rajakyla and Vartiainen, 2014). Indeed, constitutively active forms of Rho GTPases, RhoA, Rac1 and Cdc42 were shown to activate SRF-dependent transcription (Hill et al., 1995). Rho-induced actin polymerisation reduces G-actin level that favors free MAL nuclear accumulation and SRF activation. Upstream regulators of Rho GTPases including extracellular receptor ligands as lysophosphatidic acid (Hill et al., 1995) or sphingosine-1-phosphate (Lockman et al., 2004), and mechanical cues as cell-cell contacts (Busche et al., 2008) or integrin-mediated adhesions (Zhao et al., 2007), were shown to activate MAL-SRF pathway. However, whereas Rho GTPases are clearly upstream regulators of MAL-SRF pathway, only few members of the Rho GTPase family have been described as potential

targets of SRF to allow the feed back loop.

The human Rho GTPase family, which represents a subdivision of the Ras superfamily of small GTPases, is composed of 23 members that can be organised into five subfamilies, such as the Rho, Rac, Cdc42, Rnd, RhoBTB and Miro subfamilies (Grise et al., 2009). Typical Rho members cycle between an active GTP-bound form and an inactive GDP-bound form, so that they act as molecular switches in signalling pathways. This cycle is tightly regulated by proteins that act on the nucleotide load: i) the guanine nucleotide exchange factors (GEFs) which catalyze the exchange of GDP for GTP and hence lead to GTPase activation, ii) the GTPase activating proteins (GAPs) which enhance the intrinsic GTPase activity, thus returning the GTPases to their inactive state, and iii) the guanine nucleotide dissociation inhibitors (GDIs) which inhibit GDP nucleotide dissociation, and also sequester Rho GTPases in the cytosol, rendering them inactive. When on the GTP-bound state, Rho GTPases are able to bind effector proteins and transduce signals from a large variety of membrane receptors including growth factor receptors and adhesion receptors (such as integrins or cadherins). Rho family GTPases stimulate signaling activities that influence a broad array of cellular activities ranging from actin cytoskeletal rearrangements to cell polarity, migration, and cell cycle progression (Hall, 2012). Within the Rho GTPase family, the Rnd sub-family is composed of three members Rnd1/RhoS/Rho6, Rnd2/RhoN/Rho7 and Rnd3/RhoE/Rho8, among which Rnd3 is the ubiquitously expressed member. Rnd proteins are involved in the regulation of actin cytoskeleton remodeling (Guasch et al., 1998; Nobes et al., 1998). Their name, Rnd for *round*, comes from early studies showing that expression of Rnd proteins in cultured cells induced loss of stress fibers and cell rounding (Nobes et al., 1998). In fact, Rnd3, which is the most studied Rnd member, functions as a RhoA antagonist, either by inhibiting the RhoA effector ROCK-I (Riento et al., 2003), by increasing the RhoGAP activity of p190RhoGAP (Riento et al., 2003; Wennerberg et al., 2003), or by inhibiting the RhoA GEF Syx (Goh and Manser, 2010). Thus, the best-characterised functional consequence of Rnd3 activity is an inhibition of ROCK-mediated actomyosin contractility (Riou et al., 2010). Through this mechanism, Rnd3 has been involved in various cell processes such as myoblast fusion, smooth muscle contractility, neurite outgrowth, cell migration and invasion, and cell differentiation. Rnd3 was also shown to regulate cell-cycle progression, independently of its cytoskeleton remodelling activity (Riou et al., 2010). Thus, it is easy to understand that a dysregulation of Rnd3 may lead to a pro-tumorigenic stage. Indeed, a growing number of studies demonstrated the alteration of Rnd3 expression and function in tumor (Paysan et al., 2016). Rnd3 has a diverse expression pattern, depending on the cancer types. 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. However, most functional studies demonstrated that these alterations are in favor of a pro-tumorigenic role (Paysan et al., 2016). It is consequently important to understand how Rnd3 expression and activity is regulated. Early studies demonstrated that Rnd3, together with Rnd1 and 2, are atypical Rho GTPases devoid of GTPase activity (Foster et al., 1996; Nobes et al., 1998; Riento et al., 2005). Consequently, they do not cycle between GDP/GTP states and are not regulated by classical RhoGTPase modulators such as GEFs and GAPs. Thus, Rnd3 expression was shown to be dependent on the equilibrium between its transcription, translation and degradation, and its activity is also regulated by post-translational modifications such as phosphorylation (Jie et al., 2015; Riento et al., 2005).

Interestingly, genome-wide screens identified a functional CArG element in the mouse Rnd3 promoter (Esnault et al., 2014; Sun et al., 2006). Moreover, through its antagonistic role on RhoA, Rnd3 may also regulate the MAL-SRF pathway. Thus, the aim of this study was to determine the relationship between the MAL-SRF pathway and this atypical Rho GTPase. We thus ask whether Rnd3 that acts on actomyosin contractility is itself, in turn, regulated by mechanotransduction pathway.

Using cytochalasin D treatment, we demonstrated that Rnd3 promoter responds to cytoskeletal alterations. In addition, we found that modulation of MAL or SRF expression affects Rnd3 promoter activity and endogenous Rnd3 levels. We further identified the SRF binding site on Rnd3 promoter. Finally, we demonstrated that this novel MAL-SRF target is required in mechanosensitive mechanisms such as cell spreading and spheroid formation. Thus, in this study, we identified Rnd3 as a novel MAL-SRF target that may play a key role in the feedback loop described between the MAL-SRF pathway and the organisation of the actin cytoskeleton.

RESULTS

Rnd3 expression is regulated upon actin cytoskeleton changes

To learn whether Rnd3/RhoE expression is regulated upon mechanical changes in the cells, we treated hepatocellular carcinoma cells Huh7 with cytochalasin D. This drug is well known to destabilize actin filaments by binding fast-growing end of filamentous actin and also sequestering actin monomers (Cooper, 1987; Goddette and Frieden, 1985). We found that a 7-hours treatment of cytochalasin D increases endogenous Rnd3 mRNA and protein expression levels (Fig. 1A). This suggests that Rnd3 expression is sensitive to modulation of G/F-actin level. In order to confirm this statement, we altered G/F-actin ratio by increasing Rho GTPase activity in cells. Activation of RhoA, Rac1 and Cdc42 is well known to favour actin polymerisation and reorganisation in cells (Nobes and Hall, 1995). Thus, we transiently transfected Huh7 cells with constitutively activated forms of these three Rho family members and monitored the expression of Rnd3 mRNA by qRT-PCR. We found that V14-RhoA, L61-Rac1 and V12-Cdc42 expressions led to an increase in Rnd3 expression (Fig. 1B). In addition, we also found that treatment of starved cells with 10% serum induced an increase in Rnd3 expression in Huh7 cells at mRNA and protein levels (Fig. 1C). Thus, Rnd3 responds to serum stimulation and actin cytoskeleton changes, stimuli that both activate the SRF transcription factor.

Rnd3 expression is controlled by MAL transcriptional coactivator

In order to test whether Rnd3 expression is modulated upon activation of the mechanotransduction MAL-SRF pathway, we transiently transfected cells with wild-type (WT) MAL, constitutively active MAL, which lacks the N-terminal actin-binding RPEL-motifs (MAL Δ N) and dominant negative MAL, which lacks the SRF-binding basic region (MAL Δ N Δ B) (Busche et al., 2008; Miralles et al., 2003). As shown on figure 2A, MAL WT and MAL Δ N localise in Huh7 cell nuclei, whereas MAL Δ N Δ B is cytoplasmic. Interestingly, we found that WT and constitutively active MAL both led to a four-fold increase of Rnd3 mRNA expression in Huh7 cells (Fig. 2B). This result, confirmed at the protein level (Fig. 2C), demonstrates that MAL is sufficient to induce Rnd3 expression and identifies it as a MAL target gene. However, we found that expression of dominant negative MAL did not alter Rnd3 expression, suggesting that the basal expression of Rnd3 is independent on MAL in Huh7 cells. This link between MAL and Rnd3 was further confirmed in other cancer cells, as MAL WT and MAL Δ N significantly induced endogenous Rnd3 expression also in the human breast

adenocarcinoma cell line, MDA-MB-231 (Fig. S1A-B). Using the same experiment, we also ask whether this effect of MAL was specific of Rnd3 or whether the same regulation occurs on other Rho family members. We found that the expression of the four Rho GTPases, RhoA, Rac1, Cdc42 and Rnd2 were not altered upon MAL expression in Huh7 cells (Fig. 2D). But, on the other hand, Rnd1 expression was significantly induced by MAL WT and MAL Δ N, as found for Rnd3 (Fig. 2D). Thus, our data indicated that both Rnd1 and Rnd3 are controlled by MAL transcriptional coactivator.

The proximal promoter of Rnd3 is regulated through actin and MAL-SRF pathway

A genome-wide screen previously identified a functional CARG element in the mouse Rnd3 promoter (Sun et al., 2006). We thus analysed human Rnd3 promoter and found a conserved potential SRF-binding site at -101 in its proximal region (Fig. 3A). Thus, in order to better characterise the way Rnd3 expression is regulated by the MAL-SRF pathway, we generated a luciferase reporter construct containing the [-1759; +248] region of Rnd3 promoter, which includes the putative CARG box. We found that this fragment was activated by cytochalasin D and serum (Fig. 3B-C), in conditions where the MAL-SRF pathway was activated as monitored using the P3DA luciferase reporter, that contains three SRF binding sites (Busche et al., 2008) (Fig. 3B-C). To directly test the effect of MAL on Rnd3 promoter, we transiently co-transfected MAL constructs with the luciferase reporters. We found that MAL WT and MAL Δ N expressions strongly induced Rnd3 promoter activity in all tested cell types, HepG2 (Fig. 4A), Huh7 (Fig. 4B) and MDA-MB-231 cells (Fig. S1C). In addition, whereas MAL Δ N Δ B construct had a dominant negative effect on the P3DA activity, it had no impact on Rnd3 promoter. This latter result is consistent with the absence of effect of the same construct on endogenous Rnd3 expression (Fig. 2 B-C). We then mutated the putative CARG box in the human Rnd3 promoter cloned in the luciferase reporter and addressed its impact on Rnd3 promoter activity (Fig. 5A). We found that the mutations significantly decreased Rnd3 reporter activity in Huh7 cells (Fig. 5B) and also inhibited the Rnd3 reporter induction by MAL WT and MAL Δ N (Fig. 5C).

The recruitment of the transcription factor SRF to the Rnd3 promoter was further analysed by chromatin immunoprecipitation. The known MAL-regulated *ITGB1* gene, encoding β 1-integrin and the *GAPDH* gene were used as, respectively, positive and negative controls. These ChIP experiments were performed using the commonly used HEK293 cell line and the hepatoma HepG2 cell line. Our results clearly demonstrate that SRF is bound to Rnd3 promoter upon basal conditions, similar to the β 1-integrin positive control (Fig. 5D). In contrast, neither the *GAPDH* gene nor the control antibody resulted in a positive ChIP. Together, these results

strongly demonstrated that Rnd3 is a novel target of MAL-SRF pathway.

Rnd3 is part of an *incoherent feed-forward* loop

In order to further confirm these data, we used RNA interference to knock-down either MAL or SRF (Fig. 6A) and first monitored Rnd3 promoter activity (Fig. 6B). As a target of MAL-SRF pathway, we found that both treatments led to a significantly decrease in Rnd3 reporter activity (Fig. 6B). We next made the same experiment and analysed endogenous Rnd3 expression. Surprisingly, we found that MAL or SRF knock-down led to an increase in Rnd3 expression at mRNA (Fig. 6C) and protein (Fig. 6D) levels both in Huh7 and MDA-MB-231 cells. Altogether, these results demonstrate that Rnd3 expression is highly dependent on MAL and SRF expression level in cells, and suggest that Rnd3 may be part of a molecular network with dose-dependent biphasic behaviour. Indeed, both silencing of MAL/SRF and expression of MAL led to Rnd3 overexpression. This phenomenon could be explained by an *incoherent feed-forward* loop (Kim et al., 2008), in which the transcription activator complex MAL-SRF may activate Rnd3 directly, but also activates a repressor of Rnd3 (Fig. S2).

Rnd3 modulation affects MAL-SRF pathway

Rnd3 protein is a well-known regulator of RhoA functions in cells and RhoA is a key regulator of the MAL-SRF pathway. Thus, we first confirmed the antagonistic impact of RhoA and Rnd3 on stress fibre formation. Indeed, whereas expression of the constitutively active form of RhoA favours stress fibres, expression of wild-type Rnd3 inhibit their formation in Huh7 cells (Fig. S3). We then aim at analysing the impact of Rnd3 and MAL constructs on RhoA activity in hepatocellular carcinoma cells. As previously demonstrated, Rnd3 overexpression led to a decrease in RhoA activity in Huh7 cells (Fig. 7A), consistent with its impact on stress fibre formation. Interestingly, we also found that expression of MAL WT and Δ N induces a slight decrease in RhoA activity (Fig. 7A), suggesting a feedback loop between RhoA and MAL/SRF, involving Rnd3. We next analysed the impact of Rnd3 modulation on MAL/SRF activity using the P3DA reporter. We first addressed the impact of Rnd3 knock-down using Huh7 cell line that stably expresses a Rnd3 targeted shRNA upon doxycycline treatment. We found that Rnd3 depletion induces SRF activation as monitored using the P3DA reporter (Fig. 7B). We performed the reverse experiment and found that expression of Rnd3 in Huh7 cells decreases SRF activity (Fig. 7C). Altogether these data suggest that Rnd3 is a key player in the regulation of the MAL-SRF pathway, which in return regulates its expression. This complex interplay is depicted on Fig. 7D.

Rnd3 / MAL-SRF interplay in mechano-sensitive functions

Mechanical cues that occur upon cell-matrix interaction or cell-cell interaction are well known activators of the MAL-SRF mechanotransduction pathway. We thus addressed the importance of Rnd3 / MAL-SRF interplay in these functions. First, we analysed the impact of MAL construct and Rnd3 expressions on Huh7 cells spreading on fibronectin. To do so, we used the stable Huh7 cell line that expresses an Rnd3-targeting shRNA upon doxycycline treatment, in which we transfected either MAL or Rnd3 expressing constructs. We found that expression of both MAL and Rnd3 favour Huh7 cell spreading (Fig. 8A). We further demonstrated that addition of doxycycline, that allows Rnd3 depletion, abolishes MAL-induced spreading (Fig. 8A), demonstrating the involvement of Rnd3 in this MAL-dependant process. Second, we addressed the involvement of MAL and Rnd3 in spheroid formation that requires cell-cell interaction. Overexpressing either MAL WT and ΔN or Rnd3 in Huh7 cells led to irregular-shaped spheroids as monitored by analysing the circularity of the spheroid 24 hours after seeding (Fig. 8B). Interestingly, this MAL-induced phenotype is also rescued upon Rnd3 depletion (Fig. 8B). These findings demonstrate the interplay of MAL and Rnd3 in mechanosensitive functions.

DISCUSSION

Here, we identified the MAL-SRF pathway as a novel regulator of the expression of the Rho GTPase Rnd3/RhoE. As Rnd3 is not regulated by the classical GDP/GTP cycle, our data give new insights into the regulation of this atypical Rho family member. We demonstrated that the regulation of Rnd3 by MAL-SRF pathway is direct and occurs at the transcriptional level. Indeed, we identified a CArG box in Rnd3 promoter and found that SRF is able to bind to this site. Introducing mutations into this CArG box abolishes SRF-dependent Rnd3 reporter activity in Huh7 cells. Interestingly, we found that this regulation occurs in all human cell types tested, including liver tumor cells (Huh7 and HepG2 cells), breast adenocarcinoma cells (MDA-MB-231 cells) and embryonic kidney cells (HEK293), suggesting that this regulation may arise in various tissues. Thus, these data confirm computational approaches (Sun et al., 2006) and large-scale studies as ChIP-seq (Esnault et al., 2014) in which Rnd3 appears in the list of serum-responsive SRF target genes. Thus, on one hand, our findings clearly demonstrate that Rnd3 is a novel transcriptional target of the MAL-SRF pathway. On the other hand, by investigating Rnd3 response to MAL-SRF pathway, we also found that this regulation is more complex than initially expected. Indeed, Rnd3 expression increases upon MAL-SRF activation, but also upon MAL or SRF silencing, which reflects dose-dependant biphasic behaviour. This behaviour is a feature of an incoherent feed-forward loop in which two parallel pathways have opposite functional role. Thus, as depicted on figures S2 and 7D, the regulatory network between MAL-SRF and Rnd3 is believed to involved an additional factor that i) favours Rnd3 mRNA expression and ii) is repressed upon MAL-SRF activation. From our data, this unknown factor may act at the post-transcriptional or translational level as silencing MAL or SRF does not increase Rnd3 reporter activity. Interestingly, Rnd3 3'untranslated-region (3'UTR) is large (1791 nucleotide long), and contains various regulatory elements such as AU-rich elements and predicted or validated microRNA-binding sites (data not shown and (Chang et al., 2014; Luo et al., 2012; Xia et al., 2010)). To date MAL-SRF activation is also known to modulate non-coding RNA such as microRNAs (miRNAs) or long intergenic noncoding RNA clusters (lincRNAs) (Esnault et al., 2014), that may play a role into this incoherent feed-forward loop. Thus, further experiments are required to identify this intermediate factor and better characterize this complex regulation. The fact that activation of MAL-SRF pathway led to an increase of Rnd3 expression prompt us to analyse the expression of RhoA, Rac1 and Cdc42 expression in addition to the other members of the Rnd subfamily in the same conditions. We found that expression of none of these Rho family members were altered upon MAL expression, except Rnd1 that behaved like Rnd3 in Huh7 cells. However, this regulation is believed to be

indirect as no CARG box was found in Rnd1 promoter (data not shown). Thus, Rnd3 is one of the only Rho members that respond to the mechanotransduction regulation of MAL-SRF. To date RhoB and TCL/RhoJ were also found as serum-responsive genes (Esnault et al., 2014), but only TCL/RhoJ seems to be regulated upon SRF activation and cytoskeletal changes (Esnault et al., 2014; Ragu et al., 2010).

The fact that Rnd3 is a direct target of MAL-SRF pathway is of particular interest as this protein is key in the modulation of actin cytoskeleton and actin-myosin contractility. Indeed Rnd3 antagonistically regulated RhoA by at least three different mechanisms: i) inhibiting its downstream effector ROCK-I (Riento et al., 2003), ii) increasing the RhoGAP activity of its negative regulator, p190RhoGAP (Riento et al., 2003; Wennerberg et al., 2003), and iii) by inhibiting its positive regulator, the GEF Syx (Goh and Manser, 2010). Interestingly, we also found that MAL expression allows a slight decrease in active RhoA level. In this line, we also found that modulation of Rnd3 expression alters SRF promoter activity. All these data suggest a feedback loop between RhoA and MAL-SRF, involving Rnd3. Thus, Rnd3 is part of the physical coupling between actomyosin and the nucleus, and consequently of the inside-out signalling in which the MAL-SRF pathway is involved. This is illustrated in our study by the involvement of Rnd3 in MAL-SRF dependent cell spreading on fibronectin, that requires assembly of focal contacts and spatiotemporal regulation of actomyosin contractility. Upon adhesion to fibronectin, inhibition of RhoA is required to decrease contractility and allow spreading (Arthur and Burridge, 2001), thus consistently, we found that both MAL or Rnd3 overexpression favours Huh7 cell spreading. Cell-cell adhesion is also a mechanism that involved the MAL-SRF mechanotransduction pathway. Thus, we analysed the interplay of Rnd3 and MAL-SRF in spheroid formation. In this mechanism, formation of compact spheroids is known to occur through homophilic cadherin-cadherin interactions and Rho-dependant cell contractility (Lakshman et al., 2007; Lin and Chang, 2008). Consistent with their impact on RhoA activity, we also found that activation of MAL-SRF pathway through the expression of MAL WT or constitutively active MAL alters the formation of spheroids in an Rnd3-dependant manner. Altogether, our data highlight Rnd3 as a MAL-SRF target and demonstrate its implication in the feedback loop described between the MAL-SRF pathway and the control of RhoA-dependent acto-myosin contractility.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

The human hepatocellular carcinoma Huh7, hepatoblastoma HepG2, breast carcinoma MDA-MB-231 and epithelial kidney HEK293 cell lines were purchased from American Type Culture Collection. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco®) containing Glutamax and 4.5 g/l glucose supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS) and 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. All cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. To induce a stable suppression of endogenous Rnd3 expression, we generated a Huh7 cell line with conditional, doxycycline-dependent, expression of Rnd3 shRNA. The Rnd3 shRNA was constructed as described previously (Grise et al., 2012). Huh7 cells conditionally expressing the Rnd3 shRNA were obtained upon transduction of cells with lentiviral particles at a multiplicity of infection of 5 using the method described previously (Grise et al., 2012). Huh7-shRnd3 cells were cultured as described above and the shRNA expression was induced by a doxycycline treatment (500 ng/mL).

Small hairpin lentiviral vector construction and establishment of stable cell lines

To induce a stable suppression of endogenous Rnd3 expression, we generated a Huh7 cell line with conditional, doxycycline-dependent, expression of Rnd3 shRNA. The Rnd3 shRNA was constructed as described previously (Grise et al., 2012). Huh7 cells conditionally expressing the Rnd3 shRNA were obtained upon transduction of cells with lentiviral particles at a multiplicity of infection of 5 using the method described previously (Grise et al., 2012).

Antibodies and reagents

Monoclonal mouse anti-Rnd3 (clone 4) antibodies were from Millipore (#05-723); mouse anti-RhoA (sc-418), anti-GFP (sc-9996), rabbit anti-SRF (G-20, sc-335) and anti-GAPDH (sc-25778) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology. Monoclonal rat anti-HA (clone 3F10) and mouse anti-HA (clone 12CA5) antibodies were from Roche Applied Science. Monoclonal mouse anti-Flag antibodies (M2, F3165) were from Sigma. Polyclonal rabbit anti-MKL1 antibodies were from Abcam (ab49311). Control IgG1 used for ChIP experiments was from Thermo Fischer. Alexa-Fluor-546-phalloidin was purchased from Molecular Probes. Hoechst (34580, Invitrogen) was used to stain nuclei. Fibronectin (F1056), Cytochalasin D (C8273) and doxycycline (D9891) were purchased from Sigma.

Plasmid constructs

Constructs encoding constitutively active mutants of RhoGTPases (GFP-V14RhoA, GFP-L61Rac1 and GFP-V12Cdc42) were kindly provided by Philippe Fort (Montpellier, France). The pLVX-Rnd3-GFP lentiviral vector was engineered using PCR from the pXJ40-Flag-SBP-Rnd3 plasmid, obtained from Ed Manser (AStar, Singapore) (Goh and Manser, 2010), as matrix and subcloned into pLVX-EF1 α -AcGFP1-N1 vector using BstB1 and Sma1 restriction sites. P3DA-Luciferase reporter and its mutated version p2MA-Luciferase reporter, and pEF-MAL(WT)-HA, pEF-MAL(Δ N)-HA et pEF-MAL(Δ N Δ B)-HA were given by Dr. G. Posern (Halle, Germany) and were described previously (Busche et al., 2008). pLVX-MAL(fl)-GFP, pLVX-MAL(Δ N)-GFP and pLVX-MAL(Δ N Δ B)-GFP were engineered using PCR from the pEF-MAL plasmids as matrix and subcloned into pLVX-EF1 α -AcGFP1-N1 vector using BstB1 and Sma1 restriction sites. Rnd3 promoter [1759, +248] amplified from HepG2 genomic DNA using the following primers 5'- GAGCTCTCCTCATAATTACCATTAT-3' and 5'- AAAGCTTGATGTTGCCTTATTTTCTC-3', was cloned into the pGL4.10 (Promega) using SacI and HindIII restriction sites. The reporter construct encoding Renilla luciferase under the thymidine kinase (TK) promoter was a generous gift from Dr. C. Gauthier-Rouvière (Montpellier, France).

Transfection

DNA transfections were performed in HepG2 and Huh7 cells using the promofectin-hepatocyte transfection reagent (Promocell) according to manufacturer's protocol. DNA transfections were performed in MDA-MB-231 cells using lipofectamine 3000 transfection reagent (ThermoFischer) according to manufacturer's protocol. siRNA oligos were purchased from Qiagen and transfected into cells with Lipofectamine RNAiMax Reagent (Invitrogen, Life Technologies) according to manufacturer's protocol. siMAL targets human MRTF-A at 5'- ATCACGTGTGATTGACATGTA-3' and siSRF targets human SRF at 5'- CAAGATGGAGTTCATCGACAA-3'. As control, we used the AllStars negative-control siRNA from Qiagen.

Western-blot analysis and pull-down assay

Cells were lysed on ice in radio-immunoprecipitation assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.6% NP-40) with protease and phosphatase inhibitors. Cell lysates were cleared of cellular debris and nuclei by a 16,000 \times g centrifugation step for 10 min. Lysates were denatured with Laemmli loading buffer containing 2.5% 2- β -mercaptoethanol, analysed by

SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose membranes. Blots were incubated overnight at 4°C with primary antibodies, then incubated with infrared fluorescent dye-conjugated secondary antibodies (LI-COR) and activity was visualized with Odyssey infrared imaging system (LI-COR). The antibodies used were: anti-Rnd3 (1/250e); anti-RhoA (1/250e); anti-GAPDH (1/2000e); anti-GFP (1/1000e); anti-HA 12CA5 (1/2000e); anti-MAL (1/500); anti-SRF (1/1000); anti-Flag (1/1000e).

For the active-RhoA pulldown assays, cells were scraped off on ice and homogenized in lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 2% NP-40, protease and phosphatase inhibitors, PMSF 1X, NaVO₄ 1X). Cell lysates were cleared of cellular debris and nuclei by a 16,000 × g centrifugation step for 10 min. Then 60 µg of GST beads conjugated with Rhotekin binding domain (RBD, cytoskeleton) were added to the cell lysates, incubated 1h30 at 4°C under rotation. Then the samples were centrifuged at 5000 g during 1 min, the supernatant was removed and the beads were washed twice using washing buffer (25 mM Tris pH 7.5, 30 mM MgCl₂, 40 mM NaCl, protease and phosphatase inhibitors 1X, PMSF 1X, NaVO₄ 1X). Finally, beads were suspended with Laemmli loading buffer containing 2.5% 2-β-mercaptoethanol, and the RhoA activity was assessed by SDS-Page electrophoresis. Inputs before pulldown were used to provide a control of total RhoA expression in each experiment.

Real-time PCR

RNA was collected from cultured cells using the Trizol reagent (Invitrogen), according to manufacturer's protocol. cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA with Maxima® Reverse Transcriptase (Fermentas) using a mix of oligo(dT)18 and random hexamer primers. 30 ng of cDNA were then subjected to PCR amplification on a StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems) with specific forward and reverse oligonucleotide primers. The SYBR® Green SuperMix for iQTM (Quanta Biosciences, Inc.) was used with the following PCR amplification cycles: initial denaturation, 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles with denaturation, 95°C for 15 seconds and annealing-extension, 60°C for 1 minute. A dissociation curve was generated to verify that a single product was amplified. Gene expression results were first normalized to internal control r18S. Relative levels of expression were calculated using the comparative (2-ΔΔCT) method. All primers used for qRT-PCR experiments are listed in Table 1.

Luciferase reporter assay

Cells were seeded on 96-well plates and co-transfected with 64 ng of desired Firefly luciferase reporter plasmid and 25 ng of constitutively active thymidine kinase promoter (TK)-Renilla luciferase reporter plasmid. Cells were incubated 24 h at 37°C, and were then lysed and assayed for Firefly and Renilla activity using Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega). Firefly luciferase activity of each sample was normalized to Renilla luciferase activity to take into account difference in transfection efficiencies.

Site-directed mutagenesis

Point mutations were generated in the parental vector pGL4.10-Rnd3-Luc by site-directed mutagenesis using the QuikChange II XL kit according to the manufacturer's protocol (Agilent Technology). Primers used for these constructs are 5'-gctcgctcccaggctccgcgcaaggggaggaggcagat-3'; 5'-atctgcctcctccccttgcgaggagcctgggagcgagc-3'. Point mutations were verified by sequencing (Beckman Coulter Genomics).

Chromatin immunoprecipitation

Chromatin immunoprecipitation was performed in HepG2 and HEK293T cells. Briefly, cells were cultured to 80% confluence, fixed with 1% formaldehyde, quenched with 125 mM glycine and washed in cold PBS. Cells were then mechanically recovered, centrifuged and lysed in lysis buffer (10 mM Tris pH 8, 10 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.1mM EDTA, 0.5% NP-40, protease and phosphatase inhibitor cocktail). Lysates were centrifuged and recovered in resuspension buffer (50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA, 1% SDS, protease and phosphatase inhibitor cocktail). Obtained lysates were then sonicated using Bioruptor Sonicator (Diagenode). Lysates were centrifuged and supernatant containing chromatin was then diluted in dilution buffer A (150 mM KCl, 20 mM Tris pH 8, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 0.2% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA). Diluted chromatin was precleared with blocked protein A-sepharose beads (BSA, sheared salmon sperm DNA). Blocked protein A-sepharose beads and antibodies (1 µg) were added to the chromatin for 3 hours under agitation and at 4°C to perform the immunoprecipitation step. After centrifugation, pellets were washed sequentially with dilution buffer A (150 mM KCl, 20 mM Tris pH 8, 10 % glycerol, 1% Triton X-100, 0.2% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA), a low salt buffer (20 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100), a high salt buffer (20 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100), and with the low salt buffer again. After a centrifugation step, pellets are diluted with freshly prepared elution buffer (1% SDS, 0.1 M NaHCO₃). After a 15 min incubation time at room

temperature, lysates are centrifuged and supernatants are recovered in new tubes. Chromatin is then treated with RNase A and proteinase K to reverse crosslink and DNA is purified with a phenol/chloroform/isoamylalcohol extraction. DNA is dosed with Xpose (Proteigene) and targets are evaluated by PCR. Primers used are as follow: negative control GAPDH (5'-AAAAGCGGGGAGAAAGTAGG-3'; 5'-CTAGCCTCCCGGGTTTCTCT-3'); positive control β 1 integrin (5'-TGACAGATTTCTCAAAGCAGTCTC-3'; 5'-GCTATGACAACAGACACCTGAAAC-3'); gene of interest Rnd3 (5'-TAGAGGGCGCACTGCTTACA-3'; 5'-CTCTCTGCGCGGCTTTATAC-3'). GAPDH and β 1 primers were previously described (Brandt et al., 2009).

Spreading assay

Glass coverslips were coated with fibronectin (10 μ g/mL) then incubated 1 h at 37°C. Cells were seeded on fibronectin-coated coverslips and fixed 25 min later with 4% paraformaldehyde, pH 7.2, for 10 min. Fixed cells were then permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 1 min, and incubated with Alexa-Fluor-546-phalloidin (1/250e) to label F-actin. Cells were imaged with a Zeiss Axioplan 2 epifluorescence microscope. Images were analysed using Image J software.

Spheroid formation assay

Three-dimensional multicellular spheroids were prepared by seeding cells on a non-adherent surface. In brief, 96-well tissue culture microplates were coated with 75 μ l of 1.5% agar in water and incubated 1h30 at room temperature. 2000 cells were then added per well, and incubated at 37°C in complete culture medium. Spheroid formation was assessed 24 h later under a microscope (Zoe, BioRad). Spheroid circularity was measured using Image J software.

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 Student's *t*-test or analysis of variance (ANOVA) as appropriate and performed with GraphPad Prism software.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs G. Posern (Halle, Germany), E. Manser (AStar, Singapore), C. Gauthier-Rouvière (Montpellier, France) and P. Fort (Montpellier, France) for DNA constructs; Dr. A. Sotiropoulos (Cochin Institute, Paris, France) for helpful discussions. We thank Dr. Martin Teichman (Bordeaux, France) for his help with the chromatin immunoprecipitation protocol and the access to the Bioruptor sonicator. We thank Léa Bernaleau (Bordeaux University) for her help in spheroid and spreading experiments. Microscopy was done in the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France BioImaging.

Competing interests

No competing interests declared.

Author contributions

L.P. and T.R. performed experiments and analysed data; S.R. cloned Rnd3 promoter. V.M. conceived the study and wrote the manuscript. F.S. critically discussed the experiments and read the paper.

Funding

L. Piquet is supported by a PhD fellowship from the SIRIC BRIO. This work was supported by grants from La Ligue Nationale contre le Cancer “Equipe labellisée 2016” (to V. M. and F. S.), from ANR-13-JJC-JSV1-0005 and “Institut National du Cancer, PL-BIO2015” (to F. S.) and from “Institut National du Cancer, PL-BIO2014” (to V. M.).

REFERENCES

- Arthur, W.T., and K. Burridge. 2001. RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. *Mol Biol Cell*. 12:2711-2720.
- Brandt, D.T., C. Baarlink, T.M. Kitzing, E. Kremmer, J. Ivaska, P. Nollau, and R. Grosse. 2009. SCAI acts as a suppressor of cancer cell invasion through the transcriptional control of beta1-integrin. *Nat Cell Biol*. 11:557-568.
- Busche, S., A. Descot, S. Julien, H. Genth, and G. Posern. 2008. Epithelial cell-cell contacts regulate SRF-mediated transcription via Rac-actin-MAL signalling. *J Cell Sci*. 121:1025-1035.
- 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.
- Cooper, J.A. 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol*. 105:1473-1478.
- Esnault, C., A. Stewart, F. Gualdrini, P. East, S. Horswell, N. Matthews, and R. Treisman. 2014. Rho-actin signaling to the MRTF coactivators dominates the immediate transcriptional response to serum in fibroblasts. *Genes Dev*. 28:943-958.
- 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.
- Goddette, D.W., and C. Frieden. 1985. The binding of cytochalasin D to monomeric actin. *Biochem Biophys Res Commun*. 128:1087-1092.
- Goh, L.L., and E. Manser. 2010. The RhoA GEF Syx is a target of Rnd3 and regulated via a Raf1-like ubiquitin-related domain. *PloS one*. 5:e12409.
- Grise, F., A. Bidaud, and V. Moreau. 2009. Rho GTPases in hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta*. 1795:137-151.
- 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*. 55:1766-1775.
- Guasch, R.M., P. Scambler, G.E. Jones, and A.J. Ridley. 1998. RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *Molecular and cellular biology*. 18:4761-4771.
- Hall, A. 2012. Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans*. 40:1378-1382.
- Hill, C.S., J. Wynne, and R. Treisman. 1995. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*. 81:1159-1170.
- Jie, W., K.C. Andrade, X. Lin, X. Yang, X. Yue, and J. Chang. 2015. Pathophysiological Functions of Rnd3/RhoE. *Compr Physiol*. 6:169-186.
- Kim, D., Y.K. Kwon, and K.H. Cho. 2008. The biphasic behavior of incoherent feed-forward loops in biomolecular regulatory networks. *Bioessays*. 30:1204-1211.
- Lakshman, N., A. Kim, K.J. Bayless, G.E. Davis, and W.M. Petroll. 2007. Rho plays a central role in regulating local cell-matrix mechanical interactions in 3D culture. *Cell Motil Cytoskeleton*. 64:434-445.
- Lin, R.Z., and H.Y. Chang. 2008. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J*. 3:1172-1184.
- Lockman, K., J.S. Hinson, M.D. Medlin, D. Morris, J.M. Taylor, and C.P. Mack. 2004. Sphingosine 1-phosphate stimulates smooth muscle cell differentiation and proliferation by activating separate serum response factor co-factors. *J Biol Chem*. 279:42422-42430.

- Luo, H., J. Zou, Z. Dong, Q. Zeng, D. Wu, and L. Liu. 2012. 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.
- Mammoto, A., and D.E. Ingber. 2009. Cytoskeletal control of growth and cell fate switching. *Curr Opin Cell Biol*. 21:864-870.
- Mendez, M.G., and P.A. Janmey. 2012. Transcription factor regulation by mechanical stress. *Int J Biochem Cell Biol*. 44:728-732.
- Miralles, F., G. Posern, A.I. Zaromytidou, and R. Treisman. 2003. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell*. 113:329-342.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 81:53-62.
- 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.
- Olson, E.N., and A. Nordheim. 2010. Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11:353-365.
- Paysan, L., L. Piquet, F. Saltel, and V. Moreau. 2016. Rnd3 in Cancer: a Review of the Evidence for Tumor Promoter or Suppressor. *Mol Cancer Res*.
- Ragu, C., G. Elain, E. Mylonas, C. Ottolenghi, N. Cagnard, D. Daegelen, E. Passegue, W. Vainchenker, O.A. Bernard, and V. Penard-Lacronique. 2010. The transcription factor Srf regulates hematopoietic stem cell adhesion. *Blood*. 116:4464-4473.
- Rajakyla, E.K., and M.K. Vartiainen. 2014. Rho, nuclear actin, and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *Small GTPases*. 5:e27539.
- Riento, K., R.M. Guasch, R. Garg, B. Jin, and A.J. Ridley. 2003. RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Molecular and cellular biology*. 23:4219-4229.
- Riento, K., P. Villalonga, R. Garg, and A. Ridley. 2005. Function and regulation of RhoE. *Biochemical Society transactions*. 33:649-651.
- Riou, P., P. Villalonga, and A.J. Ridley. 2010. Rnd proteins: multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression. *Bioessays*. 32:986-992.
- Sun, Q., G. Chen, J.W. Streb, X. Long, Y. Yang, C.J. Stoeckert, Jr., and J.M. Miano. 2006. Defining the mammalian CARome. *Genome Res*. 16:197-207.
- Wennerberg, K., M.A. Forget, S.M. Ellerbroek, W.T. Arthur, K. Burridge, J. Settleman, C.J. Der, and S.H. Hansen. 2003. Rnd proteins function as RhoA antagonists by activating p190 RhoGAP. *Curr Biol*. 13:1106-1115.
- Xia, W., J. Li, L. Chen, B. Huang, S. Li, G. Yang, H. Ding, F. Wang, N. Liu, Q. Zhao, T. Fang, T. Song, T. Wang, and N. Shao. 2010. MicroRNA-200b regulates cyclin D1 expression and promotes S-phase entry by targeting RND3 in HeLa cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 344:261-266.
- Zhao, X.H., C. Laschinger, P. Arora, K. Szaszi, A. Kapus, and C.A. McCulloch. 2007. Force activates smooth muscle alpha-actin promoter activity through the Rho signaling pathway. *J Cell Sci*. 120:1801-1809.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1: Rnd3 expression is sensitive to G/F-actin levels.

(A) Huh7 cells were treated with cytochalasin D (2 μ M, 7 h) and Rnd3 mRNA and protein levels were evaluated by qRT-PCR and Western Blot, respectively. Shown is the mean relative Rnd3 mRNA level compared to control cells. Error bars indicate s.e.m. (n=3). * $P < 0.05$ in paired Student's t-test. Protein extracts were analyzed by immunoblotting using Rnd3, and GAPDH antibodies. (B) Huh7 cells were transfected or not (NT) with constitutively active V14-RhoA, L61-Rac1 and V12-Cdc42. After 24 hours of transfection, Rnd3 mRNA level was evaluated by qRT-PCR. Shown is the relative mRNA level compared to control NT cells. Error bars indicate s.e.m (n=3). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ by one way ANOVA. (C) Huh7 cells were serum starved 24 h and then stimulated or not 7 h with 10% FCS. Rnd3 mRNA and protein levels were evaluated by qRT-PCR and Western Blot, respectively. Shown is the mean relative Rnd3 mRNA level in unstimulated (control), starved and stimulated conditions. Error bars indicate s.e.m (n=3). * $P < 0.05$ by one way ANOVA.

Fig. 2: Rnd3 expression is modulated by MAL in cancer cell lines.

(A) Huh7 cells were transfected or not (NT) with HA-tagged MAL constructs (wild-type MAL (MAL (fl), constitutively active MAL (MAL Δ N) or dominant negative MAL (MAL Δ N Δ B)). After 24 hours, cells were fixed and stained for F-actin (red), HA (green) and nuclei (blue). Scale bar: 20 μ m. (B) Cells were transfected as described in (A) and after 24 hours, endogenous Rnd3 mRNA levels were analysed by qRT-PCR. (C) Huh7 cells were treated as in (A). After 24 hours, protein extracts were analysed by immunoblotting using anti-HA, Rnd3 and GAPDH antibodies (left panel). Right panel: quantification of Rnd3 protein levels normalized to GAPDH. (D) MAL constructs were transfected in Huh7 cells, and relative mRNA level of classical Rho GTPases (RhoA, Rac1 and Cdc42) and other members of the Rnd family (Rnd1, Rnd2) was analysed by qRT-PCR. Shown is the relative mRNA level compared to control non-transfected cells. (B-D) Each graph shows the quantification of three independent experiments. Error bars indicate s.e.m (n=3) * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ by one way ANOVA.

Fig. 3: The proximal promoter of Rnd3 is regulated upon actin remodeling and serum stimulation.

(A) The proximal promoter of Rnd3 contains a putative SRF binding site CCATAAAAGG (-101;-91). (B) HepG2 cells were transiently transfected with SRF reporter p3DA-Luc, its control

mutated version p2MA-Luc or Rnd3 reporter containing Rnd3 promoter [1759,+248] and treated or not with cytochalasin D (2 μ M, 7 h). Analysis of SRF and Rnd3 promoter activity was performed by luciferase reporter assays. Shown is the mean relative luciferase activity, normalised to Renilla luciferase. Error bars indicate s.e.m (n=3), * P < 0.05; ** P < 0.01, by paired Student's *t*-test. (B) HepG2 cells, transfected as in (A), were serum starved 24h and then stimulated or not 7 h with 10% FCS. Analysis of SRF and Rnd3 promoter activity was performed by luciferase reporter assays. Shown is the mean relative luciferase activity, normalised to Renilla luciferase. Error bars indicate s.e.m (n=3); ** P < 0.01; *** P < 0.001 by one way ANOVA.

Fig. 4: The proximal promoter of Rnd3 is regulated through MAL-SRF pathway in hepatoma cell lines.

(A) HepG2 cells were co-transfected or not (NT) with HA-tagged MAL constructs (wild-type MAL (MAL (fl), constitutively active MAL (MAL Δ N) or dominant negative MAL (MAL Δ N Δ B)) and SRF or Rnd3 reporters. Expression of these constructs was assessed by immunoblot with 40 μ g of lysates using anti-HA antibodies; GAPDH was used as loading control. Analysis of SRF and Rnd3 promoter activity was performed by luciferase reporter assays. Same experiments were performed in Huh7 cells (B). Shown is the mean relative luciferase activity, normalised to Renilla luciferase. Error bars indicate s.e.m (n=3), * P < 0,05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 by one way ANOVA.

Fig. 5: SRF binds to Rnd3 promoter.

(A) Mutation of SRF putative binding site in Rnd3 promoter was performed using site-directed mutagenesis. SRF putative binding site in Rnd3 promoter before and after mutation is represented. (B) Huh7 cells were transfected with either the wild-type (Rnd3) or the mutated Rnd3 promoter (mut Rnd3). Analysis of promoter activity was performed using luciferase reporter assays. Shown is the mean relative luciferase activity, normalised to Renilla luciferase. Error bars indicate s.e.m. (n=3), * P < 0.05, paired Student's *t*-test. (C) Huh7 cells were co-transfected with the wild-type (Rnd3) or the mutated Rnd3 promoter (mut Rnd3) and either the HA-tagged wild-type MAL (MAL (fl)) or the constitutively active MAL (MAL Δ N) construct. Shown is the mean relative luciferase activity, normalised to Renilla luciferase. Error bars indicate s.e.m. (n=3), * P < 0.05, paired Student's *t*-test. (D) Binding of SRF on Rnd3 promoter was evaluated by chromatin immunoprecipitation (ChIP) in HEK293T and HepG2 cells. ChIP was performed using a anti-SRF antibody and a control irrelevant IgG1 antibody. PCR

amplification was performed using primers specific of the positive control *ITGB1*, the negative control *GAPDH* and the gene of interest *RND3*.

Fig. 6: MAL/SRF depletion modulates Rnd3 expression.

(A) Knock-down of MAL and SRF in HepG2 cells. HepG2 cells were transfected using MAL (siMAL) or SRF (siSRF) targeting siRNAs or a non-targeting siRNA (siCtl). After 48 hours, protein extracts were analysed by immunoblotting using anti-MAL, SRF and GAPDH antibodies. (B) HepG2 cells were first transfected using indicated siRNAs, and then using Rnd3 luciferase reporter. Shown is the mean relative luciferase activity, normalised to Renilla luciferase. Error bars indicate s.e.m (n=3), * P < 0.05; ** P < 0.01 by one way ANOVA. (C) Huh7 (left-hand panel) or MDA-MB-231 (right-hand panel) cells were transfected using MAL or SRF targeting siRNAs. After 48 hours, endogenous Rnd3 mRNA level was evaluated by qRT-PCR. Shown is the mean relative Rnd3 mRNA level compared to control cells treated with a non-targeting siRNA (siCtl). Error bars indicate s.e.m (n=3), * P < 0.05, ** P<0.01, *** P < 0.001 by one way ANOVA. (D) Protein extracts from Huh7 (left-hand panel) or MDA-MB-231 (right-hand panel) cells transfected with indicated siRNAs were analysed by immunoblotting using anti-Rnd3 and GAPDH antibodies.

Fig. 7: Rnd3 is part of the MAL-SRF / RhoA regulation loop.

(A) Huh7 cells were transiently transfected or not (NT) with GFP-tagged MAL constructs or Flag-tagged Rnd3. Protein extracts were analysed by immunoblotting with anti-GFP, -Flag and -RhoA antibodies. RhoA activity was assessed by a Rhotekin-RBD-Pulldown. Active RhoA bound to beads was monitored by immunoblotting with an anti-RhoA antibody. The proportion of active RhoA was normalised to the total amount of RhoA in total lysates. The bar graph shows the relative activity of RhoA compared to control cells. Error bars indicate s.e.m (n=3), * P < 0.05 by one way ANOVA. (B) Huh7-KRAB-shRnd3 cells transfected with the SRF reporter, were treated (+Dox) or not (-Dox) with doxycycline (500 ng.mL⁻¹) for 3 days to silence or not Rnd3. Depletion of Rnd3 was evaluated by Western Blot, and analysis of SRF activity was performed by luciferase reporter assays. Shown is the mean relative luciferase activity, normalised to Renilla luciferase. Error bars indicate s.e.m (n=3); ** P < 0.01 in paired Student's *t*-test. (C) Huh7-KRAB-shRnd3 cells were co-transfected with Flag-tagged Rnd3 construct and SRF reporter. Expression of recombinant Rnd3 was evaluated by immunoblot. Analysis of SRF activity was performed by luciferase reporter assays. Shown is the mean relative luciferase activity, normalised to Renilla luciferase. Error bars indicate s.e.m (n=3), ** P < 0.01 in paired

Student's *t*-test. (D) Model of the complex regulation loop between Rnd3, RhoA and MAL-SRF. Classical Rho GTPases such as RhoA activates actin polymerisation, which in turn activates MAL-SRF pathway that lead to Rnd3 expression. Rnd3 is able to reverse this activation by inhibiting RhoA activity and MAL-SRF pathway. Intriguingly, MAL/SRF depletion inhibits Rnd3 promoter activity but increases Rnd3 mRNA and protein levels similarly to the MAL-SRF pathway activation, placing Rnd3 into an incoherent feed-forward loop, where MAL-SRF also activates a repressor of Rnd3. The arrows (“→”) or “—|” indicate the necessity of upstream factors for the activation or repression of the downstream events.

Fig. 8: Rnd3 is involved in MAL-SRF dependent regulation of mechano-sensitive functions

(A) Huh7-KRAB-shRnd3 cells were transiently transfected with GFP-tagged MAL or Rnd3 constructs and treated (+Dox) or not (-Dox) with doxycycline (500 ng.mL⁻¹). 24 h later, cells were seeded on fibronectin-coated coverslips and allowed to adhere for 25 min. Spreading was observed by fluorescent microscopy after actin staining using fluorescent phalloidin. Cells that displayed sign of protrusive activity such as filopodia or lamellipodia, were scored as “spread.” Note that cells transfected with MAL Δ N Δ B or Rnd3 were not treated with doxycycline. Shown is the percentage of spread cells relative to the total number of cells. Error bars indicate s.e.m (n=3), * P < 0.05; *** P < 0.001 by one way ANOVA. Scale bar: 20 μ m. (B) Huh7-KRAB-shRnd3 cells were transiently transfected with GFP-tagged MAL or Rnd3 constructs and treated (+Dox) or not (-Dox) with doxycycline (500 ng.mL⁻¹). 24 h later, 2000 cells were seeded on agar pre-coated 96-well plate, and allowed to form spheroids for 24 h. Note that cells transfected with MAL Δ N Δ B or Rnd3 were not treated with doxycycline. Spheroid formation was inspected by light microscopy, images were taken (ZOE cell imager, BioRad) and spheroid formation was analysed for circularity index using Image J software. Shown is the relative spheroid circularity compared to control cells. Error bars indicate s.e.m (n=3), * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 by one way ANOVA.

TABLES

	Forward primers	Reverse primers
Rnd3	GCCAGCCAGAAATTATCCAGC	CTTGGCGAAGACATGGAGC
RhoA	CAGCAAGGACCAGTTCCCA	CCACCTCGATATCTGCCACAT
Rac1	ATCCGCAAACAGATGTGTTCT	CGCACCTCAGGATACCACT
Cdc42	AAGAAAAGTGGGTGCCTGAGATAAC	AATTTGAGTCCCAACAAGCAAGA
Rnd1	TGTTAGCGAAGGATTGCTATCCA	ATCCAGAGACTAAGCTCCAC
Rnd2	AAGTGGCAAGGAGAGACTCAA	GGAGCACTCAACATAGGACACA
r18S	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG

Table 1: List of the primers used in the study

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Fig. S1: Rnd3 expression is modulated by MAL in MDA-MB-231 cells.

(A) MDA-MB-231 cells were transfected or not (NT) with HA-tagged MAL constructs (wild-type MAL (MAL (fl), constitutively active MAL (MAL Δ N) or dominant negative MAL (MAL Δ N Δ B)). After 24 hours, endogenous Rnd3 mRNA levels were analysed by qRT-PCR. (B) MDA-MB-231 cells were treated as in (A). After 24 hours, protein extracts were analysed by immunoblotting using anti-HA, Rnd3 and GAPDH antibodies (upper panel). Bottom panel: quantification of Rnd3 protein levels normalized to GAPDH. (C) MDA-MB-231 cells were co-transfected or not (NT) with HA-tagged MAL constructs (wild-type MAL (MAL (fl), constitutively active MAL (MAL Δ N) or dominant negative MAL (MAL Δ N Δ B)) and SRF or Rnd3 reporters. Analysis of SRF and Rnd3 promoter activity was performed by luciferase reporter assays. Shown is the mean relative luciferase activity, normalised to Renilla luciferase. (A-C) Each graph shows the quantification of three independent experiments. Error bars indicate s.e.m (n=3) * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 by one way ANOVA.

Fig. S2: Model of the incoherent feed-forward loop between MAL-SRF and Rnd3.

Rnd3 expression increases upon MAL-SRF activation (right-hand immunoblot), but also upon MAL or SRF silencing (left-hand immunoblot), which reflects dose-dependant biphasic behaviour. This behaviour is a feature of an incoherent feed-forward loop in which two parallel pathways have opposite functional role. On the one hand, Rnd3 is a direct transcriptional target of the MAL-SRF pathway, and on the other hand, the regulatory network between MAL-SRF and Rnd3 is believed to involved an additional factor (X) that i) is repressed upon MAL-SRF activation and ii) favours Rnd3 mRNA expression. From our data, this unknown factor may act at the post-transcriptional or translational level.

Fig. S3: Antagonistic impact of RhoA and Rnd3 expression on stress fibers in Huh7 cells.

