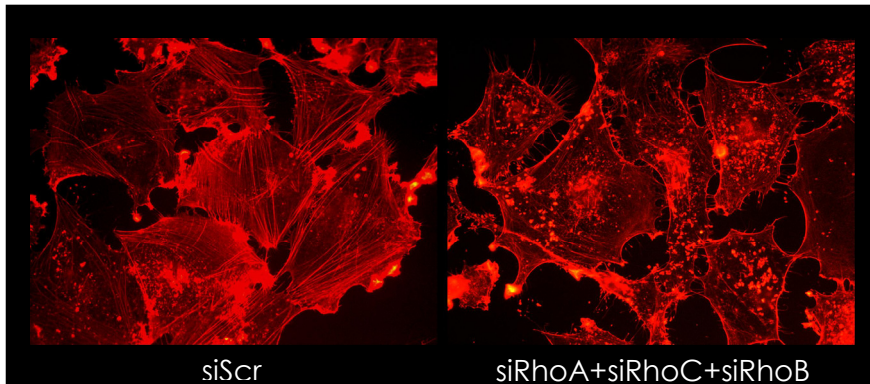


LABORATOIRE DE BIOLOGIE DES TISSUS CONJONCTIFS

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 phalloïdine-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

Liste des abréviations

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

Liste des abréviations

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

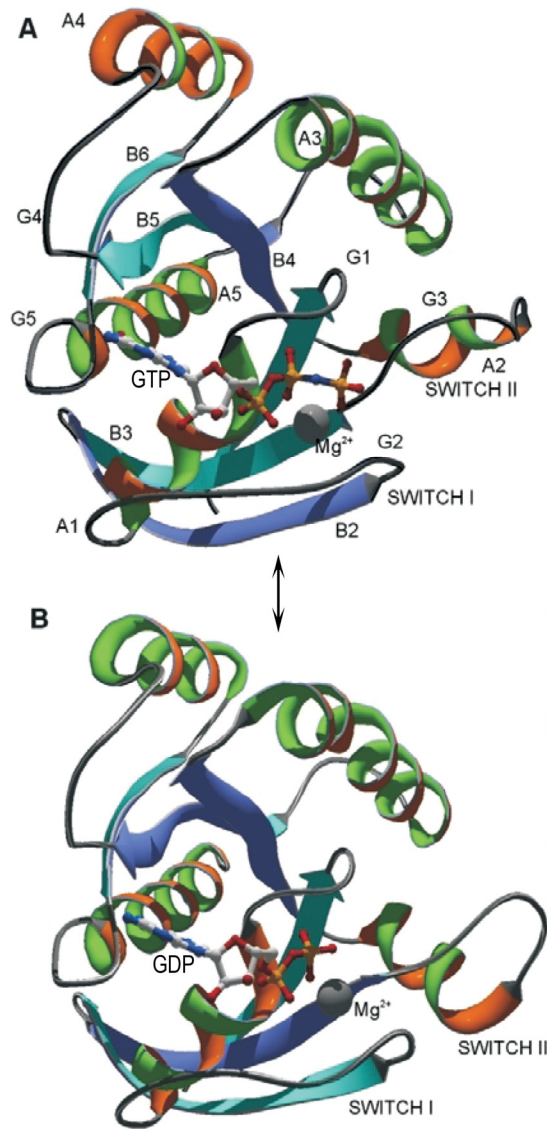


Figure 1 : Structure du domaine catalytique des protéines de la superfamille Ras (d'après Paduch et al. 2001). Ce domaine est constitué de cinq hélices α (A1-A5), six feuillets β (B1-B6) et cinq boucles polypeptidiques (G1-G5). Deux régions fonctionnelles y ont été mises en évidence : la région Switch 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).

