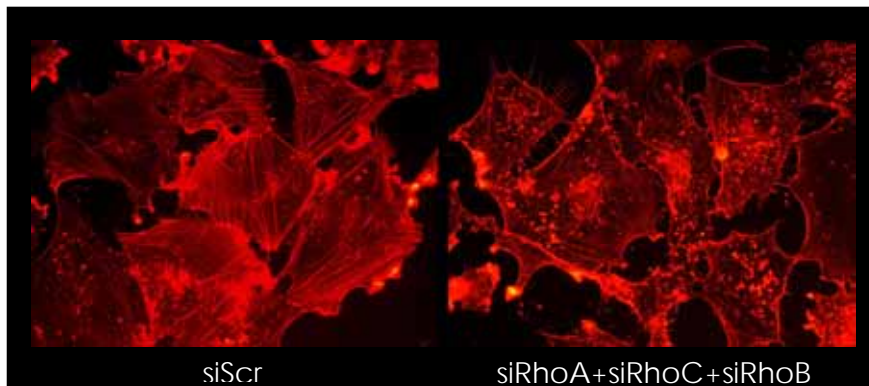

LABORATOIRE DE BIOLOGIE DES TISSUS CONJONCTIFS
Professeur B. Nusgens
Docteur C. Deroanne

**Evaluation du rôle des RhoGTPases dans la
croissance tumorale in vitro et in vivo par les
ARN interférentiels**



Marquage des fibres de stress par la phalloidine-TRITC

HO Thi Thanh Giang

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques**

Remerciements

Je souhaiterais au terme de ce travail adresser mes remerciements à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à son aboutissement.

En premier lieu, je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance au Pr Betty Nusgens pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Biologie des Tissus Conjonctifs et pour m'avoir permis de mener à bien ce projet de recherche. Son savoir étendu, sa rigueur scientifique mais aussi son extrême gentillesse et son soutien pendant les moments difficiles m'ont aidée à progresser. En outre, elle a su créer une excellente ambiance de travail très appréciée.

Je tiens également à remercier du fond du cœur le Dr Christophe Deroanne qui a co-dirigé cette thèse. Ses connaissances approfondies, sa précision, son sens du détail, sa détermination, sa motivation sans oublier ses qualités humaines m'ont sans aucun doute amenée à ce stade. Un très très grand merci à toi Christophe !

Je remercie aussi feu le Pr Charles Lapière pour ses questions et critiques toujours extrêmement constructives, le Pr Alain Colige qui a récemment repris avec brio les rennes du laboratoire et le Dr Charlie Lambert pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail ainsi que les remarques suscitées, pertinentes mais jamais dénuées d'humour.

Un énorme merci également à Antoine Heyeres (Tony ou Toto), Marie-Jeanne Nix, Audrey Hoffmann (Cocotte) et Georgette Réga pour l'aide qu'ils m'ont apportée pour les extractions d'ARN, les RT-PCR, l'histologie et la culture cellulaire. Merci pour votre disponibilité et votre gentillesse.

J'ai eu de nombreux fous rires tout au long de ce travail. Je dois ces moments inoubliables à plusieurs personnes. Merci à Pierre pour l'ambiance « calme et apaisante » du bureau, Thibaut pour le « total look » par temps

ensoleillé, Audrey S. pour son imagination débordante et la grande soirée du Cœur (ancrée pour toujours dans ma mémoire), Alexia pour les Dinos et l'art de bien servir (miam miam), Johanne pour les innombrables fois où restées les dernières (on a pourtant essayé) elle m'a servi de taxi, Cocotte et Audrey C. pour ce mémorable concert d'Indoo (forever...Cool !!!) et Werchter, Audrey ON pour m'avoir appris qu'on peut bien travailler sur une surface de 20 sur 25 cm ou moins, Victor pour son humour et l'initiation à l'horaire camerounais, Nancy pour ses répliques cinglantes et le congrès à Barcelone ainsi que Romain qui, à peine arrivé m'a montré ce qu'était un bô goss. Je remercie également Bissan pour les friandises, Fred pour l'aide informatique, Eric, Lionel et Zakia.

Merci aussi à Christine pour son professionnalisme (pro des commandes en tout genre !) et sa bonne humeur.

Enfin, je tiens à remercier ma famille et mes amis pour leur soutien inconditionnel (Papa qui n'est malheureusement plus là pour lire ce mémoire, Maman, Lan, Kresh, mes beaux-parents, Muriel, Sandrine P., Catherine, Sandrine D., Céline et les autres).

En dernier lieu, un million de fois merci à JF pour me supporter au quotidien !

Ce travail a été financé par le F.R.I.A., le Télévie, Belspo/Prodex et le Fonds Léon Frédéricq.

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	3
Liste des abréviations	5
Introduction générale	8
I. Les RhoGTPases	8
1. Généralités	8
2. Organisation de la famille des RhoGTPases.	10
3. Cycle d'activation des RhoGTPases	11
4. Cas des RhoGTPases atypiques	12
5. Régulation de l'activité des RhoGTPases	12
5.1. Contrôle de la liaison aux nucléotides par les GEFs et de l'hydrolyse par les GAPs	13
5.2. Régulation de la localisation subcellulaire : modifications post-traductionnelles et rôle des GDIs	15
5.3. Modulation du niveau d'expression des RhoGTPases	17
6. Fonctions des RhoGTPases	18
6.1. Régulation du cytosquelette d'actine	18
6.1.1. Polymérisation de l'actine	19
6.1.2. Polymérisation de l'acto-myosine et organisation des fibres de stress	21
6.2. Contrôle de la dynamique du cytosquelette de microtubules	22
6.3. Formation des adhésions focales	24
6.4. Régulation de la migration	24
6.5. Contrôle du trafic vésiculaire	26
6.6. Régulation du cycle cellulaire	27
6.7. Modulation de l'expression génique	30
6.8. Analyse génétique des fonctions des RhoGTPases <i>in vivo</i>	32
6.8.1. Sous-famille Rac et effecteurs	32
6.8.2. Sous-famille Rho et effecteurs	32
6.8.3. Sous-famille Cdc42 et effecteurs	34
7. RhoGTPases et cancer	34
7.1. Rôle dans l'initiation et la croissance tumorale	37
7.2. Rôle dans la progression tumorale, contribution à l'invasion et à la migration tumorale	39
II. Les petits ARN interférentiels	41
Buts et plan du travail	45
Résultats : Partie I	47
Validation des siRNAs comme outils biologiques performants : évaluation du rôle des RhoGTPases dans les propriétés contractiles et migratoires des fibroblastes humains en relation avec l'organisation du cytosquelette.	47

Introduction	47
Résumé des résultats	48
Conclusions	50
Publication 1: Differential Differential modulation of migratory and contractile behaviour of fibroblasts by silencing RhoA, RhoC, Rac1 and Cdc42	51
Résultats : Partie II	63
Régulation négative de RhoB par ses homologues RhoA et RhoC via RhoGDI α	63
Introduction	63
Résumé des résultats	63
Conclusions	65
Publication 2: RhoA-GDP regulates RhoB protein stability.Potential involvement of RhoGDI α	67
Résultats : Partie III	85
Analyse des rôles respectifs de RhoA et RhoC dans le phénotype des cellules d'adénocarcinome prostatique	85
Introduction	85
Résumé des résultats	85
Conclusions	87
Publication 3: RhoC, but not RhoA, is involved in Prostate Cancer Cells tumorigenesis through GSK3beta-dependent regulation of NAG-1	88
Discussion générale	106
I. Intérêt des siRNA dans notre travail	106
II. Validation des outils utilisés	107
III. Régulation de RhoB	109
IV. Rôle de RhoC dans la tumorigenèse	115
Conclusions et perspectives	121
Bibliographie	124
Liste des publications personnelles	138

Liste des abréviations

Actine F: Actine filamenteuse
Actine G: Actine globulaire
Adénovirus E1A: Adenovirus early region 1A
ADF: Actin depolymerizing factor
ADN: Acide désoxyribonucléique
ADP: Adénosine diphosphate
ANOVA: Analysis of variance
AP-1: Activator protein-1
APC: Adenomatous polyposis coli
Arf: ADP ribosylation factor
ARNm: ARN messenger
ARN: Acide ribonucléique
Arp2/3: Actin related proteins
ATF-3 : Activating transcription factor-3
ATP: Adénosine triphosphate
BH: Breakpoint cluster region-homology
Cas: Crk associated substrate
CEBP β : CCAAT/enhancer-binding protein B
Cdc: Cell division cycle
CDK: Cyclin dependent kinase
CDM: Ced-5, Dock180 and Myoblast city
Chp: Cdc42 homologous protein
CIP/KIP: Cdk2 inhibiting protein/ kinase inhibiting protein
CIT: Citron kinase
CKI: Cyclin dependent kinase inhibitor
CLIP-170: Cytoplasmic linker protein
c-myc: Cellular myelocytomatosis
CPI-17: Protein-kinase C-potentiated myosin phosphatase inhibitor
CRK: CT10 Regulator of kinase protein
CTH : Cystathionase
CXCL1: CXC ligand
CZH: CDM and Zizimin homology
Dbl: Diffuse B cell Lymphoma
DH: Dbl homology
Dock180 : 180kD protein downstream of CRK
dsRNA: Double stranded RNA
EB1: End-binding protein 1
Ect2: Epithelial cell transforming sequence 2 oncogene
EGF : Epidermal growth factor
EGFP: Enhanced green fluorescent protein
Erk1,2: Extracellular signal-regulated kinase 1,2

ERM: Ezrin-radixin-moesin
EMT: Epithelial to mesenchymal transition
Etk: Epithelial and endothelial tyrosine kinase
ETS: Erythroblast transformation specific
FAK: Focal adhesion kinase
Fas: Apoptosis stimulating fragment
FGF: Fibroblast growth factor
GADD: Growth Arrest and DNA Damage inducible transcription factor
GAP: GTPase activating protein
GDI: Guanine nucleotide dissociation inhibitor
GDP : Guanosine diphosphate
GEF: Guanine nucleotide exchange factor
Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3 β : Glycogen synthase kinase 3 β
GTP : Guanosine triphosphate
HERPUD1: Homocysteine-inducible, Endoplasmic Reticulum stress-inducible, Ubiquitin-like Domain member 1
HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzyme A
Icmt: Isoprenylcystein carboxymethyltransferase
INK4: Inhibitor of Cdk4
IQGAP: IQ motif containing GTPase activating protein 1
JNK : Jun kinase
LARG: Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor
LIM: Lin11, Isl1 and Mec3
LIMK: LIM Kinase
Ly/D4GDI: Lymphoid restricted GDI
MAPK : Mitogen activated protein kinase
MAL: T-lymphocyte maturation-associated protein
MBS: Myosin binding subunit
mDia: Mammalian diaphanous-related formin
MgcRacGAP: Male germ cell Rac GAP
miRNA: Micro ribonucleic acid
Miro: Mitochondrial rho
MLC: Myosin light chain
MMP: Metalloproteinase
MTOC: Microtubules organizing centre
MYPT: Myosin phosphatase target subunit
NAG-1: Non steroidal anti-inflammatory drug activated gene-1
NF κ B: Nuclear factor κ B
Op18: Oncoprotein 18
PAK1: p21 activated kinase
Par6: Partitioning defective 6
PDZ: Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (DlgA), and zonula occludens-1 protein (zo-1)
PH: Pleckstrin homology
Phase G0/G1/G2: Phase Gap0/Gap1/Gap2

Phase S: Phase de synthèse
PIP₂: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP₃: Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PKC: Protein kinase C
PKA: Protein kinase A
pRb: Retinoblastoma protein
Rab: Ras-regulated in brain
Rac: Ras-related C3 botulinum toxin substrate
Ran: Ras-related nuclear protein
Ras: Rat sarcoma
Rce: Ras converting enzyme
Rho : Ras homolog
RhoBTB: Rho broad complex, tramtrack, bric-à-brac
RhoD: Ras homolog member D
RhoF: Ras homolog member F (in filopodia)
RhoG: Ras homolog growth related
RhoH: Ras homolog member H
RISC: RNA induced silencing complex
ROCK: Rho-associated coiled-coil-forming protein kinase
RT-PCR : Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SH3: Src homology
siRNA: Small interfering ribonucleic acid
Smurf: Smad ubiquitination regulatory factor 1
Souris PyV-mT: Souris polyoma virus middle T-antigen
SPARC: Secreted protein and rich in cystein
SRE : Serum response element
SRF : Serum response factor
TGFβ: Transforming growth factor β
Tiam1: T-cell lymphoma invasion and metastasis 1.
TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinases
TIPS: Microtubules plus endtracking proteins
TRIB3 : Tribbles Homolog 3
VEGF: Vascular endothelial growth factor
WASP : Wiskott-Aldrich syndrome proteins
WAVE: WASP family verprolin homologous
Wnt: Wingless integration site
Wrch: Wnt-1 regulated Cdc42 homolog-1
WT: Wild type
ZIPK: Zipper interacting protein kinase

Introduction générale

I. Les RhoGTPases

1. Généralités

La superfamille des GTPases Ras comprend plus de 150 membres chez les mammifères. Ces protéines de petit poids moléculaire ont été mises en évidence chez tous les organismes eucaryotes étudiés jusqu'à présent - de la levure aux mammifères - et sont vraisemblablement les protéines les plus conservées parmi les molécules impliquées dans la signalisation cellulaire (Boureaux *et al.* 2007). Elles interviennent dans de nombreuses voies de signalisation contrôlant la division cellulaire, l'apoptose, l'adhésion aux protéines de la matrice extracellulaire et la mécanotransduction, les interactions cellule-cellule et la migration (Wennerberg *et al.* 2005; ten Klooster *et al.* 2007). Des analyses par cristallographie et par résonance magnétique nucléaire de ces petites protéines ont révélé la présence d'un domaine catalytique unique pour tous les membres de cette superfamille. Ce domaine est constitué de cinq hélices α (A1-A5), six feuillets β (B1-B6) et cinq boucles polypeptidiques (G1-G5). Deux régions fonctionnelles y ont été mises en évidence : la région Switch I qui correspond à la boucle G2 et la région Switch II qui est formée de la boucle G3 et une partie de l'hélice A2 (Paduch *et al.* 2001). La plupart des protéines de la superfamille Ras agissent comme des interrupteurs moléculaires grâce à leurs interactions au niveau de la boucle polypeptidique G5 avec des

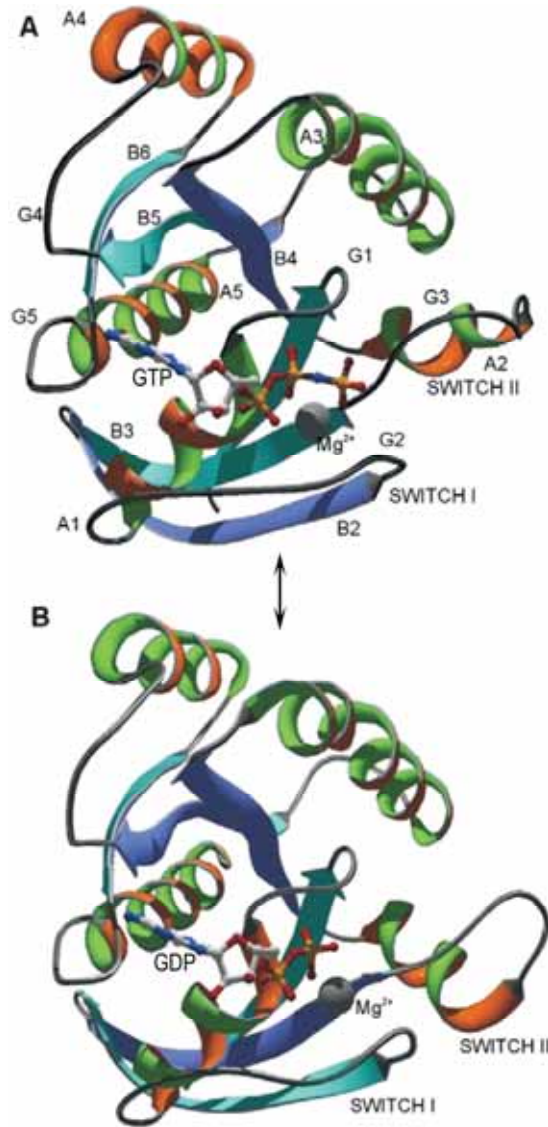


Figure 1 : Structure du domaine catalytique des protéines de la superfamille Ras (d'après Paduch et al. 2001). Ce domaine est constitué de cinq hélices α (A1-A5), six feuillets β (B1-B6) et cinq boucles polypeptidiques (G1-G5). Deux régions fonctionnelles y ont été mises en évidence : la région Switch I qui correspond à la boucle G2 et la région Switch II qui est formée de la boucle G3 et une partie de l'hélice A2 . **A.** Conformation de la protéine liée au GTP. **B.** Conformation de la protéine liée au GDP.

nucléotides guanidiques. En effet, ces protéines oscillent entre une conformation inactive lorsqu'elles sont liées au GDP (guanosine diphosphate) et une conformation active lors de l'échange de la molécule de GDP par un GTP (guanosine triphosphate) (Figure 1). Ce domaine est commun à tous les membres de cette superfamille mais aussi aux sous-unités α des protéines G hétérotrimériques.

La superfamille Ras se subdivise en 5 familles sur base de leur structure et/ou de leur fonction (Figure 2) (Wennerberg *et al.* 2005). La première famille comprend 36 membres et regroupe les oncoprotéines Ras intervenant dans le contrôle de l'expression génique, de la prolifération cellulaire, de la différenciation et de la survie (Repasky *et al.* 2004). Les protéines Rab font partie d'une deuxième famille dont les 61 membres participent à la régulation du transport vésiculaire et du trafic protéique entre les différentes organelles des voies endocytaires et sécrétoires (Fukuda 2008). Ran est le seul membre identifié d'une troisième famille et est connu pour son rôle dans le transport nucléocytoplasmique des ARN et des protéines (Weis 2003). La quatrième famille, Arf, se compose de protéines impliquées dans la régulation du transport vésiculaire (Memon 2004). Enfin, les protéines de la famille Rho, que nous détaillerons dans la suite de cette introduction jouent un rôle clé dans la régulation de l'organisation du cytosquelette, de la progression du cycle cellulaire et de l'expression génique (Etienne-Manneville *et al.* 2002).

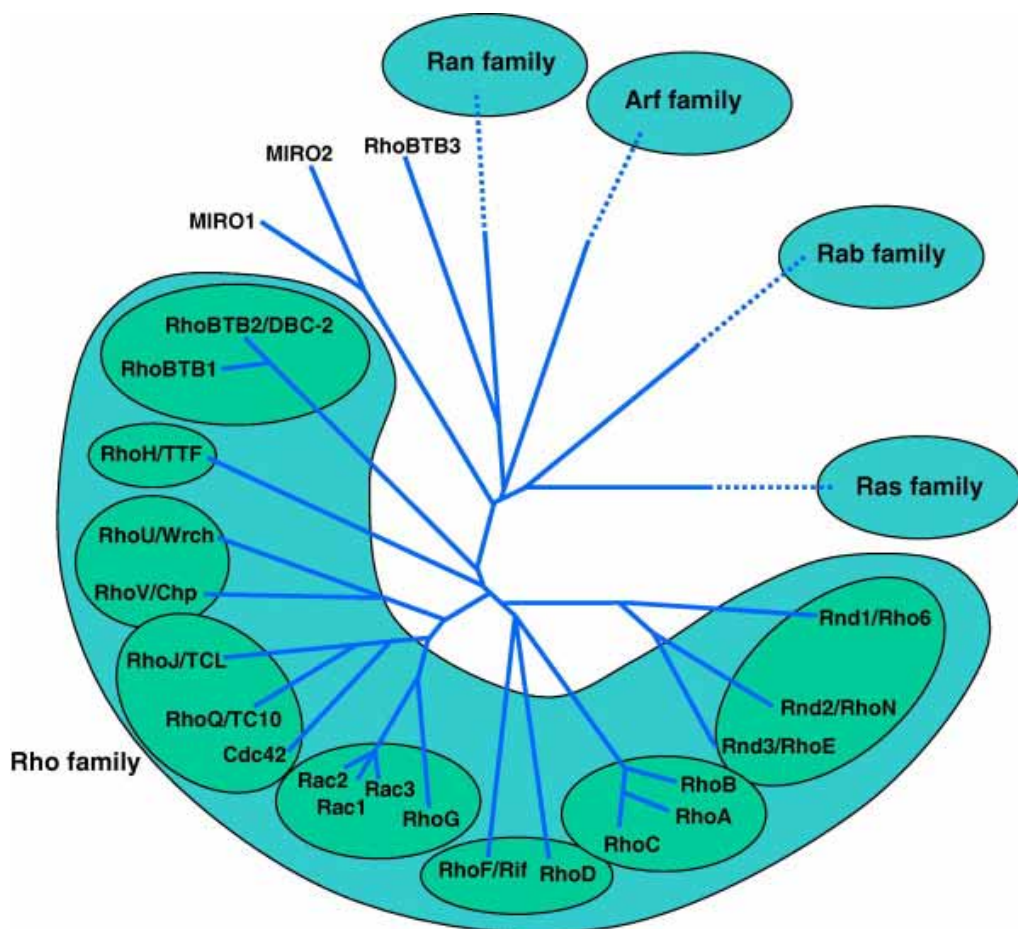


Figure 2 : Parmi la superfamille Ras, les RhoGTPases sont classées en huit sous-familles (Vega et al. 2008).

2. Organisation de la famille des RhoGTPases.

Les RhoGTPases, mises en évidence en 1985 (Madaule *et al.* 1985), se distinguent des autres GTPases de la superfamille Ras par un domaine d'insertion Rho-spécifique, situé entre les boucles G4 et G5, impliqué dans la liaison aux effecteurs et aux régulateurs. A l'instar des autres GTPases de la superfamille Ras, les RhoGTPases sont présentes aussi bien chez les eucaryotes inférieurs que chez les mammifères (Boureux *et al.* 2007). La famille des RhoGTPases comporte plus de vingt membres classés en huit sous-groupes en fonction de leur homologie en acides aminés (Figure 2). Il est à noter que de nombreux auteurs ont inclus, jusque très récemment, les petites GTPases Miro1, Miro2 et RhoBTB3 dans la famille des RhoGTPases. Elles ne sont désormais plus considérées comme membres de cette famille car leur structure ne contient pas de domaine d'insertion Rho, sont d'origine phylogénétique distincte et, de plus, présentent autant de similitudes avec la famille Rab qu'avec la famille Rho. Les RhoGTPases ont été initialement décrites comme étant impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine (Ridley *et al.* 1992; Ridley *et al.* 1992) mais il est maintenant prouvé qu'elles participent à bien d'autres voies de signalisation modulant la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'adhésion, la migration, la différenciation, l'expression génique et même le trafic vésiculaire. Les RhoGTPases les plus étudiées sont RhoA, Rac1 et Cdc42.

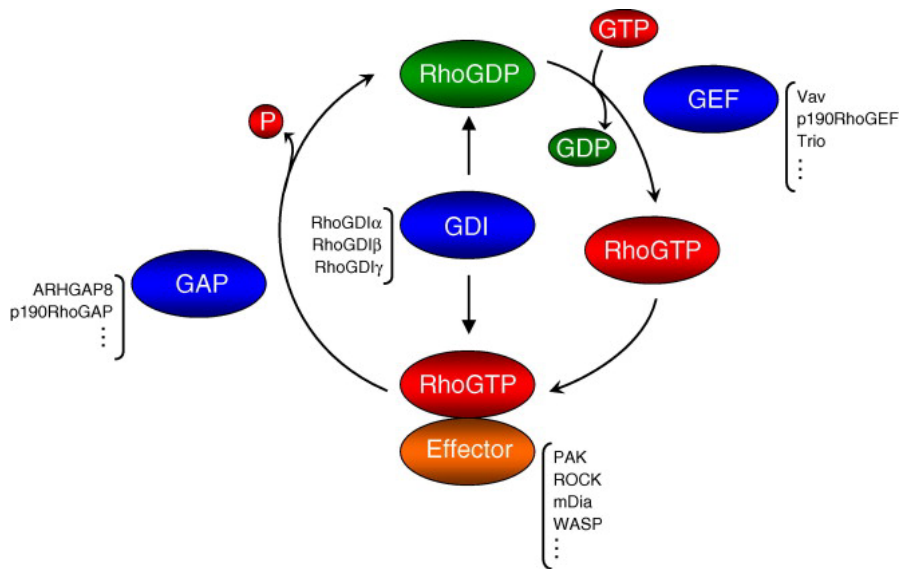


Figure 3 : Cycle d'activation des RhoGTPases (Vega et al. 2008).

Les RhoGTPases inactives sont liées au GDP et sont séquestrées dans le cytoplasme en association avec les GDIs. Divers signaux extracellulaires activent les GEFs et dissocient les complexes RhoGTPases-GDIs permettant l'ancrage des Rho à la membrane, via leur groupement prénylé, et l'échange du GDP par un GTP. Il se produit dès lors un changement de conformation favorisant l'interaction des RhoGTPases avec leurs effecteurs. Les GAPs stimulent l'activité GTPasique intrinsèque des Rho ramenant ces dernières à l'état inactif par hydrolyse du GTP en GDP.

3. Cycle d'activation des RhoGTPases

Comme nous l'avons décrit plus haut, la plupart des petites GTPases de la famille Rho agissent comme des interrupteurs moléculaires basculant d'un état inactif lorsqu'elles portent un GDP vers un état activé lorsqu'elles sont associées à un GTP (Figure 3). Elles présentent une grande affinité pour les nucléotides guanidiques et possèdent une faible activité enzymatique intrinsèque d'hydrolyse du GTP et d'échange du GDP/GTP (Wennerberg *et al.* 2005). Comme pour les protéines de la superfamille Ras, deux classes de protéines régulatrices contrôlent le passage d'un état à l'autre : les GEFs (guanine nucleotide exchange factors) et les GAPs (GTPases activating proteins). Les GEFs favorisent l'échange d'une molécule de GDP par une molécule de GTP ce qui entraîne un changement conformationnel des RhoGTPases permettant leur interaction avec toute une série de molécules effectrices qui déclencheront des cascades de signalisation aboutissant à de nombreuses réponses cellulaires (Etienne-Manneville *et al.* 2002). Les GAPs accélèrent l'hydrolyse du GTP lié à la RhoGTPase ramenant ainsi la protéine à l'état inactif. Une troisième catégorie de régulateurs contrôle l'activité des RhoGTPases : les GDIs (guanine nucleotide dissociation inhibitors). Ces derniers régulent également les RabGTPases mais pas les autres groupes de la superfamille Ras (Wennerberg *et al.* 2005). Les RhoGDIs se lient au groupement prénylé des RhoGTPases et les séquestrent au niveau du cytoplasme en empêchant leur interaction avec la membrane plasmique où elles sont activées par les GEFs.

4. Cas des RhoGTPases atypiques

Certaines RhoGTPases ne suivent pas le schéma classique d'échange de nucléotides. Elles ne sont pas régulées par les GEFs et les GAPs mais plutôt par leur niveau d'expression, par phosphorylation, par compartimentalisation intracellulaire ou par dégradation. Parmi les RhoGTPases atypiques, on distingue les protéines Rnd (1, 2 et 3), Wrch, Chp, RhoH et RhoBTB (1 et 2) (Figure 2). Ces protéines sont constitutivement actives car elles comportent généralement des séquences d'acides aminés différentes des RhoGTPases classiques au niveau du site de liaison aux nucléotides ce qui, soit leur fait perdre leur activité GTPase et entraîne leur liaison permanente au GTP (RhoH, Rnd), soit accroît leur capacité d'échange nucléotidique (Wrch) (Chardin 2006; Aspenstrom *et al.* 2007). A côté de ces six RhoGTPases atypiques, on peut ajouter un isoforme de Rac1 obtenu suite à un épissage alternatif, Rac1b, qui se caractérise par une activité d'échange élevée (Fiegen *et al.* 2004).

5. Régulation de l'activité des RhoGTPases

Les signaux extracellulaires aussi bien diffusibles - cytokines, facteurs de croissance et médiateurs biologiques divers - que physiques, comme les signaux mécaniques, peuvent activer les petites GTPases de la famille Rho. Les interactions avec la matrice extracellulaire ou d'autres cellules sont également de puissants régulateurs.

5.1. Contrôle de la liaison aux nucléotides par les GEFs et de l'hydrolyse par les GAPs

Les signaux extracellulaires activent les RhoGTPases par l'intermédiaire des GEFs. A ce jour, plus de 70 GEFs ont été identifiées. Au vu de leur grand nombre, il n'est pas étonnant de constater que plusieurs GEFs peuvent activer une même RhoGTPase. Par ailleurs, une RhoGEF peut activer plusieurs RhoGTPases. Des protéines « chaperones » à domaine PDZ participent à la régulation spatio-temporelle des signaux extracellulaires en se liant à des RhoGEFs, ce qui permet soit à un complexe RhoGEF-RhoGTPase d'activer des effecteurs différents, soit à une RhoGEF d'activer des RhoGTPases différentes (Garcia-Mata *et al.* 2007).

La plupart des RhoGEFs comportent un domaine DH (Dbl homology), responsable de leur activité catalytique, associé en C-terminal à un domaine PH (pleckstrin homology) pouvant moduler l'activité d'échange ou interagir avec des phospholipides et des protéines et ainsi cibler les GEFs à la membrane (Whitehead *et al.* 1997; Zheng 2001). Le domaine PH est également impliqué dans l'inhibition des GEFs par son association intramoléculaire avec l'extrémité N-terminale (par ex. la GEF Dbl) ou le domaine DH (par ex. la GEF Vav). Cette inhibition est levée grâce à la phosphorylation des GEFs, à leur interaction avec les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G hétérotrimériques ou avec le phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (PIP₃) (Buchsbbaum 2007). Les sous-unités α des protéines G comme G α_q , G α_{12} et G α_{13} peuvent également activer les RhoGEFs de manière directe (Siderovski *et al.* 2005). Par ailleurs, la formation d'homo ou d'hétérodimères entre certaines RhoGEFs est nécessaire pour leur activité mais peut aussi être inhibitrice dans certains cas. Leur activité peut également être régulée

négativement par leur interaction avec des protéines inhibitrices mais également par dégradation (Buchsbaum 2007).

A côté des RhoGEFs à domaine DH, une seconde sous-famille de GEFs a récemment été décrite. Il s'agit des protéines CZH (CDM and Zizimin homology ou Dock180-related proteins) qui possèdent deux régions homologues catalysant l'échange des nucléotides au niveau des RhoGTPases (Garcia-Mata *et al.* 2007).

Le mécanisme d'action des RhoGEFs s'effectue comme suit : les GEFs se lient à la forme Rho-GDP, déstabilisent le complexe GDP-GTPase et stabilisent la forme intermédiaire non liée aux nucléotides. Etant donné que le rapport de la concentration intracellulaire GTP:GDP est élevé, le GDP libéré est remplacé par un GTP menant ainsi à l'activation de la GTPase (Schmidt *et al.* 2002).

Les GAPs stimulent l'activité d'hydrolyse enzymatique intrinsèque faible des RhoGTPases terminant ainsi le cycle de régulation de ces protéines. Les GAPs ont été sensiblement moins étudiées que les GEFs ayant été considérées comme jouant un rôle secondaire dans la régulation des RhoGTPases. Néanmoins, leur grand nombre (80 RhoGAPs chez l'homme) suggère qu'elles pourraient jouer un rôle non négligeable dans le contrôle de l'activité des petites protéines de la famille Rho. Les RhoGAPs présentent une région commune de 170 acides aminés nommée « domaine RhoGAP » ou « domaine BH » suffisante pour l'activité catalytique (Peck *et al.* 2002). Les GAPs peuvent être régulées positivement et négativement par interactions avec d'autres protéines mais également par des modulations du niveau de leur phosphorylation. En effet, cette modification post-traductionnelle peut induire un changement de conformation au niveau

du site catalytique, influençant donc l'activité des GAPs. De plus, la phosphorylation peut affecter de manière indirecte l'activité des GAPs en régulant leur localisation subcellulaire, leur dégradation ainsi que leur interaction avec d'autres protéines ou avec des phospholipides (Sordella *et al.* 2003; Bernards *et al.* 2004).

5.2. Régulation de la localisation subcellulaire : modifications post-traductionnelles et rôle des GDIs

En plus de l'échange de nucléotides guanidiques, la plupart des RhoGTPases et des autres protéines de la superfamille Ras requièrent un ancrage à la membrane plasmique ou aux endomembranes pour assurer leurs fonctions biologiques. Le premier signal d'ancrage est la modification post-traductionnelle au niveau de la séquence CAAX (C pour Cystéine, A pour un acide aminé aliphatique et X pour n'importe quel acide aminé) située à l'extrémité C-terminale de la RhoGTPase. Cette modification consiste en l'addition covalentielle d'un groupement isoprényle soit, le plus souvent, un géranylgeranyl ou un farnésyl sur l'atome de soufre de la cystéine de la séquence CAAX. L'isoprénylation des RhoGTPases est catalysée par la géranylgeranyltransférase de type I et par la farnésyltransférase. Cette prénylation est alors suivie par un translocation des RhoGTPases du cytosol au réticulum endoplasmique où le groupe AAX est clivé par la protéase Rce1. Ce clivage expose la fonction carboxylique de la cystéine en C-terminal qui est alors méthyl estérifiée par la carboxyl méthyltransférase Icmt (Winter-Vann *et al.* 2005; Konstantinopoulos *et al.* 2007). Certaines RhoGTPases comme RhoB peuvent subir une modification supplémentaire par l'attachement de groupements

palmitoylés sur un résidu cystéine proche de la boîte CAAX (Michaelson *et al.* 2001).

Les RhoGDIs, troisième classe de régulateurs des RhoGTPases, jouent un rôle important dans le ciblage de ces dernières à la membrane. A ce jour, seuls trois RhoGDIs ont été identifiés chez l'Homme : RhoGDI/RhoGDI α /RhoGDI1 exprimé de manière ubiquitaire, Ly/D4GDI ou RhoGDI β /RhoGDI2 exprimé au niveau des cellules hématopoïétiques et RhoGDI γ /RhoGDI3 exprimé de manière préférentielle dans les poumons, le pancréas, les reins, le cerveau et les testicules (DerMardirossian *et al.* 2005; Dovas *et al.* 2005).

Il a été montré que les RhoGDIs libèrent les RhoGTPases de leur ancrage aux membranes en deux étapes : la première consiste en une interaction de l'extrémité N-terminale des RhoGDIs avec les régions Switch des protéines Rho ce qui permet la deuxième étape, c'est-à-dire l'insertion du groupement prénylé des petites GTPases au niveau de la poche hydrophobe des RhoGDIs (Hoffman *et al.* 2000). Trois activités biologiques distinctes ont été décrites pour les RhoGDIs : 1) ces protéines masquent les groupements isoprénylés des RhoGTPases et, de ce fait, séquestrent les GTPases inactives dans le cytosol ou les organelles, 2) les RhoGDIs peuvent également interagir avec les RhoGTPases liées au GTP empêchant leur activité hydrolase mais aussi l'action des GAPs ainsi que l'interaction avec les effecteurs, 3) en interagissant avec les régions Switch des RhoGTPases, les GDIs empêchent la libération du GDP et contribuent au maintien des RhoGTPases dans un état inactif (DerMardirossian *et al.* 2005). La dissociation du complexe RhoGDI-RhoGTPase est régulée à différents

niveaux, entre autres par l'activation des intégrines qui accroissent l'affinité des RhoGTPases, notamment Rac, pour les radeaux lipidiques (« lipid rafts »), recrutant le groupement géranylgeranyl des GTPases vers la bicouche lipidique de la membrane (Del Pozo *et al.* 2002). Par ailleurs, des facteurs de déplacement des RhoGDIs tels que les phospholipides, les membres de la famille ERM, la tyrosine kinase Etk et le récepteur à la neurotrophine p75 stimulent la dissociation du complexe et, par conséquent, la translocation des RhoGTPases à la membrane. L'affinité des RhoGDIs pour les RhoGTPases peut également être modulée par phosphorylation du RhoGDI par la PKC (protéine kinase C) et PAK1, ou par phosphorylation de la RhoGTPase par la PKA (protéine kinase A) (DerMardirossian *et al.* 2005; Dransart *et al.* 2005).

5.3. Modulation du niveau d'expression des RhoGTPases

De nombreuses RhoGTPases s'avèrent être spécifiques d'un type cellulaire. Dans le cas des protéines de la sous-famille Rac, si Rac1 est exprimé de manière ubiquitaire, Rac2 se retrouve presque exclusivement au niveau des cellules hématopoïétiques et Rac3 s'exprime de manière préférentielle au niveau du système nerveux central. D'autres, comme RhoG et RhoB, présentent des fluctuations d'expression pendant le cycle cellulaire (Vincent *et al.* 1992; Zalzman *et al.* 1995). RhoB est également régulé par des signaux extracellulaires tels que les rayonnements ultraviolets qui stabilisent son ARN messager dont le temps de demi-vie en condition de base est extrêmement court (20min) (Westmark *et al.* 2005). Enfin, Wrch1 peut être régulé par Wnt, protéine clé d'une voie de signalisation régulant la

morphologie et la polarité cellulaire, modulant les interactions cellule-cellule et contrôlant la prolifération et la motilité cellulaire (Tao *et al.* 2001). Certaines protéines Rho peuvent être régulées par la modification de leur vitesse de dégradation. Par exemple, la dégradation de RhoA par Smurf1, sous la dépendance de Rac1 et Cdc42, empêche la formation inappropriée de fibres de stress pendant la migration cellulaire (Wang *et al.* 2003) tandis que l'activation du récepteur Fas favorise la dégradation de Cdc42 ce qui contribue à induire l'apoptose (Tu *et al.* 2001).

6. Fonctions des RhoGTPases

Les membres de la famille des petites RhoGTPases sont essentiellement connus pour leur rôle dans la régulation de la dynamique du cytosquelette mais ils interviennent également dans les voies biologiques liées à la polarité, la survie cellulaire et l'apoptose, la prolifération cellulaire, l'expression génique, les réponses du système immunitaire et l'oncogenèse (Bustelo *et al.* 2007).

6.1. Régulation du cytosquelette d'actine

De nombreuses études ont montré que les RhoGTPases sont impliquées dans une série de cascades de signalisation contrôlant la polymérisation et l'organisation des filaments d'actine. L'activation des RhoGTPases de la sous-famille Rho (RhoA, RhoB et RhoC) induit la formation de filaments contractiles d'actine et de myosine appelés fibres de stress. En outre, la stimulation des protéines Rac (Rac1, Rac2 et Rac3) permet

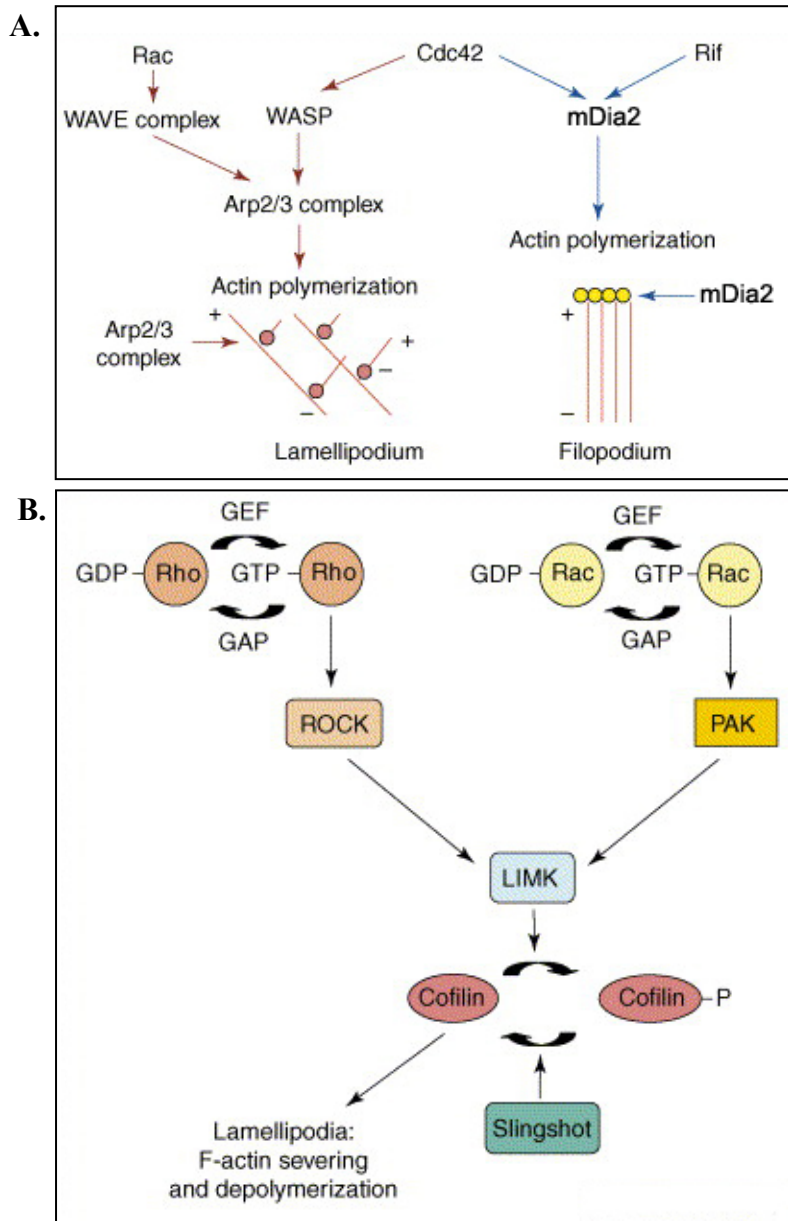


Figure 4 : Rôle des RhoGTPases dans la polymérisation de l'actine (d'après Ridley 2006). **A.** Rac et Cdc42 activent les membres de la famille WASP qui vont stimuler le complexe Arp2/3 induisant la nucléation et la polymérisation de filaments ramifiés d'actine. Cdc42 active mDia2 et la formation de filopodes. **B.** Rho, Rac et Cdc42 activent la LIMK par leurs effecteurs respectifs, ROCK et PAK, ce qui a pour conséquence la stabilisation des filaments d'actine par inhibition de la fonction déstabilisatrice de la cofiline.

l'assemblage de protrusions et d'extensions membranaires riches en actine polymérique appelées lamellipodes tandis que l'activation de Cdc42 induit la formation de prolongements membranaires contenant des filaments d'actine linéaires nommés filopodes (Etienne-Manneville *et al.* 2002).

6.1.1. Polymérisation de l'actine

L'actine, protéine globulaire de 43kD, est la protéine intracellulaire la plus abondante chez les eucaryotes. Dans la cellule, elle existe sous deux formes, une forme monomérique soluble (actine G) et une forme filamenteuse (actine F) obtenue par polymérisation de l'actine G. Les polymères d'actine sont constitués par des filaments hélicoïdaux polarisés contenant une extrémité à croissance rapide nommée « plus » ou « barbed end » et une extrémité à croissance lente appelée « minus » ou « pointed end ».

L'actine globulaire liée à l'ATP est incorporée aux filaments en croissance à l'extrémité « plus ». Grâce à son activité ATPase intrinsèque, l'actine-ATP est alors hydrolysée en actine-ADP, forme moins stable, le long des filaments au niveau de l'extrémité « minus ». Cette hydrolyse mène à la dépolymérisation de l'extrémité « minus » qui relargue alors l'actine G-ADP, l'ADP est ensuite échangé contre de l'ATP et l'actine G-ATP est réassemblée au niveau de l'extrémité « plus » (Disanza *et al.* 2005).

Les RhoGTPases interviennent dans la régulation de la polymérisation de l'actine (Figure 4) en modulant les protéines de coiffe qui stabilisent

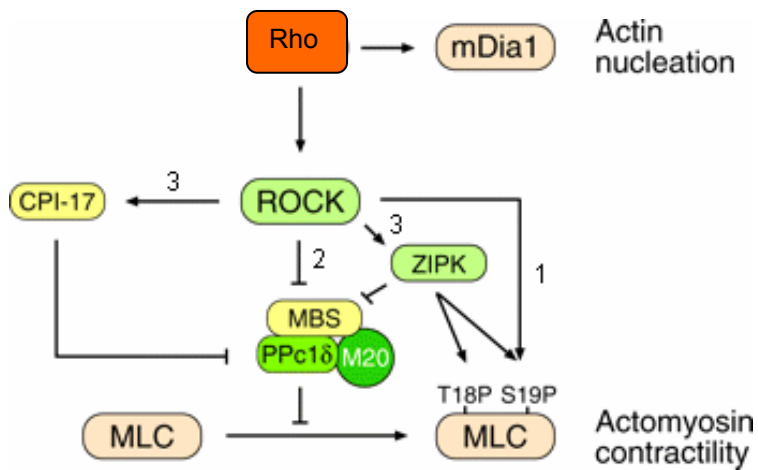


Figure 5 : Voies de signalisation menant à la formation des fibres de stress (d'après Pellegrin et al. 2007). L'activation de ROCK par Rho induit **(1)** la phosphorylation de la chaîne légère de myosine II (MLC), **(2)** inhibe la sous-unité MBS de la phosphatase de la myosine et **(3)** active des inhibiteurs de MBS (CPI-17 et ZIPK). Rho active directement la formine mDia1 induisant la nucléation et la polymérisation de l'actine.

les filaments ainsi que les deux facteurs de polymérisation de l'actine : le complexe heptamérique Arp2/3 (Actin-related proteins) et les protéines de la famille des formines (Dia). Rac et Cdc42 initient la polymérisation de l'actine en activant les membres de la famille WASP (Wiskott-Aldrich syndrome proteins), respectivement WAVE (WASP family verprolin homologous) et N-WASP ce qui conduit à la stimulation du complexe Arp2/3. Celui-ci se fixe sur les filaments existants et permet la formation de nouveaux filaments et leur ramification pour former des lamellipodes. Ces structures sont des extensions membranaires en feuillets parallèles au support composées d'un réseau de filaments ramifiés d'actine polarisés en direction de la membrane plasmique (Figure 4A). Les lamellipodes sont des structures indispensables à la migration cellulaire. Par ailleurs, les protéines de la sous-famille Cdc42 induisent, par l'intermédiaire de leur effecteur mDia2, la formation de filopodes qui sont des extensions membranaires en forme de bâtonnets rigides composées de paquets parallèles de filaments linéaires d'actine (Figure 4A) (Ridley 2006; Ladwein *et al.* 2008). Les filopodes servent de senseurs et de guides vers les agents chémo-attractants ou vers les cellules (Pellegrin *et al.* 2007). Les protéines de la sous-famille Rho se lient directement à la formine mDia1 (diaphanous-related formin), lèvent son auto-inhibition et initient la nucléation de l'actine en filaments (Figure 5). La dépolymérisation des filaments d'actine est régulée par ADF/cofiline (actin depolymerizing factor) qui dissocie les filaments d'actine à l'extrémité « minus ». En fait, Rac et Cdc42 activent leur effecteur commun PAK qui lui-même stimule la LIM kinase (LIMK) qui va phosphoryler et inactiver l'activité déstabilisatrice de la cofiline (Dianza *et al.* 2005) résultant ainsi en la stabilisation des filaments

d'actine. L'activation de LIMK est aussi contrôlée par Rho via son effecteur la Rho kinase (ROCK) (Jaffe *et al.* 2005) (Figure 4B). D'autres cibles des RhoGTPases peuvent aussi activer de façon plus indirecte la formation des filaments d'actine. Par exemple, Rho et Rac en interagissant avec les isoformes de la phosphatidylinositol (4,5) biphosphate (PIP₂) altèrent l'activité des protéines de coiffe régulées par ce lipide, telle que la gelsoline (Ridley 2006).

6.1.2. Polymérisation de l'acto-myosine et organisation des fibres de stress

Les mouvements des cellules animales s'effectuent au travers d'une combinaison d'événements protrusifs et contractiles. Les cellules non musculaires contiennent des fibres de stress, médiateurs principaux de la contraction cellulaire. Ces fibres présentent une organisation similaire aux faisceaux d'acto-myosine hautement organisés au niveau des cellules musculaires (Alberts *et al.* 2008). Les fibres de stress sont composées de paquets de dix à trente filaments d'actine maintenus solidaires par de l' α -actinine organisée de façon périodique le long des fibres. Des bandes de myosine II et de tropomyosine complètent la composition de ces fibres.

Les RhoGTPases de la sous-famille Rho comprenant RhoA, RhoB et RhoC sont largement impliquées dans la formation des fibres de stress (Pellegrin *et al.* 2007). Ces trois protéines présentent plus de 85% d'homologie de séquence et activent toutes trois la sérine/ thréonine kinase ROCK. RhoC interagit cependant de façon plus importante avec ROCK que RhoA et RhoB (Sahai *et al.* 2002; Wheeler *et al.* 2004). Nous décrirons ici le schéma général de formation des fibres de stress

en utilisant le terme Rho pour désigner les trois protéines de la sous-famille. L'activation de Rho permet à ROCK de phosphoryler : 1) la chaîne légère de myosine II (MLCII), 2) MBS (nommé également MYPT), la sous-unité régulatrice de la phosphatase de la chaîne légère de myosine, menant ainsi à son inhibition, 3) CPI-17 ou ZIPK (Zipper interacting protein kinase), ce qui active ces inhibiteurs de la phosphatase de la myosine.

Ces trois voies conduisent dès lors à un accroissement du taux de myosine phosphorylée favorisant la contractilité des fibres de stress grâce à une augmentation de l'activité ATPase de la myosine (Figure 5) (Riento *et al.* 2003). Signalons toutefois que ROCK seul génère des fibres épaisses non alignées et requiert l'activité conjointe de mDia1 pour l'établissement de fibres parallèles (Jaffe *et al.* 2005; Pellegrin *et al.* 2007).