Huh7 cells were seeded on glass coverslips, transfected with GFP-Rnd3 or GFP-V14-RhoA and fixed 24 h later with paraformaldehyde. Immunofluorescence staining was performed using GFP antibodies, fluorescent phalloidin and Hoechst. Shown are representative fluorescent micrographs using a 63x objective, and merged images with F-actin in red, GFP in green and nucleus in blue. Arrow shows an Rnd3-transfected cell that lost stress fibres; arrowheads show RhoA-transfected cells with high number of stress fibres. Scale bar: 20 μ m

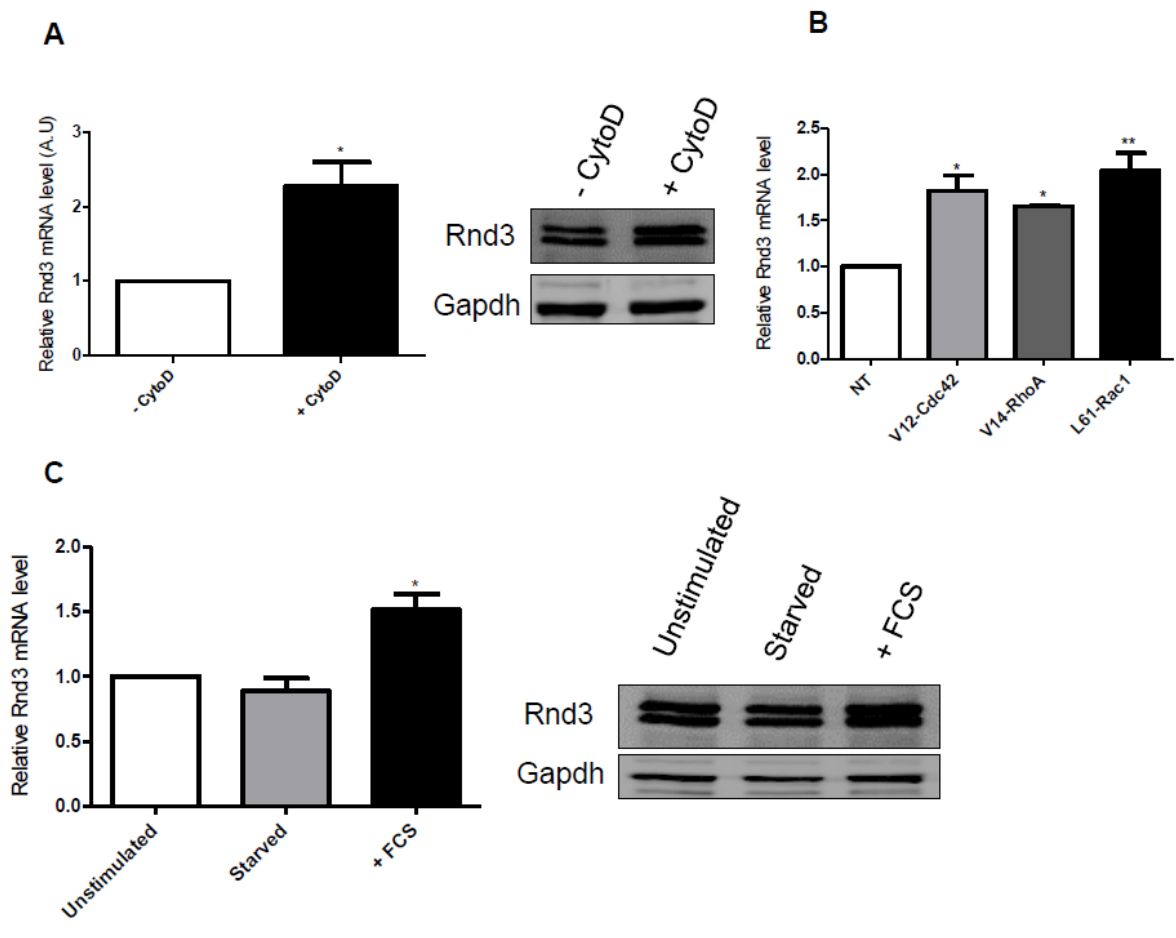


Figure 1

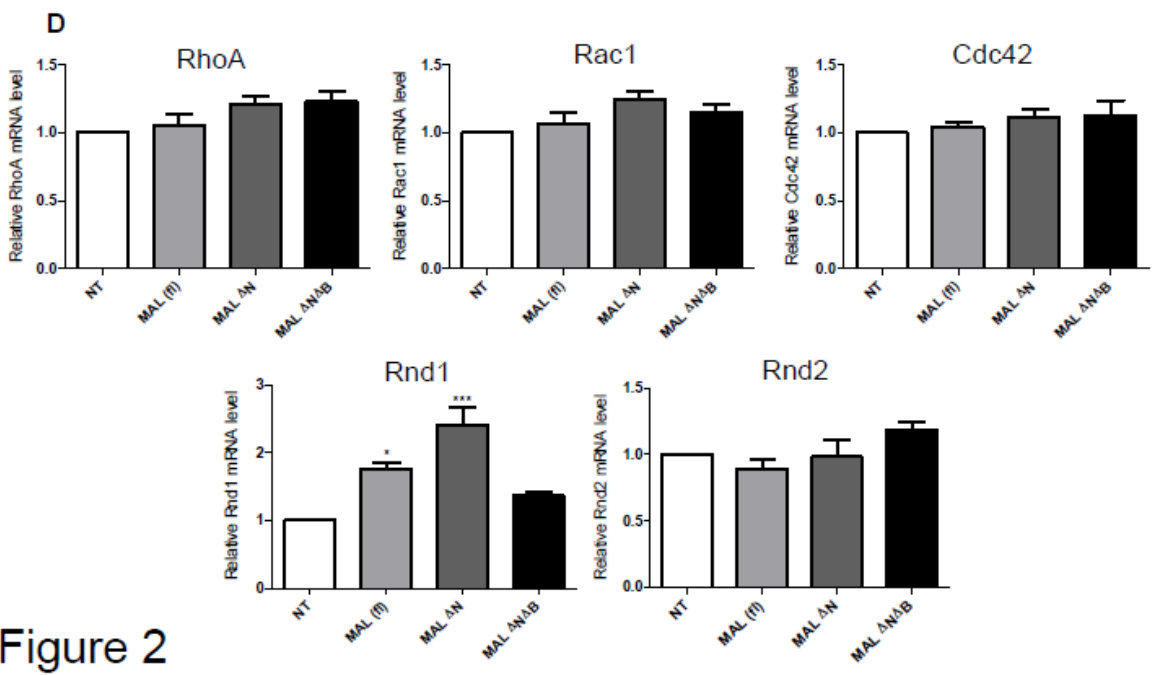
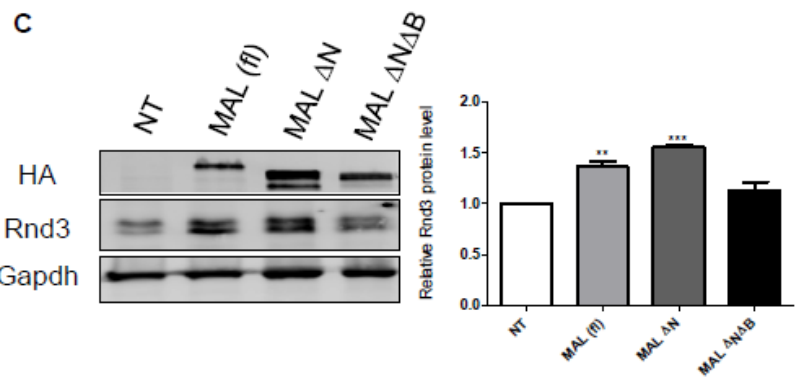
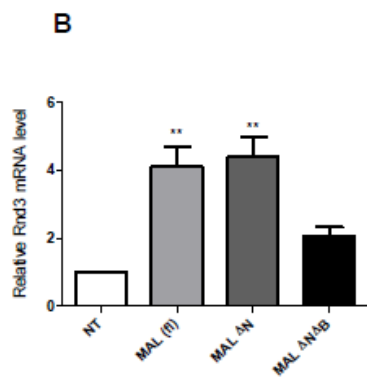
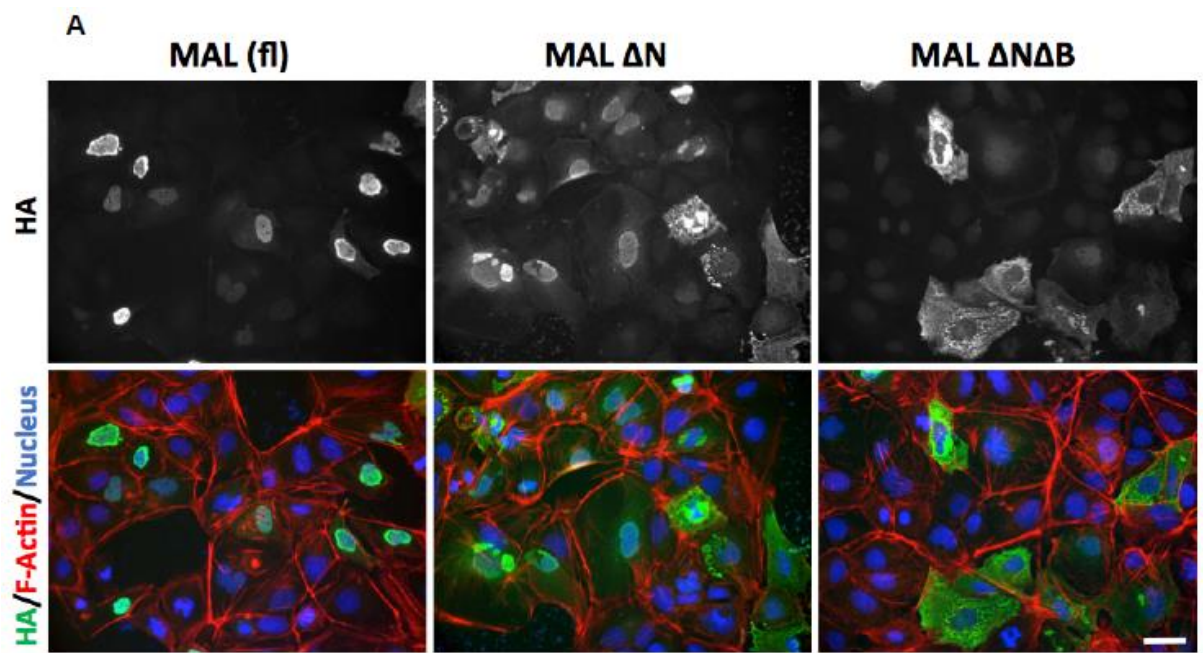


Figure 2

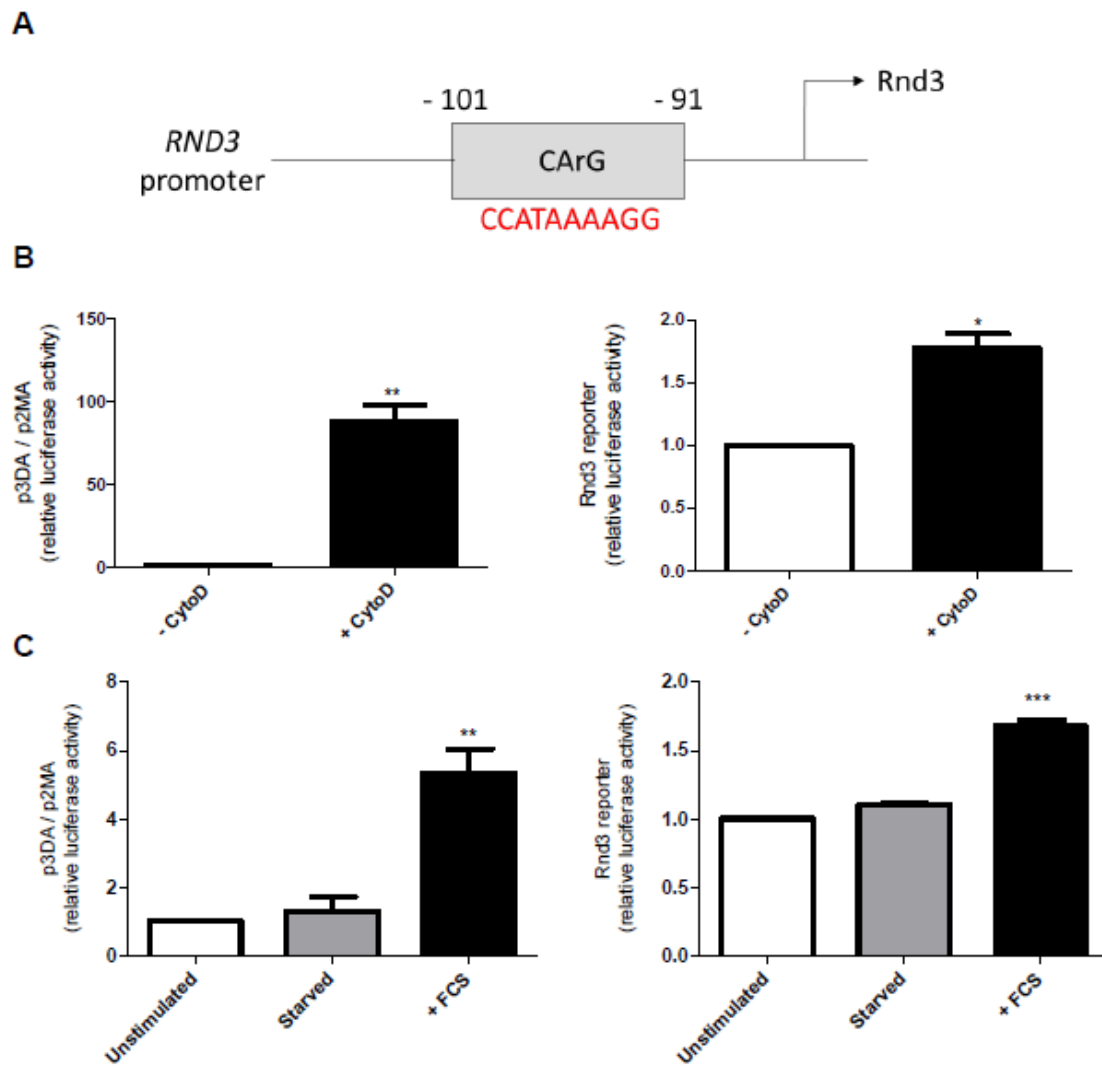


Figure 3

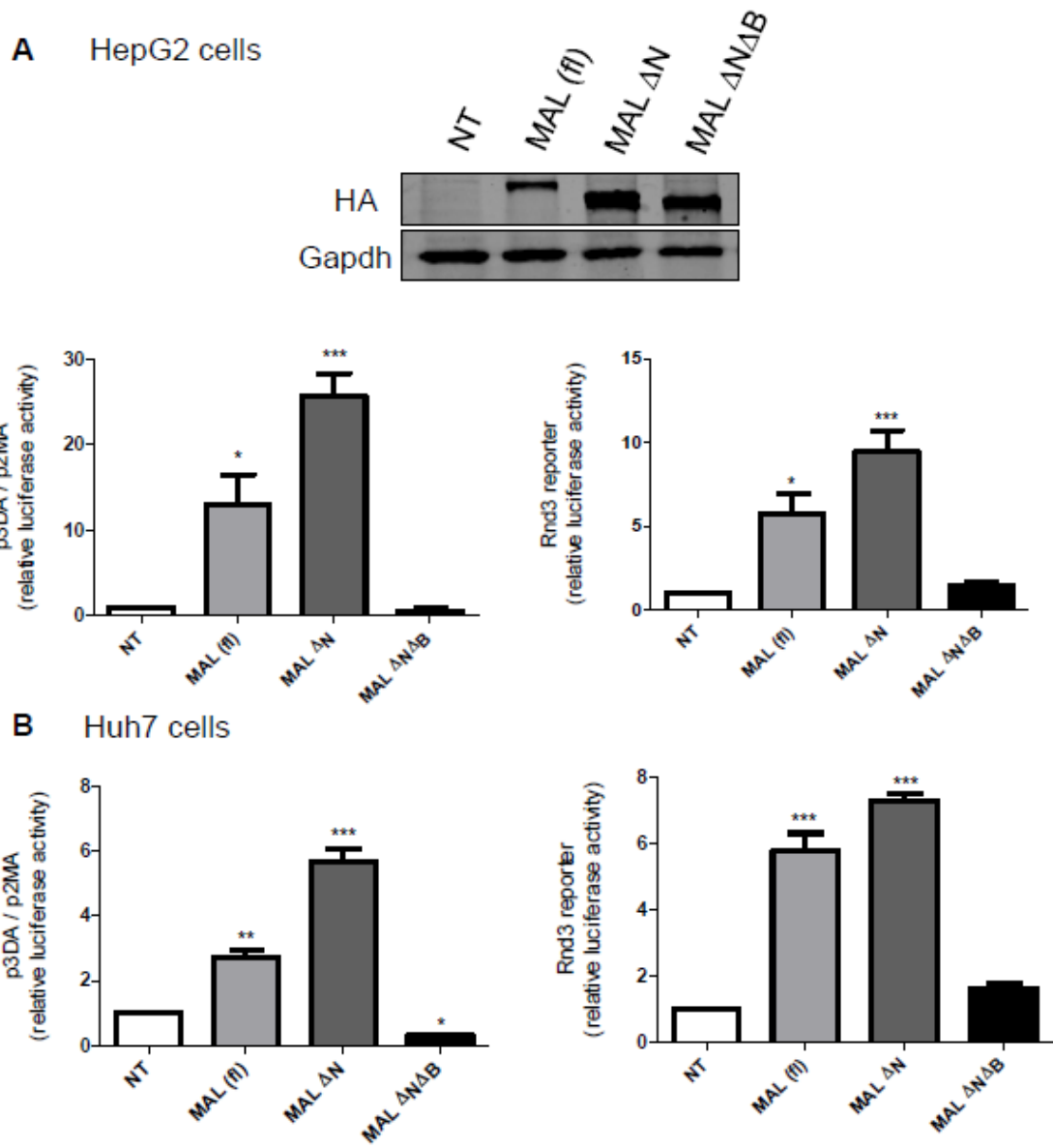


Figure 4

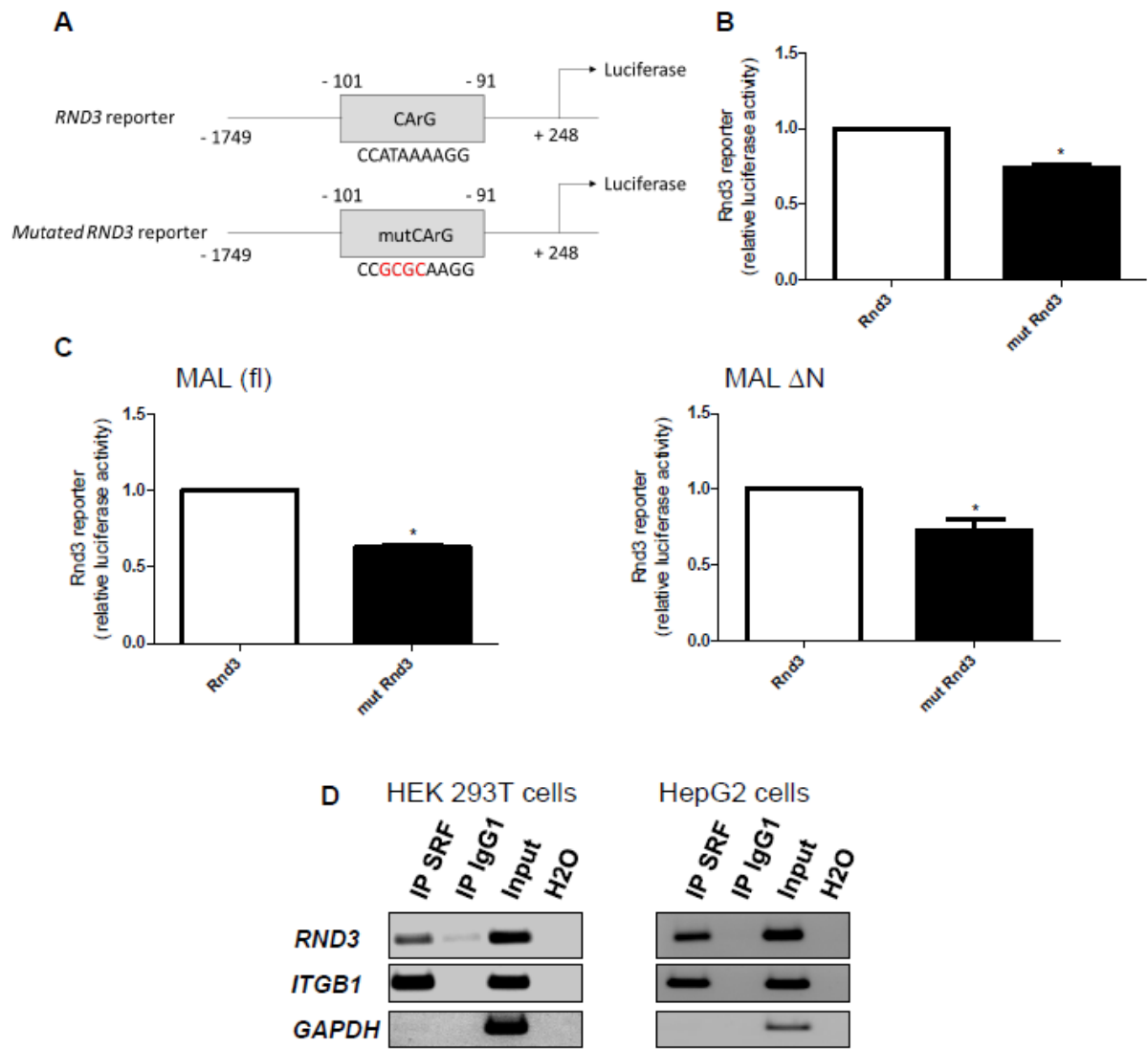


Figure 5

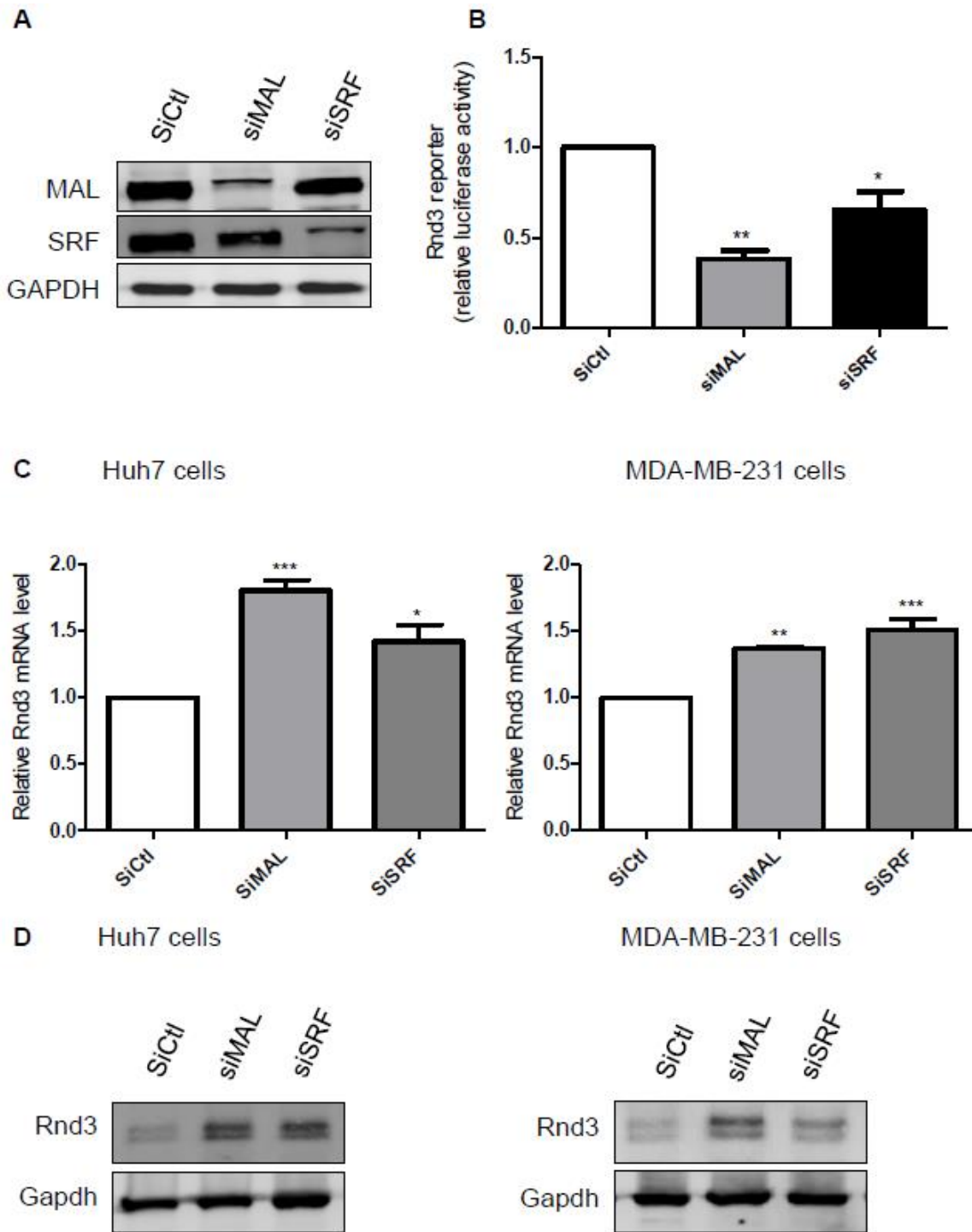
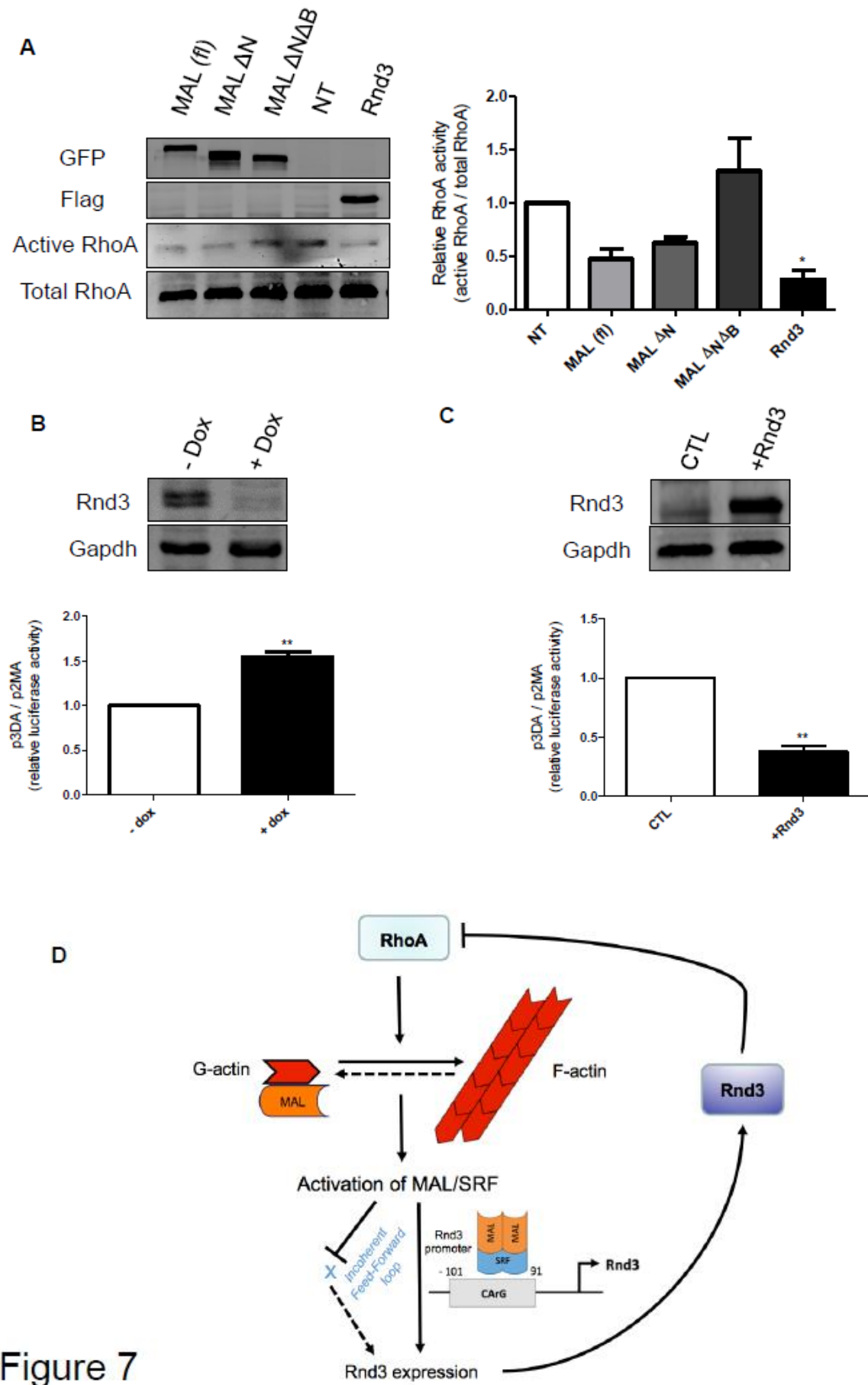


Figure 6



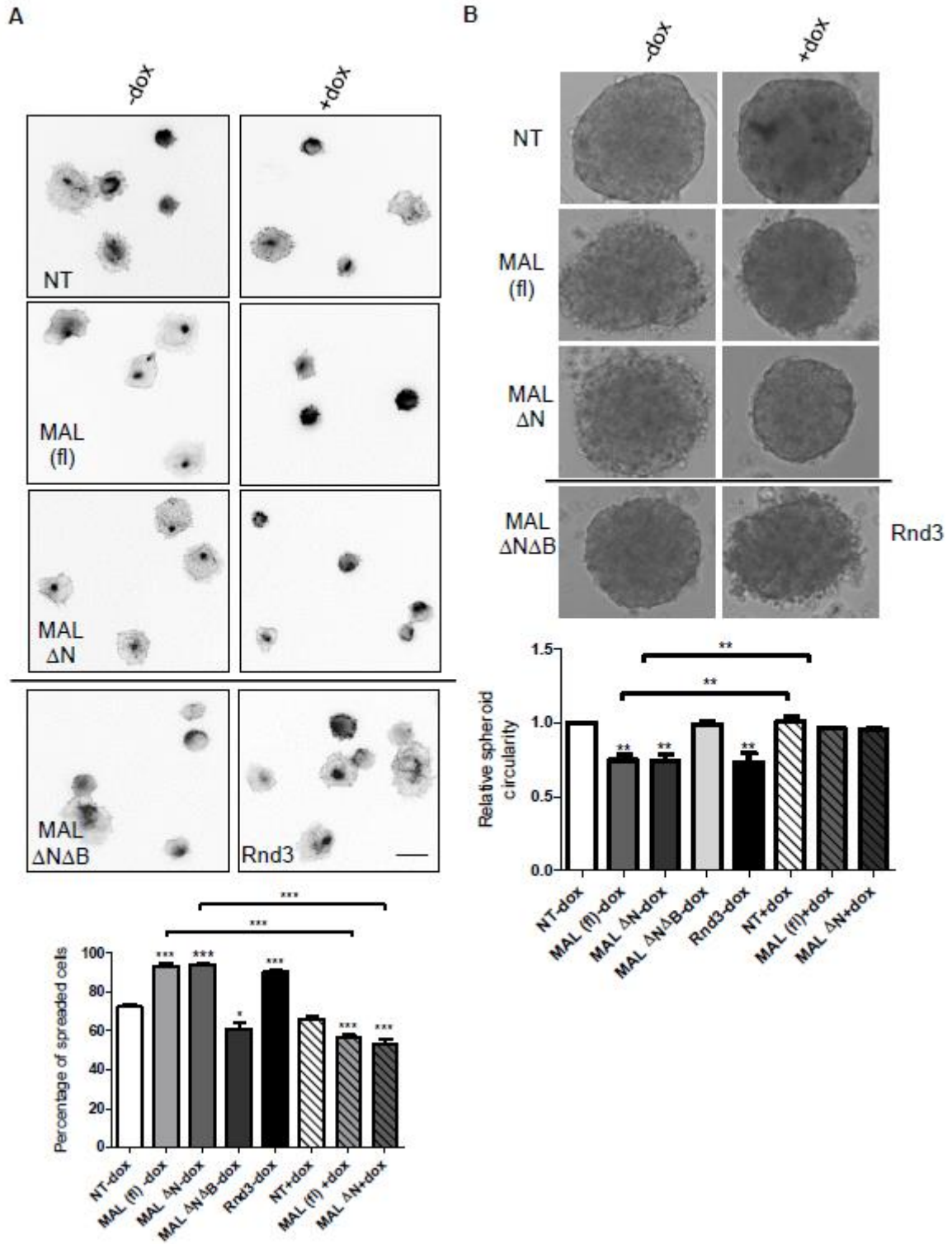


Figure 8

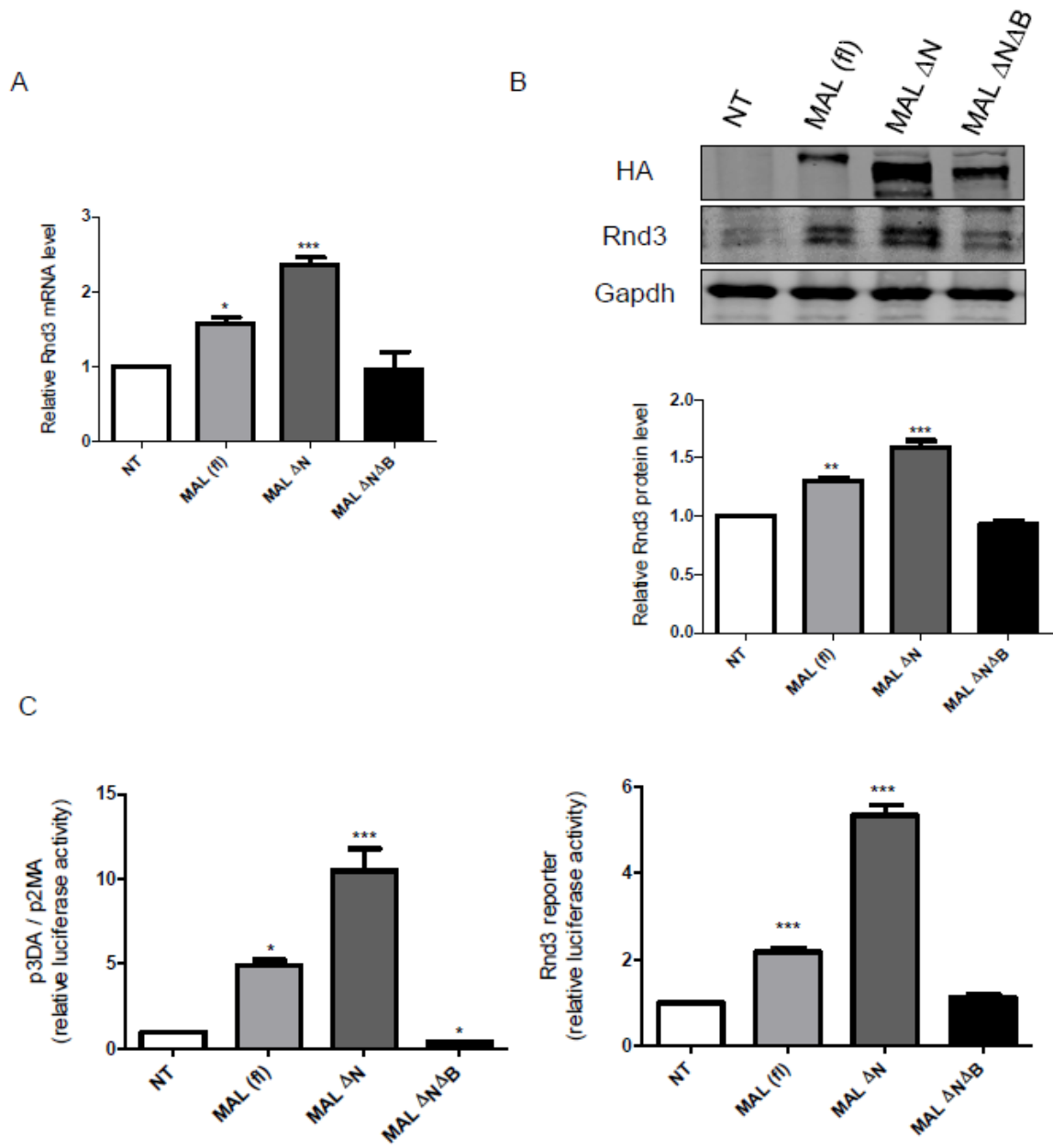


Figure S1

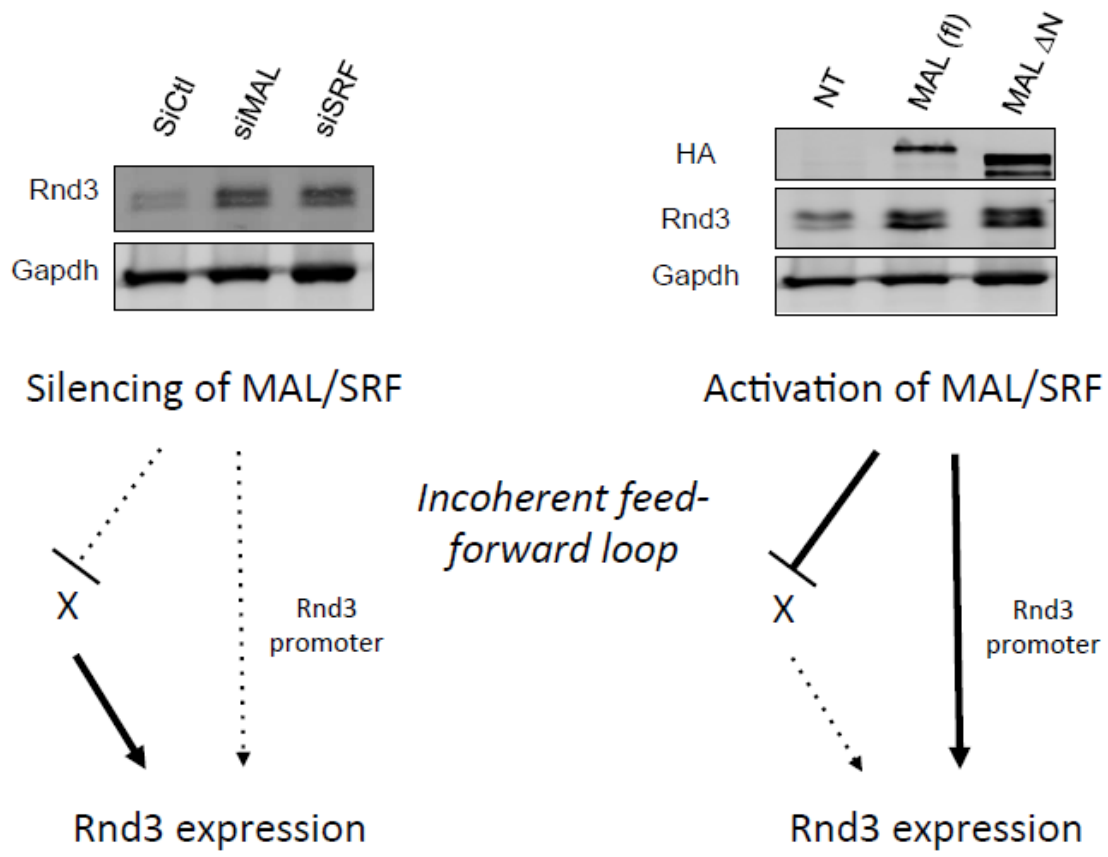


Figure S2

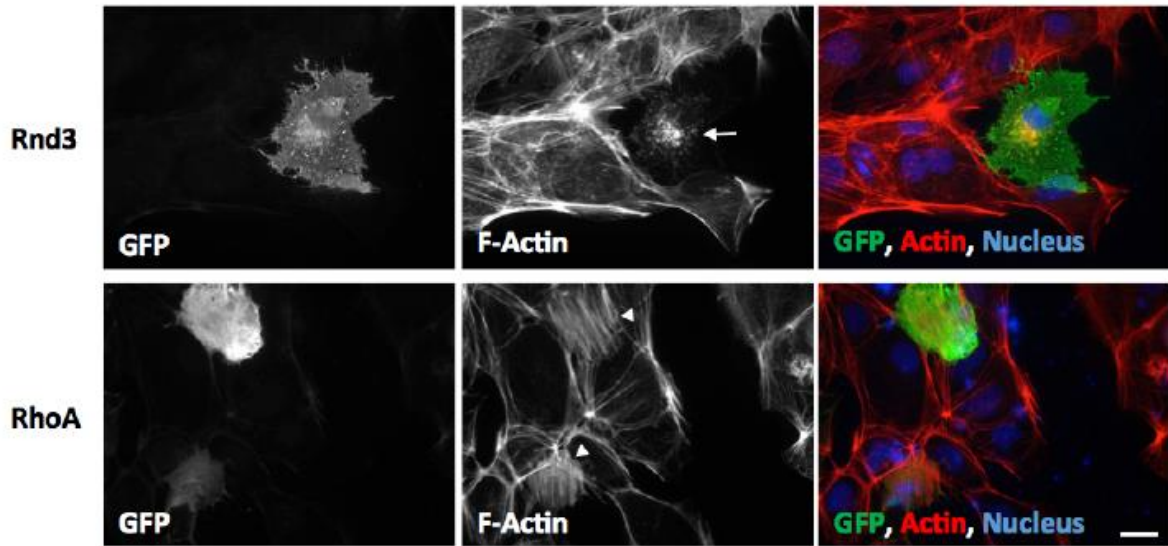


Figure S3

Chapitre III- Discussion

Partie I- Régulation de Rnd3 par la β -caténine

La β -caténine est une protéine qui exerce un double rôle au sein des cellules. Un rôle structural au niveau des jonctions adhérentes par son interaction avec la E-cadhérine, et un rôle transcriptionnel dans le noyau en réponse à une activation de la voie Wnt. Par ses deux rôles, la β -caténine participe à de nombreuses fonctions biologiques telles que le développement embryonnaire, ainsi que le renouvellement cellulaire ou la régénération des organes chez l'adulte (Valenta et al., 2012). Une activation inappropriée de la voie Wnt/ β -caténine a été rapportée dans de nombreux cancers. Dans le carcinome hépatocellulaire, des mutations activatrices de la β -caténine sont présentes dans plus d'un tiers des tumeurs et entraînent une activation des gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine (Cavard et al., 2008). Une étude récente du laboratoire a montré que la protéine Rnd3 était sous-exprimée dans le carcinome hépatocellulaire et que cette sous-expression procurait un avantage invasif aux hépatocytes (Grise et al., 2012). De plus, l'analyse de différents CHCs dans cette étude a montré que le niveau d'ARNm de Rnd3 était significativement plus faible dans les tumeurs portant des mutations activatrices de la β -caténine. Des résultats préliminaires ont montré que l'extinction de la β -caténine dans les cellules de CHC aboutissait à une augmentation du niveau d'ARNm de Rnd3. De plus, ce résultat a non seulement été observé lors de l'extinction de la β -caténine dans les cellules de CHC possédant une forme mutée de la β -caténine, mais également dans les cellules où la β -caténine n'est pas mutée. Ainsi ces résultats ont permis d'émettre l'hypothèse que Rnd3 est une nouvelle cible négative de la β -caténine dans le CHC et que son expression peut être régulée par les deux formes de la β -caténine. Un modèle a été développé au laboratoire dans cellules HepG2 qui possèdent les deux formes de la β -caténine. Dans ce modèle cellulaire, l'utilisation de trois siARN spécifiques permet d'étudier indépendamment chacune des formes de la β -caténine. L'utilisation de ce modèle a confirmé que la β -caténine sauvage est essentiellement responsable de la fonction structurale de la β -caténine tandis que la forme mutée est la forme majoritairement responsable de l'activité transcriptionnelle. De plus, l'extinction des deux formes de la β -caténine dans ce modèle aboutit à une augmentation de l'ARNm de Rnd3, confirmant cette protéine comme une nouvelle cible négative de la β -caténine. Ainsi, à partir de ce modèle, l'objectif de cette partie

de ma thèse était de caractériser la nature de la régulation de Rnd3 par la β -caténine sauvage et mutée dans ce modèle cellulaire.

L'extinction de la β -caténine jouant initialement sur le niveau d'ARNm de Rnd3, nous sommes intéressés à la possibilité d'une régulation transcriptionnelle de Rnd3 par la β -caténine. L'étude de gène rapporteur de l'activité du promoteur de Rnd3 a montré que la forme sauvage de la β -caténine, mais pas la forme mutée, était capable de réguler Rnd3 au niveau transcriptionnel. En effet, seule l'extinction de la forme sauvage de la β -caténine aboutit à une augmentation de l'activité du promoteur de Rnd3, tandis que l'extinction de la forme mutée ne provoque pas de modification majeure de cette activité.

Par la suite, l'utilisation d'une construction comportant la partie 3'NT de l'ARNm de Rnd3 couplée à la GFP a révélé que seule la β -caténine mutée régule le niveau d'ARNm de Rnd3 via une régulation impliquant cette région. En effet, seule l'extinction de la β -caténine mutée augmente le niveau de GFP produite et pourrait donc par analogie réguler la stabilité de l'ARNm de Rnd3. Afin de vérifier si la β -caténine mutée régule directement la stabilité de l'ARNm de Rnd, des expériences de stabilité de l'ARNm devrait être effectuées, notamment par des qRT-PCR pour évaluer le niveau d'ARNm de Rnd3 après un traitement à l'actinomycine D qui inhibe la transcription. De même l'utilisation d'un siARN anti-Drosha (protéine impliquée dans la maturation de l'ensemble des miARNs) permettrait de confirmer que la régulation de l'ARNm de Rnd3 par la β -caténine mutée fait directement intervenir des miARNs.

Ainsi, ces résultats ont mis en évidence la régulation différentielle de Rnd3 et confirme que l'étude des facteurs impliqués dans la régulation de Rnd3 par les deux formes de la β -caténine doit être réalisée de façon indépendante, chacune des formes de la β -caténine semblant réguler Rnd3 à un niveau différent. L'analyse transcriptomique réalisée précédemment au laboratoire dans les cellules HepG2 en condition d'extinction de chacune des formes de la β -caténine a permis d'établir la liste des facteurs dérégulés dans les différentes conditions et donc potentiellement impliqués dans la régulation de Rnd3. La β -caténine mutée régule Rnd3 via la partie 3'NT de son ARNm, ainsi l'étude des protéines liant l'ARN et des miARNs dérégulés par l'extinction de la β -caténine mutée sera le point de départ de la compréhension de la régulation de Rnd3 par la β -caténine mutée. A l'inverse, la β -caténine sauvage régule la transcription de Rnd3 et c'est donc l'étude de facteurs de transcription ou des protéines associées qui sera informative. Les voies de

mécanotransduction MRTF/SRF et YAP/TAZ ont été identifiées comme surexprimées lors de l'extinction de la β -caténine sauvage, cependant l'étude de gène rapporteur n'a pas permis de confirmer une régulation de ces voies par la β -caténine. Ainsi, il faudra repartir dans l'analyse des données transcriptomiques afin de déterminer quelles sont les voies effectivement dérégulées par la β -caténine sauvage et impliquées dans la régulation de la transcription de Rnd3. Il est également possible d'imaginer que ce sont les conditions expérimentales qui n'ont pas permis de mettre en évidence la régulation des voies MRTF/SRF et YAP/TAZ par la β -caténine dans les cellules HepG2. En effet, ces voies sont très sensibles au sérum, à la confluence cellulaire et à de nombreux autres facteurs jouant sur la stimulation mécanique des cellules. Ainsi la modulation de ces facteurs pourrait permettre de mettre en évidence une régulation de ces deux voies de mécanotransduction par la β -caténine. Rnd3 ayant été identifiée comme une nouvelle cible positive de la voie MRTF/SRF dans ces mêmes cellules tumorales au cours de mon projet principal de thèse, cette hypothèse est réellement attractive. En ce qui concerne la voie YAP/TAZ, il serait d'un intérêt tout particulier d'étudier sa relation avec Rnd3 afin de déterminer si cette protéine est également une cible de cette voie de mécanotransduction. L'analyse de la transcription à l'aide de gènes rapporteurs, de même que l'analyse du niveau endogène d'ARNm et de protéine de Rnd3 lors d'une modulation d'expression de la voie YAP/TAZ permettra de renseigner cette hypothèse. De plus, un site potentiel de fixation de TEAD (facteur de transcription associé à YAP/TAZ) ayant été identifié dans le promoteur de Rnd3, des expériences de mutagenèse dirigée au niveau de ce site ou d'immunoprécipitation de la chromatine renforceront les résultats obtenus.

Il est également possible d'imaginer une relation de nature différente entre la β -caténine, Rnd3 et les voies de mécanotransduction. L'analyse des échantillons de CHC a montré que les tumeurs possédant des mutations activatrices de la β -caténine corrèle avec le niveau d'ARNm de Rnd3 le plus faible. Ainsi, la β -caténine, par l'intermédiaire de facteurs encore indéterminés, aboutit à la diminution d'expression de Rnd3. En se basant sur les résultats obtenus dans la partie traitant de la relation entre la voie MAL/SRF et Rnd3, il est possible que le niveau plus faible de Rnd3 dans ces échantillons de CHC entraîne une inhibition moins importante de RhoA et de la polymérisation de l'actine, et favorise ainsi l'activité des voies de mécanotransductions MRTF/SRF et YAP/TAZ. Il est donc effectivement essentiel de

s'intéresser à l'activité de ces voies de mécanotransduction dans les différents groupes de CHC afin de voir si cette hypothèse se confirme.

Contrairement à l'hypothèse initiale, il semble que les fonctions structurale et transcriptionnelle de la β -caténine ne soit pas exclusivement portées par la forme sauvage et mutée, respectivement. En effet, la β -caténine sauvage est par exemple capable de jouer sur l'activité du promoteur de Rnd3. Ainsi, la découverte des facteurs impliqués dans la régulation de Rnd3 dépendante de la β -caténine doit passer par une reconsidération du rôle et des interactions de chacune des formes de la β -caténine. Dans cette optique, une expérience de co-immunoprécipitation a été réalisée et a mis en évidence l'interaction de la E-Cadhérine, non seulement avec la β -caténine sauvage, mais également avec la β -caténine mutée. L'étude des interactants de chacune des formes de la β -caténine par une analyse en spectrométrie de masse après immunoprécipitation de la β -caténine sauvage et mutée permettra de révéler de nombreux facteurs et voies de signalisation interagissant avec cette protéine, et l'analyse de ces facteurs devrait permettre de découvrir les voies à l'origine de la régulation de Rnd3 par la β -caténine.

Les résultats obtenus permettent de dire que Rnd3 est effectivement une cible négative de la forme sauvage et mutée de la β -caténine dans les cellules HepG2. De plus, alors que la β -caténine sauvage régule Rnd3 au niveau transcriptionnel, la β -caténine mutée joue sur la partie 3'UTR de l'ARNm de Rnd3. Ainsi l'étude de la régulation de Rnd3 par les deux formes de la β -caténine doit être indépendante.

Une analyse immunohistochimique de la β -caténine, de Rnd3 et des voies de mécanotransduction dans des échantillons de CHCs devrait également permettre de fournir des explications à la relation entre ces différentes voies, en permettant notamment de voir la localisation mutuellement exclusive ou non des différentes protéines. Par ailleurs, en collaboration avec le Dr. Sabinet Colnot (Institut Cochin), le laboratoire est en train d'explorer le rôle de Rnd3 dans la carcinogenèse hépatique induite par la β -caténine. Le laboratoire du Dr. Colnot possède un modèle de souris délété pour le gène APC spécifiquement dans le foie et dont la voie Wnt/ β -caténine est constitutivement active. Ce modèle est capable de développer des tumeurs en une dizaine de mois (Benhamouche et al., 2006). Afin d'étudier le rôle de Rnd3 dans la carcinogenèse hépatique induite par la β -caténine, des souris Rnd3 KO spécifiquement dans le foie ont été croisées avec ce premier modèle de souris. La génération

d'un modèle double KO dans lequel la β -caténine est active et Rnd3 est délétée doit permettre d'évaluer le potentiel suppresseur de métastases de Rnd3 dans le carcinome hépatocellulaire.

Partie II- La voie de signalisation MRTF/SRF régule les processus mécanosensibles à travers sa nouvelle cible Rnd3.

La voie de mécanotransduction MRTF/SRF est très intimement liée au cytosquelette d'actine. D'une part, c'est l'organisation de ce cytosquelette qui va permettre la régulation de la localisation des protéines MRTFs et ainsi de l'activité de la voie MRTF/SRF (Miralles et al., 2003). En retour, cette voie de signalisation est capable de diriger l'expression de centaines de gènes dont une grande proportion est impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine. Il peut s'agir de gènes codant directement pour des composants du cytosquelette, tel que le gène de l'actine elle-même, ou également de gènes codant pour des protéines associées à l'actine et régulant son organisation, telles que les intégrines ou les myosines (Miano et al., 2007; Schratt et al., 2002). Les fonctions régulées par la voie MRTF/SRF sont très diverses et vont de la différenciation à la croissance cellulaire, sans oublier les processus de migration et d'invasion (Leitner et al., 2011; Medjkane et al., 2009). De par les nombreuses protéines qu'elle régule et les nombreux processus sur lesquels elle joue, la voie MRTF/SRF a été associée à de nombreux cancers et aurait un rôle prépondérant dans le phénomène de métastase en jouant sur le cytosquelette d'actine et permettant la migration des cellules tumorales (Brandt et al., 2009; Medjkane et al., 2009). Ainsi, la caractérisation précise des gènes cibles de la voie MRTF/SRF est nécessaire afin de mieux comprendre les mécanismes qu'elle régule, notamment dans le développement tumoral, et de pouvoir à terme proposer des solutions thérapeutiques.

La protéine Rnd3 est une Rho GTPase atypique car elle ne possède pas d'activité GTPasique et elle est constitutivement sous forme active liée au GTP. Ainsi, contrairement au Rho GTPases classiques, la régulation de cette protéine n'a pas lieu à travers un cycle d'activation-inactivation, mais à d'autres niveaux tels que le niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel ou traductionnel (Jie et al., 2016). Rnd3 est impliquée dans la régulation de nombreux processus similaires à ceux régulés par la voie MRTF/SRF, à savoir la différenciation, la croissance, la migration cellulaire et notamment la régulation du cytosquelette d'actine. De plus, la protéine Rnd3 est dérégulée dans de nombreux cancers (voir revue en annexe). Ainsi il apparaît important de caractériser les mécanismes de régulation de cette protéine. Plusieurs études ont identifié Rnd3 comme une nouvelle cible potentielle de la voie MRTF/SRF (Esnault

et al., 2014; Sun et al., 2006). Ainsi, la présence d'un site potentiel de fixation de SRF dans le promoteur de Rnd3 et le fait que la voie MRTF/SRF et Rnd3 régulent les mêmes processus fortement dépendant de la régulation du cytosquelette d'actine nous ont poussé à étudier la relation entre la voie de mécanotransduction MRTF/SRF et la Rho GTPase atypique Rnd3 dans un contexte de cellules tumorales.

L'analyse de cette relation nous a permis de découvrir que Rnd3 était effectivement une cible transcriptionnelle directe de la voie MRTF/SRF, non seulement dans les cellules dérivées de CHC, mais également dans d'autres lignées cellulaires telle que la lignée MDA-MB-231 dérivée de cancer du sein. En effet, l'activation de la voie MRTF/SRF par les constructions activatrices MAL (fl) et MAL Δ N a permis d'augmenter de façon importante le niveau d'activité du promoteur de Rnd3. De plus l'activation de la voie MRTF/SRF a également aboutit à l'augmentation du niveau endogène d'ARNm et de protéine de Rnd3. La mutation de la séquence potentielle de fixation de SRF sur le promoteur de Rnd3 a permis de confirmer cette relation, la mutation de ce site diminuant l'activité du promoteur de Rnd3 en condition basale et lors de l'activation de la voie MRTF/SRF. La régulation de Rnd3 par la voie MRTF/SRF a pu définitivement être confirmée par l'expérience d'immunoprécipitation de la chromatine qui a montré la présence d'une interaction physique entre SRF et le promoteur de Rnd3. Ainsi, Rnd3 est effectivement une nouvelle cible directe et positive de la voie MRTF/SRF dans les cellules tumorales.

De façon plus surprenante, les résultats obtenus lors de l'inhibition de la voie MRTF/SRF par des siARNs ont permis de caractériser Rnd3 comme étant également une cible indirecte de cette voie de mécanotransduction. L'inhibition de cette voie aboutie, de façon cohérente avec tous les résultats précédents, à une diminution de l'activité du promoteur de Rnd3. Cependant, le niveau endogène d'ARNm et de protéine de Rnd3 est quant à lui augmenté par l'inhibition de la voie MRTF/SRF, de façon similaire à l'augmentation observée lors de l'activation de la voie MRTF/SRF. Ces résultats semblent identifier un autre mécanisme de régulation de Rnd3, qui placerait cette protéine au centre d'une régulation très fine dépendante d'une gamme précise d'activation de la voie MRTF/SRF. Ce phénomène peut être expliqué par la présence d'une incoherent feed-forward loop (Kim et al., 2008). L'activation de la voie MRTF/SRF augmente directement l'expression de Rnd3 mais inhiberait en parallèle une cible X encore inconnu qui permettrait d'augmenter l'expression de Rnd3. Ainsi, lors de

l'inhibition de la voie MRTF/SRF, la cible X ne serait plus inhibée, ce qui aboutirait à l'augmentation d'expression de Rnd3 (voir article pour une description détaillée du modèle).

Dans l'avenir, il sera important d'identifier et de caractériser cette cible X, en étudiant quels sont les facteurs inhibés par la voie MRTF-SRF. De plus, plusieurs études font état d'une régulation de miARNs par la voie MRTF/SRF, et l'extrémité 3'NT de Rnd3 est relativement longue et peut potentiellement être ciblée par de nombreux miARNs. Ainsi l'analyse de ces miARN dans le cadre de la régulation de Rnd3 a un réel intérêt et requiert de futures investigations (Liu et al., 2008; Xin et al., 2009). Dans cette optique, il serait d'un intérêt particulier d'étudier le niveau d'expression de la construction GFP-3'NT de Rnd3 (utilisée dans le premier chapitre) en condition d'activation et d'inhibition de la voie MRTF/SRF, afin d'évaluer si effectivement cette voie de mécanotransduction régule également Rnd3 au niveau de son ARNm.

Il est important de noter que l'étude de la régulation de Rnd3 par la voie MRTF/SRF a été réalisée en condition de surexpression de la protéine MRTF-A. Il serait intéressant d'étudier l'effet de MRTF-B dans la régulation de Rnd3, et la part de chaque protéine MRTF dans cette régulation.

Pour diriger l'expression génique, SRF est parfois directement lié au promoteur des gènes cibles, et parfois c'est son association avec ses cofacteurs qui va permettre l'interaction avec l'ADN. D'après l'expérience d'immunoprécipitation de la chromatine réalisée sans stimulation de la voie MRTF/SRF, il semblerait que le promoteur de Rnd3 soit constitutivement lié par SRF. De plus, cette expérience a également été réalisée lors d'une activation de la voie MRTF/SRF par un traitement à la cytochalasine D, et cette toxine n'a pas changé le résultat obtenu, confirmant la fixation constitutive de SRF sur le promoteur de Rnd3. Il serait intéressant de réaliser l'expérience d'immunoprécipitation de la chromatine à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine MRTF-A afin de renforcer les données quant à la régulation de Rnd3 par la voie MRTF/SRF. Cette expérience est un peu plus complexe car les protéines MRTFs sont capables de s'associer à l'ADN, mais cette association n'a pas lieu au niveau d'une séquence d'ADN précise, c'est plutôt l'association de SRF avec l'ADN qui va induire un changement conformationnel favorable à l'association des MRTFs avec l'ADN (Posern & Treisman, 2006).