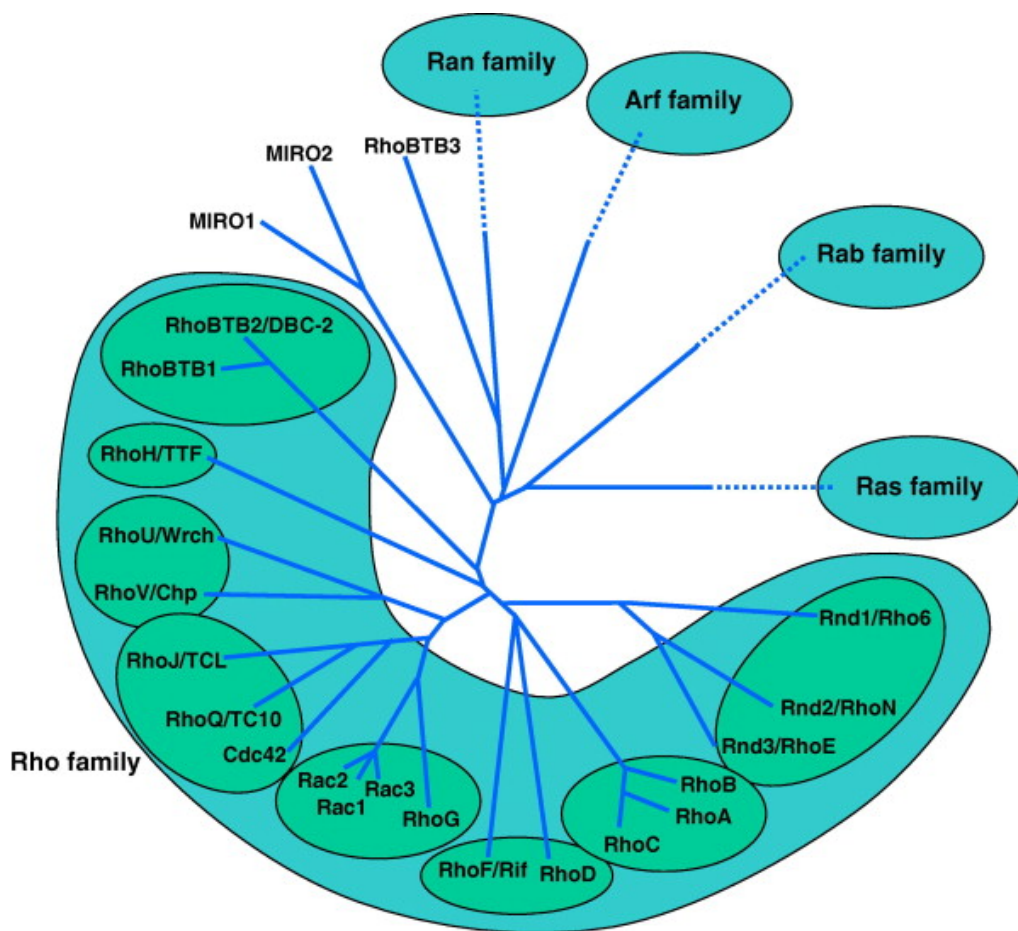


Figure 2 : Parmi la superfamille Ras, les RhoGTPases sont classées en huit sous-familles (Vega et al. 2008).

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.