6.2. Contrôle de la dynamique du cytosquelette de microtubules

Les microtubules forment un des réseaux majeurs du cytosquelette. Ils sont impliqués dans la formation du fuseau mitotique, la migration, la polarisation et servent de rails pour le trafic des organites dans la cellule (Watanabe *et al.* 2005). Ce sont des filaments dynamiques composés de 13 protofilaments, chacun contenant une rangée linéaire de dimères d' α et de β tubuline. Ces filaments, tout comme les filaments d'actine, sont polarisés, l'extrémité « minus » étant ancrée au centrosome, région cytoplasmique adjacente au noyau (MTOC, microtubules organizing centre) et l'extrémité « plus » dirigée vers la périphérie cellulaire. Les extrémités « plus » sont composées de

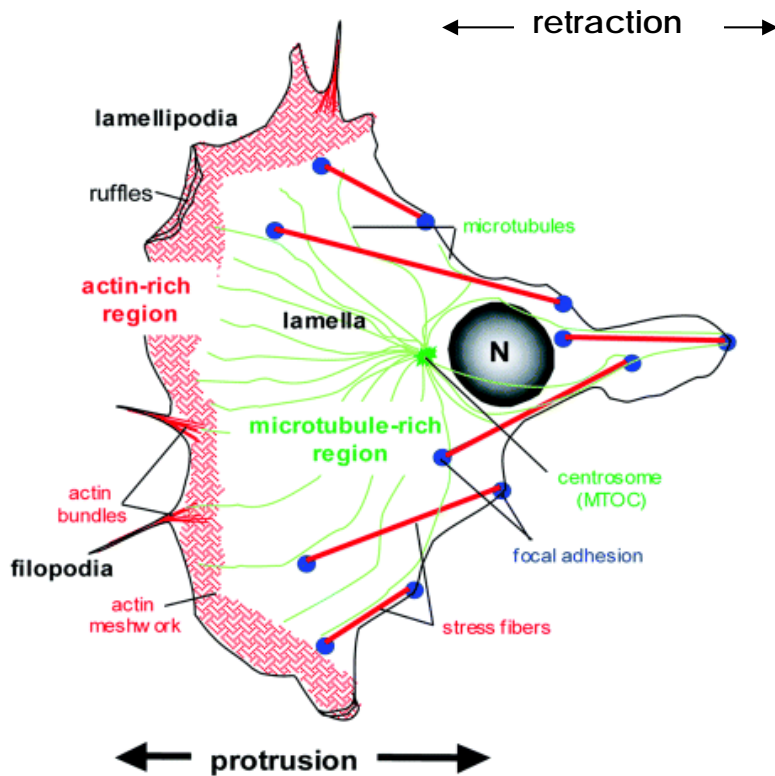


Figure 6 : Organisation des réseaux d'actine et de microtubules lors de la migration cellulaire (d'après Etienne-Manneville 2004). La polymérisation des microtubules active des GEFs de Rac et libère Rac-GTP associé à la tubuline monomérique à l'avant de la cellule. La dépolymérisation des microtubules induit l'activation de GEFs de Rho et un accroissement de la contractilité à l'arrière de la cellule. Les microtubules en croissance induisent la dissolution des adhésions focales.

tubuline-GTP permettant de les stabiliser. Par ailleurs, des protéines (nommées +TIPS) se fixant aux extrémités « plus » régulent la dynamique des microtubules telles CLIP-170 (cytoplasmic linker protein), APC (adenomatous polyposis coli), EB1 (end-binding protein 1) et la sous-unité de la dynactine p150 (Siegrist *et al.* 2007).

Rac1 et Cdc42 contribuent à la polymérisation des microtubules en activant leur effecteur IQGAP ce qui accroît son affinité pour CLIP-170 (Noritake *et al.* 2005). Rac1 et Cdc42 peuvent également, par l'intermédiaire de PAK, inactiver la Stathmine (Op18) empêchant ainsi la déstabilisation des microtubules (Daub *et al.* 2001). En outre, le complexe APC-EB1 est régulé par mDia, un effecteur de Rho, et par Par6/PKC ζ , un effecteur de Cdc42, menant respectivement à la stabilisation et à la polarisation des microtubules (Jaffe *et al.* 2005; Watanabe *et al.* 2005).

Il est important de noter que les cytosquelettes d'actine et de microtubules sont étroitement interconnectés (Figure 6). En effet, les microtubules interagissent avec les filaments d'actine notamment lors de la migration cellulaire ou de l'orientation du faisceau mitotique. De plus, ces interactions entre l'actine et les microtubules sont en partie régulées par l'intermédiaire des RhoGTPases. Effectivement, les microtubules activent Rho par la GEF Ect2 via son interaction avec EB1 déclenchant l'assemblage et l'organisation d'un anneau d'actine polymérique menant au clivage de la cellule lors de la cytokinèse (Basu *et al.* 2007). La migration cellulaire est un autre exemple d'interaction entre les réseaux de microtubules et de filaments d'actine et sera plus longuement abordée lors des paragraphes suivants.

6.3. Formation des adhésions focales

Les adhésions focales sont de larges complexes multimoléculaires connectant physiquement le cytosquelette et la matrice extracellulaire. Ces complexes sont composés des intégrines, récepteurs transmembranaires, capables de se fixer à des structures polymériques de la matrice extracellulaire et à la plaque sous-membranaire comprenant un grand nombre de protéines de structure et de signalisation dont les plus connues sont la FAK (Focal adhesion kinase), la taline, l' α -actinine, la filamine, la vinculine, la paxilline et la tensine. Cette plaque est le point de départ de la formation des fibres de stress d'acto-myosine menant à la contractilité cellulaire (Shemesh *et al.* 2005). Les RhoGTPases sont impliquées dans la formation des adhésions focales. Rho permet la formation des adhésions focales associées aux fibres de stress tandis que Rac et Cdc42 induisent l'apparition des complexes focaux en relation, respectivement, avec les lamellipodes et les filopodes. Ces complexes focaux peuvent subir une maturation en adhésions focales grâce à l'activation de RhoA (Kaverina *et al.* 2002).

6.4. Régulation de la migration

La migration cellulaire est un processus essentiel pour tous les organismes multicellulaires. Il est requis non seulement lors de processus physiologiques comme le développement embryonnaire ou la cicatrisation, mais participe également à des processus pathologiques comme l'invasion tumorale et la dissémination métastatique. Les cellules en migration directionnelle sont polarisées avec une distribution asymétrique des molécules de signalisation et des

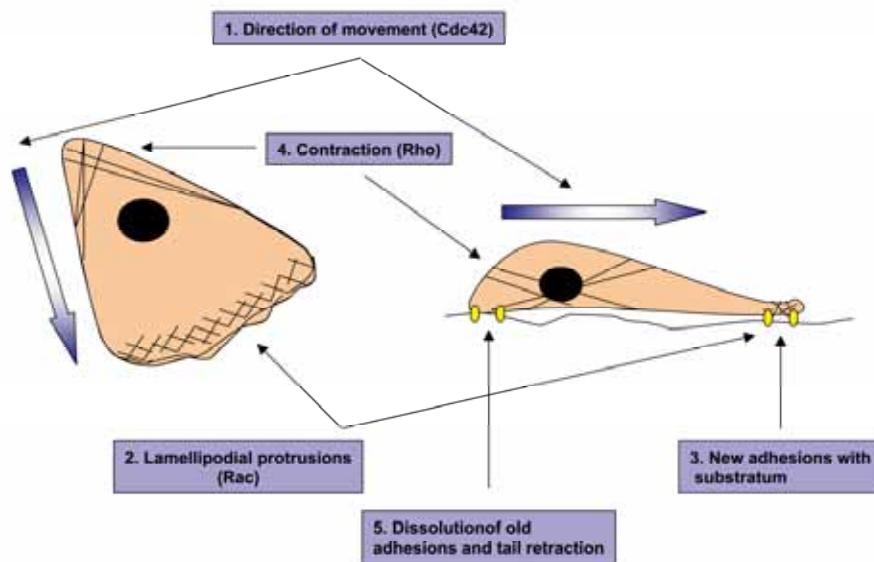


Figure 7 : Rôle des RhoGTPases dans la migration cellulaire (Raftopoulou et al. 2004). Rac est impliqué dans la formation de lamellipodes et de complexes focaux à l'avant de la cellule, Cdc42 joue un rôle dans la formation de filopodes, senseurs directionnels, et Rho permet la contraction de l'arrière de la cellule et son détachement du support.

cytosquelettes d'actine et de microtubules. Elles se caractérisent par l'extension de lamellipodes et la formation de nouveaux sites d'adhésion à l'avant de la cellule tandis que l'arrière des cellules se contracte avec détachement du support des adhésions focales (Figure 7). Ces étapes impliquent un remodelage coordonné du cytosquelette d'actine et des microtubules de façon à générer un mouvement net vers l'avant.

Au vu de ces éléments il est manifeste que la migration cellulaire est sous la dépendance des RhoGTPases. Nous décrivons donc brièvement leur régulation lors des processus migratoires. L'activation à l'avant de la cellule de la voie PI3K par les signaux extracellulaires libère PIP₃. Ce produit lipidique stimule les GEFs de la famille Dbl comme décrit plus haut avec pour conséquence l'activation de Rac, Rac GTP exerçant un rétrocontrôle positif sur la PI3K et amplifiant ainsi l'accumulation de PIP₃ (Srinivasan *et al.* 2003). Les stimuli extracellulaires, notamment relayés par les intégrines peuvent également activer le complexe de molécules adaptatrices p130Cas/Crk. Crk, par son domaine SH3, est alors capable d'interagir avec d'autres GEFs telles que Dock180 à l'avant de la cellule ce qui mène à l'activation de Rac (Hasegawa *et al.* 1996; Klemke *et al.* 1998). Rac GTP va donc induire la polymérisation locale de l'actine générant les lamellipodes qui servent de force protrusive. L'activation de Cdc42 permet la formation des filopodes à l'avant de la cellule jouant un rôle dans le contrôle de la direction de migration (Fukata *et al.* 2003). Et enfin, Rho est associé à l'assemblage et à la maturation des adhésions focales à l'avant de la cellule et à la rétraction de l'arrière du corps cellulaire (Figure 7) (Raftopoulou *et al.* 2004).

Nous avons signalé précédemment que les réseaux d'actine et de microtubules interagissent, de manière directe ou indirecte, par l'intermédiaire des RhoGTPases (Figure 6). Pour rappel, Rac et Cdc42 induisent la polymérisation de l'actine et régulent la dynamique des microtubules. De plus, Rac-GTP est capable de se lier à la tubuline monomérique mais pas aux microtubules, avec comme conséquence la libération de Rac-GTP lors de la polymérisation de la tubuline en microtubules (Best *et al.* 1996). Ceux-ci interviennent également dans l'activation de GEFs de Rac résultant en la formation de lamellipodes à l'avant de la cellule. Si les protéines de la sous-famille Rho favorisent la formation des fibres de stress et des adhésions focales menant à un accroissement de la contractilité cellulaire, les microtubules, qui sont guidés par les fibres de stress vers les adhésions focales, sont également impliqués dans la migration cellulaire. En effet, la dépolymérisation des microtubules induit l'activation de GEFs de Rho ce qui provoque l'accroissement de la contractilité et la formation de fibres de stress et d'adhésions focales (Krendel *et al.* 2002). La contraction cellulaire lors de la migration résulte donc d'une compétition entre les filaments d'actine et les microtubules puisque les fibres de stress génèrent la force contractile et favorisent le développement d'adhésions focales tandis que les microtubules en croissance provoquent leur dissolution (Etienne-Manneville 2004).

6.5. Contrôle du trafic vésiculaire

Les différents compartiments intracellulaires sont reliés entre eux par le trafic vésiculaire. Celui-ci est nécessaire pour maintenir la composition

lipidique et protéique au niveau des différents compartiments ainsi que pour assurer le tri des protéines. L'implication de l'actine et des microtubules et, par conséquence, des RhoGTPases dans le trafic vésiculaire est bien établi (Thyberg *et al.* 1999; Valderrama *et al.* 2001). Cdc42, et non RhoA ou Rac1, régule le transport des protéines de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique par son effecteur N-WASP (Luna *et al.* 2002; Matas *et al.* 2005). RhoA et Cdc42 jouent un rôle dans le processus d'exocytose tandis que RhoA, Rac1 et Cdc42 sont impliqués dans l'endocytose (Symons *et al.* 2003; Bader *et al.* 2004). RhoB, qui se localise essentiellement au niveau des endosomes, ralentit le trafic des endosomes précoces vers les endosomes tardifs de récepteurs membranaires tel que le récepteur à l'EGF (Gampel *et al.* 1999).

6.6. Régulation du cycle cellulaire

La progression à travers le cycle cellulaire est un processus strictement régulé dans les cellules non transformées. Il est activé par des facteurs de croissance mitotiques et requiert le plus souvent l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire. En absence de stimuli mitotiques, les cellules adhérentes sont quiescentes et hors du cycle cellulaire (G0). Suite à une stimulation, ces cellules entrent en phase G1 (Gap1) grâce à l'activation des kinases dépendantes des cyclines (CDK). Les CDK sont activées lors de leur association avec les cyclines. Les cyclines D (D1, D2, D3) se lient et activent CDK4 et CDK6 tandis que la cycline E active CDK2 (Figure 8). L'activation des CDK est inhibée par deux groupes d'inhibiteurs des CDK (CKI). On distingue les protéines INK4 comprenant p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} et p19^{INK4d} ainsi que les

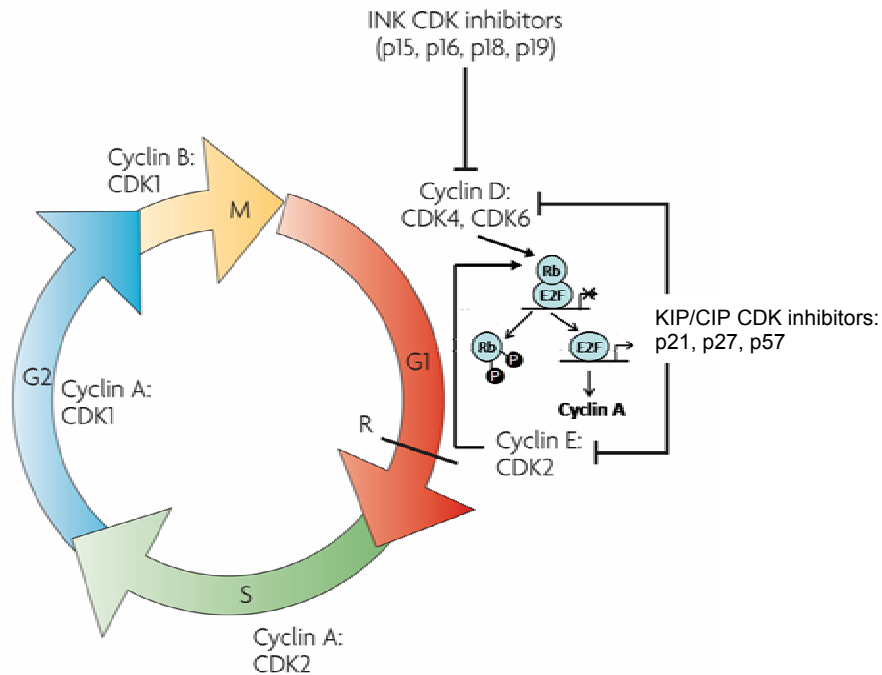


Figure 8: Régulation du cycle cellulaire (d'après Welsh 2004; Dehay et al. 2007). La progression en phase G1 est déterminée par les complexes cyclineD/CDK4/6 et cyclineE/CDK2 qui inhibent la protéine du rétinoblastome (Rb) par phosphorylation avec pour conséquence la libération du facteur de transcription E2F qui permet l'expression de la cycline A et de la cycline E requises pour l'entrée en phase S. R=point de restriction à partir duquel le cycle sera invariablement complété.

protéines Cip/Kip regroupant p21^{Cip1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2}. La phase G1 est suivie par la phase S de synthèse d'ADN et la phase G2 (Gap2) pour finalement aboutir à la mitose M (Welsh 2004). L'activation des complexes cyclines-CDK induit la phosphorylation et l'inhibition de la protéine du rétinoblastome (pRb). Cette protéine est un suppresseur de tumeurs et un répresseur clé de la progression en G1. En effet son inhibition libère le facteur de transcription E2F qui régule l'expression de gènes nécessaires pour l'entrée en phase S notamment l'expression des cyclines E et A (Figure 8).

Les RhoGTPases modulent l'activité des CDK durant la phase G1 ainsi que l'organisation du cytosquelette d'actine et des microtubules lors de la mitose (Jaffe *et al.* 2005). Les premières observations démontrant le rôle des RhoGTPases dans la régulation du cycle cellulaire ont été réalisées grâce à l'utilisation de toxines inhibitrices des RhoGTPases et à la microinjection de leurs formes dominantes inactives. L'équipe de Alan Hall (Olson *et al.* 1995) a montré que RhoA, Rac1 et Cdc42 sont impliqués dans la progression de la phase G1 à la phase S dans les fibroblastes 3T3. De nombreuses études se sont alors penchées sur la modulation par les RhoGTPases des cyclines en G1 et des CKI.

Il s'est avéré que Rac1 et Cdc42 stimulent l'expression de la cycline D1 via notamment NFκB (Coleman *et al.* 2004; Welsh 2004; Jaffe *et al.* 2005). Dans les fibroblastes stimulés par FGFb, Rho est nécessaire pour l'activation soutenue de Erk 1,2 (p42/p44 MAPK) par l'intermédiaire de ROCK et induit l'expression de la cycline D1 en milieu de phase G1. Par ailleurs, Rho aurait un effet inhibiteur sur l'activité de Rac1 et Cdc42 empêchant l'expression trop précoce de

cycline D1 (Welsh *et al.* 2001; Coleman *et al.* 2004). De plus, Cdc42 est impliqué dans la régulation de l'expression de la cycline E1 par la kinase p70 S6 (Chou *et al.* 2003). Dans les cellules endothéliales, Rac1 favorise la traduction de l'ARNm de la cycline D1 lorsqu'il est activé par l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, le récepteur principal de la fibronectine, (Mettouchi *et al.* 2001). Les RhoGTPases jouent également un rôle dans la régulation des CKI. Rho inhibe l'expression de p21Cip1 par différentes voies de signalisation dépendant du type cellulaire (Coleman *et al.* 2004) mais néanmoins de manière indépendante de p53, son principal régulateur transcriptionnel (Welsh 2004). Rac1 et Cdc42 stimulent l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome de p21Cip1 (Bao *et al.* 2002). Rho régule également le niveau de p27Kip1 par l'intermédiaire d'une séquence au niveau de la région non traduite en 3' de son ARNm, réprimant ainsi sa synthèse protéique (Vidal *et al.* 2002).

La mitose, ou division cellulaire, comprend six étapes continues (Alberts *et al.* 2008).

- 1) Durant la prophase, les chromosomes dupliqués lors de la phase S s'assemblent en chromatides reliés par le centromère et le fuseau mitotique se forme à partir du cytosquelette de microtubules.
- 2) La prométaphase se caractérise par la cassure de l'enveloppe nucléaire et le développement de structures protéiques appelées kinétochores au niveau des centromères s'attachant aux microtubules. Cette étape voit les chromosomes entrer en mouvement grâce à leur interaction via les kinétochores avec les composants du fuseau mitotique.

- 3) La métaphase durant laquelle l'alignement des chromosomes selon leur centromère forment la plaque équatoriale.
- 4) L'anaphase est caractérisée par la séparation des chromatides vers chaque pôle.
- 5) Lors de la télophase, les chromatides atteignent les pôles, les kinétochores disparaissent, l'enveloppe nucléaire se reforme autour de chaque groupe de chromatides et la chromatine se décondense.
- 6) Finalement, l'étape de cytokinèse marque la fin de la division cellulaire avec la formation d'un anneau contractile d'acto-myosine entre les deux noyaux.

Le rôle de Rho dans la formation de l'anneau contractile lors de la cytokinèse est bien connu. Il requiert son activation par la RhoGEF Ect2 et la stimulation des effecteurs mDia, ROCK et Citron kinase (CIT) (Werner *et al.* 2008). Le niveau de Cdc42-GTP atteint un pic en métaphase suite à sa stimulation par Ect2 alors que l'hydrolyse de la forme GTP est accélérée par la RhoGAP MgcRacGAP permettant ainsi la transition vers l'anaphase (Oceguera-Yanez *et al.* 2005). Cdc42 jouerait de cette manière un rôle dans l'attachement des microtubules aux kinétochores. Un rôle supplémentaire a été décrit pour Rho dans l'interaction des microtubules au cortex cellulaire lors de la prométaphase (Narumiya *et al.* 2006).

6.7. Modulation de l'expression génique

Les RhoGTPases régulent de nombreuses voies de signalisation menant à des modulations de l'expression génique. En effet, Rho active le facteur de transcription SRF (serum response factor) par l'intermédiaire

d'un co-activateur MAL. SRF agit au niveau de l'élément de réponse au sérum (SRE) de nombreux promoteurs de gènes codant notamment pour des protéines du cytosquelette dont l'actine. Le mécanisme exact restant à élucider, il est néanmoins établi que MAL se lie à l'actine G et subit une translocation nucléaire lors de la polymérisation de l'actine (Miralles *et al.* 2003). Rho, Rac et Cdc42 affectent aussi l'activité transcriptionnelle par l'intermédiaire des voies de signalisation JNK (Jun kinase), p38 MAPK et NFκB en fonction du contexte cellulaire (Jaffe *et al.* 2005). De plus, les RhoGTPases modulent l'activité des facteurs de transcription ETS, AP-1 et NFκB qui contrôlent la transcription de gènes dont les produits régulent la progression du cycle cellulaire, la prolifération et l'apoptose (Ellenbroek *et al.* 2007). Toutefois, la connaissance des gènes régulés par les RhoGTPases reste encore limitée. Quelques travaux analysant l'expression génique globale induite par une surexpression ou les formes constitutivement actives des RhoGTPases ont été réalisés. Une de ces études montre la modulation différentielle de l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et pour des protéines de la matrice extracellulaire par RhoA et Rac1/Cdc42 dans des fibroblastes murins (Teramoto *et al.* 2003). D'autres ont mis en évidence l'induction de l'expression du VEGF-C, de CXCL1, deux facteurs angiogéniques suite à la surexpression de RhoC dans des cellules épithéliales mammaires humaines (Wu *et al.* 2004). Enfin, plus récemment, Berenjano *et al.* (Berenjano *et al.* 2007) ont réalisé une analyse transcriptomique de fibroblastes murins exprimant les formes constitutivement activées de RhoA, RhoB et RhoC ; ils ont pu ainsi montrer que les gènes communs modulés

appartiennent à quatre voies de signalisation : E2F, c-Jun, c-Myc et p53 essentielles pour la transformation cellulaire.

6.8. Analyse génétique des fonctions des RhoGTPases *in vivo*

6.8.1. Sous-famille *Rac* et effecteurs

La délétion du gène *rac1* est létale suite à des défauts de la gastrulation et à l'apoptose des cellules mésodermiques (Sugihara *et al.* 1998). Par contre, l'inactivation des gènes des autres membres de cette sous-famille n'entraîne que des altérations limitées et localisées au niveau des tissus où ces protéines sont exprimées. En effet, les souris *rac2*^{-/-} présentent des altérations au niveau du système hématopoïétique confirmées par des délétions inductibles ciblées (Roberts *et al.* 1999). Les animaux *rac3*^{-/-} ont une meilleure coordination et des capacités d'apprentissage accrues (Corbetta *et al.* 2005) alors que les souris *rhoG*^{-/-} présentent une hyperactivation des cellules T en réponse aux antigènes et des altérations mineures au niveau de la voie superoxide des neutrophiles (Vigorito *et al.* 2004). La délétion de certains effecteurs de Rac1 peut avoir des répercussions fatales durant le développement embryonnaire. C'est le cas pour la suppression de Pak4 et Wasf2 (Bustelo *et al.* 2007).

6.8.2. Sous-famille *Rho* et effecteurs

Les souris présentant une délétion du gène *rhoB* sont viables, fertiles et leur capacité de cicatrisation paraît normale. Toutefois, les fibroblastes embryonnaires de ces animaux utilisés *in vitro* montrent que RhoB est

impliqué dans la prolifération et la migration induites par des conditions de stress, y compris la transformation néoplasique. De plus, les souris *rhoB*^{-/-} présentent une sensibilité accrue aux carcinogènes chimiques. Par ailleurs, l'injection, dans la cavité péritonéale de souris saines, de fibroblastes embryonnaires *rhoB*^{-/-} transformés par l'adénovirus E1A et les oncogènes Ras résulte en une incidence accrue de tumeurs intrapéritonéales. Ces données suggèrent que RhoB pourrait agir comme un suppresseur de tumeurs (Liu *et al.* 2001).

Les souris *rhoC*^{-/-}, décrites récemment, sont viables et présentent une fertilité normale. Leurs fibroblastes embryonnaires transformés par E1A et les oncogènes Ras expriment un phénotype similaire à celui obtenu pour des fibroblastes de type sauvage. De plus, lorsque des souris transgéniques développant rapidement des adénocarcinomes mammaires et des métastases pulmonaires (PyV-mT) sont croisées avec les souris *rhoC*^{-/-} (*rhoC*^{-/-} PyV-mT) et leur contrôle (*rhoC*^{+/-} PyV-mT), aucune différence significative n'a pu être observée au niveau de la fréquence, la taille, la structure et la prolifération cellulaire des tumeurs primaires. Par contre, un nombre réduit de métastases pulmonaires est observé chez les souris *rhoC*^{-/-} PyV-mT. Ces métastases ont en outre une taille plus petite, à mettre en relation avec une apoptose accrue. Ces résultats suggèrent que RhoC n'est pas nécessaire pour l'initiation et la progression des tumeurs primaires mais participerait à la dissémination métastatique (Hakem *et al.* 2005).

La délétion du gène *rhoA* n'a pas encore été décrite. Néanmoins plusieurs effecteurs de RhoA ont été inactivés par recombinaison homologue donnant lieu pour ROCK, Cit et LIMK2 à des phénotypes relativement peu altérés. Ces résultats sont quelque peu surprenants au

regard de leur rôle, réputé crucial, dans le remodelage du cytosquelette et dans la cytokinèse (Bustelo *et al.* 2007).

6.8.3. Sous-famille Cdc42 et effecteurs

La délétion du locus *cdc42* chez la souris résulte en une létalité embryonnaire plus précoce que celle induite par la délétion de Rac1. L'analyse des cellules souches embryonnaires *cdc42*^{-/-} montre que Cdc42 est essentiel pour la polymérisation de l'actine par PIP₂ (Chen *et al.* 2000). Par ailleurs, l'étude des fibroblastes embryonnaires *cdc42*^{-/-} suggère que cette molécule est requise pour l'induction de filopodes, la polarité, la migration cellulaire directionnelle ainsi que la prolifération (Yang *et al.* 2006). Certains effecteurs de Cdc42 ont également été inactivés par recombinaison homologue. Les souris *wasp*^{-/-} présentent des altérations du système immunitaire (Snapper *et al.* 1998) et les animaux *iqgap1*^{-/-} développent une hyperplasie gastrique (Li *et al.* 2000).

Toutes ces études confirment le rôle significatif que jouent les membres de la famille des petites GTPases de la famille Rho dans les voies biologiques liées à la dynamique du cytosquelette, la survie cellulaire et l'apoptose, la prolifération cellulaire, les réponses du système immunitaire et l'oncogenèse (Bustelo *et al.* 2007).

7. RhoGTPases et cancer

Etant donné l'implication des petites GTPases de la famille Rho dans des fonctions cellulaires cruciales et vitales, il n'est pas étonnant que l'altération de leur régulation conduise à des pathologies telles que les

maladies neurodégénératives, les affections cardiovasculaires ou encore les cancers comme le suggèrent les études de délétion génique décrites ci-dessus (Boettner *et al.* 2002).

Les cellules cancéreuses se définissent par deux propriétés essentielles : elles se multiplient sans contrôle et sont capables de coloniser des territoires normalement réservés à d'autres cellules. Tant que les cellules tumorales ne sont pas invasives, les tumeurs restent bénignes. Par contre, une fois le caractère invasif acquis, elles deviennent malignes justifiant l'emploi du terme cancer. Le pouvoir invasif est une caractéristique essentielle des cellules cancéreuses leur donnant la capacité de migrer, d'envahir les vaisseaux sanguins et lymphatiques puis de les quitter pour former des tumeurs secondaires à distance, les métastases. La classification des cancers se fait en fonction des tissus et des types cellulaires desquels ils dérivent. On distingue les carcinomes, cancers les plus fréquents provenant des cellules épithéliales, les sarcomes dérivant des tissus conjonctifs ou de cellules musculaires, ainsi que les leucémies et les lymphomes d'origine hématopoïétique (Weinberg 2007). La prolifération anarchique des cellules cancéreuses est due à un contrôle aberrant de la balance entre division cellulaire et apoptose. L'apoptose est une mort cellulaire programmée menant à l'élimination des cellules endommagées ou devenues inutiles. C'est un processus nécessaire notamment lors du développement ou au cours de la réponse immunitaire. L'apoptose se caractérise par l'activation des caspases (enzymes protéolytiques qui vont déclencher l'exposition des phospholipides phosphatidylsérine à la surface de la membrane cellulaire), l'arrêt de la réplication et la fragmentation du noyau et du cytosquelette entraînant la formation de corps apoptotiques phagocytés

par les macrophages. Les cellules cancéreuses sont capables de résister aux signaux pro-apoptotiques tels que l'absence de facteurs de croissance et/ou la perte d'adhésion au support.

Le tissu conjonctif entourant la tumeur ou stroma tumoral contribue également au développement tumoral. En effet, les cellules cancéreuses sécrètent non seulement des enzymes capables de dégrader la matrice extracellulaire péritumorale mais également des facteurs induisant une modification du phénotype des cellules du stroma. Ces cellules (fibroblastes et myofibroblastes, cellules endothéliales, péricytes et cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins et lymphatiques et cellules inflammatoires) vont à leur tour sécréter des facteurs stimulant la croissance tumorale, l'angiogenèse et le remodelage de la matrice extracellulaire. Pour croître, les tumeurs ont besoin d'un apport d'oxygène et de nutriments par l'intermédiaire des vaisseaux sanguins, la formation de nouveaux vaisseaux est donc un processus requis lorsque la tumeur atteint une certaine taille. Les vaisseaux tumoraux sont toutefois anormaux, tortueux, de diamètres hétérogènes et perméables.

Les métastases, ou tumeurs secondaires, sont responsables de 90% des décès dus aux cancers. Leur formation implique quatre étapes successives : les cellules cancéreuses envahissent les tissus et les vaisseaux sanguins et lymphatiques avoisinants, sont transportées par la circulation, quittent les vaisseaux et enfin établissent de nouvelles colonies sur des sites distants de la tumeur primaire (Alberts *et al.* 2008).

Les RhoGTPases contribuent à la plupart des étapes d'initiation et de progression du cancer telles que l'acquisition du potentiel de prolifération illimité, la survie et la résistance à l'apoptose et à

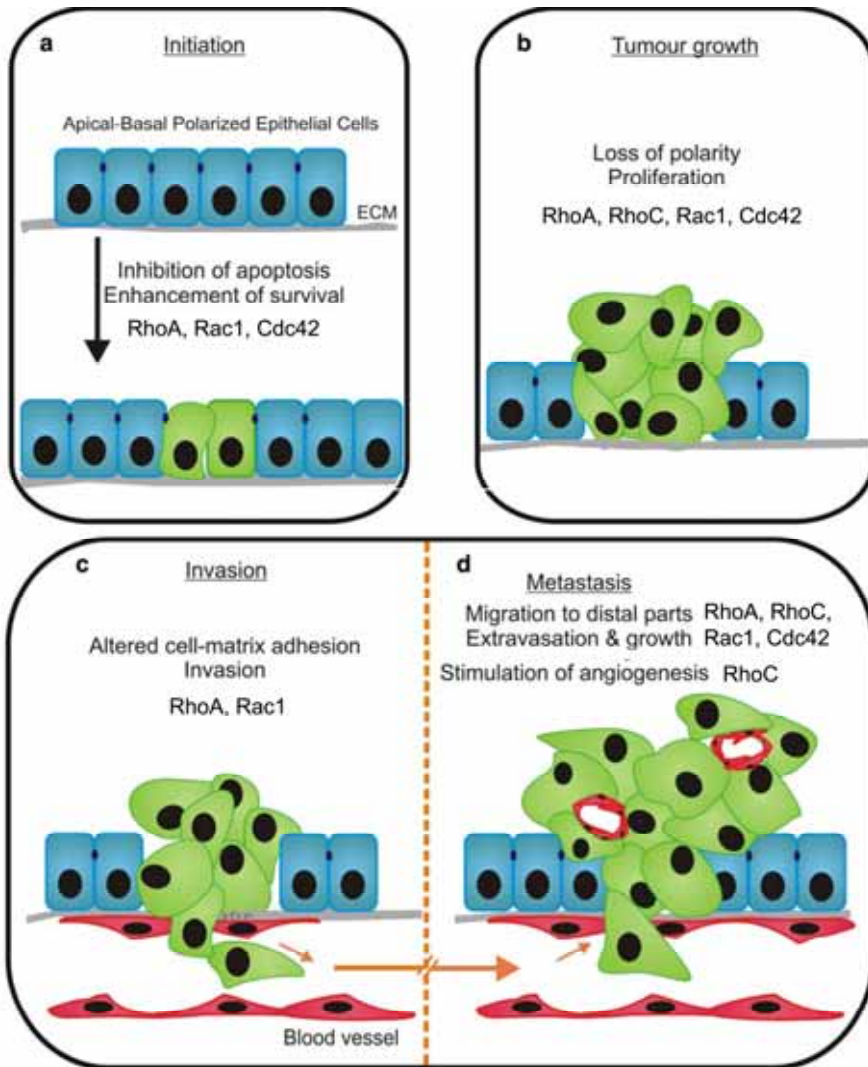


Figure 9 : Contribution des RhoGTPases à l'initiation et à la progression tumorale (d'après Ellenbroek et al. 2007). a) Parmi les RhoGTPases les plus étudiées RhoA, Rac1 et Cdc42 sont impliquées dans l'initiation tumorale. b) RhoA, RhoC, Rac1 et Cdc42 jouent un rôle dans la perte de polarité et l'EMT. c) RhoA et Rac1 modulent l'expression des MMPs et des TIMPs et la migration vers la circulation. d) Les RhoGTPases permettent l'extravasation et la croissance des tumeurs secondaires. Par ailleurs, RhoC induit l'expression de facteurs angiogéniques.

l'anoïkis, l'expression génique, l'invasion tissulaire et la formation de métastases (Figure 9) (Vega *et al.* 2008).

7.1. Rôle dans l'initiation et la croissance tumorale

Contrairement aux protéines de la famille Ras qui sont mutées dans 30% des cancers humains, les mutations des RhoGTPases sont rares (Ellenbroek *et al.* 2007). En effet, jusqu'à présent seuls les gènes de RhoH (réarrangements dans les lymphomes non hodgkiniens ou les myélomes multiples) et Rac1 (transitions de bases dans les méningiomes, les astrocytomes et les adénomes hypophysaires) ont été décrits comme étant altérés (Benitah *et al.* 2004; Hwang *et al.* 2004). En revanche, l'anomalie la plus fréquemment observée dans les tumeurs humaines est une surexpression des RhoGTPases, qui est en outre considérée comme facteur de pronostic défavorable. De fait, les niveaux d'expression de RhoA dans les cancers mammaires et les tumeurs des lignées germinales testiculaires sont positivement corrélés avec la progression de la maladie. RhoC est surexprimé dans les adénocarcinomes pancréatiques et les cancers inflammatoires du sein (Sahai *et al.* 2002) mais n'est pas impliqué dans l'initiation tumorale (Hakem *et al.* 2005). Par ailleurs, le variant d'épissage alternatif de Rac1, Rac1b, se caractérisant *in vitro* par une vitesse d'échange GTP-GDP accrue, est surexprimé dans les carcinomes du sein et du colon (Schnelzer *et al.* 2000; Benitah *et al.* 2004). Rac1, Rac2, Rac3, Cdc42, Wrch2 et RhoF sont également surexprimés dans certaines tumeurs humaines (Vega *et al.* 2008). De plus, les mutants dominants négatifs de RhoA, RhoG, Rac1, TC10 et Cdc42 inhibent la transformation des

fibroblastes par Ras tandis que les formes mutantes constitutivement activées de ces protéines ont des propriétés transformantes qui sont cependant plus faibles que celles des oncogènes Ras.

A cela, ajoutons que de nombreuses RhoGEFs ont été isolées comme gènes transformants et que les gènes encodant certaines GEFs, telle LARG, ont été retrouvés dans les translocations chromosomiques associées aux leucémies. L'oscillation des RhoGTPases entre la forme liée au GDP et la forme liée au GTP serait un élément important pour la transformation étant donné que les formes constitutivement activées ont des propriétés transformantes moindres que les formes mutantes ayant une capacité d'échange élevée ou que les RhoGEFs (Sahai *et al.* 2002).

L'expression de RhoB est souvent réduite et inversement corrélée avec l'agressivité des tumeurs humaines. RhoB est en effet décrit comme un suppresseur de tumeurs étant donné que les souris RhoB^{-/-} développent plus de tumeurs cutanées induites par des carcinogènes (Liu *et al.* 2001).

En ce qui concerne les RhoGTPases atypiques, leurs rôles dans l'initiation et la croissance tumorale sont beaucoup moins bien caractérisés, certaines d'entre-elles étant plutôt considérées comme des suppresseurs de tumeurs alors que d'autres pourraient à la fois stimuler ou inhiber la croissance tumorale en fonction du contexte. De fait, si Wrch2 est surexprimé dans certains cancers, Wrch1 qui est capable d'induire la transformation des fibroblastes *in vitro*, peut être aussi bien sur- que sous-exprimé dans certaines tumeurs. Parmi les protéines Rnd, seul Rnd3 a été mis en relation avec la progression tumorale.

Effectivement, il peut tout aussi bien inhiber la progression du cycle cellulaire qu'agir comme un facteur de survie. A ce jour, RhoD et RhoF ne semblent pas impliqués dans la prolifération ou la survie des cellules cancéreuses. RhoF est cependant surexprimé dans les lymphomes B. Les protéines RhoBTB sont considérées comme des suppresseurs de tumeurs car leurs gènes sont délétés dans certains cancers tels que les cancers mammaires et les cancers de la région tête-cou. Ils peuvent toutefois également être surexprimés dans certaines tumeurs. RhoH est la RhoGTPase atypique dont le rôle dans la progression tumorale est le mieux connu. Le réarrangement ou la mutation de son gène conduit à sa surexpression et contribuerait à la progression des lymphomes (Vega *et al.* 2008).

7.2. Rôle dans la progression tumorale, contribution à l'invasion et à la migration tumorale

L'invasion par les cellules de carcinome est initiée lorsque l'intégrité de l'épithélium est rompue permettant aux cellules malignes de franchir la barrière constituée par la membrane basale et de pénétrer dans le stroma (Vega *et al.* 2008). Les RhoGTPases RhoA, RhoC, Rac1 et Cdc42 jouent un rôle important dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) observée dans les tumeurs agressives (Figure 9) (Patel *et al.* 2005; Sequeira *et al.* 2008). Les feuilletts épithéliaux normaux sont caractérisés par une polarité cellulaire et un réseau organisé de jonctions spécialisées. L'EMT se définit par la perte du caractère épithélial au profit d'un phénotype fibroblastique et se caractérise par la disparition des jonctions adhérentes et serrées ainsi que par une motilité accrue et une expression génique altérée. On

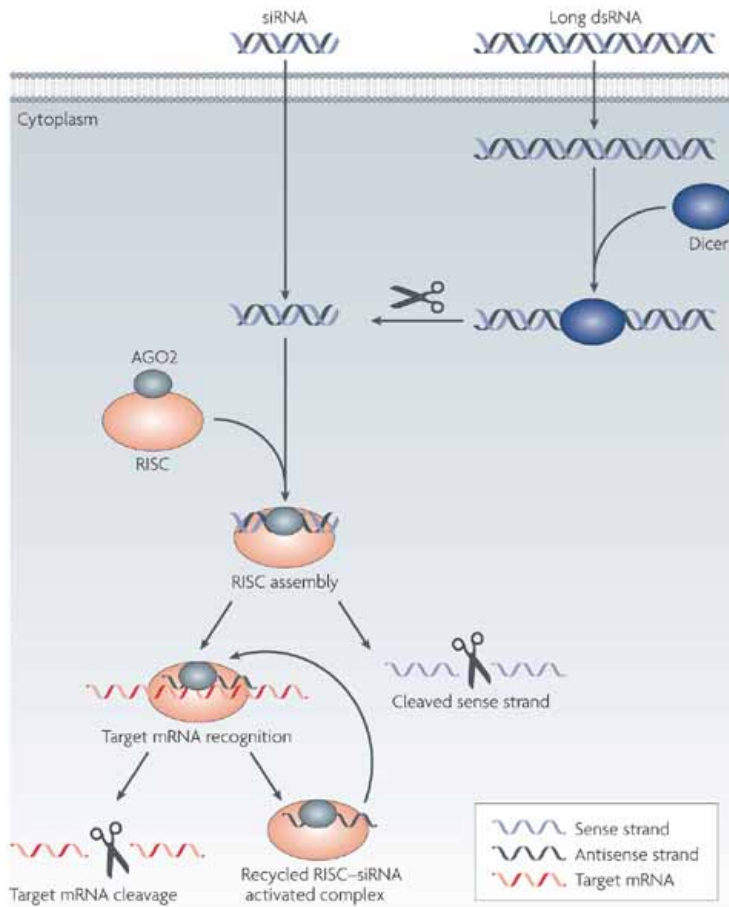
observe ainsi une réduction de l'expression de la E-cadhérine, protéine d'adhésion intercellulaire, et l'apparition de marqueurs d'origine mésenchymateuse tels que la vimentine et la N-cadhérine (Gilles *et al.* 1996; Sahai *et al.* 2002). Suite à la perte de polarité, les cellules tumorales acquièrent des structures d'adhésion à la matrice extracellulaire qui facilitent les processus d'invasion et de dissémination. Par ailleurs, certaines RhoGTPases comme RhoA et Rac1 peuvent réguler le niveau d'expression des protéines impliquées dans la dégradation et le remodelage de la matrice extracellulaire, les métalloprotéases matricielles (MMPs) et leurs inhibiteurs naturels (TIMPs). De plus, leur implication dans l'organisation dynamique du cytosquelette au cours de la migration contribue à la dissémination et à la formation des métastases. Finalement, certaines RhoGTPases, comme RhoC dans les cellules cancéreuses mammaires, sont capables de stimuler l'expression de facteurs angiogéniques contribuant de cette manière à la progression tumorale (Merajver *et al.* 2005).

II. Les petits ARN interférentiels

De nombreux outils sont utilisés pour l'étude du rôle des RhoGTPases dans les processus physiologiques et pathologiques. Parmi ceux-ci, on distingue les RhoGTPases dominantes inactives. Ces protéines mutées ne peuvent fixer que le GDP mais sont toutefois capables de se lier aux RhoGEFs déplaçant leur pool intracellulaire et les empêchent d'activer les RhoGTPases endogènes (Ridley *et al.* 1992; Luo *et al.* 1994). Cette approche expérimentale ne permet cependant pas de distinguer le rôle des protéines partageant les mêmes GEFs. Une autre stratégie consiste à utiliser des toxines bactériennes capables de bloquer l'activité des petites GTPases. C'est le cas par exemple de la C3 ADP-ribosyltransférase (C3 exoenzyme) de *Clostridium botulinum* et *Clostridium limosum* ou des glucosyltransférases (toxines A et B) de *Clostridium difficile* qui inhibent l'activité des RhoGTPases. Ces toxines ne sont pas exclusivement spécifiques d'une seule RhoGTPase. En effet, les toxines C3 ciblent RhoA, RhoB et RhoC tandis que les toxines A et B affectent toutes les RhoGTPases (Lerm *et al.* 2000). Il est aussi possible d'utiliser des inhibiteurs des effecteurs des RhoGTPases tel Y-27632 pour ROCK. Toutefois, l'analyse de tels résultats expérimentaux est rendue malaisée en raison du fait que plusieurs RhoGTPases partagent souvent les mêmes effecteurs. Une approche supplémentaire, de nouveau non spécifique, pour bloquer l'action des RhoGTPases est l'usage d'inhibiteurs des enzymes géranylgeranyltransférase, farnésyltransférase ou de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase) qui affectent les modifications post-traductionnelles permettant le ciblage

de la plupart des protéines de la superfamille Ras à la membrane plasmique (Walker *et al.* 2005).

Comme dans tous les domaines de la biologie moléculaire, l'avènement de l'interférence par les ARN a permis d'accroître la spécificité de l'étude des RhoGTPases. C'est en 1998 que Fire *et al.* ont montré que des ARN doubles brins (dsRNA) peuvent éteindre spécifiquement l'expression génique chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.* 1998). Les ARN interférentiels endogènes se retrouvent dans de nombreux organismes allant des nématodes aux mammifères en passant par les plantes. Ils ont une fonction défensive contre les acides nucléiques pathogènes notamment d'origine virale et une fonction régulatrice de gènes importants impliqués dans la mort cellulaire, la différenciation et le développement (Dykxhoorn *et al.* 2006). L'extinction de l'expression génique se fait par deux mécanismes : une inhibition transcriptionnelle décrite chez la levure, les plantes et plus récemment chez les mammifères ainsi qu'une inhibition post-transcriptionnelle beaucoup plus connue. Cette dernière fait appel à deux mécanismes : le clivage direct d'une séquence spécifique de l'ARN messager cible et la répression de la traduction protéique suivie par la dégradation de l'ARNm (Castanotto *et al.* 2009). Ce dernier processus est la modalité utilisée par les microARN (miRNA), petits ARN produits par transcription de séquence génique. Le processus de l'interférence par les ARN est déclenché par la présence d'ARN double brin (dsRNA) qui, une fois introduits ou produits dans la cellule, sont clivés par une enzyme nommée Dicer. Les fragments ainsi obtenus ont une taille de 21 à 23 nucléotides et sont communément appelés petits ARN interférentiels (siRNA) (Figure 10).



Nature Reviews | Drug Discovery

Figure 10 : Mécanisme de dégradation de l'ARN messenger par les petits ARN interférentiels (Whitehead et al. 2009). Les dsRNA sont clivés par l'enzyme Dicer en siRNA de 21 à 23 nucléotides. Ceux-ci sont reconnus et pris en charge par les protéines du complexe RISC. Les enzymes de ce complexe dissocient les doubles brins et clivent un des brins. Le brin restant associé à RISC permet la reconnaissance par ce dernier de l'ARNm cible et finalement sa dégradation. Le processus peut se répéter à de multiples reprises.

Il a été démontré en 2001 que les siRNA introduits directement dans des cellules de mammifères peuvent réprimer de manière spécifique mais transitoire l'expression d'un gène cible (Elbashir *et al.* 2001). Un avantage majeur de l'utilisation des siRNAs est que, à l'inverse des dsRNA, ils n'induisent que faiblement, voire aucunement, la réponse immunitaire d'activation de la voie des interférons, évitant ainsi une inhibition générale, non spécifique de l'expression de protéines cellulaires. Dans le cytoplasme, les siRNA sont pris en charge par un complexe protéique nommé RISC (RNA induced silencing complex) (Figure 10). Les diverses activités enzymatiques du complexe permettent la dissociation des deux brins du siRNA, le clivage d'un des deux brins et le maintien au sein de RISC du brin restant (Matranga *et al.* 2005), le choix du brin retenu étant déterminé comme étant celui dont l'extrémité 5' est la moins étroitement associée à son brin complémentaire (Schwarz *et al.* 2003). Grâce à ce petit ARN, RISC peut alors rechercher l'ARNm cible complémentaire et le dégrader (Figure 10). Le processus est régénératif et peut mener à la dégradation de nombreuses molécules d'ARNm, amplifiant ainsi le potentiel inhibiteur (Whitehead *et al.* 2009).

L'utilisation des petits ARN interférentiels permet d'étudier spécifiquement chacune des RhoGTPases malgré leur homologie parfois très élevée. C'est le cas de RhoA et RhoC dont la majorité des régulateurs et effecteurs sont communs et qui présentent une homologie de séquence en acides aminés supérieure à 90%. En raison de sa spécificité et de la puissance des inhibitions engendrées, l'utilisation de la technique de l'ARN interférentiel a suscité d'énormes espoirs en

siRNA	Company	Disease	Stage
Bevasiranib	Acuity Pharmaceuticals	Wet age-related macular degeneration	Phase III
		Diabetic macular oedema	Phase II
Sirna-027	Merck-Sirna Therapeutics	Wet age-related macular degeneration	Phase II
RTP801i-14	Quark Pharmaceuticals, and Silence Therapeutics	Wet age-related macular degeneration	Phase I/IIA
ALN-RSV01	Alnylam Pharmaceuticals	Respiratory syncytial virus infection	Phase II
NUC B1000	Nucleonics	Hepatitis B	Phase I
Anti-tat/rev shRNA	City of Hope National Medical Center, and Benitec	AIDS	Pilot feasibility study
CALAA-01	Calando Pharmaceuticals	Solid tumours	Phase I
TD101	TransDerm, and the International Pachyonychia Congenita Consortium	Pachyonychia congenita	Phase I

Figure 11 : Essais cliniques utilisant des siRNA (Castanotto et al. 2009).

thérapie humaine. Ceci explique en partie pourquoi les siRNA ont fait l'objet de nombreuses recherches visant à améliorer leur efficacité, leur durée d'action, leur résistance aux nucléases ainsi que leur délivrance aux cellules et tissus cibles. A ce jour, quelques siRNAs sont testés dans des essais cliniques pour le traitement notamment de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, de l'œdème maculaire chez les patients diabétiques et des infections dues au virus respiratoire syncytial pour ne citer que les essais les plus avancés (Figure 11) (Castanotto *et al.* 2009; Whitehead *et al.* 2009).

Buts et plan du travail

Les RhoGTPases, par leur rôle dans l'organisation dynamique du cytosquelette, interviennent dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que l'adhésion, la contractilité, la migration et la prolifération. Elles participent également à la régulation de l'activité transcriptionnelle. Des altérations de ces différentes fonctions sont largement impliquées dans la progression tumorale. Par ailleurs, de nombreuses études montrent que les RhoGTPases et notamment RhoA, RhoC, Rac1 et Cdc42 sont surexprimées dans les tissus tumoraux, surexpression souvent en relation avec le caractère invasif des tumeurs (Sahai *et al.* 2002; Ridley 2004; Vega *et al.* 2008). Les RhoGTPases représentent donc une cible thérapeutique anticancéreuse potentielle (Fritz *et al.* 2006). Nos travaux visent à préciser le rôle de différentes protéines de la famille Rho dans les fonctions cellulaires impliquées dans la croissance tumorale. Afin d'évaluer la contribution individuelle d'une RhoGTPase donnée faisant partie d'une famille de molécules présentant des homologies de séquence très élevées, la technique des petits ARN interférentiels nous a paru répondre aux exigences de spécificité requises. La première approche, réalisée *in vitro*, a visé à établir le rôle des RhoGTPases dans les fonctions cellulaires pertinentes aux propriétés des cellules tumorales. La seconde approche s'est adressée à l'utilisation des petits ARN interférentiels dans des modèles tumoraux *in vivo*.