En ce qui concerne la régulation de Rnd3 par la voie MRTF/SRF, l'étude de certaines voies de signalisation permettrait de mieux comprendre les mécanismes de cette régulation. La voie TCF/SRF tout d'abord, pourrait jouer un rôle dans la régulation de Rnd3. Le facteur TCF est l'autre cofacteur majoritaire de la protéine SRF. Il a été montré que la fixation de TCF et des MRTFs étaient mutuellement exclusives, et que la voie MRTF/SRF inhibe la voie TCF/SRF et réciproquement (Pipes et al., 2006). Il est donc possible que la voie TCF/SRF puisse également réguler Rnd3 et donc moduler l'activation de cette protéine réalisée par la voie MRTF/SRF.

L'étude de la voie YAP/TAZ pourrait également se révéler d'un intérêt tout particulier. Au même titre que la voie MRTF/SRF, cette voie est une voie majeure de mécanotransduction capable de sentir les forces appliquées sur les cellules et au niveau du cytosquelette (Halder et al., 2012). Il est intéressant de noter que le promoteur de Rnd3 contient une séquence potentielle de fixation de la protéine TEAD, facteur de transcription avec lequel interagissent YAP/TAZ. Ainsi il est possible que la voie YAP/TAZ régule également Rnd3. Il a de plus été montré qu'il existait une interaction entre la voie YAP/TAZ et MRTF/SRF. Dans des cellules dérivées de cancer du sein, il a été montré que la protéine TAZ était une cible directe de la voie MRTF/SRF (Liu et al., 2016). En outre, les deux voies de mécanotransduction MRTF/SRF et YAP/TAZ sont capables d'interagir afin de contrôler l'expression de leur gènes cibles (Yu et al., 2015). Ainsi, la voie YAP/TAZ pourrait réguler l'expression de Rnd3, soit indépendamment ou en collaboration avec la voie MRTF/SRF. Une modulation de la voie YAP/TAZ suivie de l'étude de l'expression de Rnd3 devrait permettre de répondre à ces questions.

En ce qui concerne l'impact fonctionnel de la régulation de Rnd3 par la voie MRTF/SRF, les différentes expériences réalisées au cours de ma thèse ont permis de montrer que dans les cellules tumorales, certains processus cellulaires sont régulés par la voie MRTF/SRF en partie à travers l'action de cette voie sur Rnd3. Ainsi, l'étalement cellulaire est augmenté par activation de la voie MRTF/SRF, mais l'inhibition de Rnd3 dans cette condition suffit à restaurer un niveau basal d'étalement. L'action de la voie MRTF/SRF sur l'étalement cellulaire est donc au moins partiellement due à la modification d'expression de Rnd3 induite par la voie MRTF/SRF. Cette voie de mécanotransduction a déjà été décrite comme régulant positivement l'étalement cellulaire dans des cellules tumorales (Medjkane et al., 2009). En ce qui concerne le rôle de Rnd3 dans ce processus, il est connu que RhoA inhibe le phénomène

d'étalement par la formation de fibres de tension d'actine (Etienne-Manneville & Hall, 2002). Rnd3 étant un antagoniste fonctionnel de RhoA, il apparaît cohérent que cette protéine favorise l'étalement. De plus, les expériences d'immunofluorescence ont permis de confirmer la formation de fibres de tension par RhoA et l'inhibition de ces fibres par Rnd3, confirmant ainsi les conclusions faites à propos de l'étalement cellulaire.

De même, l'étude des cellules tumorales dans un contexte tridimensionnel a également mis en évidence la relation entre la voie MRTF/SRF et Rnd3. En effet la formation de sphéroïdes est inhibée par la voie MRTF/SRF, et cette inhibition passe par l'action de cette voie sur Rnd3. Comme pour l'étalement cellulaire, l'inhibition de Rnd3 dans ces conditions d'activation de la voie MRTF/SRF permet de restaurer partiellement la formation de sphéroïdes. Ainsi, cette étude réalisée dans un environnement tridimensionnel, bien plus physiologique que les expériences réalisées en deux dimensions, permet de renforcer les conclusions obtenues quant à la régulation de la voie MRTF/SRF.

Il sera par la suite intéressant d'étudier l'impact fonctionnel de la régulation de Rnd3 par la voie MRTF/SRF dans d'autres processus, permettant de renseigner l'effet de ces protéines dans la progression tumorale. Ainsi, les phénomènes tels que la migration, la prolifération, l'adhésion, l'invasion et l'apoptose devrait être étudiés afin de mieux caractériser la relation entre la voie MRTF/SRF et Rnd3. Certains de ces processus ont été étudiés au cours de ma thèse mais requièrent de futures investigations et une optimisation des protocoles. La migration et la prolifération cellulaire ont par exemple été étudiées (non montré), mais ne semblent pas régulées par la voie MRTF/SRF et Rnd3.

En ce qui concerne la migration individuelle, il s'agit d'un problème expérimental. Les cellules Huh7 initialement utilisées ne migrent quasiment pas et ne sont donc pas utilisables pour ce type d'expérience, et les cellules MDA-MB-231 connues pour avoir de fortes capacités migratoires ne supportent pas bien la transfection transitoire des différents plasmides utilisés dans la publication. Ainsi, afin d'étudier ce paramètre, il apparaît essentiel d'élaborer une nouvelle stratégie de clonage permettant de générer des lignées stables. Pour la migration collective, nous n'avons pas observé de différence entre la condition contrôle et l'activation de la voie MRTF/SRF et de Rnd3. Une étude a montré que l'inhibition de la voie MRTF/SRF dans les cellules Huh7 aboutissait à une diminution de la migration collective au cours d'une expérience de réparation de blessure similaire à celle effectuée au laboratoire (Muehlich et

al., 2012). Ainsi, deux hypothèses peuvent se dégager de ces données. Soit le niveau de migration collective des cellules Huh7 est relativement important en situation basale et seule une inhibition de la voie MRTF/SRF aura un effet, l'activation de la voie ne permettant pas d'augmenter la vitesse de migration au-dessus d'un certain seuil ; soit l'activation de la voie MRTF/SRF pourrait induire une augmentation de la vitesse de migration mais ce phénomène n'est pas visible dans notre expérience à cause d'un biais expérimental tel que la transfection transitoire. Dans ce cas également, se placer dans des conditions de transfection stable devrait permettre de répondre à cette question.

Selon le même principe, la prolifération cellulaire a été étudiée mais n'a pas permis de mettre en évidence une régulation par la voie MRTF/SRF et Rnd3. Il a pourtant été montré que l'inhibition de la voie MRTF/SRF diminuait la prolifération de cellules dérivées d'hépatome HepG2 (Farra et al., 2010). Les deux hypothèses précédentes sont donc également applicables dans le cadre de la prolifération. Cependant, l'hypothèse la plus probable est tout de même celle d'un problème expérimental. En effet, le niveau de SRF a été déterminé comme très faible dans les cellules de carcinome hépatocellulaire Huh7, HepG2 et HLE (Park et al., 2007). Dans cette même étude, la transfection transitoire des cellules HLE avec SRF a permis d'aboutir à une augmentation de la migration réalisée en chambre de Boyden. Ainsi, changer le type d'expérimentation utilisé afin d'étudier la migration et élaborer une stratégie permettant de générer des lignées stables devrait permettre de déterminer l'impact de la voie MRTF/SRF et de Rnd3 sur ces processus de prolifération et de migration, et également sur les autres processus impliqués dans la progression tumorale.

Il est intéressant de noter que des expériences préliminaires réalisées au laboratoire ont également permis de mettre en évidence un rôle de la voie MAL/SRF dans la fonction des invadosomes. En effet, l'inhibition de la voie MAL/SRF dans les cellules MDA-MB-231 entraîne une diminution de la capacité de dégradation de la gélatine de ces cellules. De même, Rnd3 est également impliqué dans cette capacité de dégradation et son inhibition diminue la capacité de dégradation de la gélatine. Cependant, en raison de l'augmentation d'expression de Rnd3 observée également en situation d'inhibition de la voie MRTF/SRF, l'impact de la voie MRTF/SRF sur la dégradation de la gélatine et la fonction des invadosomes n'a pas pu être relié à Rnd3.

La dernière partie de ce projet a eu pour objectif de confirmer Rnd3 comme étant au centre d'une boucle de régulation de la voie MRTF/SRF. Les Rho GTPases classiques RhoA, Rac1 et Cdc42 sont à l'origine de l'activation de la voie MRTF/SRF. La simple surexpression de ces Rho GTPases permet d'augmenter le niveau d'ARNm de Rnd3, certainement à travers l'activation de la voie MRTF/SRF. A l'inverse, l'expérience de pulldown a montré que la surexpression de MRTF/SRF et de Rnd3 permettait de diminuer la quantité de RhoA actif au sein des cellules Huh7. Rnd3 est connue comme l'antagoniste fonctionnel principal de RhoA. Ainsi l'activation de la voie MRTF/SRF permet d'augmenter l'expression de Rnd3, un gène responsable de sa propre inactivation. Ce mécanisme d'auto-régulation de la voie MRTF/SRF n'est pas unique. En effet, une étude de 2004 a montré que la protéine Fhl2, cible positive directe de la voie MRTF/SRF, était capable d'inhiber cette voie de mécanotransduction (Philippart et al., 2004). Il sera intéressant de confirmer l'inhibition de RhoA par Rnd3 dans ce modèle cellulaire par l'étude de l'expression des cibles de RhoA responsables de la modulation de la dynamique de l'actine, telles que la protéine ROCK1 ou la protéine phospho-MLC2. De plus, étudier l'activité de la voie MRTF/SRF par des tests rapporteurs en condition de surexpression ou d'inhibition de Rnd3 permettra de renforcer cette hypothèse.

Il serait également intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition de la voie MRTF/SRF en condition de surexpression de RhoA, Rac1 et Cdc42, afin d'évaluer si l'augmentation d'expression de Rnd3 observée par surexpression de ces Rho GTPases est exclusivement liée à la voie MRTF/SRF. De même, étudier l'activité de Rac1 et Cdc42 lors de l'activation de la voie MRTF/SRF et de la surexpression de Rnd3 aurait également un intérêt particulier afin de mieux comprendre la régulation de cette voie de mécanotransduction.

Rnd3 apparaît donc dans les cellules tumorales comme une nouvelle cible positive directe et indirecte de la voie MRTF/SRF, impliquée dans la régulation de nombreux processus biologiques, et capable par son action antagoniste sur RhoA, de moduler l'activité de cette voie de signalisation.

D'un point de vue plus global, le modèle cellulaire utilisé peut soulever certaines questions. En effet, afin d'étudier la relation entre Rnd3 et la voie MRTF/SRF dans les cellules tumorales, nous avons utilisé des cellules dérivées de carcinome hépatocellulaire, et notamment les cellules Huh7. Bien que peu de publications renseignent sur l'état de la voie MRTF/SRF dans le carcinome hépatocellulaire, les données provenant de sources telles que

les bases de données Oncomine ou Human Protein Atlas tendent à montrer que cette voie est pro-tumorale et favoriserait le développement de CHC. Une étude a de plus montré que les protéines MRTFs vont médier la transformation tumorale des cellules de carcinome hépatocellulaire dans lesquelles le gène suppresseur de tumeur DLC-1 est délété (Muehlich et al., 2012). A l'inverse, les données précédemment obtenues au laboratoire ont montré que Rnd3 est sous-exprimée dans le carcinome hépatocellulaire et que cette sous-expression procure un avantage invasif aux hépatocytes (Grise et al., 2012). Comment expliquer dès lors que Rnd3 soit une cible positive de la voie MRTF/SRF dans des cellules dérivées de carcinome hépatocellulaire ? Rnd3 est une Rho GTPase atypique, et sa régulation a lieu à différents niveaux et fait intervenir différentes protéines et voies de signalisation. La voie de mécanotransduction MRTF/SRF représente une de ces voies. La voie MRTF/SRF étant pro-tumorale, il est possible que l'expression de Rnd3 qu'elle stimule permette de moduler son activité en inhibant l'activité de RhoA et la polymérisation des filaments d'actine, et ainsi limite la tumorigenèse hépatique en empêchant la voie MRTF/SRF d'être suractivée.

Certaines voies de signalisation dérégulées lors de la progression du carcinome hépatocellulaire vont entraîner la diminution d'expression de Rnd3. On peut par exemple penser à la voie Wnt/ β -caténine, activée dans près d'un tiers des CHCs et dont l'activation corrèle avec une diminution d'expression de Rnd3. Comme expliqué dans la partie précédente, l'inhibition de Rnd3 par de telles voies pourrait aboutir à l'activation de la voie MRTF/SRF et ainsi favoriser le développement tumoral. Il serait donc particulièrement intéressant d'étudier la corrélation entre les voies dérégulées dans les différents groupes de CHC et l'activation de la voie MRTF/SRF.

En outre, il serait d'un intérêt particulier de réaliser des marquages immunohistochimiques dans des échantillons de CHC afin d'étudier les marquages respectifs de la voie MRTF/SRF et de Rnd3 dans ces tumeurs. Dans l'optique de réellement caractériser la relation entre la voie MRTF/SRF et Rnd3 et leur rôle dans la tumorigenèse hépatique, l'utilisation de techniques telles que le CRISPR afin de muter la séquence CArG endogène présente dans le promoteur de Rnd3, se révélerait particulièrement intéressante. En effet, l'impossibilité pour la voie MRTF/SRF de stimuler l'expression de Rnd3 pourrait entraîner la perte de la boucle de régulation négative, et ainsi favoriser l'apparition de tumeur.

Chapitre IV- Conclusion générale

La protéine Rnd3 est une Rho GTPase atypique dénuée d'activité GTPasique. Sa régulation ne fait pas intervenir le cycle classique d'activation-inactivation des Rho GTPases, mais a lieu à différents niveaux et fait intervenir de nombreuses protéines et voies de signalisation. Rnd3 est dérégulée dans de nombreux cancers, et l'implication de Rnd3 dans le carcinome hépatocellulaire a précédemment été montré au laboratoire. Ainsi, dans le CHC, la protéine Rnd3 est sous-exprimée et cette sous-expression procure un avantage invasif aux hépatocytes. L'objectif de ma thèse était donc de comprendre les mécanismes à la base de la régulation de Rnd3 dans les cellules tumorales.

La première partie de ma thèse avait pour objectif de mieux comprendre les mécanismes à la base de la régulation de Rnd3 par la β -caténine dans le carcinome hépatocellulaire. L'hypothèse de départ était que la forme mutée ainsi que la forme sauvage de la β -caténine étaient capables de réguler l'expression de Rnd3, et les résultats préliminaires suggéraient que la régulation de Rnd3 par les deux formes de la β -caténine faisait intervenir des mécanismes différents. Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis de confirmer cette hypothèse et de préciser les mécanismes de régulation. Ainsi, la β -caténine sauvage régule Rnd3 au niveau transcriptionnel, tandis que la β -caténine mutée régule Rnd3 au niveau de la stabilité de son ARNm. De plus, la confirmation de la capacité de la β -caténine mutée à interagir avec la E-cadhérine permet d'envisager différemment la régulation de Rnd3 par chacune des formes de la β -caténine.

Le projet principal de ma thèse s'est intéressé à la régulation de Rnd3 par la voie de mécanotransduction MRTF/SRF. Les résultats obtenus ont permis de caractériser Rnd3 comme une nouvelle cible positive directe et indirecte de la voie MRTF/SRF dans les cellules tumorales. En outre, ces résultats ont montré que la régulation de Rnd3 par la voie MRTF/SRF va permettre la régulation de différents processus biologiques. Mais surtout, ces résultats suggèrent pour la première fois que Rnd3 pourrait se retrouver au cœur d'une boucle de régulation de la voie MRTF/SRF de par son action sur RhoA. La prise en compte de ce paramètre devrait permettre de mieux comprendre et caractériser la relation entre Rnd3 et la voie MRTF/SRF et leur implication dans le carcinome hépatocellulaire. Ainsi, l'ensemble de

ces résultats doit faciliter la découverte des facteurs impliqués dans la régulation de Rnd3 dans le carcinome hépatocellulaire.

Pour conclure, cette thèse aura permis de mieux comprendre les mécanismes à la base de la régulation de Rnd3 dans les cellules de carcinome hépatocellulaire. Cette régulation de Rnd3 fait intervenir de nombreuses protéines et voies de signalisations, telles que la voie MRTF/SRF et la β -caténine. Ainsi Rnd3 apparaît clairement au centre d'une régulation complexe dans le carcinome hépatocellulaire. La compréhension des mécanismes à l'origine de sa régulation doit être poursuivie afin d'aboutir à l'élaboration de stratégie efficace de réexpression de Rnd3 dans le carcinome hépatocellulaire, dans l'optique de lutter contre sa progression.

Chapitre V- Références bibliographiques

- Adamson, P., Marshall, C. J., Hall, A., & Tilbrook, P. A. (1992). Post-translational modifications of p21rho proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(28), 20033–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1400319>
- Akhmanova, A., & Steinmetz, M. O. (2015). Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 16(12), 711–26. <http://doi.org/10.1038/nrm4084>
- Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giulitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., ... Piccolo, S. (2013). A Mechanical Checkpoint Controls Multicellular Growth through YAP/TAZ Regulation by Actin-Processing Factors. *Cell*, 154(5), 1047–1059. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.042>
- Arsenian, S., Weinhold, B., Oelgeschläger, M., Rütter, U., Nordheim, A., Affolter, M., ... Meijer, D. (1998). Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *The EMBO Journal*, 17(21), 6289–6299. <http://doi.org/10.1093/emboj/17.21.6289>
- Azzarelli, R., Pacary, E., Garg, R., Garcez, P., van den Berg, D., Riou, P., ... Guillemot, F. (2014). An antagonistic interaction between PlexinB2 and Rnd3 controls RhoA activity and cortical neuron migration. *Nature Communications*, 5, 3405. <http://doi.org/10.1038/ncomms4405>
- Azzolin, L., Zanconato, F., Bresolin, S., Forcato, M., Basso, G., Bicciato, S., ... Piccolo, S. (2012). Role of TAZ as mediator of wnt signaling. *Cell*, 151(7), 1443–1456. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.027>
- Baarlink, C., Wang, H., & Grosse, R. (2013). Nuclear actin network assembly by formins regulates the SRF coactivator MAL. *Science (New York, N.Y.)*, 340(6134), 864–7. <http://doi.org/10.1126/science.1235038>
- Baek, S. H., Ohgi, K. A., Nelson, C. A., Welsbie, D., Chen, C., Sawyers, C. L., ... Rosenfeld, M. G. (2006). Ligand-specific allosteric regulation of coactivator functions of androgen receptor in prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(9), 3100–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.0510842103>
- Ball, S. G., Shuttleworth, C. A., & Kielty, C. M. (2007). Platelet-derived growth factor receptor- α is a key determinant of smooth muscle α -actin filaments in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(2), 379–391. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.09.005>
- Ballester-Lurbe, B., González-Granero, S., Mocholí, E., Poch, E., García-Manzanares, M., Dierssen, M., ... Terrado, J. (2015). RhoE deficiency alters postnatal subventricular zone development and the number of calbindin-expressing neurons in the olfactory bulb of mouse. *Brain Structure & Function*, 220(6), 3113–30. <http://doi.org/10.1007/s00429-014-0846-1>
- Barry, S. P., Lawrence, K. M., McCormick, J., Soond, S. M., Hubank, M., Eaton, S., ... Stephanou,

- A. (2010). New targets of urocortin-mediated cardioprotection. *Journal of Molecular Endocrinology*, 45(2), 69–85. <http://doi.org/10.1677/JME-09-0148>
- Bektic, J., Pfeil, K., Berger, A. P., Ramoner, R., Pelzer, A., Schäfer, G., ... Klocker, H. (2005). Small G-protein RhoE is underexpressed in prostate cancer and induces cell cycle arrest and apoptosis. *The Prostate*, 64(4), 332–40. <http://doi.org/10.1002/pros.20243>
- Belaguli, N. S., Sepulveda, J. L., Nigam, V., Charron, F., Nemer, M., & Schwartz, R. J. (2000). Cardiac tissue enriched factors serum response factor and GATA-4 are mutual coregulators. *Molecular and Cellular Biology*, 20(20), 7550–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11003651>
- Bell, R. D., Deane, R., Chow, N., Long, X., Sagare, A., Singh, I., ... Zlokovic, B. V. (2009). SRF and myocardin regulate LRP-mediated amyloid-beta clearance in brain vascular cells. *Nature Cell Biology*, 11(2), 143–53. <http://doi.org/10.1038/ncb1819>
- Benhamouche, S., Decaens, T., Godard, C., Chambrey, R., Rickman, D. S., Moinard, C., ... Colnot, S. (2006). Apc tumor suppressor gene is the “zonation-keeper” of mouse liver. *Developmental Cell*, 10(6), 759–70. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.03.015>
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., & Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological Reviews*, 94(1), 235–63. <http://doi.org/10.1152/physrev.00018.2013>
- Borbath, I. (2010). Le carcinome hépatocellulaire : du diagnostic au traitement.
- Borrego-Diaz, E., Kerff, F., Lee, S. H., Ferron, F., Li, Y., & Dominguez, R. (2006). Crystal structure of the actin-binding domain of α -actinin 1: Evaluating two competing actin-binding models. *Journal of Structural Biology*, 155(2), 230–238. <http://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.01.013>
- Boswell, S. A., Ongusaha, P. P., Nghiem, P., & Lee, S. W. (2007). The protective role of a small GTPase RhoE against UVB-induced DNA damage in keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(7), 4850–8. <http://doi.org/10.1074/jbc.M610532200>
- Boyault, S., Rickman, D. S., De Reyniès, A., Balabaud, C., Rebouissou, S., Jeannot, E., ... Zucman-Rossi, J. (2007). Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*, 45(1), 42–52. <http://doi.org/10.1002/hep.21467>
- Brandt, D. T., Baarlink, C., Kitzing, T. M., Kremmer, E., Ivaska, J., Nollau, P., & Grosse, R. (2009). SCAI acts as a suppressor of cancer cell invasion through the transcriptional control of beta1-integrin. *Nature Cell Biology*, 11(5), 557–68. <http://doi.org/ncb1862> [pii]\r10.1038/ncb1862
- Bréchet, C., Gozuacik, D., Murakami, Y., & Paterlini-Bréchet, P. (2000). Molecular bases for the development of hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC). *Seminars in Cancer Biology*, 10(3), 211–231. <http://doi.org/10.1006/scbi.2000.0321>
- Breuhahn, K., Vreden, S., Haddad, R., Beckebaum, S., Stippel, D., Flemming, P., ... Schirmacher, P. (2004). Molecular profiling of human hepatocellular carcinoma defines mutually exclusive interferon regulation and insulin-like growth factor II overexpression. *Cancer Research*, 64(17), 6058–64. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0292>

- Bruix, J., Raoul, J.-L., Sherman, M., Mazzaferro, V., Bolondi, L., Craxi, A., ... Hansen, H. H. (2012). Efficacy and safety of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: Subanalyses of a phase III trial. *Journal of Hepatology*, 57(4), 821–829. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.06.014>
- Bruix, J., Sherman, M., & American Association for the Study of Liver Diseases. (2011). Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 53(3), 1020–2. <http://doi.org/10.1002/hep.24199>
- Bubb, M. R., Spector, I., Bershadsky, A. D., & Korn, E. D. (1995). Swinholide A is a microfilament disrupting marine toxin that stabilizes actin dimers and severs actin filaments. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(8), 3463–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7876075>
- Bubb, M. R., Spector, I., Beyer, B. B., & Fosen, K. M. (2000). Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(7), 5163–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10671562>
- Buchwalter, G., Gross, C., & Wasylyk, B. (2004). Ets ternary complex transcription factors. *Gene*, 324, 1–14. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2003.09.028>
- Burtnick, L. D., Urosev, D., Irobi, E., Narayan, K., & Robinson, R. C. (2004). Structure of the N-terminal half of gelsolin bound to actin: roles in severing, apoptosis and FAF. *The EMBO Journal*, 23(14), 2713–22. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600280>
- Busche, S., Descot, A., Julien, S., Genth, H., & Posern, G. (2008). Epithelial cell-cell contacts regulate SRF-mediated transcription via Rac-actin-MAL signalling. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 7), 1025–1035. <http://doi.org/10.1242/jcs.014456>
- Bustelo, X. R., Sauzeau, V., & Berenjano, I. M. (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 29(4), 356–70. <http://doi.org/10.1002/bies.20558>
- Butcher, D. T., Alliston, T., & Weaver, V. M. (2009). A tense situation: forcing tumour progression. *Nature Reviews. Cancer*, 9(2), 108–22. <http://doi.org/10.1038/nrc2544>
- Camerer, E., Gjernes, E., Wiiger, M., Pringle, S., & Prydz, H. (2000). Binding of Factor VIIa to Tissue Factor on Keratinocytes Induces Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*, 275(9), 6580–6585. <http://doi.org/10.1074/jbc.275.9.6580>
- Campellone, K. G., & Welch, M. D. (n.d.). A Nucleator Arms Race: Cellular Control of Actin Assembly. <http://doi.org/10.1038/nrm2867>
- Campellone, K. G., Welch, M. D., Derman, A. I., Becker, E. C., Truong, B. D., Fujioka, A., ... Pogliano, J. (2010). *NIH Public Access. Molecular Cell* (Vol. 11). <http://doi.org/10.1038/nrm2867.A>
- Cao, D., Wang, Z., Zhang, C.-L., Oh, J., Xing, W., Li, S., ... Olson, E. N. (2005). Modulation of Smooth Muscle Gene Expression by Association of Histone Acetyltransferases and Deacetylases with Myocardin. *Molecular and Cellular Biology*, 25(1), 364–376. <http://doi.org/10.1128/MCB.25.1.364-376.2005>

- Cario-Toumaniantz, C., Reillaudoux, G., Sauzeau, V., Heutte, F., Vaillant, N., Finet, M., ... Pacaud, P. (2003). Modulation of RhoA-Rho kinase-mediated Ca²⁺ sensitization of rabbit myometrium during pregnancy - role of Rnd3. *The Journal of Physiology*, 552(Pt 2), 403–13. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.047738>
- Castillo-Lluya, S., Tatham, M. H., Jones, R. C., Jaffray, E. G., Edmondson, R. D., Hay, R. T., & Malliri, A. (2010). SUMOylation of the GTPase Rac1 is required for optimal cell migration. *Nature Cell Biology*, 12(11), 1078–85. <http://doi.org/10.1038/ncb2112>
- Caturelli, E., Bartolucci, F., Biasini, E., Vigliotti, M. L., Andriulli, A., Siena, D. A., ... Bisceglia, M. (2002). Diagnosis of liver nodules observed in chronic liver disease patients during ultrasound screening for early detection of hepatocellular carcinoma. *The American Journal of Gastroenterology*, 97(2), 397–405. <http://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2002.05477.x>
- Cavard, C., Colnot, S., Audard, V., Benhamouche, S., Finzi, L., Torre, C., ... Perret, C. (2008). Wnt/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma pathogenesis and liver physiology. *Future Oncology (London, England)*, 4(5), 647–60. <http://doi.org/10.2217/14796694.4.5.647>
- Chan, K.-L., Guan, X.-Y., Ng, I. O.-L., Marchio, A., Meddeb, M., Pineau, P., ... al., et. (2004). High-throughput tissue microarray analysis of c-myc activation in chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *Human Pathology*, 35(11), 1324–31. <http://doi.org/10.1016/j.humpath.2004.06.012>
- Chang, D. F., Belaguli, N. S., Iyer, D., Roberts, W. B., Wu, S.-P., Dong, X.-R., ... Schwartz, R. J. (2003). Cysteine-Rich LIM-Only Proteins CRP1 and CRP2 Are Potent Smooth Muscle Differentiation Cofactors. *Developmental Cell*, 4(1), 107–118. [http://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00396-9](http://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00396-9)
- Chang, J., Wei, L., Otani, T., Youker, K. A., Entman, M. L., & Schwartz, R. J. (2003). Inhibitory cardiac transcription factor, SRF-N, is generated by caspase 3 cleavage in human heart failure and attenuated by ventricular unloading. *Circulation*, 108(4), 407–13. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.0000084502.02147.83>
- Chang, J., Xie, M., Shah, V. R., Schneider, M. D., Entman, M. L., Wei, L., & Schwartz, R. J. (2006). Activation of Rho-associated coiled-coil protein kinase 1 (ROCK-1) by caspase-3 cleavage plays an essential role in cardiac myocyte apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(39), 14495–500. <http://doi.org/10.1073/pnas.0601911103>
- Chen, C. Y., & Schwartz, R. J. (1996). Recruitment of the tinman homolog Nkx-2.5 by serum response factor activates cardiac alpha-actin gene transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 16(11), 6372–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8887666>
- Chen, F., Kook, H., Milewski, R., Gitler, A. D., Lu, M. M., Li, J., ... Epstein, J. A. (2002). Hop Is an Unusual Homeobox Gene that Modulates Cardiac Development. *Cell*, 110(6), 713–723. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00932-7](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00932-7)
- Chen, J., Kitchen, C. M., Streb, J. W., & Miano, J. M. (2002). Myocardin: A component of a molecular switch for smooth muscle differentiation. *Journal of Molecular and Cellular*

Cardiology, 34(10), 1345–1356. [http://doi.org/10.1016/S0022-2828\(02\)92086-9](http://doi.org/10.1016/S0022-2828(02)92086-9)

- Chen, J., Zhou, H., Li, Q., Qiu, M., Li, Z., Tang, Q., ... Bi, F. (2011). Epigenetic modification of RhoE expression in gastric cancer cells. *Oncology Reports*, 25(1), 173–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21109974>
- Chen, X., Ni, F., Tian, X., Kondrashkina, E., Wang, Q., & Ma, J. (2013). Structural basis of actin filament nucleation by tandem W domains. *Cell Reports*, 3(6), 1910–20. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.04.028>
- Chereau, D., Boczkowska, M., Skwarek-Maruszewska, A., Fujiwara, I., Hayes, D. B., Rebowski, G., ... Dominguez, R. (2008). Leiomodin is an actin filament nucleator in muscle cells. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5873), 239–43. <http://doi.org/10.1126/science.1155313>
- Chhabra, E. S., & Higgs, H. N. (2006). INF2 Is a WASP Homology 2 Motif-containing Formin That Severs Actin Filaments and Accelerates Both Polymerization and Depolymerization * □ S. <http://doi.org/10.1074/jbc.M604666200>
- Chhabra, E. S., & Higgs, H. N. (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nature Cell Biology*, 9(10), 1110–1121. <http://doi.org/10.1038/ncb1007-1110>
- Chhaniwal, N., Li, C., Wang, J., Qiang, G., Qi, T., & Maher, H. (2015). Hepatocellular Carcinoma: Review of Current Treatment with a Focus on Transarterial Chemoembolization and Radiofrequency Ablation. *Open Journal of Radiology*, 5(5), 50–58. <http://doi.org/10.4236/ojrad.2015.51009>
- Chiarugi, P., & Giannoni, E. (2008). Anoikis: A necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochemical Pharmacology*, 76(11), 1352–1364. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.07.023>
- Chiba, T., Kita, K., Zheng, Y.-W., Yokosuka, O., Saisho, H., Iwama, A., ... Taniguchi, H. (2006). Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 44(1), 240–51. <http://doi.org/10.1002/hep.21227>
- Chiba, T., Matsuzaki, Y., Abei, M., Shoda, J., Aikawa, T., Tanaka, N., & Osuga, T. (1996). Multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-related liver cirrhosis. *Journal of Gastroenterology*, 31(4), 552–558. <http://doi.org/10.1007/BF02355056>
- Chow, N., Bell, R. D., Deane, R., Streb, J. W., Chen, J., Brooks, A., ... Zlokovic, B. V. (2007). Serum response factor and myocardin mediate arterial hypercontractility and cerebral blood flow dysregulation in Alzheimer's phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(3), 823–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.0608251104>
- Clainche, C. Le, & Carlier, M.-F. F. (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiological Reviews*, 88, 489–513. <http://doi.org/10.1152/physrev.00021.2007>
- Clark, K. A., & Graves, B. J. (2014). Dual views of SRF: A genomic exposure. *Genes and Development*, 28(9), 926–928. <http://doi.org/10.1101/gad.242420.114>

- Clevers, H., Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., Kemler, R., ... Fuchs, E. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, *127*(3), 469–80. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018>
- Coleman, M. L., Marshall, C. J., & Olson, M. F. (2004). RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *5*(5), 355–366. <http://doi.org/10.1038/nrm1365>
- Coletti, D., Daou, N., Hassani, M., Li, Z., & Parlakian, A. (2016). Serum Response Factor in muscle tissues: from development to ageing. *European Journal of Translational Myology*, *26*(2).
- Collett, G. P., Goh, X. F., Linton, E. A., Redman, C. W. G., & Sargent, I. L. (2012). RhoE is regulated by cyclic AMP and promotes fusion of human BeWo choriocarcinoma cells. *PLoS One*, *7*(1), e30453. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0030453>
- Colnot, S., Decaens, T., Niwa-Kawakita, M., Godard, C., Hamard, G., Kahn, A., ... Perret, C. (2004). 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*(49), 17216–21. <http://doi.org/10.1073/pnas.0404761101>
- Cooper, G. M. (2000). Structure and Organization of Actin Filaments.
- Cooper, J. A. (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *The Journal of Cell Biology*, *105*(4), 1473–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3312229>
- Cooper, S. J., Trinklein, N. D., Nguyen, L., & Myers, R. M. (2009). Serum response factor binding sites differ in three human cell types. *Genome Res.*, *17*, 136–144. <http://doi.org/10.1101/gr.5875007.SRF>
- Copeland, J. W., & Treisman, R. (2002). The diaphanous-related formin mDia1 controls serum response factor activity through its effects on actin polymerization. *Molecular Biology of the Cell*, *13*(11), 4088–99. <http://doi.org/10.1091/mbc.02-06-0092>
- Cotton, M., & Claing, A. (2009). G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration. *Cellular Signalling*, *21*(7), 1045–1053. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.02.008>
- Coutts, A. S., Weston, L., & La Thangue, N. B. (2009). A transcription co-factor integrates cell adhesion and motility with the p53 response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(47), 19872–19877. <http://doi.org/10.1073/pnas.0906785106>
- Cowell, C. F., Yan, I. K., Eiseler, T., Leightner, A. C., Döppler, H., & Storz, P. (2009). Loss of cell-cell contacts induces NF- κ B via RhoA-mediated activation of protein kinase D1. *Journal of Cellular Biochemistry*, *106*(4), 714–728. <http://doi.org/10.1002/jcb.22067>
- Croft, D. R., & Olson, M. F. (2011). Transcriptional regulation of Rho GTPase signaling. *Transcription*, *2*(5), 211–5. <http://doi.org/10.4161/trns.2.5.16904>
- Davis, F. J., Gupta, M., Camoretti-Mercado, B., Schwartz, R. J., & Gupta, M. P. (2003). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase activates serum response factor transcription activity by its dissociation from histone deacetylase, HDAC4. Implications in cardiac muscle gene regulation during hypertrophy. *The Journal of Biological Chemistry*,

278(22), 20047–58. <http://doi.org/10.1074/jbc.M209998200>

- de Araujo, R. M. S., Oba, Y., Kuroda, S., Tanaka, E., & Moriyama, K. (2014). RhoE regulates actin cytoskeleton organization in human periodontal ligament cells under mechanical stress. *Archives of Oral Biology*, *59*(2), 187–192. <http://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.11.010>
- de La Coste, A., Romagnolo, B., Billuart, P., Renard, C. A., Buendia, M. A., Soubrane, O., ... Perret, C. (1998). 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*(15), 8847–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9671767>
- De Souza, A. T., Hankins, G. R., Washington, M. K., Orton, T. C., & Jirtle, R. L. (1995). M6P/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity. *Nature Genetics*, *11*(4), 447–9. <http://doi.org/10.1038/ng1295-447>
- Deng, S., & Huang, C. (2014). E3 ubiquitin ligases in regulating stress fiber, lamellipodium, and focal adhesion dynamics. *Cell Adhesion & Migration*, *8*(1), 49–54. <http://doi.org/10.4161/cam.27480>
- Derynck, R., Akhurst, R. J., & Balmain, A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genetics*, *29*(2), 117–29. <http://doi.org/10.1038/ng1001-117>
- Descot, A., Rex-Haffner, M., Courtois, G., Bluteau, D., Menssen, A., Mercher, T., ... Posern, G. (2008). OTT-MAL is a deregulated activator of serum response factor-dependent gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(20), 6171–81. <http://doi.org/10.1128/MCB.00303-08>
- Discher, D. E., Mooney, D. J., & Zandstra, P. W. (2009). Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, *324*(5935), 1673–7. <http://doi.org/10.1126/science.1171643>
- Dominguez, R., & Holmes, K. C. (2011). Actin structure and function. *Annual Review of Biophysics*, *40*(3), 169–86. <http://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155359>. Actin
- Dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. a, & Nosworthy, N. J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiological Reviews*, *83*, 433–473. <http://doi.org/10.1152/physrev.00026.2002>
- Du, K. L., Chen, M., Li, J., Lepore, J. J., Mericko, P., & Parmacek, M. S. (2004). Megakaryoblastic leukemia factor-1 transduces cytoskeletal signals and induces smooth muscle cell differentiation from undifferentiated embryonic stem cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(17), 17578–86. <http://doi.org/10.1074/jbc.M400961200>
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., ... Piccolo, S. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, *474*(7350), 179–183. <http://doi.org/10.1038/nature10137>
- Durand, F., Regimbeau, J. M., Belghiti, J., Sauvanet, A., Vilgrain, V., Terris, B., ... Farges, O. (2001). Assessment of the benefits and risks of percutaneous biopsy before surgical resection of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, *35*(2), 254–258.

[http://doi.org/10.1016/S0168-8278\(01\)00108-8](http://doi.org/10.1016/S0168-8278(01)00108-8)

- Edamoto, Y., Hara, A., Biernat, W., Terracciano, L., Cathomas, G., Riehle, H.-M., ... Ohgaki, H. (2003). Alterations of RB1, p53 and Wnt pathways in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C, hepatitis B and alcoholic liver cirrhosis. *International Journal of Cancer*, *106*(3), 334–41. <http://doi.org/10.1002/ijc.11254>
- El-Serag, H. B., Rudolph, K. L., Parkin, D. M., Parkin, D. M., Okuda, K., Nakanuma, Y., ... Tong, M. J. (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, *132*(7), 2557–76. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.04.061>
- Esnault, C., Stewart, A., Gualdrini, F., East, P., Horswell, S., Matthews, N., & Treisman, R. (2014). Rho-actin signaling to the MRTF coactivators dominates the immediate transcriptional response to serum in fibroblasts. *Genes and Development*, *28*(9), 943–958. <http://doi.org/10.1101/gad.239327.114>
- Etienne-Manneville, S., & Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature*, *420*(6916), 629–635. <http://doi.org/10.1038/nature01148>
- Farazi, P. A., & DePinho, R. A. (2006). Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature Reviews. Cancer*, *6*(9), 674–87. <http://doi.org/10.1038/nrc1934>
- Farra, R., Dapas, B., Pozzato, G., Giansante, C., Heidenreich, O., Uxa, L., ... Grassi, G. (2010). Serum response factor depletion affects the proliferation of the hepatocellular carcinoma cells HepG2 and JHH6. *Biochimie*, *92*(5), 455–463. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.01.007>
- Fazal, F., Bijli, K. M., Minhajuddin, M., Rein, T., Finkelstein, J. N., & Rahman, A. (2009). Essential role of cofilin-1 in regulating thrombin-induced RelA/p65 nuclear translocation and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(31), 21047–21056. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.016444>
- Fortier, M., Comunale, F., Kucharczak, J., Blangy, A., Charrasse, S., & Gauthier-Rouvière, C. (2008). RhoE controls myoblast alignment prior fusion through RhoA and ROCK. *Cell Death and Differentiation*, *15*(8), 1221–31. <http://doi.org/10.1038/cdd.2008.34>
- Foster, R., Hu, K.-Q., Lu, Y., Nolan, K. M., Thissen, J., & Settleman, J. (1996). Identification of a Novel Human Rho Protein with Unusual Properties: GTPase Deficiency and In Vivo Farnesylation. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, *16*(6), 2689–2699.
- Freeman, W. . and C. (2008). Arp2/3 and WASP collaboration.
- Fu, Y., Liu, X., Zhou, N., Du, L., Sun, Y., Zhang, X., & Ge, Y. (2014). MicroRNA-200b stimulates tumour growth in TGFBR2-null colorectal cancers by negatively regulating p27/kip1. *Journal of Cellular Physiology*, *229*(6), 772–82. <http://doi.org/10.1002/jcp.24497>
- Fujimoto, A., Totoki, Y., Abe, T., Boroevich, K. A., Hosoda, F., Nguyen, H. H., ... Nakagawa, H. (2012). Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nature Genetics*, *44*(7), 760–4. <http://doi.org/10.1038/ng.2291>
- Fukuhara, T., Shimizu, K., Kawakatsu, T., Fukuyama, T., Minami, Y., Honda, T., ... Takai, Y. (2004). Activation of Cdc42 by trans interactions of the cell adhesion molecules nectins

- through c-Src and Cdc42-GEF FRG. *The Journal of Cell Biology*, 166(3), 393–405. <http://doi.org/10.1083/jcb.200401093>
- Gadea, G., de Toledo, M., Anguille, C., & Roux, P. (2007). Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices. *The Journal of Cell Biology*, 178(1), 23–30. <http://doi.org/10.1083/jcb.200701120>
- Ganz, A., Lambert, M., Saez, A., Silberzan, P., Buguin, A., Mège, R. M., & Ladoux, B. (2006). Traction forces exerted through N-cadherin contacts. *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization*, 98(12), 721–30. <http://doi.org/10.1042/BC20060039>
- Gauthier-Rouvière, C., Cavadore, J. C., Blanchard, J. M., Lamb, N. J., & Fernandez, A. (1991). p67SRF is a constitutive nuclear protein implicated in the modulation of genes required throughout the G1 period. *Cell Regulation*, 2(7), 575–88. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1782216>
- Geneste, O., Copeland, J. W., & Treisman, R. (2002). LIM kinase and Diaphanous cooperate to regulate serum response factor and actin dynamics. *Journal of Cell Biology*, 157(5), 831–838. <http://doi.org/10.1083/jcb.200203126>
- Georgess, D., Mazzorana, M., Terrado, J., Delprat, C., Chamot, C., Guasch, R. M., ... Machuca-Gayet, I. (2014). Comparative transcriptomics reveals RhoE as a novel regulator of actin dynamics in bone-resorbing osteoclasts. *Molecular Biology of the Cell*, 25(3), 380–96. <http://doi.org/10.1091/mbc.E13-07-0363>
- Géraud, C., Schledzewski, K., Demory, A., Klein, D., Kaus, M., Peyre, F., ... Goerdts, S. (2010). Liver sinusoidal endothelium: a microenvironment-dependent differentiation program in rat including the novel junctional protein liver endothelial differentiation-associated protein-1. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 52(1), 313–26. <http://doi.org/10.1002/hep.23618>
- Gieni, R. S., & Hendzel, M. J. (2009). Actin dynamics and functions in the interphase nucleus: moving toward an understanding of nuclear polymeric actin. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 87(1), 283–306. <http://doi.org/10.1139/O08-133>
- Gineitis, D., & Treisman, R. (2001). Differential Usage of Signal Transduction Pathways Defines Two Types of Serum Response Factor Target Gene. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), 24531–24539. <http://doi.org/10.1074/jbc.M102678200>
- Globocan. (2012). Fact Sheets by Cancer. Retrieved from http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
- Goddettes, D. W., & Frieden, C. (1986). THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Actin Polymerization THE MECHANISM OF ACTION OF CYTOCHALASIN D*, 261(34), 15974–15980.
- Goh, L. L., & Manser, E. (2010). The RhoA GEF Syx is a target of Rnd3 and regulated via a Raf1-like ubiquitin-related domain. *PLoS ONE*, 5(8). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0012409>
- Goh, L. L., & Manser, E. (2012). The GTPase-deficient Rnd proteins are stabilized by their

- effectors. *Journal of Biological Chemistry*, 287(37), 31311–31320. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.327056>
- Gómez, O., Ballester-Lurbe, B., Guasch, R. M., Pérez-Roger, I., García-Roselló, E., & Terrado, J. (2014). Analysis of RhoE expression in the testis, epididymis and ductus deferens, and the effects of its deficiency in mice. *Journal of Anatomy*, 225(6), 583–90. <http://doi.org/10.1111/joa.12241>
- Gottesbühren, U., Garg, R., Riou, P., McColl, B., Brayson, D., & Ridley, A. J. (2013). Rnd3 induces stress fibres in endothelial cells through RhoB. *Biology Open*, 2(2), 210–6. <http://doi.org/10.1242/bio.20123574>
- Grise, F., Bidaud, A., & Moreau, V. (2009). Rho GTPases in hepatocellular carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1795(2), 137–151. <http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2008.12.003>
- Grise, F., Sena, S., Bidaud-Meynard, A., Baud, J., Hiriart, J. B., Makki, K., ... Moreau, V. (2012). Rnd3/RhoE is down-regulated in hepatocellular carcinoma and controls cellular invasion. *Hepatology*, 55(6), 1766–1775. <http://doi.org/10.1002/hep.25568>
- Grosse, R., & Vartiainen, M. K. (2013). To be or not to be assembled: progressing into nuclear actin filaments. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(11), 693–697. <http://doi.org/10.1038/nrm3681>
- Guasch, R. M., Blanco, A. M., Pérez-Aragó, A., Miñambres, R., Talens-Visconti, R., Peris, B., & Guerri, C. (2007). RhoE participates in the stimulation of the inflammatory response induced by ethanol in astrocytes. *Experimental Cell Research*, 313(17), 3779–3788. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.07.018>
- Guasch, R. M., Scambler, P., Jones, G. E., & Ridley, A. J. (1998). RhoE Regulates Actin Cytoskeleton Organization and Cell Migration. *Molecular and Cellular Biology*, 18(8), 4761–71. <http://doi.org/PMID: 9671486>
- Guettler, S., Vartiainen, M. K., Miralles, F., Larijani, B., & Treisman, R. (2008). RPEL Motifs Link the Serum Response Factor Cofactor MAL but Not Myocardin to Rho Signaling via Actin Binding □. *Molecular and Cellular Biology*, 28(2), 732–742. <http://doi.org/10.1128/MCB.01623-07>
- Gumbiner, B. M., & Kim, N. G. (2014). The Hippo-YAP signaling pathway and contact inhibition of growth. *Journal of Cell Science*, 127(4), 709–717. <http://doi.org/10.1242/jcs.140103>
- Gundersen, G. G., Wen, Y., Eng, C. H., Schmoranzer, J., Cabrera-Poch, N., Morris, E. J. S., ... Gomes, E. R. (2005). Regulation of microtubules by Rho GTPases in migrating cells. *Novartis Foundation Symposium*, 269, 106-16-26, 223–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16358406>
- Guo, S., Russo, I. H., & Russo, J. (2003). Difference in gene expression profile in breast epithelial cells from women with different reproductive history. *International Journal of Oncology*, 23(4), 933–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12963971>
- Guo, X., Cao, C., Sun, J., Zhang, D., Liu, L., & Wu, D. (2014). [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(10), 1408–13.

Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25345933>

- Haidle, A. M., & Myers, A. G. (2004). An enantioselective, modular, and general route to the cytochalasins: synthesis of L-696,474 and cytochalasin B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(33), 12048–53. <http://doi.org/10.1073/pnas.0402111101>
- Halder, G., Dupont, S., & Piccolo, S. (2012). Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nature Publishing Group*, *13*(9), 591–600. <http://doi.org/10.1038/nrm3416>
- Hanna, M., Liu, H., Amir, J., Sun, Y., Morris, S. W., Siddiqui, M. A. Q., ... Chaqour, B. (2009). Mechanical Regulation of the Proangiogenic Factor CCN1/CYR61 Gene Requires the Combined Activities of MRTF-A and CREB-binding Protein Histone Acetyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(34), 23125–23136. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.019059>
- Harbott, L. K., & Nobes, C. D. (2005). A key role for Abl family kinases in EphA receptor-mediated growth cone collapse. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *30*(1), 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.05.002>
- Hayashi, K., Nakamura, S., Nishida, W., & Sobue, K. (2006). Bone Morphogenetic Protein-Induced Msx1 and Msx2 Inhibit Myocardin-Dependent Smooth Muscle Gene Transcription. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(24), 9456–9470. <http://doi.org/10.1128/MCB.00759-06>
- He, X. C., Yin, T., Grindley, J. C., Tian, Q., Sato, T., Tao, W. A., ... Li, L. (2007). PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nature Genetics*, *39*(2), 189–98. <http://doi.org/10.1038/ng1928>
- Heasman, S. J., & Ridley, A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *9*(9), 690–701. <http://doi.org/10.1038/nrm2476>
- Heemers, H. V., Regan, K. M., Dehm, S. M., & Tindall, D. J. (2007). Androgen induction of the androgen receptor coactivator four and a half LIM domain protein-2: evidence for a role for serum response factor in prostate cancer. *Cancer Research*, *67*(21), 10592–9. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1917>
- Herman, I. M. (1993). Actin isoforms. *Current Opinion in Cell Biology*, *5*(1), 48–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8448030>
- Hermann, M.-R., Jakobson, M., Colo, G. P., Rognoni, E., Jakobson, M., Kupatt, C., ... Fässler, R. (2016). Integrins synergise to induce expression of the MRTF-A-SRF target gene ISG15 for promoting cancer cell invasion. *Journal of Cell Science*, *129*(7), 1391–403. <http://doi.org/10.1242/jcs.177592>
- Hervy, M., Hoffman, L., & Beckerle, M. C. (2006). From the membrane to the nucleus and back again: bifunctional focal adhesion proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, *18*(5), 524–532. <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.08.006>
- Higgs, H. N. (2005). Formin proteins: A domain-based approach. *Trends in Biochemical Sciences*, *30*(6), 342–353. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.04.014>

- Hill, C. S., Wynne, J., & Treisman, R. (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*, *81*(8), 1159–1170. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(05\)80020-0](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80020-0)
- Hodge, R. G., & Ridley, A. J. (2016). Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <http://doi.org/10.1038/nrm.2016.67>
- Hodge, T., Cope, M. J. T. V., Jamie, M., & Cope, T. V. (2000). A myosin family tree. *Journal of Cell Science*, *113*(19), 3353–3354.
- Hong, W., & Guan, K.-L. (2012). The YAP and TAZ transcription co-activators: Key downstream effectors of the mammalian Hippo pathway. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *23*(7), 785–793. <http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.05.004>
- Hoshida, Y., Nijman, S. M. B., Kobayashi, M., Chan, J. A., Brunet, J.-P., Chiang, D. Y., ... Golub, T. R. (2009). Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*, *69*(18), 7385–92. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1089>
- Hu, Q., Guo, C., Li, Y., Aronow, B. J., & Zhang, J. (2011). LMO7 Mediates Cell-Specific Activation of the Rho-Myocardin-Related Transcription Factor-Serum Response Factor Pathway and Plays an Important Role in Breast Cancer Cell Migration. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(16), 3223–3240. <http://doi.org/10.1128/MCB.01365-10>
- Hu, T.-H., Huang, C.-C., Lin, P.-R., Chang, H.-W., Ger, L.-P., Lin, Y.-W., ... Tai, M.-H. (2003). Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, *97*(8), 1929–40. <http://doi.org/10.1002/cncr.11266>
- Huang, J., Cheng, L., Li, J., Chen, M., Zhou, D., Lu, M. M., ... Parmacek, M. S. (2008). Myocardin regulates expression of contractile genes in smooth muscle cells and is required for closure of the ductus arteriosus in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(2), 515–25. <http://doi.org/10.1172/JCI33304>
- Huang, J., Min Lu, M., Cheng, L., Yuan, L.-J., Zhu, X., Stout, A. L., ... Parmacek, M. S. (2009). Myocardin is required for cardiomyocyte survival and maintenance of heart function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(44), 18734–9. <http://doi.org/10.1073/pnas.0910749106>
- Hurteau, G. J., Spivack, S. D., & Brock, G. J. (2006). Potential mRNA degradation targets of hsa-miR-200c, identified using informatics and qRT-PCR. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *5*(17), 1951–6. <http://doi.org/10.4161/cc.5.17.3133>
- Husson, C., Renault, L., Didry, D., Pantaloni, D., & Carlier, M.-F. (2011). Cordon-Bleu uses WH2 domains as multifunctional dynamizers of actin filament assembly. *Molecular Cell*, *43*(3), 464–77. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.010>
- Huveneers, S., & Danen, E. H. J. (2009). Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *Journal of Cell Science*, *122*(Pt 8), 1059–1069. <http://doi.org/10.1242/jcs.039446>
- Iden, S., & Collard, J. G. (2008). Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *9*(11), 846–59. <http://doi.org/10.1038/nrm2521>

- Imamura, H., Matsuyama, Y., Tanaka, E., Ohkubo, T., Hasegawa, K., Miyagawa, S., ... al., et. (2003). Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *Journal of Hepatology*, 38(2), 200–207. [http://doi.org/10.1016/S0168-8278\(02\)00360-4](http://doi.org/10.1016/S0168-8278(02)00360-4)
- Ionin, B., Hammamieh, R., Shupp, J. W., Das, R., Pontzer, C. H., & Jett, M. (2008). Staphylococcal enterotoxin B causes differential expression of Rnd3 and RhoA in renal proximal tubule epithelial cells while inducing actin stress fiber assembly and apoptosis. *Microbial Pathogenesis*, 45(5), 303–309. <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2008.07.002>
- Irobi, E., Aguda, A. H., Larsson, M., Guerin, C., Yin, H. L., Burtnick, L. D., ... Robinson, R. C. (2004). Structural basis of actin sequestration by thymosin-beta4: implications for WH2 proteins. *The EMBO Journal*, 23(18), 3599–608. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600372>
- Jaalouk, D. E., & Lammerding, J. (2009). Mechanotransduction gone awry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(1), 63–73. <http://doi.org/10.1038/nrm2597>
- Jaffe, A. B., & Hall, A. (2005). RHO GTPASES: Biochemistry and Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), 247–269. <http://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721>
- Jie, W., Andrade, K. C., Lin, X., Yang, X., Yue, X., & Chang, J. (2016). Pathophysiological Functions of Rnd3/RhoE. *Comprehensive Physiology*, 6(January), 169–186. <http://doi.org/10.1002/cphy.c150018>
- Joberty, G., Petersen, C., Gao, L., & Macara, I. G. (2000). The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nature Cell Biology*, 2(8), 531–9. <http://doi.org/10.1038/35019573>
- Kadmas, J. L., & Beckerle, M. C. (2004). The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(11), 920–931. <http://doi.org/10.1038/nrm1499>
- Kalita, K., Kharebava, G., Zheng, J.-J., & Hetman, M. (2006). Role of megakaryoblastic acute leukemia-1 in ERK1/2-dependent stimulation of serum response factor-driven transcription by BDNF or increased synaptic activity. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(39), 10020–32. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2644-06.2006>
- Kanellos, G., & Frame, M. C. (2016). Cellular functions of the ADF/cofilin family at a glance. <http://doi.org/10.1242/jcs.187849>
- Katiyar, P., & Aplin, A. E. (2011). FOXD3 regulates migration properties and Rnd3 expression in melanoma cells. *Molecular Cancer Research : MCR*, 9(5), 545–52. <http://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0454>
- Kikuchi, A. (2000). Regulation of β -Catenin Signaling in the Wnt Pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <http://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1860>
- Kim, D., Kwon, Y.-K., & Cho, K.-H. (2008). The biphasic behavior of incoherent feed-forward loops in biomolecular regulatory networks. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 30(11–12), 1204–11. <http://doi.org/10.1002/bies.20839>

- Kircher, P., Hermanns, C., Nosseck, M., Drexler, M. K., Grosse, R., Fischer, M., ... Muehlich, S. (2015). Filamin A interacts with the coactivator MKL1 to promote the activity of the transcription factor SRF and cell migration. *Science Signaling*, *8*(402), ra112. <http://doi.org/10.1126/scisignal.aad2959>
- Kirk, G. D., Lesi, O. A., Mendy, M., Szymańska, K., Whittle, H., Goedert, J. J., ... Montesano, R. (2005). 249 (ser) TP53 mutation in plasma DNA, hepatitis B viral infection, and risk of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, *24*(38), 5858–67. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1208732>
- Klein, R. M., & Aplin, A. E. (2009). Rnd3 regulation of the actin cytoskeleton promotes melanoma migration and invasive outgrowth in three dimensions. *Cancer Research*, *69*(6), 2224–33. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3201>
- Klein, R. M., Spofford, L. S., Abel, E. V, Ortiz, A., & Aplin, A. E. (2008). B-RAF regulation of Rnd3 participates in actin cytoskeletal and focal adhesion organization. *Molecular Biology of the Cell*, *19*(2), 498–508. <http://doi.org/10.1091/mbc.E07-09-0895>
- Koch, B. J., Ryan, J. F., & Baxevanis, A. D. (2012). The diversification of the LIM superclass at the base of the metazoa increased subcellular complexity and promoted multicellular specialization. *PLoS One*, *7*(3), e33261. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0033261>
- Kovar, D. R. (2006). Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Current Opinion in Cell Biology*, *18*(1), 11–17. <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.12.011>
- Kremer, B. E., Adang, L. A., & Macara, I. G. (2007). Septins Regulate Actin Organization and Cell-Cycle Arrest through Nuclear Accumulation of NCK Mediated by SOCS7. *Cell*, *130*(5), 837–850. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.053>
- Kumar, M., Zhao, X., & Wang, X. W. (2011). Molecular carcinogenesis of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: one step closer to personalized medicine? *Cell & Bioscience*, *1*(1), 5. <http://doi.org/10.1186/2045-3701-1-5>
- Kuwahara, K., Barrientos, T., Pipes, G. C. T., Li, S., & Olson, E. N. (2005). Muscle-specific signaling mechanism that links actin dynamics to serum response factor. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(8), 3173–81. <http://doi.org/10.1128/MCB.25.8.3173-3181.2005>
- Kuwahara, K., Teg Pipes, G. C., McAnally, J., Richardson, J. A., Hill, J. A., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2007). Modulation of adverse cardiac remodeling by STARS, a mediator of MEF2 signaling and SRF activity. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(5), 1324–1334. <http://doi.org/10.1172/JCI31240>
- Lang, P., Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M., & Bertoglio, J. (1996). Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *The EMBO Journal*, *15*(3), 510–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8599934>
- Laurent-Puig, P., & Zucman-Rossi, J. (2006). Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene*, *25*(27), 3778–86. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1209547>
- Lee, S.-M., Vasishtha, M., & Prywes, R. (2010). Activation and repression of cellular immediate early genes by serum response factor cofactors. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(29), 22036–49. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.108878>

- Leitner, L., Shaposhnikov, D., Mengel, A., Descot, A., Julien, S., Hoffmann, R., & Posern, G. (2011). MAL/MRTF-A controls migration of non-invasive cells by upregulation of cytoskeleton-associated proteins. *Journal of Cell Science*, *124*(24), 4318–4331. <http://doi.org/10.1242/jcs.092791>
- Lesiak, A., Pelz, C., Ando, H., Zhu, M., Davare, M., Lambert, T. J., ... Wayman, G. A. (2013). A genome-wide screen of CREB occupancy identifies the RhoA inhibitors Par6C and Rnd3 as regulators of BDNF-induced synaptogenesis. *PLoS One*, *8*(6), e64658. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0064658>
- Li, J., & Anton, E. S. (2011). Rnd-ing up RhoA Activity to Link Neurogenesis with Steps in Neuronal Migration. *Developmental Cell*, *20*(4), 409–410. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.04.001>
- Li, K., Lu, Y., Liang, J., Luo, G., Ren, G., Wang, X., & Fan, D. (2009). *RhoE enhances multidrug resistance of gastric cancer cells by suppressing Bax*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 379). <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.12.044>
- Li, S., Chang, S., Qi, X., Richardson, J. A., & Olson, E. N. (2006). Requirement of a myocardin-related transcription factor for development of mammary myoepithelial cells. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(15), 5797–808. <http://doi.org/10.1128/MCB.00211-06>
- Li, S., Czubryt, M. P., McAnally, J., Bassel-Duby, R., Richardson, J. A., Wiebel, F. F., ... Olson, E. N. (2005). Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(4), 1082–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.0409103102>
- Li, S., Wang, D.-Z., Wang, Z., Richardson, J. A., & Olson, E. N. (2003). The serum response factor coactivator myocardin is required for vascular smooth muscle development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(16), 9366–70. <http://doi.org/10.1073/pnas.1233635100>
- Liebig, T., Erasmus, J., Kalaji, R., Davies, D., Loirand, G., Ridley, A., & Braga, V. M. M. (2009). RhoE is required for keratinocyte differentiation and stratification. *Molecular Biology of the Cell*, *20*(1), 452–63. <http://doi.org/10.1091/mbc.E07-11-1197>
- Liew, C. T., Li, H. M., Lo, K. W., Leow, C. K., Chan, J. Y., Hin, L. Y., ... Lee, J. C. (1999). High frequency of p16INK4A gene alterations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, *18*(3), 789–95. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1202359>
- Lin, X., Liu, B., Yang, X., Yue, X., Diao, L., Wang, J., & Chang, J. (2013). 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*(20), 8236–41. <http://doi.org/10.1073/pnas.1219995110>
- Liu, C., Chan, S. W., Guo, F., & Toloczko, A. (2016). MRTF / SRF dependent transcriptional regulation of TAZ in breast cancer cells, *7*(12).
- Liu, N., Bezprozvannaya, S., Williams, A. H., Qi, X., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2008). microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes & Development*, *22*(23), 3242–54.