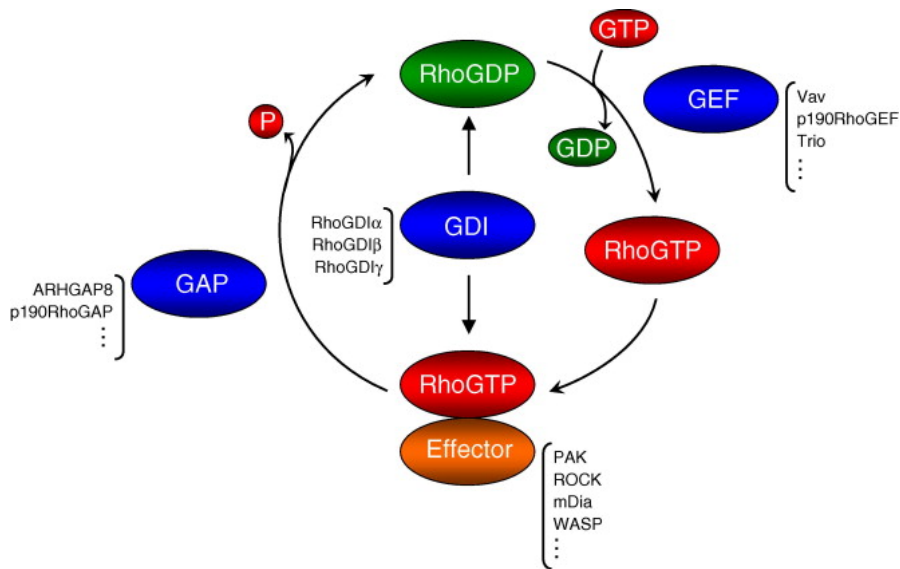


Figure 3 : Cycle d'activation des RhoGTPases (Vega et al. 2008).

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

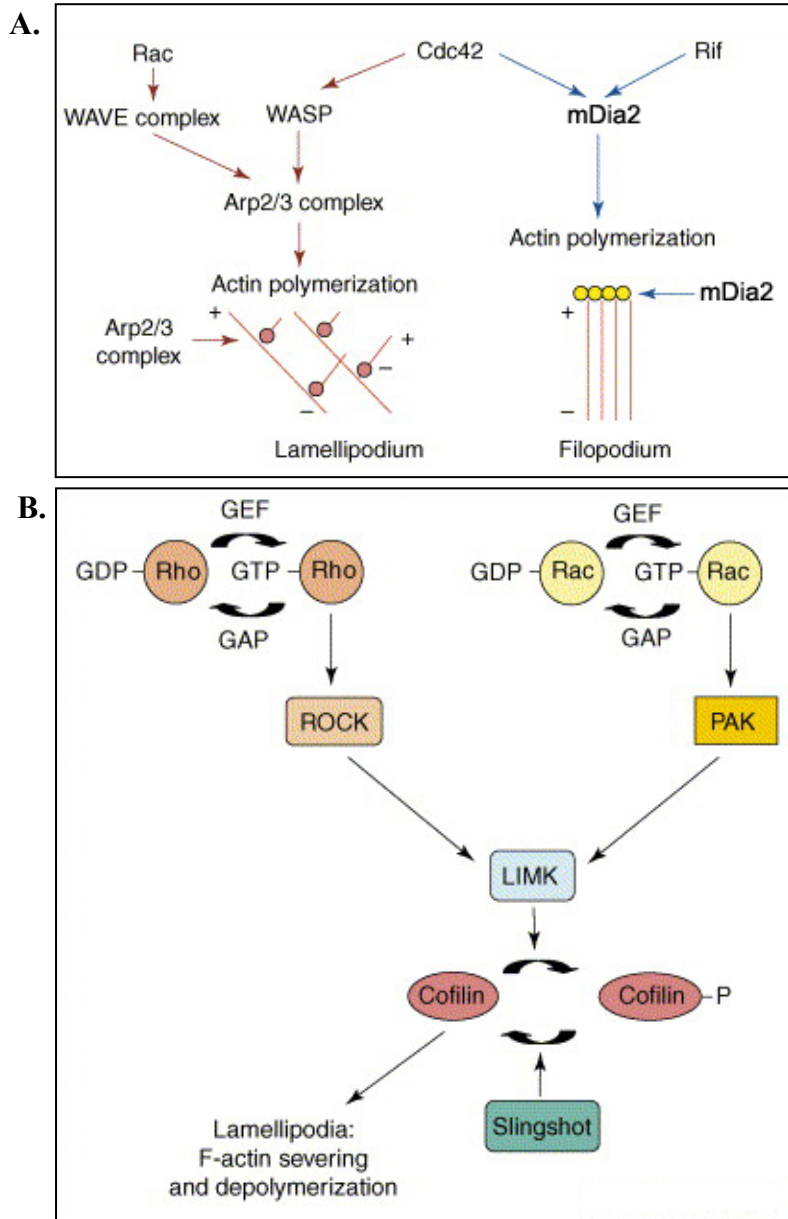


Figure 4 : Rôle des RhoGTPases dans la polymérisation de l'actine (d'après Ridley 2006). **A.** Rac et Cdc42 activent les membres de la famille WASP qui vont stimuler le complexe Arp2/3 induisant la nucléation et la polymérisation de filaments ramifiés d'actine. Cdc42 active mDia2 et la formation de 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