La première partie de ce travail a été consacrée à la validation des siRNA comme outils biologiques performants. Ce volet, entamé lors de notre mémoire de DEA et finalisé au cours des premiers mois de nos

travaux de doctorat, a confirmé le rôle des RhoGTPases Cdc42 et Rac1 dans les fonctions mécaniques des fibroblastes humains, telles que la contractilité et la migration, par l'intermédiaire de la modulation de l'organisation du cytosquelette. Ce chapitre a également mis en évidence le rôle différentiel de RhoA et RhoC, deux RhoGTPases délicates à étudier individuellement étant donné leur homologie de séquence élevée, dans la régulation des propriétés migratoires des fibroblastes humains notamment. Plusieurs siRNA ciblant une même RhoGTPase ont été utilisés en vue de valider nos données. Ces résultats supportent l'efficacité et la spécificité des outils biologiques utilisés.

La deuxième partie de nos recherches s'est adressée à l'analyse des mécanismes de régulation des trois protéines de la sous-famille Rho et plus précisément à la régulation de RhoB, suppresseur de tumeurs potentiel, par ses homologues RhoA et RhoC. Ceux-ci contribuent à la croissance tumorale dans différents types cellulaires notamment des cellules d'adénocarcinome mammaire et prostatique. Des expériences de sauvetage du phénotype nous ont permis de valider nos résultats. Cette étude a démontré à nouveau l'intérêt de l'utilisation des siRNAs pour une meilleure compréhension de la régulation fine de ces protéines, concernant notamment le rôle de la forme liée au GDP dite inactive des RhoGTPases.

Le troisième volet de nos études s'est focalisé sur l'analyse du rôle différentiel de RhoA et RhoC dans la croissance tumorale dans un modèle de cellules d'adénocarcinome prostatique. Les analyses transcriptomiques, mettant en évidence la modulation différentielle de l'expression de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs ainsi que les mécanismes de leur régulation, ont été complétées par des expériences de tumorigenèse *in vitro* et une première approche *in vivo*.

Résultats : Partie I

Validation des siRNAs comme outils biologiques performants : évaluation du rôle des RhoGTPases dans les propriétés contractiles et migratoires des fibroblastes humains en relation avec l'organisation du cytosquelette.

Introduction

In vivo, les cellules interagissent avec leur matrice extracellulaire environnante constituée par un réseau tridimensionnel de protéines fibrillaires organisé au sein d'un gel hydraté de protéoglycans et de glycoprotéines. Les cellules adhèrent à cette matrice extracellulaire par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires dont les plus représentés font partie de la famille des intégrines. Suite à leur activation par leur liaison à des séquences consensus des protéines matricielles, les intégrines recrutent au niveau de leur domaine cytoplasmique des protéines structurales et de signalisation formant les adhésions focales. Ces structures permettent l'établissement d'un lien physique entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine. Ce couplage, indispensable à la transmission des forces mécaniques issues de la matrice (« outside-in ») ou générées par le cytosquelette (« inside-out »), est requis pour de nombreuses fonctions cellulaires telles que la migration, la contraction ou l'assemblage et le remodelage des protéines matricielles. Les protéines de la famille des RhoGTPases sont des protéines de signalisation relayant des signaux extracellulaires,

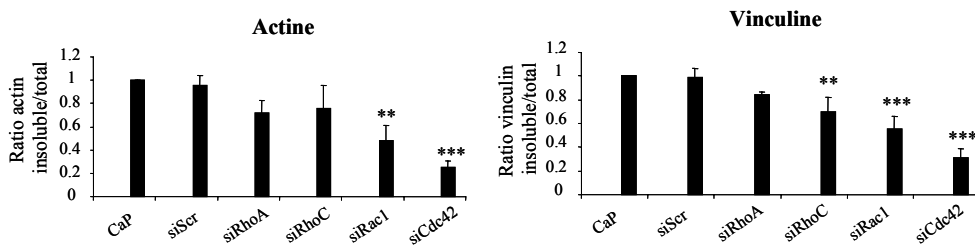


Figure 12 : Modulation de la distribution d'actine et de vinculine par l'extinction de l'expression des RhoGTPases dans des fibroblastes humains de derme. Analyse par Western blot des fractions insolubles et solubles dans le détergent non-ionique NP-40. Les différences significatives sont montrées par comparaison avec le contrôle siScr en utilisant le test statistique « ANOVA one way » suivie par un test de Tuckey-Kramer ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

chimiques et mécaniques, largement impliquées dans la dynamique du cytosquelette et le contrôle de nombreux processus cellulaires associés. A l'aide de siRNA spécifiques, nous avons évalué le rôle individuel de quatre membres apparentés de la famille des RhoGTPases RhoA, RhoC, Rac1 et Cdc42 dans les propriétés contractiles et migratoires des fibroblastes humains. Des doubles transfections ont permis en outre d'inhiber simultanément des couples de RhoGTPases.

Résumé des résultats

- La répression de l'expression de RhoA, RhoC, Rac1 et Cdc42 par transfection de siRNAs s'est révélée spécifique et efficace durant 5 à 7 jours pour au moins deux siRNAs différents ciblant deux séquences distinctes de l'ARNm de chacune des RhoGTPases étudiées. Nous avons noté d'emblée que l'inhibition de RhoC induit une surexpression de RhoA.

- Les changements de morphologie détectables par microscopie en contraste de phase des fibroblastes humains transfectés par les différents siRNA sont liés à des modifications de la distribution de l'actine polymérique (fibres de stress et corticale) et de la vinculine associée aux adhésions focales, comme le montre un marquage par la phalloïdine et un anti-vinculine réalisé trois jours après transfection. L'inhibition de l'expression de Rac1 et Cdc42 semble induire une réduction de la quantité d'actine fibrillaire et de la vinculine associée aux adhésions focales. Ces résultats morphologiques ont été quantifiés par Western blotting réalisés sur des échantillons obtenus par une extraction détersive différentielle permettant de séparer les protéines

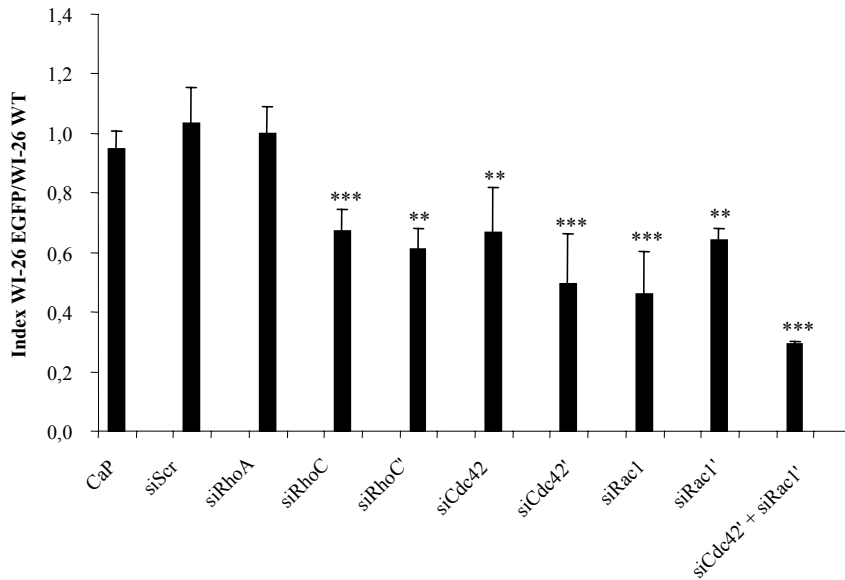


Figure 13 : Rôle des RhoGTPases dans la migration des fibroblastes humains. Index de migration des WI-26 EGFP transfectées par différents siRNA déterminé 24h après réalisation de la plaie. Les différences significatives sont montrées par comparaison avec le contrôle siScr en utilisant le test statistique « ANOVA one way » suivie par un test de Tuckey-Kramer ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

associées au cytosquelette des protéines devenant libres dans le cytoplasme (Figure 12). Ces analyses montrent que l'inhibition de l'expression de Rac1 ou de Cdc42 induit effectivement une réduction de la proportion d'actine polymérique insoluble dans le détergent. Par ailleurs, la répression de RhoC, Rac1 et Cdc42 conduit à une diminution significative du niveau de vinculine associée aux adhésions focales.

- La contribution des RhoGTPases dans les propriétés contractiles des fibroblastes a été étudiée dans le modèle des gels flottants de collagène. Dans ces conditions expérimentales, les fibroblastes exercent des forces de traction et compactent les fibres de collagène menant à une réduction progressive du diamètre et du volume de ces gels.

Les fonctions migratoires des fibroblastes ont été étudiées en réalisant des stries décellularisées (« wound assay ») *in vitro* et en analysant le recouvrement de ces zones après 24h. La transfection par siRac1 ou siCdc42 entraîne une réduction des capacités contractiles et migratoires des fibroblastes. Leur inhibition simultanée par une double transfection siRac1+siCdc42 induit un effet inhibiteur plus marqué de type additif (Figure 13).

- Nos résultats montrent également que RhoA n'est requis ni pour les fonctions contractiles ni pour les fonctions migratoires des fibroblastes. En revanche, si RhoC n'intervient pas dans les capacités contractiles des fibroblastes, il contribue par contre à leur migration (Figure 13). L'implication d'un processus de compensation entre RhoA et RhoC dans nos expériences a été écartée en réalisant des expériences de

double transfection siRhoA+siRhoC. Celles-ci ont donné des résultats équivalents à la simple transfection avec siRhoC.

Conclusions

Ces résultats suggèrent que Rac1 et Cdc42 participent à la formation de l'actine polymérique et des complexes d'adhésion. Ils indiquent également que, contrairement aux résultats publiés dans la littérature mais obtenus avec des outils moins spécifiques, RhoC mais non RhoA joue un rôle dans la formation des adhésions focales.

L'extinction de l'expression de Rac1 et Cdc42 induit une inhibition de la migration et des propriétés contractiles des fibroblastes. RhoC ne participe pas aux fonctions contractiles mais module leur migration tandis que RhoA n'est à nouveau pas impliqué.

Les modifications engendrées, notamment au niveau de l'organisation du cytosquelette et des fonctions cellulaires qui en dépendent, par les siRNA ciblant les RhoGTPases des trois classes principales de cette famille supportent l'efficacité et la spécificité de ces outils biologiques et valident leur utilisation dans la suite de nos travaux.

Differential modulation of migratory and contractile behaviour of fibroblasts by silencing RhoA, RhoC, Rac1 and Cdc42

T.T. Giang HO, Charles A. LAMBERT, Sandrine SERVOTTE, Pierre MINEUR, Charles M. LAPIERE, Betty V. NUSGENS and Christophe F. DEROANNE[§]

Laboratory of Connective Tissues Biology, University of Liège, Tour de Pathologie, B23/3, B-4000 Sart Tilman, Belgium

[§] To whom correspondence should be addressed at Laboratory of Connective Tissues Biology, University of Liège, Tour de Pathologie, B23/3, B-4000 Sart Tilman, Belgium.
Tel.: +32 (0)4 366 24 59; Fax: +32 (0)4 366 24 57; Email: c.deroanne@ulg.ac.be

Abstract

The small GTPases of the Rho family are involved in signalling events initiated by integrins and have been implicated in the contractile and migratory properties of cells. The function of RhoA, RhoC, Rac1 and Cdc42 in fibroblasts was assessed by means of siRNA. With the exception of an up-regulation of RhoA following the repression of RhoC, the silencing of the three other RhoGTPases did not modulate the expression of the non-silenced RhoGTPases. Silencing RhoC, Rac1 or Cdc42 induced cytoskeletal modifications that were quantified by a differential non-ionic detergent extraction. The silencing of Rac1 and Cdc42 induced a highly significant reduction of the non extractable actin and vinculin, associated with the cytoskeleton and the focal adhesions, while the silencing of RhoC decreased only the vinculin associated with the focal adhesions. The contractile properties of the fibroblasts were evaluated in a floating three-dimensional collagen gel assay. The silencing of Cdc42 or Rac1 significantly repressed the fibroblast-mediated collagen gel retraction. By contrast the silencing of either RhoA, RhoC or RhoA and RhoC did not affect the collagen gel retraction. The silencing of RhoC, Rac1 or Cdc42 significantly repressed the migration of fibroblasts tested in an *in vitro* wound assay while the silencing of RhoA had no

effect. These results emphasise the key role played by Rac1 and Cdc42 in the contractile and migratory properties of fibroblasts. Our siRNA approach revealed that RhoA was not involved in these cellular functions while RhoC operated only in cell migration.

Keywords: RhoA, RhoC, Rac1, Cdc42, siRNA, cytoskeleton, migration, contraction, collagen-gel, fibroblasts.

Introduction

In vivo, most cells interact with a three-dimensional network of polymeric macromolecules, the extracellular matrix (ECM), through transmembrane receptors of the integrin family. These receptors integrate the biological and mechanical signals issued from the ECM at specific sites of cell-matrix interactions, the focal adhesions. The integrins and the focal adhesions provide a physical continuum between the ECM and the cytoskeleton. This coupling allows the transmission, inside-out and outside-in, of mechanical forces required for cellular functions such as migration, assembly and architectural remodelling of the ECM. Members of the RhoGTPases family and their effectors have been implicated in these cellular events, but their contribution is quite variable depending on the experimental model [1, 2]. The tools used up to now to decipher the individual function of the

closely related RhoGTPases such as bacterial toxins, pharmacological agents are compromised by their lack of specificity. Moreover, the schematic view implying that the GTP-bound form is active and the GDP-bound form inactive is probably too simplistic [3]. Conventional tools mask a potential contribution of the GDP-bound form to intracellular signalling. These limitations can be bypassed thanks to a siRNA-based approach which allows analysis of closely related proteins and reveals the specific contribution of each of them. Moreover, the exquisite flexibility of this technology allows multiple knock-down experiments that can be used to dissect signalling pathways even in primary cells that are refractory to transfection of plasmids [4].

The current study was carried out to evaluate the contribution of 4 members of the small GTPases of the Rho family, i.e. RhoA, RhoC, Rac1 and Cdc42, to the contractile and migratory properties of human fibroblasts. They were analysed respectively in a free floating collagen gel model - where the gel contraction reflects the level of inward-pulling forces within the cells - and in a migration wound assay used as a model of integrated mechanical functions. Our results point to the key role played by Rac1 and Cdc42 in the contractile and migratory properties of fibroblasts. The siRNA approach allowed to analyse separately the contribution of RhoA and RhoC in fibroblasts and revealed that RhoA was not involved in these cellular functions while RhoC was only involved in migration.

Materials and methods

Cell culture

Human primary skin fibroblasts (HSF) were collected by explants outgrowth as described earlier [5]. Cells were regularly passaged by trypsin-EDTA and used between passages 9 and 13. Transformed SV-40 human lung fibroblasts (WI-26 cell line ATCC CCL 95.1) and HSF were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cambrex) at 37°C in 5% CO₂. WI-26 cells transformed with a vector allowing expression of Enhanced Green Fluorescent Protein under the control of a CMV promoter (WI-26 EGFP) were cultured in the same culture medium supplemented with puromycin (0.5 µg/ml) [6].

Reagents

The mouse monoclonal antibody against RhoA (clone Sc-418) and the rabbit polyclonal antibody directed to RhoA and RhoC (Sc-179) were purchased from Santa Cruz Biotechnology, against Cdc42 from Transduction Laboratories and against Rac1 (clone 05-389) from Upstate. The rabbit polyclonal antibody to p42/44 MAPK (M-5670), the mouse monoclonal anti-vinculin (V9131), anti-actin (A4700) and FITC-Phalloidin were purchased from Sigma-Aldrich. The secondary horseradish peroxidase conjugated antibodies (rabbit anti-mouse P0260 and swine anti-rabbit P0217) were from DAKO. The TRITC-coupled anti-mouse was from Molecular Probes and bis-benzimide from Calbiochem.

Design of siRNA and transfection procedures

The sequences of siRNAs targeting RhoA, RhoC, Rac1 and Cdc42 as well as the randomly mixed sequence of the siRNA targeting RhoA used as control (siScr) are detailed in table 1. The 21 nucleotides siRNAs (19 sens and antisens target sequences followed by 2 T) were chemically synthesized, desalted, deprotected and purified by using polyacrylamide-gel electrophoresis (PAGE) (Eurogentec). siRNA annealing was performed following manufacturer's instruction at a final concentration of 20 µM. Cells attached for 24 h were transfected by siRNAs using calcium phosphate precipitation. A mix containing 285 µl RNase free H₂O, 32.5 µl 2.5 M CaCl₂, 8 µl 20 µM siRNA and 325 µl HBSP 2X (NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1.5 mM, glucose 12 mM, KCl 10 mM, HEPES 50 mM, pH 7.05) was prepared extemporaneously and immediately added to the culture dishes containing 8 ml of DMEM supplemented with 10% FBS. After 14 to 16 h of incubation at 37°C-5% CO₂, cells were washed twice with PBS before incubation with fresh culture medium for the indicated period of time. The efficiency of transfection was tested by Western blot analysis in all reported experiments.

Cell morphology and immunohistochemistry

siRNAs transfected human skin fibroblasts were seeded on 4-wells LabTek® chambered coverglasses (Nalge Nunc). After 24 h, cells were washed twice with ice-cold PHEM (PIPES 60 mM, HEPES 25 mM, EGTA 10 mM, MgCl₂ 2 mM). The cytosolic components were extracted *in situ* by 15 min incubation with ice-cold extraction buffer (NaCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM, TRIS-HCl 10 mM, NP-40 0.1%). The remaining detergent insoluble components including polymerized cytoskeleton and adhesion plaques were fixed with 3% formaldehyde in PBS for 30 min at room temperature, washed with PBS, treated with 0.1% Triton X-100 and washed again. For labelling, they were incubated for 1 h with anti-vinculin, then for 1 h with the secondary antibody, for 20 min with FITC-phalloidin and finally for 20 min with bis-benzimide. After washing, cells were mounted and observed under oil immersion with a

Zeiss Axiovert 25 microscope coupled with an Axiocam Zeiss camera allowing analysis of images using a KS Kontron program.

Cell fractionation

The subcellular distribution of actin and vinculin was analysed as previously described [7]. Briefly, siRNAs transfected fibroblasts cultured on 6-wells plates were washed with PHEM buffer and extracted with NP-40 buffer on ice. After 15 min, the soluble fraction was removed and complemented with SDS-PAGE buffer. The insoluble fraction was lysed with an equal volume of the same PHEM-SDS-PAGE mixture. The proteins were separated by SDS-PAGE and actin and vinculin levels were analysed by Western blotting as detailed below.

Western blotting

Cells were lysed in SDS-PAGE lysis buffer and proteins were separated by polyacrylamide gel electrophoresis. 15%, 12.5% and 7.5% acrylamide gel were used for the RhoGTPases, actin and vinculin, respectively. Proteins were transferred to a PVDF Transfer Membrane (NEN Life Science Products). Membranes were blocked for 1 h with 3% dry milk in PBS-0.05% Tween 20 and incubated for 1 h with the diluted primary antibody. Membranes were then washed three times and incubated in the diluted secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody for 1 h. After washing, immunoreactivity was revealed by chemoluminescence using the ECL kit (Amersham Biosciences) and X-ray film exposure. The membranes were re probed with anti-Erk1,2 antibodies to control protein loading.

Active GTPase assays

The assay was carried out as previously described [8]. Briefly, cells were chilled on ice and lysed in ice-cold buffer containing 1% Triton X-100, 25 mM HEPES pH 7.3, 150 mM NaCl, 4% glycerol, 0.1 mM PMSF, 4 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin and 1 µg/ml pepstatin. Lysates were centrifuged for 8 min at 13000g. Supernatants were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used. An aliquot of each supernatant was denatured in SDS-PAGE lysis buffer before freezing to measure the total RhoGTPase content by Western blotting. For pull-down assays, supernatants were incubated for 30 min with 30 µg of GST-PBD protein containing the Cdc42 and Rac binding region of PAK-1B, or GST-RBD protein containing the Rho binding region of rhotekin, affinity linked to glutathione-Sepharose beads [9, 10]. The beads were washed 4 times in lysis buffer and boiled in 60 µl SDS-PAGE lysis buffer.

mRNA measurement by RT-PCR

Total RNA was extracted from cell cultures with the High Pure RNA Isolation kit (Roche Molecular Biochemicals) as described by the manufacturer. Ten ng of RNA were reverse-transcribed and amplified using the GeneAmp ThermoStable rTth Reverse Transcriptase RNA PCR kit (Perkin Elmer) and specific pairs of primers (Eurogentec). A known copy number of an original synthetic internal standard was used for 28S rRNA [11]. Primers for RhoA were:

forward 5'-TCGATATCTGCCACATAGTTCTCAAA-3',
reverse 5'-CATTAGTCCACGGTCTGGTCTCA-3',
for RhoC: forward 5'-TCCAGGCTGTCAGGGCTGTCGA-3', reverse 5'-GACCTGCCTCTCATCATCGTCTTCA-3', for 28S: forward 5'-GTTACCCACTAATAGGGAACGTGA-3', reverse 5'-GGATTCTGACTTAGAGGCGTTCAGT-3'. The RT step (70°C for 15 min) was followed, after 2 min incubation at 95°C for denaturation of RNA/DNA heteroduplexes, by PCR amplification for the adequate number of cycles and terminated by a final elongation step of 2 min at 72°C. The PCR conditions for amplification of RhoA (24 cycles), RhoC (24 and 27 cycles) and 28S rRNA (18 cycles) were 94°C for 15 s; 66°C for 20 s and 72°C for 10 s. The PCR products were analysed on a 10% polyacrylamide gel and the signals quantified using Fluor-S MultiImager (BioRad) after staining with GelStar dye (FMC BioProducts).

Three-dimensional collagen gel retraction assay

The collagen gel retraction assay was performed as previously described [12]. Briefly, purified bovine skin type I collagen (final collagen concentration of 0.6 mg/ml) was mixed with Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco) supplemented with sodium bicarbonate (42 mM), glutamine (3.3 mM), ascorbic acid (0.47 mM), penicillin-streptomycin (100 units/ml) and fetal bovine serum (10% final concentration). All steps were performed on ice. Human skin fibroblasts (5.10^4 cells) were added and the mixture was poured in 60 mm bacteriological dishes (Nalge Nunc International) and maintained at 37°C under 5% CO₂. After polymerization, the collagen gels were detached from the sides and bottom of the dishes. The diameter of the gels was measured daily for 5 days. After 5 days, the collagen gels were washed with PBS and digested with 1 mg/ml of collagenase (C-9891, Sigma-Aldrich) for 15 min at 37°C. Cells were collected by centrifugation and sonicated in 250 µl PBS. The DNA content was measured by a fluorimetric procedure using bis-benzimide [13].

Migration assay

WI-26 EGFP were transfected with the various siRNAs and mixed with WI-26 wild type in the respective proportion of 20% and 80%. The mixed cultures were then seeded on 4-wells Lab-Tek®. After one day cells have formed a confluent monolayer. The monolayer was wounded by a scratch performed with a sterile P1000 pipette tip along the centre of each well. Several representative images of the scratched areas under each condition were photographed after 0, 8, 24, 32 and 48 h in both phase contrast or under UV illumination (488 nm). For EGFP cells, the emitted light had a wavelength of 506 nm.

The migration rate was evaluated 24 h after wounding. A mean wound width was determined at t=0 by averaging the width of three randomly chosen regions of a single wound. This average width was reported on images photographed at t = 24 h and the

number of cells between the lines was counted both in phase contrast and in UV light (siRNAs transfected cells). An index of migration was determined as the mean percentage of migrating siRNAs treated WI-26 EGFP to the mean percentage of WI-26 EGFP at $t = 0$. An index of 1 means that the siRNA has no effect on cell migration, higher than 1 indicates an increased migration and lower than 1 a reduced migration as compared to non transfected cells.

$$\text{Index of migration} = \frac{(\% \text{ EGFP cells/total cells})_{t=24 \text{ in the wound}}}{(\% \text{ EGFP cells/total cells})_{t=0}}$$

Results

Silencing of RhoGTPases in human fibroblasts

Inhibition of the expression of RhoGTPases RhoA, RhoC, Rac1 and Cdc42 was performed with specific small interfering RNAs (siRNAs) in HSF and WI-26 fibroblasts. As described recently for HSF [4], an inhibited expression of the GTPases was already observed one day after transfection, maximal three days after and lasted until 7 days after the introduction of the siRNA into cells. The scrambled sequence of the siRNA targeting RhoA was used as a negative control (siScr). Transfection with the siScr as well as with calcium phosphate alone had no effect on the Rho proteins level. The efficiency and the specificity of each siRNA are illustrated in Fig. 1 and Fig. 2.

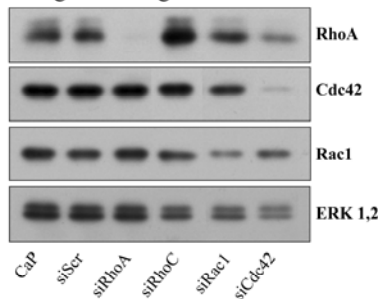


Fig. 1: Silencing of RhoA, Rac1 and Cdc42 by siRNAs in primary human skin fibroblasts. Cells were transfected with siRNA targeting RhoA (siRhoA), RhoC (siRhoC), Rac1 (siRac1) and Cdc42 (siCdc42). Fibroblasts transfected with siScr or treated with calcium phosphate alone were used as controls. 72 h after transfection, the cells were lysed in SDS-PAGE loading buffer and analysed by immunoblotting using antibodies to RhoA, Cdc42, Rac1 and ERK 1,2.

Three days after transfection, a reduction of more than 90% of the protein level of RhoA and Cdc42 was observed while the extinction of Rac1 was around 70% (Fig. 1). The mRNA of RhoC was reduced by more than 80% (Fig. 2, top). By using a polyclonal antibody recognizing both RhoA and RhoC, we observed that the double transfection of HSF with siRhoA and siRhoC induced an extinction of the expression of both proteins (Fig. 2, bottom).

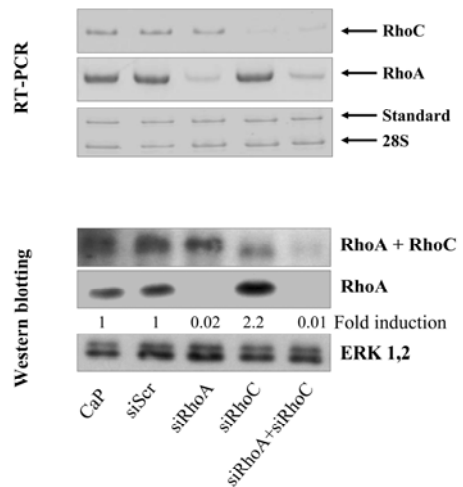


Fig. 2: The silencing of RhoC induced an increase in RhoA protein. Fibroblasts were transfected with siRhoA, siRhoC or siRhoA and siRhoC (siRhoA+siRhoC). Fibroblasts transfected with siScr or treated with calcium phosphate alone were used as controls. Cells were lysed 72 h after transfection. **A:** Representative RT-PCR analysis of RhoA and RhoC mRNA levels, and 28S rRNA levels in RNA extracted from transfected fibroblasts. **B:** Representative western-blot analysis of whole cell lysates using antibodies recognizing RhoA or RhoA and RhoC (RhoA+RhoC), or antibodies to ERK1,2. The fold induction is calculated from densitometric measurements of RhoA signal in lysates of siRNA-transfected fibroblast normalized to RhoA signal in calcium phosphate-treated fibroblast.

No modification of the level of the non-targeted RhoGTPases was observed in the cells transfected with the siRhoA, siRac1 and siCdc42. By contrast, the siRhoC transfected cells presented a two-fold increase of the RhoA at the protein level (Fig. 1 and 2). Pull-down experiments confirmed that a two-fold increase of GTP-bound RhoA was observed in RhoC-silenced cells while the active forms of

Rac1 and Cdc42 were not modified (not shown).

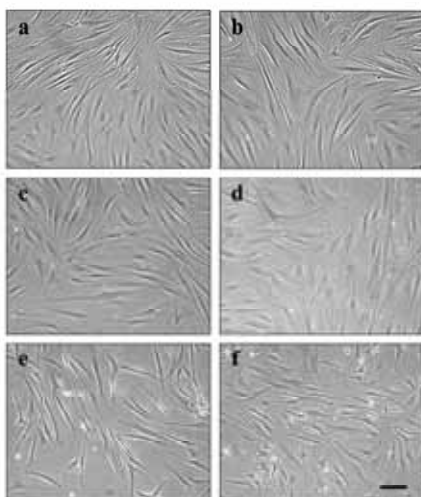


Fig. 3: Morphological effects of RhoA, RhoC, Rac1 or Cdc42 silencing. Representative phase-contrast images of human fibroblasts 72 h after treatment with calcium phosphate alone (a), or transfected with siScr (b), siRhoA (c), siRhoC (d), siRac1 (e) or siCdc42 (f). Bar = 100 μ m.

Effects of RhoGTPases silencing on fibroblasts morphology

The inhibition of the RhoGTPases affected the morphology of HSF as seen by phase contrast microscopy (Fig. 3), the silencing of RhoC lead to a more spread shape and increased cell surface, Rac1-silenced fibroblasts were smaller and thinner with less lamellipodia while the Cdc42-silenced fibroblasts were also thinner but presented more cytoplasmic projections. By contrast, the suppression of RhoA did not induce any significant shape alteration. These observations suggested the existence of cytoskeletal alterations in fibroblasts transfected with the various siRNAs. The fibrillar actin and the focal adhesions were labelled respectively with phalloidin-FITC and an anti-vinculin antibody.

The silencing of RhoA did not alter the general shape and the cytoskeleton of the cell while the silencing of RhoC induced a more spread shape with multidirectional stress fibres. The inhibition of Cdc42 altered the general shape of the cell and the actin cytoskeleton, the actin stress fibres were less abundant and the focal complexes

reduced and mostly observed at the cell edges. The suppression of Rac1 resulted in reduced focal complexes at the edges of the cells and more diffuse and rarified actin stress fibres (Fig. 4).

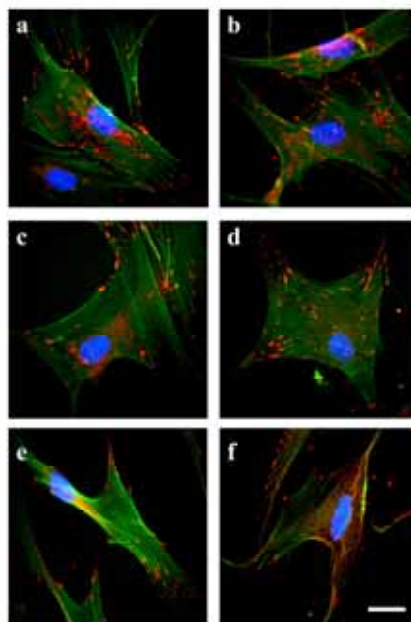


Fig. 4: Alteration of the actin-cytoskeleton and of the focal adhesion following silencing of RhoA, RhoC, Rac1 or Cdc42. Human fibroblasts were fixed 72 h after transfection with calcium phosphate alone (a), siScr (b), siRhoA (c), siRhoC (d), siRac1 (e) or siCdc42 (f) and analysed by immunofluorescence labelling with bisbenzamide (nucleus-blue), phalloidin-FITC (actin-green) and anti-vinculin antibody (red) after NP-40 extraction. Bar = 25 μ m.

Analysis of the subcellular distribution of actin and vinculin in RhoGTPases-silenced HSF

To quantify the modifications of actin and vinculin observed by immunohistochemistry, HSF transfected with the various siRNAs for three days were treated with NP-40 buffer to extract the cytoplasmic fraction of the cells. The soluble and insoluble fractions in NP-40 were analysed by Western blotting (Fig. 5A and B). In the control conditions, i.e. calcium phosphate-treated or siScr-transfected fibroblasts, actin distributed equally between both fractions (Fig. 5A) while the majority of vinculin (80%) was in the soluble fraction (Fig. 5B).

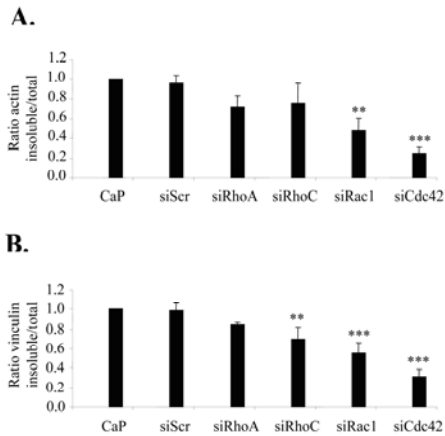


Fig. 5: Effect of the silencing of the RhoGTPases on the distribution of the actin and of the vinculin in HSF. The NP-40 insoluble and NP-40 soluble fractions of siRNAs transfected fibroblasts were analysed by Western blotting with the anti-actin (A) and anti-vinculin (B) antibodies. The ratio insoluble/total was calculated from densitometric measurements of vinculin or actin signals. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. Significant differences by comparison to siScr are shown for ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ by statistical test ANOVA one way followed by Tukey-Kramer test.

The distribution of vinculin and of actin was not significantly modified in RhoA-silenced cells as compared to control conditions. The silencing of RhoC induced a reduction of vinculin in the insoluble fraction but did not modify significantly the actin distribution. In Rac1 and Cdc42-silenced cells the amount of actin and vinculin in the insoluble fraction was dramatically reduced.

Modulation of the contractile properties of the fibroblasts by RhoGTPases silencing

The effect of each RhoGTPase on the contractile properties of the HSF was evaluated in freely-retracting collagen gels populated with siRNA-transfected fibroblasts. In this model, the tractional forces exerted by fibroblasts are reflected by the decrease over time of the diameter of the gels. Preliminary experiments showed that 10^4 fibroblasts/ml and 0.6 mg/ml (final concentration) of type I collagen allows the analysis of gel contraction for up to five days.

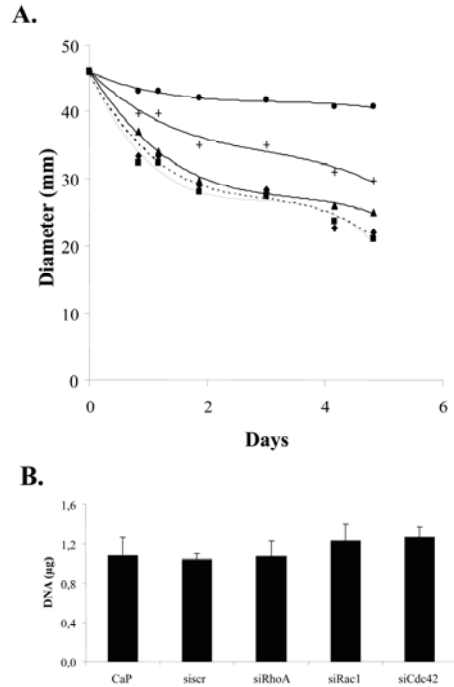


Fig. 6: Rac1 and Cdc42, but not RhoA, are involved in HSF mediated collagen gel retraction. A: SiRNAs-transfected HSF were embedded in collagen gels. A: The diameter was measured daily for 5 days. Cell density is controlled as described in materials and methods after digestion of the gels with collagenase. HSF were transfected with siRhoA (▲), siRac1 (+) or siCdc42 (●). HSF treated with CaP alone (■) or transfected with siScr (◆) were used as controls. Standard deviation was lower than the size of the icons. One representative experiment out of three is shown. B: The DNA content in the gels was determined after 5 days of culture as described in Materials and methods.

CaP and siScr treated cells induced a similar contraction of the collagen gels which was rapid during the first 24 h and slowed-down between day 1 and day 5. In both conditions, the gels reached a similar final diameter. The extinction of Cdc42 induced a strong inhibition of the fibroblasts-mediated collagen gel retraction. This inhibition was already observed after 24 h and lasted until the end of the experiment at day 5. The silencing of Rac1 also reduced significantly the contraction of the collagen gels, but its effect was less pronounced than silencing Cdc42 (Fig. 6). The inhibition of collagen gel contraction, although slightly less pronounced was

confirmed by using a second siRNA targeting Cdc42 or Rac1 (not shown). By contrast, the suppression of RhoA did not significantly influence the contraction rate of the 3-D collagen gels. In order to investigate the role of RhoC in gel contraction and to determine if RhoA could compensate for RhoC silencing, since silencing RhoC induced a two-fold up-regulation of RhoA at the protein and activity level (Fig. 2), single transfection of siRhoC, siRhoA and double transfection of siRhoA and siRhoC were carried out in parallel (Fig. 7). Neither the individual silencing nor the double silencing RhoA+RhoC significantly altered the rate of gel retraction as compared to control conditions (Fig. 7).

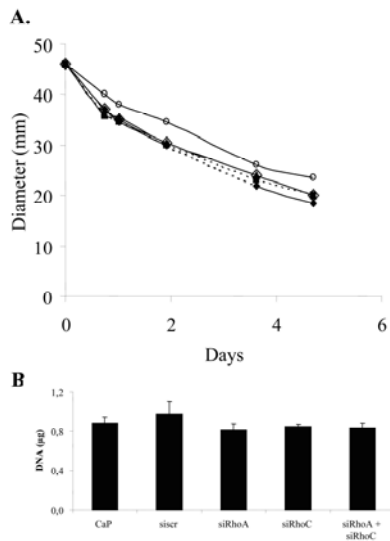


Fig. 7: Neither RhoA nor RhoC are involved in HSF mediated collagen gel retraction. SiRNAs-transfected HSF were embedded in 3-D collagen gels. The diameter was measured daily for 5 days. Cell density is controlled as described in materials and methods after digestion of the gels with collagenase. HSF were transfected with siRhoA (▲), siRhoC (○) and double-transfected siRhoA and siRhoC (◇). HSF treated with CaP alone (■) or transfected with siScr (◆) were used as controls. Standard deviation was lower than the size of the icons. One representative experiment out of three is shown. **B:** The DNA content in the collagen gels was determined after 5 days of culture as described in Materials and methods

The up-regulation of RhoA and the lack of effect on gel retraction were confirmed using a second siRNA sequence targeting RhoC (not shown). These data demonstrate that neither RhoA nor RhoC are required for fibroblast-mediated collagen gel retraction. It should be noted that a similar DNA content was measured in each condition at the end of the experiments demonstrating that differences in gel retraction were not caused by variations in cell density (Fig. 6B and Fig. 7B).

RhoA is not required for fibroblast migration.

Fibroblast migration was analysed in an *in vitro* wound assay. Human fibroblasts (WI-26) stably expressing Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) were transfected with the various siRNAs. These WI-26 EGFP transfected cells were mixed with wild type WI-26, used as internal control, at a ratio of 20:80. This cell mixture was seeded in 4-wells LabTek®. After 24 h, the cells were confluent. A scrape wound of approximately 600 µm width was made in the cell monolayer. The phase-contrast images allowed to quantify the total cell population whereas the same field photographed under UV-light showed only the siRNAs transfected cells expressing EGFP (Fig. 8). Migrating cells exhibited a polarized shape with ruffling lamellipodia at the leading edge. After 8 h, cells began to fill the gap and wound closure was completed after 48 h. We choose 24 h as the optimal time to analyse cell motility (Fig. 8A). Neither the expression of EGFP, nor the transfection reagent nor the transfection with the control siRNA affected cell migration (Fig. 8 and data not shown).

The silencing of Cdc42 as well as the silencing of Rac1 reduced significantly the migration rate. An inhibition of migration (30%) was observed with the first siCdc42 while the inhibition reached 50% with the second siCdc42. The silencing of Rac1 induced a more dramatic inhibition of WI-26 EGFP migration. An inhibition of 60% was observed with the first siRNA targeting Rac1 and of 40% with the second siRac1. The simultaneous suppression of Cdc42 and Rac1 in the EGFP cells reduced even

more the migration rate (near 70%) (Fig. 8B).

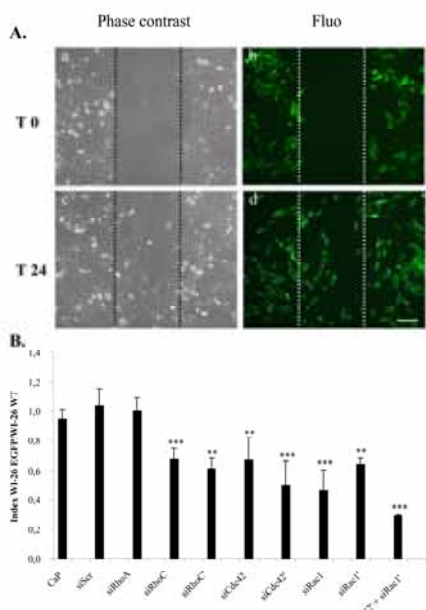


Fig. 8: RhoA is not involved in fibroblast motility.
A. Representative gap closure in scratch assay just after (T0) or 24 h after (T24) wounding the fibroblast monolayer. a, c: phase contrast microscopy b, d: fluorescent microscopy showing the siScr transfected WI-26 EGFP. Dashed lines show initial gap width. Bar = 100 μ m. **B.** The index of migration of WI-26 EGFP cells transfected with either CaP alone, siScr, siRhoA, siRhoC, siRac1, siCdc42 or siRac1+siCdc42 was determined at t = 24 h as described in Materials and Methods. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. Significant differences by comparison to siScr are shown for * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ by statistical test ANOVA one way followed by Tukey-Kramer test.

Interestingly, fibroblast migration was not affected by RhoA silencing. By contrast, the silencing of RhoC using two different siRNAs reduced the migration rate of the transfected cells by 30% to 40%. These results support the hypothesis that RhoC is involved in fibroblast migration while RhoA does not seem to play a role in this mechanical function. However, the inhibition of migration following RhoC silencing could be due to RhoA up-regulation. This is not the case since the inhibition of migration observed following double silencing RhoA+RhoC is equivalent to the inhibition of migration observed by silencing of RhoC alone (Fig. 9).

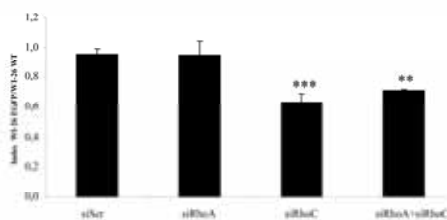


Fig. 9: Inhibition of fibroblast migration by siRhoC is not mediated by RhoA up-regulation. The index of migration of WI-26 EGFP cells transfected with either Cap alone, siScr, siRhoA, siRhoC, siRac1, siCdc42 or siRac1+siCdc42 was determined at t = 24 h as described in Materials and Methods. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. Significant differences by comparison to siScr are shown for * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ by statistical test ANOVA one way followed by Tukey-Kramer test.

Discussion

RhoGTPases are molecular switches shuttling between an inactive GDP-bound state and an active GTP-bound state. This dogmatic view implies that signalling is mediated solely by the GTP-bound form. However, the GDP-bound state is probably also involved in the regulation of intracellular signalling. Indeed, Cdc42GDP was reported to repress the Erk1,2 pathway [3]. The use of small interfering RNAs to assess the functions of the RhoGTPases RhoA, RhoC, Rac1 and Cdc42 will give a more global picture of their implication in the regulation of the phenotype of human fibroblasts by ablation of both GDP- and GTP-bound forms and open the way to uncover original regulatory pathways. This approach allowed us to highlight the negative regulation of MMP-1, MCP-1 and IL-8 expression by Cdc42 [4]. Further, it allows to discriminate between closely related proteins such as RhoA and RhoC. Non gene-specific effects have been reported by Bridge et al. [14] and Sledz et al. [15] who showed that an interferon response was activated with the 21-nucleotides duplex in contrast to previous studies [16]. No such side effect was observed in our cells [4]. The repression of RhoA, Rac1 and Cdc42 in HSF did not induce any compensatory regulation of the non-silenced RhoGTPases by contrast to previous studies using overexpression of mutated dominant negative RhoGTPases [10]. This could be related to our model but

also to the exquisite specificity of the siRNA. By contrast, the up-regulation of RhoA observed in siRhoC-transfected cells suggests that RhoC is a negative regulator of RhoA. Our results are consistent with the recent study of Simpson et al. [17] where RhoA was also up-regulated at the protein level in RhoC-silenced breast carcinoma cells. Together, these results suggest a general compensatory effect rather than a cell-type restricted process.

Analysis of the distribution of vinculin and actin between detergent-resistant and detergent-soluble fractions as well as immunofluorescence morphological investigation of the actin stress fibres and of the vinculin-containing adhesions indicate that the inhibition of Rac1 and Cdc42 affects both the actin cytoskeleton and the focal adhesions. Polymeric actin and stress fibres as well as insoluble vinculin and the number of focal complexes are reduced after silencing of Rac1 or Cdc42. This agrees with the observations of Aspenstrom et al. [18] who demonstrated an increase of stress fibres and focal complexes in cells expressing constitutively activated Rac1 and Cdc42. These cytoskeletal modifications should be related to the activation by Rac1 and Cdc42 of WASP family members that stimulate Arp2/3 to nucleate actin, induce its polymerization and drive the formation of lamellipodia and filopodia. Rho-dependent activation of ROCK was reported to mediate the formation of the acto-myosin stress fibres and focal adhesions [19]. The approach of that study can however not discriminate between the contribution of RhoA and RhoC. These RhoGTPases have more than 90% homology in amino acids sequence and share the same downstream effector ROCK. The silencing of RhoA alone did not modify the proportion of actin in the stress fibres, of vinculin in focal adhesions and did not alter cell morphology. By contrast, RhoC silencing decreased the proportion of vinculin in the focal adhesions and induced a more spread morphology. A similar phenotype was reported in fibroblasts treated with the ROCK inhibitor Y-27632 [20]. This suggests that RhoC is the main ROCK activator in fibroblasts as already proposed by others [21].

Cell contractility and migratory capacities are essential in many processes as embryonic development, wound healing, fibrosis, tumor invasion and metastasis. The contractile properties of the cells have been investigated *in vitro* using cell-populated collagen gels [12]. The contraction of gels is due to the traction forces exerted by the fibroblasts during attachment, spreading and migration on the collagen fibres [22]. Silencing Rac1 or Cdc42 induced a significant inhibition of gel contraction. Similar data were obtained with two siRNA targeting different sequences of the RhoGTPase mRNA. A similar cell density was measured in the retracted collagen gels populated with control, calcium phosphate-treated and siRNA transfected fibroblasts ruling out a modification of cells number by alteration of survival or proliferation. The difference of gel retraction could also be related to a modified regulation of MMP-1 as reported recently in Cdc42-silenced fibroblast cultured in monolayer on plastic [4]. However, in our model of free-floating collagen gels most of the metalloproteinases are largely up-regulated [22, 23] and no difference in the expression of a large panel of MMPs was observed upon treatment with the various siRNA (Ho et al., unpublished data). Several, non mutually exclusive hypotheses could explain the reduced retraction rate by silencing Rac1 and Cdc42. First, Rac1 and Cdc42 trigger the formation by fibroblasts seeded in collagen matrices of cytoplasmic extensions shown to be involved in the contractile forces [24]. Second, the deregulation of actin and vinculin organisation following Rac1 and Cdc42 silencing could affect the attachment and the spreading of the cells on the collagen fibres. Third, the inhibition of gel contraction by Cdc42 silencing may be due to decreased contractility of the acto-myosin machinery as suggested by alterations of the organization of actin stress fibres.

Previous studies reported a role for Rho and its effector ROCK in the contractile forces exerted by fibroblasts on two-dimensional surfaces and on collagen matrices by using bacterial toxins targeting Rho or by chemical inhibitors of ROCK [25-27]. Rho Kinase is involved in cell contractility by

phosphorylating the myosin phosphatase and the light chain of myosin II. These two events activate the motor protein myosin II leading to contraction of the acto-myosin stress fibres [28]. However, neither silencing RhoA alone nor RhoC alone nor both RhoA and RhoC significantly affected fibroblast-mediated collagen gel contraction. Our results are consistent with those of Lee et al. [29] who demonstrated that LPA-stimulated fibroblast contraction of free-floating collagen gels does not require Rho Kinase activity and become ROCK-dependent only when the gels are allowed to put under mechanical tension by the cells for at least two hours before detachment. Moreover, Wozniak et al. [30] have shown that in free-floating collagen gels in which the mechanical tension is low, there exists a feed-back mechanism that inhibits Rho activity, further supporting the idea that neither RhoA nor RhoC are required for fibroblast-mediated collagen gel contraction.

Cell migration is a complex dynamic process requiring coordinate temporal and spatial remodeling of the actin cytoskeleton. It involves cell polarization, formation of membrane ruffling in the direction of migration and formation of new adhesions, contraction of the rear of the cell and detachment from the substrate at the trailing edge [31]. The role of the RhoGTPases in this process is variable and depends on the model used. In most cell types, the activation of Rac1 increases migration except in epithelial cells [1]. RhoA activity positively or negatively affects migration depending on the mode of tumor cells invasion [2]. Divergent effects could also depend on the extracellular matrix surrounding the cells [32]. Fibroblast migration has been studied in an *in vitro* wound healing assay designed to prevent artefactual information. The influence of cell multiplication and modification of cell-cell interaction was reduced by analysing the migration of a subconfluent mixed culture of 80% unlabelled WI-26 wild type with 20% siRNA treated WI-26 EGFP and measuring the proportion of EGFP cells versus unlabelled in the wound. The silencing of Rac1 and Cdc42 inhibited fibroblast migration. This is likely related to the role

of Rac in the formation of the meshwork of actin filaments at the level of lamellipodia at the leading edge of the cell, the first step in migration [33]. Rac1 is also involved in the recruitment of high affinity integrins to lamellipodia [34]. Cdc42 also controls several important cellular events required for cell migration like filopodia formation but also cell polarity by redirecting the Golgi apparatus in the direction of movement [35]. The double silencing of Rac1 and Cdc42 impaired more extensively fibroblasts migration suggesting that Rac1 and Cdc42 have additive effects on cell migration.

RhoA and RhoC displayed distinct effects in fibroblasts migration. Silencing RhoC induced a reduction of the migration rate while silencing RhoA had no such effect. The inhibition of migration following RhoC silencing could be due to the observed up-regulation of RhoA. Indeed, Simpson et al. [17] have recently reported a negative role for RhoA in tumor cell migration. However, the double silencing RhoA-RhoC inhibits fibroblast migration as efficiently as silencing of RhoC alone, demonstrating that RhoA is actually not involved in fibroblast migration. RhoC is required for cell motility probably via activation of ROCK which allows the rear of the cell to retract and move forward. These results are consistent with those of Tkach et al. [36] who found that the dominant negative form of RhoA had no effect on cell motility or cell morphology. By contrast inhibition of ROCK induced a partial inhibition of fibroblast migration. The overexpression of RhoC in many cancers also support its significant role in cell migration [37].