<http://doi.org/10.1101/gad.1738708>

- Liu, T., Bauskin, A. R., Zaunders, J., Brown, D. A., Pankhurst, S., Russell, P. J., ... Panhurst, S. (2003). Macrophage inhibitory cytokine 1 reduces cell adhesion and induces apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Research*, *63*(16), 5034–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12941831>
- Liu, Y., Sinha, S., McDonald, O. G., Shang, Y., Hoofnagle, M. H., & Owens, G. K. (2005). Kruppel-like factor 4 abrogates myocardin-induced activation of smooth muscle gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(10), 9719–27. <http://doi.org/10.1074/jbc.M412862200>
- Livraghi, T., Giorgio, A., Marin, G., Salmi, A., de Sio, I., Bolondi, L., ... Torzilli, G. (1995). Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: long-term results of percutaneous ethanol injection. *Radiology*, *197*(1), 101–8. <http://doi.org/10.1148/radiology.197.1.7568806>
- Livraghi, T., Goldberg, S. N., Lazzaroni, S., Meloni, F., Ierace, T., Solbiati, L., & Gazelle, G. S. (2000). Hepatocellular carcinoma: radio-frequency ablation of medium and large lesions. *Radiology*, *214*(3), 761–8. <http://doi.org/10.1148/radiology.214.3.r00mr02761>
- Lonjedo, M., Poch, E., Mocholí, E., Hernández-Sánchez, M., Ivorra, C., Franke, T. F., ... Pérez-Roger, I. (2013). The Rho family member RhoE interacts with Skp2 and is degraded at the proteasome during cell cycle progression. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(43), 30872–82. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.511105>
- Luo, H., Dong, Z., Zou, J., Zeng, Q., Wu, D., & Liu, L. (2012). Down-regulation of RhoE is associated with progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Journal of Surgical Oncology*, *105*(7), 699–704. <http://doi.org/10.1002/jso.23019>
- Luo, H., Zou, J., Dong, Z., Zeng, Q., Wu, D., & Liu, L. (2012). 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*(2), 311–21. <http://doi.org/10.1042/BJ20111517>
- Ma, W., Wong, C. C. L., Tung, E. K. K., Wong, C. M., & Ng, I. O. L. (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*, *57*(1), 152–161. <http://doi.org/10.1002/hep.25987>
- Maciver, S. . (n.d.). Encyclopaedia of Actin-Binding proteins (and drugs). Retrieved January 1, 2004, from <http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/Encyclop/encycloABP.htm>
- MacNeil, L. G., Melov, S., Hubbard, A. E., Baker, S. K., & Tarnopolsky, M. A. (2010). Eccentric exercise activates novel transcriptional regulation of hypertrophic signaling pathways not affected by hormone changes. *PloS One*, *5*(5), e10695. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0010695>
- Mammoto, A., & Ingber, D. E. (2009). Cytoskeletal control of growth and cell fate switching. *Current Opinion in Cell Biology*, *21*(6), 864–870. <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.08.001>

- Marcoux, N., & Vuori, K. (2005). EGF receptor activity is essential for adhesion-induced stress fiber formation and cofilin phosphorylation. *Cellular Signalling*, *17*(11), 1449–1455. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.03.001>
- María Vieites, J., Torre, R. de la, Ramírez, M. D. C., Torres, M. I., Sánchez-Pozo, A., Gil, A., & Suárez, A. (2008). Exogenous nucleosides accelerate differentiation of rat intestinal epithelial cells. *The British Journal of Nutrition*, *99*(4), 732–8. <http://doi.org/10.1017/S0007114507837457>
- Marie-Claire, C., Salzmann, J., David, A., Courtin, C., Canestrelli, C., & Noble, F. (2007). Rnd family genes are differentially regulated by 3,4-methylenedioxymethamphetamine and cocaine acute treatment in mice brain. *Brain Research*, *1134*, 12–17. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.11.065>
- Matsudaira, P. matsudaira actin crosslinking protéines.pdf, 5Seminars in cell biology 165–74 (1994). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7919230>
- Mazzaferro, V., Regalia, E., Doci, R., Andreola, S., Pulvirenti, A., Bozzetti, F., ... Gennari, L. (1996). Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *The New England Journal of Medicine*, *334*(11), 693–9. <http://doi.org/10.1056/NEJM199603143341104>
- Medjkane, S., Perez-Sanchez, C., Gaggioli, C., Sahai, E., & Treisman, R. (2009). Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis. *Nature Cell Biology*, *11*(3), 257–268. <http://doi.org/10.1038/ncb1833>
- Mei, H., Ho, M. K. C., Yung, L. Y., Wu, Z., Ip, N. Y., & Wong, Y. H. (2011). Expression of Gaz in C2C12 cells restrains myogenic differentiation. *Cellular Signalling*, *23*(2), 389–397. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.10.009>
- Mendez, M. G., & Janmey, P. a. (2012). Transcription factor regulation by mechanical stress. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *44*(5), 728–732. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.02.003>
- Mercher, T., Raffel, G. D., Moore, S. A., Cornejo, M. G., Baudry-Bluteau, D., Cagnard, N., ... Gilliland, D. G. (2009). The OTT-MAL fusion oncogene activates RBPJ-mediated transcription and induces acute megakaryoblastic leukemia in a knockin mouse model. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(4), 852–64. <http://doi.org/10.1172/JCI35901>
- Miano, J. M. (2015). Myocardin in biology and disease. *J Biomed Res*, *29*(1), 3–19. <http://doi.org/10.7555/JBR.29.20140151>
- Miano, J. M., Ko, M. S. H., Elowitz, M. B., Levine, A. J., Siggia, E. D., Swain, P. S., ... Owens, G. K. (2003). Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *35*(6), 577–93. [http://doi.org/10.1016/s0022-2828\(03\)00110-x](http://doi.org/10.1016/s0022-2828(03)00110-x)
- Miano, J. M., Long, X., & Fujiwara, K. (2007). Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *292*(1), C70–C81. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00386.2006>
- Milyavsky, M., Shats, I., Cholostoy, A., Brosh, R., Buganim, Y., Weisz, L., ... Rotter, V. (2007).

- Inactivation of Myocardin and p16 during Malignant Transformation Contributes to a Differentiation Defect. *Cancer Cell*, 11(2), 133–146. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.11.022>
- Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A. I., & Treisman, R. (2003). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell*, 113(3), 329–342. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00278-2](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00278-2)
- Mocholí, E., Ballester-Lurbe, B., Arqué, G., Poch, E., Peris, B., Guerri, C., ... Pérez-Roger, I. (2011). RhoE deficiency produces postnatal lethality, profound motor deficits and neurodevelopmental delay in mice. *PloS One*, 6(4), e19236. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0019236>
- Mockrin, S. C., & Korn, E. D. (1980). Acanthamoeba profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry*, 19(23), 5359–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6893804>
- Morita, T., & Hayashi, K. (2013). G-actin sequestering protein thymosin- β 4 regulates the activity of myocardin-related transcription factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 437(3), 331–5. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.069>
- Morita, T., Mayanagi, T., & Sobue, K. (2007). Dual roles of myocardin-related transcription factors in epithelial-mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling. *Journal of Cell Biology*, 179(5), 1027–1042. <http://doi.org/10.1083/jcb.200708174>
- Moustakas, A., & Heldin, C.-H. (2008). Dynamic control of TGF- β signaling and its links to the cytoskeleton. *FEBS Letters*, 582(14), 2051–2065. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.03.027>
- Muehlich, S., Hampl, V., Khalid, S., Singer, S., Frank, N., Breuhahn, K., ... Prywes, R. (2012). The transcriptional coactivators megakaryoblastic leukemia 1/2 mediate the effects of loss of the tumor suppressor deleted in liver cancer 1. *Oncogene*, 31(35), 3913–3923. <http://doi.org/10.1038/onc.2011.560>
- Muehlich, S., Wang, R., Lee, S.-M., Lewis, T. C., Dai, C., & Prywes, R. (2008). Serum-Induced Phosphorylation of the Serum Response Factor Coactivator MKL1 by the Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Pathway Inhibits Its Nuclear Localization. *Molecular and Cellular Biology*, 28(20), 6302–6313. <http://doi.org/10.1128/MCB.00427-08>
- Nadiminty, N., Dutt, S., Tepper, C., & Gao, A. C. (2010). Microarray analysis reveals potential target genes of NF-kappaB2/p52 in LNCaP prostate cancer cells. *The Prostate*, 70(3), 276–87. <http://doi.org/10.1002/pros.21062>
- Nakanishi, K., Sakamoto, M., Yamasaki, S., Todo, S., & Hirohashi, S. (2005). Akt phosphorylation is a risk factor for early disease recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 103(2), 307–12. <http://doi.org/10.1002/cncr.20774>
- Nault, J. C., Calderaro, J., Di Tommaso, L., Balabaud, C., Zafrani, E. S., Bioulac-Sage, P., ... Zucman-Rossi, J. (2014). Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis. *Hepatology*, 60(6), 1983–1992. <http://doi.org/10.1002/hep.27372>

- Nault, J.-C., Datta, S., Imbeaud, S., Franconi, A., Mallet, M., Couchy, G., ... Zucman-Rossi, J. (2015). Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nature Genetics*, *47*(10), 1–15. <http://doi.org/10.1038/ng.3389>
- Navarro-Lérida, I., Sánchez-Perales, S., Calvo, M., Rentero, C., Zheng, Y., Enrich, C., & Del Pozo, M. A. (2012). A palmitoylation switch mechanism regulates Rac1 function and membrane organization. *The EMBO Journal*, *31*(3), 534–51. <http://doi.org/10.1038/emboj.2011.446>
- Nigg, E. A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *17*(6), 471–80. <http://doi.org/10.1002/bies.950170603>
- Niu, Z., Li, A., Zhang, S. X., & Schwartz, R. J. (2007). Serum response factor micromanaging cardiogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, *19*(6), 618–627. <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.09.013>
- Nobes, C. D., & Hall, A. (1995). Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, *81*(1), 53–62. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90370-4](http://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90370-4)
- Nobes, C. D., Lauritzen, I., Mattei, M. G., Paris, S., Hall, A., & Chardin, P. (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*(1), 187–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9531558>
- Noritake, J., Fukata, M., Sato, K., Nakagawa, M., Watanabe, T., Izumi, N., ... Kaibuchi, K. (2004). Positive role of IQGAP1, an effector of Rac1, in actin-meshwork formation at sites of cell-cell contact. *Molecular Biology of the Cell*, *15*(3), 1065–76. <http://doi.org/10.1091/mbc.E03-08-0582>
- Norman, C., Runswick, M., Pollock, R., & Treisman, R. (1988). Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell*, *55*(6), 989–1003. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90244-9](http://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90244-9)
- Oh, J., Richardson, J. A., & Olson, E. N. (2005). Requirement of myocardin-related transcription factor-B for remodeling of branchial arch arteries and smooth muscle differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(42), 15122–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.0507346102>
- Oh, J., Wang, Z., Wang, D.-Z., Lien, C.-L., Xing, W., & Olson, E. N. (2004). Target gene-specific modulation of myocardin activity by GATA transcription factors. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(19), 8519–28. <http://doi.org/10.1128/MCB.24.19.8519-8528.2004>
- Okano, H., Shiraki, K., Inoue, H., Ito, T., Yamanaka, T., Deguchi, M., ... Nakano, T. (2001). Comparison of screening methods for hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *Anticancer Research*, *21*(4B), 2979–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11712797>
- Okuda, K. (2002). Hepatocellular carcinoma--history, current status and perspectives. *Digestive and Liver Disease : Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, *34*(9), 613–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12405244>

- Olson, E. N., & Nordheim, A. (2010). Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *11*(5), 353–65. <http://doi.org/10.1038/nrm2890>
- Olson, E. N., & Nordheim, A. (2011). Motile Functions, *11*(5), 353–365. <http://doi.org/10.1038/nrm2890>.Linking
- Ongusaha, P. P., Kim, H.-G., Boswell, S. A., Ridley, A. J., Der, C. J., Dotto, G. P., ... Lee, S. W. (2006). *RhoE Is a Pro-Survival p53 Target Gene that Inhibits ROCK I-Mediated Apoptosis in Response to Genotoxic Stress*. *Current Biology* (Vol. 16). <http://doi.org/10.1016/j.cub.2006.10.056>
- Ornelles, D. A., Fey, E. G., & Penman, S. (1986). Cytochalasin Releases mRNA from the Cytoskeletal Framework and Inhibits Protein Synthesis. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, *6*(5), 1650–1662.
- Owens, G. K., Kumar, M. S., & Wamhoff, B. R. (2004). Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiological Reviews*, *84*(3), 767–801. <http://doi.org/10.1152/physrev.00041.2003>
- Pacary, E., Azzarelli, R., & Guillemot, F. (2013). Rnd3 coordinates early steps of cortical neurogenesis through actin-dependent and -independent mechanisms. *Nature Communications*, *4*, 1635. <http://doi.org/10.1038/ncomms2614>
- Pacary, E., Heng, J., Azzarelli, R., Riou, P., Castro, D., Lebel-Potter, M., ... Guillemot, F. (2011). Proneural Transcription Factors Regulate Different Steps of Cortical Neuron Migration through Rnd-Mediated Inhibition of RhoA Signaling. *Neuron*, *69*(6), 1069–1084. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.018>
- Pan, D. (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Developmental Cell*, *19*(4), 491–505. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.011>
- Panayiotou, R., Miralles, F., Pawlowski, R., Diring, J., Flynn, H. R., Skehel, M., & Treisman, R. (2016). Phosphorylation acts positively and negatively to regulate MRTF-A subcellular localisation and activity. *eLife*, *5*. <http://doi.org/10.7554/eLife.15460>
- Parmacek, M. S. (2007). Myocardin-related transcription factors: Critical coactivators regulating cardiovascular development and adaptation. *Circulation Research*, *100*(5), 633–644. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000259563.61091.e8>
- Pawłowski, R., Rajakylä, E. K., Vartiainen, M. K., & Treisman, R. (2010). An actin-regulated importin α/β -dependent extended bipartite NLS directs nuclear import of MRTF-A. *The EMBO Journal*, *29*(20), 3448–58. <http://doi.org/10.1038/emboj.2010.216>
- Paysan, L., Piquet, L., Saltel, F., & Moreau, V. (2016). Rnd3 in Cancer: a Review of the Evidence for Tumor Promoter or Suppressor. *Molecular Cancer Research: MCR*. <http://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0164>
- Pellegrini, L., Tan, S., & Richmond, T. J. (1995). Structure of serum response factor core bound to DNA. *Nature*, *376*(6540), 490–8. <http://doi.org/10.1038/376490a0>
- Perez-Moreno, M., & Fuchs, E. (2006). Catenins: Keeping Cells from Getting Their Signals Crossed. *Developmental Cell*, *11*(5), 601–612.

<http://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.10.010>

- Peris, B., Gonzalez-Granero, S., Ballester-Lurbe, B., García-Verdugo, J.-M., Pérez-Roger, I., Guerri, C., ... Guasch, R. M. (2012). Neuronal polarization is impaired in mice lacking RhoE expression. *Journal of Neurochemistry*, *121*(6), 903–14. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07733.x>
- Pérot, G., Derré, J., Coindre, J.-M., Tirode, F., Lucchesi, C., Mariani, O., ... Aurias, A. (2009). Strong smooth muscle differentiation is dependent on myocardin gene amplification in most human retroperitoneal leiomyosarcomas. *Cancer Research*, *69*(6), 2269–78. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1443>
- Philippar, U., Schratt, G., Dieterich, C., Müller, J. M., Galgóczy, P., Engel, F. B., ... Nordheim, A. (2004). The SRF Target Gene Fhl2 Antagonizes RhoA/MAL-Dependent Activation of SRF. *Molecular Cell*, *16*(6), 867–880. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.039>
- Piccolo, S., Dupont, S., & Cordenonsi, M. (2014). The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiological Reviews*, *94*(4), 1287–312. <http://doi.org/10.1152/physrev.00005.2014>
- Pipes, G. C. T., Creemers, E. E., & Olson, E. N. (2006). The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes & Development*, *20*(12), 1545–56. <http://doi.org/10.1101/gad.1428006>
- Plessner, M., & Grosse, R. (2015). Extracellular signaling cues for nuclear actin polymerization. *European Journal of Cell Biology*, *94*(7–9), 359–62. <http://doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.05.009>
- Poch, E., Miñambres, R., Mocholí, E., Ivorra, C., Pérez-Aragó, A., Guerri, C., ... Guasch, R. M. (2007). RhoE interferes with Rb inactivation and regulates the proliferation and survival of the U87 human glioblastoma cell line. *Experimental Cell Research*, *313*(4), 719–731. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.11.006>
- Pollard, T. D. (2016). Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1–18. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a018226>
- Poser, S., Impey, S., Trinh, K., Xia, Z., & Storm, D. R. (2000). SRF-dependent gene expression is required for PI3-kinase-regulated cell proliferation. *The EMBO Journal*, *19*(18), 4955–66. <http://doi.org/10.1093/emboj/19.18.4955>
- Posern, G., Miralles, F., Guettler, S., & Treisman, R. (2004). Mutant actins that stabilise F-actin use distinct mechanisms to activate the SRF coactivator MAL. *The EMBO Journal*, *23*(20), 3973–83. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600404>
- Posern, G., Sotiropoulos, A., & Treisman, R. (2002). Mutant actins demonstrate a role for unpolymerized actin in control of transcription by serum response factor. *Molecular Biology of the Cell*, *13*(12), 4167–78. <http://doi.org/10.1091/mbc.02-05-0068>
- Posern, G., & Treisman, R. (2006). Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends in Cell Biology*, *16*(11), 588–596. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.09.008>
- Provenzano, P. P., Keely, P. J., Aijaz, S., D'Atri, F., Citi, S., Balda, M. S., ... Qiu, M. (2011).

- Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and Rho GTPase signaling. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 8), 1195–1205. <http://doi.org/10.1242/jcs.067009>
- Qiu, P., Ritchie, R. P., Fu, Z., Cao, D., Cumming, J., Miano, J. M., ... Li, L. (2005). Myocardin Enhances Smad3-Mediated Transforming Growth Factor-1 Signaling in a CArG Box-Independent Manner: Smad-Binding Element Is an Important cis Element for SM22 Transcription In Vivo. *Circulation Research*, 97(10), 983–991. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000190604.90049.71>
- Rajakylä, E. K., & Vartiainen, M. K. (2014). Rho, nuclear actin, and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *Small GTPases*, 5, e27539. <http://doi.org/10.4161/sgtp.27539>
- Renault, L., Bugyi, B., & Carlier, M. F. (2008). Spire and Cordon-bleu: multifunctional regulators of actin dynamics. *Trends in Cell Biology*, 18(10), 494–504. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.07.008>
- Ridley, A. J. (2015). Rho GTPase signalling in cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 36, 103–112. <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.08.005>
- Riento, K., Guasch, R. M., Garg, R., Jin, B., & Ridley, A. J. (2003). RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 23(12), 4219–29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12773565>
- Riento, K., & Ridley, A. J. (2003). Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(6), 446–56. <http://doi.org/10.1038/nrm1128>
- Riento, K., & Ridley, A. J. (2006). Inhibition of ROCK by RhoE. *Methods in Enzymology*, 406, 533–541. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)06041-1](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)06041-1)
- Riento, K., Totty, N., Villalonga, P., Garg, R., Guasch, R., & Ridley, A. J. (2005). RhoE function is regulated by ROCK I-mediated phosphorylation. *The EMBO Journal*, 24(6), 1170–80. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600612>
- Riento, K., Villalonga, P., Garg, R., & Ridley, a. (2005). Function and regulation of RhoE. *Biochemical Society Transactions*, 33(Pt 4), 649–651. <http://doi.org/10.1042/BST0330649>
- Riou, P., Kjær, S., Garg, R., Purkiss, A., George, R., Cain, R. J., ... Ridley, A. J. (2013). 14-3-3 Proteins Interact with a Hybrid Prenyl-Phosphorylation Motif to Inhibit G Proteins. *Cell*, 153(3), 640–653. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.044>
- Riou, P., Villalonga, P., & Ridley, A. J. (2010). Rnd proteins: Multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression. *BioEssays*, 32(11), 986–992. <http://doi.org/10.1002/bies.201000060>
- Roberts, P. J., Mitin, N., Keller, P. J., Chenette, E. J., Madigan, J. P., Currin, R. O., ... Der, C. J. (2008). Rho Family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(37), 25150–63. <http://doi.org/10.1074/jbc.M800882200>
- Roszko, I., Sawada, A., & Solnica-Krezel, L. (2009). Regulation of convergence and extension

- movements during vertebrate gastrulation by the Wnt/PCP pathway. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(8), 986–997. <http://doi.org/10.1016/j.semcd.2009.09.004>
- Rotty, J. D., Wu, C., & Bear, J. E. (2013). New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(1), 7–12. <http://doi.org/10.1038/nrm3492>
- Rubenstein, N. M., Chan, J. F., Kim, J. Y., Hansen, S. H., & Firestone, G. L. (2005). Rnd3/RhoE induces tight junction formation in mammary epithelial tumor cells. *Experimental Cell Research*, 305(1), 74–82. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.12.010>
- Ryan, K. R., Lock, F. E., Heath, J. K., & Hotchin, N. A. (2012). Plakoglobin-dependent regulation of keratinocyte apoptosis by Rnd3. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 13), 3202–9. <http://doi.org/10.1242/jcs.101931>
- Sahin, M., Greer, P. L., Lin, M. Z., Poucher, H., Eberhart, J., Schmidt, S., ... Greenberg, M. E. (2005). Eph-dependent tyrosine phosphorylation of ephexin1 modulates growth cone collapse. *Neuron*, 46(2), 191–204. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.030>
- Sawada, T., Nishiyama, C., Kishi, T., Sasazuki, T., Komazawa-Sakon, S., Xue, X., ... Nakano, H. (2008). Fusion of OTT to BSAC results in aberrant up-regulation of transcriptional activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(39), 26820–8. <http://doi.org/10.1074/jbc.M802315200>
- Scandaglia, M., Benito, E., Morenilla-Palao, C., Fiorenza, A., del Blanco, B., Coca, Y., ... Hernández-Munain, C. (2015). Fine-tuned SRF activity controls asymmetrical neuronal outgrowth: implications for cortical migration, neural tissue lamination and circuit assembly. *Scientific Reports*, 5, 17470. <http://doi.org/10.1038/srep17470>
- Schiller, M. R. (2006). Coupling receptor tyrosine kinases to Rho GTPases-GEFs what's the link. *Cellular Signalling*, 18(11), 1834–1843. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.01.022>
- Schmidt, A., & Hall, M. N. (1998). Signaling to the actin cytoskeleton. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14, 305–38. <http://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.14.1.305>
- Schratt, G., Philippar, U., Berger, J., Schwarz, H., Heidenreich, O., & Nordheim, A. (2002). Serum response factor is crucial for actin cytoskeletal organization and focal adhesion assembly in embryonic stem cells. *Journal of Cell Biology*, 156(4), 737–750. <http://doi.org/10.1083/jcb.200106008>
- Schratt, G., Philippar, U., Hockemeyer, D., Schwarz, H., Alberti, S., & Nordheim, A. (2004). SRF regulates Bcl-2 expression and promotes cell survival during murine embryonic development. *The EMBO Journal*, 23(8), 1834–44. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600188>
- Schulze, K., Imbeaud, S., Letouzé, E., Ludmil, B., & Ligue, E. L. (2015). Europe PMC Funders Group Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nature Genetics*, 47(5), 505–511. <http://doi.org/10.1038/ng.3252>
- Selvaraj, A., & Prywes, R. (2004). Expression profiling of serum inducible genes identifies a subset of SRF target genes that are MKL dependent. *BMC Molecular Biology*, 5, 13.

<http://doi.org/10.1186/1471-2199-5-13>

- Sepulveda, J. L., Vlahopoulos, S., Iyer, D., Belaguli, N., & Schwartz, R. J. (2002). Combinatorial expression of GATA4, Nkx2-5, and serum response factor directs early cardiac gene activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25775–82. <http://doi.org/10.1074/jbc.M203122200>
- Shaposhnikov, D., Kuffer, C., Storchova, Z., & Posern, G. (2013). Myocardin related transcription factors are required for coordinated cell cycle progression. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(11), 1762–72. <http://doi.org/10.4161/cc.24839>
- Shaw, P. E., Schröter, H., & Nordheim, A. (1989). The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human c-fos promoter. *Cell*, 56(4), 563–572. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90579-5](http://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90579-5)
- Sheen, I.-S., Jeng, K.-S., & Wu, J.-Y. (2003). Is p53 gene mutation an indicator of the biological behaviors of recurrence of hepatocellular carcinoma? *World Journal of Gastroenterology*, 9(6), 1202–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12800224>
- Sherman, M., Kew, M. ., Trevisani, F., D’Intino, P. ., Morselli-Labate, A. ., Mazzella, G., ... Yang, B. (2001). Alpha-fetoprotein: an obituary. *Journal of Hepatology*, 34(4), 603–605. [http://doi.org/10.1016/S0168-8278\(01\)00025-3](http://doi.org/10.1016/S0168-8278(01)00025-3)
- Shimomura, A., Ohama, T., Hori, M., & Ozaki, H. (2009). 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(12), 1591–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20046026>
- Shin, C. H., Liu, Z.-P., Passier, R., Zhang, C.-L., Wang, D.-Z., Harris, T. M., ... Olson, E. N. (2002). Modulation of Cardiac Growth and Development by HOP, an Unusual Homeodomain Protein. *Cell*, 110(6), 725–735. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00933-9](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00933-9)
- Shore, P., & Sharrocks, A. D. (1995). The MADS-box family of transcription factors. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 229(1), 1–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7744019>
- Shurin, G. V, Tourkova, I. L., & Shurin, M. R. (2008). Low-dose chemotherapeutic agents regulate small Rho GTPase activity in dendritic cells. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, 31(5), 491–9. <http://doi.org/10.1097/CJI.0b013e318176fae4>
- Silacci, P., Mazzolai, L., Gauci, C., Stergiopoulos, N., Yin, H. L., & Hayoz, D. (2004). Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 61(19–20), 2614–23. <http://doi.org/10.1007/s00018-004-4225-6>
- Sisson, T. H., Ajayi, I. O., Subbotina, N., Dodi, A. E., Rodansky, E. S., Chibucos, L. N., ... Horowitz, J. C. (2015). Inhibition of myocardin-related transcription factor/serum response factor signaling decreases lung fibrosis and promotes mesenchymal cell apoptosis. *The American Journal of Pathology*, 185(4), 969–86. <http://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.12.005>
- Small, E. M., O’Rourke, J. R., Moresi, V., Sutherland, L. B., McAnally, J., Gerard, R. D., ... Olson, E. N. (2010). Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486.

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9), 4218–4223. <http://doi.org/10.1073/pnas.1000300107>
- Sotiropoulos, A., Gineitis, D., Copeland, J., & Treisman, R. (1999). Signal-Regulated Activation of Serum Response Factor Is Mediated by Changes in Actin Dynamics. *Cell*, 98(2), 159–169. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81011-9](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81011-9)
- Starley, B. Q., Calcagno, C. J., & Harrison, S. A. (2010). Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 51(5), 1820–32. <http://doi.org/10.1002/hep.23594>
- Stern, S., Debre, E., Stritt, C., Berger, J., Posern, G., & Knöll, B. (2009). A nuclear actin function regulates neuronal motility by serum response factor-dependent gene transcription. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(14), 4512–8. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0333-09.2009>
- Sun, Q., Chen, G., Streb, J. W., Long, X., Yang, Y., Stoeckert, C. J., & Miano, J. M. (2006). Defining the mammalian CArGome. *Genome Research*, 16(2), 197–207. <http://doi.org/10.1101/gr.4108706>
- Sun, Y., Boyd, K., Xu, W., Ma, J., Jackson, C. W., Fu, A., ... Morris, S. W. (2006). Acute myeloid leukemia-associated Mkl1 (Mrtf-a) is a key regulator of mammary gland function. *Molecular and Cellular Biology*, 26(15), 5809–26. <http://doi.org/10.1128/MCB.00024-06>
- Tang, Y., Kitisin, K., Jogunoori, W., Li, C., Deng, C.-X., Mueller, S. C., ... Mishra, L. (2008). Progenitor/stem cells give rise to liver cancer due to aberrant TGF-beta and IL-6 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), 2445–50. <http://doi.org/10.1073/pnas.0705395105>
- Taylor, A., & Halene, S. (2015). The regulatory role of serum response factor pathway in neutrophil inflammatory response. *Current Opinion in Hematology*, 22(1), 67–73. <http://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000099>
- Thorgeirsson, S. S., & Grisham, J. W. (2002). Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature Genetics*, 31(4), 339–46. <http://doi.org/10.1038/ng0802-339>
- Ting, H.-J., Yeh, S., Nishimura, K., & Chang, C. (2002). Supervillin associates with androgen receptor and modulates its transcriptional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(2), 661–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.022469899>
- Tong, J., Fu, Y., Xu, X., Fan, S., Sun, H., Liang, Y., ... Ge, Y. (2014). TGF-β1 stimulates human Tenon's capsule fibroblast proliferation by miR-200b and its targeting of p27/kip1 and RND3. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55(4), 2747–56. <http://doi.org/10.1167/iovs.13-13422>
- Torrado, M., López, E., Centeno, A., Medrano, C., Castro-Beiras, A., & Mikhailov, A. T. (2003). Myocardin mRNA is augmented in the failing myocardium: expression profiling in the porcine model and human dilated cardiomyopathy. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 81(9), 566–77. <http://doi.org/10.1007/s00109-003-0470-7>
- Treisman, R. (1986). Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell*, 46(4), 567–574.

[http://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90882-2](http://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90882-2)

- Treisman, R. (1990). The SRE: a growth factor responsive transcriptional regulator. *Seminars in Cancer Biology*, 1(1), 47–58. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2133110>
- Treisman, R. (1994). Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators. *Current Opinion in Genetics & Development*, 4(1), 96–101. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8193547>
- Turati, F., Talamini, R., Pelucchi, C., Polesel, J., Franceschi, S., Crispo, A., ... Montella, M. (2013). Metabolic syndrome and hepatocellular carcinoma risk. *British Journal of Cancer*, 108(1), 222–8. <http://doi.org/10.1038/bjc.2012.492>
- Tyburczy, M. E., Kotulska, K., Pokarowski, P., Mieczkowski, J., Kucharska, J., Grajkowska, W., ... Kaminska, B. (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(4), 1878–1890. <http://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090950>
- Udagawa, T., Yuan, J., Panigrahy, D., Chang, Y.-H., Shah, J., & D'amato, R. J. (2000). Cytochalasin E, an Epoxide Containing Aspergillus-Derived Fungal Metabolite, Inhibits Angiogenesis and Tumor Growth 1. Retrieved from <http://www.jpnet.org>
- Valenta, T., Hausmann, G., & Basler, K. (2012). The many faces and functions of β -catenin. *The EMBO Journal*, 31(12), 2714–36. <http://doi.org/10.1038/emboj.2012.150>
- Vartiainen, M. K., Guettler, S., Larijani, B., & Treisman, R. (2007). Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5832), 1749–52. <http://doi.org/10.1126/science.1141084>
- Vickers, E. R., Kasza, A., Kurnaz, I. A., Seifert, A., Zeef, L. A. H., O'Donnell, A., ... Sharrocks, A. D. (2004). Ternary Complex Factor-Serum Response Factor Complex-Regulated Gene Activity Is Required for Cellular Proliferation and Inhibition of Apoptotic Cell Death. *Molecular and Cellular Biology*, 24(23), 10340–10351. <http://doi.org/10.1128/MCB.24.23.10340-10351.2004>
- Villalonga, P., Fernández de Mattos, S., & Ridley, A. J. (2009). RhoE inhibits 4E-BP1 phosphorylation and eIF4E function impairing cap-dependent translation. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(51), 35287–96. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.050120>
- Villalonga, P., Guasch, R. M., Riento, K., & Ridley, A. J. (2004). RhoE inhibits cell cycle progression and Ras-induced transformation. *Molecular and Cellular Biology*, 24(18), 7829–40. <http://doi.org/10.1128/MCB.24.18.7829-7840.2004>
- Vinson, V. K., De La Cruz, E. M., Higgs, H. N., & Pollard, T. D. (1998). Interactions of Acanthamoeba profilin with actin and nucleotides bound to actin. *Biochemistry*, 37(31), 10871–80. <http://doi.org/10.1021/bi980093l>
- Wada, K.-I., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S., & Sasaki, H. (2011). Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development*, 138(18), 3907–3914. <http://doi.org/10.1242/dev.070987>

- Waghray, A. (2015). Hepatocellular carcinoma: From diagnosis to treatment. *World Journal of Hepatology*, 7(8), 1020. <http://doi.org/10.4254/wjh.v7.i8.1020>
- Wallar, B. J., & Alberts, A. S. (2003). The formins: Active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends in Cell Biology*, 13(8), 435–446. [http://doi.org/10.1016/S0962-8924\(03\)00153-3](http://doi.org/10.1016/S0962-8924(03)00153-3)
- Wang, D.-Z. D. Z., Chang, P. S. S. P. S., Wang, Z., Sutherland, L., Richardson, J. A. J. A., Small, E., ... Chien, K. R. (2001). Activation of Cardiac Gene Expression by Myocardin, a Transcriptional Cofactor for Serum Response Factor. *Cell*, 105(7), 851–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11439182>
- Wang, D.-Z., Li, S., Hockemeyer, D., Sutherland, L., Wang, Z., Schratt, G., ... Olson, E. N. (2002). Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(23), 14855–60. <http://doi.org/10.1073/pnas.222561499>
- Wang, F., Liu, X., Li, H., Liang, K., Miner, J. N., Hong, M., ... Jiang, T. (2006). Structure of the ligand-binding domain (LBD) of human androgen receptor in complex with a selective modulator LGD2226. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 62(Pt 11), 1067–71. <http://doi.org/10.1107/S1744309106039340>
- Wang, P., Kang, D., Cao, W., Wang, Y., & Liu, Z. (2012). Diabetes mellitus and risk of hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes/metabolism Research and Reviews*, 28(2), 109–22. <http://doi.org/10.1002/dmrr.1291>
- Wang, Z., Wang, D.-Z., Hockemeyer, D., McAnally, J., Nordheim, A., & Olson, E. N. (2004). Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. *Nature*, 428(6979), 185–189. <http://doi.org/10.1038/nature02331.1>
- Wang, Z., Wang, D.-Z., Pipes, G. C. T., & Olson, E. N. (2003). Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12), 7129–34. <http://doi.org/10.1073/pnas.1232341100>
- Weaver, A. M., Karginov, A. V., Kinley, A. W., Weed, S. A., Li, Y., Parsons, J. T. T., & Cooper, J. A. (2001). Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Current Biology*, 11(5), 370–374. [http://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00098-7](http://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00098-7)
- Wegner, A. (1976). Head to tail polymerization of actin. *Journal of Molecular Biology*, 108(1), 139–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1003481>
- Welzel, T. M., Graubard, B. I., Quraishi, S., Zeuzem, S., Davila, J. A., El-Serag, H. B., & McGlynn, K. A. (2013). Population-attributable fractions of risk factors for hepatocellular carcinoma in the United States. *The American Journal of Gastroenterology*, 108(8), 1314–21. <http://doi.org/10.1038/ajg.2013.160>
- Wennerberg, K., Rossman, K. L., & Der, C. J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 5), 843–846. <http://doi.org/10.1242/jcs.094300>
- WHO | The top 10 causes of death. (2016). *WHO*.

- Wilkens, L., Bredt, M., Flemming, P., Mengel, M., Becker, T., Klempnauer, J., & Kreipe, H. (2002). Comparative genomic hybridization (CGH) and fluorescence in situ hybridization (FISH) in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 9(3), 304–11. <http://doi.org/10.1007/s005340200034>
- Wilkens, L., Flemming, P., Gebel, M., Bleck, J., Terkamp, C., Wingen, L., ... Schlegelberger, B. (2004). Induction of aneuploidy by increasing chromosomal instability during dedifferentiation of hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(5), 1309–14. <http://doi.org/10.1073/pnas.0305817101>
- Winder, S. J. (2005). Actin-binding proteins. *Journal of Cell Science*, 118(4), 651–654. <http://doi.org/10.1242/jcs.01670>
- Winter, C. G., Wang, B., Ballew, A., Royou, A., Karess, R., Axelrod, J. D., & Luo, L. (2001). Drosophila Rho-Associated Kinase (Drok) Links Frizzled-Mediated Planar Cell Polarity Signaling to the Actin Cytoskeleton. *Cell*, 105(1), 81–91. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00298-7](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00298-7)
- Wirth, T. C., & Manns, M. P. (2016). The impact of the revolution in hepatitis C treatment on hepatocellular carcinoma. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 27(8), 1467–74. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdw219>
- Witte, H., & Bradke, F. (2008). The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *Current Opinion in Neurobiology*, 18(5), 479–487. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2008.09.019>
- Woo, H. G., Wang, X. W., Budhu, A., Kim, Y. H., Kwon, S. M., Tang, Z.-Y., ... al., et. (2011). Association of TP53 mutations with stem cell-like gene expression and survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 140(3), 1063–70. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.11.034>
- Wozniak, M. A., & Chen, C. S. (2009). Mechanotransduction in development: a growing role for contractility. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(1), 34–43. <http://doi.org/10.1038/nrm2592>
- Wu, K. J., Grandori, C., Amacker, M., Simon-Vermot, N., Polack, A., Lingner, J., & Dalla-Favera, R. (1999). Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nature Genetics*, 21(2), 220–4. <http://doi.org/10.1038/6010>
- Xia, H., Li, M., Chen, L., Leng, W., Yuan, D., Pang, X., ... Bi, F. (2013). Suppression of RND3 activity by AES downregulation promotes cancer cell proliferation and invasion. *International Journal of Molecular Medicine*, 31(5), 1081–6. <http://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1321>
- Xia, W., Li, J., Chen, L., Huang, B., Li, S., Yang, G., ... Shao, N. (2010). MicroRNA-200b regulates cyclin D1 expression and promotes S-phase entry by targeting RND3 in HeLa cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 344(1–2), 261–6. <http://doi.org/10.1007/s11010-010-0550-2>
- Xin, M., Small, E. M., Sutherland, L. B., Qi, X., Mcanally, J., Plato, C. F., ... Olson, E. N. (2009). MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of

- smooth muscle cells to injury. *Genes & Development*, 23(18), 2166–78. <http://doi.org/10.1101/gad.1842409>
- Xing, W., Zhang, T.-C., Cao, D., Wang, Z., Antos, C. L., Li, S., ... Wang, D.-Z. (2006). Myocardin induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation Research*, 98(8), 1089–97. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000218781.23144.3e>
- Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research*, 19(2), 156–72. <http://doi.org/10.1038/cr.2009.5>
- Yamamoto, J., Okada, S., Shimada, K., Okusaka, T., Yamasaki, S., Ueno, H., & Kosuge, T. (2001). Treatment strategy for small hepatocellular carcinoma: comparison of long-term results after percutaneous ethanol injection therapy and surgical resection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 34(4 Pt 1), 707–13. <http://doi.org/10.1053/jhep.2001.27950>
- Yan, J., & Jin, T. (2012). Signaling network from GPCR to the actin cytoskeleton during chemotaxis. *Bioarchitecture*, 2(1), 15–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22754623>
- Yang, J. D., & Roberts, L. R. (2010). Hepatocellular carcinoma: A global view. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 7(8), 448–58. <http://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181a15ae8.Screening>
- Yang, X., Wang, T., Lin, X., Yue, X., Wang, Q., Wang, G., ... Chang, J. (2015). Genetic deletion of Rnd3/RhoE results in mouse heart calcium leakage through upregulation of protein kinase A signaling. *Circulation Research*, 116(1), e1–e10. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.304940>
- Yang, Y., Dowling, J., Yu, Q.-C., Kouklis, P., Cleveland, D. W., Fuchs, E., ... Soukup, T. (1996). An Essential Cytoskeletal Linker Protein Connecting Actin Microfilaments to Intermediate Filaments. *Cell*, 86(4), 655–665. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80138-5](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80138-5)
- Yarmola, E. G., Somasundaram, T., Boring, T. A., Spector, I., & Bubb, M. R. (2000). Actin-latrunculin A structure and function. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(36), 28120–7. <http://doi.org/10.1074/jbc.M004253200>
- Yonemura, S., Wada, Y., Watanabe, T., Nagafuchi, A., & Shibata, M. (2010). alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nature Cell Biology*, 12(6), 533–42. <http://doi.org/10.1038/ncb2055>
- Yoshida, T., Sinha, S., Dandr??, F., Wamhoff, B. R., Hoofnagle, M. H., Kremer, B. E., ... Owens, G. K. (2003). Myocardin is a key regulator of CARg-dependent transcription of multiple smooth muscle marker genes. *Circulation Research*, 92(8), 856–864. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000068405.49081.09>
- Yu, O. M., Miyamoto, S., & Brown, J. H. (2015). Myocardin-Related Transcription Factor A and Yes-Associated Protein Exert Dual Control in G Protein-Coupled Receptor- and RhoA-Mediated Transcriptional Regulation and Cell Proliferation. *Molecular and Cellular Biology*, 36(1), 39–49. <http://doi.org/10.1128/MCB.00772-15>
- Yue, X., Yang, X., Lin, X., Yang, T., Yi, X., Dai, Y., ... Chang, J. (2014). Rnd3 haploinsufficient mice are predisposed to hemodynamic stress and develop apoptotic cardiomyopathy with

- heart failure. *Cell Death & Disease*, 5, e1284. <http://doi.org/10.1038/cddis.2014.235>
- Zaromytidou, A.-I., Miralles, F., & Treisman, R. (2006). MAL and ternary complex factor use different mechanisms to contact a common surface on the serum response factor DNA-binding domain. *Molecular and Cellular Biology*, 26(11), 4134–48. <http://doi.org/10.1128/MCB.01902-05>
- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., ... Guan, K.-L. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & Development*, 21(21), 2747–2761. <http://doi.org/10.1101/gad.1602907.Hpo/Sav>
- Zhao, H., Yang, J., Fan, T., Li, S., & Ren, X. (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(5), 1363–74. <http://doi.org/10.1007/s13277-012-0384-5>
- Zhao, Z., & Manser, E. (2005). PAK and other Rho-associated kinases--effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *The Biochemical Journal*, 386(Pt 2), 201–14. <http://doi.org/10.1042/BJ20041638>
- Zheng, B., Han, M., Bernier, M., & Wen, J. (2009). Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *The FEBS Journal*, 276(10), 2669–85. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06986.x>
- Zhou, J., Li, K., Gu, Y., Feng, B., Ren, G., Zhang, L., ... Fan, D. (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* (Vol. 415). <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.10.065>
- Zhou, Y., Li, S., Huang, Q., Xie, L., & Zhu, X. (2013). Nanog suppresses cell migration by downregulating thymosin β 4 and Rnd3. *Journal of Molecular Cell Biology*, 5(4), 239–49. <http://doi.org/10.1093/jmcb/mjt002>
- Zhu, Y., Zhou, J., Xia, H., Chen, X., Qiu, M., Huang, J., ... Bi, F. (2014). The Rho GTPase RhoE is a p53-regulated candidate tumor suppressor in cancer cells. *International Journal of Oncology*, 44(3), 896–904. <http://doi.org/10.3892/ijo.2014.2245>
- Zhu, Z., Todorova, K., Lee, K. K., Wang, J., Kwon, E., Kehayov, I., ... Mandinova, A. (2014). Small GTPase RhoE/Rnd3 is a critical regulator of Notch1 signaling. *Cancer Research*, 74(7), 2082–2093. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0452>
- Zuchero, J. B., Coutts, A. S., Quinlan, M. E., Thangue, N. B. La, & Mullins, R. D. (2009). p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. *Nature Cell Biology*, 11(4), 451–459. <http://doi.org/10.1038/ncb1852>
- Zucman-Rossi, J. (2010). Molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Digestive and Liver Disease*, 42(SUPPL. 3), 234–241. <http://doi.org/10.1016/j.dld.2009.05.020>
- Zucman-Rossi, J., Benhamouche, S., Godard, C., Boyault, S., Grimber, G., Balabaud, C., ... Perret, C. (2007). Differential effects of inactivated Axin1 and activated beta-catenin

mutations in human hepatocellular carcinomas. *Oncogene*, 26(5), 774–80.
<http://doi.org/10.1038/sj.onc.1209824>

Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J. C., & Llovet, J. M. (2015). Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, 149(5), 1226–1239.
<http://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.05.061>

Chapitre VI- Annexes

Ce chapitre a pour but de répertorier le matériel et méthodes, les différents articles auxquels j'ai participé, et les congrès auxquels j'ai assisté durant ma thèse. Chaque article sera précédé d'une brève introduction de remise en contexte.

Matériel et méthodes

I- Culture cellulaire

Les lignées Huh7, HepG2 et Hep3B, toutes dérivées de carcinome hépatocellulaire, sont cultivées dans un milieu DMEM GlutaMAX (Dubecco's Modified Eagle Medium, Gibco®) contenant 4,5 g/L de glucose, complété avec 10% de Sérum de veau fœtal, 100U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Ces lignées sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂. Les cellules sont décollées par de la trypsine (0,05% trypsine-EDTA, Gibco®). La lignée MDA-MB-231, dérivée de cancer du sein, et la lignée HEK293T (human embryonic kidney), ont également été utilisées et sont cultivées dans les mêmes conditions que les lignées précédentes.

II- Transfections

1- Transfection de plasmide

La transfection de plasmides a lieu sur cellules adhérentes. Ainsi, la veille de l'expérience, 250 000 cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits. Le lendemain, la transfection de plasmide est effectuée à l'aide de la Promofectine-Hepatocyte (PromoKine®) selon le protocole du fournisseur. 100 µL de milieu Opti-MEM® sont utilisés pour diluer 3 µg d'ADN plasmidique. Dans un autre tube, 9,6 µL de Promofectine-Hepatocyte sont ajoutés à 100 µL d'Opti-MEM®. Les deux tubes sont homogénéisés, et le mélange Promofectine/Opti-MEM® est ajouté à la solution d'ADN. Le tube ainsi obtenu est mélangé, et après 20 minutes d'incubation à température ambiante, le mélange est ajouté dans le puits contenant les cellules à transférer. Le puits est complété à 2mL avec du milieu DMEM décrit précédemment mais ne contenant pas d'antibiotiques. Les cellules peuvent ensuite être utilisées dans différentes expérimentations 24H après transfection. Lors de la transfection de plasmides dans les cellules MDA-MB-231, le protocole utilisé est similaire mis à part que l'agent de transfection est la

lipofectamine 3000®(Invitrogen) et que les quantités de produits diffèrent. Pour un puits d'une plaque 6 puits, 3,75 µL de lipofectamine sont dilués dans 125 µL d'Opti-MEM, et 2,5 µg d'ADN supplémentés de 5 µL de réactif P3000 sont dilués dans 125 µL d'Opti-MEM. Le mélange obtenu est ensuite déposé sur les cellules, comme pour la transfection classique.

Deux plasmides codant pour la protéine Rnd3 murine ont été utilisés, il s'agit des plasmides pXJ40-Flag-SBP-Rnd3 et pLVX-Rnd3-GFP. De même, 6 plasmides codant pour des constructions de la protéine MAL (MRTF-A) murine ont été utilisés. Les plasmides pEF-MAL(WT)-HA, pEF-MAL(ΔN)-HA et pEF-MAL(ΔNΔB)-HA ont été donnés par le Dr. Guido Posern, tandis que les constructions pLVX-MAL(WT)-GFP, pLVX-MAL(ΔN)-GFP et pLVX-MAL(ΔNΔB)-GFP ont été réalisées par clonage des constructions précédentes dans le vecteur pLVX-EF1α-AcGFP1-N1 à l'aide des enzymes de restrictions BstB1/Sma1. La construction pLVX-Rnd3-GFP a également été générée par clonage. Les constructions GFP ont été réalisées dans l'optique d'obtenir des protéines recombinantes fluorescentes. Enfin, les constructions V12-Cdc42, V14-RhoA et L61-Rac1, codant pour des mutants constitutivement actifs des protéines respectives et étiquetées GFP, ont été utilisés.

2- Transfection de siARN

La transfection de siARN est réalisée en deux temps, la première transfection ayant lieu sur cellules en suspension et la deuxième sur cellules adhérentes. L'agent de transfection utilisé est la lipofectamine RNAiMax® (Thermo Fischer) et le protocole suit les recommandations du fournisseur. Un mélange de transfection va être réalisé avec 500 µL d'Opti-MEM®, 5 µL de lipofectamine RNAiMax® et 10 nM de siARN. Cette solution est homogénéisée et mise à incuber 25 minutes à température ambiante. Pendant ce temps, 300000 cellules sont ensemencées dans un puits d'une plaque 6 puits, puis le mélange contenant le siARN est ajouté sur les cellules. Le milieu utilisé pour l'ensemencement des cellules est du milieu DMEM sans antibiotiques. Le lendemain, la même préparation de siARN est réalisée puis mise à incuber pendant 25 minutes. Le milieu de culture des cellules est remplacé, puis la solution de siARN est ajoutée sur les cellules. Après 5 heures d'incubation, le milieu de culture est remplacé par du milieu contenant des antibiotiques. Les cellules sont utilisées 48 heures après la seconde transfection.

