

## 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

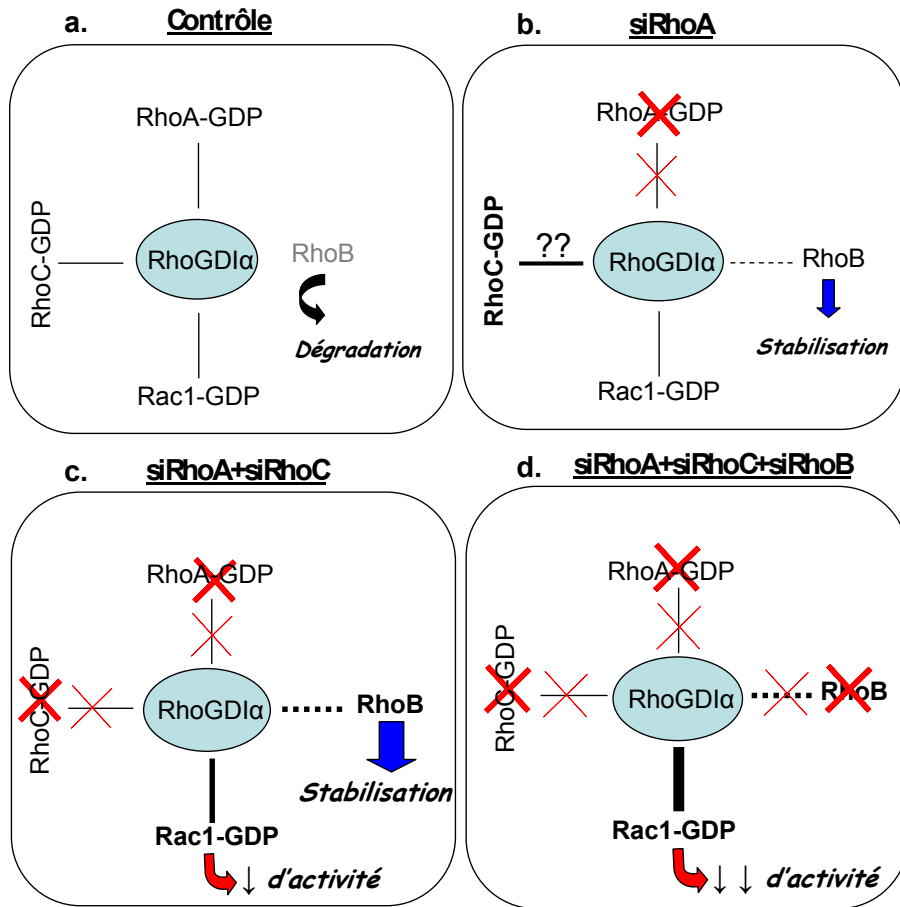
mutations et n'altèrent pas l'expression des protéines cibles jusqu'à une concentration de 60nM représentent donc des contrôles idéaux. Un type complémentaire de contrôle a été établi par réexpression de la protéine RhoA de type sauvage dans les cellules Hs578T transfectées par siRhoA. Ceci a été rendu 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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  ce qui conduit à une diminution de Rac1-GTP. **d)** L'extinction des trois Rho induit une interaction plus prononcée entre Rac1 et RhoGDI $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  dans la régulation de RhoB suite à l'inhibition de RhoA.

Il est probable que l'affinité de RhoA pour RhoGDI $\alpha$  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 $\alpha$  prolongeant ainsi leur demi-vie (Figure 20). Une telle fonction de RhoGDI $\alpha$  suggère que des régulations croisées pourraient s'opérer avec d'autres RhoGTPases mais également avec les RabGTPases qui s'associent également au RhoGDI $\alpha$ .

#### **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)

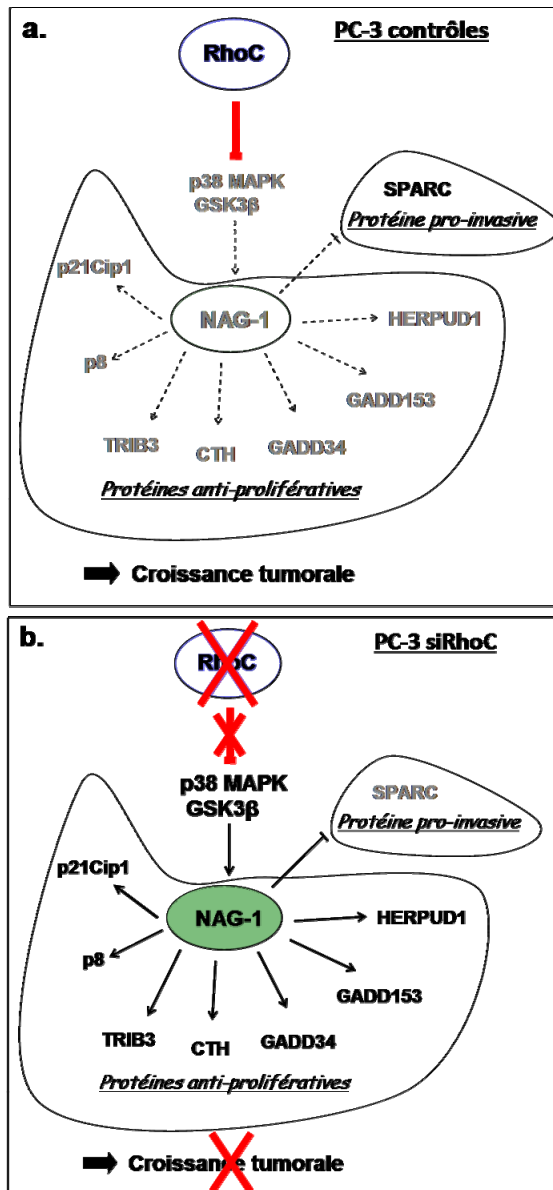
et, dans cette analyse transcriptomique, aucune modification significative de l'expression des gènes appartenant à la voie des interférons n'a été mise en évidence dans les échantillons transfectés par les siRNA ciblant RhoA et RhoC.

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 $\beta$ . 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 $\beta$  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 GSK3β. 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 $\beta$  (Yamaguchi *et al.* 2004). Comme nous n'avons observé de modification ni de la phosphorylation de GSK3 $\beta$  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 $\beta$  (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).