In conclusion, Rac1 and Cdc42 are obviously involved in the contractile properties of fibroblasts and play a key role in their motility probably by their role in the formation of polymeric actin structures and focal complexes. In contrast to previous studies using the dominant negative forms of the GTPases or inhibitors, our data did not support a role for RhoA in these cellular functions whereas RhoC was found necessary for cell migration and the formation of focal adhesions but not for fibroblast-mediated retraction of free floating collagen gels. The two processes are known to rely on different mechanisms.

The repression of RhoA expression by RhoC deserves to be further investigated. Work is now in progress to decipher the intracellular pathways mediating these regulations.

Acknowledgements

This work was partly supported by grants from Belgian FRSM (n° 3.4566.99) and FNRS (n° 1.5.055.01.F), from the Belspo/Prodex Agency at ESA and from the "Fédération belge contre le Cancer" a non-profit organisation. T.T.Giang Ho is supported by the FRIA (Brussels, Belgium) and Sandrine Servotte is a fellow FNRS-Télévie. Christophe F. Deroanne is a Research Associate of the Belgian FNRS.

References

[1] P.L. Hordijk, J.P. ten Klooster, R.A. van der Kammen, F. Michiels, L.C. Oomen, J.G. Collard, Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signalling, *Science* 278 (1997) 1464-1466.

[2] E. Sahai, C.J. Marshall, Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis, *Nat. Cell Biol.* 5 (2003) 711-719.

[3] I. Arozarena, D. Matallanas, P. Crespo, Maintenance of CDC42 GDP-bound state by Rho-GDI inhibits MAP kinase activation by the exchange factor Ras-GRF. evidence for Ras-GRF function being inhibited by Cdc42-GDP but unaffected by CDC42-GTP, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 21878-21884.

[4] C.F. Deroanne, D. Hamelryckx, T.T.G. Ho, C.A. Lambert, P. Catroux, C.M. Lapiere, B.V. Nussgens, Cdc42 downregulates MMP-1 expression by inhibiting the ERK1/2 pathway, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 1173-1183.

[5] P. Delvoe, P. Wiliquet, J.L. Leveque, B.V. Nussgens, C.M. Lapiere, Measurement of mechanical forces generated by skin fibroblasts embedded in a three-dimensional collagen gel, *J. Invest. Dermatol.* 95 (1991) 898-902.

[6] S. Servotte, Z.G. Zhang, C.A. Lambert, T.T.G. Ho, G. Chometon, B. Eckes, T. Krieg, C.M. Lapiere, B.V. Nussgens, M. Aumailley, Establishment of stable human fibroblast cell lines constitutively expressing active RhoGTPase, *Protoplasma* (2005) in press.

[7] C.F. Deroanne, A.C. Colige, B.V. Nussgens, C.M. Lapiere, Modulation of expression and assembly of vinculin during in vitro fibrillar collagen-induced angiogenesis and its reversal, *Exp. Cell Res.* 224 (1996) 215-223.

[8] C. Deroanne, V. Vouret-Craviari, B. Wang, J. Pouyssegur, EphrinA1 inactivates integrin-mediated vascular smooth muscle cell spreading via the Rac/PAK pathway, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 1367-1376.

[9] X.D. Ren, W.B. Kiesses, M.A.Schwartz, Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton, *EMBO J.* 18 (1999) 578-585.

[10] E.E. Sander, J.P. ten Klooster, S. van Delft, R.A. van der Kammen, J.G. Collard, Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behaviour, *J. Cell Biol.* 147 (1999) 1009-1022.

[11] C.A. Lambert, A.C. Colige, C. Munaut, C.M. Lapiere, B.V. Nussgens, Distinct pathways in the over-expression of matrix metalloproteinases in human fibroblasts by relaxation of mechanical tension, *Matrix Biol.* 20 (2001) 397-408.

[12] E. Bell, S. Sher, B. Hull, C. Merrill, S. Rosen, A. Chamson, D. Asselineau, L. Dubertret, B. Coulomb, C. Lapiere, B. Nussgens, Y. Neveux, The reconstitution of living skin, *J. Invest. Dermatol.* 81 (1983) 2-10.

[13] C. Labarca, K. Paigen, A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure, *Anal. Biochem.* 102 (1980) 344-352.

[14] A.J. Bridge, S. Pebernard, A. Ducraux, A.L. Nicoulaz, R. Iggo, Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells, *Nat. Genet.* 34 (2003) 263-264.

[15] C.A. Sledz, M. Holko, M.J. de Veer, R.H. Silverman, B.R. Williams, Activation of the interferon system by short-interfering RNAs, *Nat. Cell Biol.* 5 (2003) 834-839.

[16] S.M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature* 411 (2001) 494-498.

[17] K.J. Simpson, A.S. Dugan, A.M. Mercurio, Functional analysis of the contribution of RhoA and RhoC GTPases to invasive breast carcinoma, *Cancer Res.* 64 (2004) 8694-8701.

[18] P. Aspenstrom, A. Fransson, J. Saras, Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system, *Biochem. J.* 377 (2004) 327-337.

[19] L. Van Aelst, C. D'Souza-Schorey, Rho GTPases and signaling networks, *Genes Dev.* 11 (1997) 2295-2322.

[20] G. Totsukawa, Y. Wu, Y. Sasaki, D.J. Hartshorne, Y. Yamakita, S. Yamashiro, F. Matsumura, Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts, *J. Cell Biol.* 164 (2004) 427-439.

- [21] E. Sahai, C.J. Marshall, RHO-GTPases and cancer, *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 133-142.
- [22] J.J. Tomasek, G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, R.A. Brown, Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (2002) 349-363.
- [23] C.A. Lambert, E.P. Soudant, B.V. Nusgens, C.M. Lapiere, Pretranslational regulation of extracellular matrix macromolecules and collagenase expression in fibroblasts by mechanical forces, *Lab. Invest.* 66 (1992) 444-441.
- [24] F. Grinnell, Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices, *Trends Cell Biol.* 13 (2003) 264-269.
- [25] M. Vishwanath, L. Ma, C.A. Otey, J.V. Jester, W.M. Petroll, Modulation of corneal fibroblast contractility within fibrillar collagen matrices, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44 (2003) 4724-4735.
- [26] M. Parizi, E.W. Howard, J.J. Tomasek, Regulation of LPA-promoted myofibroblast contraction: role of Rho, myosin light chain kinase, and myosin light chain phosphatase, *Exp. Cell Res.* 254 (2000) 210-220.
- [27] M. Yanase, H. Ikeda, A. Matsui, H. Maekawa, E. Noiri, T. Tomiya, M. Arai, T. Yano, M. Shibata, M. Ikebe, K. Fujiwara, M. Rojkind, I. Ogata, Lysophosphatidic acid enhances collagen gel contraction by hepatic stellate cells: association with rho-kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277 (2000) 72-78.
- [28] D.A. Emmert, J.A. Fee, Z.M. Goeckeler, J.M. Grojean, T. Wakatsuki, E.L. Elson, B.P. Herring, P.J. Gallagher, R.B. Wysolmerski, Rho-kinase-mediated Ca²⁺-independent contraction in rat embryo fibroblasts, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286 (2004) 8-21.
- [29] D.J. Lee, C.H. Ho, F. Grinnell, LPA-stimulated fibroblast contraction of floating collagen matrices does not require Rho kinase activity or retraction of fibroblast extensions, *Exp. Cell Res.* 289 (2003) 86-94.
- [30] M.A. Wozniak, R. Desai, P.A. Solski, C.J. Der, P.J. Keely, ROCK-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the physical properties of a three-dimensional collagen matrix, *J. Cell Biol.* 163 (2003) 583-595.
- [31] A.J. Ridley, Rho GTPases and cell migration, *J. Cell Sci.* 114 (2001) 2713-2722.
- [32] H. Zhou, R.H. Kramer, Integrin engagement differentially modulates epithelial cell motility by RhoA/ROCK and PAK1, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 10624-10635.
- [33] A. Hall, Rho GTPases and the actin cytoskeleton, *Science* 279 (1998) 509-514.
- [34] W.B. Kiosses, S.J. Shattil, N. Pampori, M.A. Schwartz, Rac recruits high-affinity integrin alphavbeta3 to lamellipodia in endothelial cell migration, *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 316-320.
- [35] C.D. Nobes, A. Hall, Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement, *J. Cell Biol.* 144 (1999) 1235-1244.
- [36] V. Tkach, E. Bock, V. Berezin, The role of RhoA in the regulation of cell morphology and motility, *Cell Motil. Cytoskeleton* 61 (2005) 21-33.
- [37] K. Wennerberg, C.J. Der, Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it), *J. Cell Sci.* 117 (2004) 1301-1312.

Résultats : Partie I I

Régulation négative de RhoB par ses homologues RhoA et RhoC via RhoGDI α

Introduction

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction générale, la famille des RhoGTPases se divise en huit sous-groupes. Parmi ceux-ci, on distingue la sous-famille Rho comprenant RhoA, son homologue RhoC mais également RhoB. Contrairement à RhoA et RhoC, RhoB est une protéine dont la demi-vie est courte et qui possède des propriétés anti-tumorales. En effet, certaines tumeurs présentent une diminution d'expression de RhoB tandis que sa surexpression inhibe la migration cellulaire, la croissance tumorale et la formation de métastases. Par ailleurs, il a été démontré que RhoB fait partie de la réponse antitumorale induite par des agents anticancéreux tels que les inhibiteurs de la farnésyltransférase. La compréhension des mécanismes régulant son expression pourrait ouvrir de nouvelles voies de développement de stratégies anticancéreuses.

Résumé des résultats

- Dans le premier chapitre de notre mémoire, nous avons montré que l'inhibition spécifique de RhoA ou de RhoC seuls ne modifiait pas l'organisation et la distribution de l'actine polymérique dans les

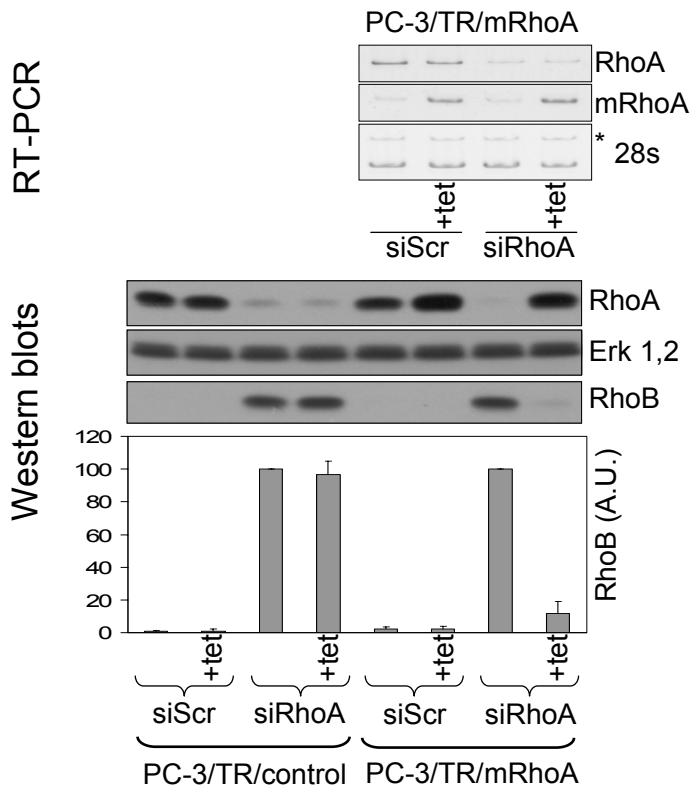


Figure 14: Réversion de la régulation de RhoB par réexpression de RhoA. Les clones inducibles contenant le vecteur vide (PC-3/TR/control) ou le vecteur permettant l'expression de l'ARNm de RhoA muté de façon à le rendre résistant au siRNA (PC-3/TR/mRhoA) mais exprimant toujours la protéine sauvage sont transfectés par siScr ou siRhoA en présence (+tet) ou en l'absence de tétracycline. **Panneau supérieur.** RT-PCR réalisée avec des oligonucléotides permettant uniquement l'amplification de l'ARNm RhoA endogène ou uniquement l'amplification de l'ARNm RhoA exogène résistant au siRNA (mRhoA). **Panneaux inférieurs.** Western blot sur des lysats cellulaires totaux et quantification de RhoB après normalisation sur base de l'abondance de Erk 1,2.

fibroblastes humains. Puisque ces deux RhoGTPases activent un effecteur commun (ROCK) qui contrôle la formation des fibres de stress d'actomyosine en permettant la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine, nous avons réalisé une double transfection par siRhoA et siRhoC et évalué les fibres de stress par marquage à la phalloïdine dans des cellules d'adénocarcinome mammaire (Hs578T). Malgré une extinction efficace de l'expression de ces deux RhoGTPases et une altération modérée de la morphologie, les fibres de stress étaient toujours présentes ce qui suggérait l'existence d'une activité de type Rho résiduelle. L'inhibition de RhoA seul et la double répression de RhoA et de RhoC induisent effectivement l'apparition d'un taux élevé de la protéine RhoB dans les Hs578T. Cette surexpression s'est également révélée dans d'autres types cellulaires tels que les fibroblastes dermiques primaires, des cellules de mélanome, de fibrosarcome et d'adénocarcinome prostatique (PC-3). Ce n'est que lorsque les Hs578T sont transfectés simultanément par les siRNAs ciblant RhoA, RhoC et RhoB que la disparition totale des fibres de stress est observée. Cette observation indique que RhoB induit par l'extinction simultanée de RhoA et RhoC joue un rôle actif dans la dynamique du cytosquelette. Ceci est corroboré par la mesure de la forme active de RhoB par « Pull-down » indiquant que la forme RhoB-GTP est accrue parallèlement à l'induction de la protéine. La réexpression de RhoA à l'aide d'un vecteur inductible exprimant un ARNm muté insensible au siRNA a permis la réversion de l'induction de RhoB confirmant ainsi l'existence d'un processus de régulation de RhoB par RhoA (Figure 14).

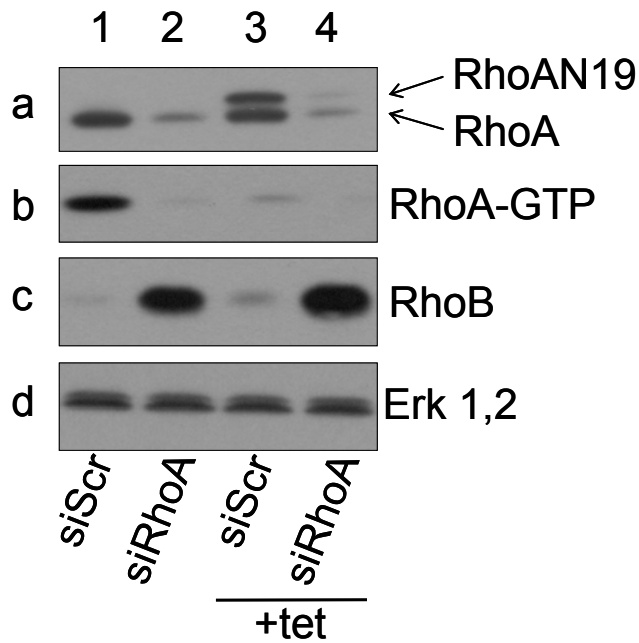


Figure 15 : *RhoB* est régulé par *RhoA-GDP*. Les clones PC-3 inductibles contenant le vecteur permettant l'expression de *RhoA* dominant négatif (PC-3/TR/*RhoA* N19) sont transfectés par *siScr* ou par *siRhoA* en présence (+tet) ou en l'absence de tétracycline. Western blot utilisant les anticorps anti-*RhoA*, anti-*RhoB* et anti-Erk 1,2 sur les lysats totaux (a, c, d) ou après pull-down de *RhoA-GTP* (b).

- L'expression inductible de la forme dominante négative de RhoA (RhoAN19) empêche l'échange GDP-GTP (Figure 15, a et b, puits 3) et démontre que l'absence de la forme GTP n'est pas responsable de l'induction de RhoB (Figure 15, c, puits 3) suggérant que c'est la suppression de la forme RhoA-GDP qui en est responsable (Figure 15, c, puits 4).
- La surexpression de RhoB est liée à un allongement de la demi-vie de la protéine. Cette stabilisation induite par l'ablation de RhoA est indépendante des voies de synthèse des isoprénoïdes, de ROCK et des voies de signalisation de Erk 1,2, p38 MAPK ou PI3K mais elle implique en revanche l'inhibiteur de dissociation RhoGDI α . En effet, la surexpression de RhoGDI α accroît la demi-vie de RhoB tandis que la co-transfection d'un siRhoGDI α avec le siRhoA réduit l'induction de RhoB (Figure 16, comparer les puits 3 et 4 aux puits 6 et 7). Par ailleurs, l'expression d'un mutant de RhoA ne se liant pas à RhoGDI α ne permet pas la réversion de l'induction de RhoB suite à l'extinction de RhoA.

Conclusions

Nos résultats suggèrent que l'inhibition de l'expression d'une RhoGTPase ne mime pas uniquement les effets de la surexpression d'un mutant dominant-négatif mais révèle de nouvelles voies de régulation des RhoGTPases. Ceci est dû non seulement à la haute spécificité des siRNAs mais également à la déplétion simultanée des formes liées au GTP et au GDP ce qui nous a permis de mettre en évidence une fonction inattendue de RhoA-GDP. Les mécanismes de

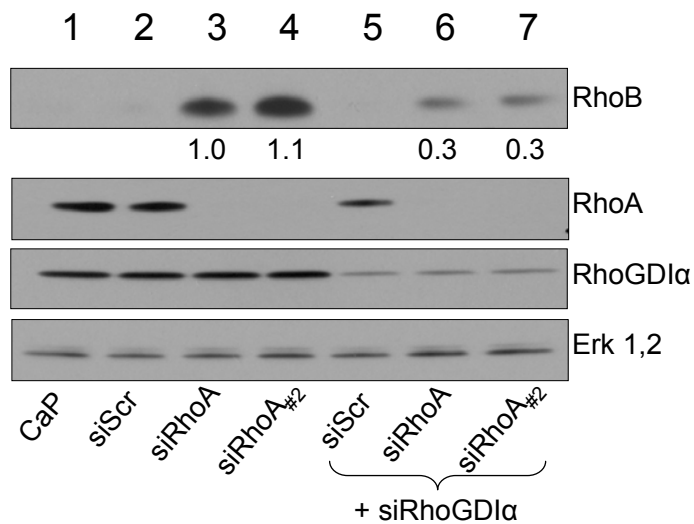


Figure 16: L'induction de RhoB est dépendante de RhoGDIα. Les HS578T sont transfectées par l'agent de transfection seul (CaP), siScr, siRhoA, siRhoA#2, siScr+siRhoGDIα, siRhoA+siRhoGDIα et siRhoA#2+siRhoGDIα. Western blot réalisé sur des extraits cellulaires totaux utilisant des anticorps anti-RhoB, anti-RhoA, anti-RhoGDIα et anti-Erk1,2.

régulation croisée ne se limitent probablement pas à la seule sous-famille Rho et doivent être pris en compte pour l'analyse des résultats d'expériences basées sur le ciblage des RhoGTPases par des siRNA mais également pour l'élaboration de stratégies à visée thérapeutique.

Supplemental Material can be found at:
<http://www.jbc.org/cgi/content/full/M710033200/DC1>

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 283, NO. 31, pp. 21588–21598, August 1, 2008
 © 2008 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

RhoA-GDP Regulates RhoB Protein Stability

POTENTIAL INVOLVEMENT OF RhoGDI α ³⁶

Received for publication, December 10, 2007, and in revised form, April 14, 2008. Published, JBC Papers in Press, June 4, 2008, DOI 10.1074/jbc.M710033200

T. T. Giang Ho¹, Sofia D. Merajver², Charles M. Lapière³, Betty V. Nusgens¹, and Christophe F. Deroanne^{1,3}

From the ¹Laboratory of Connective Tissues Biology, GIGA-R, University of Liège, Tour de Pathologie, B23/3, B-4000 Sart Tilman, Belgium and the ²Breast and Ovarian Cancer Risk Evaluation Program, University of Michigan Comprehensive Cancer Center, Ann Arbor, Michigan 48109-0948

RhoA plays a significant role in actin stress fibers formation. However, silencing RhoA alone or RhoA and RhoC did not completely suppress the stress fibers suggesting a residual "Rho-like" activity. RhoB, the third member of the Rho subclass, is a short-lived protein barely detectable in basal conditions. In various cell types, the silencing of RhoA induced a strong up-regulation of both total and active RhoB protein levels that were rescued by re-expressing RhoA and related to an enhanced half-life of the protein. The RhoA-dependent regulation of RhoB does not depend on the activity of RhoA but is mediated by its GDP-bound form. The stabilization of RhoB was not dependent on isoprenoid biosynthesis, Rho kinase, extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated kinase, or phosphatidylinositol 3'-OH kinase pathways but required RhoGDI α . The forced expression of RhoGDI α increased RhoB half-life, whereas its knock-down antagonized the induction of RhoB following RhoA silencing. Moreover, a RhoA mutant (RhoAR68E) unable to bind RhoGDI α was significantly less efficient as compared with wild-type RhoA in reversing RhoB up-regulation upon RhoA silencing. These results suggest that, in basal conditions, RhoGDI α is rate-limiting and the suppression of RhoA makes it available to stabilize RhoB. Our results highlight RhoGDI α -dependent cross-talks that regulate the stability of RhoGTPases.

The small GTPases of the Rho family are at the cross-roads of signaling pathways initiated by receptors to diffusible biological mediators and those depending on cell-adhesion receptors. They are key signaling molecules regulating a plethora of biological pathways (1). The Rho GTPases shuttle between an inactive GDP-bound state and an active GTP-bound state. Their level of activation is regulated by three classes of factors: the guanine-nucleotide exchange factors that catalyze the exchange of GDP to GTP, the GAPs that increase the intrinsic

GTPase activity of the RhoGTPase, and the RhoGDIs that inhibit the exchange of GDP to GTP. However, their mechanism of action may not be solely restricted to activation of downstream signaling cascades when GTP-loaded (2).

In mammals, RhoGDIs constitute a family encompassing three members: RhoGDI α , the ubiquitously expressed archetypal member of the family; Lyr/D4-GDI or RhoGDI β , which has a hematopoietic tissue-specific expression pattern; and RhoGDI-3 or γ , which is membrane-anchored and preferentially expressed in brain, pancreas, lung, kidney, and testis. RhoGDIs are usually perceived as "static" inhibitors preventing the activation of the downstream effectors by the RhoGTPases. Accumulative evidences suggest that RhoGTPase-RhoGDI complexes are highly dynamic. Phosphorylation of RhoGDI α by various kinases that decreases its affinity for RhoGTPases is one mechanism used by receptors to activate specific RhoGTPases (3, 4). By contrast, phosphorylation of the RhoGTPases themselves seems to increase their affinity for RhoGDI α thus leading to signal termination (5–7). Furthermore, a novel function has been attributed to RhoGDI α in the activation of NADPH oxidase by its capacity to present the RhoGTPase to the appropriate effectors in a way that potentiates efficient activation (8, 9). More recently, it was shown that a Rac1 mutant displaying an increased affinity for RhoGDI α stimulated the activity of RhoA suggesting that RhoGDI is a key intermediate in the cross-talks between RhoA and Rac1 (10).

Among the RhoGTPase family, the Rho subclass includes RhoA, its closely related homolog RhoC, and RhoB. By contrast to RhoA and RhoC, RhoB is a short-lived protein displaying anti-tumorigenic properties (11). In various solid tumors, RhoB expression diminished in parallel with tumor progression (12, 13). Its overexpression antagonizes cell migration, tumor growth, and metastasis (14, 15). Furthermore, RhoB was reported to be an essential component of the anti-tumoral response triggered by farnesyl transferase inhibitors as well as of the apoptotic response of transformed cells to DNA damaging agents (16, 17). Thus, a better understanding of the mechanisms regulating RhoB expression and stability is of great importance for the optimization of potential anti-cancer strategies.

In this report, we targeted RhoGTPases by using a siRNA⁴-based approach. This technology that recently allowed us to

¹ This work was supported in part by grants from the Belgian Fonds de la Recherche Scientifique (FNRS) (1.5.188.06) and Fonds de la Recherche Scientifique Médicale (FRSM) (3.4514.07) (to C. F. D.), the "Belgian Federation against Cancer, Nonprofit Organization," and the Belspo/Prodex Agency at the European Space Agency (to C. M. L. and B. V. N.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

² The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. 51–56.

³ Fellow of the Belgian F.N.R.S. (FNRS).

⁴ Supported by the Burroughs Wellcome Fund and the Breast Cancer Research Foundation.

⁵ Research Associate of the Belgian FNRS. To whom correspondence should be addressed. Tel.: 32-0-4-366-24-59; Fax: 32-0-4-366-24-57; E-mail: c.deroanne@ulg.ac.be.

⁶ The abbreviations used are: siRNA, small interfering RNA; ERK, extracellular signal-regulated kinase; HSF, human skin fibroblast; p38MAPK, p38 mitogen-activated kinase; PI3K, phosphatidylinositol 3'-OH kinase; ROCK, Rho kinase; RT, reverse transcriptase; HA, hemagglutinin; PBS, phosphate-buffered saline; TRITC, tetramethylrhodamine isothiocyanate.

highlight the regulation operated by Cdc42 on matrix metalloprotease-1 (18) has several advantages as compared with classical methods. Beside a higher specificity, siRNA suppresses both GDP- and GTP-bound forms allowing to better evaluate the contribution of either form in the global function of individual RhoGTPase. Silencing RhoA led to an increased RhoB expression by a post-transcriptional mechanism extending the half-life of the protein. Our results demonstrated that this regulation is mediated by RhoA-GDP. Investigation of various intracellular signaling pathways suggested a role of a RhoGDI α -dependent mechanism in this process.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents and Cells—The antibodies were purchased from the following manufacturers: mouse anti-RhoA (sc-418), rabbit anti-RhoB (number sc-180), goat anti-RhoC (number sc-26480), rabbit anti-RhoGDI α (number sc-360), and normal rabbit IgG (number sc-2027) were from Santa Cruz Biotechnology; mouse anti-Rac1 (23A8) from Upstate Biotechnology; mouse anti-Cdc42 from BD Biosciences; rabbit anti-ERK1,2 (number M-5670) was from Sigma; rabbit monoclonal anti- β -actin (13E5, number 4970), rabbit polyclonal anti-AKT (number 9272), anti-phospho-AKT (Ser-473, number 9271), and anti-phospho ERK1,2 (number 4370X) were from Cell Signaling; mouse monoclonal anti-human p38 (AHO0782) was from BioSource International; rabbit anti-phospho-p38 was from Zymed Laboratories Inc. (number 36-8500); rabbit polyclonal anti-Tet-repressor antibody was from MoBiTec (number TET01); rat anti-HA (clone 3F10, number 11867423001) was from Roche Diagnostics. Alexa Fluor[®] 546 goat anti-mouse IgG (number A11003) and Alexa Fluor[®] 488 goat anti-rabbit IgG were from Molecular Probes. Y-27632 was kindly supplied by A. Yoshimura (Welfide Co., Japan), U0126 was from Calbiochem, LY294 from Sigma, and SB203580 from Alexis Corporation. 4',6-Diamidino-2-phenylindole (Bisbenzimidazole H 33258 number 382061) was from Calbiochem. Blasticidin (number R210-01) and ZeocinTM (number 45-0430) were from Invitrogen. Human primary skin fibroblasts (HSF) were isolated by the explant procedure from normal human dermis and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (Cambrex). Cells were trypsinized 1:3 every week and used between passages 8 and 13. Human breast adenocarcinoma cell line HS578T, human fibrosarcoma cell line HT1080, and human melanoma cell line A2058 were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 8% fetal bovine serum and trypsinized 1:10 every week. Human prostate adenocarcinoma cells PC-3 were amplified in F-12 Kaighn's medium supplemented with 7% fetal bovine serum.

siRNA Transfection—A series of 21-nucleotide long siRNAs were chemically synthesized, desalted, deprotected, and PAGE purified (Eurogentec). The 5'-GAAGUCAAGCAUUUCUGU-CTT-3' and 5'-GACAGAAAUGCUUGACUUCTT-3' oligoribonucleotides (siRhoA) or 5'-GAAGGAUCUUCGGAU-GAUTT-3' and 5'-AUCAUUCGGAAGAUCCUUCTT-3' oligoribonucleotides (siRhoA#2) were used to inhibit RhoA synthesis; the 5'-GAAGGACUGAGGCAAGACTT-3' and 5'-GUCUUGCCUCAGGUCCUUCTT-3' oligoribonucleotides

(siRhoC) or the 5'-UCCACUUCUCAGGAAUGUUTT-3' and 5'-AACAUUCCUGAGAAGUGGATT-3' oligoribonucleotides (siRhoC#2) were used to inhibit RhoC synthesis; the 5'-CACCACUGUCCCAACACUUCTT-3' and 5'-GAGUGUUG-GGACAGUGGUGTT-3' oligoribonucleotides (siRac1) or 5'-GAUAAAGACACGAUCGAGATT-3' and 5'-UCUCGAU-CGUGUCUUUAUUCTT-3' oligoribonucleotides (siRac1#2) were used to inhibit Rac1 synthesis. The siRNAs used to inhibit RhoB, Cdc42, or RhoGDI α synthesis were described elsewhere (18–20). The 5'-UUGCAUACAGGACUCGUUATT-3' and 5'-UAACGAGUCCUGUAUGCAATT-3' oligoribonucleotides used as control (siScr) were designed by randomly mixing the sequence of the siRhoA. The 5'-AAAGUCAUUAUUUC-UGUUCTT-3' and 5'-GACAGAAAUGAUUGACUUUUTT-3' (CtrRhoA) and 5'-AAAGGACCCGAGGCAAGACTT-3' and 5'-GUCUUGCCUCGGGUCCUUUTT-3' (CtrRhoC) were used, respectively, as specific controls for siRhoA and siRhoC. They were designed by introducing two nucleotide mismatches in the sequences of siRhoA and siRhoC, respectively. Each pair of oligoribonucleotides was annealed at a concentration of 20 μ M in 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5. siRNA transfection was carried out as previously described (21). Briefly, calcium phosphate-mediated transfection was performed overnight (14–16 h) on subconfluent cells at a final concentration of siRNA ranging from 0.2 to 60 nM. Cells were washed twice with PBS and once with complete medium, this last step was defined as time 0 post-transfection. Cells were lysed for Western blot or RT-PCR analysis 48 h post-transfection.

RT-PCR Analysis—The RT-PCR amplifications were performed in an automated thermocycler (GeneAmp PCR system 9600) using a GeneAmp ThermoStable rTth Reverse Transcriptase RNA PCR kit (PerkinElmer Life Sciences) with pairs of primers amplifying mRNA coding for human RhoA (5'-GTACATGGAGTGTTCAGCAAAGACC-3' and 5'-GGTGGGCCA-GACGGGTGGACA-3'), human mutated RhoA (mRhoA) (5'-GTACATGGAGTGTTCAGCAAAGACC-3' and 5'-AGAAGG-CACAGTCGAGGCTGATCA-3'), and 28 S rRNA (5'-GTTCA-CCCCTAATAGGGAACGTGA-3' and 5'-GGATTCTGACT-TAGAGGCGTTCAGT-3'). For the 28 S rRNA, the efficiency of the RT-PCR was controlled by a synthetic RNA co-transcribed and co-amplified with the same primers as the endogenous RNA to yield an amplification product of slightly larger size. The RT-PCR conditions were described elsewhere (18). Briefly, 10 ng of total RNA and a known copy number of the standard synthetic RNA were reverse transcribed (70 °C for 15 min). Then, RNA-DNA heteroduplexes were denatured for 2 min at 94 °C and amplification was carried out for 22 cycles (RhoA and mRhoA) or for 17 cycles (28 S rRNA) at 94 °C for 15 s, 66 °C for 20 s, and 72 °C for 20 s (10 s for 28 S rRNA). The RT-PCR products were quantified after electrophoresis on a 10% polyacrylamide gel and staining (Gelstar, FMC BioProducts) using a Fluor-STM Multimager (Bio-Rad).

Real Time Quantitative PCR—Total RNA was isolated from cells 48 h after transfection with siRNA using the High Pure RNA isolation kit (Roche Applied Science). 100 ng of total RNA were reversed transcribed using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Real time PCR was performed in a final



RhoA-GDP Regulates RhoB

volume of 20 μ l containing 2 μ l of cDNA (corresponding to 10 ng of total RNA for RhoB amplification and corresponding to 0.1 ng of total RNA for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase amplification), 300 nM of each primer and 10 μ l of the qPCR MasterMix Plus for SYBR[®] Green (Eurogentec) in the Abi Prism 7000 Sequence Detection system (Applied Biosystems). The results were normalized to the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase transcript. PCR was performed with the following primers: RhoB, forward, 5'-GCCACGCGGCC-GCGCTGCA-3', reverse, 5'-CCGGCAGGGCAGGCGC-GAC-3'; and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: forward, 5'-CCTGGCCAAGGTCCATGACA-3', reverse, 5'-GGGATGACCTTGCCACAGCCTT-3'.

Creation of the Various Expression Vectors and Cell Transfection—The entire coding sequence of human RhoA was amplified by RT-PCR. The amplification product was mutated by means of a PCR-based approach with mutated primers. Five silent mutations were introduced in the sequence targeted by the 1st siRhoA to make it resistant to this siRNA. The mutated RhoA cDNA (mRhoA) was cloned into pcDNA3 and pcDNA4/TO (Invitrogen). Sequencing confirmed that the five expected mutations were introduced into the cDNA. Rescue experiments with HS578T cells were carried out as previously described (18). Briefly, cells were first transfected with 6 nM siScr or 6 nM siRhoA for 14–16 h following the protocol described above. Immediately after washing, each pool of cells was trypsinized and seeded in two wells of 6-well plates. Three hours later, 1 μ g of pcDNA4/TO or pcDNA4/TO/mRhoA were transfected into cells for 20–24 h with 3 μ l of Genejuice[™] (Novagen). Cells were washed and cultured for a further 24 h before being processed for immunoblotting analysis. Rescue experiments were also carried out with PC-3 cells engineered to express mRhoA in a tetracycline-dependent way. For this purpose, PC-3 cells were first transfected with pcDNA6/TR (Invitrogen) and selected in medium supplemented with 1 μ g/ml blasticidin. A clone expressing a high level of tetracycline repressor (PC-3/TR) was isolated. PC-3/TR cells were transfected with either the empty pcDNA4/TO or the pcDNA4/TO/mRhoA and selected in medium supplemented with 1 μ g/ml blasticidin + 200 μ g/ml Zeocin. 3 clones of cells transfected with pcDNA4/TO (PC-3/TR/control) and 3 clones of cells transfected with pcDNA4/TO/mRhoA (PC-3/TR/mRhoA) were isolated and amplified. For rescue experiments, the PC-3/TR/control and the PC-3/TR/mRhoA clones were seeded at subconfluence in medium without blasticidin and Zeocin. 24 h later, the cells were transfected with 6 nM siScr or 6 nM siRhoA for 14–16 h following the procedure described above. Immediately after washing, each pool of transfected cells was trypsinized and separated in two parts, the first was cultured with normal medium and the second with medium supplemented with 1 μ g/ml tetracycline. 48 h later, cells were processed for immunoblotting analysis and a measure of the expression level of both endogenous and mutated RhoA mRNA by RT-PCR. The entire coding sequence of human RhoA was amplified by RT-PCR. A point mutation was introduced in the amplification product by means of a PCR-based approach with mutated primers to generate a cDNA encoding RhoAN19, the dominant negative form of RhoA. The entire sequence was

cloned into pcDNA4/TO (Invitrogen). Sequencing confirmed that the expected point mutation was introduced into the cDNA. PC-3/TR cells were transfected with the pcDNA4/TO/RhoAN19 and selected in medium supplemented with 1 μ g/ml blasticidin + 200 μ g/ml Zeocin. 3 clones (PC-3/TR/RhoAN19) expressing in a tetracycline-dependent way a dominant-negative RhoA were isolated and amplified. The functionality of the dominant-negative RhoA was tested with a GTPase assay as described below. To generate the RhoAR68E mutant, 4 mutations were introduced in the mRhoA cDNA. A HA-tagged RhoB was generated by amplifying the whole human RhoB cDNA with a forward primer including the sequence coding for the HA-FLAG plus a start codon (MYPYDVPDYA) upstream of the first 22 nucleotides of the human RhoB coding sequence and a classical reverse primer hybridizing at the end of the coding sequence. To generate the HA-tagged RhoBR68E, 3 mutations were introduced in the HA-RhoB sequence by a PCR-based approach. These three cDNAs were cloned into pcDNA4/TO. The entire coding sequence of human RhoGDI α was amplified by RT-PCR and cloned into pcDNA3 (pcDNA3_RhoGDI α). The integrity of the four cDNAs was confirmed by sequencing. For plasmid transfection, HS578T cells were seeded in 6-well plates. 3 h after seeding, a total amount of 1 μ g of plasmid was transfected into cells for 20–24 h with 3 μ l of Genejuice[™] (Novagen).

Rho Translocation Assay—A Rho translocation assay was performed as described previously (22, 23). HS578T cells were incubated with lysis buffer containing 50 mM Hepes, pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 5 mM sodium fluoride, 0.1 mM 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride, 4 μ g/ml aprotinin, 1 mM dithiothreitol, and 0.1% Triton X-100 for 5 min on ice. The cell lysates were centrifuged at 24,000 \times g for 15 min at 4 °C. The supernatant corresponding to the cytosol fraction was collected and the pellet resuspended in ice-cold lysis buffer containing 1% Triton X-100 and centrifuged at 24,000 \times g for 15 min at 4 °C. The supernatant corresponding to the membrane fraction was collected.

GTPase Assays—The assay was carried out as previously described (24, 25). Briefly, cells were chilled on ice and lysed in ice-cold buffer containing 0.5% Triton X-100, 25 mM Hepes, pH 7.3, 150 mM NaCl, 4% glycerol, 10 mM NaF, 20 mM β -glycerophosphate, 0.1 mM 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride, 4 μ g/ml aprotinin. Lysates were centrifuged for 8 min at 13,000 \times g. Supernatants were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until use. An aliquot of each supernatant collected before freezing was denatured in SDS-PAGE lysis buffer to measure the total RhoGTPase content by Western blotting. For pull-down assays, supernatants were incubated for 30 min with 30 μ g of GST-PBD protein containing the Cdc42 and Rac binding region of PAK-1B, or GST-RBD protein containing the Rho binding region of rhotekin affinity linked to glutathione-Sepharose beads. The beads were washed 4 times in lysis buffer and boiled in 60 μ l of SDS-PAGE lysis buffer.

Determination of RhoB Protein Stability—48 h after transfection with siRNA or 24 h after transfection with plasmids cells were incubated with 20 μ g/ml cycloheximide, at a concentration that effectively blocked synthesis of the RhoB protein (26),

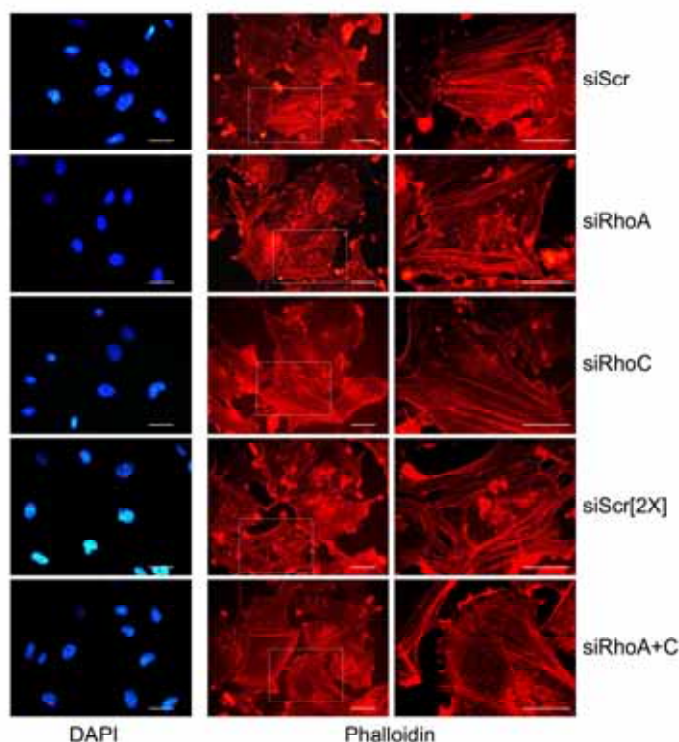


FIGURE 1. Simultaneous knockdown of RhoA and RhoC did not completely suppress actin stress fibers. Immediately after transfection with 20 or 40 nM of an irrelevant siRNA (siScr or siScr[2X]), 20 nM of an siRNA targeting RhoA (siRhoA), 20 nM of an siRNA targeting RhoC (siRhoC) or 20 nM siRhoA + 20 nM siRhoC (siRhoA + C), HS578T cells were seeded on tissue culture dishes. 24 h later, cells were analyzed by fluorescence labeling with phalloidin-TRITC and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Bar, 20 μ m.

and the RhoB protein levels were analyzed by Western blot at various time points after cycloheximide addition.

Cytoskeleton Labeling—For fibrillar actin labeling, HS578T cells were fixed with 3% paraformaldehyde in PBS for 15 min and permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 5 min. The samples were blocked with 0.2% bovine serum albumin in PBS for 30 min and incubated with 50 ng/ml of phalloidin-TRITC and with 50 ng/ml of 4',6-diamidino-2-phenylindole for 30 min. Fluorescence was analyzed with a Leica DMRB microscope. A minimum of 100 cells in each condition tested were analyzed to determine the percentage of cells displaying stress fibers.

RESULTS

Silencing RhoA and RhoC Does Not Completely Suppress the Actin Stress Fibers—RhoA is a key determinant in the organization of actin cytoskeleton and cell shape. However, its specific repression, up to 95%, in various cell types with two different sets of siRNA did not alter the cell morphology of either actin

RhoA-GDP Regulates RhoB

stress fibers formation (Refs. 18 and 21 and Fig. 1). According to the data published by Simpson and co-workers (27), this lack of morphological alteration could be due to a compensatory mechanism between RhoA and RhoC. We tested this hypothesis by a double silencing of RhoA and RhoC. Although the morphology of human breast adenocarcinoma cell HS578T was somewhat altered by this double knock-down, stress fibers were still visible, suggesting a residual "Rho-like" activity (Fig. 1). Therefore, we hypothesized that it might be related to the activity of the third member of the Rho subclass, RhoB. This RhoGTPase is indeed able to activate effectors such as ROCK and to induce the formation of actin stress fibers.

RhoA-dependent Regulation of RhoB—RhoB is a short-lived and inducible protein that is barely detectable as observed by Western blot analysis of whole lysate of mock-transfected cells or of cells transfected with a control siRNA (Fig. 2). The knockdown of RhoA in HS578T cells induced a significant up-regulation of the RhoB protein level (Fig. 2). RhoB concentration was also slightly increased upon RhoC silencing, whereas the double silencing of RhoA and RhoC induced its dramatic increase as compared with the single silencing of RhoA (Fig. 2). The negative regulation of RhoB operated by RhoA

and RhoC was also observed in human HT1080 fibrosarcoma cells, A2058 melanoma cells, in primary HSF (Fig. 2), and in human prostate PC-3 adenocarcinoma cells (Fig. 4B) suggesting that it represents a wide spread mechanism. Similar results were observed by using a second siRNA targeting another sequence of RhoA or RhoC mRNA (Fig. 3A). To further validate our observations, we designed control siRNA with two nucleotide changes from the target sequence (CtrRhoA and CtrRhoC) as recommended in Ref. 28. As illustrated in supplementary Fig. S1, the use of these controls confirmed the negative regulations operated by RhoA and RhoC on RhoB but also the specificity of the cross-regulations between RhoA and RhoC. By contrast, the silencing of Rac1 or Cdc42 with our previously published siRNA sequences (18) did not affect RhoB protein level (Fig. 3A). The induction of RhoB following RhoA silencing was observed at a concentration of siRNA as low as 0.2 nM (Fig. 3B). To definitively ascertain the specificity of the negative regulation operated by RhoA on RhoB expression, the silencing of RhoA was rescued by re-expressing a *RhoA* mRNA resistant to

RhoA-GDP Regulates RhoB

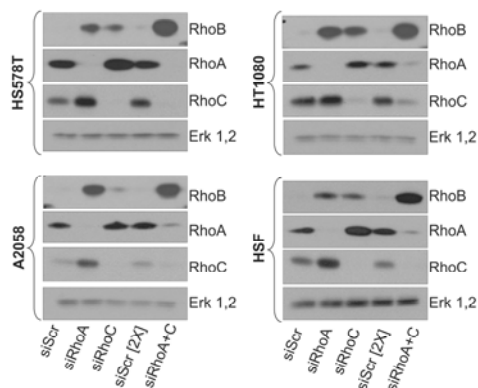


FIGURE 2. RhoA or/and RhoC silencing significantly increased the RhoB protein level in various cell types. HS578T cells, A2058 cells, HT1080 cells, or human primary skin fibroblasts (HSF) were transfected with 20 or 40 nM of an irrelevant siRNA (siScr or siScr[2X]), with 20 nM of an siRNA targeting RhoA (siRhoA) or RhoC (siRhoC), or with 20 nM of an siRNA targeting RhoA + 20 nM of an siRNA targeting RhoC (siRhoA+C). 48 h post-transfection, cells were lysed and analyzed by immunoblotting with specific antibodies to RhoA, RhoB, RhoC, and ERK1,2.

the first siRNA targeting RhoA by introducing five neutral mutations impairing the silencing by this siRNA (mRhoA) (Fig. 4). HS578T cells were first transfected with scrambled siRNA or the first siRNA targeting RhoA. Immediately after washing and trypsinization, each pool of transfected cells was separated in two halves and transfected either with empty pcDNA3 or pcDNA3/mRhoA as described under "Experimental Procedures." The transient re-expression of RhoA reversed at least partly the overexpression of RhoB (Fig. 4A). The residual RhoB (40%) could be due to the presence of some cells that were not transfected by pcDNA3/mRhoA. The strong (more than 10 times the physiological level) and transient (~24 h) re-expression of RhoA is obviously not the most appropriate manner to rescue silencing. To reverse more adequately RhoA silencing, we transfected PC-3 cells stably expressing a repressor sensitive to tetracycline (PC-3/TR) with an empty inducible vector (pcDNA4/TO) or with the same vector encoding mRhoA (pcDNA4/TO/mRhoA) to generate, respectively, control clones (PC-3/TR/control) or clones expressing mRhoA in a tetracycline-dependent way (PC-3/TR/mRhoA). Three clones of PC-3/TR/control cells and 3 clones of PC-3/TR/mRhoA cells were isolated. These clones were transfected with 6 nM scrambled siRNA or 6 nM siRhoA. Immediately after washing and trypsinization, each pool of transfected cells was separated in two halves and cultured for 2 days either in the absence or presence of 1 µg/ml tetracycline. Cells were then processed for Western blot or RT-PCR analysis (Fig. 4B). RT-PCR analysis revealed that endogenous RhoA was similarly repressed in the absence or presence of tetracycline, whereas the mutated RhoA was significantly induced by tetracycline. The re-expression of the RhoA protein in these conditions nearly completely reversed the overexpression of RhoB, whereas treatment of PC-3/TR/control cells with tetracycline did not affect the RhoB

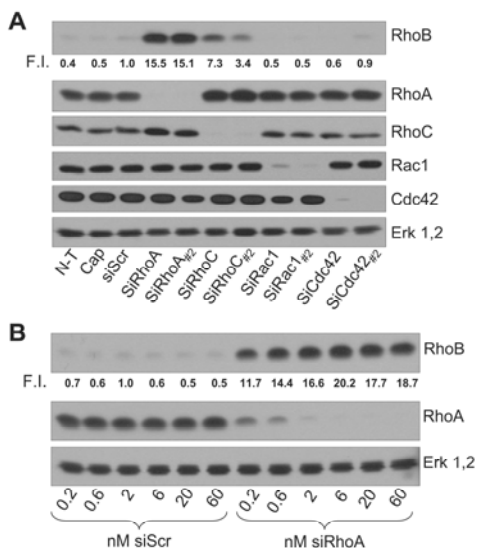


FIGURE 3. The repression of RhoA or RhoC, but not Rac1 or Cdc42, increased RhoB protein level. A, representative Western blot analysis of cell lysates of HS578T cells untransfected (NT) or 48 h after transfection with calcium phosphate alone (Cap), 20 nM of an irrelevant siRNA (siScr), or 20 nM of two different siRNA targeting RhoA (siRhoA or siRhoA#2), RhoC (siRhoC or siRhoC#2), Rac1 (siRac1 or siRac1#2), or Cdc42 (siCdc42 or siCdc42#2). B, representative Western blot analysis of HS578T cells 48 h after transfection with the indicated concentrations of siRNA. The factor of induction (F.I.) was calculated from densitometric measurements of the RhoB signal normalized to ERK1,2 loading measured compared with the same measurements in the lysates of HS578T cells transfected with siScr in A or 2 nM of siScr in B.

protein level. These results definitively confirm the negative regulation operated by RhoA on RhoB. It should be noted that the re-expression of RhoA also reversed the up-regulation of RhoC upon RhoA silencing (supplementary Fig. S2).