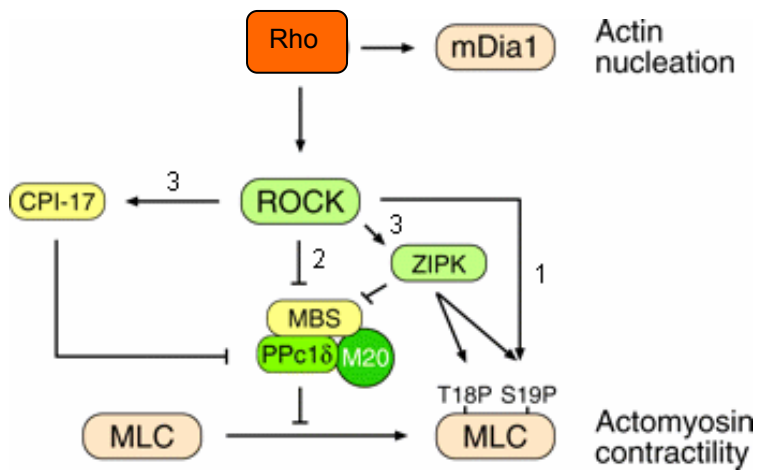


Figure 5 : Voies de signalisation menant à la formation des fibres de stress (d'après Pellegrin et al. 2007). L'activation de ROCK par Rho induit **(1)** la phosphorylation de la chaîne légère de myosine II (MLC), **(2)** inhibe la sous-unité MBS de la phosphatase de la myosine et **(3)** active des 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

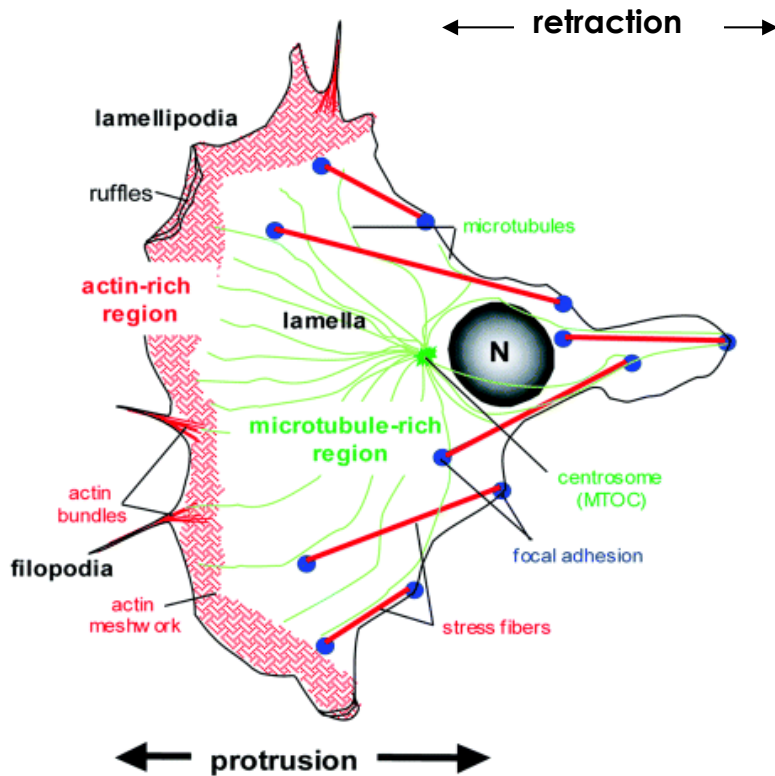


Figure 6 : Organisation des réseaux d'actine et de microtubules lors de la migration cellulaire (d'après Etienne-Manneville 2004). La polymérisation des microtubules active des GEFs de Rac et libère Rac-GTP associé à la tubuline monomérique à l'avant de la cellule. La dépolymérisation des microtubules 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