Les siARN utilisés ont été achetés chez Qiagen. Les séquences de siARN utilisées sont les suivantes: siMAL: 5'-ATCACGTGTGATTGACATGTA-3' ; siSRF: 5'-CAAGATGGAGTTCATCGACAA-3' ; si β -caténine S1: 5'-GTAGCTGATATTGATGGACAG-3' ; si β -caténine S2: 5'-ACCAGTTGTGGTTAAGCTCTT-3' ; si β -caténine S3: 5'-TGTTAGTCACAACACTATCAAGA-3'. Un siARN contrôle (AllStars Negative control) est utilisé dans chaque expérience.

III- Transduction lentivirale

Les cellules HepG2 sontensemencées en plaque 6 puits, puis transduites après 24 heures à une multiplicité d'infection de 5, soit avec un plasmide lentiviral contenant la partie 3'non traduite (3'NT) de Rnd3 couplée à la GFP, soit avec un plasmide contrôle codant la GFP sans séquence 3'NT. Les cellules transduites sont sélectionnées à l'aide d'un traitement puromycine (1 μ g/mL).

IV- Extraction protéique

Les cellules sont cultivées dans des plaques 6 puits. Le jour de l'expérimentation, les cellules sont placées sur de la glace, rincées deux fois avec du PBS 1X froid (Phosphate Buffered Saline, Gibco®), puis lysées mécaniquement à l'aide d'un grattoir dans du tampon RIPA (50 mM Tris base pH 8 ; 150 mM NaCl ; 1% NP40 ; 0,5% sodium déoxycholate ; 0,1 % SDS ; 5mM EDTA ; 1mM EGTA ; cocktail d'inhibiteurs de protéases et phosphatases 1x Thermo Scientific). Le lysat obtenu est mis à incuber 30 minutes sur la glace, centrifugé 10 minutes à 13000 g et 4°C puis le surnageant est ensuite récupéré. Les extraits protéiques sont ensuite dosés par la méthode Lowry à l'aide du kit DC™ Protein Assay de Biorad afin de déterminer leur concentration. Ces extraits sont ensuite conservés à -80°C.

V- Western Blot

40 μ g d'extraits protéiques sont mélangés à du tampon de charge Laemmli (Laemmli sample buffer 1x BioRad, 10% β -mercaptoethanol). Les échantillons sont ensuite mis à chauffer 5 minutes à 95 °C afin de dénaturer les protéines. Les échantillons sont déposés sur un gel de polyacrylamide préalablement coulé (10 % acrylamide pour le gel de séparation, 5% pour le gel de concentration ; 375mM Tris HCl pH 8,8 pour le gel de séparation, 150 mM Tris HCl pH 6,8 pour le gel de séparation ; 0,1% SDS ; 0,1% APS ; 10mM TEMED). La migration est

réalisée entre 100 et 150 V dans un tampon de migration (25mM Tris Base ; 192mM glycine ; 0,1% SDS).

Les gels sont transférés après la migration sur une membrane de nitrocellulose. Le transfert est effectué à 100 V pendant 1h30 dans un tampon de transfert (25mM Tris base ; 192 mM glycine, 10% éthanol). L'efficacité du transfert peut être vérifiée par une coloration de la membrane au rouge Ponceau.

Afin d'éviter la fixation des anticorps sur des sites aspécifiques, la membrane est saturée dans une solution de blocage (TBS, 5% BSA) pendant une heure à température ambiante et sous agitation. Les anticorps primaires dilués dans une solution de TBS/BSA sont ensuite ajoutés sur la nuit à 4°C. La membrane est rincée par deux lavages de 5 minutes avec une solution de TBS-T (TBS, 0,1% Tween-20), puis les anticorps secondaires (IRDye LI-COR ; 1/5000^{ème}) sont incubés pendant une heure à température ambiante et sous agitation. Après deux rinçages de 5 minutes au TBS-T suivi d'un rinçage au TBS, la membrane peut être révélée à l'aide du système Odyssey, permettant de visualiser les protéines grâce à l'émission de deux longueurs d'ondes d'excitation dans l'infrarouge (700 et 800nm).

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : (Rnd3 Millipore #05-723 - 1/250^{ème} ; RhoA Santa Cruz #sc-418 – 1/250^{ème} ; GAPDH Santa Cruz #sc-25778 - 1/2000^{ème} ; GFP Santa Cruz #sc-9996 - 1/1000^{ème} ; HA 12CA5 Roche - 1/2000^{ème} ; E-cadhérine BD Transduction Laboratories #610181 – 1/2500^{ème} ; β -caténine BD Transduction Laboratories #610153 - 1/2000^{ème} ; intégrine β 1 BD Transduction Laboratories #553715 – 1/1000^{ème})

VI- Immunoprécipitation

L'expérience d'immunoprécipitation a été réalisée dans les cellules HepG2. Pour cette expérience, 3,5 millions de cellules sontensemencées dans une boîte 15 cm. Deux jours après ensemencement, les cellules sont déposées sur la glace, lavées deux fois par du PBS froid puis lysées à l'aide d'un grattoir dans du tampon de lyse (Tris HCl pH 7,4 50 mM ; NaCl 150 mM ; Triton X-100 1% ; Na₃VO₄ 1 mM ; cocktail d'inhibiteurs de protéases et phosphatases 1X, Thermo Scientific). Le lysat est récupéré dans un tube, mis à incuber sur la glace pendant 30 minutes puis centrifugé 10 minutes à 4°C et 16000 g. Le surnageant contenant les protéines est récupéré, dosé à l'aide du kit DC™ Protein Assay de Biorad suivant les recommandations

du fournisseur. L'immunoprécipitation est ensuite effectuée en ajoutant 6 µg d'anticorps (une condition avec un anticorps anti-β-caténine, une condition contrôle avec un anticorps IgG1 irrelevant) à 4 mg de protéines. L'ensemble est incubé sous rotation à 4°C sur la nuit. Le reste de l'extrait protéique est conservé à -80°C.

Le lendemain, pour chaque immunoprécipitation, 50 µL de billes magnétiques couplées à la protéine G (Dynabeads® Protein G, Life Technologies) sont prélavées trois fois par du tampon de lyse sans inhibiteur de protéases et phosphatases. Les billes sont ensuite ajoutées aux échantillons et l'ensemble est mis à 4°C pendant une heure sous agitation. Ensuite, à l'aide d'un portoir magnétique, le surnageant est enlevé (il est récupéré car il servira pour préparer les échantillons correspondant aux protéines non fixées sur les billes), puis les billes sont lavées 5 fois avec du tampon de lyse. Les billes sont enfin reprises dans 30 µL de tampon de charge (50% tampon de lyse ; 50% Laemmli 2X + β-mercaptoéthanol). 40 µg d'extraits protéiques totaux (et d'extraits de protéines non fixées sur les billes) sont également préparés par ajout de tampon Laemmli (Laemmli sample buffer 1x BioRad, 10% β-mercaptoethanol). Les tubes sont chauffés pendant 5 minutes à 95°C pour que les protéines soient dénaturées, puis les résultats sont analysés par dépôt sur gel et technique de Western Blot décrite dans la partie précédente).

VII- Pulldown RhoA actif

La proportion de RhoA actif dans les cellules peut être estimée par l'expérience de pulldown en piégeant le RhoA GTP par des billes recouvertes d'un domaine effecteur de RhoA. Cette expérience a été réalisée dans les cellules Huh7. 1 million de cellules sontensemencées dans une boîte 10 cm (une boîte par condition). Après traitement (transfection de plasmides) et une fois les cellules confluentes, soit deux jours après l'ensemencement, les boîtes sont déposées sur la glace, lavées deux fois par du PBS froid, puis lysées de façon mécanique à l'aide d'un grattoir dans 400 µL de tampon de lyse (50 mM Tris pH 7,5 ; 10 mM MgCl₂ ; 300 mM NaCl ; 2% NP-40 ; cocktail d'inhibiteurs de protéases et phosphatase 1X ; PMSF 1X ; Na₃VO₄ 1X). Le lysat est récupéré dans un tube froid, incubé sur la glace pendant 15 minutes puis centrifugé 10 minutes à 4°C et 16000 g. Pendant l'étape de centrifugation, 60 µg de billes glutathione couplées à la GST-Rhotekin-RBD (rhotekin binding domain, substrat de RhoA actif, Cytoskeleton) sont lavées par 500 µL de tampon de lyse. Après centrifugation des extraits

protéiques, le surnageant est récupéré. 100 μL sont mis de côté et seront utilisés pour les échantillons protéiques totaux, et les 300 μL restants sont mis en contact des billes et incubés 1h30 à 4°C sous rotation. Ensuite, les tubes sont centrifugés à 5000 g pendant 1 minute à 4°C, le surnageant est jeté puis les billes sont lavées trois fois par du tampon de lavage (25 mM Tris pH 7,5 ; 30 mM MgCl_2 ; 40 mM NaCl; cocktail d'inhibiteurs de protéases et phosphatase 1X ; PMSF 1X ; Na_3VO_4 1X). Entre chaque lavage, une étape de centrifugation de 1 minute à 4°C et 5000 g est effectuée. Après le dernier lavage, le culot de billes est repris dans 25 μL de tampon Laemmli 2X. 40 μg d'échantillons protéiques totaux sont préparés en ajoutant du tampon Laemmli, et les différents échantillons sont déposés sur gel et analysés par la technique du Western Blot.

VIII- Extraction d'ARN

Les cellules sont cultivées en plaque 6 puits. Sous hotte chimique, les cellules sont rincées par du PBS froid, puis lysées de façon mécanique avec un grattoir dans 500 μL de Trizol. Le lysat est récupéré dans un tube auquel sont ajoutés 100 μL de chloroforme et 8 μL de Glycoblu[™] (Thermo Fischer) permettant de visualiser le précipité d'ARN à la fin de l'extraction. Le tube est vortexé, laissé à incuber 5 minutes à température ambiante puis centrifugé 15 minutes à 4 °C et 16000 g. La phase aqueuse supérieure qui contient l'ARN est récupérée dans un tube propre. 200 μL d'isopropanol sont ajoutés au tube qui est ensuite mis pendant 1 heure à -80°C pour permettre la précipitation de l'ARN. Au bout d'une heure, le tube est de nouveau centrifugé pendant 15 minutes à 4°C et 16000 g, puis le surnageant est jeté. Le culot est rincé avec 1 mL d'éthanol 75%, centrifugé 5 minutes à 4°C et 16000 g. Le surnageant est jeté puis le culot est laissé à température ambiante le temps que l'éthanol s'évapore complètement. L'ARN est enfin repris dans de l'eau stérile, puis mis 5 minutes à 55°C afin que l'ARN se dissolve complètement. L'ARN est dosé à l'aide du spectrophotomètre Xpose (Proteigene). L'ARN est stocké à -80°C.

IX- RT-qPCR

2 μg d'ARN sont utilisés afin de réaliser des transcriptions inverses et d'obtenir l'ADN complémentaire (ADNc). Pour cela, un mélange contenant 2 μg d'ARN, 1 μL d'amorces

aléatoires (Random Hexamer Primers, Thermo Scientific), 1 μL de dNTP 10 mM (Thermo Scientific) et un volume d'eau permettant d'avoir un volume total de 14,5 μL , est réalisé. Ce mélange est mis 5 min à 65°C, puis 4 μL de buffer 5X, 0,5 μL d'inhibiteurs de RNase (RiboLock RNase inhibitor, Thermo Scientific), et 1 μL de Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) sont ajoutés au mélange réactionnel. Enfin, un programme de PCR composé de 10 minutes à 25°C, 30 minutes à 50°C, puis 5 minutes à 85°C permet d'obtenir les ADNc concentrés à 100 ng/ μL . A noter que des contrôles, sans enzyme de transcription inverse, sont réalisés.

Les échantillons ainsi obtenus sont conservés à -20°C avant de servir pour la PCR quantitative. Pour cette PCR, les ADNc sont dilués à 30 ng/ μL . Puis 1 μL de cette dilution est mélangé à 6 μL de SyBR Green®(Thermofischer), et déposé dans un puits d'une plaque 96 puits. A ce puits est ajouté 5 μL d'un mélange d'amorces (amorce sens et antisens, chacune à 480 nM). Une fois la plaque de qPCR remplie, elle est recouverte d'un film plastique, centrifugée puis déposé dans un thermocycleur (thermocycler CFX 96, BioRad). Le programme utilisé est le suivant :

1 cycle	95°C	10 minutes
41 cycles	95°C	15 secondes
	60 °C	1 minute
1 cycle	65°C	5 secondes
1 cycle	95°C	50 secondes

Les amorces utilisées pour ces expériences de RT-qPCR sont listées ci-dessous:

	Séquence 5'-3' de l'amorce sens	Séquence 5'-3' de l'amorce antisens
Rnd3	GCCAGCCAGAAATTATCCAGC	CTTGGCGAAGACATGGAGC
RhoA	CAGCAAGGACCAGTTCCCA	CCACCTCGATATCTGCCACAT
Rac1	ATCCGCAAACAGATGTGTTCT	CGCACCTCAGGATAACCACT
Cdc42	AAGAAAAGTGGGTGCCTGAGATAAC	AATTTGAGTCCCAACAAGCAAGA
Rnd1	TGTTAGCGAAGGATTGCTATCCA	ATCCCAGAGACTAAGCTCCAC
Rnd2	AAGTGGCAAGGAGAGACTCAA	GGAGCACTCAACATAGGACACA
r18S	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG

X- Immunofluorescence

Les cellules, ensemencées sur lamelles de verre, sont fixées avec une solution de paraformaldéhyde 4% dilué dans du PBS pendant 10 minutes à température ambiante. Après trois lavages avec du PBS, les cellules sont perméabilisées au Triton X-100 0,1% pendant 1 minute, rincées par deux lavages PBS puis déposées sur des gouttes de 20 µL de solution de blocage (TBS ; 1% BSA ; 2% SVF) pendant 5 minutes afin de bloquer les sites aspécifiques. Pendant ce temps, les anticorps primaires (GFP Santa Cruz sc-9996-1/100^{ème} ; HA 3F10 Roche-1/100^{ème}) sont dilués dans la solution de blocage et déposés sous forme de gouttes de 20 µL sur du parafilm. Les lamelles sont incubées sur les gouttes d'anticorps primaires pendant 30 minutes, puis sont déplacées successivement sur trois gouttes de TBS afin de les rincer. Les lamelles sont ensuite déplacées sur des gouttes composées d'anticorps secondaires fluorescents dilués au 1/250^{ème} dans la solution de blocage (anticorps anti-souris ou anti-rat, Interchim). A noter que la révélation de l'actine est permise par l'ajout de phalloïdine fluorescente, également diluée au 1/250^{ème}, dans la solution d'anticorps secondaires. Les lamelles sont enfin rincées sur trois gouttes successives de TBS, dans de l'eau distillée puis montées sur lames de verre avec du milieu de montage Fluoromount-G (SouthernBiotech). Afin de marquer les noyaux, du Hoechst au 1/2000^{ème} peut être ajouté à la deuxième goutte de rinçage au TBS, la lamelle étant laissée 5 minutes sur cette goutte le cas échéant. Les images sont par la suite prises à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Zeiss Axioplan 2) ou d'un microscope confocal (Leica SP5).

XI- Test de formation de sphéroïdes

Afin d'étudier la formation de sphéroïdes, de l'agar 1,5% est chauffé afin de le faire fondre, puis des gouttes de 50 µL sont déposées dans les puits d'une plaque 96 puits. La plaque est mise à incuber une heure à température ambiante afin que l'agar solidifie, puis 2000 cellules sont déposées dans chaque puits. La plaque est ensuite mise dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂. La formation de sphéroïdes est observée à partir de 24H à l'aide du microscope ZOE™ (BioRad) et la circularité des sphéroïdes est évaluée à l'aide du logiciel ImageJ.

XII- Test d'étalement cellulaire

Pour étudier l'étalement cellulaire, des lamelles de verre sont déposées dans une plaque 24 puits. 500 μL de fibronectine (F1056 ; Sigma-Aldrich) diluée à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans du PBS est ensuite déposée sur chaque lamelle. La plaque est placée à 37°C pendant une heure, avant que chaque puits ne soit rincé avec du PBS et rempli avec 1 mL de milieu DMEM. Enfin, 40000 cellules sont déposées sur les lamelles recouvertes de fibronectine, la plaque est remise à l'incubateur, puis les cellules sont fixées après 25 minutes et analysées au microscope après marquage immunofluorescent.

XIII- Test rapporteur à la luciférase

Afin de mesurer l'activité de gènes rapporteurs permettant de renseigner sur l'activité de différents promoteurs, des tests rapporteurs à la luciférase ont été réalisés à l'aide du kit Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega) et suivant les recommandations du fournisseur. Ces expériences sont basées sur l'expression de la luciférase, capable d'émettre de la luminescence en présence d'un substrat tel que la luciférine. En amont du gène de la luciférase, l'insertion de séquences d'intérêt va permettre de renseigner sur l'activité de ces séquences (*Figure 70*).

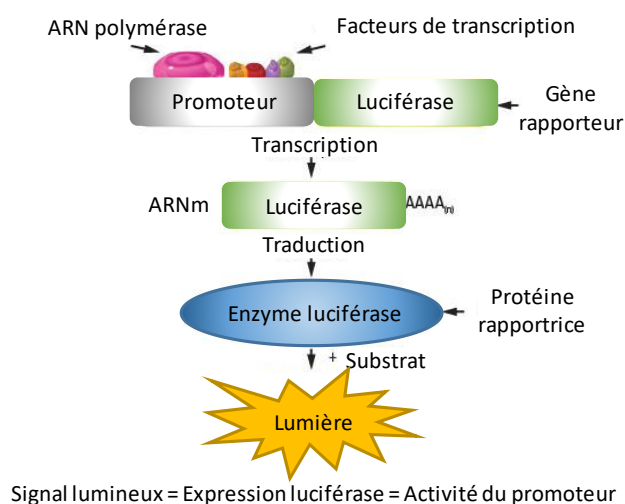


Figure 70: Test rapporteur à la luciférase

Une séquence spécifique telle qu'un promoteur d'intérêt, est fusionnée au gène de la luciférase. L'activité du promoteur va directement influencer la production de luciférase. Par l'ajout de substrat, la mesure de la luminescence renseignera sur la présence de luciférase et sera proportionnelle à l'activité du promoteur. (Image inspirée de ThermoFischer.com)

En résumé, 15000 cellules sontensemencées dans des puits d'une plaque 96 puits. Sur les cellules encore en suspension est ajoutée une solution de transfection comprenant : 16 µL d'OptiMEM ; 0,064 µg de plasmide rapporteur d'intérêt (construction couplée à la luciférase firefly) ; 0,025 µg de plasmide rapporteur contrôle Renilla (pRL-TK-Renilla, Promega) ; et 0,28µL de Promofectine-Hepatocyte. Le lendemain, chaque puits est rincé avec du PBS, puis 25 µL d'un tampon de lyse « Passive lysis Buffer 5X » (dilué au 1X dans de l'eau distillée) sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est mise à agiter à température ambiante pendant 15 minutes afin que la lyse des cellules soit complète. Dans une nouvelle plaque 96 puits, 10 µL de lysat cellulaire sont déposés, auquel 50 µL d'une solution LarII (Luciferase Assay Substrate) sont ajoutés afin de mesurer la luminescence des constructions rapportrices d'intérêt. La plaque est lue immédiatement à l'aide d'un lecteur de microplaques Clariostar® (BMGLabtech). Après cette première lecture, 50 µL d'une solution de Stop and Glo® servant à arrêter la réaction ainsi qu'à fournir le substrat du rapporteur contrôle (Renilla) est ajoutée dans chaque puits, puis une nouvelle lecture est effectuée. Les données sont récupérées et analysées en normalisant les résultats de chaque puits par rapport à la luminescence contrôle émise par la Renilla dans ces mêmes puits. Différentes constructions d'intérêt ont été utilisées et sont résumées dans le tableau suivant :

Plasmide utilisé	Promoteur étudié
pRL-TK-Renilla	Plasmide contrôle de transfection
p3DA-Luc (contient 3 SRF-binding site)	Activité transcriptionnelle de SRF
p2MA-Luc (ne contient pas de SRF binding site)	Contrôle négatif de l'activité de SRF
pGL4.10-Rnd3-Luc (Rnd3-luc)	Activité du promoteur (-1759 ; +248) de Rnd3
pGL4.10-Rnd3mut-Luc (Rnd3mut-luc)	Activité du promoteur muté (-1759 ; +248) de Rnd3
8xGTIIC-Luc (contient 8 site TEAD où se fixe YAP/TAZ)	Activité transcriptionnelle de YAP/TAZ
pGL4.10-TOP (contient sites LEF/TCF)	Activité transcriptionnelle de la β-caténine
pGL4.10-FOP (contient sites LEF/TCF mutés)	Contrôle négatif de l'activité transcriptionnelle de la β-caténine

XIV- Mutagenèse dirigée

Afin d'étudier l'importance du site potentiel de fixation de SRF dans le promoteur de Rnd3 pour la transcription de Rnd3, une mutagenèse dirigée a été effectuée à l'aide du kit Quick-Change II XL Mutagenesis (Agilent Technologies) et selon les recommandations du fournisseur. Une paire d'amorces complémentaires du promoteur de Rnd3 au niveau du site potentiel de fixation de SRF a été générée.

Ces amorces comprennent 4 bases modifiées au niveau de ce site (5'-gctcgctcccaggct**ccgcgcaaggggaggaggcagat**-3' ; 5'-atctgcctcctccc**cttgcgagg**gagcctgggagcgagc-3', en gras est représenté le site potentiel de fixation de SRF une fois muté (la séquence avant mutation étant ccataaaagg). Une réaction de PCR est réalisée avec 10 ng de plasmide pGL4.10-Rnd3-Luc ; 125 ng de chaque amorce ; 1 µL de dNTP à 10 mM ; 3 µL de QuickSolution (Promega) ; 5 µL de tampon de réaction 10X ; 1 µL d'ADN polymérase PfuUltra HF (2.5 U/µl) et enfin un volume d'eau permettant d'obtenir un volume total de 50 µL. Le cycle de PCR utilisé comporte une étape de dénaturation initiale de 1 minute à 95°C, puis 18 cycles de dénaturation (50 secondes à 95°C) -hybridation des amorces (50 secondes à 60°C) -élongation (2 minutes à 68°C), puis un dernier cycle d'élongation de 7 minutes à 68°C.

Après amplification par PCR, le plasmide parental (non muté) est digéré de sorte que seul le plasmide muté ne soit récupéré. Pour cela, 1 µL d'enzyme de restriction Dpn1 (10U/µL) (permettant de reconnaître et digérer le plasmide parental méthylé) est ajouté directement dans le tube, qui est ensuite homogénéisé et incubé 1 heure à 37°C. Enfin, 2 µL de la solution ainsi digérée sont transformés dans des bactéries ultracompetentes XL10-Gold Ultracompetent Cells (Promega). Les colonies obtenues sont mises en culture liquide dans du milieu LB (Lysogeny Broth), puis une extraction d'ADN est réalisée à l'aide du kit NucleoBond® Xtra Maxi EF (Macherey Nagel) afin de récupérer l'ADN plasmidique. L'efficacité de la mutagenèse dirigée est vérifiée par séquençage.

XV- Immunoprécipitation de chromatine

La technique d'immunoprécipitation de la chromatine a été utilisée afin de vérifier l'interaction physique entre SRF et le promoteur de Rnd3. Cette technique est composée de différentes étapes décrites ci-dessous.

Cette technique a été réalisée dans des cellules HepG2 et HEK293T. Le premier jour, 3,5 millions de cellules sontensemencées dans une boîte de 15 cm de diamètre. Pour une expérience d'immunoprécipitation, 4 boîtes sont préparées. Ainsi, à chaque expérience, afin de réaliser l'immunoprécipitation anti-SRF et l'immunoprécipitation contrôle avec un anticorps irrelevant, 8 boîtes sont préparées.

Isolement de la chromatine. Deux jours après ensemencement, les interactions ADN-protéines sont fixées par un traitement au formaldéhyde ajouté au milieu de culture (concentration finale de 1%) pendant 10 minutes à température ambiante. La fixation est stoppée par une solution de 125 mM final de glycine rajoutée pendant 5 minutes à 37°C. Les boîtes 15 cm sont ensuite posées sur la glace. Après deux lavages au PBS froid, les cellules sont lysées mécaniquement à l'aide d'un grattoir puis récupérées dans des tubes Falcon 15 mL. Une centrifugation à 2000 g et 4°C pendant 3 minutes permet de culotter les cellules. Les cellules sont ensuite remises en suspension dans 6 mL de tampon de lyse (10mM Tris pH 8 ; 10mM KCl ; 3 mM MgCl₂ ; 0,1mM EDTA ; 0,5% NP-40 ; cocktail d'inhibiteurs de protéases et phosphatases 1X). Après une incubation de 10 minutes sur la glace, les cellules sont centrifugées 15 minutes à 4°C et 5000 g. Le surnageant est retiré, puis les cellules des 4 boîtes sont reprises et rassemblées à l'aide de 5 mL d'un tampon de resuspension (50 mM Tris pH 8 ; 10 mM EDTA ; 1% SDS ; cocktail d'inhibiteurs de protéases et phosphatases 1X). Le lysat ainsi obtenu est soniqué afin de fragmenter l'ADN, à l'aide du Bioruptor Sonicator (Diagenode ; Laboratoire du Dr. Martin Teichmann, IECB, Bordeaux) par un programme de 15 minutes avec des cycles de 30 secondes toutes les 30 secondes. Cette opération est réalisée dans la glace. Les lysats sont centrifugés à 16000 g, 4°C pendant 30 minutes. Le surnageant contenant la chromatine est récupéré dans des tubes propres. A l'issue de cette étape, on obtient 5 mL de chromatine. 300 µL sont mis de côté afin de vérifier la sonication de la chromatine en fragment d'environ 400 pb et d'évaluer la concentration de la chromatine dans le tube. Si les étapes suivantes ne sont pas réalisées immédiatement, la chromatine est conservée à -80°C.

Blocage des billes de sépharose. Avant de poursuivre l'expérience, des billes de sépharose couplées à la protéine A sont bloquées afin de rendre plus spécifique l'immunoprécipitation. Pour cela, 20 µL de billes sont lavés deux fois par le tampon de dilution A (150mM KCl ; 20mM Tris pH 8 ; 10 % glycerol ; 1% Triton X-100 ; 0,2% Tween 20 ; 5mM MgCl₂ ; 1mM EDTA). Les billes sont bloquées par 1 mL de tampon de blocage (1mg/mL BSA ; 1mg/mL ADN soniqué de

sperme de saumon, Thermo Fischer ; cocktail inhibiteur de proteases et phosphatases 1X). Le blocage a lieu à 4°C, sur la nuit.

Pré-lavage de la chromatine. Ensuite, 4,5 mL de solution de chromatine sont dilués à 50 mL par le tampon de dilution A, puis 60 µL de billes pré-bloquées sont rajoutées à la solution qui est mise à incuber 1 heure à 4°C sous rotation. Le tube est centrifugé 3 minutes à 4°C et 3000 g, puis la chromatine ainsi prélevée est transférée dans un nouveau tube.

Immunoprécipitation. Afin de réaliser l'étape d'immunoprécipitation, 20 µL de billes pré-bloquées et 1 µg d'anticorps d'intérêt (SRF (G-20), Santa Cruz ; anticorps contrôle négatif IgG1, Thermo Fischer) sont rajoutés à la chromatine prélevée. L'ensemble est incubé 3 heures à 4°C sous rotation. La chromatine est centrifugée à 3000g, 4°C pendant 3 minutes puis les culots de chromatine sont lavés séquentiellement avec 1 mL de tampon de dilution A, 1 mL de tampon de lavage faible en sel (20 mM Tris pH 8 ; 150mM NaCl ; 2mM EDTA ; 0,1% SDS ; 1% Triton x-100), 1 mL de tampon de lavage riche en sel (20 mM Tris pH 8 ; 500 mM NaCl ; 2mM EDTA ; 0,1% SDS ; 1% Triton x-100), puis un nouveau lavage avec 1 mL de tampon de lavage faible en sel. Les lavages sont effectués à 4°C avec 5 minutes de rotation. Le surnageant est enfin enlevé, puis 60 µL de tampon d'élution fraîchement préparé (1% SDS ; 0,1 M NaHCO₃) sont ajoutés sur les billes. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, et une centrifugation de 2 minutes à 3000 g, le surnageant est transféré dans de nouveaux tubes.

Réversion des interactions ADN-protéines et PCR. Afin de réaliser la PCR permettant d'évaluer l'immunoprécipitation du promoteur de Rnd3 par l'utilisation de l'anticorps anti-SRF, la fixation des interactions ADN-protéines doit être réversée et l'ADN purifié. Pour cela, le volume des éluats est tout d'abord ajusté à 0,5 mL avec du tampon de dilution A. A cette solution est ajoutée 2 µL de RNase A à 20 mg/mL afin de dégrader l'ARN, puis l'ensemble est incubé 1 heure à 37°C. Ensuite, 20 µL de NaCl 5 M et 3 µL de protéinase K à 20mg/mL sont rajoutés afin d'éliminer les protéines associées à l'ADN. Les tubes sont incubés 2 heures à 42°C puis 5 heures à 65°C. L'ADN est ensuite purifié. Pour cela, 0,5 mL d'une solution phenol/chloroform/isoamyl alcohol (49,5/49,5/1) sont ajoutés. L'ensemble est vortexé puis centrifugé à 16000 g et 4°C pendant 5 minutes. La phase supérieure est récupérée, puis complétée par 1/10 du volume de NaOAc 3M, 2,5 volumes d'éthanol 95% et 1 µL de glycogène concentré à 20 µg/µL. La solution est vortexée, incubée 30 minutes à -80°C, centrifugée à 16000 g, 15 minutes et 4° C. Le supernageant est retiré et le culot est lavé avec de l'éthanol 70%. Après une dernière centrifugation de 16000 g à 4°C pendant 5 minutes, le surnageant

est enlevé, puis le culot laissé à température ambiante le temps qu'il sèche. Le culot est finalement resuspendu dans 45 µL d'eau stérile, la concentration d'ADN est mesurée à l'Xpose (Proteigene). Enfin, par PCR classique, dépôt sur gel d'agarose et révélation aux ultraviolets, la présence d'ADN est analysée.

Pour l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-SRF comme pour l'immunoprécipitation contrôle, 3 cibles ont été étudiées par PCR : Un contrôle négatif, la GAPDH (5'-AAAAGCGGGGAGAAAGTAGG-3' amorce sens et 5'-CTAGCCTCCCGGTTTCTCT-3' amorce antisens); un contrôle positif connu pour être fixé par SRF, l'intégrine β-1 (5'-TGACAGATTTCTCAAAGCAGTCTC-3' amorce sens et 5'-GCTATGACAACAGACACCTGAAAC-3' amorce antisens) et enfin le gène d'intérêt Rnd3 (5'-TAGAGGGCGCACTGCTTACA-3' amorce sens et 5'-CTCTCTGCGCGGCTTATAC-3' amorce antisens). Les couples d'amorces pour la GAPDH et l'intégrine β-1 ont précédemment été décrit dans la littérature (Brandt et al., 2009).

XVI- Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Les données sont présentées sous forme de moyenne +/- écart-type à la moyenne d'un minimum de trois expériences indépendantes. La comparaison des différentes conditions est analysée par un test ANOVA quand le nombre de conditions est supérieur à 2, et par un t-test de Student quand ce nombre est égal à 2. La significativité est acceptée pour les valeurs suivantes :

*P<0.05, ** P<0.01, and *** P<0.001.

Publication 2 :

Rnd3 in cancer : a review of the evidence for tumor promoter or suppressor

Paysan, L*, Piquet, L*, Saltel F and Moreau V.

Molecular Cancer Research (2016)

**Co-premiers auteurs*

Les Rho GTPases, membres de la superfamille Ras des petites GTPases, régulent de nombreux processus biologiques impliqués dans le développement tumoral, tels que la migration ou la prolifération cellulaire. Rnd3, une Rho GTPase atypique dénuée d'activité GTPasique et constitutivement sous forme active et liée au GTP, régule de tels processus et se retrouve ainsi au centre de diverses études évaluant son rôle dans la tumorigénèse. Il n'existe pas de consensus quant à l'expression de Rnd3 car cette protéine peut être retrouvée surexprimée ou sous-exprimée selon le contexte tumoral. Cette dérégulation est cependant toujours associée à la progression tumorale. De plus, les mécanismes à l'origine de la régulation de Rnd3 dépendent également grandement du contexte. L'objectif de cette revue était d'offrir une vue d'ensemble des données concernant Rnd3 et ses dérégulations dans les cancers. Pour chaque type de cancer, le niveau d'expression de Rnd3 a été étudié, de même que les conséquences biologiques des dérégulations observées. L'analyse de ces données a permis de montrer que selon le type tumoral, Rnd3 se comporte soit comme un suppresseur de tumeur, soit comme un promoteur de tumeur. De plus, ces données permettent de définir Rnd3 comme une cible thérapeutique intéressante afin de diminuer l'agressivité et la progression tumorale.

Publication 3 :

Identification of a novel functional domain in p190RhoGAP found mutated in tumors

Fabien Binamé*, Aurélien Bidaud-Meynard*, Laure Magnan, Léo Piquet, Bertille Montibus, Anne Chabadel, Frédéric Saltel, Valérie Lagrée and Violaine Moreau.

Journal of Cell Biology (2016)

**Co-premiers auteurs*

Une régulation spatio-temporelle précise des Rho GTPases est requise afin de réaliser une migration cellulaire efficace. La protéine p190RhoGAP (p190A), le principal régulateur négatif de RhoA, va se localiser au niveau des protrusions membranaires des cellules en migration, où son activité GAP est nécessaire à la migration directionnelle. L'objectif de cette publication était de déchiffrer les mécanismes responsables de la localisation de p190A au niveau des protrusions d'actine. L'utilisation de constructions tronquées de p190A a permis de mettre en évidence un nouveau domaine fonctionnel, le PLS (protrusion localization sequence), nécessaire et suffisant afin de permettre la localisation membranaire de p190A. Ce domaine est également requis afin d'inhiber l'activité GAP de p190A. De plus, l'analyse du PLS a permis d'identifier la cortactine comme un partenaire de p190A important pour la localisation au niveau des protrusions. La dernière partie de l'étude a été consacrée aux mutations de p190A retrouvées dans le cancer et présentes dans le PLS. Ces mutations sont capables d'influer sur la localisation et l'activité de p190A, et par conséquent sur la migration directionnelle des cellules tumorales. Les résultats obtenus ont permis d'identifier un nouveau mécanisme de régulation de p190 dans les cellules tumorales en migration.

J'ai été impliqué dans ce projet lors des révisions de la publication. Les expériences que j'ai réalisées s'articulent autour de trois axes principaux. Dans un premier temps, j'ai réalisé des transfections et des marquages immunofluorescents afin de valider la localisation membranaire de p190A et de certaines constructions tronquées, et également d'évaluer la colocalisation de ces différentes constructions avec un marqueur membranaire spécifique, la protéine VASP. Dans un second temps, j'ai évalué par Western Blot le niveau d'expression de différentes constructions utilisées au cours de l'étude. La dernière partie de mon travail a consisté à réaliser des expériences de pulldown de RhoA lors de la transfection de différentes constructions de p190A, mais également lors de l'extinction de la cortactine par des siARNs, afin d'évaluer le rôle de p190A et de son interactant la cortactine dans l'activité de RhoA.

Cancer-associated mutations in the protrusion-targeting region of p190RhoGAP impact tumor cell migration

Fabien Binamé,^{1,2*} Aurélien Bidaud-Meynard,^{1,2*} Laure Magnan,^{1,2} Léo Piquet,^{1,2} Bertille Montibus,^{1,2} Anne Chabadel,³ Frédéric Saltel,^{1,2} Valérie Lagrée,^{1,2} and Violaine Moreau^{1,2}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and ²Université de Bordeaux, Unité Mixte de Recherche 1053 Bordeaux Research In Translational Oncology, F-33000 Bordeaux, France

³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 441, F-33600 Pessac, France

Spatiotemporal regulation of RhoGTPases such as RhoA is required at the cell leading edge to achieve cell migration. p190RhoGAP (p190A) is the main negative regulator of RhoA and localizes to membrane protrusions, where its GTPase-activating protein (GAP) activity is required for directional migration. In this study, we investigated the molecular processes responsible for p190A targeting to actin protrusions. By analyzing the subcellular localization of truncated versions of p190A in hepatocellular carcinoma cells, we identified a novel functional p190A domain: the protrusion localization sequence (PLS) necessary and sufficient for p190A targeting to leading edges. Interestingly, the PLS is also required for the negative regulation of p190A RhoGAP activity. Further, we show that the F-actin binding protein cortactin binds the PLS and is required for p190A targeting to protrusions. Lastly, we demonstrate that cancer-associated mutations in PLS affect p190A localization and function, as well as tumor cell migration. Altogether, our data unveil a new mechanism of regulation of p190A in migrating tumor cells.

Introduction

Cell migration plays key roles in embryonic development, immunity, angiogenesis, and tumor metastasis. Efficient cell locomotion requires polarized processes: membrane protrusions at the front side and retraction at the trailing side. This occurs through the coordinated regulation of actin dynamics and integrin-mediated adhesion to the substratum. At the leading edge, the actin-based protrusions lamellipodia and filopodia, respectively, flattened protrusions and microspikes, contribute to cell movement (Ridley, 2011). Downstream of membrane-bound

receptors, the RhoGTPases have emerged as major regulators of the formation of F-actin-rich protrusions. RhoGTPases associate with plasma membrane under their GTP-bound form and function by facilitating the formation of effector complexes at the right time and place. Spatiotemporal analysis of the process revealed that RhoA plays a role in the onset of the protrusion, whereas Rac1 and Cdc42 are involved in the reinforcement and stabilization of the newly expanded protrusion (Machacek et al., 2009). In addition, the reciprocal balance between these GTPases activity determines cell movement. Indeed, Rac1 promotes cellular protrusion, which counteracts RhoA signaling. RhoGTPase activation is tightly regulated by the coordinated action of guanine nucleotide exchange factors (GEFs), which facilitate GTP loading and GTPase-activating proteins (GAPs), which promote GTPase inactivation by enhancing GTP hydrolysis.

p190RhoGAP (also known as ARHGAP35 or GRLF1 and hereafter called p190A) is an important regulator of RhoA activity involved in the antagonism between RhoA and Rac1 at cell protrusions (Herbrand and Ahmadian, 2006; Bustos et al., 2008). p190A was first described as a tyrosine phosphorylated protein in v-Src-transformed cells (Ellis et al., 1990; Settleman

*F. Binamé and A. Bidaud-Meynard contributed equally to this paper.

Correspondence to Violaine Moreau: violaine.moreau@inserm.fr

A. Bidaud-Meynard's present address is Dept. of Physiology, McGill University, H3G 1Y6 Montréal, Canada.

L. Magnan's present address is Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Bioingénierie Tissulaire, U1026, Université de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France.

B. Montibus' present address is Laboratoire de Génétique, Reproduction et Développement, Centre National de la Recherche Scientifique 6293, Clermont Université, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1103, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

A. Chabadel's present address is Aix-Marseille Université, F-13003 Marseille, France.

Abbreviations used: ANOVA, analysis of variance; Arp2, actin-related protein 2; BPA, branched polyamine; GAP, GTPase-activating proteins; GBD, GTP-binding segment; GEF, guanine nucleotide exchange factor; MD, middle domain; MEF, mouse embryonic fibroblast; p120BD, p120RasGAP binding domain; p190A, p190RhoGAP; PAE, porcine aortic endothelial; PLA, proximity ligation assay; PLS, protrusion localization sequence; VASP, vasodilator-stimulated phosphoprotein; WT, wild-type.

© 2016 Binamé 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/>).



et al., 1992). This phosphorylation promotes the association of p190A with p120RasGAP and its recruitment to the plasma membrane (McGlade et al., 1993; Bryant et al., 1995; Hu and Settleman, 1997; Roof et al., 1998). p190A is responsible for RhoA inactivation upon integrin signaling in fibroblasts (Nakahara et al., 1998; Arthur et al., 2000; Bradley et al., 2006; Bass et al., 2008). It also plays a central role in axon outgrowth and neural development (Brouns et al., 2000, 2001) and is a mechanosensitive master switch to determine lineage-type specification in the cardiac tissue (Kshitiz et al., 2014).

To date, only few studies are available on the function of p190A in cancer. Early studies demonstrated that p190A inhibition results in transformation of NIH/3T3 fibroblasts, whereas the overexpression of its GAP domain inhibits Ras-dependent transformation (Wang et al., 1997). This tumor-suppressor function was confirmed in oligodendroglioma and pancreatic cancer (Wolf et al., 2003; Kusama et al., 2006). However, high expression of p190A mRNA is associated with advanced state of lung carcinoma, and its expression in lung adenocarcinoma and breast carcinoma correlates with cell proliferation, migration, and invasion, arguing for an oncogenic role (Shen et al., 2008; Notsuda et al., 2013). Recently, *ARHGAP35*, the gene encoding p190A, was reported highly significantly mutated in 15% of endometrial tumors and 2% of global cancers (Lawrence et al., 2014). In this large-scale study, the nonsense mutations support a tumor suppressor function of p190A. Surprisingly, among the large number of missense mutations, none of them target the phosphorylated amino acids implicated in the regulation of p190A (Roof et al., 1998; Tatsis et al., 1998; Haskell et al., 2001; Jiang et al., 2008; Lévy et al., 2009). To get insight into the impact of cancer-associated mutations on p190A function, we performed a structure/function analysis of the protein. This approach led to the identification of a sequence sufficient to ensure p190A targeting to cell protrusions, such as lamellipodia. Moreover, a construct of p190A deleted of the identified protrusion localization sequence (p190A Δ PLS) is mislocalized and cannot target to these actin-based structures. Functional characterization of p190A Δ PLS revealed that deletion of the PLS increased the RhoGAP activity of p190A in cells. We further identified cortactin as a binding partner of the PLS and demonstrated its requirement for p190A targeting to lamellipodia's edge. Finally, we identified and characterized cancer-associated mutations in the PLS that affect p190A in a similar way to PLS deletion, unveiling a new regulatory mechanism of this RhoGAP in tumor pathophysiology.

Results

Identification of the PLS, the domain responsible for the localization of p190A to actin-based protrusions

In human hepatocellular carcinoma Huh7 cells, endogenous p190A localizes to cell edges such as membrane ruffles and lamellipodia (Fig. 1 A), as previously described in other cell types (Tsubouchi et al., 2002; Bass et al., 2008; Guegan et al., 2008). In standard conditions in which cells were plated overnight on glass coverslips, p190A colocalizes with cortical F-actin at the cell periphery. To unambiguously show the localization of p190A to actin-rich protrusions, we induced lamellipodium outgrowth by short-term spreading on fibronectin or by chemical treatment with the lamellipodial growth promoter

C8N6-branched polyamine (BPA; Nedeva et al., 2013). Endogenous p190A colocalizes along lamellipodium's edge with actin and α -actinin, an F-actin cross-linking protein found at the leading edge of migrating cells (Langanger et al., 1984; Knight et al., 2000). When expressed in cells, wild-type (WT) HA-tagged p190A (HA-p190AWT) localized similarly to the endogenous protein in standard and stimulated conditions (Fig. 1 B). Moreover, costaining with anti-vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) antibodies revealed that HA-tagged p190A localized at the very edge of lamellipodia (Fig. 1 C).

p190A is a large multidomain protein including an N-terminal GTP-binding segment (GBD) followed by four FF domains (protein-protein-interacting modules harboring two strictly conserved phenylalanine residues), a middle domain (MD), a p120RasGAP binding domain (p120BD), and the C-terminal RhoGAP domain (GAP). To functionally characterize p190A domains, we generated 12 HA-tagged truncated versions of p190A overlapping the different domains as described in Table S3. Each construct was then transfected into Huh7 cells, and actin remodeling and recombinant protein localization were analyzed by immunofluorescence microscopy (Fig. S1). Due to its RhoGAP activity, overexpression of HA-p190AWT in cells induces stress fiber loss (Ridley et al., 1993). The same pattern was observed for each construct containing the GAP domain (Fig. S1; p120BD-GAP, GAP, Δ GBD, and Δ GBD-2F). On the contrary, all of the constructs without this catalytic domain left the stress fibers unaffected (Fig. S1; Δ p120BD-GAP, GBD-4F, 4F, 4F-MD, 2F-MD-p120BD, p120BD, 2F-MD, and 2F), confirming that the GAP domain alone is sufficient to promote actin cytoskeleton reorganization. This analysis also led to the identification of a construct composed of the two last FF domains and the MD of p190A (2F-MD) as the minimal p190A protein that colocalizes with F-actin at membrane protrusions (Fig. 2 A; Fig. S1; and Table S3). This enrichment at actin-rich edges was not observed for many other soluble HA-tagged truncated constructs, ruling out artifactual staining attributable to an increased membrane thickness in this region (Fig. S1). To determine the minimal PLS, N- and C-terminal truncations of the 2F-MD construct were performed (Fig. 2 B). A deletion of 90 aa from the C-terminal end of the 2F-MD construct did not alter its membrane targeting (2F-MD3; Fig. 2, C and D). However, further C-terminal truncation dramatically decreased its localization to actin-rich edges (Fig. 2, B and D; and Fig. S2). Furthermore, truncation from the N-terminal end (1F-MD2 and MD2) altered the specificity of the localization (Fig. S2). Indeed, the suppression of the FF domains led to the nonspecific localization of p190A mutants to all F-actin structures, including stress fibers and focal adhesions (Fig. S2). We can therefore hypothesize that the MD mediates the localization of p190A to polymerized actin, whereas the FF domains coupled to the MD specify actin-rich protrusion targeting. Hence, our results demonstrate that the 2F-MD3 construct, corresponding to aa 380–971, is the minimal domain sufficient to target p190A to membrane protrusions and is therefore p190A PLS.

PLS is necessary and sufficient to target p190A to actin-based protrusions

Considering this domain as a functional PLS would imply its ability to target irrelevant proteins to cell leading edges. To test this, the PLS of p190A was fused to GFP, and the localization of the fusion protein was determined by confocal microscopy. Compared with GFP alone, which showed cytoplasmic and

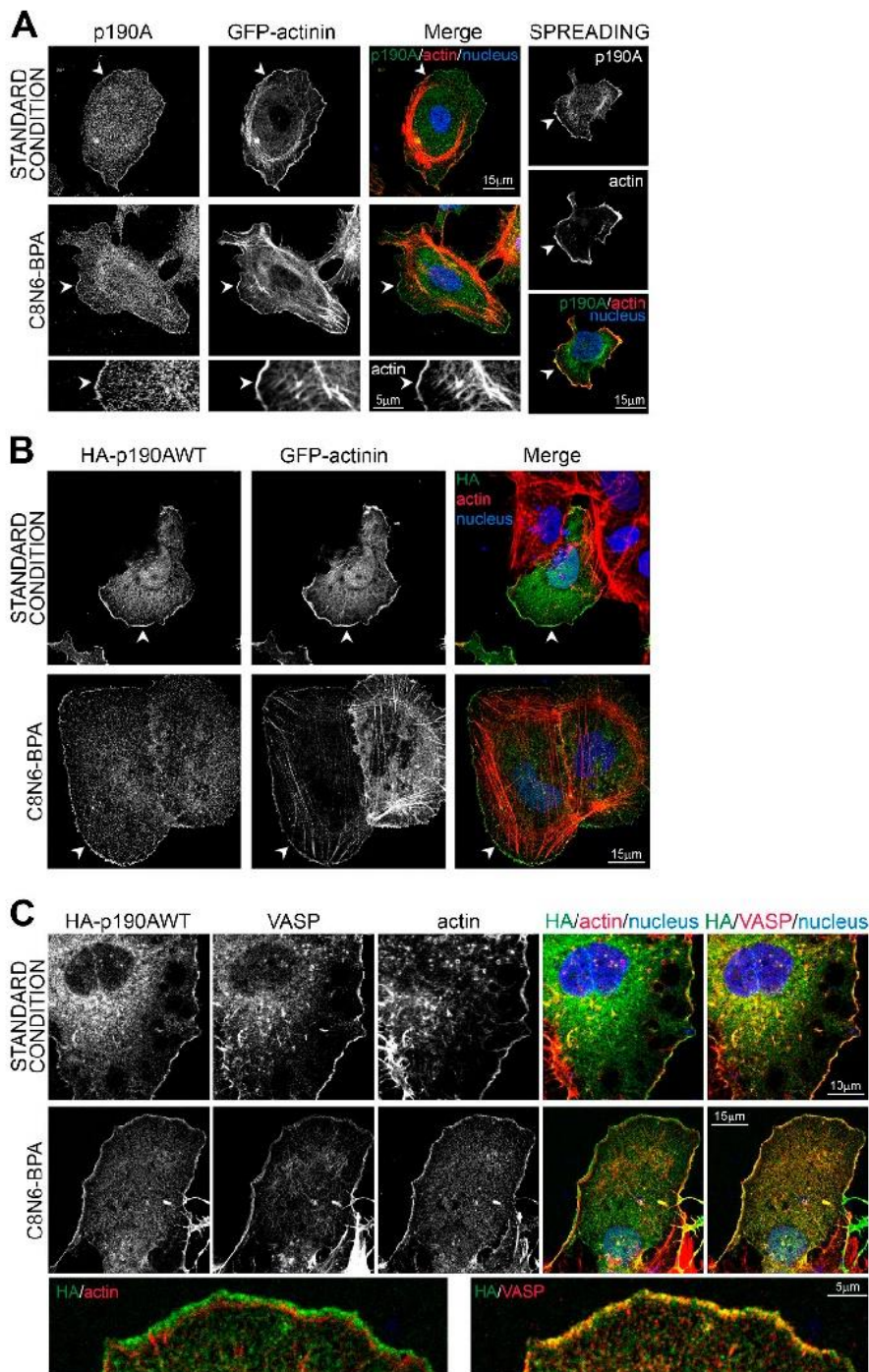


Figure 1. p190A localizes to membrane protrusions in Huh7 cells. (A) As a standard condition, Huh7 cells were plated on glass coverslips and then fixed after overnight culture. Lamellipodium growth was either stimulated by spreading on fibronectin for 30 min (top) or by treatment with 100 μ M C8N6-BPA (middle). Huh7 cells were transfected with α -actinin-GFP used as a lamellipodium marker, fixed, and stained for p190A (green), F-actin (red), and nuclei (blue). Bottom panel shows enlargement of C8N6-BPA condition. (B) Huh7 cells were transfected with HA-p190AWT and α -actinin-GFP, fixed, and stained for HA tag (green), F-actin (red), and nuclei (blue). (C) Huh7 cells were transfected with HA-p190AWT, fixed, and stained for HA tag (green), VASP (red) or F-actin (red), and nuclei (blue). Bottom panel shows enlargement of C8N6-BPA condition. (A and B) Arrowheads show membrane ruffles with p190A/HA-p190AWT localization.

nuclear localizations, GFP-PLS chimera was strongly targeted to actin-rich edges (Fig. 2, E and F). Hence, the PLS of p190A is sufficient to target proteins to the cell periphery where ruffles and lamellipodia are formed. To demonstrate that the PLS domain is required for p190A localization to membrane protrusions, a p190A Δ PLS mutant, corresponding to the protein lacking the PLS domain, was constructed and expressed in Huh7 cells (Fig. 2, G and H). Although HA-p190AWT strongly localized to cell edges (mean $91.3 \pm 1.1\%$), the HA-p190A Δ PLS mutant was not targeted to these structures (mean $7.7 \pm 1.8\%$; Fig. 2, I and J).

We next investigated whether p190A constructs localize to Rac1-induced lamellipodia. To this end, we used porcine

aortic endothelial (PAE) cells expressing a constitutively active form of Rac1 (Rac1G12V) in an IPTG-inducible manner (PAE-V12Rac1; Welch et al., 1998). As expected, IPTG-driven expression of V12Rac1 induced spreading of the majority of PAE cells (Fig. S3, A and B). These cells form continuous lamellipodia covering the entire cell periphery, where p190AWT colocalizes with F-actin (Fig. S3 C). The expression of PLS and p190A Δ PLS in these cells confirmed that the PLS localized to the lamellipodia, whereas p190A devoid of this domain did not (Fig. S3 C). Overall, our results demonstrate that the PLS is the minimal domain necessary and sufficient for p190A localization to ruffles and lamellipodia.