The Up-regulated RhoB Is Biologically Active—As measured by pull-down assay, the increased RhoB level observed in RhoA and/or RhoC silenced cells is paralleled by an enhanced level of the RhoB active form (Fig. 5A). RhoB-GTP was estimated to represent between 2 and 3% of the total up-regulated RhoB. However, an efficient activation of the downstream effectors also requires translocation of the RhoGTPase to the membrane. To evaluate the subcellular localization of RhoB, a differential extraction procedure was used. It showed that up-regulated RhoB is mainly associated with the membrane fraction (Fig. 5B). These observations suggested that the induced RhoB was functional and could be responsible for the residual Rho-like activity observed in Fig. 1. To address this issue, a simultaneous repression of RhoA, RhoC, and RhoB was performed in HS578T cells. Western blot analysis and pull-down assays collected 48 h after transfection supported the efficient repression of total and active RhoB (Fig. 5A). The simultaneous knock-down of RhoA, RhoB, and RhoC effectively suppressed the actin stress fibers network as compared with its maintenance in

RhoA-GDP Regulates RhoB

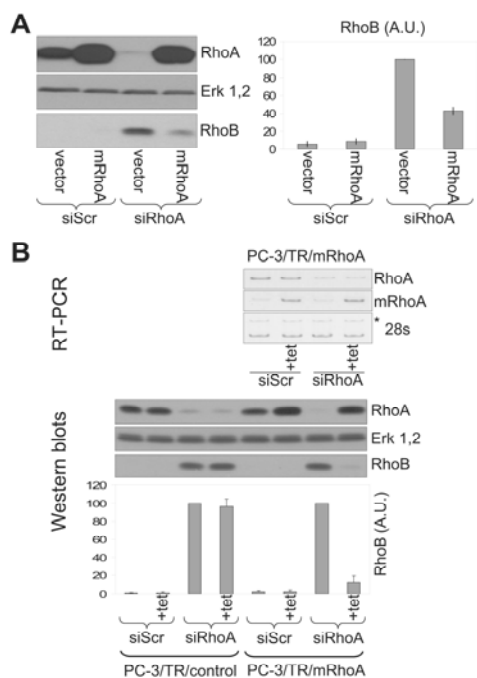


FIGURE 4. The rescue of RhoA silencing reverses RhoB overexpression. A, representative Western blot analysis with specific antibodies to RhoA, RhoB, or ERK1,2 of whole cell lysates of HS578T transfected with 6 nM of an irrelevant siRNA (siScr) or 6 nM of the first siRNA targeting RhoA (siRhoA) and 1 μ g of empty pcDNA3 (vector) or pcDNA3/mRhoA (mRhoA). The right panel illustrates the densitometric analysis of RhoB signal intensity. Results are the mean \pm S.D. of three independent experiments. B, PC-3/TR/control and PC-3/TR/mRhoA cells were transfected with 6 nM of an irrelevant siRNA (siScr) or 6 nM of the first siRNA targeting RhoA (siRhoA). Cells were supplemented (+tet) or not with 1 μ g/ml of tetracycline for 48 h and processed for RT-PCR analysis (top panel) or Western blot (middle panel). Representative analyses of six independent experiments performed on 3 clones of PC-3/TR/control and 3 clones of PC-3/TR/mRhoA are illustrated. The bottom panel illustrates the mean \pm S.D. of densitometric analysis of RhoB protein measurements. AU, arbitrary units.

the double knockdown RhoA + RhoC (Fig. 5C). The percentage of HS578T cells displaying stress fiber was $89 \pm 3\%$ in cells transfected with siScr, $69 \pm 2\%$ in cells transfected with siRhoA + siRhoC, and $25 \pm 2\%$ in cells transfected with siRhoA + siRhoC + siRhoB.

RhoB Up-regulation Is Related to a Prolonged Half-life of the Protein—As assessed by real time quantitative PCR measurements following RhoA or RhoC silencing, the induction of RhoB was not related to an increase of its mRNA level (Fig. 6A). It was, however, clearly up-regulated by the double silencing RhoA + RhoC. The stability of the RhoB protein was determined in HS578T cells by blocking protein synthesis with cycloheximide. As compared with cells transfected with the scrambled siRNA, the half-life of RhoB was slightly increased in RhoC-silenced cells. By contrast, RhoA silencing as well as the

double silencing RhoA + RhoC induced a dramatic increase of RhoB stability from 3.0 to 16.5 h (Fig. 6B and Table 1). In the double knock-down RhoA + RhoC, the RhoB protein level is therefore up-regulated both by transcriptional and post-translational mechanisms. Similar results were also obtained in HSF (not shown).

The Induction of RhoB Is Neither Dependent on Isoprenoid Biosynthesis, nor ERK1,2, p38MAPK, or PI3K Pathways, nor ROCK or RhoA Activity—Inhibitors of the mevalonate pathway such as simvastatin have been reported to increase the stability of RhoB by reducing the availability of isoprenoid intermediates required for translocation to the membrane (26). It was also observed in our models (Fig. 5B). Addition of geranylgeranyl-pyrophosphate and/or farnesyl-pyrophosphate rescued the simvastatin-induced up-regulation of RhoB (26). A similar procedure used in RhoA- and/or RhoC-silenced cells did not alter the up-regulation of RhoB (supplementary Fig. S3). Moreover, by using a differential extraction procedure, we observed that up-regulated RhoB by silencing RhoA was associated with the membrane fraction, whereas the RhoB induced upon simvastatin treatment was cytoplasmic (Fig. 5B). These results rule out the implication of isoprenoid biosynthesis in the up-regulation of RhoB reported here. In parallel, we tested the involvement of the ERK1,2, p38MAPK, and PI3K pathways by means of pharmacological inhibitors. Used at concentrations allowing an efficient inhibition of their specific target, none of these inhibitors affected the RhoA-dependent regulation of RhoB (supplemental Fig. S3) suggesting that neither ERK1,2, p38MAPK, nor PI3K pathways were involved in the up-regulation of RhoB reported here. Alternatively, the knockdown of RhoA and/or RhoC could affect the activation level of a common downstream effector such as ROCK. To test this hypothesis, ROCK was specifically inhibited in HS578T cells with daily renewed Y-27632 during 48 h of culture. This treatment barely modulated the RhoB protein level in HS578T cells (Fig. 7A), suggesting that the RhoA-mediated RhoB regulation did not depend on the classical activation of downstream signaling cascades upon GTP loading. A siRNA approach as we used depletes both GTP- and GDP-bound RhoA. To discriminate between the effects of both forms, PC-3 cell lines expressing, in an inducible way, the dominant-negative form of RhoA were created by transfecting PC-3 cells stably expressing a repressor sensitive to tetracycline (PC-3/TR) with a vector encoding RhoAN19 (pcDNA4/TO/RhoAN19) that prevents GDP-GTP exchange. Three clones of PC-3/TR/RhoAN19 cells were isolated on the basis of their ability to express upon tetracycline addition a functional RhoAN19 by using a pull-down assay (Fig. 7). RhoAN19 is visible as a slower migrating band in Fig. 7. As observed in Fig. 7B, the repression of RhoA-GTP alone was not sufficient to increase RhoB expression. By contrast, the silencing of RhoA in the three clones of PC-3/TR/RhoAN19 induced RhoB expression as efficiently with (+tet) or without (–tet) prior depletion of RhoA-GTP (Fig. 7C). These results suggest that the regulation of RhoB expression is mediated by RhoA-GDP and not by RhoA-GTP.

RhoGDI α Is Involved in the Induction of RhoB—Several studies suggested that in addition to regulating RhoGTPase activation, RhoGDIs protect some RhoGTPases from degradation

RhoA-GDP Regulates RhoB

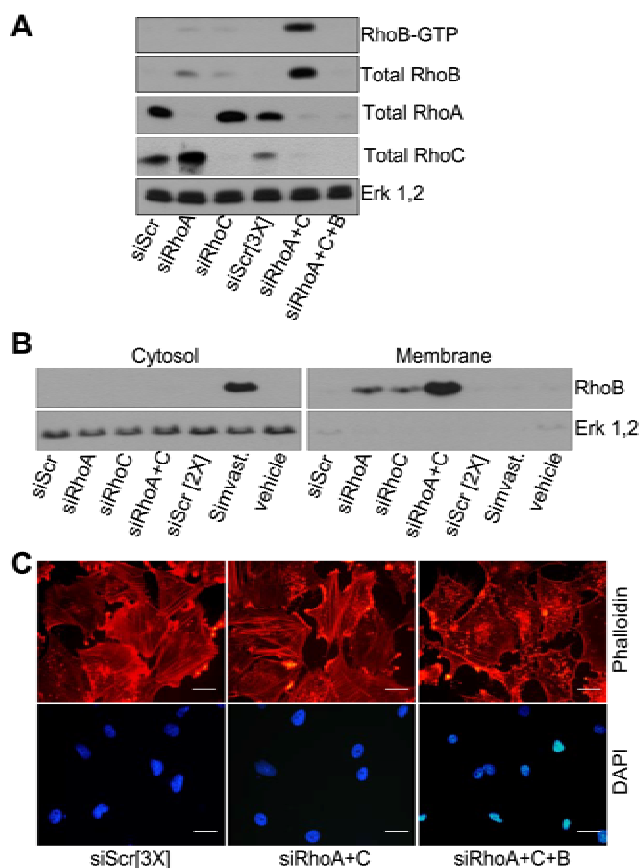


FIGURE 5. RhoB induced by silencing RhoA and/or RhoC is active and associated with the membrane fraction. A, H5578T cells were processed for pull-down and Western blot analysis with specific antibodies to RhoA, RhoB, and RhoC 48 h after transfection with 20 nm of an irrelevant siRNA (siScr), the first siRNA targeting RhoA (siRhoA), or the first siRNA targeting RhoC (siRhoC), with 60 nm siScr (siScr[3X]), 20 nm siRhoA + 20 nm siRhoC + 20 nm siScr (siRhoA+C), or 20 nm siRhoA + 20 nm siRhoC + 20 nm siRhoB (siRhoA+C+B). B, the cytosolic and membrane fractions of H5578T cells transfected with 20 or 40 nm of an irrelevant siRNA (siScr or siScr[2X]), with 20 nm of the first siRNA targeting RhoA (siRhoA) or RhoC (siRhoC), or with 20 nm of the first siRNA targeting RhoA + 20 nm of the first siRNA targeting RhoC (siRhoA+C), or treated with 10 μ M simvastatin (simvast.) or ethanol alone (vehicle) were obtained as described under "Experimental Procedures." Both fractions (10 μ g) were analyzed by Western blot with specific antibodies against RhoB and ERK1,2. C, immediately after transfection with 60 nm siScr (siScr[3X]), 20 nm siRhoA + 20 nm siRhoC + 20 nm siScr (siRhoA+C), or 20 nm siRhoA + 20 nm siRhoC + 20 nm siRhoB (siRhoA+C+B), H5578T cells were seeded on tissue culture dishes for 24 h and analyzed by fluorescence labeling by phalloidin-TRITC and with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Bar, 20 μ m.

(7). To address the role of RhoGDI α in RhoB protein stability we transfected H5578T cells with an expression vector encoding the whole coding sequence of human RhoGDI α . Its forced expression strongly enhanced the RhoB protein level as compared with cells transfected with an empty vector where RhoB was barely detectable (Fig. 8A). Upon RhoGDI α overexpression, RhoB was mainly membrane-bound (supplementary Fig.

S4B). The GTP-bound RhoB form was also increased and represented between 2 and 3% of total RhoB (supplementary Fig. S4A). This up-regulation of RhoB was associated with a strong increase of its half-life (Table 1) suggesting that RhoGDI α may protect RhoB from degradation (Fig. 8B). This potential role was tested by performing simultaneous knockdown of RhoA and RhoGDI α in H5578T cells. The level of RhoB protein 48 h after transfection with the two different siRNA targeting RhoA alone was reduced by more than 70% if RhoGDI α was simultaneously knocked down (Fig. 8C). To investigate more directly the involvement of RhoGDI α in the regulation of RhoB, we generated by a PCR-based approach a cDNA encoding a RhoA mutant (mRhoAR68E) unable to bind RhoGDI α but still able to undergo GDP-GTP exchange and to bind downstream effectors as assessed by a pull-down assay (supplementary Fig. S5). The construct further contains five silent mutations making the encoded mRNA resistant to the first siRhoA as shown in rescue experiments in Fig. 8D. Even though this mRhoAR68E mutant was strongly expressed it was significantly less efficient as compared with wild-type RhoA in rescuing RhoB up-regulation upon RhoA silencing (Fig. 8D). To further investigate the molecular mechanism driving RhoB stabilization, we tested its interaction with RhoGDI α . Co-immunoprecipitation experiments in siRhoA-transfected cells did not reveal any association between endogenous RhoB and RhoGDI α . A direct interaction between RhoB and RhoGDI α could be observed by co-immunoprecipitation in lysates of H5578T cells co-transfected with expression vectors encoding a HA-tagged RhoB and RhoGDI α (supplemental Fig. S6). The generation of the R68E mutation in RhoB completely abolished its interaction with RhoGDI α (supplemental Fig. S6). Co-transfection of RhoGDI α increased significantly the half-life of HA-tagged RhoB but not that of HA-tagged RhoBR68E (Table 1). Altogether, these results suggest that RhoGDI α is involved in the RhoA-mediated regulation of RhoB. Although an interaction between RhoB and RhoGDI α

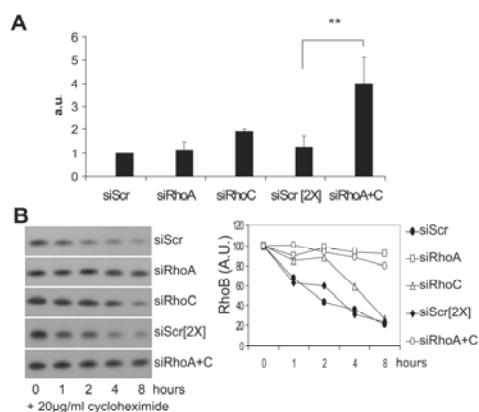


FIGURE 6. The up-regulation of RhoB by silencing RhoA or RhoC was related to an increased half-life of the protein. *A*, real time quantitative PCR analysis of the RhoB mRNA level was performed with total RNA extracted from HSF cells 48 h after transfection with an irrelevant siRNA at 20 or 40 nM (siScr or siScr[2X]), 20 nM of the first siRNA targeting RhoA (siRhoA), 20 nM of the first siRNA targeting RhoC (siRhoC), or 20 nM of the first siRNA targeting RhoA + 20 nM of the first siRNA targeting RhoC (siRhoA+C). Results are the mean \pm S.D. of three independent experiments. **, $p < 0.01$ analysis of variance followed by Tukey-Kramer analysis. *B*, HS578T cells were transfected with 20 or 40 nM of an irrelevant siRNA (siScr or siScr[2X]), 20 nM of the first siRNA targeting RhoA (siRhoA) or RhoC (siRhoC), or 20 nM siRhoA + 20 nM siRhoC (siRhoA+C). 48 h after transfection, cells were supplemented with 20 μ g/ml cycloheximide for the indicated time before being processed for Western blot analysis. Representative blots of three independent experiments are shown. The right panel illustrates the densitometric analysis of the illustrated blots. It has to be noted that blots were loaded with 30 (siScr and siScr[2X]), 10 (siRhoC), or 5 μ g of proteins (siRhoA and siRhoA+C) to obtain initial similar signal intensities.

TABLE 1

Wild type and mutated RhoB stability

RhoB, HA-RhoB, and HA-RhoBR68E protein half-life were measured in HS578T cells after transfection with the indicated siRNA or plasmids.

Transfection conditions	RhoB half-life
siRNA	
Scr	3.0 \pm 0.9 h
siRhoA	16.3 \pm 4.4 h
siRhoC	5.1 \pm 1.6 h
scr (40 nM)	3.7 \pm 0.8 h
siRhoA + siRhoC	16.5 \pm 1.0 h
Plasmids	
Empty pcDNA3	2.1 \pm 0.6 h
pcDNA3_RhoGDI α	13.5 \pm 3.5 h
HA-RhoB half-life	
pcDNA4_HA-RhoB + empty pcDNA3	2.5 \pm 0.1 h
pcDNA4_HA-RhoB + pcDNA3_RhoGDI α	4.6 \pm 0.3 h
HA-RhoBR68E half-life	
pcDNA4_HA-RhoBR68E + empty pcDNA3	4.9 \pm 1.5 h
pcDNA4_HA-RhoBR68E + pcDNA3_RhoGDI α	3.6 \pm 1.3 h

can be observed in overexpression experiments, a direct role for RhoGDI α in the stabilization of endogenous RhoB remains elusive.

DISCUSSION

Deciphering the functions and regulations of closely related members of the RhoGTPase family like RhoA, RhoB, and RhoC requires a highly specific approach. In this study, we took

RhoA-GDP Regulates RhoB

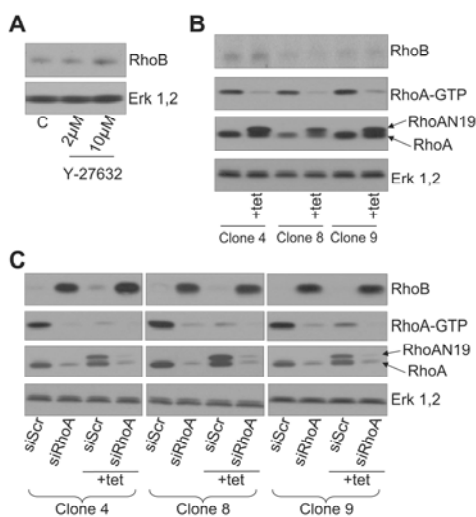


FIGURE 7. The regulation of RhoB is mediated by RhoA-GDP. *A*, HS578T cells were cultured for 2 days with vehicle alone (c) or the indicated concentrations of ROCK inhibitor Y-27632, renewed daily, and processed for Western blot analysis with specific antibodies to RhoB and ERK1,2. *B*, 3 clones of PC-3/TR/RhoAN19 cells were supplemented (+tet) or not with 1 μ g/ml of tetracycline for 48 h and processed for RhoA pull-down assay and Western blot analysis with specific antibodies to RhoA, RhoB, and ERK1,2. Representative analyses are illustrated. *C*, after 48 h of culture with (+tet) or without 1 μ g/ml tetracycline, the 3 clones of PC-3/TR/RhoAN19 were transfected with 6 nM of an irrelevant siRNA (siScr) or 6 nM of the first siRNA targeting RhoA (siRhoA). After washing, cells were cultured for 48 more hours and then processed for RhoA pull-down assay and Western blot analysis with specific antibodies to RhoA, RhoB, and ERK1,2. Where indicated, the tetracycline was maintained in the culture medium throughout the experiment. The upper band observed in the "Total RhoA" blots corresponds to the dominant-negative RhoA (RhoAN19).

advantage of the high precision afforded by the siRNA technology to underscore the role played by mainly RhoA, and to a lesser extent by RhoC, in the regulation of RhoB. The control operated by RhoA on RhoB appears to be a widespread mechanism as it was observed in many cell types of various lineages. The induction of RhoB protein with two different siRNA targeting RhoA and at concentrations as low as 0.2 nM are significant arguments supporting the specificity of our observations. Rescue experiments with a mutated RhoA mRNA (mRhoA) resistant to the first siRNA targeting RhoA definitely validate our results. To appropriately rescue the effect of RhoA silencing, we generated clones of PC-3 cells expressing the mRhoA in a tetracycline dependent way. The concentration of tetracycline used here (1 μ g/ml) did not affect the RhoA-dependent regulation of RhoB as observed in the control clones. The inducible re-expression of mRhoA was close to the physiological range in the 3 PC-3/TR/mRhoA clones tested and was maintained as long as tetracycline was present. By using this procedure, the rescue nearly completely suppressed the up-regulation of RhoB. This technology also opens the way to *in vivo* rescue experiments by feeding animals, in which these cells could be injected to

RhoA-GDP Regulates RhoB

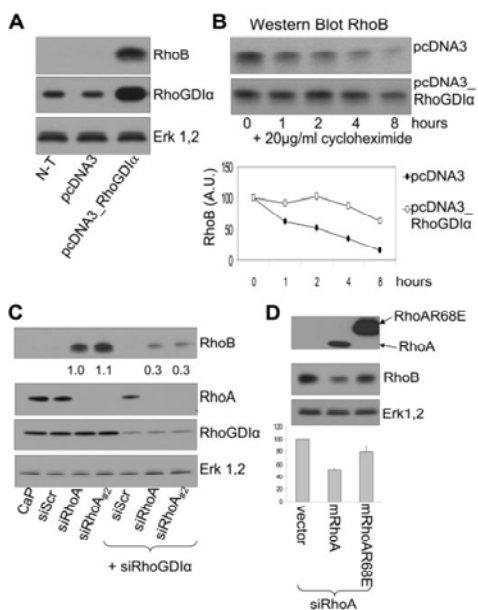


FIGURE 8. RhoB up-regulation depends on RhoGDI α availability and a RhoA mutant unable to bind RhoGDI α is less efficient than WT-RhoA in rescuing RhoB up-regulation. A, H5578T cells were left untransfected (N-T), transfected with an empty vector (pcDNA3), or transfected with an expression vector encoding the whole coding cDNA sequence of RhoGDI α (pcDNA3_RhoGDI α). 24 h after transfection, cells were processed for Western blot analysis with specific antibodies to RhoB, RhoGDI α , and ERK1,2. B, H5578T cells were transfected with an empty vector (pcDNA3) or with an expression vector encoding the whole coding DNA sequence of RhoGDI α (pcDNA3_RhoGDI α). 24 h after transfection, cells were cultured with 20 μ g/ml cycloheximide for the indicated time before being processed for Western blot analysis. Representative blots of three independent experiments are shown. The bottom panel illustrates the densitometric analysis of the illustrated blots. Blots were loaded with 30 (pcDNA3) or 5 μ g (pcDNA3_RhoGDI α) of proteins to obtain similar initial signal intensities. C, H5578T cells were transfected with calcium phosphate alone (CaP), 20 nm of an irrelevant siRNA (siScr), 20 nm of the first or of the second siRNA targeting RhoA (siRhoA or siRhoA#2) alone, or in combination with 20 nm siRhoGDI α (+ siRhoGDI α). 48 h after transfection, cells were processed for Western blot analysis with specific antibodies to RhoB, RhoA, RhoGDI α , and ERK1,2. D, representative Western blot analysis with specific antibodies to RhoA, RhoB, or ERK1,2 of whole cell lysates of H5578T transfected with 10 nm of the first siRNA targeting RhoA (siRhoA) and 1 μ g of empty pcDNA4/TO (vector), pcDNA4/TO/mRhoA (mRhoA), or pcDNA4/TO/mRhoA68E (mRhoA68E). The lower panel illustrates the densitometric analysis of RhoB signal intensity. Results are the mean \pm S.D. of three independent experiments.

evaluate, for instance, their tumorigenic potential, with stable tetracycline analogs, like doxycycline.

No modulation of the RhoB mRNA level in RhoA-silenced cells was observed by real time quantitative PCR analysis. Moreover, two independent comparisons of the gene expression profiles by microarrays of PC-3 cells transfected either with an irrelevant siRNA or the first siRNA targeting RhoA did not reveal any modulation of RhoB mRNA expression.⁵ We

⁵ T. T. G. Ho, C. M. Lapière, B. V. Nusgens, and C. F. Deroanne, unpublished data.

demonstrated that the increase of RhoB occurs at a post-transcriptional level through stabilization of the protein as assessed by half-life measurements. Fritz and Kaina (29) reported an up-regulation of the *RhoB* gene by overexpressing the dominant-negative mutant RhoAN19. The results reported here demonstrate that silencing of a RhoGTPase does not simply mimic the overexpression of a dominant-negative mutant that targets guanine-nucleotide exchange factors. Whereas some Rho guanine-nucleotide exchange factors are highly specific, others activate multiple Rho GTPases (30). Our data suggest that the double silencing of RhoA + RhoC is an experimental condition closer to the overexpression of RhoAN19 than the single silencing of RhoA. This is likely because the RhoA dominant-negative mutant depletes the pool of guanine-nucleotide exchange factor(s) that activate both RhoA and RhoC. Our results clearly demonstrate that, under physiological conditions, RhoA is the main determinant to set the low steady-state level of RhoB through (a) post-transcriptional(s) mechanism(s) that strongly decrease(s) the half-life of the protein. The RhoA-mediated regulation of RhoB has a physiological significance and can be operational in cells exposed to bacterial toxins such as *Clostridium difficile* toxin B (TcdB). Genth *et al.* (31) reported that, in cells treated with 1 ng/ml of TcdB, the RhoA level was decreased with a parallel increase in the RhoB level. More recently, Huelsenbeck *et al.* (32) demonstrated that the apoptotic effect of TcdB was mediated by RhoB.

Our results strongly suggest that the RhoA-dependent regulation of RhoB does not depend on the activity of RhoA but is mediated by its GDP-bound form explaining why such a regulation is only visible upon depletion of the inactive pool of RhoA. Using a siRNA approach, Simpson *et al.* (27) recently reported a cross-regulation between RhoA and RhoC that was also observed in our models. Thus, our results suggest that such regulations, uncovered by a siRNA-based approach and undetectable by conventional tools, are common in the RhoGTPase family.

By contrast to RhoA and RhoC reported to be up-regulated in various cancers, RhoB displays properties that might participate in tumor suppression (33). As assessed by the pull-down assay and indicated by the presence of actin stress fibers the up-regulated RhoB is indeed actually biologically active. It could contribute to the anti-tumoral effect of siRNA targeting RhoA or RhoC recently reported *in vitro* and *in vivo* (34). Furthermore, we observed that the induction of the cell cycle inhibitor p21^{CIP1} following RhoC silencing in PC-3 cells is RhoB-dependent.⁵

It is well documented that alterations of post-translational prenylation of RhoB by inhibitors of the mevalonate pathways or farnesyl transferase can increase the expression of RhoB by acting at a transcriptional level (35) but also through modulation of the protein stability (26). However, the RhoB protein induced by treatment with one of these inhibitors, simvastatin as we showed here, is cytosolic, whereas the RhoB induced by repressing RhoA is associated with the membrane fraction similarly to the RhoB expressed in basal conditions. This suggests that silencing of RhoA did not affect post-translational lipid modifications required for RhoB subcellular localization. Moreover, the increased half-life of RhoB following RhoA

silencing was not reversed by supplementation of prenylation precursors such as geranylgeranyl-pyrophosphate or farnesyl-pyrophosphate demonstrating that the mevalonate pathway is not involved in the regulation of RhoB in our experimental model. Nevertheless, isoprenylation might constitute a signal for RhoB degradation (26). In physiological conditions, the isoprenyl moiety is masked upon binding to RhoGDIs (36) thus explaining, at least in part, how RhoGDI can protect the RhoGTPases from ubiquitin-mediated degradation as reported for RhoA (7).

RhoGDI γ has been reported to be the preferred RhoGDI partner of RhoB (37, 38). However, similarly to RhoGDI β , its pattern of expression is tissue specific and is unlikely to account for the RhoA-dependent regulation of RhoB, a process observed in many cell types derived from various tissues (37). We considered that the ubiquitously expressed RhoGDI α was a better candidate. Moreover, it was described as interacting with RhoB in some studies (39). Our data strongly suggest that RhoGDI α can stabilize RhoB and is operational in the up-regulation of RhoB following RhoA silencing. Moreover, we observed that the ability of RhoA to bind RhoGDI α is involved, at least partly, in the regulation of RhoB reported here. The affinity of RhoGDI α is likely higher for RhoA and RhoC than for RhoB because the latter lacks Ser-188, a residue affecting positively the binding to RhoGDI α upon phosphorylation by PKA (7, 40). In overexpression experiments, an interaction between RhoB and RhoGDI α was actually observed. Moreover, transfected RhoGDI α can stabilize wild-type RhoB and not RhoBR68E that has lost the ability to bind RhoGDI α . However, a direct stabilization of endogenous RhoB by RhoGDI α remains elusive. Alternatively, it could involve the interaction of RhoGDI α with some proteins other than RhoB. Quantitation of the RhoGDI α level in various cell types shows that its molar amount is roughly equal to the molar amount of the three GTPases: RhoA, Rac1, and Cdc42 (38). In physiological conditions RhoGDI α is thus likely rate-limiting and its overexpression or the silencing of RhoA are two means for making it available to stabilize RhoB. The freed RhoGDI α by RhoA silencing could also contribute to the up-regulation of the RhoC protein level that we and others observed upon RhoA depletion (Fig. 2 and Ref. 27). In agreement with our hypothesis, it should be noticed that TcdB prevents RhoA from interacting with RhoGDI (32) and, as mentioned above, increases in parallel the RhoB protein level. Recently, Wong and co-workers (10) reported that the alteration of RhoGDI-dependent cross-talk between RhoA and Rac1 suppresses integrin-mediated bacterial uptake. Altogether these data suggest that such interplays should be a widespread mechanism to control the stability and the activity of the RhoGTPases.

Our study demonstrates that silencing a RhoGTPase does not simply recapitulate the effects of a dominant-negative mutant but reveal novel mechanisms of regulation. The identification of these mechanisms is related to the highest specificity of the siRNA approach but also to the strategy of depletion of both GTP- and GDP-bound forms thus unraveling an unexpected role for RhoA-GDP. Mechanisms implicating the GDP-bound form of RhoGTPase are not restricted to RhoA. Arozarena and co-workers (2) previously reported the involve-

ment of Cdc42-GDP in Ras signaling. Di-Poi and co-workers (9) observed that Rac1-GDP in complex with RhoGDI can efficiently activate the NADPH oxidase. Our results also suggest that RhoGDI α is a necessary component for stabilizing RhoB that could act directly, indirectly, or as part of a multiprotein complex. The potential interplays between members of the RhoGTPase family should be taken into account for analysis of loss-of-function experiments as well as for the efficient design of therapeutic strategies based on a siRNA approach.

REFERENCES

- Bishop, A. L., and Hall, A. (2000) *Biochem. J.* **348**, 241–255
- Arozarena, I., Matalanas, D., and Crespo, P. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 21878–21884
- DerMardirossian, C., Schnelzer, A., and Bokoch, G. M. (2004) *Mol. Cell* **15**, 117–127
- DerMardirossian, C., Rocklin, G., Seo, J. Y., and Bokoch, G. M. (2006) *Mol. Biol. Cell* **17**, 4760–4768
- Forget, M. A., Desrosiers, R. R., Gingras, D., and Beliveau, R. (2002) *Biochem. J.* **361**, 243–254
- Lang, P., Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M., and Bertoglio, J. (1996) *EMBO J.* **15**, 510–519
- Rolli-Derkinden, M., Sauzeau, V., Boyer, L., Lemichez, E., Baron, C., Henrion, D., Loirand, G., and Pacaud, P. (2005) *Circ. Res.* **96**, 1152–1160
- Carol, R. J., Takeda, S., Linstead, P., Durrant, M. C., Kakesova, H., Derbyshire, P., Drea, S., Zarsky, V., and Dolan, L. (2005) *Nature* **438**, 1013–1016
- Di-Poi, N., Faure, J., Grizot, S., Molnar, G., Pick, E., and Dagher, M. C. (2001) *Biochemistry* **40**, 10014–10022
- Wong, K. W., Mohammadi, S., and Isberg, R. R. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 40379–40388
- Ridley, A. J. (2004) *Breast Cancer Res. Treat.* **84**, 13–19
- Adnane, J., Muro-Cacho, C., Mathews, L., Sebti, S. M., and Munoz-Antonia, T. (2002) *Clin. Cancer Res.* **8**, 2225–2232
- Mazieres, J., Tillement, V., Allal, C., Clanet, C., Bobin, L., Chen, Z., Sebti, S. M., Favre, G., and Pradines, A. (2005) *Exp. Cell Res.* **304**, 354–364
- Jiang, K., Sun, J., Cheng, J., Djeu, J. Y., Wei, S., and Sebti, S. (2004) *Mol. Cell Biol.* **24**, 5565–5576
- Couderc, B., Pradines, A., Rafii, A., Golzio, M., Deviers, A., Allal, C., Berg, D., Penary, M., Teissie, J., and Favre, G. (2008) *Cancer Gene Ther.* **15**, 456–464
- Du, W., and Prendergast, G. C. (1999) *Cancer Res.* **59**, 5492–5496
- Liu, A., Cerniglia, G. J., Bernhard, E. J., and Prendergast, G. C. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6192–6197
- Deroanne, C. F., Hamelryck, D., Ho, T. T., Lambert, C. A., Catroux, P., Lapiere, C. M., and Nusgens, B. V. (2005) *J. Cell Sci.* **118**, 1173–1183
- Canguilhem, B., Pradines, A., Baudouin, C., Boby, C., Lajoie-Mazenc, L., Charveron, M., and Favre, G. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 43257–43263
- Zhang, B., Zhang, Y., Dagher, M. C., and Shacter, E. (2005) *Cancer Res.* **65**, 6054–6062
- Deroanne, C., Vouret-Craviari, V., Wang, B., and Pouyssegur, J. (2003) *J. Cell Sci.* **116**, 1367–1376
- Chaplet, M., Detry, C., Deroanne, C., Fisher, L. W., Castronovo, V., and Bellahcene, A. (2004) *Biochem. J.* **384**, 591–598
- Yoshida, M., Sawada, T., Ishii, H., Gerszten, R. E., Rosenzweig, A., Gimbrone, M. A., Jr., Yasukochi, Y., and Numano, F. (2001) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1165–1171
- Ren, X. D., Kioussis, W. B., and Schwartz, M. A. (1999) *EMBO J.* **18**, 578–585
- Sander, E. E., ten Klooster, J. P., van Delft, S., van der Kammen, R. A., and Collard, J. G. (1999) *J. Cell Biol.* **147**, 1009–1022
- Stamatakis, K., Cernuda-Morollon, E., Hernandez-Perera, O., and Perez-Sala, D. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 49389–49396
- Simpson, K. I., Dugan, A. S., and Mercurio, A. M. (2004) *Cancer Res.* **64**, 8694–8701
- Pulverer, B. (2003) *Nat. Cell Biol.* **5**, 489–490
- Fritz, G., and Kaina, B. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30637–30644

RhoA-GDP Regulates RhoB

30. Schmidt, A., and Hall, A. (2002) *Genes Dev.* **16**, 1587–1609
31. Genth, H., Huelsenbeck, J., Hartmann, B., Hofmann, F., Just, I., and Gerhard, R. (2006) *FEBS Lett.* **580**, 3565–3569
32. Huelsenbeck, J., Dreger, S. C., Gerhard, R., Fritz, G., Just, I., and Genth, H. (2007) *Biochemistry* **46**, 4923–4931
33. Huang, M., and Prendergast, G. C. (2006) *Histol. Histopathol.* **21**, 213–218
34. Pille, J. Y., Denoyelle, C., Varet, J., Bertrand, J. R., Soria, J., Opolon, P., Lu, H., Pritchard, L. L., Vannier, J. P., Malvy, C., Soria, C., and Li, H. (2005) *Mol. Ther.* **11**, 267–274
35. Delarue, F. L., Adnane, J., Joshi, B., Blaskovich, M. A., Wang, D. A., Hawker, J., Bizouarn, F., Ohkanda, J., Zhu, K., Hamilton, A. D., Chellappan, S., and Sebt, S. M. (2007) *Oncogene* **26**, 633–640
36. Hoffman, G. R., Nassar, N., and Cerione, R. A. (2000) *Cell* **100**, 345–356
37. Zalzman, G., Closson, V., Camonis, J., Honore, N., Rousseau-Merck, M. F., Tavitian, A., and Olofsson, B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 30366–30374
38. Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M., and Philips, M. R. (2001) *J. Cell Biol.* **152**, 111–126
39. Faure, J., and Dagher, M. C. (2001) *Biochimie (Paris)* **83**, 409–414
40. Dovas, A., and Couchman, J. R. (2005) *Biochem. J.* **390**, 1–9

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Fig.S1. The use of specific controls for RhoA and RhoC silencing confirms the cross-regulations between the three members of the Rho sub-class. HS578T cells were transfected with 20 nM of the specific control for siRhoA (CtrRhoA), 20nM of the first siRNA targeting RhoA (siRhoA), 20nM of the specific control for siRhoC (CtrRhoC), 20nM of the first siRNA targeting RhoC (siRhoC), 20nM of CtrRhoA+20nM of CtrRhoC (CtrRhoA+C) or 20nM of siRhoA+ 20nM of siRhoC (SiRhoA+C). 24 hours after transfection, the cells were processed for Western blot analysis with specific antibodies to RhoA, RhoB, RhoC or Erk1/2.

Fig.S2. The rescue of RhoA silencing reverses RhoC over-expression. PC-3/TR/control and PC-3/TR/mRhoA cells were transfected with 6 nM of an irrelevant siRNA (siScr) or 6 nM of the first siRNA targeting RhoA (siRhoA). Cells were supplemented (+tet) or not with 1 µg/ml of tetracycline for 48 hours and processed for Western blot analysis with specific antibodies to RhoA, RhoC or Erk1,2.

Fig.S3. The stabilization of RhoB is not dependent on isoprenoid biosynthesis, Erk1,2, p38MAPK or PI3K pathways. HS578T cells were treated with 10µM U0126, 10µM SB203580, 25µM LY294 or 0.1% DMSO (vehicle) alone. After 24 hours, cells were processed for Western blot analysis with specific antibodies to Erk1,2, Phospho-Erk1,2, p38, Phospho-P38, AKT and Phospho-AKT to assess the efficiency of the pharmacological inhibitors (A). HS578T cells transfected with 20 nM of an irrelevant siRNA (siScr) or 20 nM of the first siRNA targeting RhoA (siRhoA). Immediately after transfection, cells were cultured with (B) 10µM U0126, 10µM SB203580, 25 µM LY294 or 0.1% DMSO (vehicule) or (C) with 5µM farnesylpyrophosphate (Fpp), 5µM geranylgeranylpyrophosphate (Gpp), 5µM geranylgeranylpyrophosphate+ 5µM farnesylpyrophosphate (Gpp+Fpp), 0.1% methanol (vehicule) or 0.2% methanol (vehicule[2X]). 24 hours after transfection, cells were processed for Western blot analysis with specific antibodies to RhoB, RhoA and Erk1,2.

Fig.S4. RhoGDIα over-expression increased total and GTP-bound RhoB which is membrane-associated. HS578T cells were transfected with 1µg of pcDNA3 or 1µg of pcDNA3_RhoGDIα. 24 hours after transfection, cells were processed for Western blot analysis with specific antibodies to RhoB, RhoGDIα and Erk1,2 (A) or for collecting the cytosolic and membrane fractions as described in Experimental Procedures (B). Both fractions (10 µg) were analyzed by immunoblotting with specific antibodies against RhoB and Erk1,2.

Fig.S5. The mutant protein RhoAR68E is unable to associate with RhoGDIα but still able to undergo GDP-GTP exchange. HS578T cells were transfected with 10 nM of the first siRNA targeting RhoA (siRhoA) and 1 µg of empty pcDNA4/TO (vector), pcDNA4/TO/mRhoA (mRhoA) or pcDNA4/TO/mRhoAR68E (mRhoAR68E). 24 hours after transfection, the cells were processed for RhoA pull down assay (RBD pull down), for RhoGDIα immunoprecipitation (IP RhoGDIα) and for Western blot analysis with specific antibodies to RhoA, RhoGDIα or Erk1,2.

Fig.S6. RhoB wild type but not the mutant protein RhoBR68E is able to associate with RhoGDIα. HS578T cells were seeded in 10-cm dishes and transfected with 3 µg of pcDNA4/TO/HA-RhoB + 3 µg of pcDNA3/RhoGDIα or with 3 µg of pcDNA4/TO/HA-RhoBR68E + 3 µg of pcDNA3/RhoGDIα. 24 hours after transfection, the cells were processed for immunoprecipitation with 2µg of anti-RhoGDIα antibodies (IP RhoGDIα) or with 2µg normal rabbit IgG (Control IgG) and for Western blot analysis with specific antibodies to HA-tag or RhoGDIα.

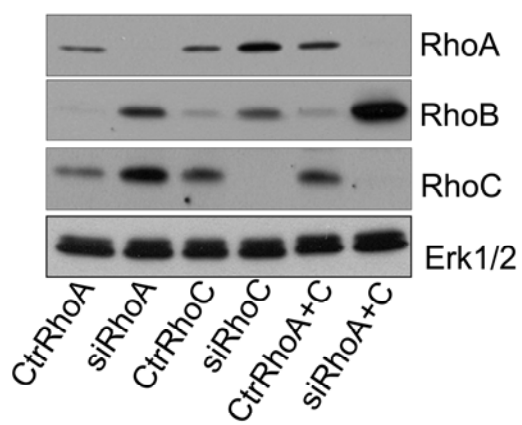


Fig.S1

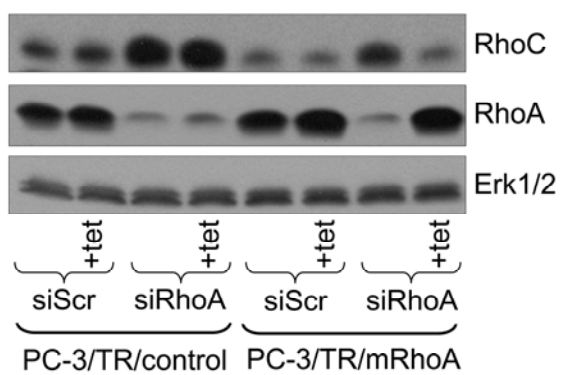


Fig.S2

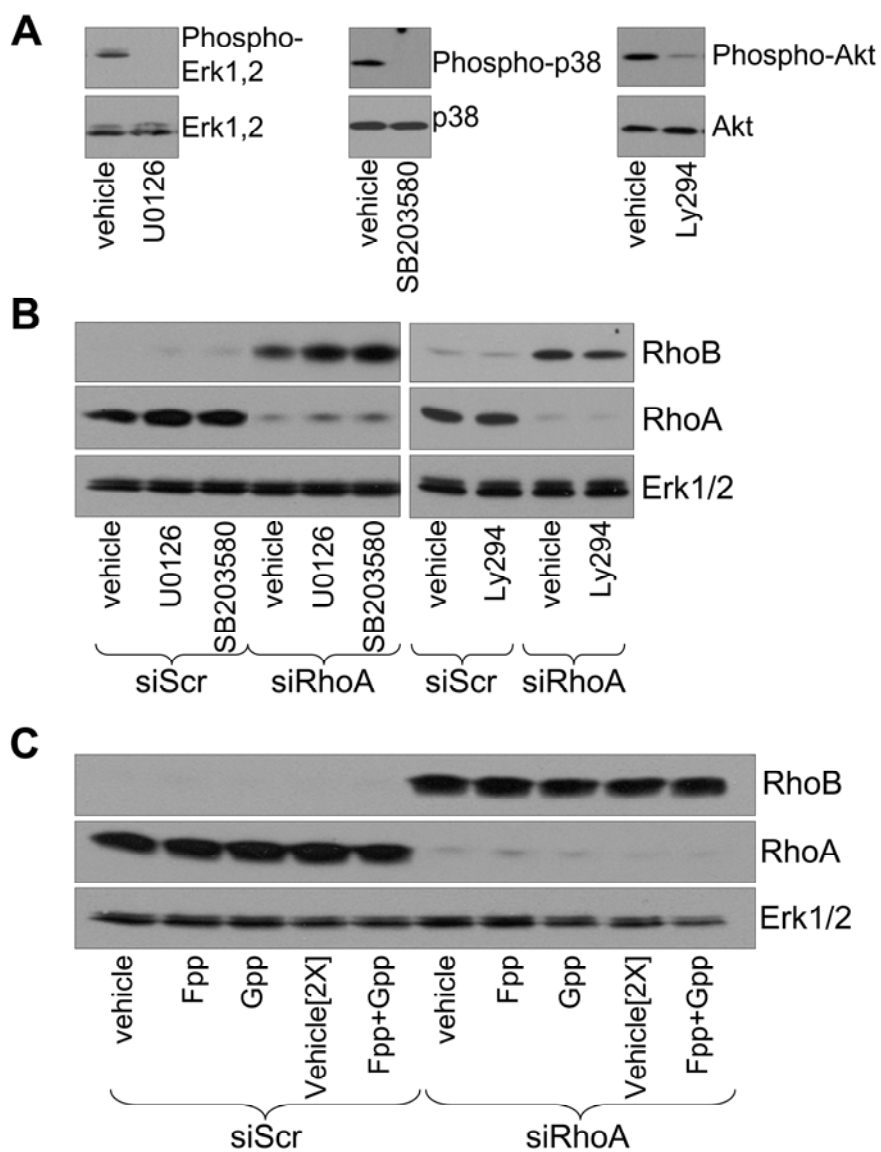


Fig.S3

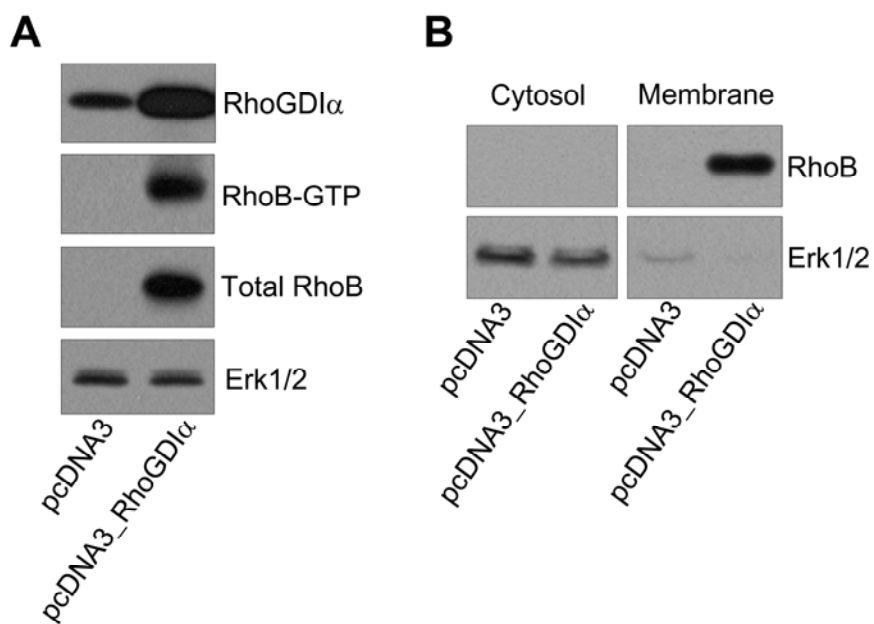


Fig.S4

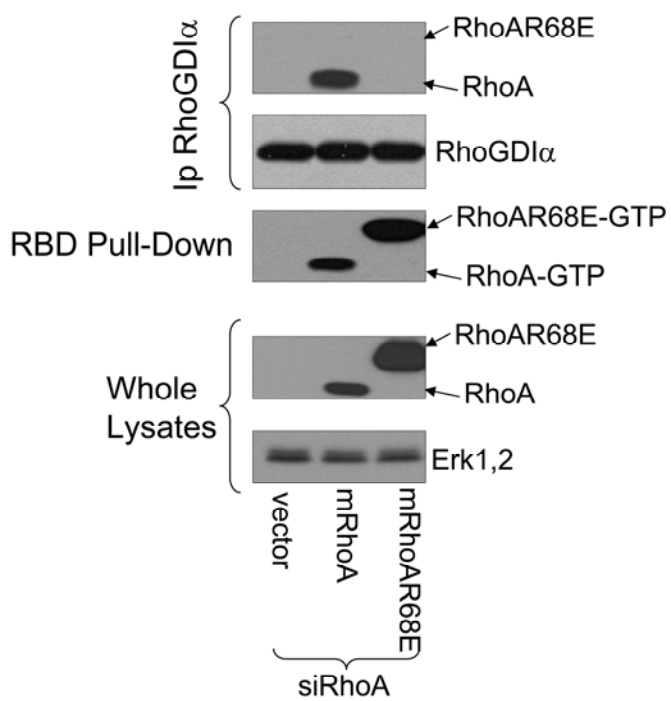


Fig.S5

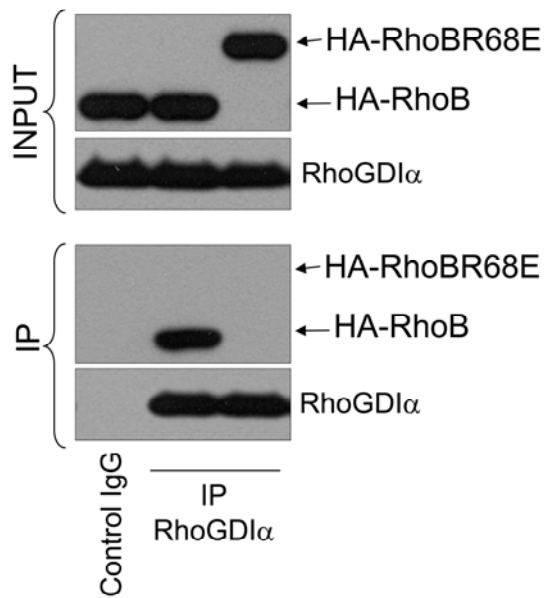


Fig.S6

Résultats : Partie III

Analyse des rôles respectifs de RhoA et RhoC dans le phénotype des cellules d'adénocarcinome prostatique

Introduction

Parmi les protéines du sous-groupe Rho, RhoC a été décrit comme marqueur d'invasion et de dissémination métastatique. Dans le même ordre d'idée, les résultats exposés dans le premier chapitre montrent clairement une implication différente pour RhoA et RhoC au cours de la migration de fibroblastes humains. Afin de comparer leurs rôles respectifs dans le phénotype des cellules tumorales, nous avons inhibé spécifiquement leur expression dans des cellules d'adénocarcinome prostatique (PC-3) qui expriment un niveau significatif de chacune d'entre elles. Les conséquences de ces inhibitions spécifiques ont été évaluées par des analyses transcriptomiques et par détermination des propriétés tumorigéniques *in vitro* et *in vivo*.

Résumé des résultats

- La suppression de RhoA ou RhoC nous a permis de conclure que RhoC contribue significativement à la croissance sans ancrage des PC-3, alors que RhoA ne semble pas impliqué dans ce processus (Figure 17).

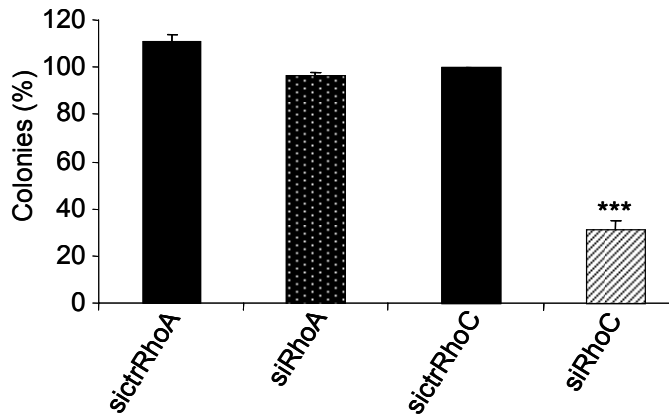


Figure 17 : RhoC et non RhoA est impliqué dans la croissance sans ancrage des PC-3. Nombre de colonies en agar mou de PC-3 transfectées par les différents siRNA exprimé en pourcentage par rapport au sictrRhoC considéré comme 100%. Les différences significatives sont montrées par comparaison avec le contrôle sictrRhoC par le test statistique « ANOVA one way » suivie par un test de Tuckey-Kramer *** : $p < 0.001$.