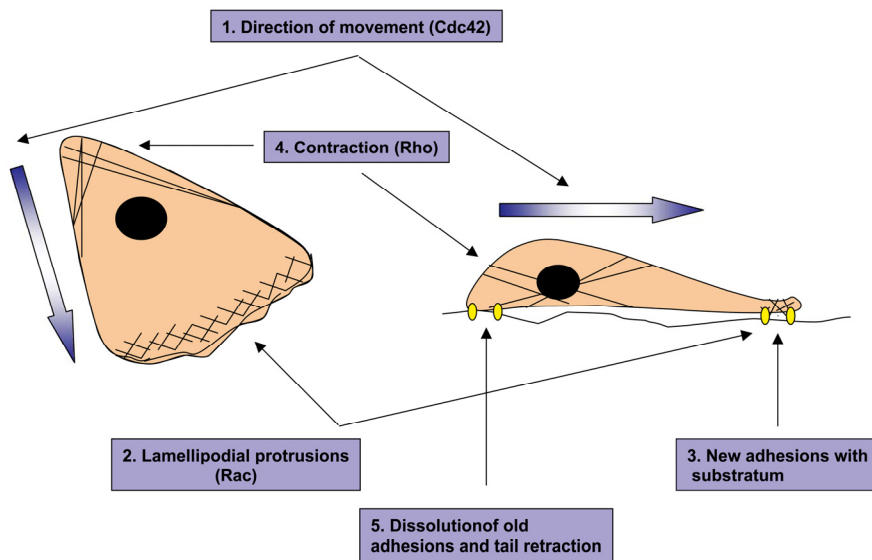


Figure 7 : Rôle des RhoGTPases dans la migration cellulaire (Raftopoulou et al. 2004). Rac est impliqué dans la formation de lamellipodes et de complexes focaux à l'avant de la cellule, Cdc42 joue un rôle dans la formation de filopodes, senseurs directionnels, et Rho permet la contraction de l'arrière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