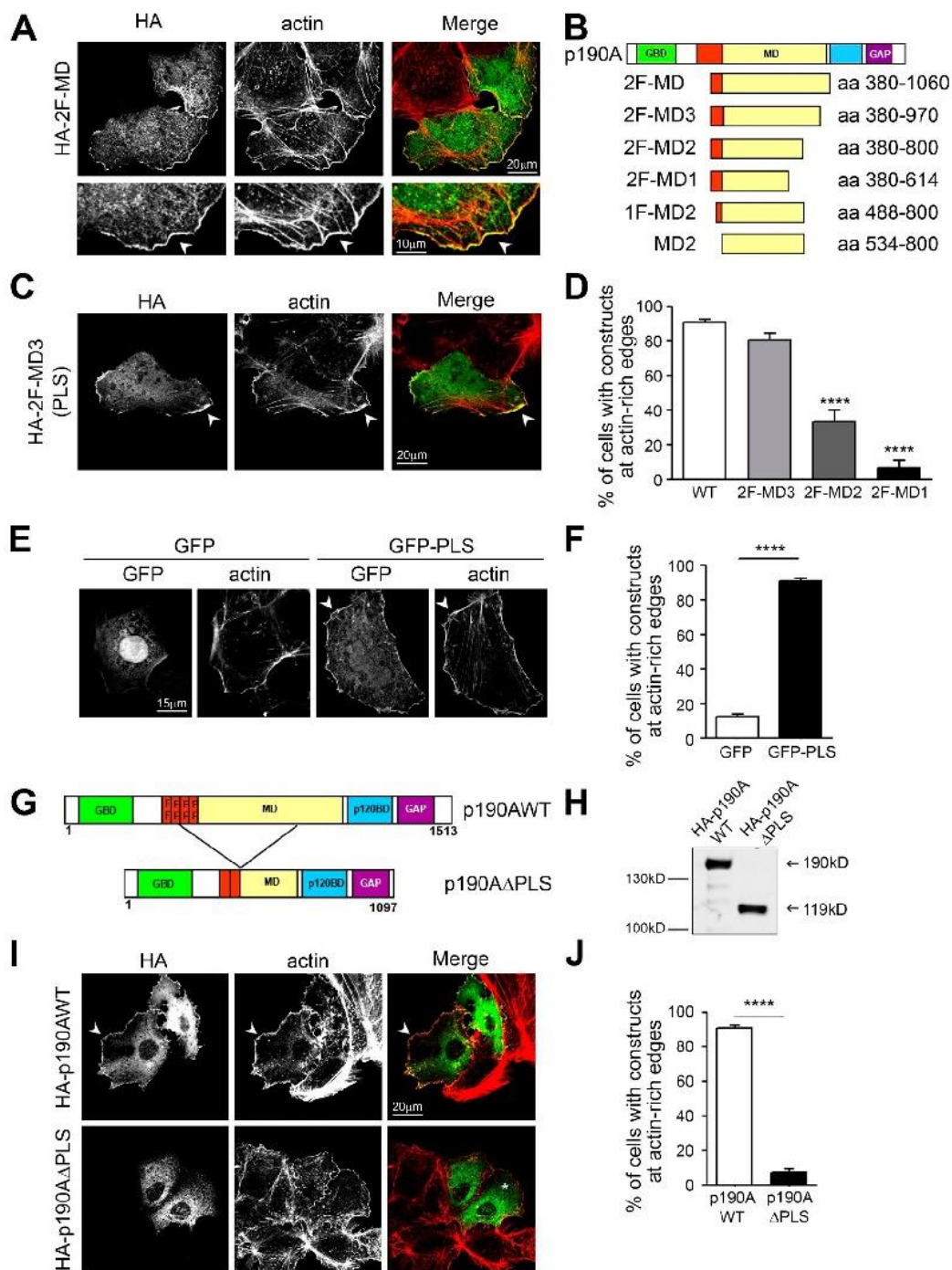


Figure 2. Identification of a domain targeting p190A to cell protrusions. (A) A region of p190A containing the two last FF motifs and the MD (2F-MD, 380–1,060 aa) was generated (see Table S3). Huh7 cells were transfected with HA-2F-MD, fixed, and stained for HA (green) and F-actin (red). Bottom panels show membrane outgrowth at higher magnification. Arrowheads show cell edge where p190A constructs and F-actin colocalize. (B) Schematic representation of N and C terminus truncations of 2F-MD. (C) Immunostaining of Huh7 cells transfected with HA-2F-MD3, fixed, and stained as in A. (D) Quantification of the number of cells presenting a localization of p190A constructs at actin-rich edges. Values are expressed as the mean \pm SEM ($n > 200$ for each construct; three to four independent experiments). ****, $P < 0.0001$ when compared with p190AWT condition, by ANOVA followed by Tukey's multiple-comparison test. (E) Huh7 cells were transfected with GFP or GFP-PLS, fixed, and stained for actin. Arrowheads point out colocalization of p190A constructs and F-actin. (F) Quantification of cells showing localization of GFP or GFP-PLS at actin-rich edges. Values are expressed as the mean \pm SEM ($n = 360$; three independent experiments). P-value from the unpaired t test is indicated. ****, $P < 0.0001$. (G) Schematic representation of the p190A Δ PLS protein compared with the full-length p190A protein (p190AWT). (H) Western blot analysis of Huh7 cells transiently expressing the recombinant proteins HA-p190AWT and HA-p190A Δ PLS. (I) Huh7 cells were transfected with HA-p190AWT or HA-p190A Δ PLS, fixed, and immunostained for HA (green) and F-actin (red). Arrowheads show actin-rich edges with construct localization; * indicates the cytoplasmic localization of p190A Δ PLS. (J) Quantification of (I), indicating percentage of cells showing HA-p190AWT or HA-p190A Δ PLS at actin-rich edges. Values are expressed as the mean \pm SEM ($n = 715$; three independent experiments). P-value from the unpaired t test is indicated. ****, $P < 0.0001$.

p190A interacts with cortactin via the PLS

To further characterize the molecular mechanisms responsible for PLS function, we searched for PLS binding partners. As PLS targets proteins to membrane protrusions, we first tested a potential interaction of the PLS with phospholipids. Phospholipid binding assays were performed using purified GST-PLS on PIP strip membranes. Unlike PLC- γ 1-PH, which corresponds to the pleckstrin homology domain of the PLC- γ 1 and Rgd1, a yeast RhoGAP protein (Prouzet-Mauléon et al., 2008), PLS was not able to interact with phospholipids (Fig. S4 A). We then performed GST pull-down assays using GST-PLS as bait in Huh7 cell lysates. Candidate partner proteins were screened by immunoblotting based on shared characteristics with p190A, such as association with F-actin and localization to membrane protrusions. This approach successfully identified cortactin as a specific partner of PLS, contrary to the actin-related protein 2 (Arp2), which did not bind to GST-PLS (Fig. S4 B). Cortactin is a crucial regulator of actin cytoskeleton dynamics involved in lamellipodial persistence through the binding of the Arp2/3 complex and F-actin (Bryce et al., 2005). We confirmed this interaction in Huh7 cells by coimmunoprecipitating transiently expressed mcherry-cortactin with HA-tagged PLS and p190AWT. In the same conditions, p190A Δ PLS displayed a dramatically reduced binding to cortactin (Fig. 3 A). The interaction between p190A and cortactin was also confirmed on endogenous proteins by coprecipitating cortactin using anti-p190 antibody in Huh7 cells (Fig. 3 B). To visualize the interaction between cortactin and p190A in the cell, we used the proximity ligation assay (PLA). As shown in Fig. 3 (C and D), PLS-containing constructs HA-p190AWT and GFP-PLS displayed dots of interaction with cortactin in the whole cell body with an increased density at the plasma membrane. α -Actinin-GFP used as negative control and HA-p190A Δ PLS displayed only background dots (Fig. 3, C and D). To avoid any potential artifact from expression difference between constructs, PLA was then tested using antibodies directed against endogenous p190A and cortactin. As positive and negative controls, antibodies directed, respectively, against two epitopes of cortactin or two noninteracting proteins present at the cell periphery, cortactin and vinculin, were used. As expected, the positive control produced many dots in the whole cell with a greater density at membrane ruffles where cortactin localizes, whereas the negative control produced only few background dots (Fig. 3 E). PLA performed with endogenous p190A and cortactin revealed dots in the whole cell but preferentially at the cell edges (Fig. 3 E, left). Quantification of dots density (Fig. 3 D) confirmed the close association of p190A and cortactin and the requirement of PLS in this association.

Cortactin is required for p190A targeting to actin-based protrusions

To test whether cortactin is required for p190A targeting to membrane protrusions, we studied the impact of cortactin silencing on p190A subcellular localization. To study this mechanism in a well-defined structure, we induced lamellipodia with C8N6-BPA in Huh7 cells. Silencing cortactin with two different siRNAs produced a similar and dramatic decrease of cortactin expression without affecting p190A level (Fig. 4 A). Lamellipodia induced in Huh7 cells transfected with control siRNA presented both cortactin and p190A at their edge (Fig. 4 B). When siRNA targeting cortactin is

transfected, cells exhibiting the most efficient silencing of cortactin displayed a defect in p190A staining at lamellipodia's edge. We quantified the effect of cortactin knockdown on the localization of p190A at the cell periphery (Fig. 4, C and D; and Fig. S4 C). Arp3, a known interacting partner of cortactin, and α -actinin were used as positive and negative controls, respectively. Measurement of relative staining intensities in cells treated with control siRNA showed peaks of actin, cortactin, Arp3, and α -actinin-GFP at the lamellipodium's edge, as expected. Downregulation of cortactin erased the peak of cortactin without affecting actin or α -actinin-GFP expression at the cell edge. However, it reduced the peak of Arp3 and p190A. These results, together with the highly significant correlation found between cortactin staining and both Arp3 and p190A at lamellipodium's edge (Fig. 4 D and Fig. S4 C), confirm the role of cortactin in Arp3 recruitment (Weaver et al., 2002) and reveal the requirement of cortactin for p190A targeting (Fig. 4 C).

PLS is required for the autoinhibition of p190A GAP activity

To functionally characterize the PLS domain, we analyzed the impact of its deletion on the RhoGAP activity of p190A. Because RhoA activity controls stress fibers and focal adhesion maturation and disassembly (Binamé et al., 2010), we analyzed the effect of p190A constructs expression on actin cytoskeleton (Fig. 5 A). 3 h after plating on a highly adhesive substrate of fibronectin, untransfected cells displayed many stress fibers, cells expressing HA-p190AWT less fibers, and cells expressing HA-p190A Δ PLS no fibers at all (Figs. 5 A and 6 D for quantification), suggesting that the expression of this latter construct resulted in a higher RhoGAP activity in cells. We thus analyzed RhoA activation using a GST-Rhotekin pull-down assay in p190AWT- or p190A Δ PLS-transfected cells (Fig. 5 B). The expression of both constructs resulted in the inhibition of RhoA, with a more important effect observed for the p190A Δ PLS mutant, arguing for an enhanced GAP activity in cells. Hence, deletion of the PLS increases the protein capacity to inhibit cellular RhoA and remodel actin cytoskeleton. The strong effect of Δ PLS may result from increased intrinsic GAP catalytic activity toward RhoA. To analyze the level of activation of p190AWT and - Δ PLS, we performed an affinity precipitation assay with the activated form of RhoA (RhoAQ63L) that binds with high affinity to activated GAPs and effectors in the cell (García-Mata et al., 2006). Recombinant GST-RhoAQ63L was incubated with protein extracts of Huh7 cells expressing either HA-p190AWT or HA-p190A Δ PLS. Interestingly, p190A Δ PLS exhibited a higher affinity for active RhoA than p190AWT (Fig. 5 C), indicating that the GAP domain is more inclined to interact with active RhoA in the Δ PLS version of the protein. As cortactin is a partner of the PLS responsible for p190A localization, we then tested whether cortactin interaction affects the binding capacity of p190A to active RhoA. Surprisingly, we found that overexpression of cortactin decreases the ability of p190A to bind active RhoA (Fig. 5 D). Overall, our results show that besides its role in targeting p190A to cell protrusions, the PLS domain is important for the regulation of p190A interaction with active RhoA. Moreover, these data suggest that the PLS is committed in an autoinhibited conformation of p190A that is relieved upon PLS deletion and promoted by cortactin interaction.

p190A interacts with cortactin via the PLS

To further characterize the molecular mechanisms responsible for PLS function, we searched for PLS binding partners. As PLS targets proteins to membrane protrusions, we first tested a potential interaction of the PLS with phospholipids. Phospholipid binding assays were performed using purified GST-PLS on PIP strip membranes. Unlike PLC- γ 1-PH, which corresponds to the pleckstrin homology domain of the PLC- γ 1 and Rgd1, a yeast RhoGAP protein (Prouzet-Mauléon et al., 2008), PLS was not able to interact with phospholipids (Fig. S4 A). We then performed GST pull-down assays using GST-PLS as bait in Huh7 cell lysates. Candidate partner proteins were screened by immunoblotting based on shared characteristics with p190A, such as association with F-actin and localization to membrane protrusions. This approach successfully identified cortactin as a specific partner of PLS, contrary to the actin-related protein 2 (Arp2), which did not bind to GST-PLS (Fig. S4 B). Cortactin is a crucial regulator of actin cytoskeleton dynamics involved in lamellipodial persistence through the binding of the Arp2/3 complex and F-actin (Bryce et al., 2005). We confirmed this interaction in Huh7 cells by coimmunoprecipitating transiently expressed mcherry-cortactin with HA-tagged PLS and p190AWT. In the same conditions, p190A Δ PLS displayed a dramatically reduced binding to cortactin (Fig. 3 A). The interaction between p190A and cortactin was also confirmed on endogenous proteins by coprecipitating cortactin using anti-p190 antibody in Huh7 cells (Fig. 3 B). To visualize the interaction between cortactin and p190A in the cell, we used the proximity ligation assay (PLA). As shown in Fig. 3 (C and D), PLS-containing constructs HA-p190AWT and GFP-PLS displayed dots of interaction with cortactin in the whole cell body with an increased density at the plasma membrane. α -Actinin-GFP used as negative control and HA-p190A Δ PLS displayed only background dots (Fig. 3, C and D). To avoid any potential artifact from expression difference between constructs, PLA was then tested using antibodies directed against endogenous p190A and cortactin. As positive and negative controls, antibodies directed, respectively, against two epitopes of cortactin or two noninteracting proteins present at the cell periphery, cortactin and vinculin, were used. As expected, the positive control produced many dots in the whole cell with a greater density at membrane ruffles where cortactin localizes, whereas the negative control produced only few background dots (Fig. 3 E). PLA performed with endogenous p190A and cortactin revealed dots in the whole cell but preferentially at the cell edges (Fig. 3 E, left). Quantification of dots density (Fig. 3 D) confirmed the close association of p190A and cortactin and the requirement of PLS in this association.

Cortactin is required for p190A targeting to actin-based protrusions

To test whether cortactin is required for p190A targeting to membrane protrusions, we studied the impact of cortactin silencing on p190A subcellular localization. To study this mechanism in a well-defined structure, we induced lamellipodia with C8N6-BPA in Huh7 cells. Silencing cortactin with two different siRNAs produced a similar and dramatic decrease of cortactin expression without affecting p190A level (Fig. 4 A). Lamellipodia induced in Huh7 cells transfected with control siRNA presented both cortactin and p190A at their edge (Fig. 4 B). When siRNA targeting cortactin is

transfected, cells exhibiting the most efficient silencing of cortactin displayed a defect in p190A staining at lamellipodia's edge. We quantified the effect of cortactin knockdown on the localization of p190A at the cell periphery (Fig. 4, C and D; and Fig. S4 C). Arp3, a known interacting partner of cortactin, and α -actinin were used as positive and negative controls, respectively. Measurement of relative staining intensities in cells treated with control siRNA showed peaks of actin, cortactin, Arp3, and α -actinin-GFP at the lamellipodium's edge, as expected. Downregulation of cortactin erased the peak of cortactin without affecting actin or α -actinin-GFP expression at the cell edge. However, it reduced the peak of Arp3 and p190A. These results, together with the highly significant correlation found between cortactin staining and both Arp3 and p190A at lamellipodium's edge (Fig. 4 D and Fig. S4 C), confirm the role of cortactin in Arp3 recruitment (Weaver et al., 2002) and reveal the requirement of cortactin for p190A targeting (Fig. 4 C).

PLS is required for the autoinhibition of p190A GAP activity

To functionally characterize the PLS domain, we analyzed the impact of its deletion on the RhoGAP activity of p190A. Because RhoA activity controls stress fibers and focal adhesion maturation and disassembly (Binamé et al., 2010), we analyzed the effect of p190A constructs expression on actin cytoskeleton (Fig. 5 A). 3 h after plating on a highly adhesive substrate of fibronectin, untransfected cells displayed many stress fibers, cells expressing HA-p190AWT less fibers, and cells expressing HA-p190A Δ PLS no fibers at all (Figs. 5 A and 6 D for quantification), suggesting that the expression of this latter construct resulted in a higher RhoGAP activity in cells. We thus analyzed RhoA activation using a GST-Rhotekin pull-down assay in p190AWT- or p190A Δ PLS-transfected cells (Fig. 5 B). The expression of both constructs resulted in the inhibition of RhoA, with a more important effect observed for the p190A Δ PLS mutant, arguing for an enhanced GAP activity in cells. Hence, deletion of the PLS increases the protein capacity to inhibit cellular RhoA and remodel actin cytoskeleton. The strong effect of Δ PLS may result from increased intrinsic GAP catalytic activity toward RhoA. To analyze the level of activation of p190AWT and Δ PLS, we performed an affinity precipitation assay with the activated form of RhoA (RhoAQ63L) that binds with high affinity to activated GAPs and effectors in the cell (García-Mata et al., 2006). Recombinant GST-RhoAQ63L was incubated with protein extracts of Huh7 cells expressing either HA-p190AWT or HA-p190A Δ PLS. Interestingly, p190A Δ PLS exhibited a higher affinity for active RhoA than p190AWT (Fig. 5 C), indicating that the GAP domain is more inclined to interact with active RhoA in the Δ PLS version of the protein. As cortactin is a partner of the PLS responsible for p190A localization, we then tested whether cortactin interaction affects the binding capacity of p190A to active RhoA. Surprisingly, we found that overexpression of cortactin decreases the ability of p190A to bind active RhoA (Fig. 5 D). Overall, our results show that besides its role in targeting p190A to cell protrusions, the PLS domain is important for the regulation of p190A interaction with active RhoA. Moreover, these data suggest that the PLS is committed in an autoinhibited conformation of p190A that is relieved upon PLS deletion and promoted by cortactin interaction.

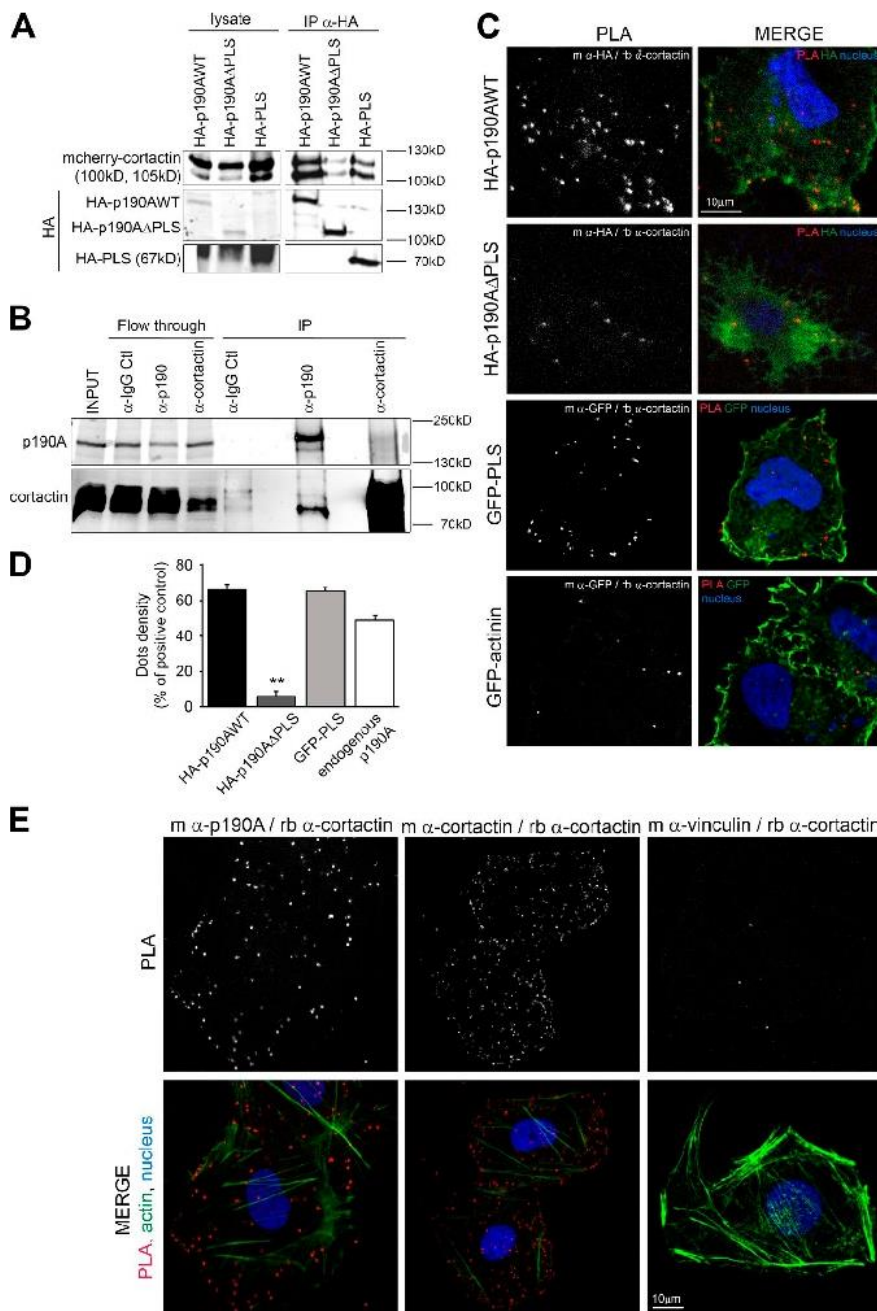


Figure 3. p190A interacts with cortactin via the PLS domain. (A) Huh7 cells transfected with both mCherry-cortactin and indicated HA-tagged p190A plasmids were used to perform immunoprecipitation (IP) with anti-HA beads. Presence of cortactin is analyzed by immunoblot using an anti-cortactin antibody. (B) Co-immunoprecipitation was performed on Huh7 lysates with IgG control (Ctl), anti-p190A, and anti-cortactin antibodies. PLA was performed on Huh7 cells transfected (C) or not (E) with the indicated constructs. Cells were stained for nuclei (Hoechst, blue). The green staining represents, as shown on each panel, the HA staining, GFP tag, or F-actin staining. The dots in the PLA panel represent locations where interaction between indicated proteins (stained using primary antibodies from mouse [m] or rabbit [rb] species) occurs; dots density is quantified in D. Values are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments ($n = 9$ cells per condition). P-value from the ANOVA test is indicated. **, $P < 0.01$.

Cancer-associated mutations present in the PLS impact on p190A properties

In a recent study (Lawrence et al., 2014), the somatic point mutations in exome sequence from 4,742 tumor-normal pairs across 21 cancer types were analyzed. This large-scale genomic analysis identified the p190RhoGAP-encoding gene *ARHGAP35* as highly significantly mutated in 2% of global cancers and more specifically in 15% of endometrial tumors (data available at <http://www.tumorportal.org/>). Among the mutations found in tumors, a high frequency of nonsense mutations such as the recurrent R997* were detected, arguing for a loss of function. In light of our study, we focused on mutations located in the PLS domain of p190A (i.e., three point mutations: Y742H, R832Q, and S866F) and the intriguing in-frame deletion Δ (865–870), all found in endometrial tumors (Fig. 6 A and Table S1). In

addition, we also selected the R997* nonsense mutation (lacking the GAP domain) and the R997Q point mutation, both localized in the MD of p190A outside the PLS, but, respectively, found in six endometrial tumors and in colon cancer (Fig. 6 A and Table S1). HA-tagged constructs of p190A bearing these mutations were generated by site-directed mutagenesis, and their consequences on p190A functionality were analyzed in Huh7 cells. We first studied the localization of the mutated proteins in cells plated on fibronectin. Interestingly, whereas most mutants localized to actin protrusions similar to the WT protein, p190A-S866F and Δ (865–870) failed to reach the cell edge and displayed mainly a cytoplasmic staining (Fig. 6, B and C). As described earlier, actin remodeling (i.e., alteration of stress fibers) is a consequence of the RhoGAP activity of p190A expression (Fig. S1 and Table S3). We then classified stress

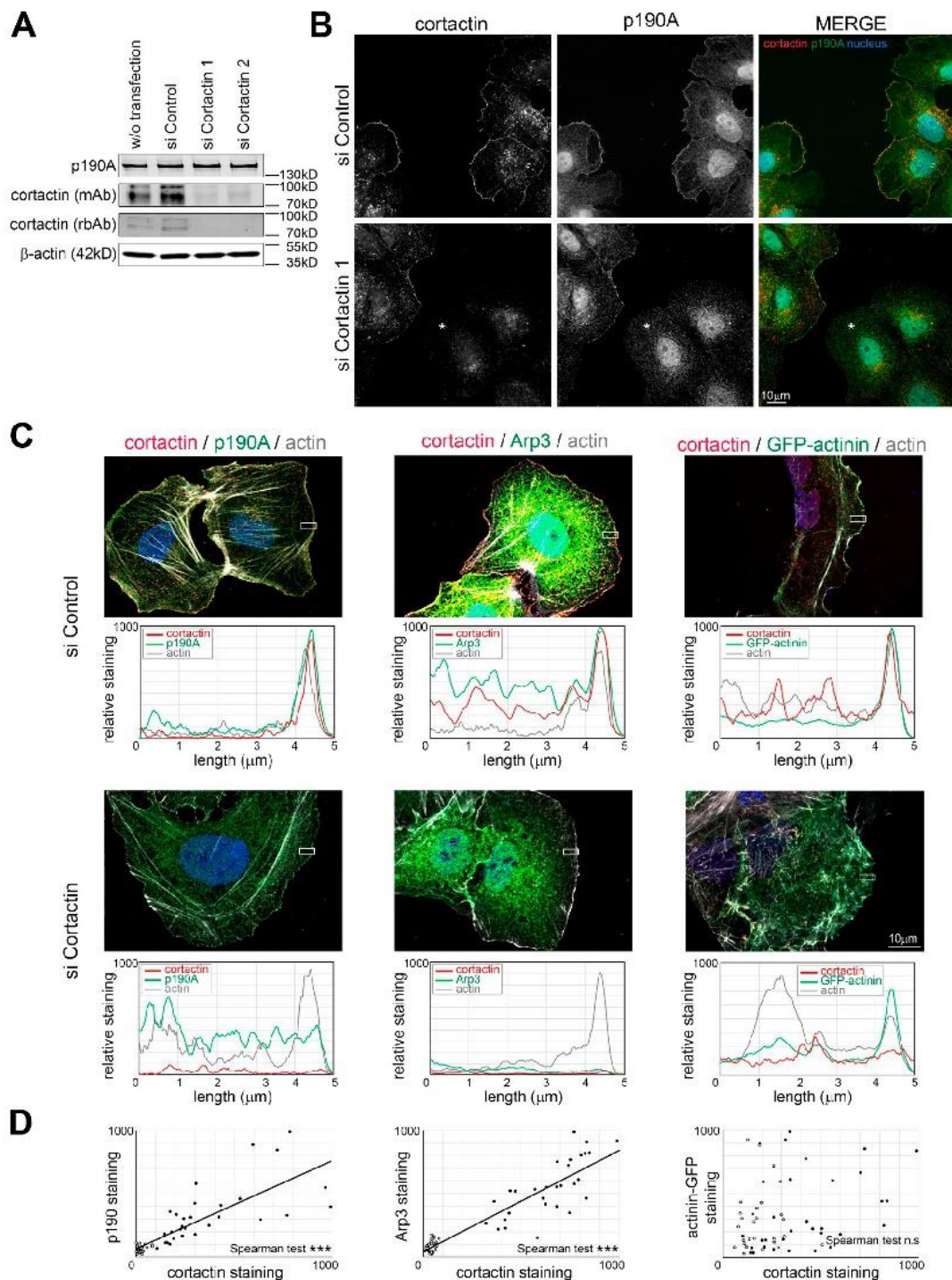


Figure 4. Cortactin recruits p190A to the lamellipodium's edge. Huh7 cells were transfected with control siRNA (siControl) or siRNA targeting cortactin (siCortactin1 and 2) and treated with 100 μ M C8N6-BPA to induce lamellipodia growth. (A) The expression of endogenous p190A and cortactin was assayed by immunoblotting with an anti-p190A antibody and two antibodies from different species (mAb from mouse and rbAb from rabbit) against cortactin. β -Actin is used as a loading control. (B) Immunofluorescence staining of cortactin (red) and endogenous p190A (green) was performed on Huh7 cells transfected with siControl or siCortactin1. Asterisk indicates cells with absence of cortactin staining. (C) Huh7 cells transfected with siControl or siCortactin1 were immunostained as indicated on each panel. Graphs under each panel represent the quantification of the relative staining of cortactin (red), actin (gray), and p190A, Arp3, or α -actinin-GFP (green) determined inside the white rectangle of $2 \times 5 \mu$ m. Results are expressed as mean value of the height. (D) Correlation of cortactin staining with p190A, Arp3, and α -actinin-GFP at the lamellipodium edge. Mean values of membrane areas of $2 \times 0.28 \mu$ m are plotted on the graph. Closed and open circles represent measurement in cells transfected with control siRNA and siCortactin1, respectively ($n = 30$ /condition). Linear regression is presented when Spearman correlation is significant. ***, $P < 0.001$; n.s., not significant.

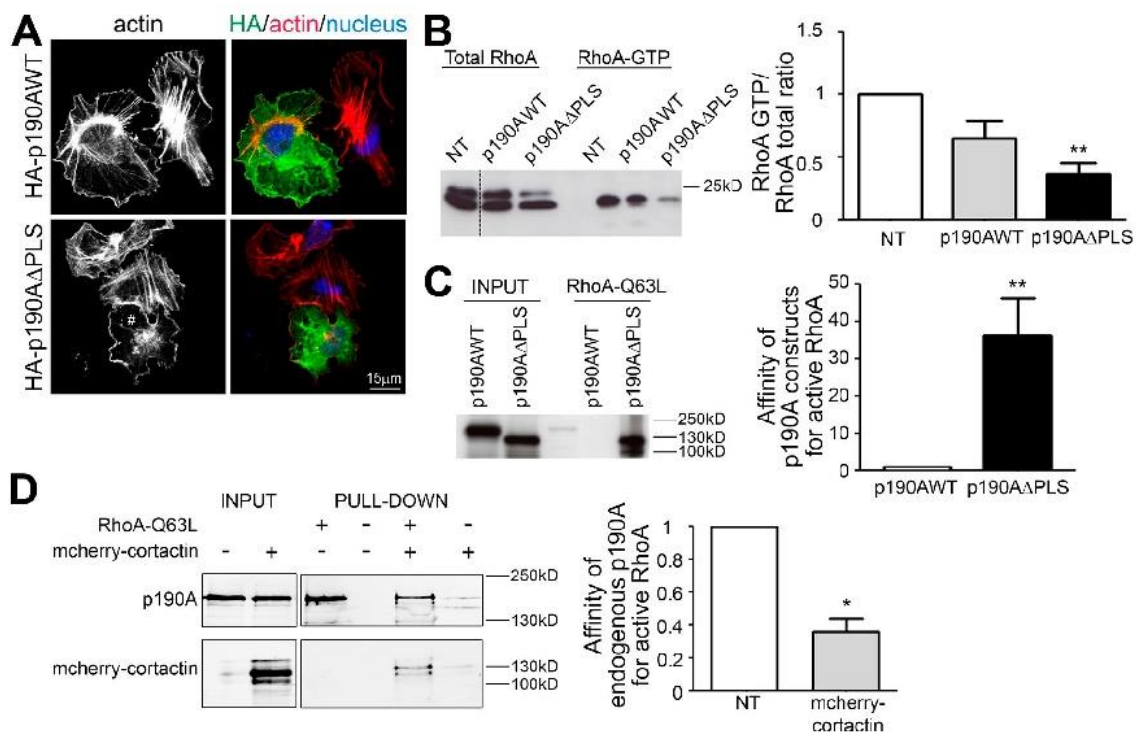


Figure 5. Regulation of p190A GAP activity. (A) Huh7 cells expressing p190AWT or p190A Δ PLS were plated for 3 h on fibronectin and stained for HA (green), F-actin (red, phalloidin), and nuclei (blue, Hoechst). # indicates a cell without stress fibers. (B) Huh7 cells transfected with p190AWT or p190A Δ PLS were used for a RhoA GTPase pulldown assay using GST-Rhotekin. RhoA is detected using an anti-RhoA antibody. Quantification of RhoA activity is represented as a histogram. (C) Huh7 cells were transfected with p190AWT or p190A Δ PLS. Affinity purification of Huh7 cell lysate was performed with GST-RhoAQ63L and analyzed by immunoblot using anti-HA antibodies. Quantification of the affinity between p190A and active RhoA is represented as a histogram. (D) Huh7 cells were transfected or not (NT) with mcherry-cortactin. Affinity purification on Huh7 cell lysate was performed with GST-RhoAQ63L and analyzed with anti-p190A antibodies. Quantification of the affinity between endogenous p190A and active RhoA is represented as a histogram. On graphs, values were calculated by measuring the band intensity of pulldown/input and are represented as the mean \pm SEM of three independent experiments. P-values from the ANOVA (B) or the unpaired *t* test (C and D) are indicated. *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01.

fibers into two phenotypes: stress fibers crossing the entire cell body and short stress fibers (Fig. S5 A and Fig. 6 D). Whereas p190A-R997* expression showed no impact on stress fibers, confirming its lack of GAP activity, p190A-Y742H, R832Q, and R997Q expression decreased the number of stress fibers as observed upon expression of p190AWT (Fig. 6, B and D). Of interest, cells expressing p190A-S866F and Δ (865–870) showed very few stress fibers, suggesting a stronger RhoGAP activity of these mutants. We further measured the affinity of the mutant proteins toward active RhoA and demonstrated that S866F and Δ (865–870) mutations increase the affinity of p190A for active RhoA (Fig. 6 E), as previously described for p190A Δ PLS. p190A-Y742H, R832Q, and R997Q showed similar affinity for active RhoA to p190AWT, and the absence of binding of R997* to active RhoA is explained by its lack of GAP domain. These results suggest that S866F and Δ (865–870) mutations mimic the effect of PLS deletion on both p190A GAP activity and cellular localization. We then addressed whether these p190A mutants present a defective interaction with cortactin. Surprisingly, unlike p190A Δ PLS, the cancer-associated mutants of p190A remain able to interact with cortactin (Fig. S5 B), demonstrating that these amino acids are not involved in cortactin–p190A interaction. As their leading edge localization is impaired, this result also indicates that cortactin binding is necessary but not sufficient to target p190A to actin-rich protrusions.

To get more insights into the function of cancer-associated p190A mutations, we then used mouse embryonic

fibroblasts (MEFs), which display a spindle shape with a ruffling cell process easier to identify and measure than that of Huh7 cells. Moreover, tension applied by stress fibers induces focal adhesion formation in this model. HA-tagged versions of p190A were expressed in p190A knockout MEFs to avoid additive effect of endogenous p190A, and the number of focal adhesions was evaluated. A decreased focal adhesion area was observed in p190A^{-/-} MEFs transfected with HA-p190AWT compared with nontransfected cells after overnight plating on fibronectin (Fig. 7, A and B). Expression of the mutants with predicted high GAP activity led to an even more dramatic decrease of focal adhesion area and a marginal decrease of the number of focal adhesions per cell. Focal adhesions regulate ruffles and lamellipodia stability (Schwarz and Gardel, 2012). Because persistent membrane ruffling favors cell process growth, we hypothesized that p190A mutants may affect cell process length. To test this, we measured the distance between the nucleus and ruffle edges of spindle shape MEFs plated overnight on fibronectin (Fig. 7 C). MEFs transfected with p190AWT displayed a cell process length similar to nontransfected cells, arguing that overexpression of p190AWT does not disturb cell process stability in MEFs. However, p190A Δ PLS, S866F, and Δ (865–870) significantly decreased the cell process length, indicating that their higher GAP activity reduces lamellipodial persistence, a mechanism involving cortactin. As a consequence, we found that p190A Δ PLS, S866F, and Δ (865–870) expression in MEFs increase random cell migration in

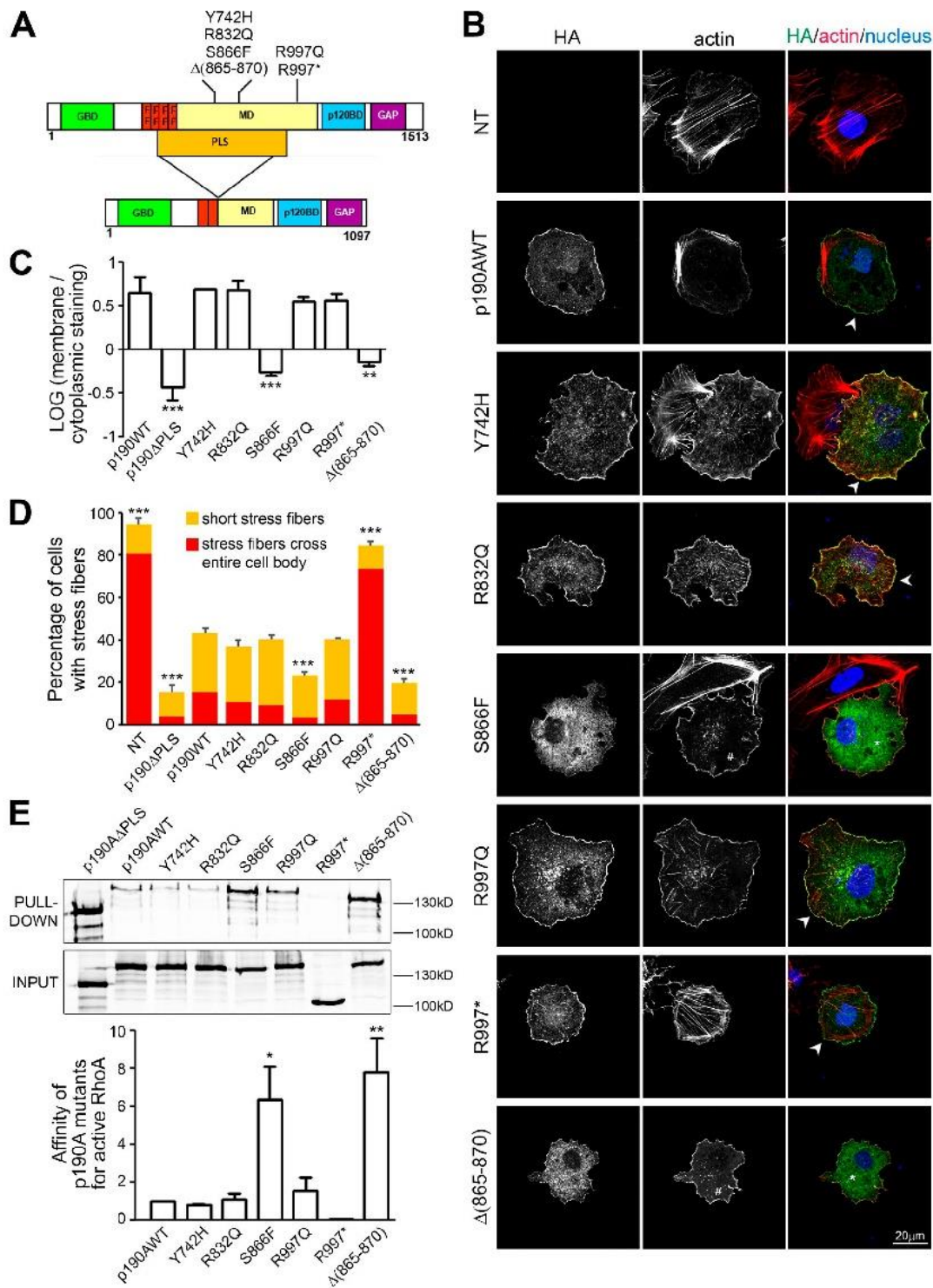


Figure 6. Analysis of p190A mutations found in tumors. (A) Schematic representation of the different p190A mutants. Point mutations, deletion, and the PLS domain are indicated on the protein. (B) Huh7 cells transfected with p190AWT or p190A mutants were plated for 3 h on fibronectin, fixed, and stained for HA (green), F-actin (red), and nuclei (blue). NT, nontransfected cells. Arrowheads show localization of mutants at cell protrusions; * shows cytoplasmic localization of mutants; and # points out absence of stress fibers. (C) Localization of p190A mutants is analyzed by quantification of membrane staining intensity/cytoplasmic staining intensity ratio. The graph presents the mean \pm SEM of three independent experiments ($n = 20$ cells per condition). **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. (D) Quantification of cells bearing stress fibers in the experiment described in B. Statistical significance was calculated relative to the control (p190WT) condition. ***, $P < 0.001$. (E) Huh7 cells were transfected with indicated constructs or mutants, and their affinity for active RhoA was tested by pull-down using recombinant GST-RhoAQ63L and revealed by immunoblot with anti-HA antibodies. Quantification of the affinity between p190A mutants and active RhoA is represented as a histogram in which values were calculated by measuring the band intensity of pull-down/input and are represented as the mean \pm SEM of three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

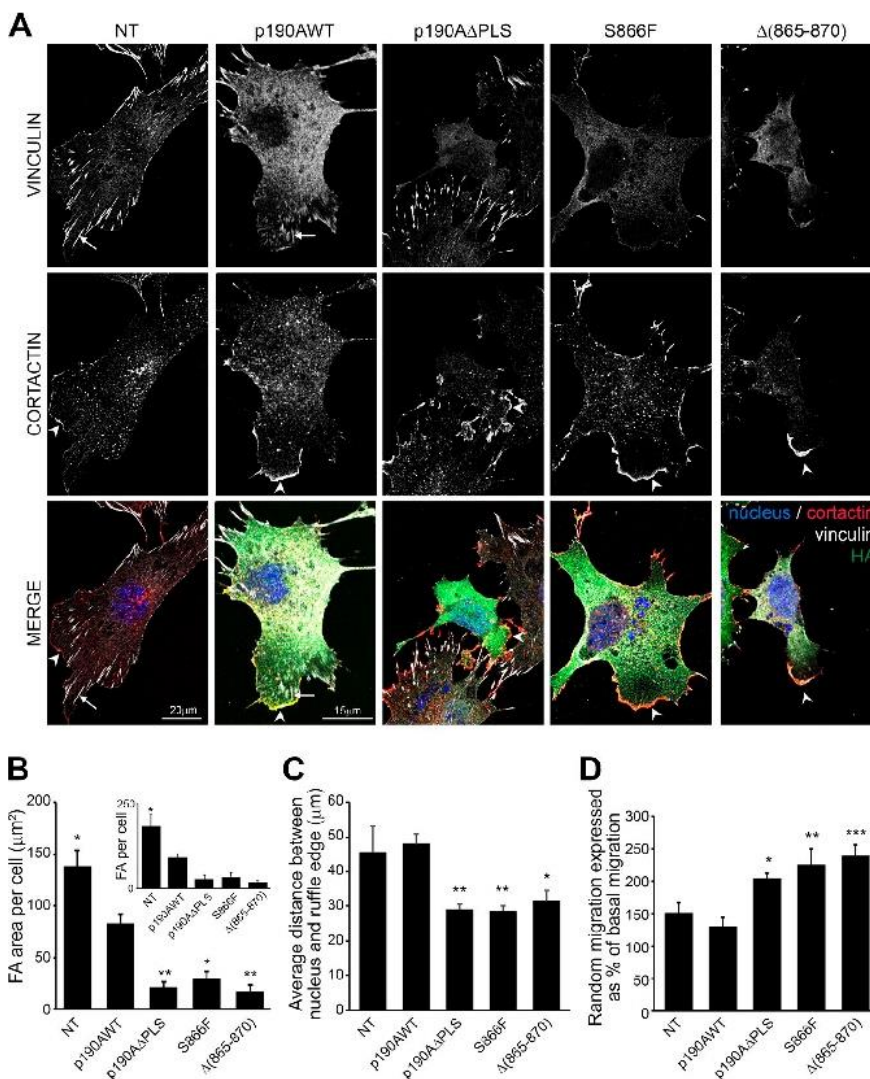


Figure 7. Mutations in PLS affect cell process growth. (A) p190A^{-/-} MEFs expressing the indicated HA-tagged p190A constructs were plated overnight on fibronectin, fixed, and stained for nucleus (Hoechst, blue), cortactin (red), focal adhesions (vinculin, gray), and HA (green). Arrowheads show cortactin-rich edges, and arrows show focal adhesions. (B) Quantification of focal adhesion area in cells transfected as described in A ($n = 15$ cells per condition). Inset represents the number of focal adhesions (FA) per cell in the same experiment. (C) Quantification of ruffling cell process length. Graph presents the mean distance between nucleus and ruffle edges in cells transfected as described in A ($n = 15$ cells per condition). (D) Transfilter chemokinesis of cells transfected as described in A. Results are expressed as a percentage of basal migration without chemoattractant ($n > 100$ cells). For all graphs, values are expressed as the mean \pm SEM of three (B and C) or five (D) independent experiments. Statistical significance was calculated relative to p190AWT condition. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. NT, nontransfected cells.

chemokinesis assays when compared with untransfected or p190AWT-expressing cells (Fig. 7 D).

Finally, we tested the impact of these p190A mutations on cancer cell migration using MDA-MB-231 breast carcinoma cells plated on gelatin-coated dishes. Time-lapse microscopy experiments were performed after cotransfection of the cells with p190A- and EGFP-expressing constructs (Videos 1–5). Analysis of the transfected cell paths revealed that the directionality of the cells expressing p190A mutants is altered compared with their WT counterpart (Fig. 8, A and B), whereas the speed of migration remains unaffected (Fig. 8 C). Thus, this result demonstrates that the S866F and $\Delta(865-870)$ cancer-associated mutations may favor turning behavior, which reflects exploration of cancerous cells.

Discussion

To timely and spatially regulate RhoA, the localization of p190A is itself tightly controlled. In the present study, we investigated the mechanisms by which p190A is recruited to cell edges. We demonstrated that the region comprising aa 380–971 corresponds to its PLS. The PLS is the minimal domain necessary

and sufficient for p190A localization to ruffles and lamellipodia in migrating cells. This PLS-based localization was also observed in fibronectin-, C8N6-BPA-, or V12Rac1-induced lamellipodia. Because lamellipodia induced by constitutively active Rac1 are devoid of active RhoA (Pertz et al., 2006), it is unlikely that membrane-bound RhoA mediates p190A recruitment to protrusion. This is further emphasized by the fact that the PLS does not contain the RhoA-binding GAP domain of p190A. In addition, the PLS lacks the p120BD, which was described to mediate p190A recruitment to the plasma membrane upon stimulation by integrins during cell attachment and subsequent tyrosine phosphorylation of p190A by Src or Arg (Hu and Settleman, 1997). It was previously shown that p190A has to be released from p120RasGAP to efficiently access and inactivate RhoA at the cell periphery. This mechanism occurs through a competition between the phosphorylated forms of p190A and paxillin for p120RasGAP binding during cell adhesion (Tsubouchi et al., 2002). We thus describe PLS as a novel functional domain involved in the targeting of p190A.

It is striking that the identified PLS almost corresponds to the region (aa 382–1,007) defined as the Rnd3-binding domain of p190B isoform (Wennerberg et al., 2003; Bustos et al., 2008). However, silencing of Rnd3 does not alter p190A targeting to

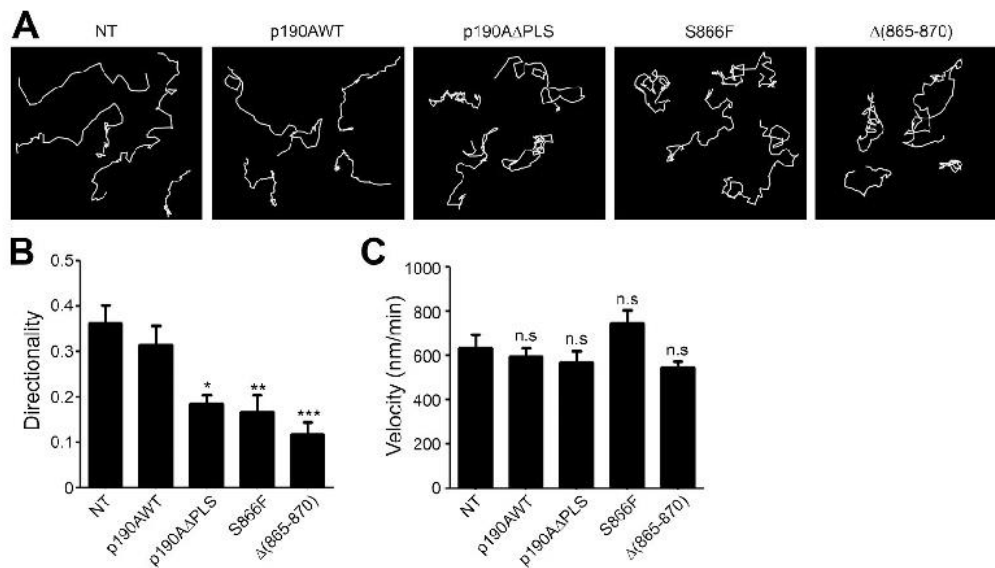


Figure 8. Mutations in PLS affect MDA-MB-231 directed cell migration. MDA-MB-231 cells were cotransfected with p190A- and EGFP-expressing constructs, spread on gelatin coating, and visualized by epifluorescence and contrast time-lapse microscopy for 16 h. Frames were collected every 10 min. (A) Representative tracings of paths traveled over 16 h by MDA-MB-231 cells transfected with p190A mutants. (B) Quantification of movement directionality represented as a ratio of the distance between the start and end point over the total path traveled. (C) Cell velocity is calculated by length of the path traveled divided by time. Values are expressed as the mean \pm SEM ($n = 20$ cells per condition). Statistical significance was calculated relative to nontransfected (NT) condition. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; n.s., not significant.

membrane protrusions in Huh7 cells (unpublished data), suggesting that Rnd3 is not involved in p190A localization. The Rnd3-binding domain was further restricted to an aa 382–607 fragment sufficient to promote the interaction between activated Rac1 and p190B and subsequent p190B membrane recruitment (Bustos et al., 2008). However, authors failed to detect a GTP-dependent association between activated Rac1 and p190A, suggesting a different targeting mechanism between both isoforms.

By affinity purification assays, we identified cortactin as a binding partner of the PLS. siRNA-mediated silencing of cortactin revealed that cortactin is necessary for p190A targeting to membrane ruffles and lamellipodia. Cortactin is an F-actin regulating factor that allows directional migration by stabilizing lamellipodia (Krause and Gautreau, 2014). Although not essential for the formation of the lamellipodia, cortactin regulates migration by increasing lamellipodial persistence through the binding of the Arp2/3 complex and F-actin (Bryce et al., 2005). We documented the p190A/cortactin interaction through four types of experiments: GST-pulldown, coimmunoprecipitation, indirect immunostaining, and PLA. Although a strong colocalization between p190A and cortactin was found by indirect immunostaining, only few dots could be seen by PLA. This difference may be because of a technical caveat of the PLA. Indeed, considering that p190A and cortactin are relatively large proteins, the Fc part of the antibodies used may be often too far to allow annealing. Another possible explanation may be that the proteins are located at the same place but only interact in a stimuli-dependent (i.e., regulation of RhoA activity or F-actin elongation) and tightly regulated manner. This hypothesis is supported by the fact that an increased interaction between p190A and cortactin inhibits p190A GAP accessibility (Fig. 5 D). Hence, a dynamic regulation of p190A activity by cortactin likely occurs at the leading edge, implying transient binding/dissociation events while the proteins remain in proximity. Cortactin redistribution from the cytoplasm to

the membrane ruffles and lamellipodia is controlled by Rac1 activation (Weed et al., 1998). Beyond its role in F-actin polymerization, cortactin controls the cell shape by interacting with GTPase regulators such as Fgd1 and Dock4, respectively, GEFs of Cdc42 and Rac1 (Hou et al., 2003; Ueda et al., 2013). Cortactin-mediated control of lamellipodial persistence could therefore be driven by both the stimulation of Rac1 and Cdc42 activity by GEFs and the inhibition of RhoA activity by p190A. Furthermore, Rac1-mediated recruitment of the cortactin–p190A complex to the lamellipodia and subsequent RhoGAP domain activation could account for the negative regulation of RhoA by Rac1 observed in various cell lines (Kozma et al., 1997; Leeuwen et al., 1997; Sander et al., 1999; Zondag et al., 2000; Nimnual et al., 2003). Recent spatiotemporal analyses of lamellipodia formation revealed that RhoA is activated directly at the leading edge, but is switched off to allow Rac1 and Cdc42 activation during the protrusion phase (Machacek et al., 2009). Therefore, as suggested for p190B, p190RhoGAP proteins may be involved in the local antagonistic cross talk between these GTPases. We believe that the PLS of p190A is functionally implicated in this mechanism.

Accordingly, in addition to the involvement of the PLS in p190A localization, we found that the same sequence is required to inhibit p190A RhoGAP activity. Indeed, RhoA activity decrease is more pronounced in cells expressing p190AΔPLS than p190AWT. However, we were not able to demonstrate a modification of Rac1 activity upon expression of either p190AWT or p190AΔPLS in Huh7 cells (unpublished data). It has to be noted that the PLS excludes the poly basic region identified in p190A as crucial for its RacGAP activity (Lévy et al., 2013). The lowest RhoA activity observed with p190AΔPLS has phenotypic consequences (e.g., loss of stress fibers, a process controlled by RhoA; Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996). The non-specific localization of the mutant may provide more RhoA substrate and explain this discrepancy. However, affinity purification

of p190A with the active form of RhoA (RhoAQ63L), a method already used to detect p190A RhoGAP activity upon cadherin engagement (Noren et al., 2003), demonstrated that the strong effect of p190A Δ PLS arises from a drastic increase of its affinity toward active RhoA, in accordance with an enhanced GAP activity in cells. Even if we cannot exclude the possibility that this stronger binding titrates out active RhoA, making the latter unavailable for effector binding and resulting in the same phenotype (i.e., loss of stress fibers), these results account for a PLS-mediated cis-inhibition of the GAP domain. This hypothesis is consistent with previous studies showing that p190B lacking the Rac1-binding sequence, described above, also exhibited enhanced RhoGAP activity (Bustos et al., 2008). Collectively, these data indicate that the same region in both p190 isoforms accounts for a similar autoinhibitory function. Autoinhibition due to protein folding that controls the GAP activity has been described for several GAPs such as p50RhoGAP, oligophrenin, Abr, and chimerins (Ligeti et al., 2012). Thus, this reinforces the model proposed earlier by S.H. Hansen and colleagues (Wennerberg et al., 2003; Bustos et al., 2008), in which p190 is present in a “closed” conformation in the cytoplasm that may be opened upon stimuli, leading to the translocation and full activation of p190 restricted to membrane ruffles and lamellipodia, thus promoting cell protrusion and migration. Whereas for p190B it was proposed that Rac1 or Rnd3 could relieve its autoinhibition, the mechanism for p190A remains to be established. We found that cortactin is not involved in this mechanism and in contrast favors the closed conformation of p190AWT. Thus, another additive signal may be necessary to locally activate p190A by competing with cortactin antagonism. Interestingly, our data pointed out serine 866 as an important amino acid for p190A regulation. Indeed, the cancer-associated S866F missense mutation and the Δ 865–870 deletion phenocopy the absence of PLS, affecting both p190A localization and GAP activity regulation. Because phosphorylation is frequently involved in functional regulation, it is tempting to hypothesize that phosphorylation of serine 866 keeps p190A in its closed conformation and that its dephosphorylation activates the protein.

Our study also highlights that mutations found in tumors may have opposite effects on the activity of the protein. Indeed, whereas p190A-R997* mutant has no GAP activity, p190A-S866F and Δ 865–870 showed a high RhoGAP activity. Our data further demonstrated that p190A Δ PLS, S866F, and Δ (865–870) significantly decreased cell process length, indicating that their higher GAP activity reduces lamellipodia persistence. Thus, as demonstrated earlier by the polarized cell migration defect of p190A^{-/-} cells (Jiang et al., 2008), the RhoGAP activity of p190A must be tightly regulated to allow for proper cell migration. As a consequence, we found that gain-of-function mutations such as S866F and Δ 865–870 favor random cell migration and decrease the ability of cancer cells to migrate in a directed manner. Hence, acquisition of p190A mutations may result into an enhanced exploratory behavior of tumor cells. Given the high prevalence of *ARHGAP35* mutations in tumors, these data open up a new path of investigations with clinical implications.

Materials and methods

Cell lines

Huh7 and MDA-MB-231 cell lines were purchased from American Type Culture Collection. p190^{-/-} MEFs were a gift from A. Koleski

(Yale University, New Haven, CT). Huh7 cells and MEFs were cultured in DMEM containing Glutamax and 4.5 g/l glucose (Gibco), supplemented with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin (Invitrogen). MDA-MB-231 cells were maintained in L-15 medium and Glutamax-I (Invitrogen) supplemented with 10% FCS and penicillin–streptomycin. PAE expressing EE-tagged V12Rac1 under the control of an IPTG-inducible promoter were established previously (Welch et al., 1998). They were cultured in Ham F12 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS, penicillin–streptomycin, 100 μ M hygromycin B, and 500 nM puromycin. V12Rac1 expression was achieved by adding 1 mM IPTG to the culture for 15 h. All cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

Antibodies and reagents

Monoclonal mouse anti-p190A (clone 30) and anti-VASP (clone 43) antibodies were purchased from BD; mouse anti-p190A (clone D2D6), mouse anti-vinculin (clone hVIN1) antibodies, and IgG1 isotype control from mouse myeloma were purchased from Sigma-Aldrich, mouse anti-Rac1 (clone 23A8) and anti-cortactin (clone 4F11) were purchased from Millipore; and mouse anti-GFP and anti-RhoA were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. Monoclonal rat anti-HA (clone 3F10) and mouse anti-HA (clone 12CA5) were obtained from Roche. Polyclonal rabbit anti-cortactin (H222) antibodies were obtained from Cell Signaling Technology. Alexa Fluor 546–phalloidin and Alexa Fluor 488–labeled secondary antibodies were purchased from Molecular Probes. IPTG, puromycin, and hygromycin B were obtained from EMD Millipore.

Transfection

DNA transfections in Huh7, MEFs, and PAE cells were realized with promofectin-hepatocyte transfection reagent (Promocell) according to the manufacturer’s protocol. MDA-MB-231 cells were transfected using Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer’s protocol. siRNA oligos were purchased from Eurofins Genomics and transfected into Huh7 cells with Lipofectamine RNAi-Max Reagent (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer’s protocol. siCortactin1 targets human cortactin mRNA at 5′-CCC AGAAAGACUAUGUGAAAGGGUU-3′ and siCortactin2 targets at 5′-GGAGAAGCACGAGUCACAGAGAGAU-3′ (Jia et al., 2008). The nonsilencing siRNA siControl 5′-AATTCTCCGAACGTGTCA CGT-3′ was used as a control.