▪ L'analyse de l'expression génique des cellules PC-3 par microarray montre que la répression de RhoC, mais non de RhoA, induit la surexpression d'un groupe de gènes codant pour des protéines décrites comme suppresseurs de tumeurs tels que NAG-1 (Non steroidal anti-inflammatory drug activated gene-1), p21Cip1 et p8 (Figure 18). RhoC réprime également l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans les cascades de signalisation induites par le stress au niveau du réticulum endoplasmique cellulaire et susceptibles d'induire l'apoptose. Il s'agit de GADD153 (Growth Arrest and DNA Damage inducible transcription factor 153), GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage inducible transcription factor 34), ATF-3 (Activating transcription factor-3), TRIB3 (Tribbles Homolog 3), HERPUD1 (Homocysteine-inducible, Endoplasmic Reticulum stress-inducible, Ubiquitin-like Domain member 1) et CTH (Cystathionase). La réduction de l'expression de protéines matricellulaires contribuant à la tumorigenèse comme SPARC (Secreted protein acidic and rich in cysteine ou ostéonectine) (Chen *et al.* 2007) a été aussi observée par inhibition de RhoC. Ces modulations ont été confirmées par RT-PCR en temps réel et/ou Western blot. Des données de la littérature permettent d'établir des relations entre les produits de certains de ces gènes dans divers modèles de carcinomes, dont l'adénocarcinome prostatique (Jiang *et al.* 2006; Niknejad *et al.* 2007; Papineni *et al.* 2008). Parmi les facteurs différentiellement régulés par RhoA et RhoC, NAG-1 joue un rôle central. En effet, sa répression par co-transfection d'un siNAG-1 avec un siRhoC reverse la plupart des régulations de gènes observées après l'extinction de RhoC (Figure 18).

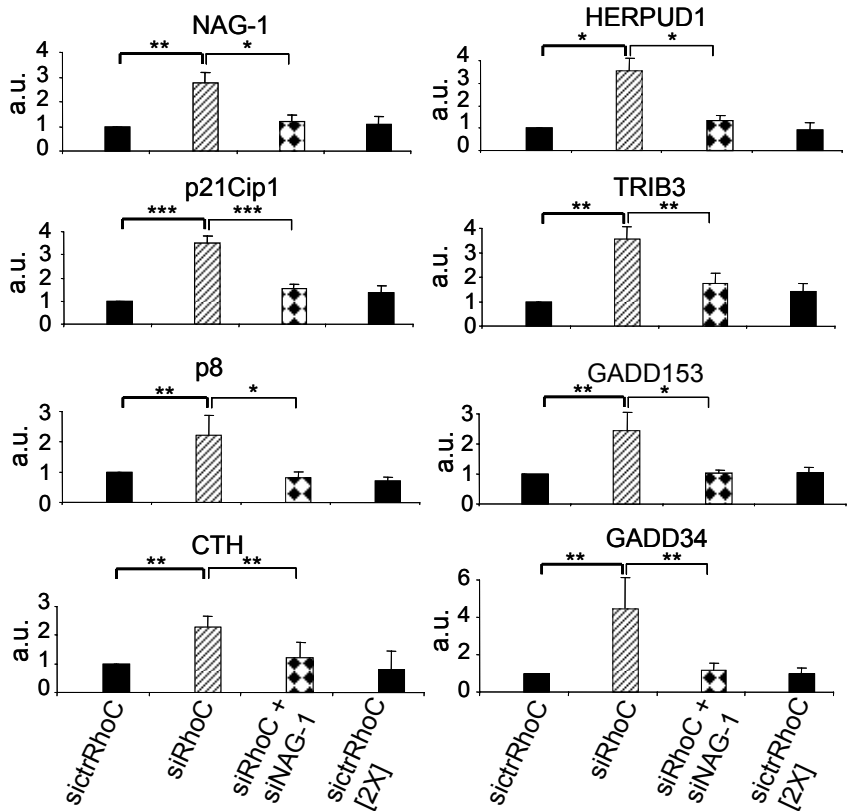


Figure 18 : L'induction de p21Cip1, p8, CTH, TRIB3, HERPUD1, GADD153 et GADD34 dans les PC-3 invalidées pour RhoC est dépendante de NAG-1. En effet, les surexpressions observées après transfection avec le seul siRhoC sont abolies lors d'une double transfection siRhoC+siNAG-1. PCR en temps réel réalisées à partir d'ARN totaux extraits des PC-3 transfectés par sictrRhoC, siRhoC, siRhoC+siNAG-1. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (a.u.). Les différences significatives sont montrées par comparaison avec sictrRhoC et avec siRhoC+siNAG-1 en utilisant le test statistique « ANOVA one way » suivie par un test de Tukey-Kramer *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

L'inhibition de NAG-1 restaure également les capacités de croissance en agar mou de cellules PC-3 transfectées par siRhoC. Enfin, le rôle de NAG-1 dans le contrôle de la croissance tumorale *in vivo* par RhoC a été confirmée en comparant le développement de tumeurs PC-3 injectées *in situ* chez la souris par siRhoC seul ou siRhoC+siNAG-1 (Figure 19).

L'analyse des voies de signalisation potentiellement impliquées dans la régulation de NAG-1 par RhoC montre qu'elle dépend de GSK3 β et de p38 MAPK mais n'implique pas Erk 1,2.

Conclusions

Nos résultats indiquent que la RhoGTPase RhoC, contrairement à RhoA, joue un rôle promoteur dans la tumorigenèse des cellules d'adénocarcinome prostatique *in vitro* et *in vivo*. L'exploration des mécanismes de régulation de ce processus par une analyse transcriptomique a mis en évidence l'implication du suppresseur de tumeurs NAG-1 dont l'expression est réprimée par RhoC par l'intermédiaire de la voie p38 MAPK et GSK3 β . Dans notre modèle, NAG-1 régule positivement d'autres suppresseurs de tumeurs tels que p8 et p21Cip1 et module négativement l'expression de protéines contribuant à l'invasion tumorale telles que SPARC.

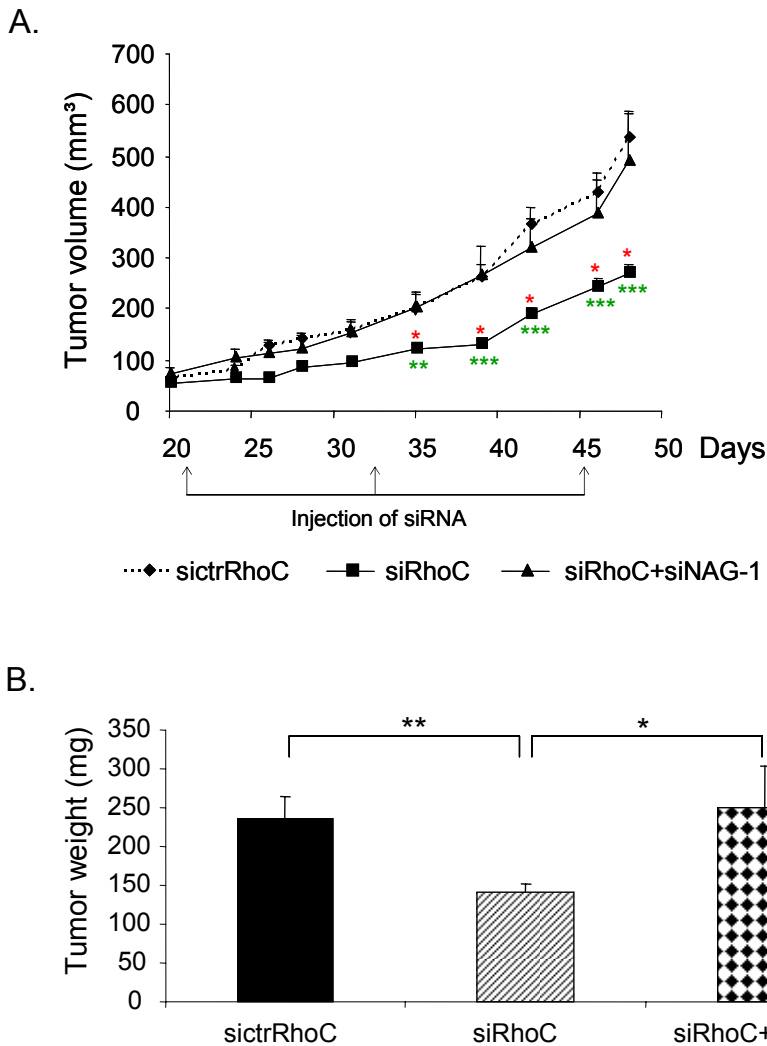


Figure 19 : RhoC est impliqué dans la croissance tumorale in vivo par un mécanisme dépendant de NAG-1. Les PC-3 sont injectées en sous-cutané dans le flanc de souris athymiques. Après formation des tumeurs (j20), celles-ci sont injectées par sictrRhoC, siRhoC ou siRhoC+siNAG-1 associés à de l'atelocollagène à j21, j33 et j45. **A.** Évolution du volume des tumeurs. Les différences significatives sont montrées en utilisant le test statistique « ANOVA one way » suivie par un test de Tukey-Kramer * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$. En vert, comparaison avec sictrRhoC. En rouge, comparaison avec siRhoC+siNAG-1. **B.** Après le sacrifice des animaux, les tumeurs sont excisées et pesées. Les différences significatives sont montrées en utilisant le test statistique « ANOVA one way » suivie par un test de Tukey-Kramer * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$.

RhoC, but not RhoA, is involved in Prostate Cancer Cells Tumorigenesis through GSK3beta-dependent Regulation of NAG-1.

T. T. Giang HO, Johanne DUBAIL, Audrey STULTIENS, Charles M. LAPIERE, Betty V. NUSGENS, Alain C. COLIGE and Christophe F. DEROANNE.

From the Laboratory of Connective Tissues Biology, GIGA-R, University of Liège, Tour de Pathologie, B23/3, B-4000 Sart-Tilman, Belgium

Address correspondence to: Christophe F. Deroanne, PhD, Laboratory of Connective Tissues Biology, GIGA-R, University of Liège, Tour de Pathologie, B23/3, B-4000 Sart-Tilman, Belgium.

Tel.: +32 (0)4 366 24 59; Fax: +32 (0)4 366 24 57; Email : c.deroanne@ulg.ac.be

RUNNING TITLE: RhoC controls tumorigenesis via NAG-1 regulation

ABSTRACT

The small GTPases of the Rho family are key elements in signal transduction pathways. Activated RhoGTPases interact with effectors that trigger a wide variety of cellular responses. Within the RhoA-related subclass, both RhoA and RhoC, in contrast to RhoB, are reported to contribute to cancer progression. To gain insight into the individual role of RhoC and RhoA in prostate cancer cells (PC-3) phenotype, we used siRNA to specifically knock-down each of them. The silencing of RhoC, and not that of RhoA, significantly decreased the anchorage-independent growth of PC-3 and increased the expression of several genes encoding tumor suppressors such as NAG-1, p21Cip1 and p8. This transcriptomic analysis also highlighted the differential regulation of SPARC, a matricellular protein, by RhoA and RhoC. Interestingly, the transfection of RhoC-silenced PC-3 with a siRNA targeting NAG-1 reversed most of these gene regulations and restored the anchorage-independent growth of PC-3. Tumor growth of PC-3 in nude mice was significantly delayed by intratumoral injection of siRNA targeting RhoC, an inhibitory effect relieved by co-injecting siRNA targeting NAG-1. The up-regulation of NAG-1 following RhoC silencing requires p38MAPK and GSK3 β but not Erk1/2. These results suggest that RhoC contributes to tumorigenesis of PC-3 through the repression of NAG-1 expression.

KEYWORDS: RhoC, RhoA, NAG-1, GSK3 β , PC-3, tumor

INTRODUCTION

The small GTPases of the Rho family are key intermediates in transducing signals that originate from clustered cell adhesion receptors and drive cytoskeleton organisation and cell migration. They play also a central role in several aspects of cellular physiology including cell proliferation and survival (Jaffe & Hall, 2005). Although this family include 23 members, most of the studies focused on the three founding members: RhoA, Rac1 and Cdc42 (Aspenstrom et al., 2007). However, other members of the RhoGTPases family have critical functions in various physiological and/or pathological processes. For instance, Rac2, but not Rac1, is involved in B cell adhesion and immunological synapse formation (Arana et al., 2008), RhoE functions both as RhoA antagonist (Wennerberg et al., 2003) and keratinocytes differentiation factor (Liebig et al., 2008) and the atypical RhoGTPase RhoBTB2 is involved in protein ubiquitinylation (Wilkins et al., 2004). Among the RhoGTPase family, the Rho subclass includes RhoA, its closely related homolog RhoC, and RhoB. These three proteins share several properties including the regulation of actin stress fibers formation. However, their roles in cancer progression are clearly not redundant. RhoB is a short-lived protein displaying anti-tumorigenic properties (Liu et al., 2001; Mazieres et al., 2004; Mazieres et al., 2005) whereas RhoA and RhoC are reported as pro-tumorigenic. Despite their high degree of homology, RhoA and RhoC display different affinity for their downstream effectors (Sahai & Marshall, 2002) and exert differential functions in several key steps of cancer progression like epithelial-to-mesenchymal transition (Bellovin

et al., 2006) and invasion of breast carcinoma cells (Simpson et al., 2004). While RhoA is ubiquitously expressed, increasing evidences suggest that RhoC expression is associated with highly aggressive cancers where it promotes metastasis (Clark et al., 2000; Kleer et al., 2002; Shikada et al., 2003; Wang et al., 2008; Wang et al., 2004; Yao et al., 2006). In particular, this was observed in prostate cancer cell lines and tissues where RhoC protein expression was associated with a metastatic phenotype (Iizumi et al., 2008).

Interestingly, it has been established that small GTPases of the Rho family are also integral components of signalling pathways regulating transcription (Coso et al., 1995; Hill et al., 1995) and potential RhoGTPases responsive genes have been identified. The effect of Rho subclass protein on the overall cell transcriptome have been first analysed by Teramoto et al. (Teramoto et al., 2003) and Wu et al. (Wu et al., 2004) who investigated the effect of RhoA and RhoC in NIH3T3 and MCF10A cells, respectively. More recently, a comparison of the gene expression profiles in cells transfected by constitutively active RhoA, RhoB or RhoC has been conducted (Berenjeno et al., 2007). However, in these studies, the Rho proteins are largely overexpressed and sometimes constitutively active while their targeting to specific sub-cellular compartments -which is required for some of their functions (Wu et al., 2005) and specified in the 3' untranslated region of their mRNA- is not warranted. Moreover, the cell lines used in these studies could lack components of the specific signalling pathways activated by one of these RhoGTPases. Thus, these models are not entirely satisfactory for determining some of the specific functions of each of these RhoGTPase. In this work the individual contribution of endogenous RhoA and RhoC to the cancer phenotype was evaluated by specifically knocking down their expression in PC-3 cells, a prostate cancer cell line known to express a significant level and activity of these two Rho proteins (Yao et al., 2006). The knockdown of RhoC, but not that of RhoA, inhibited the anchorage-independent growth of PC-3 cells in vitro and stimulated the expression of genes encoding proteins involved in cell survival and apoptosis regulation such as NAG-1 (also called GDF-15 or MIC-1). The oncogenic properties of RhoC via NAG-1 were also demonstrated in vivo by using intratumoral delivery of siRNA. Our results suggest that

endogenous RhoC contributes to the tumorigenic phenotype of PC-3 cells by repressing the anti-proliferative factor NAG-1.

MATERIALS AND METHODS

Cells and reagents

U0126 was from Calbiochem (Hull, England) and SB203580 was from Alexis (Zandhoven, Belgium). Mouse anti-RhoA (#sc-418), goat anti-RhoC (#sc-26480), rabbit anti-p21 (#sc-397), rabbit anti-SPARC (#sc-25574), goat anti-NAG-1 (#sc-10603) and donkey anti-goat IgG (#sc-2020) were from Santa-Cruz (Boechout, Belgium). Rabbit anti-ERK1/2 (#M-5670) was from Sigma. The secondary horseradish peroxidase conjugated rabbit anti-mouse IgG (P0260) and swine anti-rabbit IgG (P0217) were from DAKO (Heverlee, Belgium). Atelocollagen is pepsinized bovine skin type I collagen purified as described previously (Delvoye et al., 1991). Human prostate adenocarcinoma cells PC-3 were cultured in F-12 Kaighn's medium (Invitrogen, Merelbeke, Belgium) supplemented with 7% FBS (Lonza, Verviers, Belgium).

siRNA transfection

21-nucleotides long siRNAs chemically synthesized, desalted, deprotected and PAGE purified were from Eurogentec (Liège, Belgium). The sequences of the siRNA targeting RhoA (siRhoA and siRhoA#2) and RhoC (siRhoC and siRhoC#2), of the irrelevant siRNA used as control (siScr), and of the specific controls for siRhoA and siRhoC (ctrRhoA and ctrRhoC) were described previously (Ho et al., 2008). The siRNA used to silence NAG-1 were described by others (Shim & Eling, 2005). The 5'-GAAUCGAGAGCUCCAGAUCTT-3' and 5'-GAUCUGGAGCUCUGAUUCTT-3' oligoribonucleotides were used to silence GSK3beta. Each pair of oligoribonucleotides was annealed at a concentration of 20 µM in 50 mM NaCl, 1mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.5. siRNA transfection was carried out as previously described (Deroanne et al., 2003). Briefly, calcium phosphate-mediated transfection was performed overnight (14-16 hours) on subconfluent cells at a final concentration of 20 nM siRNA. Cells were washed twice with PBS and once with complete medium, this last step was defined as time 0 post-transfection. Cells were lysed for Western blot or RT-PCR analysis 48 hours post-transfection.

Microarray analysis

The effect of RhoA and RhoC silencing on the gene expression profile of PC-3 cells was assessed by microarray analysis using the Affymetrix® HG-U133 Plus 2.0 chip containing 22,000 probe sets. Total RNA was isolated from siRNA transfected cells using the High Pure RNA isolation kit (Roche Molecular Biochemical). The integrity of the RNA

was checked with the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Probe synthesis hybridisation, washing protocols and signals scanning were performed on the Genomics Facility of the GIGA, University of Liège.

Real time quantitative PCR

Total RNA was isolated from siRNA transfected cells using the High Pure RNA isolation kit (Roche, Vilvoorde, Belgium). 1 µg of total RNA was reversed transcribed using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Real time PCR was performed in a final volume of 20 µl containing 2 µl of cDNA (corresponding to 10 ng of total RNA for GDF-15, p21Cip1, GADD 153, ATF-3, SPARC and p57Kip2 amplification and corresponding to 0,1 ng of total RNA for GAPDH amplification), 300 nM of each primer and 10 µl of the qPCR MasterMix Plus for SYBR[®] green (Eurogentec) in the Abi Prism 7000 Sequence Detection system (Applied Biosystems, Halle, Belgium). The results were normalized to the GAPDH transcript. PCR was performed with the primers listed in table 1.

Creation of PC-3 clones expressing SPARC in a tetracycline-dependent way

The entire coding sequence of human SPARC was amplified by RT-PCR and cloned into the pcDNA4/TO (Invitrogen). The cDNA sequence was checked by sequencing. Clones of PC-3 cells expressing a high level of tetracycline repressor (PC-3/TR) isolated as previously described (Ho et al., 2008) were transfected with pcDNA4/TO/SPARC and selected in medium supplemented with 1 µg/ml blasticidin + 200 µg/ml zeocin[™]. 2 clones expressing SPARC in a tetracycline-dependent way (PC-3/TR/SPARC) were isolated and used in this study.

Western blotting

Cells were lysed in SDS-PAGE lysis buffer and proteins were separated by polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were transferred to a PVDF Transfer Membrane (NEN Life Science Products). Membranes were blocked for 1 hour with 3% dry milk in PBS-0.05% Tween 20 and incubated for 4 hours with the diluted primary antibody. Membranes were then washed three times, incubated in the diluted secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody for 1 hour, and revealed by chemoluminescence using the ECL kit (Amersham Biosciences) and X-ray film exposure. The membranes were reprobbed with anti-Erk1/2 antibodies to control protein loading.

GTPase activity assay

The assay was carried out as previously described (Deroanne et al., 2003; Sander et al., 1999). Briefly, cells were chilled on ice and lysed in ice-cold buffer containing 1% Triton X-100, 25 mM HEPES pH 7.3,

150 mM NaCl, 4% glycerol, 0.1 mM AEBSF, 4 µg/ml aprotinin. Lysates were centrifuged for 6 minutes at 16000 g. Supernatants were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used. An aliquot of each supernatant collected before freezing was denatured in SDS-PAGE lysis buffer to measure the total RhoGTPase content by Western blotting. For pull-down assays, supernatants were incubated for 30 minutes with 30 µg of GST-PBD protein containing the Cdc42 and Rac binding region of PAK-1B affinity linked to glutathione-Sepharose beads. The beads were washed 4 times in lysis buffer and boiled in 60µl SDS-PAGE lysis buffer.

GENE		PRIMER SEQUENCE
p21Cip1	Forward	5'-TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA-3'
	Reverse	5'-GGCGTTTGGAGTGGTAGAAATC-3'
p57Kip2	Forward	5'-GCGGGCGGATCAAGAA-3'
	Reverse	5'-ACATCCCGCCGACGACTTC-3'
GADD153	Forward	5'-AGAACCAGGAAACGGAAACAGA-3'
	Reverse	5'-TTCATGCGGTGCTTCCA-3'
ATF-3	Forward	5'-TCAAGGAAGAGCTAGGTTTGC-3'
	Reverse	5'-GATTCCAGCGCAGAGGACAT-3'
SPARC	Forward	5'-CCTGGATCTTCTTCTCCTTTGC-3'
	Reverse	5'-ATCAGGCAGGGCTTCTGTCT-3'
NAG-1/ GDF-15/ MIC-1	Forward	5'-TGCCCGCCAGCTACAATC-3'
	Reverse	5'-TCITTTGGCTAACAAAGTCATCATAGGT-3'
HERPUD1	Forward	5'-GACAGTATCCTGAGGATTTCTCAA-3'
	Reverse	5'-GGTGTGTAACCCGAGAAACCAGGA-3'
GADD34	Forward	5'-TGATGGCATGTATGGTGAGCGAGA-3'
	Reverse	5'-TCAGAAGGCTGGGAGACAGGGGA-3'
CTH	Forward	5'-GATCTCACTGCCACGTTCAA-3'
	Reverse	5'-CCAGTGTGCCACTGCTTTTCAA-3'
p8	Forward	5'-GCACGAGAGGAAACTGGTGACCAA-3'
	Reverse	5'-CTCTATTGCTGGGTGATGTCCA-3'
TRIB3	Forward	5'-CACCTACTGCTCCAGATCGTGCAA-3'
	Reverse	5'-TGGACGGGTACACCTTGACAGTA-3'
RhoC	Forward	5'-TCCAGGCTGTCAGGGCTGTCGA-3'
	Reverse	5'-GACCTGCCTCCTCATCATCGTCTCA-3'
GAPDH	Forward	5'-CCTGGCCAAGGTCATCCATGACA-3'
	Reverse	5'-GGGATGACCTTGCCACAGCCIT-3'

Table 1: Sequences of primers used in Real time quantitative PCR

Soft agar assay

Anchorage-independent growth was determined by soft agar assay (Laboisse et al., 1981). 2x10⁵ siRNA-transfected PC-3 cells were plated in 60 mm dishes in growth medium containing 0.3% agar, on top of a 0.6% agar gel. After 21 days colonies were counted in the whole dishes using an inverted phase-contrast microscope. Each assay was done in triplicate. Results are the means ± sem of three independent experiments.

Tumorigenicity studies in nude mice.

A volume of 200 µl of serum-free medium containing 2X10⁶ PC-3 cells was inoculated into both flanks of 4-week-old male nude (athymic) mice by using a 27-gauge needle (n=6). After 3 weeks, the tumors had reached an average volume of 50-100 mm³. They were then injected with 50 µl of siRNA (10 µM) mixed with atelocollagen (2.5 mg/ml) in PBS at day 21, 33 and 45. Tumor growth was

assessed by measuring the length and width of tumors and the volume was determined by using the following formula: (length) x (width)² x 0.4. Tumors were resected and weighted at day 48. Data are presented as means ± sem. This experimental protocol was approved by the Ethical Committee of the University of Liège.

RESULTS

Silencing RhoC, but not RhoA, significantly decreased the anchorage-independent growth of PC-3 cells.

The specific role played by RhoA and RhoC in PC-3 cells phenotype was evaluated by using a siRNA approach. To reduce concerns about "off-target" effects, experiments were performed using two distinct siRNA targeting RhoA (siRhoA or siRhoA#2) and two other targeting RhoC (siRhoC or siRhoC#2). An irrelevant siRNA (siScr), which is a randomly mixed sequence of siRhoA, was used as control. The effective silencing of RhoA and RhoC was checked 48h after transfection by Western blot analysis with specific antibodies to RhoA, RhoC and Erk1/2 used as total proteins loading control. As illustrated in figure 1A, both siRNAs efficiently and specifically repressed their target. The effect of RhoA or RhoC silencing on the in vitro tumorigenic properties of PC-3 cells was tested in an anchorage-independent growth model. Immediately after transfection, PC-3 cells were seeded in soft-agar. After 3 weeks, colonies were counted in the whole culture dishes. The silencing of RhoC with the two different siRNA strongly reduced the number of colonies (Fig. 1B). By contrast, the silencing of RhoA did not affect the number of colonies or even slightly increased it as observed with the siRhoA#2.

To further validate our results, two additional control siRNA were designed by introducing two nucleotide changes from the target sequence (sictRhoA and sictRhoC, (Ho et al., 2008)) as recommended in an editorial of Nat. Cell Biol. (2003). These two mutations completely abrogated their silencing activity since the expression level of RhoA or RhoC was not altered by these control siRNA even at concentrations as high as 60 nM (Fig. 2A and 2B). The culture in soft-agar of PC-3 transfected with these control siRNA, with siRhoC or with siRhoA further showed that RhoC contributes to their anchorage-independent growth capacity (Fig.2C).

It was previously reported that inhibiting RhoC activity, by ectopic expression of a dominant-

negative mutant, or silencing RhoA, by stable expression of a specific shRNA, modulated Rac1 activity (Simpson et al., 2004; Yao et al., 2006). In PC-3 cells, the silencing of RhoA did not affect the activity of Rac1 and that of RhoC only barely decreased active Rac1 (Supplementary Fig. S1). As shown in Fig.1 and 2, and in agreement with Simpson et al. (Simpson et al., 2004), silencing of RhoA up-regulates RhoC and vice-versa.

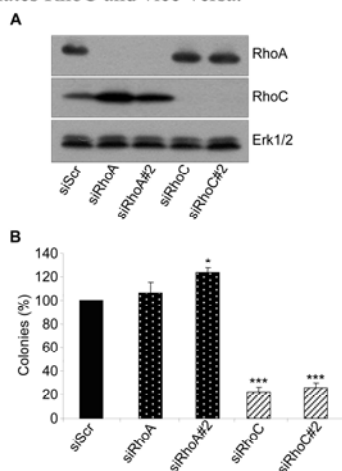


Figure 1: (A) RhoA and RhoC are efficiently silenced by their respective siRNA in human prostate adenocarcinoma cells. PC-3 cells were transfected by 20 nM of two different siRNAs targeting RhoA (siRhoA and siRhoA#2), by 20 nM of two different siRNAs targeting RhoC (siRhoC and siRhoC#2) and by an irrelevant siRNA as control (siScr). 48 hours post transfection, cells were lysed and analyzed by immunoblotting using specific antibodies to RhoA, RhoC and Erk1/2. **(B)** RhoC but not RhoA is involved in the anchorage-independent growth properties of PC-3 cells. PC-3 cells were transfected by 20 nM of siScr, siRhoA, siRhoA#2, siRhoC and siRhoC#2. 24 hours post-transfection, cells were plated in soft agar as described in material and methods. After three weeks of culture, colonies were counted in the whole dishes. Results are reported as the number of colonies in percentage of the siScr condition taken as 100% and are the mean ± sem of three independent experiments. * p < 0.05 and *** p < 0.001 ANOVA followed by Tukey-Kramer analysis.

To assess if the inhibition of anchorage-independent growth of PC-3 cells upon RhoC silencing could be due also to the concomitant RhoA up-regulation, we performed a double silencing of RhoA+RhoC that repressed PC-3 colonies formation in soft-agar similarly to the single silencing of RhoC, ruling out the involvement of this compensatory mechanism (Supplementary Fig. S2).

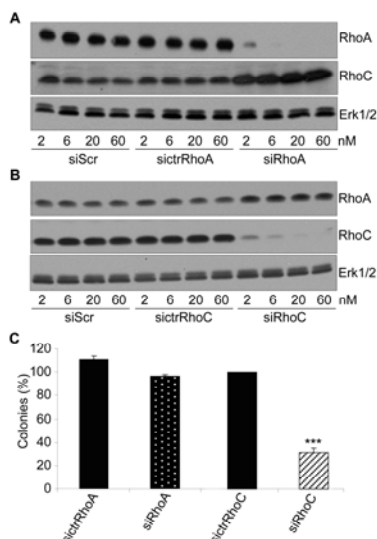


Figure 2: (A) Specific controls for siRhoA and (B) for siRhoC do not silence the expression of RhoA and RhoC. PC-3 cells were transfected with the indicated concentrations of an irrelevant siRNA (siScr), of specific controls for siRhoA (siRhoA) and siRhoC (siRhoC), of the first siRNA targeting RhoA (siRhoA) or of the first siRNA targeting RhoC (siRhoC). 48 hours post transfection, cells were lysed and analyzed by immunoblotting using specific antibodies to RhoA, RhoC and Erk1/2. (C) The use of specific control for siRhoA and siRhoC confirmed the involvement of RhoC in the anchorage-independent growth properties of PC-3 cells. PC-3 cells were transfected with 20 nM of specific controls for siRhoA (siRhoA) and siRhoC (siRhoC), of the first siRNA targeting RhoA (siRhoA) or of the first siRNA targeting RhoC (siRhoC). 24 hours post-transfection, cells were plated in soft agar as described in material and methods. After three weeks of culture, colonies were counted in the whole dishes. Results are reported as the number of colonies in percentage of the siRhoC condition taken as 100% and are the mean \pm sem of three independent experiments. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ ANOVA followed by Tukey-Kramer analysis.

Silencing of RhoC regulates genes involved in cell proliferation and survival.

In order to identify mechanisms involved in the PC-3 anchorage-independent growth two independent comparative analyses of the gene expression profiles following silencing of RhoA or RhoC versus siScr were carried out with Affymetrix® microarrays. An additional microarray analysis comparing PC-3 transfected with siRhoC#2 versus siScr was performed to validate the regulations observed with the first siRNA targeting RhoC. The most significant variations are listed in Table 2. Several genes were up-regulated upon RhoC silencing and unchanged or down-regulated in RhoA silenced

PC-3. Among them, NAG-1, p21Cip1, p57Kip2, ATF-3, GADD153, GADD34, p8, TRIB3 or HERPUD1 are involved in signaling networks controlling cell growth arrest and apoptosis, and in the endoplasmic reticulum stress response. Microarray results were confirmed by real-time PCR (Fig.3) and, at the protein level, by Western blot analysis (Fig.4 and supplementary Fig.S3). Interestingly, the expression level of SPARC (for secreted protein, acidic, cysteine-rich; also called osteonectin), an extracellular matrix component potentially involved in tumorigenesis (Hooi et al., 2006), was repressed upon RhoC silencing and up-regulated upon RhoA silencing. This antagonistic regulation was confirmed by real-time PCR (Fig.3) and Western blot analysis (Fig.4).

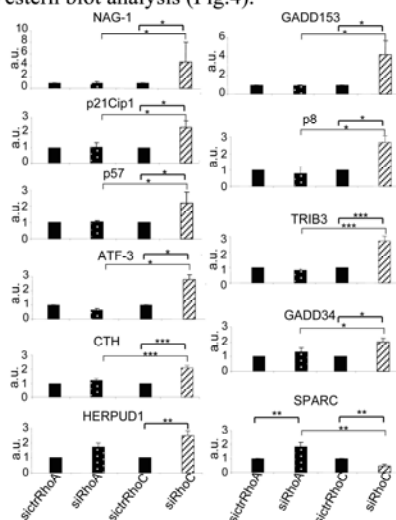


Figure 3: Confirmation of the microarray data by Real Time Q-PCR. Real time quantitative PCR analysis of the expression of the indicated mRNAs was performed with total RNA extracted from PC-3 cells 48 hours after transfection with 20nM of specific controls for siRhoA (siRhoA) and siRhoC (siRhoC), of the first siRNA targeting RhoA (siRhoA) or of the first siRNA targeting RhoC (siRhoC). Results are the mean \pm sem of three independent experiments. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ ANOVA followed by Tukey-Kramer analysis.

Repression of NAG-1 partly reversed the gene regulations driven by RhoC silencing.

NAG-1 was reported to regulate the expression of genes controlling proliferation and apoptosis. To address its role in the modulations of gene expression induced by RhoC silencing, a simultaneous repression of RhoC and NAG-1 was performed. As illustrated in figure 5 and 6A, both molecules were efficiently silenced. The simultaneous silencing of NAG-1 and RhoC

reversed the induction of p21cip1 both at the mRNA level (Fig.5) and at the protein level (Fig.6A). Among the genes stimulated by RhoC silencing, p8, CTH, HERPUD1, TRIB3, GADD153 and GADD34 overexpression was as well reversed by co-silencing NAG-1 (Fig.5). The repression of SPARC induced by RhoC silencing was also dependent on NAG-1 since the co-silencing RhoC+NAG-1 restored SPARC expression (Fig.6B). For some genes however, as ATF-3 and p57kip2, the inhibition of NAG-1 did not significantly repress the regulation induced by silencing RhoC (Fig.5).

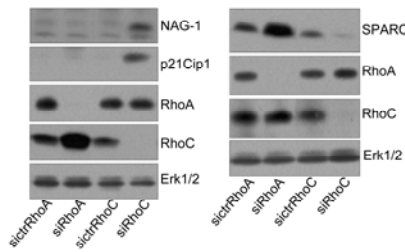


Figure 4: The siRhoC-induced regulations of NAG-1, p21Cip1 and SPARC are expressed at the protein level. PC-3 cells were transfected with 20nM of specific controls for siRhoA (sictRhoA) and siRhoC (sictRhoC), of the first siRNA targeting RhoA (siRhoA) or of the first siRNA targeting RhoC (siRhoC). 48 hours post-transfection, cells were lysed and analyzed by immunoblotting using specific antibodies to NAG-1, p21Cip1, SPARC and Erk1/2. Representative blots of three independent experiments are shown.

The up-regulation of NAG-1 after RhoC silencing requires p38MAPK and GSK3β but not Erk1/2.

The role of GSK3β and p38MAPK, two potential regulators of NAG-1 expression (Shim & Eling, 2008; Yamaguchi et al., 2004), and of Erk1/2 was evaluated in RhoC-silenced cells obtained by co-transfecting a siRNA targeting GSK3β or by mean of pharmacological inhibitors, SB203580 or U0126. The increased expression of NAG-1 observed in RhoC-silenced PC3 cells was effectively repressed by co-silencing of GSK3β to a level close to that observed in control transfected cells (Fig. 7A). It should be noted that GSK3β silencing alone did not alter significantly the basal expression level of NAG-1. The inhibition of p38MAPK also repressed the expression of NAG-1 but in both RhoC-silenced and control-transfected PC3 cells suggesting that this pathway, by contrast to GSK3β, is required also for the basal expression of NAG-1 (Supplementary Fig. S4). Erk1/2

inhibition slightly increased the expression of NAG-1 in control-transfected and RhoC-silenced cells (Fig.7B).

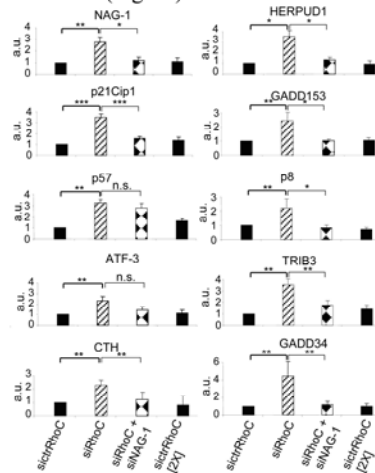


Figure 5: The induction of p21Cip1, p8, CTH, HERPUD1, TRIB3, GADD153 and GADD34 following RhoC silencing are dependent on NAG-1. Real time quantitative PCR analysis of the expression of the indicated mRNA was performed with total RNA extracted from PC-3 cells 48 hours after transfection with 20 nM (or 40 nM) of specific controls for siRhoC (sictRhoC or sictRhoC[2X]), with 20nM of the first siRNA targeting RhoC (siRhoC) or co-transfection with 20 nM of the first siRNA targeting RhoC + 20 nM of the siRNA targeting NAG-1 (siRhoC+siNAG1). Results are the mean ± sem of three independent experiments. n.s.: not significant; *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001 ANOVA followed by Tukey-Kramer analysis

The repression of NAG-1 restored the anchorage-independent growth of RhoC-silenced PC-3 cells.

To address the role of NAG-1 in the repression of the anchorage-independent growth upon RhoC silencing, PC-3 cells were transfected with siRhoC alone or with siRhoC+siNAG-1 and tested immediately after transfection for colonies formation in soft-agar. After 3 weeks, the colonies were counted in the whole culture dishes. As illustrated in figure 8, the silencing of RhoC significantly reduced the number of colonies as compared to sictRhoC-transfected cells as previously described. By contrast, cells co-transfected with siRhoC and siNAG-1 had the same ability to form colonies as the sictRhoC-transfected cells. It should be noted that increasing the concentration of sictRhoC up to 40 nM did not alter the ability of PC-3 cells to form colonies in soft-agar as compared to cells transfected with 20 nM of sictRhoC,

suggesting that the restoration of the ability of PC-3 cells to form colonies upon the double silencing RhoC+NAG-1 is not an unspecific effect due to the increased concentration of siRNA.

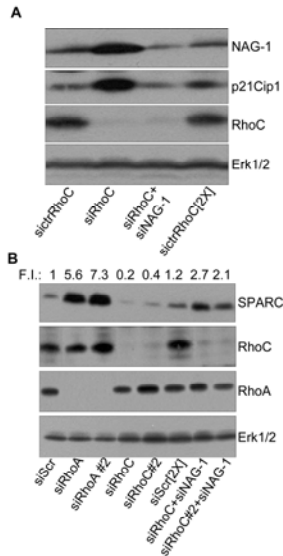


Figure 6: The regulation of p21Cip1 and SPARC protein level following RhoC silencing are dependent on NAG1. (A) PC-3 cells were transfected with 20 nM (or 40 nM) of specific controls for siRhoC (sictrRhoC or sictrRhoC[2X]), with 20 nM of the first siRNA targeting RhoC (siRhoC) or co-transfected with 20 nM of the first siRNA targeting RhoC + 20 nM of the siRNA targeting NAG-1 (siRhoC+siNAG1). (B) PC-3 cells were transfected with 20 nM (or 40 nM) of an irrelevant siRNA (siScr or siScr [2X]) with 20 nM of two different siRNAs targeting RhoA (siRhoA and siRhoA#2), of two different siRNAs targeting RhoC (siRhoC and siRhoC#2) or with 20 nM of siRhoC + 20 nM of siNAG-1 (siRhoC+siNAG-1) or with 20 nM of siRhoC#2 + 20 nM siNAG-1. 48 hours post-transfection, cells were lysed and analyzed by immunoblotting with specific antibodies to NAG-1, p21Cip1, SPARC and Erk1/2. The fold induction (F.I.) was calculated from densitometric measurements of SPARC normalized to Erk1/2 in each condition compared with the siScr condition taken as 1.0.

The re-expression of SPARC in RhoC-silenced PC-3 is sufficient to restore their anchorage-independent growth properties. SPARC has been implicated in tumorigenesis and we observed that it was antagonistically regulated by RhoA and RhoC. To test if its repression upon RhoC-silencing was involved in the growth inhibition of PC-3 in soft-agar, we generated clones expressing SPARC in a tetracycline-dependent way (PC-3/TR/SPARC). These clones were transfected with 20 nM of

control siRNA (sictrRhoC) or with 20 nM of siRhoC. Immediately after transfection, the cells were processed for culture in soft-agar either in absence or in presence of 1 ng/ml of tetracycline. As assessed by Western blot analysis, this concentration of tetracycline was sufficient to induce the expression of exogenous SPARC (Fig.9). The overexpression of SPARC did not modulate the number of colonies formed by PC-3 cells transfected with the control siRNA but significantly increased the number of colonies form by RhoC-silenced PC-3 cells suggesting that SPARC is involved, at least partly, in the in vitro tumorigenic properties of PC-3 cells (Fig.9).

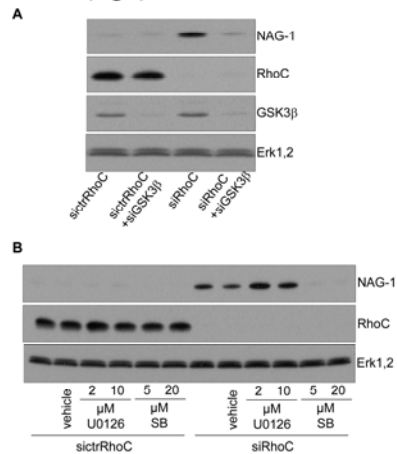


Figure 7: The up-regulation of NAG-1 following RhoC silencing is dependent on GSK3beta and p38MAPKinase. (A) PC-3 cells were transfected with 20 nM of a specific control for siRhoC (sictrRhoC), with 20 nM of the first siRNA targeting RhoC (siRhoC) or with 20 nM of the first siRNA targeting RhoC + 20 nM of the siRNA targeting GSK3beta (siRhoC+siGSK3β), with 20 nM of the first siRNA targeting RhoC (siRhoC) or with 20 nM of the first siRNA targeting RhoC + 20 nM of the siRNA targeting GSK3beta (siRhoC+siGSK3β). 48 hours post transfection, cells were lysed and analyzed by immunoblotting using specific antibodies to NAG-1, RhoC, GSK3β and Erk1/2. Representative blots of three independent experiments are shown. (B) PC-3 cells were transfected with 20 nM of a specific control for siRhoC (sictrRhoC) or with 20 nM of the first siRNA targeting RhoC (siRhoC) and cultured between day 1 and 2 after transfection with the indicated concentrations of MEK-kinase inhibitor U0126 and of the p38MAPKinase inhibitor SB203580.

Intratumoral injection of siRNA targeting RhoC delayed PC-3 tumor growth, a process reversed by co-injecting siRNA targeting NAG-1.

The atelocollagen-mediated siRNA transfer as described by Minakuchi et al. (2004) was used to perform in vivo experiments. PC-3 cells were

subcutaneously inoculated in each flank of nude mice. After 3 weeks, when the tumors reached a volume of 50-100 mm³, a mixture of atelocollagen and siRNA was injected in each tumor. This procedure was repeated 12 and 24 days later. The injection of siRhoC significantly slowed down the growth of PC-3 tumors. By contrast, the simultaneous injection of siRhoC and siNAG-1 restored to PC-3 tumors the same growth capacity as that of sictrRhoC-injected tumors (Fig. 10A). The mice were sacrificed at day 48 to collect the tumors. The weight of the tumors subjected to siRhoC treatment was significantly lower than that of tumors treated with the control siRNA (sictrRhoC) or with siRhoC+siNAG-1 (Fig.10B). These results strongly support a role for NAG-1 in the mechanisms involved in the in vivo anti-tumoral effect of siRhoC.

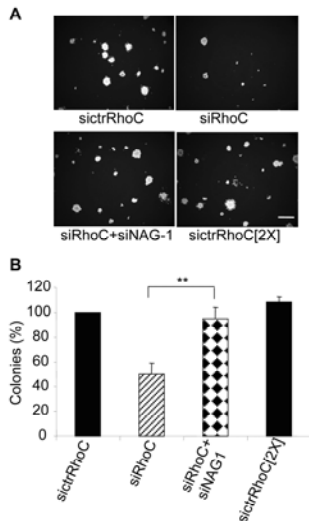


Figure 8: RhoC is involved in tumorigenesis of PC-3 cells by a mechanism dependent on NAG-1. PC-3 cells were transfected with 20 nM (or 40 nM) of specific controls for siRhoC (sictrRhoC or sictrRhoC[2X]), with 20 nM of the first siRNA targeting RhoC (siRhoC) or with 20 nM of the first siRNA targeting RhoC + 20 nM of the siRNA targeting NAG-1 (siRhoC+siNAG1). 24 hours post-transfection, cells were plated in soft agar as described in Material and Methods. After three weeks of culture, colonies were counted in the whole dishes. (A) Representative fields of colonies growing in soft agar. Bar = 1 mm. (B) Results are reported as the number of colonies in percentage of the sictrRhoC condition taken as 100% and are the mean ± sem of three independent experiments. ** p< 0.01 ANOVA followed by Tukey-Kramer analysis.

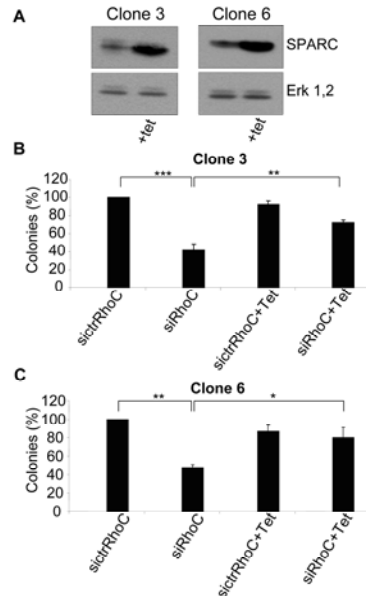


Figure 9: The re-expression of SPARC is sufficient to restore the anchorage-independent growth properties of RhoC-silenced PC-3 cells. Two clones (#3 and #6) of PC-3 cells were selected for their ability to express SPARC in a tetracycline-dependent way (+tet) as illustrated in the representative western blots shown in (A). These clones were transfected with 20 nM of a specific control for siRhoC (sictrRhoC) or with 20 nM of the first siRNA targeting RhoC (siRhoC). 24 hours post-transfection, cells were plated in soft agar as described in Material and Methods. Cells were weekly supplemented (+tet) or not with renewed tetracycline (1 ng/ml). After three weeks of culture, colonies were counted in the whole dishes. Results are reported as the number of colonies in percentage of the sictrRhoC condition taken as 100% and are the mean ± sem of three independent experiments carried out with clone 3 (B) or clone 6 (C). * p<0.05 ** p< 0.01 and *** p< 0.001 ANOVA followed by Tukey-Kramer analysis.

DISCUSSION

The three members of the Rho sub-class, RhoA, RhoB and RhoC, play various roles in cancer progression. RhoA and RhoC are reported to contribute to the cancer phenotype while RhoB displays properties that might participate in tumor suppression (Liu et al., 2001; Mazieres et al., 2004; Mazieres et al., 2005). Even if RhoA and RhoC are close homologs sharing downstream effectors and regulating similar biological processes, their implication in key steps of cancer progression like breast carcinoma cell invasion or epithelial-to-mesenchymal transition is clearly distinct (Bellovin et al., 2006; Simpson et al., 2004).

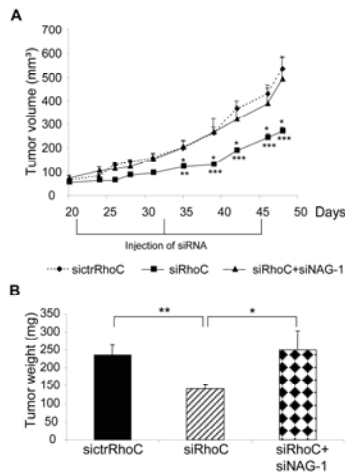


Figure 10: The in vivo anti-tumorigenic effect of the siRNA targeting RhoC is inhibited by co-administration of a siRNA targeting NAG-1. **(A)** Tumor growth curves. After induction of tumor formation by subcutaneous injection of 2×10^6 PC-3 cells, $50 \mu\text{l}$ of a solution containing $10 \mu\text{M}$ of a specific control for siRhoC (siCtrlRhoC), $10 \mu\text{M}$ of the first siRNA targeting RhoC (siRhoC) or $10 \mu\text{M}$ of the first siRNA targeting RhoC + $10 \mu\text{M}$ of the siRNA targeting NAG-1 (siRhoC+siNAG1) mixed with atelocollagen as described in Materials and Methods were injected into the tumor region on day 21, 33 and 45. Tumor volume was calculated from tumor biaxial diameter measurement at regular interval up to day 48. Results represent the means \pm sem ($n = 6$ tumors). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ ANOVA followed by Tukey-Kramer analysis. **(B)** Weight of the tumor at day 48. Results represent the means \pm sem.

Moreover, RhoC expression is preferentially associated with highly aggressive cancers (Clark et al., 2000; Iizumi et al., 2008; Kleer et al., 2005; Kleer et al., 2002). The specific contribution of RhoA and RhoC to cancer progression could be related to the biological program elicited by their effects on the cytoskeleton dynamics but also to their activity on the overall cell transcriptome. RhoGTPases are indeed involved in intracellular signalling pathways leading to alterations in gene expression. For instance, the serum responsive factor (SRF) can be activated through Rho-mediated cytoskeletal changes (Miralles et al., 2003). By contrast, RhoGTPases are also able to regulate gene transcription through signal transduction pathways independent of their effect on cytoskeleton (Marinissen et al., 2004). To date, three microarray studies using cells transfected by RhoA and/or RhoC oncoproteins are available (Berenjeno et al., 2007; Teramoto et al., 2003; Wu et al., 2004). However, in the

most recent of these studies, a similar cellular transformation program was elicited by constitutively active RhoA, RhoB or RhoC overexpression suggesting that these experimental strategies are not relevant to the biological program activated by the physiological endogenous Rho proteins. The excessive expression and/or activation level of the Rho proteins, the potential depletion of upstream or downstream effectors required for specific parts of the Rho-driven biological program in the cell types used and the absence in the expression vector of untranslated regions of the Rho mRNA which can convey cues required for some Rho-mediated cellular events (Wu et al., 2005) weaken the significance of these models. In our work, the specific effect of RhoA and RhoC on the cellular transcriptome was investigated by an inverted approach: the specific silencing of RhoA and RhoC in a cellular model expressing significant amount of both RhoGTPases (Yao et al., 2006). Our results were validated by silencing each target with two different siRNAs and by using general and specific controls. These investigations were completed by assessing the relevance of the gene regulations to the in vitro and in vivo tumorigenic phenotype, i.e. growth in soft-agar and tumor growth in nude mice, respectively.