Plasmid constructs

All of the truncated p190A constructs were engineered using PCR with the rat full-length p190RhoGAP (GenBank under accession no. M94721) as matrix and subcloned into pKH3 expression vector using BamHI and EcoRI restriction sites. The Δ PLS mutant was constructed as follows: two PCR fragments corresponding to N-terminal part (aa 1–380) and C-terminal part (aa 800–1,513) were amplified from pKH3-p190WT and subcloned into pGEM-T easy vectors. Both fragments were then purified and ligated. This Δ PLS fragment was finally inserted into the BamHI–EcoRI sites of pKH3 vector. All primers used for these constructs are listed in Table S2. All constructs were verified by DNA sequencing. pKH3-p190AWT was a gift from I. Macara (Vanderbilt University, Nashville, TN). pGEX-RhoAQ63L was a gift from K. Burridge (University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC). Cortactin-pmCherryC1 was a gift from C. Merrifield (Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, Gif-sur-Yvette, France; plasmid 27676; Addgene; Taylor et al., 2011). α -Actinin–GFP construct was a gift from G. Giannone (Interdisciplinary Institute for Neuroscience, Bordeaux, France; Giannone et al., 2004). pGEX-2T-Rgd1 and pGEX-PH-PLC- γ 1 were gifts from

F. Doignon (Bordeaux University, Bordeaux, France) and M. Lemmon (University of Pennsylvania, Philadelphia, PA), respectively. pEGFP-C1 was purchased from Takara Bio Inc.

Western blot analysis, immunoprecipitation, and pulldown assay

Cells were scraped off on ice and homogenized in Tris-HCl lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 0.6% NP-40) with protease and phosphatase inhibitors. Cell lysates were cleared of cellular debris and nuclei by a 10,000 *g* centrifugation step for 10 min. Lysates were denatured with Laemmli loading buffer containing 2.5% 2- β -mercaptoethanol, analyzed by SDS-PAGE, and blotted onto nitrocellulose membranes. Blots were incubated overnight at 4°C with primary antibodies, and then incubated with infrared fluorescent dye-conjugated secondary antibodies (LI-COR Biosciences), and activity was visualized with the Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biosciences).

Immunoprecipitation was performed with anti-HA affinity matrix beads (Roche) according to the manufacturer's instructions. In brief, cells were extracted with Tris-HCl lysis buffer and centrifuged for 10 min at 10,000 *g*. The supernatant was incubated for 30 min with the beads. Bead pellets were washed three times with Wash Buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 0.1% NP-40), resuspended in loading buffer, and analyzed by SDS-PAGE. Recombinant GST-proteins were expressed in bacteria, purified on GSH-coated sepharose beads (Sigma-Aldrich), and incubated with protein extracts of Huh7 cells. Bacteria lysis was performed with Tris-HCl lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, and 1 mM DTT) with protease and phosphatase inhibitors. GST-RhoAQ63L pulldown was performed as previously described (García-Mata et al., 2006). pGEX-2T construct containing Rhotekin-Rho binding domain was provided by Martin Schwartz (University of Virginia, Charlottesville, VA). Transfected Huh7 cells were lysed, and protein extracts were used for RhoA pulldown assays as previously described (Ren et al., 1999). The lysis buffer for RhoA GTPase pulldown assay consists of 50 mM Tris, pH 7.2, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 10 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, and a mixture of protease inhibitors. In brief, cleared cell lysates were incubated with Rhotekin-RBD beads (Cytoskeleton, Inc.), and then the beads were washed and suspended in 5 \times Laemmli loading buffer. The whole-cell lysate was also used to examine the total amount of Rho GTPase in the cells. Samples were analyzed by Western blotting with anti-RhoA antibody. Immunoprecipitation of endogenous proteins was performed with anti-p190A (clone D2D6) and anti-cortactin (clone 4F11). In brief, cells were extracted with Tris-HCl lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.6% NP-40, and 0.2% Triton X-100) and centrifuged for 10 min at 10,000 *g*. The supernatant was incubated overnight with control IgG and specific antibodies for 3 h with Dynabeads Protein G (Invitrogen). Bead pellets were washed three times with Wash Buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 0.1% NP-40), resuspended in loading buffer, and analyzed by SDS-PAGE.

Immunofluorescence and confocal imaging

Glass coverslip-plated cells were prepared for immunofluorescence microscopy as previously described (Moreau et al., 2003). Coverslips were mounted on slides with Fluoromount G mounting medium. Cells were imaged using an SP5 confocal microscope (Leica Biosystems) using a 63 \times /NA 1.4 Plan NeoFluor objective lens and the LAS-AF-Lite 2.4.1 acquisition software (Leica Biosystems). To prevent contamination among fluorochromes, each channel was imaged sequentially using the multitrack recording module before merging. Images were processed using LAS-AF-Lite 2.4.1 (Leica Biosystems), Gimp 2.0, or ImageJ software (National Institutes of Health). Quantification of protrusion localization was performed in a double-blinded manner by

comparing actin and HA signal at the plasma membrane on 30–200 transfected cells per condition.

PLA (Sigma-Aldrich) is an immunofluorescence-based method allowing the visualization of protein interaction with a distance <16 nm. Antigens were immunolabeled with two primary antibodies from different species and then specific secondary antibodies conjugated to complementary oligonucleotides. Close proximity of the antibodies allows the ligation, amplification, and hybridization of fluorescent probes appearing as distinct puncta. Quantification of dots was performed in ImageJ (National Institutes of Health) with the “analyze particles” command. The staining intensities at the membrane were measured inside a 2 \times 0.28- μ m rectangle, of which the longest dimension follows the membrane. 60 measurements were made for each condition. Cytoplasmic staining intensities were measured on the same surface parallel to the rectangle used for membrane measurement 6 μ m behind the membrane. Cell process length measurement was performed in three independent experiments. For each experiment, mean size was calculated from 15 cells with spindle shape. The measurement was done from a line starting from the nucleus edge on the side of the ruffling process and ending at the most distant part of the ruffling edge. Focal adhesion area was measured as previously described (Horzum et al., 2014). In brief, using ImageJ software (National Institutes of Health), we sequentially subtracted background, enhanced contrast, minimized background, and adjusted brightness and contrast automatically, ran LOG3D filter, thresholded the image, and then executed the “analyze particles” command.

Cell migration assays

Migration of MEFs was performed with Boyden chambers (8- μ m pore size filter; BD). 10⁵ cells were seeded per chamber on top of the filter. Chemokinesis assays were performed with 10% serum on both sides of the filter. Migration was performed for 6 h, and membranes were then fixed with 4% PFA. Nonmigrated cells were removed from the top compartment with a cotton swab. Cells that had migrated to the lower side of the filter were stained with Hoechst 33258 and counted. Data are expressed as a percentage of basal migration without serum. Time-lapse microscopy experiments were performed with transfected MDA-MB-231 cells plated on gelatin-coated six-well dishes. The cells were placed in a 37°C chamber equilibrated with humidified air containing 5% CO₂ throughout the experiment. Time-lapse microscopy was performed using a microscope composed of an inverted DMI 6000 microscope (Leica Biosystems) equipped with a resolute HQ2 camera (Photometrics). The objective used was an HCX PL Fluotar 10 \times dry 0.3 NA PH1. The 37°C atmosphere was created with an incubator box and an air heating system (Life Imaging Services). This system was controlled by MetaMorph software (Molecular Devices). Images were taken every 10 min during 16 h. The videos were created from the time-lapse series using ImageJ (National Institutes of Health). Movements of cells expressing the green EGFP plasmid reporter were tracked in ImageJ with MtrackJ plugin.

Phospholipid binding assays

GST-PLS, GST-Rgd1, and GST expressions were induced in BL21 bacterial strains with 0.1 mM IPTG overnight at 20°C. The proteins were eluted from Glutathione Sepharose beads (Sigma-Aldrich) just before the experiments and quantified by SDS-PAGE. The PIP Strip membranes (Echelon Biosciences) were used according to the manufacturer's instructions. GST-PLC- γ 1-PH and GST-Rgd1 were used as positive controls (Prouzet-Mauléon et al., 2008). Each GST fusion protein was incubated overnight at 4°C with the PIP Strip membranes at 1 μ g/ml and revealed by a rabbit anti-GST antibody (EMD Millipore) used at 1:2,500.

Site-directed mutagenesis

All p190A point mutations and the $\Delta(865-870)$ deletion were generated in the parental vector pKH3-p190A using site-directed mutagenesis with the QuikChange II XL kit according to the manufacturer's protocol (Agilent Technologies). All primers used for these constructs are listed in Table S2. Point mutations and deletion were verified by sequencing. Note that the aa R997 found mutated in human tumors corresponds to the amino acid R998 in the rat p190A sequence.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Prism software (GraphPad Software). Data are presented as mean \pm SEM of at least three independent experiments. Comparisons between groups were analyzed by *t* test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's posttest when the number of conditions was higher than two, Mann-Whitney test to compare two conditions, and Spearman test when specified. Significance was accepted for values where *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; and ****, $P < 0.0001$.

Online supplemental material

Fig. S1 shows the localization of all truncated versions of p190A. Fig. S2 shows the localization of the different truncated versions of the 2F-MD construct. Fig. S3 demonstrates that PLS is necessary and sufficient for Rac1-induced lamellipodia targeting in PAE cells. Fig. S4 reveals that PLS does not interact with phospholipids *in vitro*, but interacts with cortactin. Fig. S5 shows the interaction of p190A cancer-associated mutations with cortactin. Table S3 summarizes the localization and impact on the actin cytoskeleton of the truncated versions of p190A. Table S1 describes the cancer-associated mutations in p190A from patients. Table S2 contains the list of primers used to generate p190A constructs and mutants. Video 1 shows MDA-MB-231 cells transfected with an EGFP-expressing construct. Videos 2, 3, 4, and 5 show MDA-MB-231 cells cotransfected with an EGFP-expressing construct and with, respectively, WTp190A, p190A Δ PLS, p190AS866F, and p190A $\Delta(865-870)$ constructs.

Acknowledgments

We thank Drs. K. Burridge, A. Koleske, I. G. Macara, M. Schwartz, C. Merrifield, G. Giannone, and F. Doignon for DNA constructs, Dr. S. Fribourg for structural advice, and Drs. E. Chevet and G. Giannone for helpful discussions. Microscopy was done in the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the Centre National de la Recherche Scientifique-Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and Bordeaux University, member of the national infrastructure France BiImaging, with the help of Dr. F. Cordelières.

F. Binamé was supported by an IDEX Postdoctoral fellowship from the Université de Bordeaux. A. Bidaud-Meynard was supported by a PhD scholarship from the French Ministry of Research and an end-of-thesis short-term fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale, comité Aquitaine. L. Piquet is supported by a PhD fellowship from the SIRIC BRIO. This work was supported by grants from La Ligue Contre le Cancer (Comité de la Dordogne), La Ligue Contre le Cancer "Equipe labellisée," and Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer.

The authors declare no competing financial interests.

Submitted: 20 January 2016

Accepted: 15 August 2016

References

- Arthur, W.T., L.A. Petch, and K. Burridge. 2000. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr. Biol.* 10:719–722. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00537-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00537-6)
- Bass, M.D., M.R. Morgan, K.A. Roach, J. Settleman, A.B. Goryachev, and M.J. Humphries. 2008. p190RhoGAP is the convergence point of adhesion signals from alpha 5 beta 1 integrin and syndecan-4. *J. Cell Biol.* 181:1013–1026. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200711129>
- Binamé, F., G. Pawlak, P. Roux, and U. Hibner. 2010. What makes cells move: requirements and obstacles for spontaneous cell motility. *Mol. Biosyst.* 6:648–661. <http://dx.doi.org/10.1039/b915591k>
- Bradley, W.D., S.E. Hernández, J. Settleman, and A.J. Koleske. 2006. Integrin signaling through Arg activates p190RhoGAP by promoting its binding to p120RasGAP and recruitment to the membrane. *Mol. Biol. Cell.* 17:4827–4836. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E06-02-0132>
- Brouns, M.R., S.F. Matheson, K.Q. Hu, I. Delalle, V.S. Caviness, J. Silver, R.T. Bronson, and J. Settleman. 2000. The adhesion signaling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development.* 127:4891–4903.
- Brouns, M.R., S.F. Matheson, and J. Settleman. 2001. p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nat. Cell Biol.* 3:361–367. <http://dx.doi.org/10.1038/35070042>
- Bryant, S.S., S. Briggs, T.E. Smithgall, G.A. Martin, F. McCormick, J.H. Chang, S.J. Parsons, and R. Jove. 1995. Two SH2 domains of p120 Ras GTPase-activating protein bind synergistically to tyrosine phosphorylated p190 Rho GTPase-activating protein. *J. Biol. Chem.* 270:17947–17952. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.30.17947>
- Bryce, N.S., E.S. Clark, J.L. Leysath, J.D. Currie, D.J. Webb, and A.M. Weaver. 2005. Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. *Curr. Biol.* 15:1276–1285. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2005.06.043>
- Bustos, R.I., M.A. Forget, J.E. Settleman, and S.H. Hansen. 2008. Coordination of Rho and Rac GTPase function via p190B RhoGAP. *Curr. Biol.* 18:1606–1611. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2008.09.019>
- Chrzanowska-Wodnicka, M., and K. Burridge. 1996. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell Biol.* 133:1403–1415. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.133.6.1403>
- Ellis, C., M. Moran, F. McCormick, and T. Pawson. 1990. Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases. *Nature.* 343:377–381. <http://dx.doi.org/10.1038/343377a0>
- García-Mata, R., K. Wennerberg, W.T. Arthur, N.K. Noren, S.M. Ellerbroek, and K. Burridge. 2006. Analysis of activated GAPs and GEFs in cell lysates. *Methods Enzymol.* 406:425–437. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)06031-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(06)06031-9)
- Giannone, G., B.J. Dubin-Thaler, H.G. Döbereiner, N. Kieffer, A.R. Bresnick, and M.P. Sheetz. 2004. Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. *Cell.* 116:431–443. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00058-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00058-3)
- Guegan, F., F. Tatin, T. Leste-Lasserre, G. Drutel, E. Genot, and V. Moreau. 2008. p190B RhoGAP regulates endothelial-cell-associated proteolysis through MT1-MMP and MMP2. *J. Cell Sci.* 121:2054–2061. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.025817>
- Haskell, M.D., A.L. Nickles, J.M. Agati, L. Su, B.D. Dukes, and S.J. Parsons. 2001. Phosphorylation of p190 on Tyr1105 by c-Src is necessary but not sufficient for EGF-induced actin disassembly in C3H10T1/2 fibroblasts. *J. Cell Sci.* 114:1699–1708.
- Herbrand, U., and M.R. Ahmadian. 2006. p190-RhoGAP as an integral component of the Tiam1/Rac1-induced downregulation of Rho. *Biol. Chem.* 387:311–317. <http://dx.doi.org/10.1515/BC.2006.041>
- Horzum, U., B. Ozdil, and D. Pesen-Okvur. 2014. Step-by-step quantitative analysis of focal adhesions. *MethodsX.* 1:56–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mex.2014.06.004>
- Hou, P., L. Estrada, A.W. Kinley, J.T. Parsons, A.B. Vojtek, and J.L. Gorski. 2003. Fgd1, the Cdc42 GEF responsible for Facio-genital Dysplasia, directly interacts with cortactin and mAbp1 to modulate cell shape. *Hum. Mol. Genet.* 12:1981–1993. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddg209>
- Hu, K.Q., and J. Settleman. 1997. Tandem SH2 binding sites mediate the RasGAP-RhoGAP interaction: a conformational mechanism for SH3 domain regulation. *EMBO J.* 16:473–483. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/16.3.473>
- Jia, L., T. Uekita, and R. Sakai. 2008. Hyperphosphorylated cortactin in cancer cells plays an inhibitory role in cell motility. *Mol. Cancer Res.* 6:654–662. <http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-0220>

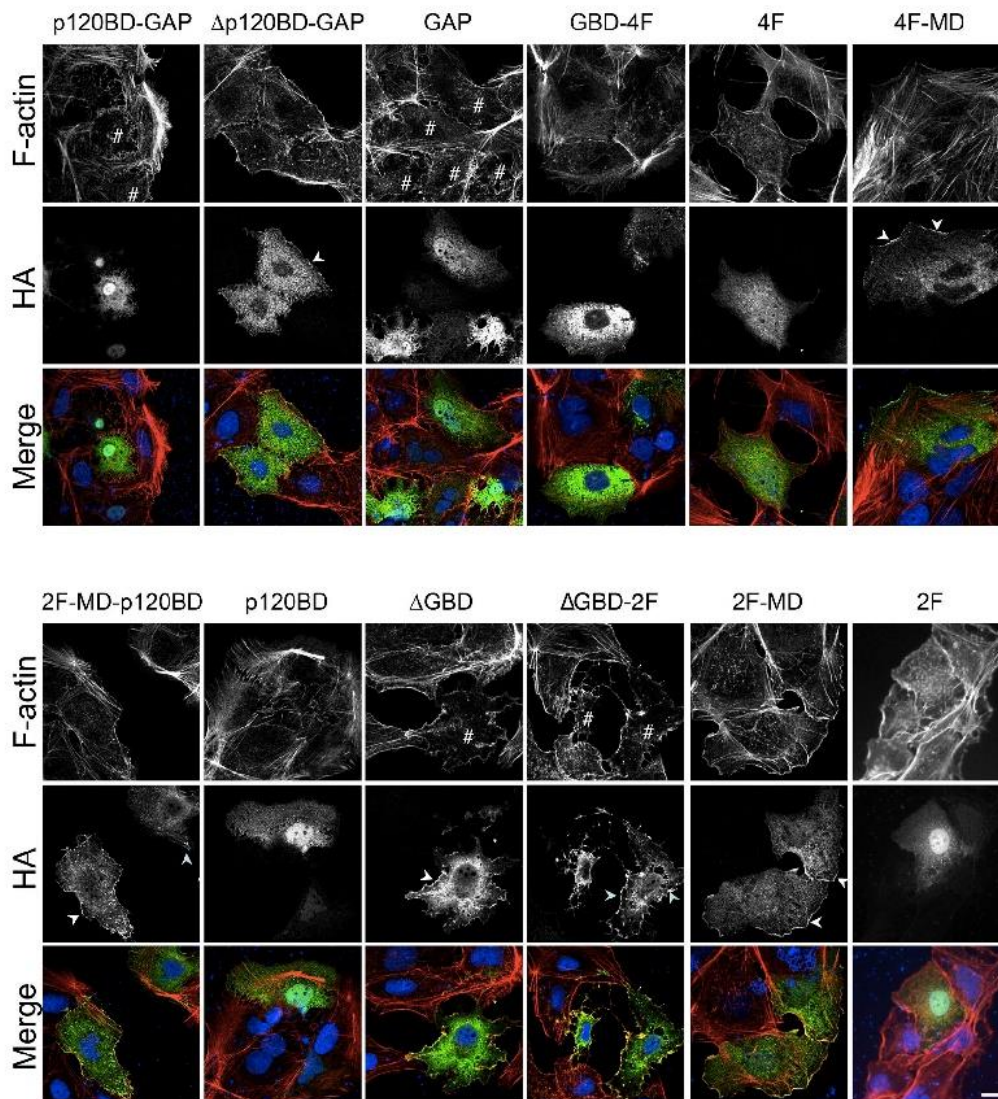


Figure S1. **Localization of the truncated versions of p190A.** HA-tagged p190A constructs were generated as described in Materials and methods and expressed in Huh7 cells. Cells were fixed, stained for F-actin (red), HA tag (green), and nucleus (blue), and analyzed by fluorescent microscopy. Arrowheads indicate colocalization of p190A with actin-rich edges. # indicate cells with altered actin cytoskeleton (loss of stress fibers). Bar, 20 μ m.

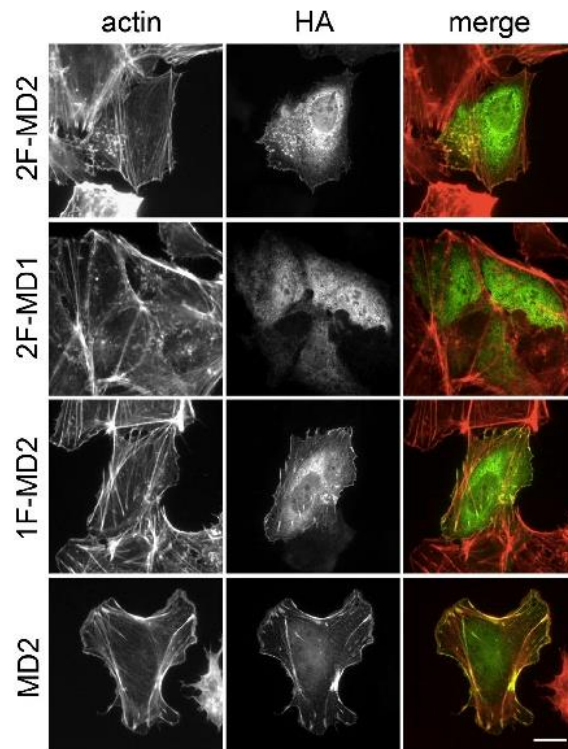


Figure S2. **Localization of the different truncated versions of 2F-MD construct.** HA-tagged p190A constructs were generated as described in Materials and methods and expressed in Huh7 cells. Cells were fixed, stained for F-actin (red) and HA tag (green), and analyzed by fluorescent microscopy. Bar, 20 μ m.

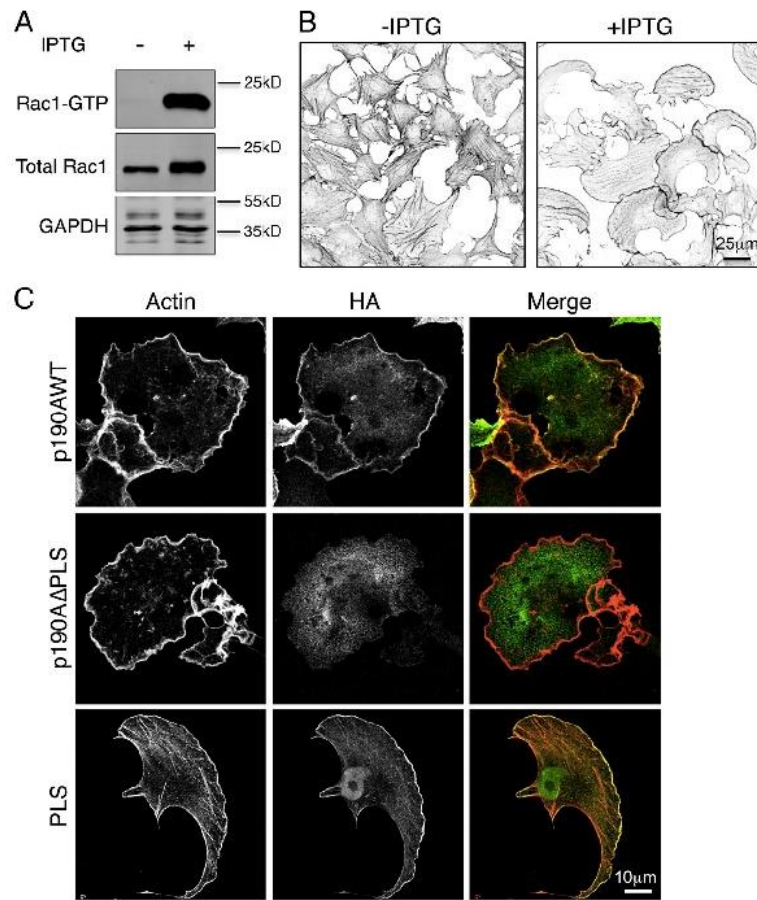


Figure S3. **PLS is necessary and sufficient for Rac1-induced lamellipodia targeting.** (A) PAEV12Rac1 cells were treated or not with IPTG, lysed, and Rac1 activity was assayed by pulldown with biotinylated Cdc42/Rac-interacting and binding and streptavidin beads. Proteins were then resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-Rac1 antibody. (B) PAEV12Rac1 cells were treated or not with IPTG, fixed, and stained with fluorescent phalloidin to visualize F-actin. To increase contrast, inverted images are shown. (C) The HA-tagged constructs p190AWT, p190AΔPLS, and PLS were transiently transfected in PAEV12Rac1 cells. After transfection, cells were treated 16 h with IPTG, fixed, and stained for F-actin (red) and HA tag (green).

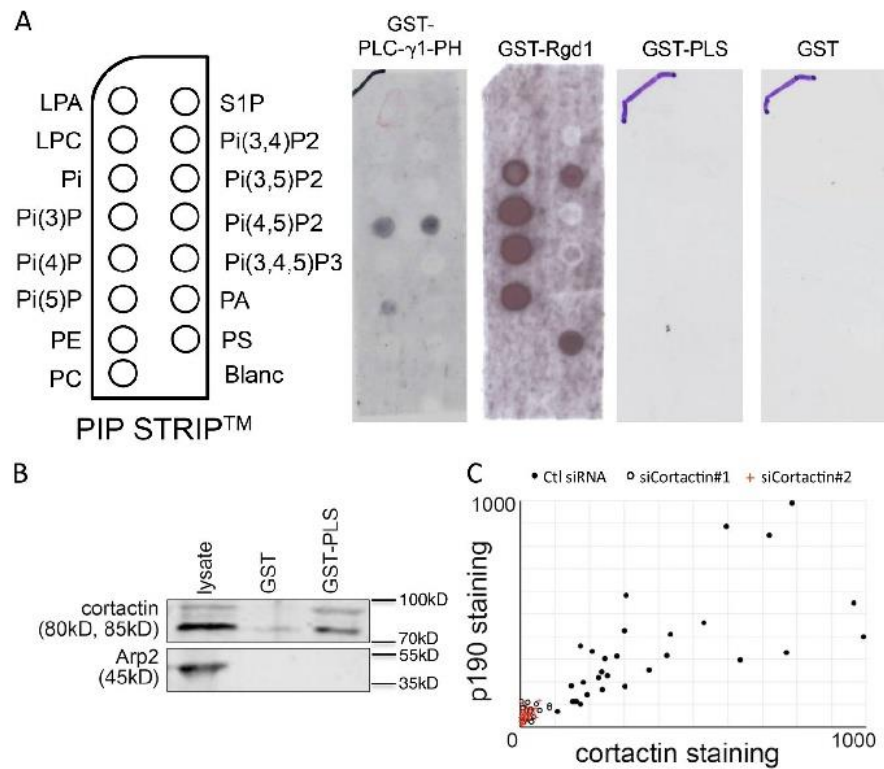


Figure S4. **PLS does not interact with phospholipids in vitro, but interacts with cortactin.** (A) PIP Strip membranes were incubated with recombinant purified GST-PLC- γ 1-PH, GST-Rgd1 (a yeast RhoGAP protein), GST-PLS, and GST as a negative control. The corresponding membranes were revealed using an anti-GST antibody. Left panel represents the phospholipids map of the PIP Strip. (B) p190A interacts with cortactin via the PLS domain. Purified GST-PLS produced in bacteria was used as bait to pull-down p190A interacting partners from Huh7 lysate. GST was used as a negative control. Western blot was performed using anti-cortactin and anti-Arp2 antibodies. (C) Correlation of cortactin staining with p190A at the lamellipodium edge. Mean values of membrane areas of $2 \times 0.28 \mu\text{m}$ are plotted on the graph. Closed and open circles and red crosses represent, respectively, correlations in cells transfected with control (Ctl) siRNA, siCortactin 1, and siCortactin2 ($n = 30/\text{condition}$).

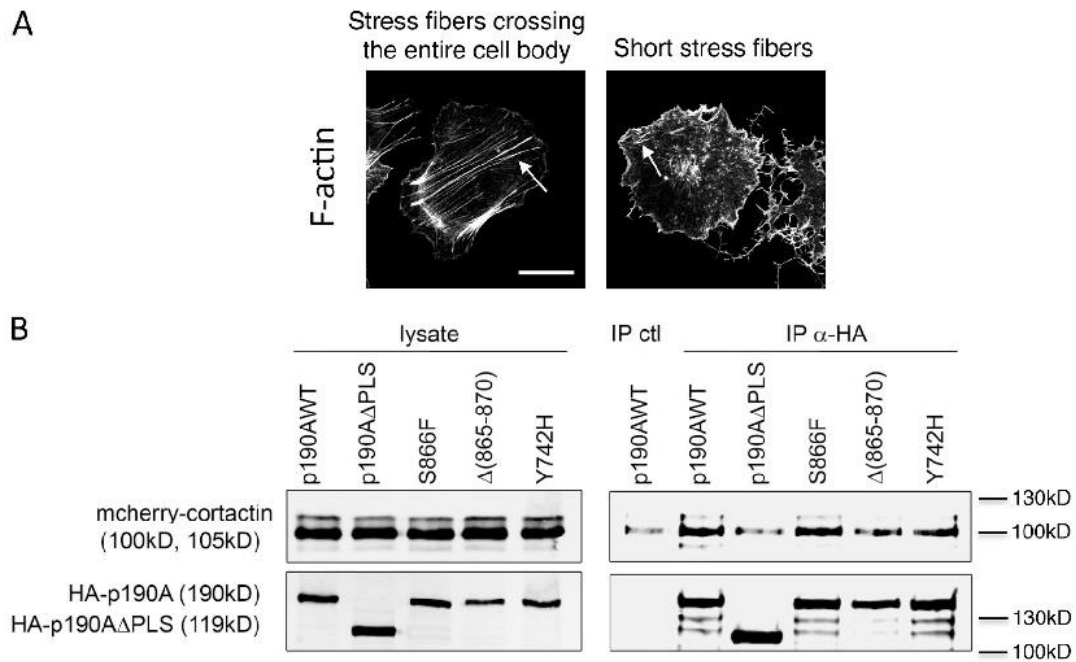
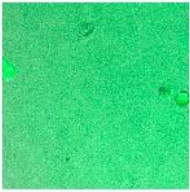


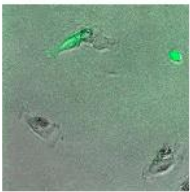
Figure S5. **Characterization of p190A cancer-associated mutations.** (A) Classification of stress fibers. Left panel shows an example of cells with long stress fibers (arrow) that cross the entire cell body, as found in nontransfected Huh7 cells. Right panel shows an example of cells with short stress fibers (arrow) as found in Huh7 cells transfected with p190A-S866F. (B) Interaction of p190A mutants with cortactin. Huh7 cells transfected with both mcherry-cortactin and indicated HA-tagged p190A plasmids were used to perform immunoprecipitation (IP) with anti-HA beads. Presence of cortactin is analyzed by immunoblot using an anti-cortactin antibody. ctl, control.



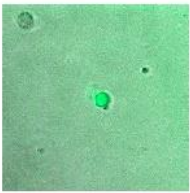
Video 1. **MDA-MB-231 cells were transfected with an EGFP-expressing construct, spread on gelatin coating and visualized by epifluorescence and contrast time-lapse microscopy for 15 h.** Frames were collected every 10 min, and videos display at three frames per second.



Video 2. **MDA-MB-231 cells were cotransfected with WT p190A- and EGFP-expressing constructs and were visualized by epifluorescence and contrast time-lapse microscopy for 15 h.** Frames were collected every 10 min, and videos display at three frames per second.



Video 3. **MDA-MB-231 cells were cotransfected with p190A Δ PLS- and EGFP-expressing constructs and were visualized by epifluorescence and contrast time-lapse microscopy for 15 h.** Frames were collected every 10 min, and videos display at three frames per second.



Video 4. **MDA-MB-231 cells were cotransfected with p190A Δ S866F- and EGFP-expressing constructs and were visualized by epifluorescence and contrast time-lapse microscopy for 15 h.** Frames were collected every 10 min, and videos display at three frames per second.



Video 5. **MDA-MB-231 cells were cotransfected with p190A Δ (865-870)- and EGFP-expressing constructs and were visualized by epifluorescence and contrast time-lapse microscopy for 15 h.** Frames were collected every 10 min, and videos display at three frames per second.

Table S1. Cancer-associated mutations in p190A from patients

Amino acid	Gene mutation	Protein mutation	Cancer type (no. of tumors)
Y742H	TAT → CAT	Tyr → His	Endometrial (1)
R832Q	CGC → CAG	Arg → Gln	Endometrial (1)
S866F	TCC → TTC	Ser → Phe	Endometrial (1)
Δ(865–870)	GCC TCC TTG GCA ATG TTA → GTA	Deletion of 5 aa, addition of 1 Val	Endometrial (1)
R997Q	CGG → CAA	Arg → Gln	Colon (1)
R997*	CGG → TGA	Arg → STOP	Endometrial (6)

ARHGAP35 somatic mutations found in human tumors by Lawrence et al. (2014); data available at <http://www.tumorportal.org/>, generated and characterized in this study. Bold indicates changes of bases.

Table S2. Primers used to generate p190A constructs and mutants

Construct name	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
p120BD-GAP	CGGGATCCCAGATCTTTCTTACTTAGACC	GGAATTCAGAGAACAAGCACTGATTTTCCTG
Δp120BD-GAP	CGGGATCCCGATGATGATGGCAAGAAAGCAAG	GGAATTCAGTAAGTAAGAAAGATCTTTTG
GAP	CGGGATCCCGCCGATACCCATTTTCATTG	GGAATTCAGAGAACAAGCACTGATTTTCCTG
GBD-4F	CGGGATCCCGATGATGATGGCAAGAAAGCAAG	GGAATTCAGTAAGTAAGAAAGATCTTTTG
4F	CGGGATCCCAGGGAAGACGAAAATCATCC	GGAATTCAGTAAGTAAGAAAGATCTTTTG
4F-MD	CGGGATCCCAGGGAAGACGAAAATCATCC	GGAATTCAGTAAGTAAGAAAGATCTTTTG
2F-MD-p120BD	CGGGATCCCAGGTTGTGTACTTGAAGAGAC	GGAATTCAGTAAGTAAGAAAGATCTTTTG
p120BD	CGGGATCCCAGATCTTTCTTACTTAGACC	GGAATTCAGTAAGTAAGAAAGATCTTTTG
ΔGBD	CGGGATCCCAGGGAAGACGAAAATCATCC	GGAATTCAGAGAACAAGCACTGATTTTCCTG
ΔGBD-2F	CGGGATCCCAGGTTGTGTACTTGAAGAGAC	GGAATTCAGAGAACAAGCACTGATTTTCCTG
2F-MD	CGGGATCCCAGGTTGTGTACTTGAAGAGAC	GGAATTCAGTAAGTAAGAAAGATCTTTTG
2F	CGGGATCCCAGGTTGTGTACTTGAAGAGAC	GGAATTCAGTAAGTAAGAAAGATCTTTTG
2F-MD1	CGGGATCCCAGGTTGTGTACTTGAAGAGAC	GGAATTCAGTAAGTAAGAAAGATCTTTTG
2F-MD2	CGGGATCCCAGGTTGTGTACTTGAAGAGAC	GGAATTCAGTAAGTAAGAAAGATCTTTTG
2F-MD3	CGGGATCCCAGGTTGTGTACTTGAAGAGAC	GGAATTCAGTAAGTAAGAAAGATCTTTTG
1F-MD2	CGGGATCCCAGGCAAGGAAGATTC	GGAATTCAGTAAGTAAGAAAGATCTTTTG
MD2	CGGGATCCCAGAACTCCAAGCAGAGCGTGATG	GGAATTCAGTAAGTAAGAAAGATCTTTTG
Mutant name		
Y742H	TCTGCTGGCATTGGTCATGGACGCAACATTAAC	GTTAATGTTGCGTCCATGACCAATGCCAGCAGA
R832Q	GGAGTACACAAGAAGCAGATTGAGCTGTCTGTT	AACAGACAGCTCAATCTGCTTCTGTGTACTCC
S866F	GCCAAACGTAAGGCCCTTTGGCAATGTTA CGT	ACGTAAACATTGCCAAGAAGGCCTTACGTTTGGC
Δ(865–870)	TATTCAGCCAAACGTAAGGTACGTGCCTTTCTTTGTGAA	TTCAACAAGAAAGGCACGTACCTTACGTTTGGCTGAATA
R997Q	TCGTACCACCTTTTCAAGAAGATGCGACATTG	CAATGTCGCATCTTCTGAAAAAGGTGGTACGA
R997*	TCGTACCACCTTTTGTAGAAGATGCGACATTG	CAATGTCGCATCTTCTCAAAAAAGGTGGTACGA

Provided online is Table S3 in Excel, showing truncated versions of p190A protein and localization and impact on the actin cytoskeleton. Indicated p190A truncated proteins were generated in pKH3 vector and expressed in Huh7 cells. Name, N and C terminus amino acids, and domains are indicated for each construct. Localization and impact on the actin cytoskeleton were analyzed by fluorescent microscopy and reported in the table.

Reference

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. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12912>

Publication 4 :

TGF- β promotes linear invadosome formation in hepatocellular carcinoma cells, through DDR1 up-regulation and collagen I cross-linking

Zakaria Ezzoukhry*, Elodie Henriet*, Léo Piquet, Paulette Bioulac-Sage, Charles Balabaud, Jessica Zucman-Rossi, Violaine Moreau and Frédéric Saltel.

European Journal of Cell Biology (2016)

**Co-premiers auteurs*

Le TGF- β (transforming growth factor- β) joue un rôle important dans les maladies chroniques du foie induisant la fibrogenèse et le développement du carcinome hépatocellulaire. Le TGF- β est impliqué dans la régulation de nombreux processus aussi bien au niveau cellulaire que du microenvironnement. Il a été décrit que le TGF- β augmente la production de collagène de type I et de l'enzyme de réticulation associée, la LOXL2 (lysyl oxidase-like 2). Il a été montré que collagène I est un important inducteur d'invadosomes. En effet, à travers le récepteur à domaine discoidine DDR1, le collagène I va induire la formation d'invadosomes linéaires, une nouvelle structure d'invadosome récemment identifiée au laboratoire. L'objectif de cette étude était d'évaluer le rôle du TGF- β dans la réticulation du collagène et son impact sur la formation des invadosomes linéaires dans les cellules du cancer du foie. Les premières analyses ont montré une corrélation entre l'expression du TGF- β et l'expression du collagène I, de la LOXL2, de DDR1 et de MT1-MMP (une métalloprotéase) dans des échantillons de carcinome hépatocellulaire. De plus, les expériences réalisées dans les cellules de carcinome hépatocellulaire ont démontré que le TGF- β va augmenter l'expression de DDR1 à travers Smad4, de même que l'expression de la LOXL2. La réticulation du collagène par la LOXL2 favorise la formation des invadosomes linéaires. Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus ont permis de montrer que le TGF- β stimule la formation des invadosomes linéaires à travers l'expression non seulement des inducteurs tels que le collagène I et la LOXL2, mais également à travers l'expression des composants des invadosomes linéaires que sont DDR1 et MT1-MMP. Ainsi, cette étude a mis en évidence un nouveau mécanisme de régulation de l'expression de DDR1 dépendant du TGF- β .

Dans ce projet, j'ai principalement été chargé de réaliser des expériences de qRT-PCR afin d'évaluer le niveau d'ARNm des différentes cibles après traitement au TGF- β de cellules de carcinome hépatocellulaire. J'ai ainsi montré que le traitement au TGF- β induit une augmentation de l'ARNm des inducteurs d'invadosomes linéaires (collagène I et LOXL2) et également des composants de ces invadosomes (DDR1 et MT1-MMP). J'ai également évalué le niveau d'ARNm de ces cibles au cours d'une cinétique de traitement au TGF- β et selon différentes concentrations de TGF- β . De plus, j'ai vérifié l'induction du phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse par le TGF- β par l'analyse de cibles telles que ZEB1,

ZEB2 ou la vimentine. Enfin, j'ai analysé l'impact du TGF- β sur l'expression de miR-199a-5p, un miARN potentiellement impliqué dans la régulation de Rnd3.

*Manuscript

TGF- β 1 promotes linear invadosome formation in hepatocellular carcinoma cells, through DDR1 up-regulation and collagen I cross-linking

Zakaria Ezzoukhry^{1,2#}, Elodie Henriet^{1,2#}, Léo Piquet^{1,2}, Kevin Boyé³, Paulette Bioulac-Sage^{1,2}, Charles Balabaud^{1,2}, Gabrielle Couchy⁴, Jessica Zucman-Rossi⁴, Violaine Moreau^{1,2} and Frédéric Saltel^{1,2*}

¹INSERM, UMR1053 Bordeaux Research In Translational Oncology, BaRITOn, F-33000 Bordeaux, France; ²Univ. Bordeaux, UMR1053 Bordeaux Research In Translational Oncology, BaRITOn, F-33000 Bordeaux, France; ³INSERM, U1029 Angiogenesis and tumor microenvironment laboratory, F-33000 Bordeaux. ; ⁴INSERM, UMR1162, Génomique Fonctionnelle des Tumeurs Solides, Paris, France; Université Paris Descartes, Labex Immuno-Oncology, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, UFR SMBH, Bobigny, France; Université Paris Diderot, Paris, France.

These authors contributed equally to this work

*Corresponding author

Phone: +33 (0)5 57 57 17 07. Fax: +33 (0)5 56 51 40 77. E-mail: frederic.saltel@inserm.fr

Keywords: TGF- β 1, invadosomes, collagen, discoidin domain receptor 1, lysyl oxidase-like2, cross-linking

Abbreviations: TGF- β 1, transforming growth factor beta1; LOX, lysyl oxidase; LOXL2, lysyl oxidase-like2; MMP-2, matrix metalloproteinase-2; MT1-MMP, membrane type-1 matrix metalloproteinase 1; DDR1, discoidin domain receptor 1; HCC, hepatocellular carcinoma; ECM, extracellular matrix; EGF, epidermal growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; Cdc42, cell division control protein 42; CAFs, cancer-associated fibroblasts; EMT, epithelial-mesenchymal transition; F-actin, fibrillar actin; PI3K, phosphoinositide 3 kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinases; RTK, receptor tyrosine kinase; IGF-I, insulin growth factor 1; mRNA, messenger ribonucleic acid; miRNA, micro-ribonucleic acid;

Abstract

Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) is an important player in chronic liver diseases inducing fibrogenesis and hepatocellular carcinoma (HCC) development. TGF- β 1 promotes pleiotropic modifications at the cellular and matrix microenvironment levels. TGF- β 1 was described to enhance production of type I collagen and its associated cross-linking enzyme, the lysyl oxidase-like2 (LOXL2). In addition, TGF- β 1 and type I collagen are potent inducers of invadosomes. Indeed, type I collagen fibers induce the formation of active linear invadosomes through the discoidin domain receptor 1 (DDR1). The goal of our study was to address the role of TGF- β 1 in collagen cross-linking and its impact on the formation of linear invadosomes in liver cancer cells. We first report a significant correlation between expressions of TGF- β 1, and type I collagen, LOXL2, DDR1 and MT1-MMP in human HCCs. We demonstrate that TGF- β 1 promotes a Smad4-dependent up-regulation of DDR1, together with LOXL2, in cultured HCC cells. Moreover, we show that LOXL2-induced collagen cross-linking enhances linear invadosome formation. Altogether, our data demonstrate that TGF- β 1 favors linear invadosome formation through the expressions of both the inducers, such as collagen and LOXL2, and the components such as DDR1 and MT1-MMP of linear invadosomes in cancer cells. Meanwhile, our data uncover a new TGF- β 1-dependent regulation of DDR1 expression.

1.Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common form of primary liver cancer and the fifth-most prevalent but the second-most lethal cancer worldwide (Karaman et al., 2014). In most cases HCC developed after chronic liver disease caused by various factors such as viral hepatitis B/C alcohol or metabolic syndrome (Zucman-Rossi et al., 2015). Due to frequent late diagnosis, the prognosis for HCC is poor. HCC invasion criteria such as satellite nodules, vascular embolization or capsule invasion are hallmark features of HCC progression. This intra or extra-liver metastasis formation participates to the very high HCC mortality rate because they cause liver failure and their presence is not compatible with liver transplantation. Therefore, it is crucial to decipher molecular mechanisms used by HCC cells to invade and colonize liver, vessels and distant organs.

Cancer metastasis is a complex and multistep process including intravasation, survival in circulatory system, extravasation and colonization of other organs, such as bone or lung for HCC. For most of these different stages, cancer cells have to acquire migrating and invasive capabilities. They thus need to degrade extracellular matrices (ECM) in order to cross tissue boundaries, meaning that interaction with the microenvironment is crucial for cancer cell invasion.

Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) is an important player in chronic liver diseases inducing fibrogenesis and tumorigenesis (Giannelli et al., 2014). TGF- β 1 is involved in HCC development and progression (Neuzillet et al., 2014). High levels of this inflammatory factor were measured in plasma of HCC patients compared to patients with cirrhosis only (Ito et al., 1991; Shirai et al., 1994). This growth factor is secreted by hepatic stellate cells, myofibroblasts and cancer-associated fibroblasts during fibrosis or HCC (Dooley and ten Dijke, 2012). TGF- β 1 promotes pleiotropic modifications at the cellular and matrix microenvironment levels (Giannelli et al., 2014) and participates to the progression of liver diseases (Dooley and ten Dijke, 2012). It regulates many cellular pathways and is involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT) (Lamouille et al., 2014). It regulates E-cadherin expression, activates β 1 integrin and promotes HCC cell migration and invasion (Fransvea et al., 2008)(Fransvea et al., 2009). In the canonical pathway, TGF- β 1 binds to TGF- β 1 receptor (TGF- β RI) inducing the phosphorylation of Smad2/3 proteins. Phosphorylated Smad2/3 form a complex with a common mediator, Smad4, which translocates to the nucleus and regulates gene transcription through the interaction with various transcription factors.

At the cellular level, TGF- β 1 has been involved in the formation of invadosomes (Mandal et al., 2008; Varon et al., 2006). Invadosomes are actin-based structures involved in matrix degradation and cell invasion through metalloproteinases (MMP) activity (Linder et al., 2011). Invadosomes, constitutively formed by various tumor cells, correspond to dynamic structures able to adapt to the microenvironment. Indeed, depending on the ECM context, invadosomes can adopt different shapes as dots, aggregates or lines (Di Martino et al., 2016). Invadosomes could be constitutively formed or induced after different stimulations. Indeed, various cytokines or growth factors, including epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and TGF- β 1 were described to enhance invadosome formation, maturation and activity in different cellular

models (Mader et al., 2011; Osiak et al., 2005); (Pignatelli et al., 2012). TGF- β 1 was found to induce invadosome formation in endothelial and cancer cells (Mandal et al., 2008; Varon et al., 2006).

Recently, we identified the linear invadosomes as a new class of invadosomes specifically induced by the fibrillar type I collagen (Juin et al., 2012). Linear invadosomes formation is dependent on the discoidin domain receptor 1 (DDR1), a specific collagen type I receptor (Juin et al., 2014). DDR1 leads to the recruitment of the active small GTPase Cdc42, the invadosome marker Tks5 and the metalloproteinase MT1-MMP along type I collagen fibrils allowing invadosome formation and degradation activity. The DDR receptor family, consisting of two members DDR1 and DDR2, are distinctive receptor tyrosine kinases (RTKs) that signal in response to interaction with collagen instead of growth factors (Leitinger, 2014). However, we previously demonstrated that the kinase activity of DDR1 is not required for linear invadosome formation.

DDR1 is overexpressed in HCC cell lines and HCCs (Jian et al., 2012; Park et al., 2007; Shen et al., 2010). Moreover, its overexpression was associated with advanced tumor stages (Shen et al., 2010). Cancerous ECM is composed of various elements such as proteoglycans, hyaluronic acid, fibronectin, elastin and collagens. During cancer progression, associated ECM evolves in parallel and modulates tumor cells behavior (Pickup et al., 2014). Different studies clearly established the link between collagen and matrix stiffness with metastasis formation in many solid tumors (Cox et al., 2013; Ramaswamy et al., 2003). Lysyl oxidase (LOX) is a secreted copper-dependent amine oxidase that creates intra and inter-molecular cross-linking of collagen. Lysyl oxidase-like (LOXL) proteins (1 to 4) present homology with the LOX and are also able to cross-link collagen. This cross-linking enhances collagen fiber formation and increases the matrix stiffness. A recent study demonstrated that TGF- β 1 induces the expression of LOXL2 in HCC cells (Wong et al., 2014). Interestingly, it is known that matrix stiffness enhances invadosome formation and/or activity (Alexander et al., 2008; Juin et al., 2013) and invadosomes correspond to mechanosensors (Labernadie et al., 2014). Moreover, TGF- β 1 promotes type I collagen secretion in many organs and cellular models (Cutroneo, 2003; Leask and Abraham, 2004).

All these data prompted us to test the impact of TGF- β 1 on the molecular machinery implicated in linear invadosome formation and ECM degradation, namely, DDR1 and MT1-MMP. Moreover, we investigated the impact of LOXL2 secretion, and collagen cross-linking on these invasive structures.

2. Material and Methods

Transcriptomic analysis

The GSE62232 series available at the GEO database and including 82 HCC and 4 normal liver samples was used to analyze gene expression correlation. Comparative gene expression analysis was done using Affymetrix U133plus v2 array. The following probe sets were extracted and analyzed for the Spearman correlation using GraphPad: TGFB1_203085_s_at, COL1A1_1556499_s_at, COL1A2_202403_s_at, SH3PXD2A_224817_at, DDR1_210749_x_at, LOXL2_202998_s_at, MMP14_202827_s_at.

Cell culture

Human HCC cell lines (Huh7, Hep3B, SNU398), MDA-MB-231 were purchased from American Type Culture Collection. NIH-3T3-Src cells were provided by the Dr Courtneidge (NCI Cancer Center, La Jolla, USA) (Seals et al., 2005). These cell lines were recently authenticated by American Type Culture Collection. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with 4.5g/l glucose Glutamax-I (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma-Aldrich) and 100U/ml penicillin–streptomycin (Invitrogen). Growth factor stimulation was performed using 3ng/ml of TGF- β 1 (Sigma-Aldrich)

Antibodies and reagents

Type I rat tail collagen was purchased from Corning. TGF- β 1, anti- α -tubulin (mouse, B-5-1- 2), anti-lamin (rabbit, L1293) and anti- β -actin (rabbit, A2066) antibodies were purchased from Sigma-Aldrich. Anti-Tks5 (rabbit, M-300) and anti-GAPDH (mouse, D-6 or rabbit, FL-

335) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. We also used anti- DDR1 (rabbit, D1G6), anti-Smad4 (rabbit), anti-Akt (rabbit, #9272), anti-phospho-Akt (rabbit, D25E6), anti-ERK (rabbit, #9102) and anti-phospho-ERK (mouse, E10) antibodies from Cell Signaling Technology. Anti-collagen I antibodies (mouse, COL-I) were purchased from ThermoFisher and anti-LOXL2 antibodies (rabbit) from Abcam. Anti-MT1-MMP antibodies (mouse, Lem 2/15.8) were purchased from Merck Millipore.

Anti–rabbit and anti–mouse secondary antibodies FluoProbes 488, 547H, and 647H were purchased from Interchim. F-actin was stained with Phalloidin-FluoProbes 647, 547H or 488 (Interchim). Hoechst 34580 (Invitrogen) was used to stain nuclei. LOXL2 was purchased from R&D Systems, Glutaraldehyde was obtained from Electron Microscopy Sciences.

Transfections

Small interfering RNAs (siRNA) (75 nM) were transfected using 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'-

GAGCGUCUGUCUGCGGGUAAU-3' according to published sequences (Hidalgo-Carcedo et al., 2011). The antisense strand siRNA was targeted against Smad4 using the 25-nucleotide sequences: Smad4#1, 5'-CCUGAGUAUUGGUGUCCAUUGCUU-3'; Smad4#2, 5'-GCAAAGGUGUGCAGUUGGAAUGUAA-3'. All siRNAs, including the control siRNA targeted against luciferase 5'-CGTACGCGGAATACTTCGA-3', were purchased from Eurofins MWG Operon, Inc.

Real-time PCR

RNA was collected from cultured cells using the Trizol reagent (Invitrogen), according to manufacturer's protocol. cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA with Maxima® Reverse Transcriptase (Fermentas) using a mix of oligo(dT)18 and random hexamer primers. 30 ng of cDNA were then subjected to PCR amplification on a StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems) with specific forward and reverse oligonucleotide primers. The SYBR® Green SuperMix for iQTM (Quanta Biosciences, Inc.) was used with the following PCR amplification cycles: initial denaturation, 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles with denaturation, 95°C for 15 seconds and annealing-extension, 60°C for 1 minute. A dissociation curve was generated to verify that a single product was amplified. Gene expression results were first normalized to internal control r18S. Relative levels of expression were calculated using the comparative ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method. Primers used to analyze expression of r18S, E-cadherin, Vimentin, Zeb1 and 2 were described previously (Grise et al., 2012). Other primers used for qRT-PCR are listed below. DDR1 forward: 5'- CCGACTGGTTCGCTTCTACC-3', DDR1 reverse: 5'- CCGTGTAAGACAGGAGTCCATC-3', LOXL2 forward: 5'- AGGACATTCGGATTCGAGCC-3', LOXL2 reverse: 5'-CTTCCTCCGTGAGGCAAAC-3', COL1A forward: 5'- GGCCCTCAAGGTTTCCAAGG-3', COL1A reverse: 5'- CACCCTGTGGTCCAACAAC-3', MT1-MMP forward: 5'- TGAGATCAAGGCCAATGTTTCG-3', MT1-MMP Reverse: 5'- AGTGATTTCATTATGTTGCCATTTG-3'.

***In situ* zymography assay**

Coverslips were coated with gelatin (Sigma Aldrich) labeled with 10 µg/ml Alexa Fluor 546 carboxylic acid succinimidyl ester (Invitrogen), fixed with 0.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences), and washed three times with PBS (Invitrogen). Cells were seeded on coated coverslips and incubated 24 h 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 63×/NA 1.4 Plan Neofluor objective lens. To prevent contamination between fluorochromes, each channel was imaged sequentially using the multitrack recording module before merging.

Cellular fractioning

Nuclear and cytoplasmic fractions were prepared, as previously reported (Ezzoukhry et al., 2011). In brief, $5 \cdot 10^6$ Huh7 cells were homogenized in a buffer containing 250 mM sucrose, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, and 20 mM HEPES-KOH, pH 7.4, together with protease and phosphatase inhibitors. Nuclei were recovered after centrifugation at 720 g for 5 min. Cytoplasmic fraction was obtained after centrifugation of post-nuclear supernatant at 13000 g for 15 min. Equal amounts of proteins from different fractions were loaded on SDS-PAGE.

Collagen polymerization/ cross-linking

Collagen polymerization and linear invadosome quantifications were made as described previously (Juin 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. Collagen crosslinking was performed by using recombinant LOXL2 (50 ng/mL; 5 days), or conditioned medium (CM, obtained from Huh7 cells stimulated with 3ng/mL of TGF- β 1; 5 days), or glutaraldehyde (2.5%; 1 hour).

Western blotting

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), incubated at 95°C for 5 min, and loaded onto a 10% TGX™ FastCast™ acrylamide gel (BioRad). Proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane (BioRad), blocked with Odyssey buffer (LI-COR Biosciences) 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).

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 Mann-Whitney or analysis of variance (ANOVA) as appropriate and performed with GraphPad Prism software.