Our results clearly show that the anchorage-independent growth of PC-3 cells is dependent on RhoC but not on RhoA. In other cellular models, RhoA was however reported to positively contribute to proliferation (Pille et al., 2005). These discrepancies could be related to the variation of the expression level of each of these RhoGTPases from one cell type to another but also to the repertoire of proteins available in each cell type that can trigger the selection of downstream targets for RhoGTPases to achieve a particular response. The direct involvement of RhoC was assessed by several experiments designed to rule out potential compensatory mechanisms. Previous studies suggested that inhibition of RhoC, by expressing a dominant-negative RhoC mutant, or of RhoA, by shRNA, affected the activation level of Rac1 (Simpson et al., 2004; Yao et al., 2006). This was not observed in our model suggesting that such indirect effect does not contribute to the regulations observed in our study. This discrepancy could be related to the selection process required in their studies to isolate clones during which counter selection mechanisms could take place.

		Fold change				
		siRhoC vs siScr		siRhoC#2 vs siScr	siRhoA vs siScr	
		microarray 1	microarray 2		microarray 1	microarray 2
ras homolog gene family, member C	RHOC	-7	-4.6	-3	1.2	1
ras homolog gene family, member A	RHOA	1	-1.1	-1.1	-5.2	-4.9
downregulated						
secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	SPARC	-3	-5.7	-2.1	2.3	2.3
parathyroid hormone-like hormone	PTH1H	-1.9	-1.6	-2	1.3	1.3
interleukin 1, beta	IL1B	-4.3	-2.3	-2.3	-1.1	-1.1
angiotensin-like 4	ANGPTL4	-2.5	-4.3	-2.8	1.1	1.1
chromosome 1 open reading frame 165	C1orf165	-3	-2.1	-2.3	1.1	-1.1
plasminogen activator tissue	PLAT	-2.5	-2	-1.9	1	-1.1
COBL-like 1	COBL1	-2.3	-2	-1.9	-1.9	-1.2
very low density lipoprotein receptor	VDLDR	-2.3	-2.1	-2	1.1	-1.1
opsin 3 (encephalopsin panopsin)	OPN3	-2.3	-2	-1.6	1	-1.2
retinol binding protein 4 plasma	RBP4	-2.3	-2.8	-1.9	1.1	-1.1
urotensin 2	UTS2	-2	-3.2	-1.7	1.9	1.2
solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2	SLC12A2	-2.1	-2.8	-2.1	1	1
phosphofructokinase, platelet	PFKP	-2.1	-1.9	-2.1	-1.4	-1.2
T cell receptor beta constant 1	TRBC1	-2.5	-2	-2.1	-1.5	-1.1
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter)	SLC2A1	-1.5	-2.1	-2.5	1	1
procollagen-proline 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase) alpha polypeptide II	P4HA2	-1.6	-2	-2	-1.3	-1.4
upregulated						
NSAID-activated gene 1/ growth differentiation factor 15	NAG-1/GDF15	2.5	2.5	2.6	-1.1	-1.3
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	p21Cip1/CDKN1A	3.2	3	1.1	1.1	1
Growth Arrest and DNA Damage gene 153/DNA-damage-inducible transcript 3	GADD153/DDIT3	4	4.6	2.8	-1.4	-1.3
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	p57Kip2/CDKN1C	2.1	1.7	1.2	1.3	1.6
activating transcription factor 3	ATF3	2.1	2.3	1.9	-1.2	-1.4
cystathionase (cystathionine gamma-lyase)	CTH	2.1	2.8	1.6	-1.3	-1.1
homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	HERPUD1	2.3	1.9	1.9	-1.1	1
Growth Arrest and DNA Damage gene 34/protein phosphatase 1 regulatory (inhibitor) subunit 15A	GADD34/PPP1R1 5A	3.5	3.2	1.5	1.1	1.1
Tribbles homolog 3	TRIB3	2	1.7	1.7	-1.9	-1.7
asparagine synthetase	ASNS	2	1.5	1.9	-1.1	-1.2
CCAA1/enhancer-binding protein B	CEBPB	2.8	1.9	1.7	-1.3	-1.2
p8 protein (candidate of metastasis 1)	p8	2.8	2.3	2.6	-1.4	-1.6
sequestosome 1	SQSTM1	2.6	3	3	1.1	1.3
ATPase H+ transporting lysosomal 42kDa V1 subunit C1	ATP6V1C1	2	2	1.7	-1.2	1.4
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (GalNAc-T3)	GALNT3	2.5	3	1.9	-1.1	1
arginase type II	ARG2	4.3	3.7	1.5	1.2	1
S100 calcium binding protein P	S100P	2.6	2.8	1.5	-2.8	-2.6
GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	GEM	2.1	2.8	1.9	-1.1	-1.1
tripeptidyl peptidase I	TPP1	2.5	2.5	1.6	1.1	1.1
brain expressed X-linked-like 1	BEX1	2.5	2	1.9	-1.2	-1.4
HSPB (heat shock 27kDa) associated protein 1	HSPBAP1	3	2.1	1.5	1.2	-1.1
cell cycle progression 1	CCPG1	2	2.1	1.5	1.3	1.1
syntaxin 3	STX3	2.1	1.6	2.1	1.1	-1.1
neutrophil cytosolic factor 2 (65kDa, chronic granulomatous disease, autosomal 2)	NCF2	4	7	4	-2	-1.4
metallothionein 1F (functional)	MT1F	1.9	2.5	2	-1.4	-1.4
metallothionein 1X	MT1X	1.9	3.5	1.9	-1.3	1.3
DnaJ (Hsp40) homolog subfamily C member 12	DNAJC12	1.9	2.1	1.7	1.1	1

Table 2: Selected genes regulated in PC-3 cells following RhoA or RhoC silencing

By contrast, our investigations were always carried out on transiently transfected cells avoiding therefore such mechanisms. We and others recently reported cross-regulations within the Rho-subclass (Ho et al., 2008;

Simpson et al., 2004; Steffan et al., 2009; Tillement et al., 2008). Notably, an increased expression of RhoA is induced upon RhoC silencing as we also observed in this study suggesting that the inhibition of anchorage-

independent growth by RhoC silencing might be due to either the repression of RhoC or the induction of RhoA. The latter possibility was ruled out by performing a double silencing RhoC+RhoA which resulted in a repression of anchorage-independent growth similar to the silencing of RhoC alone. In the other hand, RhoB protein level is also regulated via cross-talks within the Rho sub-class. As its expression is repressed by RhoA and RhoC, it is likely not involved in their differential effect on the PC-3 cells phenotype (Ho et al., 2008). Among the genes specifically regulated by RhoC silencing, a cluster of genes, including NAG-1, p21Cip1, p57Kip2, ATF-3, GADD153, GADD34, p8, TRIB3, CTH and HERPUD1, were most interesting since they are involved in cell growth arrest and reported to be cross-regulated (Carracedo et al., 2006; Clark et al., 2008; Jiang et al., 2004; Kim et al., 2005; Zu et al., 2006). NAG-1 (also called GDF-15 or MIC-1) seems to play a central role in this network by controlling the expression of most of the others. This transforming growth factor-beta superfamily cytokine has been generally considered as part of the antitumoral repertoire of the cells. However, its secretion, processing and sequestration within the extracellular matrix, suggest a complex role in cancer progression (Bauskin et al., 2006). In our model, it clearly contributes to the repression of the tumorigenic properties of PC-3 cells upon RhoC silencing not only through the regulation of genes involved in cell growth arrest but also via the inhibition of the expression of SPARC (or osteonectin). This component of the extracellular matrix has been shown to display pro-tumorigenic properties in prostate cancer (Chen et al., 2007; Hooi et al., 2006). The contribution of SPARC to the tumorigenic phenotype of PC-3 cells was demonstrated by restoring the anchorage-independent growth properties of RhoC-silenced PC-3 cells through its re-expression. Our results emphasized the involvement of the p38MAPKinase pathways in the basal expression of NAG-1, as it was inhibited by SB203580 in RhoC-silenced as well as in control-transfected PC-3 cells. By contrast, GSK3 β controls the inducible expression of NAG-1 following RhoC-silencing. These data are in agreement with those of the group of Ehling and Baek who reported NAG-1 induction in cancer cell lines by various anti-tumorigenic agents through these pathways

(Shim & Eling, 2008; Yamaguchi et al., 2004). The activity of GSK3 β can be modulated by several intracellular signalling cascades potentially regulated by RhoC such as the AKT or Wnt pathways (Iizumi et al., 2008; Qiang et al., 2003; Ruth et al., 2006). We did not observe any modulation of its phosphorylation status (data not shown) suggesting that the regulation of its activity might be independent of its phosphorylation or this modification could be too transient to be observed. Nevertheless, our siRNA experiments demonstrated clearly the involvement of GSK3 β in the regulation of NAG-1. The Erk1/2 pathway seems to be also implicated in the regulation of NAG-1 as suggested by the increased expression of NAG-1 in RhoC-silenced PC-3 cells treated with the MEK1/2 inhibitor U0126. Antagonistic regulations of gene expression by the p38MAPKinase and the Erk1/2 pathways have already been reported (Brauchle et al., 2000; Deroanne et al., 2005; Reunanen et al., 2002). They are likely related to the potential inhibition of MEK1,2 activity by the p38MAPKinase pathway (Westermarck et al., 2001).

Studies by Buchsbaum et al. (Buchsbaum et al., 2002; Buchsbaum et al., 2003) and by Jaffe et al. (Jaffe et al., 2005) suggested that the panel of biological responses elicited by RhoGTPases is exquisitely orchestrated by the selected GEFs and the ability of these GEFs to interact with scaffold proteins which finally dictate the choice of the downstream effectors. Although RhoA and RhoC display common activators and effectors, their respective affinity for these proteins might differ as it was reported for ROCK (Sahai & Marshall, 2002). The relative affinity of RhoA and RhoC for GEFs and/or for their targets, including those who act as scaffold proteins, could explain their differential effect on the phenotype of PC-3 cells and the differential regulation of the transcriptome of these cells by RhoA and RhoC reported here. We are currently investigating the relative affinity of RhoA and RhoC for various activators and effectors to decipher potential points of divergence in their downstream signalling.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partly supported by grants from Belgian F.R.S.M. (3.4514.07), Fonds Léon Frédéricq and Centre Anticancéreux près l'ULg and

the Belspo/Prodex Agency at the ESA. C.F.D. and A.C. are Research Associate and Senior Research Associates of the Belgian F.R.S.-FNRS. T.T.G.H and A.S are fellows of the Belgian F.R.S.-FNRS (FRIA and Télévie).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

SUPPLEMENTARY INFORMATIONS

Supplementary informations are available at Oncogene's web site

REFERENCES

(2003). Whither RNAi? *Nat Cell Biol* **5**: 489-490.

Arana E, Vehlow A, Harwood NE, Vigorito E, Henderson R, Turner M, et al. (2008). Activation of the small GTPase Rac2 via the B cell receptor regulates B cell adhesion and immunological-synapse formation. *Immunity* **28**: 88-99.

Aspenstrom P, Ruusala A , Pacholsky D. (2007). Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho GTPases. *Exp Cell Res* **313**: 3673-3679.

Bauskin AR, Brown DA, Kuffner T, Johnen H, Luo XW, Hunter M, et al. (2006). Role of macrophage inhibitory cytokine-1 in tumorigenesis and diagnosis of cancer. *Cancer Res* **66**: 4983-4986.

Bellovin DI, Simpson KJ, Danilov T, Maynard E, Rimm DL, Oetgen P, et al. (2006). Reciprocal regulation of RhoA and RhoC characterizes the EMT and identifies RhoC as a prognostic marker of colon carcinoma. *Oncogene* **25**: 6959-6967.

Berenjeno IM, Nunez F , Bustelo XR. (2007). Transcriptomal profiling of the cellular transposition induced by Rho subfamily GTPases. *Oncogene* **26**: 4295-4305.

Brauchle M, Gluck D, Di Padova F, Han J , Gram H. (2000). Independent role of p38 and ERK1/2 mitogen-activated kinases in the upregulation of matrix metalloproteinase-1. *Exp Cell Res* **258**: 135-144.

Buchsbaum RJ, Connolly BA , Feig LA. (2002). Interaction of Rac exchange factors Tiam1 and Ras-GRF1 with a scaffold for the p38 mitogen-activated protein kinase cascade. *Mol Cell Biol* **22**: 4073-4085.

Buchsbaum RJ, Connolly BA , Feig LA. (2003). Regulation of p70 S6 kinase by complex formation between the Rac guanine nucleotide exchange factor (Rac-GEF) Tiam1 and the scaffold spinophilin. *J Biol Chem* **278**: 18833-18841.

Carracedo A, Lorente M, Egia A, Blazquez C, Garcia S, Giroux V, et al. (2006). The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer Cell* **9**: 301-312.

Chen N, Ye XC, Chu K, Navone NM, Sage EH, Yu-Lee LY, et al. (2007). A secreted isoform of ErbB3 promotes osteonectin expression in bone and enhances the invasiveness of prostate cancer cells. *Cancer Res* **67**: 6544-6548.

Clark DW, Mitra A, Fillmore RA, Jiang WG, Samant RS, Fodstad O, et al. (2008). NUPR1 interacts with p53, transcriptionally regulates p21 and rescues breast epithelial cells from doxorubicin-induced genotoxic stress. *Curr Cancer Drug Targets* **8**: 421-430.

Clark EA, Golub TR, Lander ES , Hynes RO. (2000). Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* **406**: 532-535.

Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, et al. (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**: 1137-1146.

Delvoye P, Wiliquet P, Leveque JL, Nusgens BV , Lapiere CM. (1991). Measurement of mechanical forces generated by skin fibroblasts embedded in a three-dimensional collagen gel. *J Invest Dermatol* **97**: 898-902.

Deroanne C, Vouret-Craviari V, Wang B , Pouyssegur J. (2003). EphrinA1 inactivates integrin-mediated vascular smooth muscle cell spreading via the Rac/PAK pathway. *J Cell Sci* **116**: 1367-1376.

Deroanne CF, Hamelryckx D, Ho TT, Lambert CA, Catroux P, Lapiere CM, et al. (2005). Cdc42 downregulates MMP-1 expression by inhibiting the ERK1/2 pathway. *J Cell Sci* **118**: 1173-1183.

Hill CS, Wynne J , Treisman R. (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* **81**: 1159-1170.

Ho TT, Merajver SD, Lapiere CM, Nusgens BV , Deroanne CF. (2008). RhoA-GDP regulates RhoB protein stability. Potential involvement of RhoGDIalpha. *J Biol Chem* **283**: 21588-21598.

Hooi CF, Blancher C, Qiu W, Revet IM, Williams LH, Ciavarella ML, et al. (2006). ST7-mediated suppression of tumorigenicity of prostate cancer cells is characterized by remodeling of the extracellular matrix. *Oncogene* **25**: 3924-3933.

Iizumi M, Bandyopadhyay S, Pai SK, Watabe M, Hirota S, Hosobe S, et al. (2008). RhoC promotes metastasis via activation of the Pyk2 pathway in prostate cancer. *Cancer Res* **68**: 7613-7620.

Jaffe AB , Hall A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 247-269.

Jaffe AB, Hall A , Schmidt A. (2005). Association of CNK1 with Rho guanine nucleotide exchange factors controls signaling specificity downstream of Rho. *Curr Biol* **15**: 405-412.

Jiang HY, Wek SA, McGrath BC, Lu D, Hai T, Harding HP, et al. (2004). Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Mol Cell Biol* **24**: 1365-1377.

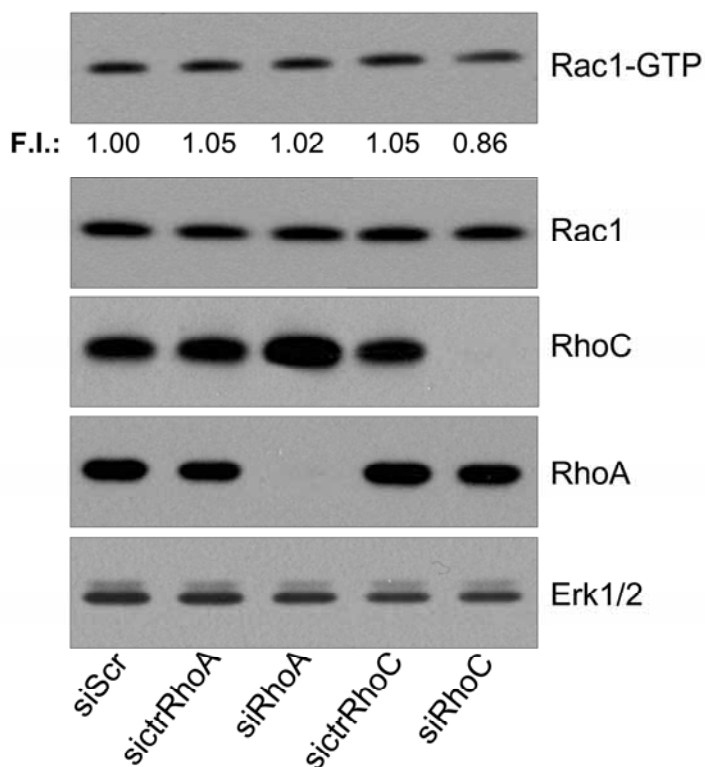
Kim JS, Baek SJ, Sali T , Eling TE. (2005). The conventional nonsteroidal anti-inflammatory drug sulindac sulfide arrests ovarian cancer cell growth via the expression of NAG-1/MIC-1/GDF-15. *Mol Cancer Ther* **4**: 487-493.

Kleer CG, Griffith KA, Sabel MS, Gallagher G, van Golen KL, Wu ZF, et al. (2005). RhoC-GTPase is a novel tissue biomarker associated with biologically aggressive carcinomas of the breast. *Breast Cancer Res Treat* **93**: 101-110.

- Kleer CG, van Golen KL, Zhang Y, Wu ZF, Rubin MA, Merajver SD. (2002). Characterization of RhoC expression in benign and malignant breast disease: a potential new marker for small breast carcinomas with metastatic ability. *Am J Pathol* **160**: 579-584.
- Laboisse CL, Augeron C, Potet F. (1981). Growth and differentiation of human gastrointestinal adenocarcinoma stem cells in soft agarose. *Cancer Res* **41**: 310-315.
- Liebig T, Erasmus J, Kalaji R, Davies D, Loirand G, Ridley A, et al. (2008). RhoE Is Required for Keratinocyte Differentiation and Stratification. *Mol Biol Cell*.
- Liu AX, Rane N, Liu JP, Prendergast GC. (2001). RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells. *Mol Cell Biol* **21**: 6906-6912.
- Marinissen MJ, Chiariello M, Tanos T, Bernard O, Narumiya S, Gutkind JS. (2004). The small GTP-binding protein RhoA regulates c-jun by a ROCK-JNK signaling axis. *Mol Cell* **14**: 29-41.
- Mazieres J, Antonia T, Daste G, Muro-Cacho C, Berchery D, Tillement V, et al. (2004). Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. *Clin Cancer Res* **10**: 2742-2750.
- Mazieres J, Tillement V, Allal C, Clanet C, Bobin L, Chen Z, et al. (2005). Geranylgeranylated, but not farnesylated, RhoB suppresses Ras transformation of NIH-3T3 cells. *Exp Cell Res* **304**: 354-364.
- Minakuchi Y, Takeshita F, Kosaka N, Sasaki H, Yamamoto Y, Kouno M, et al. (2004). Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res* **32**: e109.
- Miralles F, Posern G, Zaromytidou AI, Treisman R. (2003). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* **113**: 329-342.
- Pille JY, Denoyelle C, Varet J, Bertrand JR, Soria J, Opolon P, et al. (2005). Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro and in vivo. *Mol Ther* **11**: 267-274.
- Qiang YW, Endo Y, Rubin JS, Rudikoff S. (2003). Wnt signaling in B-cell neoplasia. *Oncogene* **22**: 1536-1545.
- Reunanen N, Li SP, Ahonen M, Foschi M, Han J, Kahari VM. (2002). Activation of p38 alpha MAPK enhances collagenase-1 (matrix metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) expression by mRNA stabilization. *J Biol Chem* **277**: 32360-32368.
- Ruth MC, Xu Y, Maxwell IH, Ahn NG, Norris DA, Shellman YG. (2006). RhoC promotes human melanoma invasion in a PI3K/Akt-dependent pathway. *J Invest Dermatol* **126**: 862-868.
- Sahai E, Marshall CJ. (2002). ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat Cell Biol* **4**: 408-415.
- Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, van der Kammen RA, Collard JG. (1999). Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* **147**: 1009-1022.
- Shikada Y, Yoshino I, Okamoto T, Fukuyama S, Kameyama T, Maehara Y. (2003). Higher expression of RhoC is related to invasiveness in non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* **9**: 5282-5286.
- Shim M, Eling TE. (2005). Protein kinase C-dependent regulation of NAG-1/placental bone morphogenic protein/MIC-1 expression in LNCaP prostate carcinoma cells. *J Biol Chem* **280**: 18636-18642.
- Shim M, Eling TE. (2008). Vitamin E succinate induces NAG-1 expression in a p38 kinase-dependent mechanism. *Mol Cancer Ther* **7**: 961-971.
- Simpson KJ, Dugan AS, Mercurio AM. (2004). Functional analysis of the contribution of RhoA and RhoC GTPases to invasive breast carcinoma. *Cancer Res* **64**: 8694-8701.
- Steffan JJ, Snider JL, Skalli O, Welbourne T, Cardelli JA. (2009). Na/H Exchangers and RhoA Regulate Acidic Extracellular pH-Induced Lysosome Trafficking in Prostate Cancer Cells. *Traffic*.
- Teramoto H, Malek RL, Behbahani B, Castellone MD, Lee NH, Gutkind JS. (2003). Identification of H-Ras, RhoA, Rac1 and Cdc42 responsive genes. *Oncogene* **22**: 2689-2697.
- Tillement V, Lajoie-Mazenc I, Casanova A, Froment C, Penary M, Tovar D, et al. (2008). Phosphorylation of RhoB by CK1 impedes actin stress fiber organization and epidermal growth factor receptor stabilization. *Exp Cell Res* **314**: 2811-2821.
- Wang W, Wu F, Fang F, Tao Y, Yang L. (2008). Inhibition of invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells via targeting RhoC in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* **14**: 6804-6812.
- Wang W, Yang LY, Huang GW, Lu WQ, Yang ZL, Yang JQ, et al. (2004). Genomic analysis reveals RhoC as a potential marker in hepatocellular carcinoma with poor prognosis. *Br J Cancer* **90**: 2349-2355.
- Wennerberg K, Forget MA, Ellerbroek SM, Arthur WT, Burrige K, Settleman J, et al. (2003). Rnd proteins function as RhoA antagonists by activating p190 RhoGAP. *Curr Biol* **13**: 1106-1115.
- Westermarck J, Li SP, Kallunki T, Han J, Kahari VM. (2001). p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression. *Mol Cell Biol* **21**: 2373-2383.
- Wilkins A, Ping Q, Carpenter CL. (2004). RhoBTB2 is a substrate of the mammalian Cul3 ubiquitin ligase complex. *Genes Dev* **18**: 856-861.
- Wu KY, Hengst U, Cox LJ, Macosko EZ, Jeromin A, Urquhart ER, et al. (2005). Local translation of RhoA regulates growth cone collapse. *Nature* **436**: 1020-1024.
- Wu M, Wu ZF, Kumar-Sinha C, Chinnaiyan A, Merajver SD. (2004). RhoC induces differential expression of genes involved in invasion and metastasis in MCF10A breast cells. *Breast Cancer Res Treat* **84**: 3-12.
- Yamaguchi K, Lee SH, Eling TE, Baek SJ. (2004). Identification of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) as a novel downstream target of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/GSK-3beta pathway. *J Biol Chem* **279**: 49617-49623.

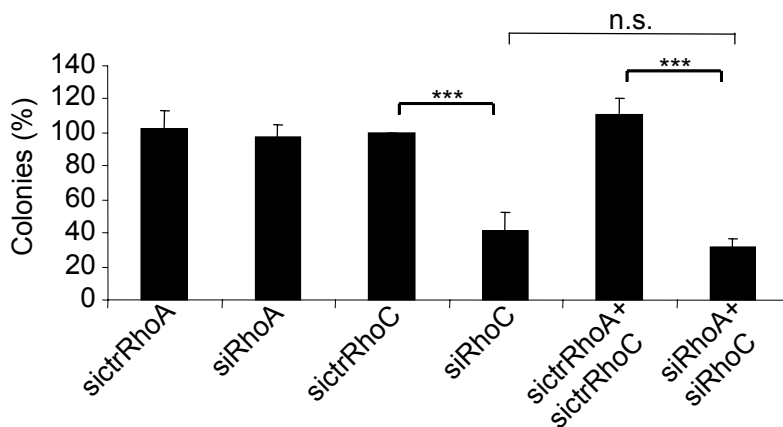
- Yao H, Dashner EJ, van Golen CM , van Golen KL. (2006). RhoC GTPase is required for PC-3 prostate cancer cell invasion but not motility. *Oncogene* **25**: 2285-2296.
- Zu K, Bihani T, Lin A, Park YM, Mori K , Ip C. (2006). Enhanced selenium effect on growth arrest by BiP/GRP78 knockdown in p53-null human prostate cancer cells. *Oncogene* **25**: 546-554.

Ho_Supplementary Figure S1



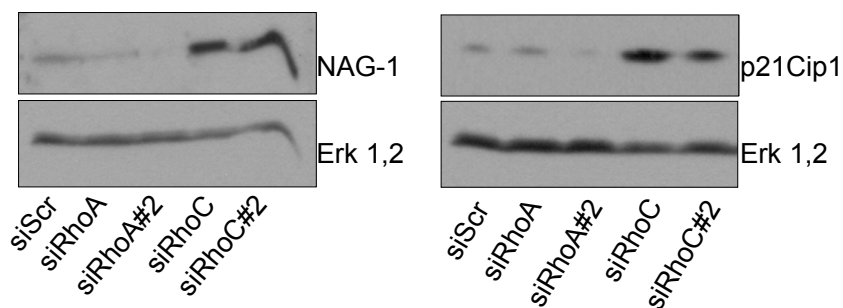
Neither RhoA-silencing nor RhoC-silencing affected the Rac1 expression and activation level. PC-3 cells were transfected with 20 nM of the indicated siRNA. 48h after transfection, cells were harvested and processed for Western blot and pull-down experiments. An aliquot of each lysate was denatured in SDS-PAGE loading buffer to analyse the concentration of total Rac1, RhoA, RhoC and Erk1,2 with specific antibodies. Rac1 activity was determined as the amount of GST-PBD-bound Rac1 (Rac1-GTP) normalized to total Rac1 in whole cell lysates. The fold induction (F.I.) is calculated from densitometric measurements of Rac1-GTP normalized to total Rac1 in each transfection conditions compared to the siScr condition taken as 1.0.

Ho_Supplementary Figure S2



The double silencing RhoA+RhoC was as efficient as the single silencing of RhoC in inhibiting the anchorage-independent growth properties of PC-3 cells. PC-3 cells were transfected by 20 nM of sictRhoA, siRhoA, sictRhoC, siRhoC, 20 nM sictRhoA + 20 nM sictRhoC (sictRhoA+C) or 20 nM siRhoA + 20 nM siRhoC (siRhoA+C) . 24 hours post-transfection, cells were plated in soft agar as described in material and methods. After three weeks of culture, colonies were counted in the whole dishes. Results are reported on the sictRhoC condition and are the mean \pm sem of triplicate experiments. Two independent experiments were performed with similar results. n.s.: not significant *** $p < 0.001$ ANOVA followed by Tukey-Kramer analysis.

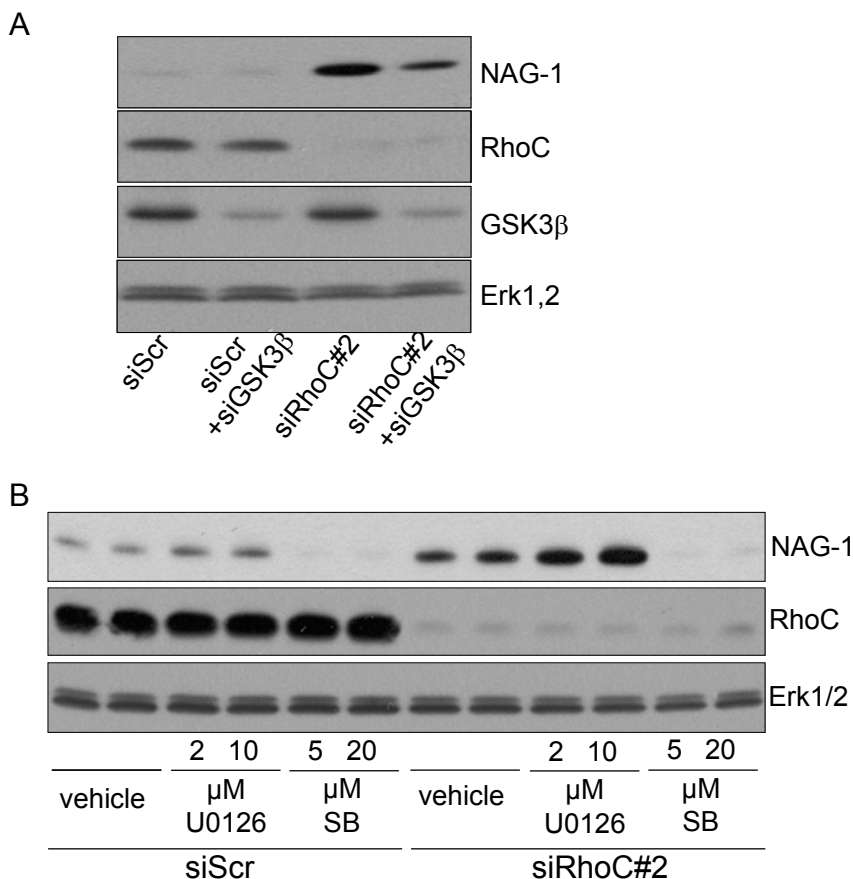
Ho_Supplementary Figure S3



The up-regulation of NAG-1 and p21Cip1 protein level following RhoC-silencing were confirmed with a second siRNA targeting RhoC (siRhoC#2).

PC-3 cells were transfected by 20nM of two different siRNAs targeting RhoA (siRhoA and siRhoA#2), by 20nM of two different siRNAs targeting RhoC (siRhoC and siRhoC#2) and by an irrelevant siRNA as control (siScr). 48 hours post transfection, cells were lysed and analyzed by immunoblotting using specific antibodies to NAG-1, p21Cip1 and Erk 1,2. Representative blots of three independent experiments are shown.

Ho_Supplementary Figure S4



Regulation of NAG-1 expression. (A) NAG-1 up-regulation following RhoC silencing with the 2nd siRNA targeting RhoC is also dependent on GSK-3 β . Representative Western blot analysis with specific antibodies to NAG-1, GSK3 β , RhoC and Erk1/2 of lysates of PC-3 harvested 48h after transfection with 20 nM of the mentioned siRNA. **(B)** p38 MAPK, but not Erk1/2, regulated the expression of NAG-1. Representative Western blot analysis with specific antibodies to NAG-1, RhoC and Erk1/2 of lysates of PC-3 harvested 48h after transfection with 20nM of the mentioned siRNA. To inhibit Erk1/2, cells were cultured with 2 or 10 μ M of the MEK inhibitor U0126. To inhibit p38MAPK, cells were treated with 5 or 20 μ M of SB203580.

Discussion générale

I. Intérêt des siRNA dans notre travail

L'étude du rôle spécifique des RhoGTPases dans la progression tumorale se justifie par la surexpression de certaines d'entre-elles dans de nombreux cancers, souvent corrélée au caractère invasif et à un pronostic défavorable. L'implication de cinq RhoGTPases dans des fonctions cellulaires pertinentes au développement cancéreux a été évaluée par l'utilisation des petits ARN interférentiels. Cette stratégie expérimentale permet en effet de supprimer spécifiquement l'expression d'une protéine sans inhiber l'expression d'autres protéines pourtant hautement homologues en terme de séquence en acides aminés ou de fonctionnalité. Cet outil s'est révélé bien supérieur aux approches classiques tels que les formes dominantes négatives, les toxines bactériennes, les inhibiteurs des modifications post-transcriptionnelles ou encore les inhibiteurs d'effecteurs qui, tous, manquent de spécificité. Il est, par ailleurs, important de noter que les petits ARN interférentiels éteignent simultanément la forme active Rho-GTP et la forme liée au GDP. Cette technologie représente donc une approche de choix pour mettre en lumière des fonctions de la forme dite inactive des RhoGTPases. Précédemment, d'autres groupes avaient identifié des fonctions pour Cdc42-GDP et Rac-GDP dans, respectivement, la signalisation de Ras et l'activation de la NADPH oxydase (Arozarena *et al.* 2001; Di-Poi *et al.* 2001).

II. Validation des outils utilisés

La mécanotransduction est un terme générique qui regroupe l'ensemble des processus qui permettent à la cellule d'intégrer et de convertir en signaux biochimiques des stimuli mécaniques d'origine externe ou interne à l'organisme. La mécanotransduction joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie des tissus mais également au cours du développement embryonnaire et dans une vaste gamme de fonctions cellulaires telles que la prolifération, l'apoptose, l'adhésion, la contractilité et la migration (Jaalouk *et al.* 2009; Wozniak *et al.* 2009). Des altérations de la réceptivité et la réactivité cellulaires aux stimuli mécaniques peuvent être impliquées dans des pathologies telles que la perte osseuse et musculaire en condition de microgravité (Nusgens *et al.* 2005), l'ostéoporose, l'athérosclérose, les dystrophies musculaires ou les cancers (Clark *et al.* 2007; Jaalouk *et al.* 2009). Dans cette dernière pathologie, la mécanotransduction participe à la progression de la maladie en régulant aussi bien le phénotype des cellules cancéreuses que les cellules du stroma péri-tumoral, y compris les fibroblastes.

La mécanotransduction met en jeu des structures du cytosquelette - fibres de stress, microtubules, filaments intermédiaires - qui forment un réseau intégré selon le concept de « tensegrity » élaboré par Ingber (Ingber 2003; Ingber 2003). Les RhoGTPases sont parmi les régulateurs principaux de l'organisation du cytosquelette, notamment les membres du sous-groupe Rho qui régulent la contractilité de l'actomyosine des fibres de stress par leur effecteur commun, ROCK. Au cours de la première partie de ce travail, nous avons validé notre stratégie expérimentale d'utilisation des siRNA en l'appliquant à

l'étude du rôle des RhoGTPases dans la modulation de la polymérisation des protéines du cytosquelette et la régulation des propriétés contractiles et migratoires des fibroblastes humains. Ce type cellulaire est particulièrement bien caractérisé dans notre laboratoire et était idéal pour la mesure des paramètres d'intérêt.

L'altération de la morphologie cellulaire suite à l'inhibition de l'expression de Rac1 et Cdc42 (Deroanne *et al.* 2005) suggérait une dérégulation de la dynamique du cytosquelette. Celle-ci a été confirmée qualitativement, par marquage fluorescent, puis quantitativement par l'utilisation d'une technique d'extraction détersive différentielle permettant de séparer d'une part l'actine et la vinculine cytosolique et d'autre part l'actine polymérique et la vinculine associée aux adhésions focales.

Les altérations de la fonction du cytosquelette peuvent être étudiées en analysant leur répercussion sur des fonctions cellulaires qui en dépendent. Nous avons choisi deux modèles parmi les plus pertinents, la rétraction d'un gel tridimensionnel de collagène et la migration cellulaire. Les fibroblastes ensemencés dans un réseau tridimensionnel de fibres de collagène y exercent des forces de traction qui peuvent être évaluées par simple mesure de la réduction du diamètre des gels au cours du temps (Delvoye *et al.* 1991; Lambert *et al.* 1992; Tomasek *et al.* 2002; Grinnell 2003). La migration cellulaire fait appel, quant à elle, à un remodelage intense du cytosquelette se caractérisant à l'avant de la cellule par l'extension de lamellipodes et de filopodes contrôlant la direction de migration et la formation de nouveaux sites d'adhésion tandis que la partie arrière se contracte avec dissolution des adhésions focales et détachement du support. Rac1 et Cdc42 sont respectivement

impliqués dans la formation des lamellipodes et des filopodes (Etienne-Manneville *et al.* 2002).

Ces modèles expérimentaux nous ont permis de confirmer les rôles de Rac1 et Cdc42 dans ces fonctions mécaniques en relation avec la modulation de la distribution d'actine et de la vinculine. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus à l'aide d'autres approches dans les fibroblastes (Ridley *et al.* 1992; Nobes *et al.* 1999). Les siRNA s'avèrent donc être des outils adéquats pour étudier la fonction des RhoGTPases.

III. Régulation de RhoB

De nombreuses publications démontrent que RhoA est responsable de la formation des fibres de stress d'actomyosine et des adhésions focales, et régule donc les fonctions cellulaires qui en découlent (Ridley *et al.* 1992). Or, comme nous l'avons montré, son extinction spécifique n'affecte en rien ni le cytosquelette d'actine, ni les adhésions focales, ni les propriétés contractiles et migratoires des fibroblastes humains. RhoA considéré comme la protéine archétypale du sous-groupe Rho a été largement étudiée alors que RhoC et RhoB, deux homologues proches de RhoA ont longtemps été négligés. Les effecteurs ROCK et mDia, par l'intermédiaire desquels RhoA régule le cytosquelette d'actine, peuvent également être activés par RhoB et RhoC. RhoB ayant un niveau basal faible et une demi-vie courte, nous nous sommes intéressés en premier lieu à RhoC qui, de plus, possède pour ROCK une affinité supérieure à celle de RhoA. La répression de RhoC, tout comme celle de RhoA, n'affecte pas les propriétés contractiles des fibroblastes humains et ne modifie pas la distribution d'actine

polymérique suggérant ainsi une absence d'implication de ces deux RhoGTPases. Ces résultats étaient apparemment en contradiction avec des travaux montrant que l'inhibition de ROCK module les forces de tractions des fibroblastes (Beningo *et al.* 2006). Il était par ailleurs connu que l'inhibition de l'expression de RhoA ou de RhoC induit un processus compensatoire par surexpression de RhoC ou de RhoA, respectivement (Simpson *et al.* 2004). L'existence d'un tel mécanisme dans nos fibroblastes aurait pu expliquer le manque d'effet de leur « knock-down » individuel sur les propriétés contractiles. Nos résultats expérimentaux ont toutefois démontré que l'extinction simultanée de RhoA et RhoC dans les fibroblastes n'affectait pas non plus de manière significative la vitesse de rétraction des gels de collagène ni la distribution des fibres de stress d'actomyosine. Ces données pouvaient éventuellement être expliquées par des travaux montrant que, dans les gels flottants de collagène où la tension mécanique est dissipée, il existe une boucle de rétrocontrôle négatif inhibant l'activité de Rho (Wozniak *et al.* 2003) suggérant que Rho n'est pas requis dans ce modèle. Néanmoins, un mécanisme compensatoire par le troisième membre du sous-groupe Rho, RhoB, devait être envisagé. Nous avons clairement montré que l'extinction individuelle ou simultanée de RhoA et RhoC induisait un accroissement très significatif de l'expression de RhoB dans tous les types cellulaires testés, soulignant ainsi la généralité du processus de compensation entre les trois protéines de ce sous-groupe. Cette régulation croisée explique la nécessité de leur extinction simultanée pour altérer certaines fonctions mécaniques des cellules. La modulation de ces fonctions cellulaires requiert probablement une inhibition marquée de l'activation de ROCK et/ou de mDia plus importante qui ne peut être obtenue qu'en réprimant

simultanément l'expression des trois membres du sous-groupe Rho. La réduction de l'activité de Rac1 observée lors de la répression simultanée de RhoA, RhoC et RhoB pourrait également participer à l'inhibition de la capacité des cellules à rétracter les gels de collagène. RhoB est décrit comme un suppresseur de tumeurs (Liu *et al.* 2001). L'étude des mécanismes opérant dans sa régulation pourrait contribuer au développement de nouvelles stratégies antitumorales. Nous avons choisi d'étudier la régulation de RhoB par RhoA et RhoC dans des lignées cellulaires cancéreuses. Nos choix se sont portés sur des cellules d'adénocarcinome mammaire (Hs578T) et prostatique (PC-3) dérivées de cancers à haut taux de mortalité. Ces deux lignées invasives expriment les RhoGTPases à un niveau élevé et répondent de manière très efficace aux siRNA. Plus particulièrement, les transfections simultanées de Hs578T par deux ou trois siRNA montrent une extinction de plus de 90% de l'expression de chacune des protéines ciblées. De plus, les Hs578T adhèrent rapidement au substrat et présentent une forme étalée permettant une analyse fine de la morphologie cellulaire. Cependant ces cellules forment des colonies de taille réduite dans l'agar mou et n'induisent pas de tumeurs en transplantation sous-cutanée chez la souris athymique (Hughes *et al.* 2008). Nous nous sommes alors tournés vers les cellules PC-3 qui offrent l'avantage de développer des tumeurs *in vivo* chez la souris (Kaighn *et al.* 1979).

L'induction de RhoB suite à l'inhibition de RhoA a été confirmée par plusieurs approches. Dans un premier temps, deux siRNA ciblant des séquences différentes de RhoA ont été utilisés avec le même résultat. Des siRNA contrôles spécifiques ont été ensuite mis au point. Ces contrôles, qui ne diffèrent de siRhoA ou siRhoC que par deux

mutations et n'altèrent pas l'expression des protéines cibles jusqu'à une concentration de 60nM représentent donc des contrôles idéaux. Un type complémentaire de contrôle a été établi par réexpression de la protéine RhoA de type sauvage dans les cellules Hs578T transfectées par siRhoA. Ceci a été rendu possible par la création d'un vecteur d'expression contenant une séquence codant pour RhoA dans laquelle avaient été introduites des mutations silencieuses (n'affectant pas la séquence de la protéine produite) disposées de façon à empêcher la reconnaissance de l'ARNm par le siRhoA. La réversion de l'expression de RhoB dans ces cellules n'était que partielle mais pouvait être expliquée par une efficacité de la transfection trop faible, par un niveau trop élevé du RhoA exogène ou encore par le caractère transitoire de son expression. Pour répondre à ces limitations techniques, nous avons dès lors validé la régulation négative de RhoB par RhoA à l'aide de clones PC-3 exprimant l'ARNm muté de RhoA de manière inducible en présence de tétracycline. Ces clones ont permis de démontrer qu'une réexpression de RhoA à un niveau physiologique permet la réversion totale de la surexpression de RhoB. L'intérêt de ce modèle réside également dans son utilisation potentielle dans des études *in vivo* en induisant l'expression de la protéine d'intérêt par l'ajout d'analogues stables de la tétracycline, telle que la doxycycline dans l'eau de boisson des animaux d'expérience. La tétracycline et ses dérivés, connus pour inhiber l'activité des métalloprotéases pourraient interférer avec l'interprétation de nos données. Cependant, aux doses utilisées (<25mM), ces antibiotiques n'affectent pas la fonction de ces enzymes (Steinmeyer *et al.* 1998).

Alors que la surexpression de la protéine RhoB est clairement induite lors de l'inhibition de RhoA ou RhoC seuls, nous n'avons pas observé

de modulation du niveau de son ARNm tandis que l'extinction simultanée de RhoA et RhoC induit une surexpression de l'ARNm de RhoB. Les toxines A et B de *C. difficile* inhibent de façon non spécifique les RhoGTPases et provoquent également une induction de l'ARNm et de la protéine RhoB alors qu'un variant de ces toxines inactivant uniquement Rac et Ras n'a pas d'effet. Par contre, l'exoenzyme C3 de *C. limosum* qui n'agit que sur le sous-groupe Rho, accroît fortement le niveau de RhoB (ARNm et protéine) (Gerhard *et al.* 2005; Huelsenbeck *et al.* 2007; Genth *et al.* 2008). Nos résultats concernant la régulation de l'ARNm et de la protéine RhoB par RhoA et RhoC sont donc en accord avec ces derniers travaux qui suggèrent que l'induction de RhoB dépend de l'inhibition du sous-groupe Rho.

Nous avons démontré que la surexpression de RhoB dans les cellules invalidées pour RhoA est due à un accroissement du temps de demi-vie de la protéine. Cette stabilisation aurait pu être la conséquence d'un défaut de prénylation (Stamatakis *et al.* 2002) mais cette hypothèse a été rejetée puisque nous avons démontré que RhoB se trouve majoritairement au niveau de la membrane. Nous avons également écarté l'implication des voies de signalisation classiques telles que ROCK, Erk 1,2, p38 MAPK et PI3K. De façon intéressante, nous avons mis en évidence le rôle de l'inhibiteur de dissociation RhoGDI α dans la stabilisation de RhoB suite à la répression de RhoA. Cette observation pourrait paraître assez surprenante étant donné que l'interaction de RhoB avec RhoGDI α n'est pas clairement établie (Olofsson 1999; Faure *et al.* 2001; Dovas *et al.* 2005; Michaelson *et al.* 2005), que les complexes RhoGTPases-RhoGDI sont cytosoliques et que les RhoGDIs y séquestrent les RhoGTPases sous forme inactive (Michaelson *et al.* 2001).

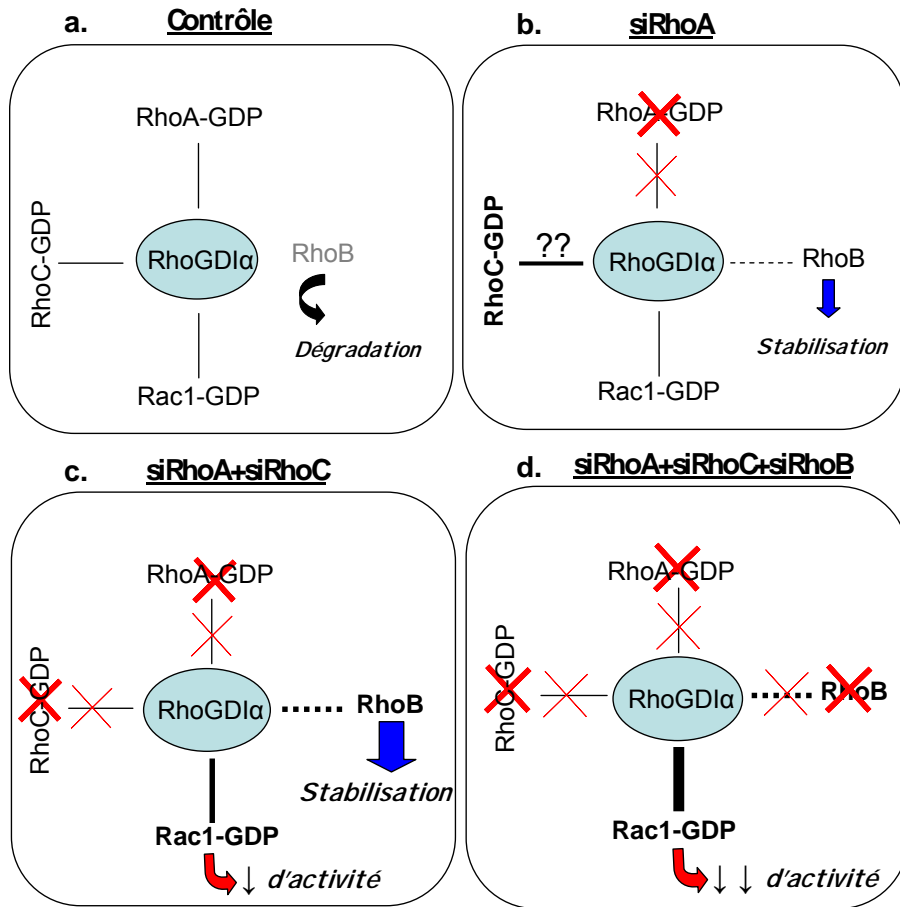


Figure 20 : Mécanisme de régulation croisée entre les RhoGTPases.
a) En condition contrôle, l'affinité de RhoB pour RhoGDI α est inférieure à celle de RhoA. Le groupement prénylé de RhoB reste libre et constitue un signal de protéolyse. RhoB est dégradé. **b)** L'inhibition de RhoA permet à RhoGDI α de se lier, de manière directe ou indirecte, à RhoC et à RhoB probablement par leur groupement prénylé stabilisant ainsi ces protéines. **c)** L'inhibition simultanée de RhoA et RhoC résulte en une stabilisation de RhoB et un accroissement de l'interaction entre Rac1 et RhoGDI α ce qui conduit à une diminution de Rac1-GTP. **d)** L'extinction des trois Rho induit une interaction plus prononcée entre Rac1 et RhoGDI α avec une réduction plus marquée de son activité.

Bien que les inhibiteurs de dissociation des RhoGTPases aient été considérés par certains comme de simples régulateurs négatifs, plusieurs données suggèrent que leur rôle serait plus complexe (Dovas *et al.* 2005; Dransart *et al.* 2005). En effet, bien que les RhoGDIs interagissent de manière préférentielle avec les formes Rho-GDP, une interaction avec les formes liant le GTP a été décrite pour Rac1, empêchant son interaction avec les GAPs, et pour RhoA, inhibant sa dégradation (Hancock *et al.* 1993; Rolli-Derkinderen *et al.* 2005). Il a ainsi été suggéré que RhoGDI agirait comme une protéine « chaperone » durant la translocation des RhoGTPases activées du compartiment cytosolique à la membrane plasmique. RhoGDI pourrait également stabiliser les RhoGTPases en masquant le groupement prénylé.

Nous n'avons toutefois pas pu démontrer une interaction directe entre RhoGDI α et RhoB endogène alors que nous avons pu montrer par des expériences de co-immunoprécipitations qu'elles se lient l'une à l'autre lorsqu'elles sont surexprimées. De nombreux autres éléments nous ont cependant permis de confirmer l'implication de RhoGDI α dans la régulation de RhoB suite à l'inhibition de RhoA.

Il est probable que l'affinité de RhoA pour RhoGDI α soit supérieure à celle de RhoB pour cette molécule. Dès lors, l'absence de RhoA permettrait à RhoB, mais également à RhoC, d'interagir avec RhoGDI α prolongeant ainsi leur demi-vie (Figure 20). Une telle fonction de RhoGDI α suggère que des régulations croisées pourraient s'opérer avec d'autres RhoGTPases mais également avec les RabGTPases qui s'associent également au RhoGDI α .

IV. Rôle de RhoC dans la tumorigenèse

Nous avons observé que l'extinction de RhoC, mais pas celle de RhoA, altère les propriétés migratoires des fibroblastes suggérant que, malgré leur homologie, RhoA et RhoC pourraient jouer des rôles distincts dans l'invasion tumorale. Par ailleurs, des données de la littérature récente montre que RhoA et RhoC exercent des fonctions différentes dans des étapes clés de la progression cancéreuse telles que la transition épithélio-mésenchymateuse (Bellovin *et al.* 2006) et l'invasivité de cellules cancéreuses (Simpson *et al.* 2004). Ces différences pourraient être expliquées par l'existence de GEFs différentes pour RhoA et RhoC (Arthur *et al.* 2002). Une autre possibilité serait l'activation de RhoGTPases différentes par une même RhoGEF complexée à des protéines « chaperones » à domaine PDZ distinctes capables de se lier aux GEFs, RhoGTPases et effecteurs pour en moduler la fonction (Marinissen *et al.* 2005; Garcia-Mata *et al.* 2007). RhoA et RhoC présentent en outre des affinités différentes pour certains effecteurs tels que ROCK. Ces observations nous ont poussés à évaluer le rôle de ces deux RhoGTPases dans les propriétés tumorales des cellules d'adénocarcinome prostatique, PC-3, qui expriment un niveau significatif de chacune d'entre-elles.

Nous avons observé que la capacité de croissance des PC-3 en agar mou, un modèle de tumorigenèse *in vitro*, est réduite par l'extinction de RhoC et non par celle de RhoA. Ces résultats rejoignent ceux de Simpson *et al.* (Simpson *et al.* 2004) montrant des fonctions différentes pour RhoA et RhoC dans l'invasivité de cellules de carcinome mammaire. L'extinction simultanée de deux ou trois des membres du sous-groupe Rho a permis de conclure que les processus de compensation observés précédemment entre RhoA, RhoB et RhoC

n'intervenaient pas dans la régulation de la croissance sans ancrage des PC-3. De manière intéressante, l'extinction simultanée des trois Rho induit une diminution plus marquée du nombre de colonies en agar mou, effet probablement en relation avec la réduction de l'activité de Rac1 que nous avons observée lors de l'inhibition de RhoA, RhoC et RhoB.

Les RhoGTPases sont impliquées dans diverses fonctions cellulaires pertinentes au développement cancéreux dont notamment la transcription génique. Il a, en effet, été montré que certaines RhoGTPases font partie de voies de signalisation intracellulaire régulant l'expression de gènes, cette fonction pouvant être dépendante ou non de leur effet sur le cytosquelette (Ellenbroek *et al.* 2007).

Une approche expérimentale permettant de caractériser le rôle spécifique de RhoA et RhoC dans le phénotype tumoral des PC-3 consistait donc à analyser leur fonction dans la régulation de l'expression génique. A ce jour, seules trois études ont analysé les altérations transcriptomiques induites, dans des fibroblastes murins et des cellules épithéliales mammaires humaines, par la surexpression des formes sauvages ou constitutivement activées des RhoGTPases (Teramoto *et al.* 2003; Wu *et al.* 2004; Berenjano *et al.* 2007).

La réalisation de ce type d'expérimentation nécessitait la prise en compte préalable de l'existence éventuelle d'artéfacts susceptibles de masquer les effets spécifiques recherchés ou de mener à des conclusions erronées. Divers contrôles ont été mis au point pour pallier ce problème. Une autre source d'artéfacts pourrait être l'activation de la voie des interférons qui a été mise en évidence suite à l'utilisation de petits ARN interférentiels (Sledz *et al.* 2003). Nous n'avons pas observé cette réponse dans une étude précédente (Deroanne *et al.* 2005)

et, dans cette analyse transcriptomique, aucune modification significative de l'expression des gènes appartenant à la voie des interférons n'a été mise en évidence dans les échantillons transfectés par les siRNA ciblant RhoA et RhoC.

L'induction de l'expression d'un groupe de gènes codant pour des protéines suppressives de tumeurs, impliquées dans l'apoptose ou appartenant à la voie de signalisation de stress du réticulum endoplasmique, a été observée uniquement suite à l'extinction de RhoC. Des relations entre ces différentes protéines ont été décrites dans diverses lignées tumorales dont les PC-3 (Graichen *et al.* 2002; Kim *et al.* 2005; Ohoka *et al.* 2005; Carracedo *et al.* 2006; Wek *et al.* 2006; Zu *et al.* 2006; Minami *et al.* 2007; Clark *et al.* 2008). Nous nous sommes également intéressés à SPARC, une protéine matricellaire favorisant l'invasion des cellules tumorales (Chen *et al.* 2007) en raison de sa régulation positive par RhoC et négative par RhoA. Ces résultats suggèrent que RhoC est impliqué dans les propriétés tumorigéniques des PC-3 en réprimant l'expression de protéines suppressives de tumeurs et en contrôlant positivement l'expression de protéines pro-invasives. Certaines de ces modulations, telle la surexpression de NAG-1 et p21Cip1, semblent toutefois être spécifiques des cellules d'adénocarcinome prostatique PC-3 et LNCaP (provenant de métastases des ganglions lymphatiques) car elles ne sont pas observées dans les DU-145 (provenant de métastases cérébrales) ni dans d'autres lignées telles que des fibroblastes ou des cellules d'adénocarcinome mammaire, de fibrosarcome et de mélanome. Ces données sont en accord avec une étude montrant l'expression préférentielle de NAG-1 dans les PC-3 et LNCaP (Liu *et al.* 2003).

L'induction de facteurs pro-apoptotiques par la répression de RhoC ne se traduit toutefois, ni dans des cellules adhérentes ni dans des cellules en suspension, par l'induction d'un processus apoptotique. Il est possible que le niveau d'expression de ces facteurs ne soit pas suffisant pour déclencher le processus d'apoptose et que dans nos conditions expérimentales, RhoC ne soit impliqué dans la croissance sans ancrage des PC-3 que par une modulation de leur prolifération.

Le gène NAG-1 (nommé également PLAB/MIC-1/GDF-15/PDF/PTGFB) appartient à la superfamille TGF β . Sa protéine, qui peut être sécrétée, est impliquée dans l'inflammation et l'apoptose, et possède des propriétés anti-tumorigéniques. L'expression de NAG-1 est induite par des agents anti-tumoraux tels que les anti-inflammatoires non stéroïdiens, le resvératrol ou la génistéine (Baek *et al.* 2001). Nous avons montré que NAG-1 régule l'expression des facteurs impliqués dans l'arrêt de la prolifération comme p21Cip1, GADD153, GADD34, p8, TRIB3, CTH et HERPUD1. La modulation de l'expression de p21Cip1 par NAG-1 a été décrite notamment dans des cellules cancéreuses ovariennes (Kim *et al.* 2005). Nous avons également montré que NAG-1 réprime l'expression de SPARC. La confirmation du rôle de SPARC a été apportée dans un modèle de tumorigenèse *in vitro* démontrant que sa réexpression est capable de restaurer la capacité des PC-3 à croître en agar mou suite à l'inhibition de RhoC. La nature matricellaire de SPARC s'accumulant à proximité des cellules permet probablement l'activation de récepteurs membranaires telles que les intégrines et, par cette voie, pourrait accroître leur prolifération en absence d'ancrage.

Nous avons mis en évidence le rôle des voies de signalisation p38MAPK et GSK3 β dans la régulation de NAG-1 par RhoC (Figure

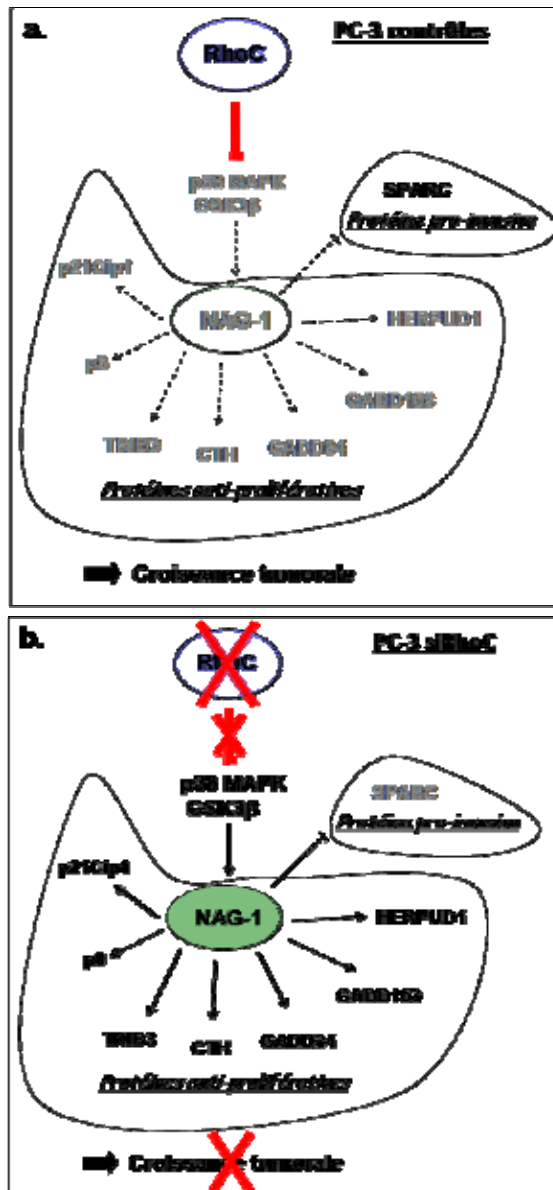


Figure 21 : a) RhoC joue un rôle dans la croissance tumorale des PC-3 en régulant négativement NAG-1 par les voies p38 MAPK et GSK3 β . NAG-1, suppresseur de tumeurs, contrôle l'expression de plusieurs protéines impliquées dans l'arrêt de la prolifération et module de façon négative l'expression de SPARC, molécule pro-invasive. b) L'extinction de RhoC permet la levée de l'inhibition de NAG-1 et la diminution de la croissance tumorale.

21). La voie p38 MAPK est impliquée dans la régulation de l'expression de NAG-1 par un dérivé de la vitamine E dans des PC-3 (Shim *et al.* 2008). La modulation de l'expression de NAG-1 dans les cellules cancéreuses colorectales dépend de la voie PI3K/Akt/GSK3 β (Yamaguchi *et al.* 2004). Comme nous n'avons observé de modification ni de la phosphorylation de GSK3 β ni de celle d'Akt, ceci suggère que le mécanisme de régulation de NAG-1 par RhoC dans les PC-3 pourrait dépendre d'une translocation nucléaire ou d'une autre régulation indépendante du niveau de phosphorylation de GSK3 β (Meares *et al.* 2007). Ces processus peuvent être également transitoires et notre plan d'expérience ne nous a peut être pas permis de les détecter.

Il était essentiel de confirmer les rôles respectifs de RhoC et de NAG-1 dans un modèle de tumorigenèse *in vivo* si possible par une approche susceptible d'être utilisée en thérapeutique. C'est dans ce contexte que l'atolocollagène a été choisi en raison de sa très faible immunogénicité, et de sa capacité à prolonger la demi-vie des siRNA en empêchant leur dégradation par les ribonucléases tout en permettant leur libération progressive. Le protocole utilisé est similaire à celui décrit par Takei *et al.* (Takei *et al.* 2004) concernant la concentration et la fréquence d'injection des siRNA. Nos résultats sont en accord avec ceux de Pillé *et al.* (Pillé *et al.* 2005) montrant l'implication de RhoC dans la tumorigenèse de cellules cancéreuses mammaires. Ces résultats préliminaires sont donc encourageants pour la mise en place de stratégies thérapeutiques anti-tumorales *in vivo*.

Par sa capacité à inhiber l'expression de n'importe quel gène humain, la technologie de l'ARN interférentiel présente un potentiel thérapeutique élevé. Toutefois, les obstacles majeurs à son utilisation

clinique sont la biodistribution localisée et leur effet transitoire. Les modifications chimiques des siRNA, leur encapsulation dans des cyclodextrines, leur complexation avec des liposomes ou encore leur association avec des polymères comme l'atelocollagène ou le chitosan sont utilisées *in vivo* dans le but de prolonger leur durée de vie et d'améliorer leur distribution notamment au niveau cérébral. Ces systèmes semblent plus sûrs que les vecteurs viraux permettant l'expression de siRNA à long terme. Ceux-ci peuvent en effet être immunogènes ou subir au cours du temps des mutations entraînant des effets secondaires imprévisibles. Des essais cliniques sont actuellement en cours pour le traitement par siRNA de certaines pathologies humaines comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge, l'infection par le virus respiratoire syncytial ou l'hépatite B (Castanotto *et al.* 2009; Whitehead *et al.* 2009).

Conclusions et perspectives

Ce travail, largement réalisé à l'aide d'outils extrêmement performants que constituent les petits ARN interférentiels, a contribué à préciser les mécanismes de régulation et la fonction de plusieurs RhoGTPases impliquées dans la croissance tumorale.

En premier lieu, nous avons validé nos outils technologiques en confirmant le rôle des petites GTPases Rac1 et Cdc42 dans la régulation du cytosquelette d'actine et des adhésions focales et le contrôle des propriétés contractiles et migratoires des fibroblastes humains.

L'étude du rôle individuel de RhoA et RhoC dans ces processus a révélé leurs fonctions spécifiques et mis en évidence un mécanisme de compensation entre ces deux protéines. L'analyse de l'organisation du cytosquelette d'actine nous a suggéré l'existence d'un deuxième processus de compensation impliquant RhoB, le troisième membre de ce sous-groupe.

L'étude de la régulation de RhoB par RhoA dans des cellules d'adénocarcinome mammaire a démontré le rôle de la forme de RhoA liée au GDP, réputée inactive, dans le contrôle de la stabilité de RhoB et cela par l'intermédiaire de l'inhibiteur de dissociation des RhoGTPases, RhoGDI α .

L'analyse *in vitro* et *in vivo* des fonctions respectives de RhoA et RhoC a également permis de conclure que RhoC, mais non RhoA, joue un rôle dans la tumorigenèse des cellules d'adénocarcinome prostatique,

par une régulation négative de protéines suppresseur de tumeurs et une régulation positive de protéines pro-invasives.

Ces résultats nous laissent entrevoir de nombreuses perspectives et pistes de recherches:

- Afin de déterminer les mécanismes par lesquels RhoGDI α stabilise RhoB, nous rechercherons les éventuelles protéines se liant au complexe RhoB-RhoGDI α .
- Les mécanismes de compensation observés parmi le sous-groupe Rho suggèrent que d'autres protéines appartenant à des sous-groupes apparentés différents pourraient présenter des régulations similaires. Nous analyserons donc la modulation de la stabilité et de l'activité d'autres RhoGTPases induites par l'inhibition de protéines homologues. Cette recherche pourra s'étendre à d'autres membres de la superfamille Ras qui interagissent avec les RhoGDIs, telles les RabGTPases.
- Lors des expériences *in vivo*, seule la croissance des tumeurs a été évaluée. Il serait dès lors intéressant d'effectuer des analyses histologiques en termes notamment de vascularisation et de prolifération.
- Nous mettrons au point des modèles de tumorigenèse *in vivo* basés sur l'utilisation de cellules exprimant de façon conditionnelle des protéines suppresseur de tumeurs ou au contraire pro-invasives.

- L'efficacité des siRNAs que nous avons utilisés devrait nous permettre de préciser le rôle de RhoC dans la formation de métastases.
- Dans le cadre du développement de nouvelles approches thérapeutiques, les associations siRNA-chitosan et siRNA-atelocollagène seront comparées dans nos modèles *in vivo* en terme de stabilité, de biodisponibilité et d'efficacité. Les bénéfices de l'association du siRhoC avec des molécules chimiothérapeutiques et/ou avec de la radiothérapie pourront en outre être évalués parallèlement.

Bibliographie

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D., Eds. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. New York & London, Garland Publishing, Inc.

Arozarena, I., Matallanas, D. and Crespo, P. (2001). "Maintenance of CDC42 GDP-bound state by Rho-GDI inhibits MAP kinase activation by the exchange factor Ras-GRF. evidence for Ras-GRF function being inhibited by Cdc42-GDP but unaffected by CDC42-GTP." *J Biol Chem* **276**(24): 21878-84.

Arthur, W. T., Ellerbreek, S. M., Der, C. J., Burrridge, K. and Wennerberg, K. (2002). "XPLN, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and RhoB, but not RhoC." *J Biol Chem* **277**(45): 42964-72.

Aspenstrom, P., Ruusala, A. and Pacholsky, D. (2007). "Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho GTPases." *Exp Cell Res* **313**(17): 3673-9.

Bader, M. F., Doussau, F., Chasserot-Golaz, S., Vitale, N. and Gasman, S. (2004). "Coupling actin and membrane dynamics during calcium-regulated exocytosis: a role for Rho and ARF GTPases." *Biochim Biophys Acta* **1742**(1-3): 37-49.

Baek, S. J., Kim, K. S., Nixon, J. B., Wilson, L. C. and Eling, T. E. (2001). "Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities." *Mol Pharmacol* **59**(4): 901-8.

Bao, W., Thullberg, M., Zhang, H., Onischenko, A. and Stromblad, S. (2002). "Cell attachment to the extracellular matrix induces proteasomal degradation of p21(CIP1) via Cdc42/Rac1 signaling." *Mol Cell Biol* **22**(13): 4587-97.

Basu, R. and Chang, F. (2007). "Shaping the actin cytoskeleton using microtubule tips." *Curr Opin Cell Biol* **19**(1): 88-94.

Bellovin, D. I., Simpson, K. J., Danilov, T., Maynard, E., Rimm, D. L., Oettgen, P. and Mercurio, A. M. (2006). "Reciprocal regulation of RhoA and RhoC characterizes the EMT and identifies RhoC as a prognostic marker of colon carcinoma." *Oncogene* **25**(52): 6959-67.

Beningo, K. A., Hamao, K., Dembo, M., Wang, Y. L. and Hosoya, H. (2006). "Traction forces of fibroblasts are regulated by the Rho-dependent kinase but not by the myosin light chain kinase." *Arch Biochem Biophys* **456**(2): 224-31.

Benitah, S. A., Valeron, P. F., van Aelst, L., Marshall, C. J. and Lacal, J. C. (2004). "Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation." *Biochim Biophys Acta* **1705**(2): 121-32.

Berenjeno, I. M., Nunez, F. and Bustelo, X. R. (2007). "Transcriptomal profiling of the cellular transformation induced by Rho subfamily GTPases." *Oncogene* **26**(29): 4295-305.

Bernards, A. and Settleman, J. (2004). "GAP control: regulating the regulators of small GTPases." *Trends Cell Biol* **14**(7): 377-85.

Best, A., Ahmed, S., Kozma, R. and Lim, L. (1996). "The Ras-related GTPase Rac1 binds tubulin." *J Biol Chem* **271**(7): 3756-62.

Boettner, B. and Van Aelst, L. (2002). "The role of Rho GTPases in disease development." *Gene* **286**(2): 155-74.

Boureau, A., Vignal, E., Faure, S. and Fort, P. (2007). "Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes." *Mol Biol Evol* **24**(1): 203-16.

Buchsbaum, R. J. (2007). "Rho activation at a glance." *J Cell Sci* **120**(Pt 7): 1149-52.

Bustelo, X. R., Sauzeau, V. and Berenjeno, I. M. (2007). "GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo." *Bioessays* **29**(4): 356-70.

Carracedo, A., Gironella, M., Lorente, M., Garcia, S., Guzman, M., Velasco, G. and Iovanna, J. L. (2006). "Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes." *Cancer Res* **66**(13): 6748-55.

Castanotto, D. and Rossi, J. J. (2009). "The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics." *Nature* **457**(7228): 426-33.

Chardin, P. (2006). "Function and regulation of Rnd proteins." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(1): 54-62.

Chen, F., Ma, L., Parrini, M. C., Mao, X., Lopez, M., Wu, C., Marks, P. W., Davidson, L., Kwiatkowski, D. J., Kirchhausen, T., Orkin, S. H., Rosen, F. S., Mayer, B. J., Kirschner, M. W. and Alt, F. W. (2000). "Cdc42 is required for PIP(2)-induced actin polymerization and early development but not for cell viability." *Curr Biol* **10**(13): 758-65.

Chen, N., Ye, X. C., Chu, K., Navone, N. M., Sage, E. H., Yu-Lee, L. Y., Logothetis, C. J. and Lin, S. H. (2007). "A secreted isoform of ErbB3 promotes osteonectin expression in bone and enhances the invasiveness of prostate cancer cells." *Cancer Res* **67**(14): 6544-8.

Chou, M. M., Masuda-Robens, J. M. and Gupta, M. L. (2003). "Cdc42 promotes G1 progression through p70 S6 kinase-mediated induction of cyclin E expression." *J Biol Chem* **278**(37): 35241-7.

Clark, D. W., Mitra, A., Fillmore, R. A., Jiang, W. G., Samant, R. S., Fodstad, O. and Shevde, L. A. (2008). "NUPR1 interacts with p53, transcriptionally regulates p21 and rescues breast epithelial cells from doxorubicin-induced genotoxic stress." *Curr Cancer Drug Targets* **8**(5): 421-30.

Clark, K., Langeslag, M., Figdor, C. G. and van Leeuwen, F. N. (2007). "Myosin II and mechanotransduction: a balancing act." *Trends Cell Biol* **17**(4): 178-86.

Coleman, M. L., Marshall, C. J. and Olson, M. F. (2004). "RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(5): 355-66.

Corbetta, S., Gualdoni, S., Albertinazzi, C., Paris, S., Croci, L., Consalez, G. G. and de Curtis, I. (2005). "Generation and characterization of Rac3 knockout mice." *Mol Cell Biol* **25**(13): 5763-76.

Daub, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Sobel, A. and Hall, A. (2001). "Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16." *J Biol Chem* **276**(3): 1677-80.

Dehay, C. and Kennedy, H. (2007). "Cell-cycle control and cortical development." *Nat Rev Neurosci* **8**(6): 438-50.

Del Pozo, M. A., Kiosses, W. B., Alderson, N. B., Meller, N., Hahn, K. M. and Schwartz, M. A. (2002). "Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI." *Nat Cell Biol* **4**(3): 232-9.

Delvoe, P., Wiliquet, P., Leveque, J. L., Nusgens, B. V. and Lapiere, C. M. (1991). "Measurement of mechanical forces generated by skin fibroblasts embedded in a three-dimensional collagen gel." *J Invest Dermatol* **97**(5): 898-902.

DerMardirossian, C. and Bokoch, G. M. (2005). "GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation." *Trends Cell Biol* **15**(7): 356-63.

Deroanne, C., Vouret-Craviari, V., Wang, B. and Pouyssegur, J. (2003). "EphrinA1 inactivates integrin-mediated vascular smooth muscle cell spreading via the Rac/PAK pathway." *J Cell Sci* **116**(Pt 7): 1367-76.

Deroanne, C. F., Hamelryckx, D., Ho, T. T., Lambert, C. A., Catroux, P., Lapiere, C. M. and Nusgens, B. V. (2005). "Cdc42 downregulates MMP-1 expression by inhibiting the ERK1/2 pathway." *J Cell Sci* **118**(Pt 6): 1173-83.

Di-Poi, N., Faure, J., Grizot, S., Molnar, G., Pick, E. and Dagher, M. C. (2001). "Mechanism of NADPH oxidase activation by the Rac/Rho-GDI complex." *Biochemistry* **40**(34): 10014-22.

Disanza, A., Steffen, A., Hertzog, M., Frittoli, E., Rottner, K. and Scita, G. (2005). "Actin polymerization machinery: the finish line of signaling

networks, the starting point of cellular movement." *Cell Mol Life Sci* **62**(9): 955-70.

Dovas, A. and Couchman, J. R. (2005). "RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities." *Biochem J* **390**(Pt 1): 1-9.

Dransart, E., Olofsson, B. and Cherfils, J. (2005). "RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation." *Traffic* **6**(11): 957-66.

Dykxhoorn, D. M. and Lieberman, J. (2006). "Running interference: prospects and obstacles to using small interfering RNAs as small molecule drugs." *Annu Rev Biomed Eng* **8**: 377-402.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." *Nature* **411**(6836): 494-8.

Ellenbroek, S. I. and Collard, J. G. (2007). "Rho GTPases: functions and association with cancer." *Clin Exp Metastasis* **24**(8): 657-72.

Etienne-Manneville, S. (2004). "Actin and microtubules in cell motility: which one is in control?" *Traffic* **5**(7): 470-7.

Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002). "Rho GTPases in cell biology." *Nature* **420**(6916): 629-35.

Faure, J. and Dagher, M. C. (2001). "Interactions between Rho GTPases and Rho GDP dissociation inhibitor (Rho-GDI)." *Biochimie* **83**(5): 409-14.

Fiegen, D., Haeusler, L. C., Blumenstein, L., Herbrand, U., Dvorsky, R., Vetter, I. R. and Ahmadian, M. R. (2004). "Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase." *J Biol Chem* **279**(6): 4743-9.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **391**(6669): 806-11.

Fritz, G. and Kaina, B. (2006). "Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs." *Curr Cancer Drug Targets* **6**(1): 1-14.

Fukata, M., Nakagawa, M. and Kaibuchi, K. (2003). "Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration." *Curr Opin Cell Biol* **15**(5): 590-7.

Fukuda, M. (2008). "Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases." *Cell Mol Life Sci* **65**(18): 2801-13.

Gampel, A., Parker, P. J. and Mellor, H. (1999). "Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB." *Curr Biol* **9**(17): 955-8.

Garcia-Mata, R. and Burridge, K. (2007). "Catching a GEF by its tail." *Trends Cell Biol* **17**(1): 36-43.

- Genth, H., Dreger, S. C., Huelsenbeck, J. and Just, I. (2008). "Clostridium difficile toxins: more than mere inhibitors of Rho proteins." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(4): 592-7.
- Gerhard, R., Tatge, H., Genth, H., Thum, T., Borlak, J., Fritz, G. and Just, I. (2005). "Clostridium difficile toxin A induces expression of the stress-induced early gene product RhoB." *J Biol Chem* **280**(2): 1499-505.
- Gilles, C., Polette, M., Piette, J., Delvigne, A. C., Thompson, E. W., Foidart, J. M. and Birembaut, P. (1996). "Vimentin expression in cervical carcinomas: association with invasive and migratory potential." *J Pathol* **180**(2): 175-80.
- Graichen, R., Liu, D., Sun, Y., Lee, K. O. and Lobie, P. E. (2002). "Autocrine human growth hormone inhibits placental transforming growth factor-beta gene transcription to prevent apoptosis and allow cell cycle progression of human mammary carcinoma cells." *J Biol Chem* **277**(29): 26662-72.
- Grinnell, F. (2003). "Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices." *Trends Cell Biol* **13**(5): 264-9.
- Hakem, A., Sanchez-Sweetman, O., You-Ten, A., Duncan, G., Wakeham, A., Khokha, R. and Mak, T. W. (2005). "RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis." *Genes Dev* **19**(17): 1974-9.
- Hancock, J. F. and Hall, A. (1993). "A novel role for RhoGDI as an inhibitor of GAP proteins." *EMBO J* **12**(5): 1915-21.
- Hasegawa, H., Kiyokawa, E., Tanaka, S., Nagashima, K., Gotoh, N., Shibuya, M., Kurata, T. and Matsuda, M. (1996). "DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane." *Mol Cell Biol* **16**(4): 1770-6.
- Ho, T. T., Merajver, S. D., Lapiere, C. M., Nusgens, B. V. and Deroanne, C. F. (2008). "RhoA-GDP Regulates RhoB Protein Stability: Potential involvement of RhoGDI{alpha}." *J Biol Chem* **283**(31): 21588-98.
- Hoffman, G. R., Nassar, N. and Cerione, R. A. (2000). "Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI." *Cell* **100**(3): 345-56.
- Huelsenbeck, J., Dreger, S. C., Gerhard, R., Fritz, G., Just, I. and Genth, H. (2007). "Upregulation of the immediate early gene product RhoB by exoenzyme C3 from Clostridium limosum and toxin B from Clostridium difficile." *Biochemistry* **46**(16): 4923-31.
- Hughes, L., Malone, C., Chumsri, S., Burger, A. M. and McDonnell, S. (2008). "Characterisation of breast cancer cell lines and establishment of a novel isogenic subclone to study migration, invasion and tumourigenicity." *Clin Exp Metastasis* **25**(5): 549-57.

- Hwang, S. L., Hong, Y. R., Sy, W. D., Lieu, A. S., Lin, C. L., Lee, K. S. and Howng, S. L. (2004). "Rac1 gene mutations in human brain tumours." *Eur J Surg Oncol* **30**(1): 68-72.
- Ingber, D. E. (2003). "Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology." *J Cell Sci* **116**(Pt 7): 1157-73.
- Ingber, D. E. (2003). "Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks." *J Cell Sci* **116**(Pt 8): 1397-408.
- Jaalouk, D. E. and Lammerding, J. (2009). "Mechanotransduction gone awry." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(1): 63-73.
- Jaffe, A. B. and Hall, A. (2005). "Rho GTPases: biochemistry and biology." *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 247-69.
- Jiang, W. G., Davies, G., Martin, T. A., Kynaston, H., Mason, M. D. and Fodstad, O. (2006). "Com-1/p8 acts as a putative tumour suppressor in prostate cancer." *Int J Mol Med* **18**(5): 981-6.
- Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F. and Jones, L. W. (1979). "Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)." *Invest Urol* **17**(1): 16-23.
- Kaverina, I., Krylyshkina, O. and Small, J. V. (2002). "Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility." *Int J Biochem Cell Biol* **34**(7): 746-61.
- Kim, J. S., Baek, S. J., Sali, T. and Eling, T. E. (2005). "The conventional nonsteroidal anti-inflammatory drug sulindac sulfide arrests ovarian cancer cell growth via the expression of NAG-1/MIC-1/GDF-15." *Mol Cancer Ther* **4**(3): 487-93.
- Klemke, R. L., Leng, J., Molander, R., Brooks, P. C., Vuori, K. and Cheresch, D. A. (1998). "CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration." *J Cell Biol* **140**(4): 961-72.
- Konstantinopoulos, P. A., Karamouzis, M. V. and Papavassiliou, A. G. (2007). "Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets." *Nat Rev Drug Discov* **6**(7): 541-55.
- Krendel, M., Zenke, F. T. and Bokoch, G. M. (2002). "Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton." *Nat Cell Biol* **4**(4): 294-301.
- Ladwein, M. and Rottner, K. (2008). "On the Rho'd: the regulation of membrane protrusions by Rho-GTPases." *FEBS Lett* **582**(14): 2066-74.
- Lambert, C. A., Soudant, E. P., Nusgens, B. V. and Lapiere, C. M. (1992). "Pretranslational regulation of extracellular matrix macromolecules and collagenase expression in fibroblasts by mechanical forces." *Lab Invest* **66**(4): 444-51.

- Lerm, M., Schmidt, G. and Aktories, K. (2000). "Bacterial protein toxins targeting rho GTPases." *FEMS Microbiol Lett* **188**(1): 1-6.
- Li, S., Wang, Q., Chakladar, A., Bronson, R. T. and Bernards, A. (2000). "Gastric hyperplasia in mice lacking the putative Cdc42 effector IQGAP1." *Mol Cell Biol* **20**(2): 697-701.
- Liu, A. X., Rane, N., Liu, J. P. and Prendergast, G. C. (2001). "RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells." *Mol Cell Biol* **21**(20): 6906-12.
- Liu, T., Bauskin, A. R., Zaunders, J., Brown, D. A., Pankhurst, S., Russell, P. J. and Breit, S. N. (2003). "Macrophage inhibitory cytokine 1 reduces cell adhesion and induces apoptosis in prostate cancer cells." *Cancer Res* **63**(16): 5034-40.
- Luna, A., Matas, O. B., Martinez-Menarguez, J. A., Mato, E., Duran, J. M., Ballesta, J., Way, M. and Egea, G. (2002). "Regulation of protein transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum by CDC42 and N-WASP." *Mol Biol Cell* **13**(3): 866-79.
- Luo, L., Liao, Y. J., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1994). "Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: Drosophila Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion." *Genes Dev* **8**(15): 1787-802.
- Madaule, P. and Axel, R. (1985). "A novel ras-related gene family." *Cell* **41**(1): 31-40.
- Marinissen, M. J. and Gutkind, J. S. (2005). "Scaffold proteins dictate Rho GTPase-signaling specificity." *Trends Biochem Sci* **30**(8): 423-6.
- Matas, O. B., Fritz, S., Luna, A. and Egea, G. (2005). "Membrane trafficking at the ER/Golgi interface: functional implications of RhoA and Rac1." *Eur J Cell Biol* **84**(8): 699-707.
- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. P. and Zamore, P. D. (2005). "Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes." *Cell* **123**(4): 607-20.
- Meares, G. P. and Jope, R. S. (2007). "Resolution of the nuclear localization mechanism of glycogen synthase kinase-3: functional effects in apoptosis." *J Biol Chem* **282**(23): 16989-7001.
- Memon, A. R. (2004). "The role of ADP-ribosylation factor and SAR1 in vesicular trafficking in plants." *Biochim Biophys Acta* **1664**(1): 9-30.
- Merajver, S. D. and Usmani, S. Z. (2005). "Multifaceted role of Rho proteins in angiogenesis." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **10**(4): 291-8.
- Mettouchi, A., Klein, S., Guo, W., Lopez-Lago, M., Lemichez, E., Westwick, J. K. and Giancotti, F. G. (2001). "Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle." *Mol Cell* **8**(1): 115-27.

- Michaelson, D., Ali, W., Chiu, V. K., Bergo, M., Silletti, J., Wright, L., Young, S. G. and Philips, M. (2005). "Postprenylation CAAX processing is required for proper localization of Ras but not Rho GTPases." *Mol Biol Cell* **16**(4): 1606-16.
- Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M. and Philips, M. R. (2001). "Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding." *J Cell Biol* **152**(1): 111-26.
- Minami, K., Inoue, H., Terashita, T., Kawakami, T., Watanabe, R., Haneda, M., Isobe, K., Okabe, H. and Chano, T. (2007). "GADD34 induces p21 expression and cellular senescence." *Oncol Rep* **17**(6): 1481-5.
- Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A. I. and Treisman, R. (2003). "Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL." *Cell* **113**(3): 329-42.
- Narumiya, S. and Yasuda, S. (2006). "Rho GTPases in animal cell mitosis." *Curr Opin Cell Biol* **18**(2): 199-205.
- Niknejad, N., Morley, M. and Dimitroulakos, J. (2007). "Activation of the integrated stress response regulates lovastatin-induced apoptosis." *J Biol Chem* **282**(41): 29748-56.
- Nobes, C. D. and Hall, A. (1999). "Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement." *J Cell Biol* **144**(6): 1235-44.
- Noritake, J., Watanabe, T., Sato, K., Wang, S. and Kaibuchi, K. (2005). "IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration." *J Cell Sci* **118**(Pt 10): 2085-92.
- Nusgens, B. V., Chometon, G., Guignandon, A., Ho, T. T. G., Lambert, C. A., Mineur, P., Servotte, S., Zhang, Z., Deroanne, C., Eckes, B., Vico, L., Krieg, T., Aumailley, M. and Lapiere, C. M. (2005). "Role of the RhoGTPases in the cellular receptivity and reactivity to mechanical signals including microgravity." *Journal of Gravitational Physiology* **12**: 269-270.
- Oceguera-Yanez, F., Kimura, K., Yasuda, S., Higashida, C., Kitamura, T., Hiraoka, Y., Haraguchi, T. and Narumiya, S. (2005). "Ect2 and MgcRacGAP regulate the activation and function of Cdc42 in mitosis." *J Cell Biol* **168**(2): 221-32.
- Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K. and Hayashi, H. (2005). "TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death." *EMBO J* **24**(6): 1243-55.
- Olofsson, B. (1999). "Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling." *Cell Signal* **11**(8): 545-54.

Olson, M. F., Ashworth, A. and Hall, A. (1995). "An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1." *Science* **269**(5228): 1270-2.

Paduch, M., Jelen, F. and Otlewski, J. (2001). "Structure of small G proteins and their regulators." *Acta Biochim Pol* **48**(4): 829-50.

Papineni, S., Chintharlapalli, S. and Safe, S. (2008). "Methyl 2-cyano-3,11-dioxo-18 beta-olean-1,12-dien-30-oate is a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist that induces receptor-independent apoptosis in LNCaP prostate cancer cells." *Mol Pharmacol* **73**(2): 553-65.

Patel, S., Takagi, K. I., Suzuki, J., Imaizumi, A., Kimura, T., Mason, R. M., Kamimura, T. and Zhang, Z. (2005). "RhoGTPase activation is a key step in renal epithelial mesenchymal transdifferentiation." *J Am Soc Nephrol* **16**(7): 1977-84.

Peck, J., Douglas, G. t., Wu, C. H. and Burbelo, P. D. (2002). "Human RhoGAP domain-containing proteins: structure, function and evolutionary relationships." *FEBS Lett* **528**(1-3): 27-34.

Pellegrin, S. and Mellor, H. (2007). "Actin stress fibres." *J Cell Sci* **120**(Pt 20): 3491-9.

Pille, J. Y., Denoyelle, C., Varet, J., Bertrand, J. R., Soria, J., Opolon, P., Lu, H., Pritchard, L. L., Vannier, J. P., Malvy, C., Soria, C. and Li, H. (2005). "Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro and in vivo." *Mol Ther* **11**(2): 267-74.

Raftopoulou, M. and Hall, A. (2004). "Cell migration: Rho GTPases lead the way." *Dev Biol* **265**(1): 23-32.

Repasky, G. A., Chenette, E. J. and Der, C. J. (2004). "Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis?" *Trends Cell Biol* **14**(11): 639-47.

Ridley, A. J. (2004). "Rho proteins and cancer." *Breast Cancer Res Treat* **84**(1): 13-9.

Ridley, A. J. (2006). "Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking." *Trends Cell Biol* **16**(10): 522-9.

Ridley, A. J. and Hall, A. (1992). "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors." *Cell* **70**(3): 389-99.

Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. and Hall, A. (1992). "The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling." *Cell* **70**(3): 401-10.

Riento, K. and Ridley, A. J. (2003). "Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(6): 446-56.

- Roberts, A. W., Kim, C., Zhen, L., Lowe, J. B., Kapur, R., Petryniak, B., Spaetti, A., Pollock, J. D., Borneo, J. B., Bradford, G. B., Atkinson, S. J., Dinauer, M. C. and Williams, D. A. (1999). "Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense." *Immunity* **10**(2): 183-96.
- Rolli-Derkinderen, M., Sauzeau, V., Boyer, L., Lemichez, E., Baron, C., Henrion, D., Loirand, G. and Pacaud, P. (2005). "Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells." *Circ Res* **96**(11): 1152-60.
- Sahai, E. and Marshall, C. J. (2002). "RHO-GTPases and cancer." *Nat Rev Cancer* **2**(2): 133-42.
- Sahai, E. and Marshall, C. J. (2002). "ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho." *Nat Cell Biol* **4**(6): 408-15.
- Schmidt, A. and Hall, A. (2002). "Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch." *Genes Dev* **16**(13): 1587-609.
- Schnelzer, A., Prechtel, D., Knaus, U., Dehne, K., Gerhard, M., Graeff, H., Harbeck, N., Schmitt, M. and Lengyel, E. (2000). "Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b." *Oncogene* **19**(26): 3013-20.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P. D. (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." *Cell* **115**(2): 199-208.
- Sequeira, L., Dubyk, C. W., Riesenberger, T. A., Cooper, C. R. and van Golen, K. L. (2008). "Rho GTPases in PC-3 prostate cancer cell morphology, invasion and tumor cell diapedesis." *Clin Exp Metastasis* **25**(5): 569-79.
- Servotte, S., Zhang, Z., Lambert, C. A., Ho, T. T., Chometon, G., Eckes, B., Krieg, T., Lapiere, C. M., Nusgens, B. V. and Aumailley, M. (2006). "Establishment of stable human fibroblast cell lines constitutively expressing active Rho-GTPases." *Protoplasma* **229**(2-4): 215-20.
- Shemesh, T., Geiger, B., Bershadsky, A. D. and Kozlov, M. M. (2005). "Focal adhesions as mechanosensors: a physical mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(35): 12383-8.
- Shim, M. and Eling, T. E. (2008). "Vitamin E succinate induces NAG-1 expression in a p38 kinase-dependent mechanism." *Mol Cancer Ther* **7**(4): 961-71.
- Siderovski, D. P. and Willard, F. S. (2005). "The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits." *Int J Biol Sci* **1**(2): 51-66.
- Siegrist, S. E. and Doe, C. Q. (2007). "Microtubule-induced cortical cell polarity." *Genes Dev* **21**(5): 483-96.

- Simpson, K. J., Dugan, A. S. and Mercurio, A. M. (2004). "Functional analysis of the contribution of RhoA and RhoC GTPases to invasive breast carcinoma." *Cancer Res* **64**(23): 8694-701.
- Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H. and Williams, B. R. (2003). "Activation of the interferon system by short-interfering RNAs." *Nat Cell Biol* **5**(9): 834-9.
- Snapper, S. B., Rosen, F. S., Mizoguchi, E., Cohen, P., Khan, W., Liu, C. H., Hagemann, T. L., Kwan, S. P., Ferrini, R., Davidson, L., Bhan, A. K. and Alt, F. W. (1998). "Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient mice reveal a role for WASP in T but not B cell activation." *Immunity* **9**(1): 81-91.
- Sordella, R., Jiang, W., Chen, G. C., Curto, M. and Settleman, J. (2003). "Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis." *Cell* **113**(2): 147-58.
- Srinivasan, S., Wang, F., Glavas, S., Ott, A., Hofmann, F., Aktories, K., Kalman, D. and Bourne, H. R. (2003). "Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis." *J Cell Biol* **160**(3): 375-85.
- Stamatakis, K., Cernuda-Morollon, E., Hernandez-Perera, O. and Perez-Sala, D. (2002). "Isoprenylation of RhoB is necessary for its degradation. A novel determinant in the complex regulation of RhoB expression by the mevalonate pathway." *J Biol Chem* **277**(51): 49389-96.
- Steinmeyer, J., Daufeldt, S. and Taiwo, Y. O. (1998). "Pharmacological effect of tetracyclines on proteoglycanases from interleukin-1-treated articular cartilage." *Biochem Pharmacol* **55**(1): 93-100.
- Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A. and Katsuki, M. (1998). "Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation." *Oncogene* **17**(26): 3427-33.
- Symons, M. and Rusk, N. (2003). "Control of vesicular trafficking by Rho GTPases." *Curr Biol* **13**(10): R409-18.
- Takei, Y., Kadomatsu, K., Yuzawa, Y., Matsuo, S. and Muramatsu, T. (2004). "A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics." *Cancer Res* **64**(10): 3365-70.
- Tao, W., Pennica, D., Xu, L., Kalejta, R. F. and Levine, A. J. (2001). "Wrch-1, a novel member of the Rho gene family that is regulated by Wnt-1." *Genes Dev* **15**(14): 1796-807.
- ten Klooster, J. P. and Hordijk, P. L. (2007). "Targeting and localized signalling by small GTPases." *Biol Cell* **99**(1): 1-12.

Teramoto, H., Malek, R. L., Behbahani, B., Castellone, M. D., Lee, N. H. and Gutkind, J. S. (2003). "Identification of H-Ras, RhoA, Rac1 and Cdc42 responsive genes." *Oncogene* **22**(17): 2689-97.

Thyberg, J. and Moskalewski, S. (1999). "Role of microtubules in the organization of the Golgi complex." *Exp Cell Res* **246**(2): 263-79.

Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. and Brown, R. A. (2002). "Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(5): 349-63.

Tu, S. and Cerione, R. A. (2001). "Cdc42 is a substrate for caspases and influences Fas-induced apoptosis." *J Biol Chem* **276**(22): 19656-63.

Valderrama, F., Duran, J. M., Babia, T., Barth, H., Renau-Piqueras, J. and Egea, G. (2001). "Actin microfilaments facilitate the retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum in mammalian cells." *Traffic* **2**(10): 717-26.

Vega, F. M. and Ridley, A. J. (2008). "Rho GTPases in cancer cell biology." *FEBS Lett* **582**(14): 2093-101.

Vidal, A., Millard, S. S., Miller, J. P. and Koff, A. (2002). "Rho activity can alter the translation of p27 mRNA and is important for RasV12-induced transformation in a manner dependent on p27 status." *J Biol Chem* **277**(19): 16433-40.

Vigorito, E., Bell, S., Hebeis, B. J., Reynolds, H., McAdam, S., Emson, P. C., McKenzie, A. and Turner, M. (2004). "Immunological function in mice lacking the Rac-related GTPase RhoG." *Mol Cell Biol* **24**(2): 719-29.

Vincent, S., Jeanteur, P. and Fort, P. (1992). "Growth-regulated expression of rhoG, a new member of the ras homolog gene family." *Mol Cell Biol* **12**(7): 3138-48.

Walker, K. and Olson, M. F. (2005). "Targeting Ras and Rho GTPases as opportunities for cancer therapeutics." *Curr Opin Genet Dev* **15**(1): 62-8.

Wang, H. R., Zhang, Y., Ozdamar, B., Ogunjimi, A. A., Alexandrova, E., Thomsen, G. H. and Wrana, J. L. (2003). "Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation." *Science* **302**(5651): 1775-9.

Watanabe, T., Noritake, J. and Kaibuchi, K. (2005). "Regulation of microtubules in cell migration." *Trends Cell Biol* **15**(2): 76-83.

Weinberg, R. A. (2007). *The biology of cancer*. New York, Garland Science, Taylor and Francis Group.

Weis, K. (2003). "Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle." *Cell* **112**(4): 441-51.

Wek, R. C., Jiang, H. Y. and Anthony, T. G. (2006). "Coping with stress: eIF2 kinases and translational control." *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 1): 7-11.

Welsh, C. F. (2004). "Rho GTPases as key transducers of proliferative signals in g1 cell cycle regulation." *Breast Cancer Res Treat* **84**(1): 33-42.

Welsh, C. F., Roovers, K., Villanueva, J., Liu, Y., Schwartz, M. A. and Assoian, R. K. (2001). "Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho." *Nat Cell Biol* **3**(11): 950-7.

Wennerberg, K., Rossman, K. L. and Der, C. J. (2005). "The Ras superfamily at a glance." *J Cell Sci* **118**(Pt 5): 843-6.

Werner, M. and Glotzer, M. (2008). "Control of cortical contractility during cytokinesis." *Biochem Soc Trans* **36**(Pt 3): 371-7.

Westmark, C. J., Bartleson, V. B. and Malter, J. S. (2005). "RhoB mRNA is stabilized by HuR after UV light." *Oncogene* **24**(3): 502-11.

Wheeler, A. P. and Ridley, A. J. (2004). "Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility." *Exp Cell Res* **301**(1): 43-9.

Whitehead, I. P., Campbell, S., Rossman, K. L. and Der, C. J. (1997). "Dbl family proteins." *Biochim Biophys Acta* **1332**(1): F1-23.

Whitehead, K. A., Langer, R. and Anderson, D. G. (2009). "Knocking down barriers: advances in siRNA delivery." *Nat Rev Drug Discov* **8**(2): 129-38.

Winter-Vann, A. M. and Casey, P. J. (2005). "Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis." *Nat Rev Cancer* **5**(5): 405-12.

Wozniak, M. A. and Chen, C. S. (2009). "Mechanotransduction in development: a growing role for contractility." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(1): 34-43.

Wozniak, M. A., Desai, R., Solski, P. A., Der, C. J. and Keely, P. J. (2003). "ROCK-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the physical properties of a three-dimensional collagen matrix." *J Cell Biol* **163**(3): 583-95.

Wu, M., Wu, Z. F., Kumar-Sinha, C., Chinnaiyan, A. and Merajver, S. D. (2004). "RhoC induces differential expression of genes involved in invasion and metastasis in MCF10A breast cells." *Breast Cancer Res Treat* **84**(1): 3-12.

Yamaguchi, K., Lee, S. H., Eling, T. E. and Baek, S. J. (2004). "Identification of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) as a novel downstream target of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/GSK-3beta pathway." *J Biol Chem* **279**(48): 49617-23.

Yang, L., Wang, L. and Zheng, Y. (2006). "Gene targeting of Cdc42 and Cdc42GAP affirms the critical involvement of Cdc42 in filopodia induction,

directed migration, and proliferation in primary mouse embryonic fibroblasts." Mol Biol Cell 17(11): 4675-85.

Zalcman, G., Closson, V., Linares-Cruz, G., Lerebours, F., Honore, N., Tavitian, A. and Olofsson, B. (1995). "Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle." Oncogene 10(10): 1935-45.

Zheng, Y. (2001). "Dbl family guanine nucleotide exchange factors." Trends Biochem Sci 26(12): 724-32.

Zu, K., Bihani, T., Lin, A., Park, Y. M., Mori, K. and Ip, C. (2006). "Enhanced selenium effect on growth arrest by BiP/GRP78 knockdown in p53-null human prostate cancer cells." Oncogene 25(4): 546-54.

Liste des publications personnelles

Deroanne, C. F., Hamelryckx, D., Ho, T. T., Lambert, C. A., Catroux, P., Lapiere, C. M. and Nusgens, B. V. (2005). "Cdc42 downregulates MMP-1 expression by inhibiting the ERK1/2 pathway." *J Cell Sci* **118**(Pt 6): 1173-83.

Nusgens, B. V., Chometon, G., Guignandon, A., Ho, T. T. G., Lambert, C. A., Mineur, P., Servotte, S., Zhang, Z., Deroanne, C., Eckes, B., Vico, L., Krieg, T., Aumailley, M. and Lapiere, C. M. (2005). "Role of the RhoGTPases in the cellular receptivity and reactivity to mechanical signals including microgravity." *Journal of Gravitational Physiology* **12**: 269-270.

Servotte, S., Zhang, Z., Lambert, C. A., Ho, T. T., Chometon, G., Eckes, B., Krieg, T., Lapiere, C. M., Nusgens, B. V. and Aumailley, M. (2006). "Establishment of stable human fibroblast cell lines constitutively expressing active Rho-GTPases." *Protoplasma* **229**(2-4): 215-20.

Ho, T. T., Merajver, S. D., Lapiere, C. M., Nusgens, B. V. and Deroanne, C. F. (2008). "RhoA-GDP Regulates RhoB Protein Stability: Potential involvement of RhoGDI{alpha}." *J Biol Chem* **283**(31): 21588-98.