3.RESULTS

TGF- β 1 impacts on the expression of invasion molecular machinery components

TGF- β 1 is known to induce LOXL2 expression in HCC and type I collagen overexpression in various cell types such as hepatic stellate cells or cancer cells (Garcia-Trevijano et al., 1999; Mahara et al., 1994; Wong et al., 2014) and is a key factor for HCC progression. Moreover, TGF- β 1 is an enhancer of invadosomes (Mandal et al., 2008; Pignatelli et al., 2012; Rottiers et al., 2009). Thus, we first aimed to search for links between TGF- β 1 expression and expression of the linear invadosome components in HCC. To do so, we analyzed the Affymetrix GeneChip arrays of a series of 82 human HCCs and four samples of non-tumor tissues (Fig. 1A). We investigated the correlations between TGF- β 1 expression and expression of invadosome markers (DDR1, Tks5 and MT1-MMP) and invadosome inducers (type I collagen) in human HCCs. We found that expression of *DDR1*, *MT1-MMP* and *SH3PXD2A* (encoding Tks5) genes significantly correlates with the expression of *TGFB1* gene in HCC (Fig. 1A). We also confirmed the correlation of expression between *TGFB1* and *LOXL2*, *COL1A1*, *COL1A2* genes. Thus, these results highlight a potential pathophysiological link between TGF- β 1 and the invasion molecular machinery components.

To test whether TGF- β 1 is able to induce the expression of molecules involved in linear invadosome formation, Huh7 cells were treated with TGF- β 1. First, TGF- β 1 stimulation efficiency was confirmed by analyzing Smad4 nuclear translocation (Fig. Sup1A). We also found that TGF- β 1 48h treatment induces HCC cell EMT as expression of target genes such as *CDH1*, *VIM*, *ZEB1* and *ZEB2* were altered (Fig. Sup1B). We thus assayed mRNA expression of *DDR1*, *MT1-MMP*, *COL1A* and *LOXL2* after 48h, 72h and 96h of TGF- β 1 treatment using qRT-PCR. We found that expression of these four genes was upregulated after TGF- β 1 treatment (Fig. 1B). In parallel we tested the same kinetic without TGF- β 1 and we didn't observe this increase (data not shown). These results were also confirmed in the Hep3B HCC cell line (Fig. Sup2A).

We further confirmed this overexpression at the protein level into HCC cells (Fig. 1C and Sup2B). Similarly, to the mRNA, the protein levels of DDR1, collagen 1 and LOXL2 increase after TGF- β 1 stimulation. However, MT1-MMP overexpression was not confirmed at the protein level (Fig. 1C). Interestingly, the LOXL2 increase was also measured into the supernatant of cells after stimulation in Huh7 (Fig. 1C) and Hep3B cells (Fig. Sup2B). However, neither the expressions of the invadosome marker, Tks5, nor of DDR2 were influenced by TGF- β 1 treatment (Fig. Sup2C).

Different pathways such as PI3K/AKT, ERK regulate DDR1 expression (Mata et al., 2016) (Chetoui et al., 2011). We found that TGF- β 1 treatment did not alter ERK and AKT expression and phosphorylation state in Huh7 cells (Fig. Sup2D). TGF- β 1-induced LOXL2 expression was demonstrated to be Smad4 dependent in HCC cells (Wong et al., 2014). To determine if TGF- β 1 regulates DDR1 expression in a similar way, we depleted Smad4 in Huh7 cells. Using two distinct siRNA targeting Smad4, we confirmed that Smad4 depletion decreases TGF- β 1 ability to promote LOXL2 overexpression in cells and in the cell supernatant (Fig. 2). We found that Smad4 depletion also abolishes DDR1 overexpression obtained after TGF- β 1 stimulation (Fig. 2).

Altogether, these data demonstrated that TGF- β 1 signaling pathway controls type I collagen and LOXL2 expression that may contribute to the densification of the matrix surrounding tumor cells. In parallel, TGF- β 1 induces DDR1 overexpression that may help cells to sense this modification.

Impact of TGF- β 1 stimulation on linear invadosomes

TGF- β 1 was an already known inducer of invadosomes (Mandal et al., 2008; Varon et al., 2006), and type I collagen was described to induce or increase invadosome formation in cancer cell lines (Juin et al., 2012; Juin et al., 2014). In order to address the involvement of TGF- β 1 in linear invadosome formation in HCC cells, we first tested the actin cytoskeleton response of Huh7 and Hep3B cells upon type I collagen contact. Huh7 and Hep3B cells were seeded on fluorescent gelatin or on a mixed matrix composed of fluorescent gelatin and type I collagen fibrils. In the gelatin condition, both HCC cell lines are unable to form invadosome structures (Fig. 3A). At the opposite, the presence of type I collagen fibrils promotes formation of linear invadosomes in Huh7 and Hep3B cells (Fig. 3A). As shown for Huh7 cells (Fig. 3B), we confirmed that linear invadosome formation is associated with matrix degradation appearance. We demonstrated previously that linear invadosomes are formed by the interaction between type I collagen fibrils and DDR1. These data demonstrated that HCC cell lines are able to sense the presence of type I collagen fibrils leading to invadosome formation and to the emergence of cell matrix degradation properties.

We next analyzed the actin cytoskeleton remodeling upon TGF- β 1 stimulation. In Huh7 cells, TGF- β 1 treatment does not lead to invadosome formation in the gelatin condition (Fig. 4A). By contrast, in the type I collagen condition where linear invadosomes are already induced, TGF- β 1 increases the cell response to collagen fibrils. Classically, we notice a correlation between the percentage of cells forming linear invadosomes and their matrix degradation capacities. In the type I collagen condition, TGF- β 1 treated cells are more active to degrade the ECM as revealed using the *in situ* zymography assay (Fig. 4B). The same result was obtained with Hep3B cells (data not shown).

As TGF- β 1 increases DDR1 expression, using a siRNA approach, we tested the impact of DDR1 depletion on TGF- β 1-induced linear invadosomes (Fig. 4C). As described previously (Juin et al., 2014), DDR1 silencing promotes a decrease in number and size of linear invadosomes per cell and reduces the cell ability to form type I collagen-induced linear invadosomes (Fig 4C). In addition, DDR1 knockdown also inhibits TGF- β -induced linear invadosomes. Thus, we demonstrate that DDR1 and its TGF- β 1-induced overexpression are part of the linear invadosome response on type I collagen.

LOXL2-dependent collagen I cross-linking enhances linear invadosome formation

LOXL2 is an element strongly regulated by TGF- β 1. Following TGF- β 1 stimulation, HCC cells secrete an important amount of LOXL2 (Fig. 1C and sup 2B). Thus, we further investigated the

impact of type I collagen cross-linking on linear invadosome formation. Type I collagen cross-linking can be induced in different ways, using chemical cross-linking agents such as glutaraldehyde, using conditioned medium of Huh7 cells treated with TGF- β 1, or using recombinant LOXL2. The collagen cross-linking with glutaraldehyde is less physiological but faster (one hour) when compared to the cross-linking using culture cell medium containing LOXL2 or using the recombinant protein, which requires five days. The same concentration of type I collagen was cross-linked using these different methods. Fluorescent collagen allows us to visualize type I collagen fibril modifications. In each condition, collagen fibrils are reorganized, and all three treatments increase the fibril thickness (Fig. 5A) attesting of the cross-linking. Interestingly, we found that the three methods of type I collagen cross-linking increase the percentage of Huh7 cells able to form linear invadosomes (Fig. 5B). These data demonstrate that type I collagen cross-linking increases the capacity of tumor cells to form invasive structures.

4. Discussion

We previously reported that type I collagen is a potent inducer of linear invadosomes (Juin et al., 2012) and that DDR1 is required for their formation and matrix degradation activity (Juin et al., 2014) (Di Martino et al., 2015). As TGF- β 1 was described to enhance type I collagen and LOXL2 expression (Wong et al., 2014), to promote HCC invasion (Fransvea et al., 2009) (van Zijl et al., 2009) and invadosomes *in vitro* (Pignatelli et al., 2012), we decided to study the role of this cytokine in linear invadosome formation.

Transcriptomic data analysis obtained from 86 patient liver samples reveals that *TGFB1* expression positively correlates with *DDR1* and *MMP14* (encoding MT1-MMP), expression. These data also confirm the link between *TGFB1*, *COL1A1*, *COL1A2* and *LOXL2*. Moreover, this analysis establishes a significant correlation between the expression of *DDR1* and *SH3PXD2A* (Tks5) and between collagen-related genes (*COL1A1*, *COL1A2* and *LOXL2*) and *MT1-MMP*. Lysyl oxidase is a family of enzymes composed of five members LOX, LOXL1 to 4. As published earlier (Wong et al., 2014), only LOXL2 expression appears up-regulated upon analysis of HCC transcriptomic data (data not shown). The enzyme involved in type I collagen cross-linking seems to be organ specific, as LOX, but not LOXL2, was implicated in breast cancer (Cox et al., 2013).

These data raised from human tissues suggested a potential link between TGF- β 1 signaling and linear invadosome machinery that may explain TGF- β involvement in HCC progression and invasion. Using HCC cultured cells, we confirmed that TGF- β 1 stimulation increases the production and secretion of collagen I and LOXL2 and we demonstrated that DDR1 is also a target of TGF- β 1 signaling. As previously shown for LOXL2 (Wong et al., 2014), we established that TGF- β 1-dependent regulation of DDR1 is mediated by the canonical signaling pathway involving Smad4. Thus, the regulation of DDR1 expression depends on various factors, as IGF-I was described to also modulate its expression in breast cancer cells through the PI3K/AKT pathway and the miR-199a-5p miRNA (Mata et al., 2016).

This new link between TGF- β 1 and DDR1 prompted us to investigate the role of TGF- β 1 into linear invadosome formation and activity in HCC cells. Our results first demonstrate that liver tumor cells can sense the presence of type I collagen fibrils and are able to form linear invadosomes in response to this matrix element. Logically, the presence of linear invadosomes in HCC cells activates their matrix proteolysis capacity. We found that all HCC cells tested can form these structures after interaction with type I collagen fibrils (data not shown). Moreover, all these different cell lines express DDR1 and not DDR2 the other member of the receptor family.

Interestingly, without the presence of type I collagen, TGF- β 1 is unable to promote invadosome formation and associated matrix degradation. But in presence of type I collagen, TGF- β 1 enhances the percentage of HCC cells exhibiting linear invadosomes and this increase is correlated with an improvement of the degradation of the ECM. We demonstrated that this effect is dependent on the collagen receptor DDR1 as its depletion decreases TGF- β -induced invadosome formation. Thus, our study is in favor of a role of DDR1 in the invasive capabilities of liver cancer cells. Accordingly, several studies described the association of DDR1 overexpression with the HCC tumor stage (Shen et al., 2010). DDR1 expression was also correlated with the recurrence of HCC

(Jian et al., 2012). Interestingly, miR-199a-5p was described to regulate DDR1 expression (Mata et al., 2016); and a decrease of miR-199a-5p contributes to increase cell invasion by functional deregulation of DDR1 activity in HCC. However, this study revealed that the effect of miR-199a-5p on DDR1 varies among individuals and HCC cell lines (Shen et al., 2010). Thus, it will be interesting to further test the impact of TGF- β 1 stimulation on the expression of this miRNA in HCC cell lines. Surprisingly, DDR2 was also found overexpressed in HCC and implicated in HCC invasion and metastasis formation. In this study, the authors demonstrated that DDR2 play this role through ERK signaling pathway and via a stabilization of the EMT factor, SNAIL1 (Xie et al., 2015). In addition, another study described a role of DDR2 in HCC cell proliferation (Park et al., 2015). So it will be necessary to determine the specific role or the redundancy of these two receptors in the invasion process of liver tumor cells.

In addition to the receptor, TGF- β 1 also regulates the DDR1 ligand meaning the type I collagen and the enzyme involved in its maturation (LOXL2). We previously demonstrated that an increase of type I collagen concentration is associated with the presence of more linear invadosomes in cells (Juin et al., 2012). *In vivo*, type I collagen is cross-linked, this modification increases the diameter and the stiffness of the fibrils (Parry et al., 1978). Matrix stiffness is now a well-known parameter implicated in tumor invasion (Levental et al., 2009). Indeed, the matrix stiffness modulates cell adhesion, migration and invasion (Kai et al., 2016). Several studies described the importance of matrix rigidity in invadosome formation and/or activity (Collin et al., 2008; Collin et al., 2006; Linder and Wiesner, 2015; Parekh and Weaver, 2015). Modulating the type, I collagen fibril cross-linking using chemical compounds or LOXL2 as a physiological cross-linker, we demonstrated that an increase of collagen cross-linking is associated with an increase of the cell capacity to form linear invadosomes. Thus, DDR1 could be considered as a mechanosensor for the type I collagen fibril stiffness. However, the signaling of this mechanosensing is not elucidated. As mentioned before, DDR1 belongs to the RTK family; however, we demonstrated that the kinase activity of DDR1 is not necessary for linear invadosome formation and activity (Juin et al., 2014). Now, it will be necessary to determine how DDR1 signal as a mechansensor for type I collagen fibrils.

In conclusion, our results demonstrated that TGF- β 1 promotes linear invadosome formation in hepatocellular carcinoma cells, through the regulation of collagen I, its receptor and its cross-linker (Fig 6). The key role of TGF- β 1 in HCC development allow us to suggest that linear invadosomes and their receptor DDR1 could be an interesting target to stop HCC progression.

Figures Legend

Figure 1

TGF- β 1 treatment increases expression of invasion molecular machinery.

Expression of TGF- β 1 positively correlates with DDR1, MT1-MMP (MMP14), LOXL2 and COL1A1 expression in human liver samples (82 HCC, 4 normal livers). Data were extracted from the GSE62232 transcriptomic analysis. Correlation matrix shows the correlations of expression between all tested genes. Spearman's rank correlation coefficients are shown (bold, significant correlation ($P < 0.0005$); italic, non significant correlation).

Huh7 cells were treated with 3 ng/ml TGF- β 1. After 48, 72 or 96 h, DDR1, LOXL2, MT1-MMP and COL1A mRNA were analyzed by qRT-PCR. Each bar represents the mean \pm SE of three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ by ANOVA, when compared with the control condition.

Huh7 cells were treated with 3 ng/ml of TGF- β 1. Protein extracts were analyzed after 24, 48, and 72 h by immunoblotting to determine DDR1, LOXL2, MT1-MMP and type I collagen protein expression. LOXL2 protein expression was also determined into the cell medium (supernatant). β -actin and GAPDH were used as loading controls.

Figure 2

Smad4 signaling is responsible for DDR1 overexpression in response to TGF- β 1.

Huh7 cells transfected with siRNA control (siCtr) or two independent Smad4 siRNAs were seeded on mixed matrix and treated or not with TGF- β 1. Protein extracts were then analyzed by immunoblotting to determine Smad4, LOXL2 (cell extract or supernatant) and DDR1 protein expression. GAPDH is used as a loading control. Three independent experiments were realized and quantified to demonstrate the importance of Smad4 in LOXL2 and DDR1 overexpression following TGF- β 1 treatment. Values are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. ns, not statically significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, P

< 0.001 ; as compared with the control siRNA condition with or not TGF- β 1 respectively.

Figure 3

Hepatocellular carcinoma cells form linear invadosomes.

Huh7 cells were cultured on gelatin (top) or on a mixed matrix (gelatin/collagen I) (middle and bottom) overnight. (A, Left panel) Quantification of the percentage of Huh7 and Hep3B cells exhibiting invadosomes on gelatin or on gelatin/collagen I mixed matrix. (A, Right panel, top and middle) Representative confocal images of Tks5 (green), F-actin (red) and nucleus (blue) staining in Huh7 cells are shown (A, Right panel, bottom) Confocal images of linear invadosomes (Tks5, green) along collagen I fibrils (red). Bars: 10 μ m. Right panels show a zoom of white squares.

Huh7 cells were cultured on fluorescent gelatin for 24 h in presence or absence of type I collagen. (B, Left panel) Quantification of the degradation capacity of Huh7 cells depending on the substrate. Values are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments.

***, $P < 0.001$ as compared with plating on gelatin. (B, Right panel) Representative confocal images of degradation area (black) are shown. Gelatin (grey), Tks5 (green) and type I collagen (red). Bar: 10 μ m. Right panels show a zoom of black squares.

Figure 4

TGF- β 1 treatment promotes linear invadosome formation and activity through DDR1.

Huh7 cells were cultured on gelatin or on a mixed matrix, treated or not with TGF- β 1 overnight. (A, Left panel) Quantification of the percentage of cells exhibiting invadosomes on gelatin versus gelatin/collagen I matrices. (A, Right panel) Representative confocal images of Tks5 (green), F-actin (red) and nucleus (blue) are shown. Bar, 10 μ m. Right panels show a zoom of white squares (X5).

Huh7 cells were cultured on fluorescent gelatin and type I collagen for 24 h, treated or not with TGF- β 1. (B, Right panel) Quantification of the degradation capacity of Huh7 cells upon TGF- β 1 treatment. (B, Left panel) Representative confocal images of degradation area (black) are shown. Gelatin (grey), Tks5 (green) and collagen I (red). Bar: 10 μ m. Right panels show a zoom of black squares.

Huh7 cells transfected with siRNA control (siCtr) or two independent DDR1 siRNAs were seeded on mixed matrix and treated or not with TGF- β 1. (C, Left panel, top) Protein extracts were then analyzed by immunoblotting to determine DDR1 protein expression. GAPDH is used as a loading control. (C, Right panel, top) Three independent experiments were realized and quantified. (C, Left panel, bottom) Quantification of the percentage of cells exhibiting linear invadosomes. (C, Right panel, bottom). Representative confocal images of Tks5 (green) stainings are shown. Bar: 5 μ m. (A-C) Values are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. ns, not statically significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; as compared with the control siRNA condition with or not TGF- β 1 respectively.

Figure 5

Cross-linking of type I collagen fibrils induces an increase in fibril thickness and enhances the formation of linear invadosomes in Huh7 cells.

Representative confocal images of fluorescent type I collagen fibrils cross-linked with glutaraldehyde 0.5%, conditioned medium or recombinant LOXL2. Bar: 10 μ m.

Quantification of linear invadosome formation in Huh7 cells seeded on type I collagen fibrils with or without type I collagen crosslinking agents. Values are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. ***, $P < 0.001$.

Figure 6

Schematic representation of TGF- β 1 action mode on the modulation of invasiveness and matrix stiffness in HCC cells.

The activation of TGF- β 1 pathway leads to nuclear translocation of Smad4 and upregulation of mRNAs and protein levels of DDR1, collagen I, LOXL2 and MT1-MMP. Altogether, this model

highlights the importance of TGF- β 1 pathway in the modulation of invasion and metastasis formation in HCCs.

Supplemental figures

Supplemental figure 1

TGF- β 1 treatment efficiency analysis

Huh7 cells were treated or not with TGF- β 1 between 30 min to 24h. A subcellular fractioning was then performed allowing the separation of the nucleus part from the cytosolic part. Protein extracts were then analyzed by immunoblotting to determine the subcellular localization of Smad4 depending on the TGF- β 1 treatment. Lamin A and tubulin are used as specific loading controls for the nucleus part and the cytosolic part respectively.

Huh7 cells were treated or not with TGF- β 1. After 48hours, E-Cadherin, vimentin, Zeb1 and Zeb2 mRNA were analyzed by qRT-PCR.

Supplemental figure 2

TGF- β 1 treatment induces DDR1 expression independently of Erk and Akt pathways activation

Hep3B cells were treated or not with TGF- β 1. After 48hours, DDR1, LOXL2, MT1- MMP and COL1A1 mRNA expression were analyzed by qRT-PCR.

Hep3B cells were treated or not with TGF- β 1 for 4 days. Protein extracts were then analyzed by immunoblotting to determine DDR1, LOXL2 (cell extract or supernatant) protein expression. GAPDH is used as a loading control.

Huh7 cells were treated or not with TGF- β 1. After 48h, 72h or 96h proteins were extracted and immunoblotted to determine DDR2 and Tks5 protein expression. GAPDH is used as a loading control.

Huh7 cells were treated or not with 3ng/ml TGF- β 1 between 6h and 24h. Protein extracts were then analyzed by immunoblotting to determine Erk, pErk, Akt and pAkt protein expression.

Acknowledgements

E. Henriot is supported by a PhD from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Z. Ezzoukhry is supported by a fellowship from ANR-13-JJC-JSV1-0005, Léo Piquet is supported by SIRIC Brio. We thank Gaëlle Lachiver for technical support. This work is supported by grants from ANR-13-JJC-JSV1-0005, SIRIC BRIO and La Ligue Nationale contre le Cancer. V Moreau and F Saltel are supported by fundings from Equipe Labellisée, Ligue Nationale contre le Cancer 2016. Jessica Zucman-Rossi's is funded by Ligue Nationale Contre le Cancer, "Equipe labellisée". F Saltel is supported by Institut National du Cancer (INCa, PLBIO 2015).

References

- Alexander, N.R., Branch, K.M., Parekh, A., Clark, E.S., Iwueke, I.C., Guelcher, S.A., Weaver, A.M., 2008. Extracellular matrix rigidity promotes invadopodia activity. *Curr Biol* 18, 1295-1299.
- Chetoui, N., El Azreq, M.A., Boisvert, M., Bergeron, M.E., Aoudjit, F., 2011. Discoidin domain receptor 1 expression in activated T cells is regulated by the ERK MAP kinase signaling pathway. *J Cell Biochem* 112, 3666-3674.
- Collin, O., Na, S., Chowdhury, F., Hong, M., Shin, M.E., Wang, F., Wang, N., 2008. Self-organized podosomes are dynamic mechanosensors. *Curr Biol* 18, 1288-1294.
- Collin, O., Tracqui, P., Stephanou, A., Usson, Y., Clement-Lacroix, J., Planus, E., 2006. Spatiotemporal dynamics of actin-rich adhesion microdomains: influence of substrate flexibility. *J Cell Sci* 119, 1914-1925.
- Cox, T.R., Bird, D., Baker, A.M., Barker, H.E., Ho, M.W., Lang, G., Erler, J.T., 2013. LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis. *Cancer Res* 73, 1721-1732.
- Cutroneo, K.R., 2003. How is Type I procollagen synthesis regulated at the gene level during tissue fibrosis. *J Cell Biochem* 90, 1-5.
- Di Martino, J., Henriot, E., Ezzoukhry, Z., Goetz, J.G., Moreau, V., Saltel, F., 2016. The microenvironment controls invadosome plasticity. *J Cell Sci*.
- Di Martino, J., Moreau, V., Saltel, F., 2015. Type I collagen fibrils: an inducer of invadosomes. *Oncotarget* 6, 28519-28520.
- Dooley, S., ten Dijke, P., 2012. TGF-beta in progression of liver disease. *Cell Tissue Res* 347, 245-256.
- Ezzoukhry, Z., Louandre, C., Francois, C., Saidak, Z., Godin, C., Maziere, J.C., Galmiche, A., 2011. The Bcl-2 homology domain 3 (BH3) mimetic ABT-737 reveals the dynamic regulation of bad, a proapoptotic protein of the Bcl-2 family, by Bcl-xL. *Mol Pharmacol* 79, 997-1004.
- Fransvea, E., Angelotti, U., Antonaci, S., Giannelli, G., 2008. Blocking transforming growth factor-beta up-regulates E-cadherin and reduces migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 47, 1557-1566.
- Fransvea, E., Mazzocca, A., Antonaci, S., Giannelli, G., 2009. Targeting transforming growth factor (TGF)-betaRI inhibits activation of beta1 integrin and blocks vascular invasion in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 49, 839-850.
- Garcia-Trevijano, E.R., Iraburu, M.J., Fontana, L., Dominguez-Rosales, J.A., Auster, A., Covarrubias-Pinedo, A., Rojkind, M., 1999. Transforming growth factor beta1 induces the

expression of alpha1(I) procollagen mRNA by a hydrogen peroxide-C/EBPbeta-dependent mechanism in rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 29, 960-970.

Giannelli, G., Villa, E., Lahn, M., 2014. Transforming growth factor-beta as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 74, 1890-1894.

Grise, F., Sena, S., Bidaud-Meynard, A., Baud, J., Hiriart, J.B., Makki, K., Dugot-Senant, N., Staedel, C., Bioulac-Sage, P., Zucman-Rossi, J., Rosenbaum, J., Moreau, V., 2012. Rnd3/RhoE Is down-regulated in hepatocellular carcinoma and controls cellular invasion. *Hepatology* 55, 1766-1775.

Ito, N., Kawata, S., Tamura, S., Takaishi, K., Shirai, Y., Kiso, S., Yabuuchi, I., Matsuda, Y., Nishioka, M., Tarui, S., 1991. Elevated levels of transforming growth factor beta messenger RNA and its polypeptide in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 51, 4080-4083.

Jian, Z.X., Sun, J., Chen, W., Jin, H.S., Zheng, J.H., Wu, Y.L., 2012. Involvement of discoidin domain 1 receptor in recurrence of hepatocellular carcinoma by genome-wide analysis. *Med Oncol* 29, 3077-3082.

Juin, A., Billottet, C., Moreau, V., Destaing, O., Albiges-Rizo, C., Rosenbaum, J., Genot, E., Saltel, F., 2012. Physiological type I collagen organization induces the formation of a novel class of linear invadosomes. *Mol Biol Cell* 23, 297-309.

Juin, A., Di Martino, J., Leitinger, B., Henriët, E., Gary, A.S., Paysan, L., Bomo, J., Baffet, G., Gauthier-Rouviere, C., Rosenbaum, J., Moreau, V., Saltel, F., 2014. Discoidin domain receptor 1 controls linear invadosome formation via a Cdc42-Tuba pathway. *J Cell Biol* 207, 517-533.

Juin, A., Planus, E., Guillemot, F., Horakova, P., Albiges-Rizo, C., Genot, E., Rosenbaum, J., Moreau, V., Saltel, F., 2013. Extracellular matrix rigidity controls podosome induction in microvascular endothelial cells. *Biol Cell* 105, 46-57.

Kai, F., Laklai, H., Weaver, V.M., 2016. Force Matters: Biomechanical Regulation of Cell Invasion and Migration in Disease. *Trends Cell Biol*.

Karaman, B., Battal, B., Sari, S., Verim, S., 2014. Hepatocellular carcinoma review: current treatment, and evidence-based medicine. *World J Gastroenterol* 20, 18059-18060.

Labernadie, A., Bouissou, A., Delobelle, P., Balor, S., Voituriez, R., Proag, A., Fourquaux, I., Thibault, C., Vieu, C., Poincloux, R., Charriere, G.M., Maridonneau-Parini, I., 2014. Protrusion force microscopy reveals oscillatory force generation and mechanosensing activity of human macrophage podosomes. *Nat Commun* 5, 5343.

Lamouille, S., Xu, J., Derynck, R., 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 178-196.

Leask, A., Abraham, D.J., 2004. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 18, 816-827.

Leitinger, B., 2014. Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. *Int Rev Cell Mol Biol* 310, 39-87.

Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N., Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., Yamauchi, M., Gasser, D.L., Weaver, V.M., 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139, 891-906.

Linder, S., Wiesner, C., 2015. Feel the force: Podosomes in mechanosensing. *Exp Cell Res*.

Linder, S., Wiesner, C., Himmel, M., 2011. Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 185-211.

Mader, C.C., Oser, M., Magalhaes, M.A., Bravo-Cordero, J.J., Condeelis, J., Koleske, A.J., Gil-Henn, H., 2011. An EGFR-Src-Arg-cortactin pathway mediates functional maturation of invadopodia and breast cancer cell invasion. *Cancer Res* 71, 1730-1741.

Mahara, K., Kato, J., Terui, T., Takimoto, R., Horimoto, M., Murakami, T., Mogi, Y., Watanabe, N., Kohgo, Y., Niitsu, Y., 1994. Transforming growth factor beta 1 secreted from scirrhous gastric cancer cells is associated with excess collagen deposition in the tissue. *Br J Cancer* 69, 777-783.

Mandal, S., Johnson, K.R., Wheelock, M.J., 2008. TGF-beta induces formation of F-actin cores and matrix degradation in human breast cancer cells via distinct signaling pathways. *Exp Cell Res* 314, 3478-3493.

Mata, R., Palladino, C., Nicolosi, M.L., Lo Presti, A.R., Malaguarnera, R., Ragusa, M., Sciortino, D., Morrione, A., Maggiolini, M., Vella, V., Belfiore, A., 2016. IGF-I induces upregulation of DDR1 collagen receptor in breast cancer cells by suppressing MIR-199a-5p through the PI3K/AKT pathway. *Oncotarget* 7, 7683-7700.

Neuzillet, C., de Gramont, A., Tijeras-Raballand, A., de Mestier, L., Cros, J., Faivre, S., Raymond, E., 2014. Perspectives of TGF-beta inhibition in pancreatic and hepatocellular carcinomas. *Oncotarget* 5, 78-94.

Osiak, A.E., Zenner, G., Linder, S., 2005. Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Exp Cell Res* 307, 342-353.

Parekh, A., Weaver, A.M., 2015. Regulation of invadopodia by mechanical signaling. *Exp Cell Res*.

Park, H.S., Kim, K.R., Lee, H.J., Choi, H.N., Kim, D.K., Kim, B.T., Moon, W.S., 2007. Overexpression of discoidin domain receptor 1 increases the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells in association with matrix metalloproteinase. *Oncol Rep* 18, 1435-1441.

Park, J.W., Lee, Y.S., Kim, J.S., Lee, S.K., Kim, B.H., Lee, J.A., Lee, N.O., Kim, S.H., Hong, E.K., 2015. Downregulation of discoidin domain receptor 2 decreases tumor growth of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 141, 1973-1983.

Parry, D.A., Barnes, G.R., Craig, A.S., 1978. A comparison of the size distribution of collagen fibrils in connective tissues as a function of age and a possible relation between fibril size distribution and mechanical properties. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 203, 305-321.

- Pickup, M.W., Mouw, J.K., Weaver, V.M., 2014. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep* 15, 1243-1253.
- Pignatelli, J., Tumbarello, D.A., Schmidt, R.P., Turner, C.E., 2012. Hic-5 promotes invadopodia formation and invasion during TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 197, 421-437.
- Ramaswamy, S., Ross, K.N., Lander, E.S., Golub, T.R., 2003. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 33, 49-54.
- Rottiers, P., Saltel, F., Daubon, T., Chaigne-Delalande, B., Tridon, V., Billottet, C., Reuzeau, E., Genot, E., 2009. TGFbeta-induced endothelial podosomes mediate basement membrane collagen degradation in arterial vessels. *J Cell Sci* 122, 4311-4318.
- Seals, D.F., Azucena, E.F., Jr., Pass, I., Tesfay, L., Gordon, R., Woodrow, M., Resau, J.H., Courtneidge, S.A., 2005. The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer Cell* 7, 155-165.
- Shen, Q., Cicinnati, V.R., Zhang, X., Jacob, S., Weber, F., Sotiropoulos, G.C., Radtke, A., Lu, M., Paul, A., Gerken, G., Beckebaum, S., 2010. Role of microRNA-199a-5p and discoidin domain receptor 1 in human hepatocellular carcinoma invasion. *Mol Cancer* 9, 227.
- Shirai, Y., Kawata, S., Tamura, S., Ito, N., Tsushima, H., Takaishi, K., Kiso, S., Matsuzawa, Y., 1994. Plasma transforming growth factor-beta 1 in patients with hepatocellular carcinoma. Comparison with chronic liver diseases. *Cancer* 73, 2275-2279.
- van Zijl, F., Mair, M., Csiszar, A., Schneller, D., Zulehner, G., Huber, H., Eferl, R., Beug, H., Dolznig, H., Mikulits, W., 2009. Hepatic tumor-stroma crosstalk guides epithelial to mesenchymal transition at the tumor edge. *Oncogene* 28, 4022-4033.
- Varon, C., Tatin, F., Moreau, V., Van Obberghen-Schilling, E., Fernandez-Sauze, S., Reuzeau, E., Kramer, I., Genot, E., 2006. Transforming growth factor beta induces rosettes of podosomes in primary aortic endothelial cells. *Mol Cell Biol* 26, 3582-3594.
- Wong, C.C., Tse, A.P., Huang, Y.P., Zhu, Y.T., Chiu, D.K., Lai, R.K., Au, S.L., Kai, A.K., Lee, J.M., Wei, L.L., Tsang, F.H., Lo, R.C., Shi, J., Zheng, Y.P., Wong, C.M., Ng, I.O., 2014. Lysyl oxidase-like 2 is critical to tumor microenvironment and metastatic niche formation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 60, 1645-1658.
- Xie, B., Lin, W., Ye, J., Wang, X., Zhang, B., Xiong, S., Li, H., Tan, G., 2015. DDR2 facilitates hepatocellular carcinoma invasion and metastasis via activating ERK signaling and stabilizing SNAIL1. *J Exp Clin Cancer Res* 34, 101.
- Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J.C., Llovet, J.M., 2015. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 149, 1226-1239 e1224.

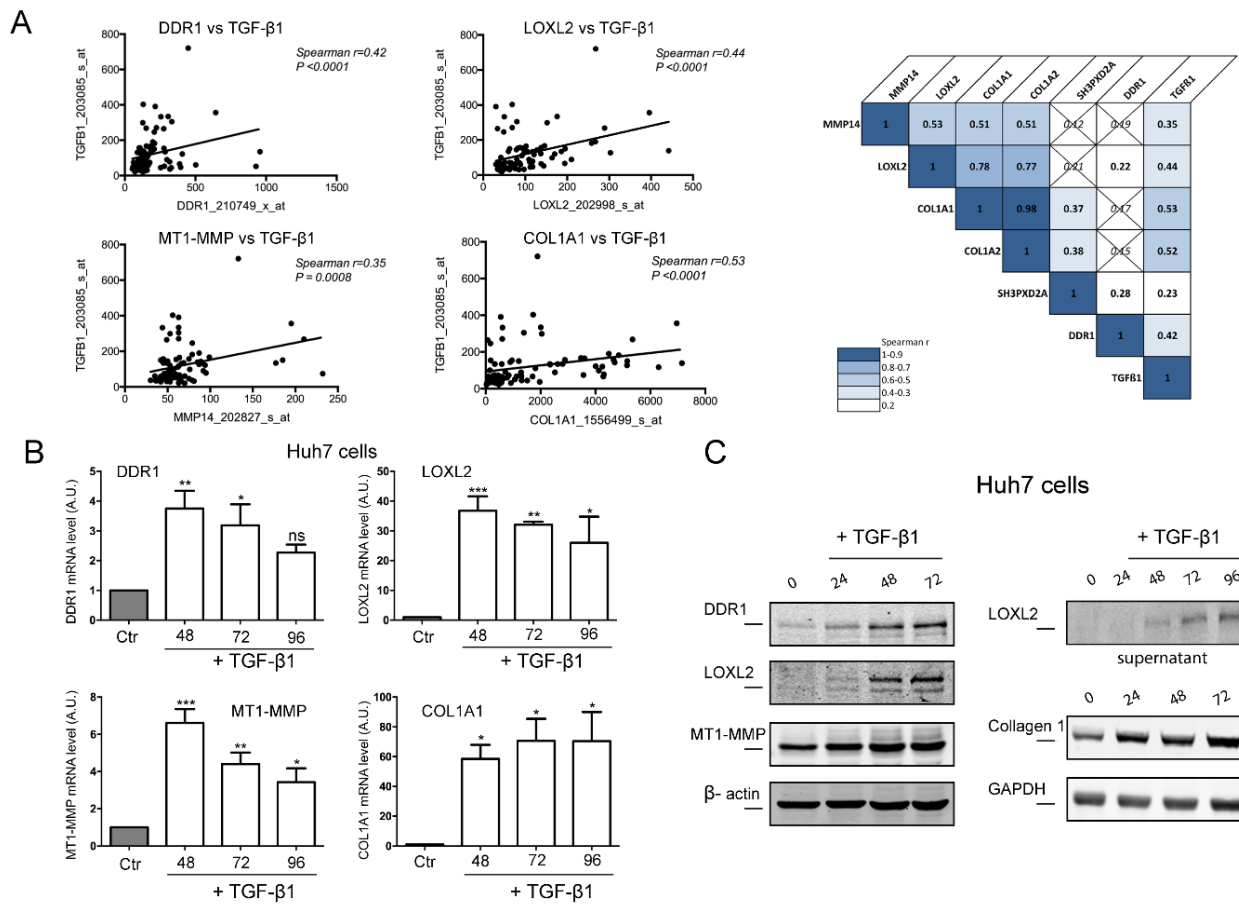
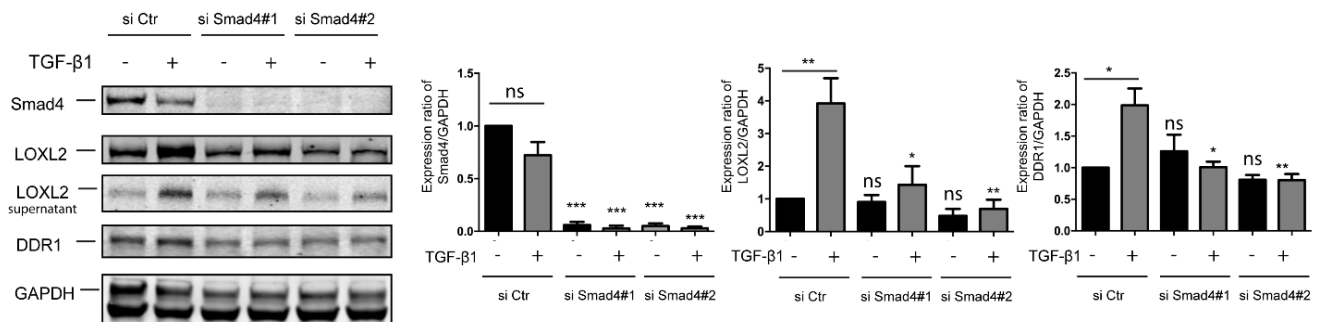
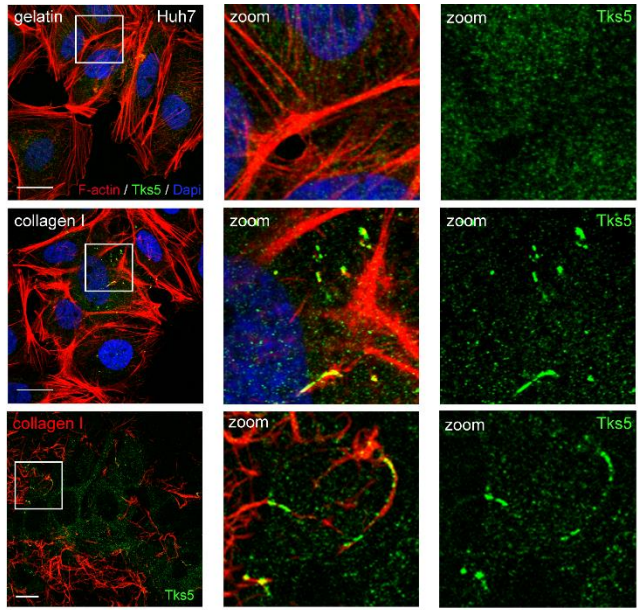
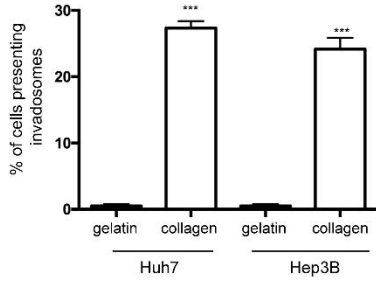


Figure 1:



A



B

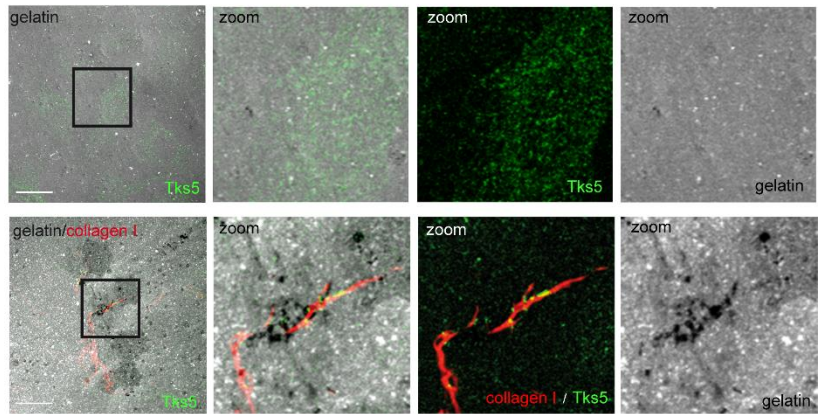
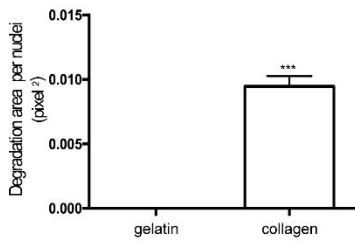


Figure 3:

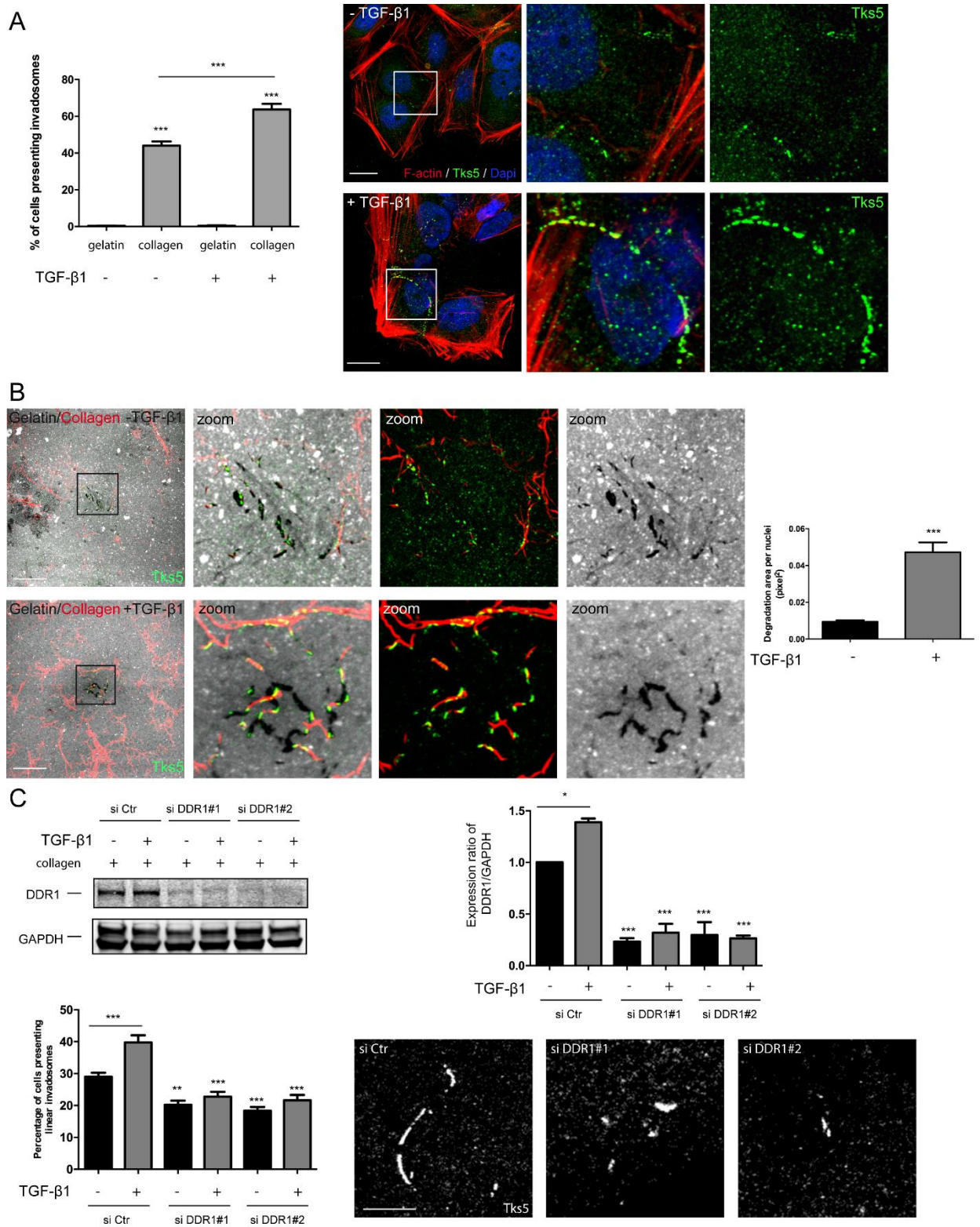


Figure 4:

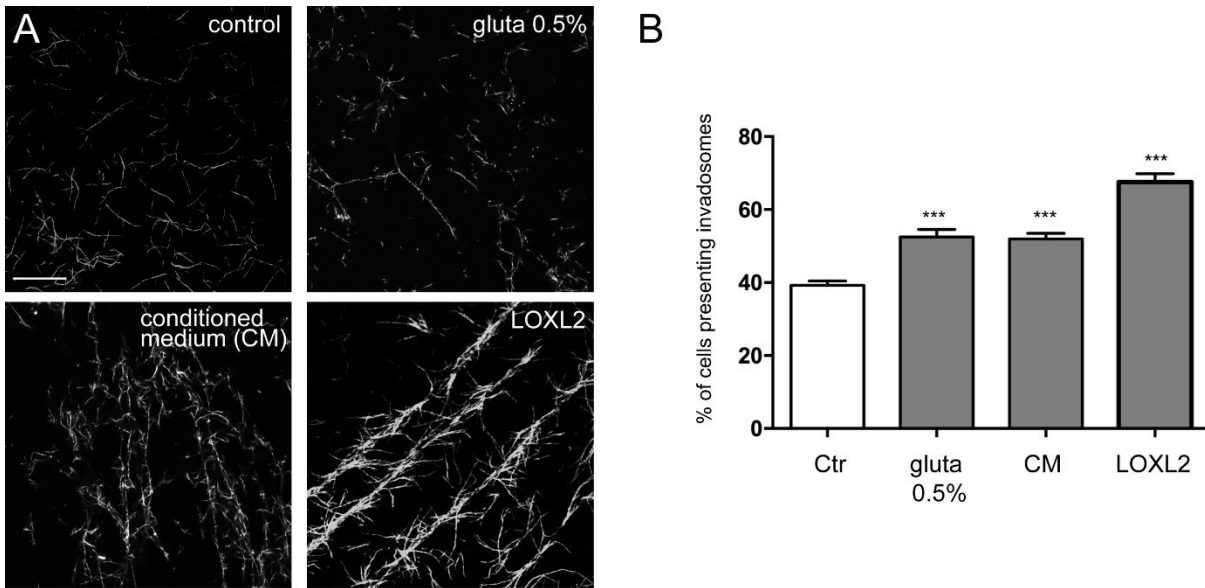


Figure 5:

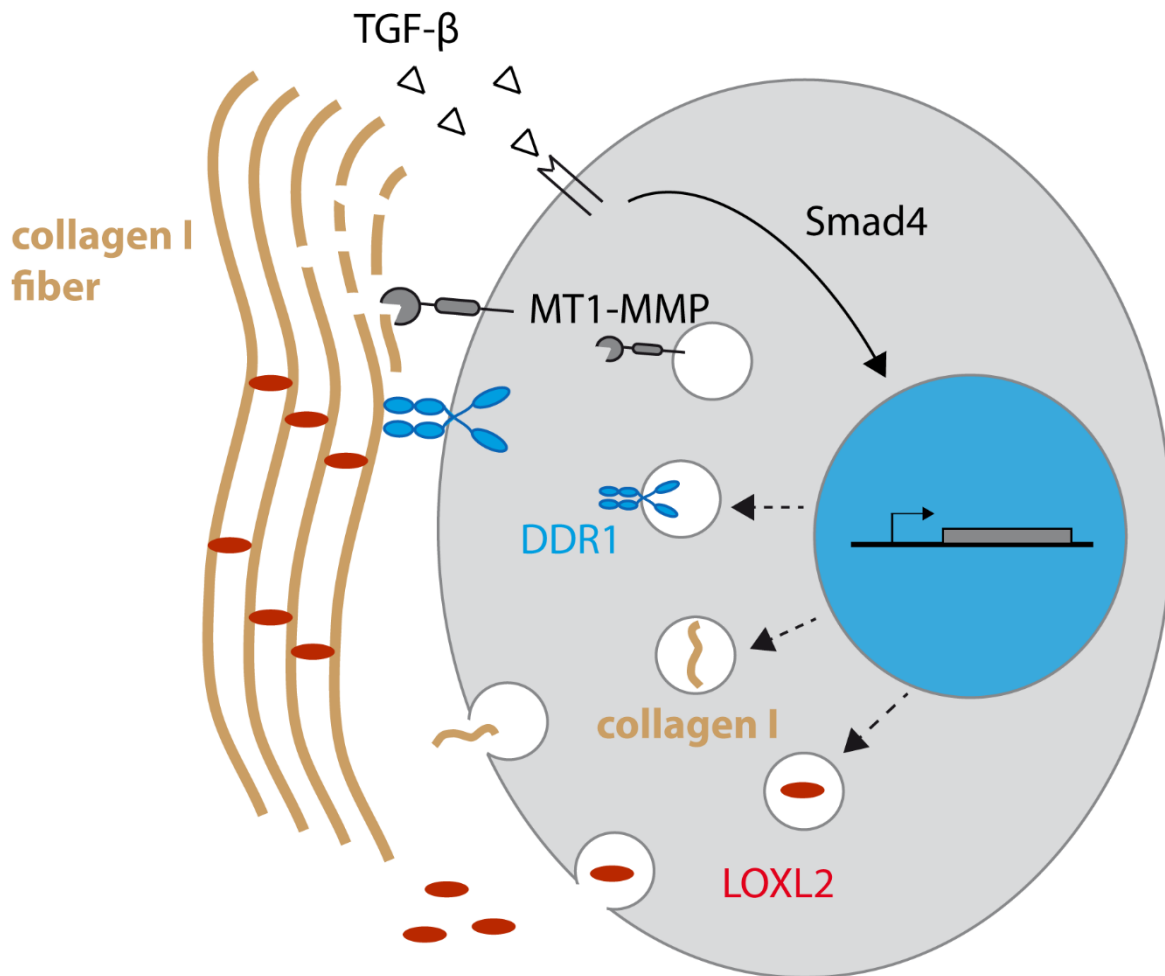


Figure 6

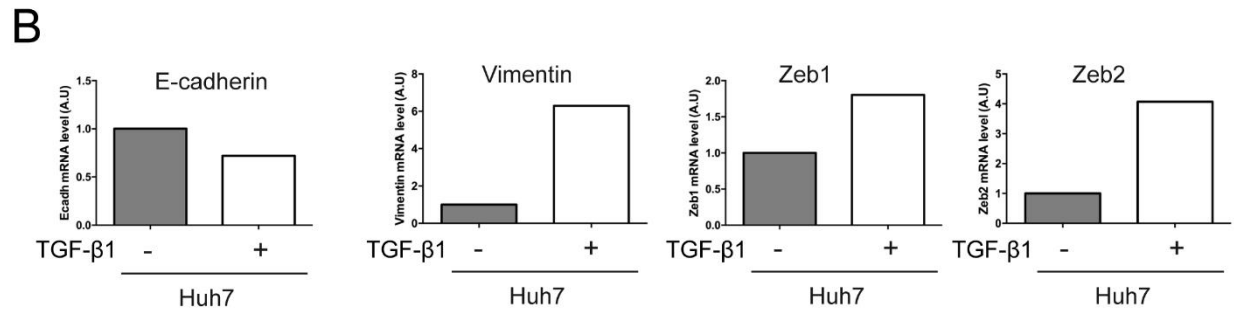
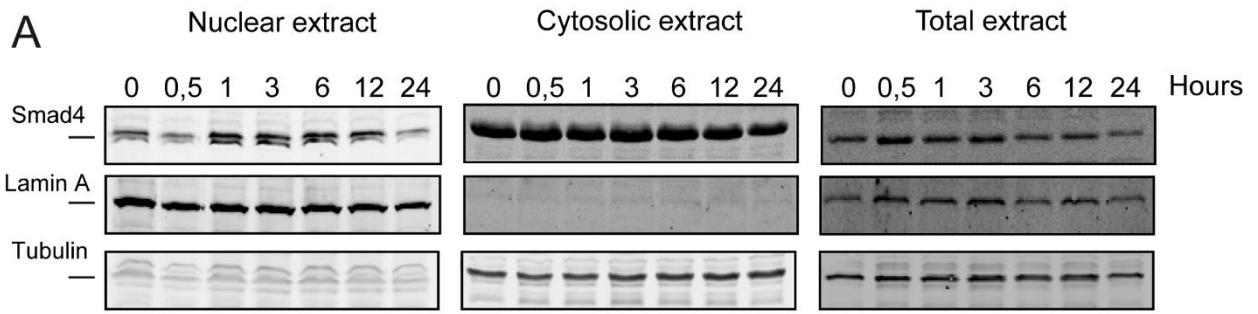


Figure sup1:

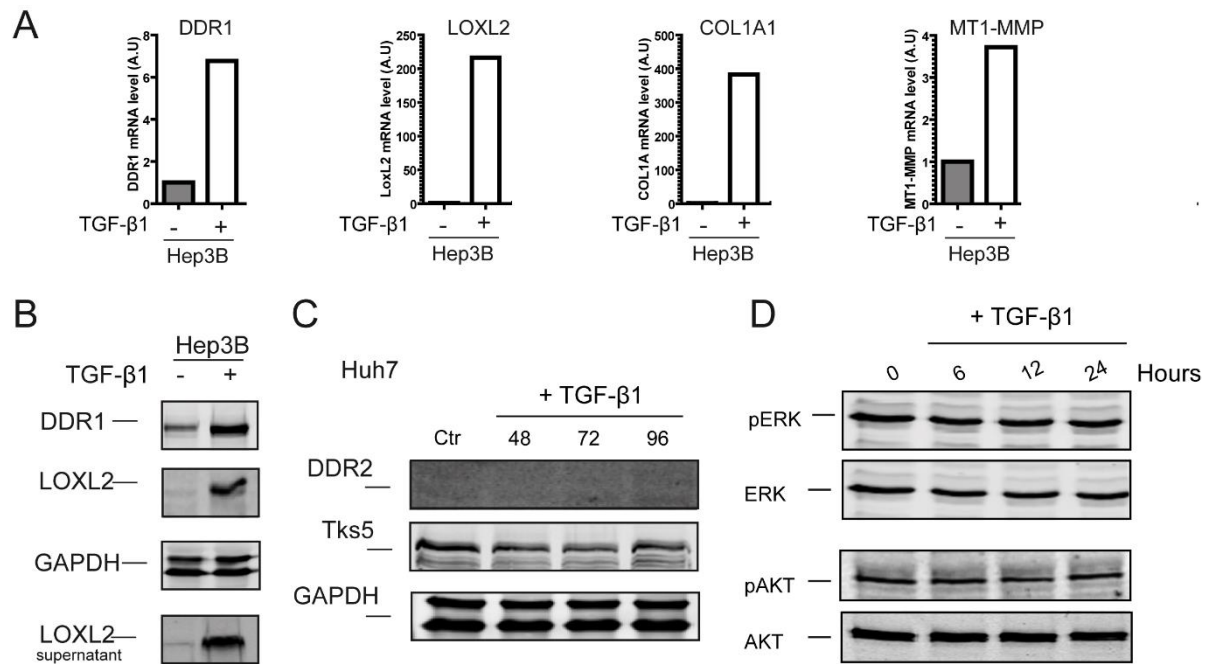


Figure sup2:

Participation à des congrès

2016: Présentation d'un poster. Journée scientifique de l'Ecole Doctorale, Arcachon, FRANCE.

Regulation of Rnd3 expression in tumor cells

2015: Communication orale. Journée scientifique du SIRIC Brio, Bordeaux, FRANCE.

Rnd3/RhoE: a novel target of β -catenin signalling in hepatocellular carcinoma cells.

2015: Présentation d'un poster. Congrès international: integrated mechano-chemical signals in invasion, Nice, FRANCE.

The mechanotransduction pathway MAL/SRF and its new target Rnd3/RhoE are involved in invadosome function

2014: Présentation d'un poster. Congrès international: Building the Cell, Paris, FRANCE

Rnd3/RhoE: a novel target of β -catenin signalling in hepatocellular carcinoma cells.

2014: International Workshop on 3D cell culture, Bordeaux, FRANCE