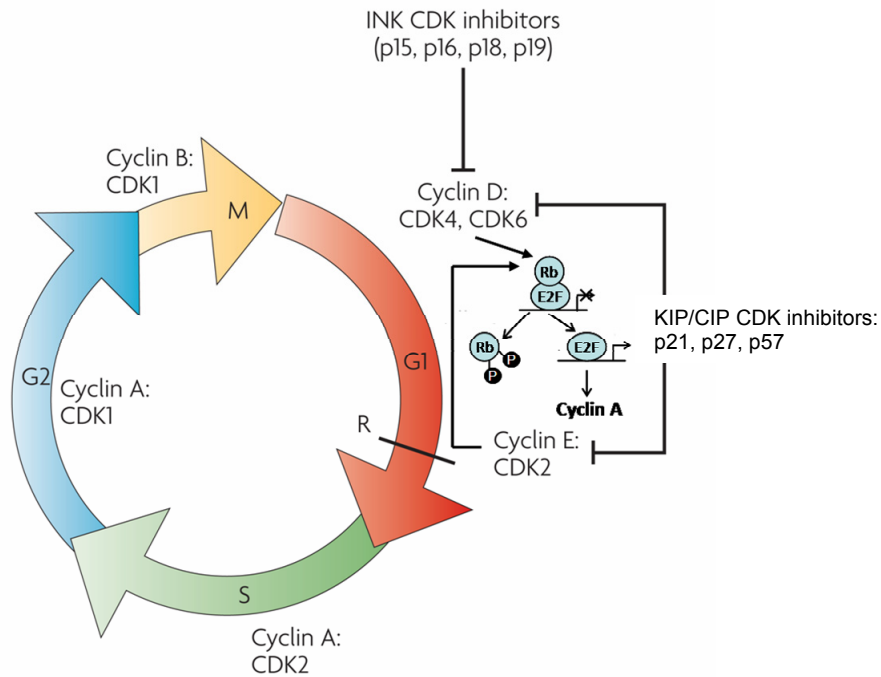


Figure 8: Régulation du cycle cellulaire (d'après Welsh 2004; Dehay et al. 2007). La progression en phase G1 est déterminée par les complexes cyclineD/CDK4/6 et cyclineE/CDK2 qui inhibent la protéine du rétinoblastome (Rb) par phosphorylation avec pour conséquence la libération du facteur de transcription 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 superoxyde 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 $\rho B^{-/-}$ présentent une sensibilité accrue aux carcinogènes chimiques. Par ailleurs, l'injection, dans la cavité péritonéale de souris saines, de fibroblastes embryonnaires $\rho B^{-/-}$ 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 $\rho C^{-/-}$, 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 $\rho C^{-/-}$ ($\rho C^{-/-}$ PyV-mT) et leur contrôle ($\rho C^{+/+}$ 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 $\rho C^{-/-}$ 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 ρA 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

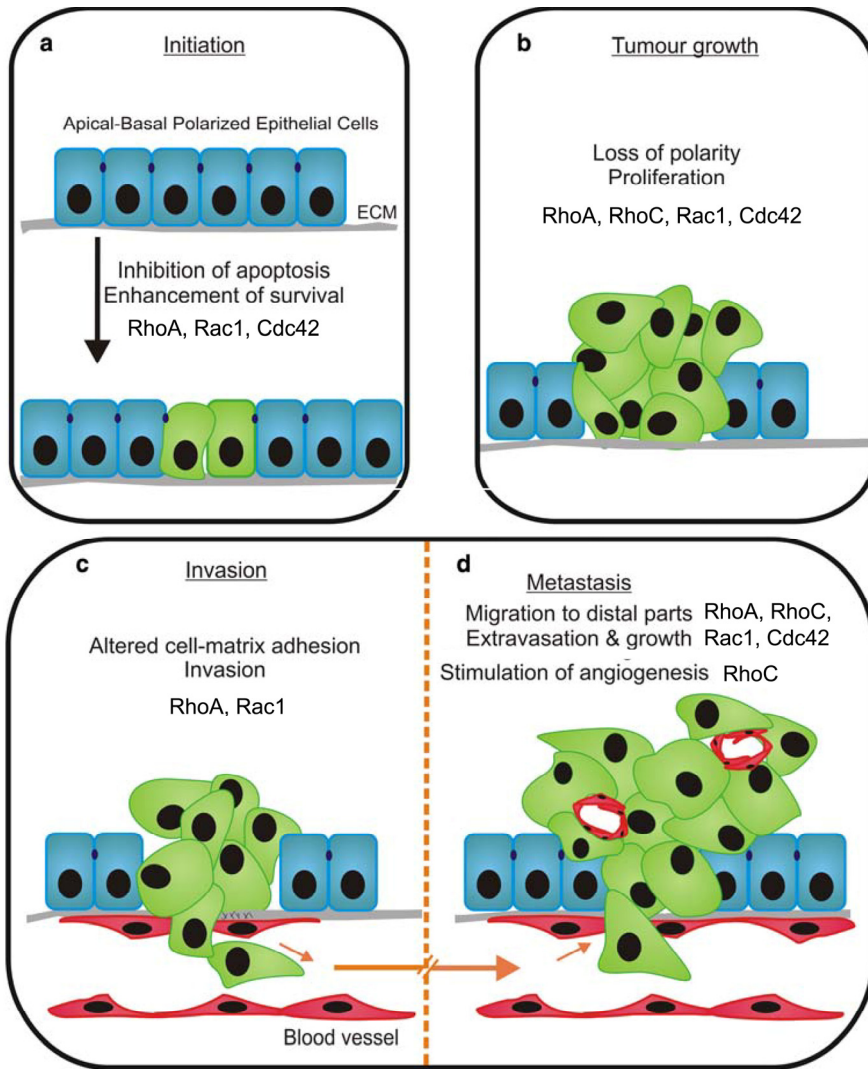


Figure 9 : Contribution des RhoGTPases à l'initiation et à la progression tumorale (d'après Ellenbroek et al. 2007). **a)** Parmi les RhoGTPases les plus étudiées RhoA, Rac1 et Cdc42 sont impliquées dans l'initiation tumorale. **b)** RhoA, RhoC, Rac1 et Cdc42 jouent un rôle dans la perte de polarité 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'anoikis, 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 feuillets 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

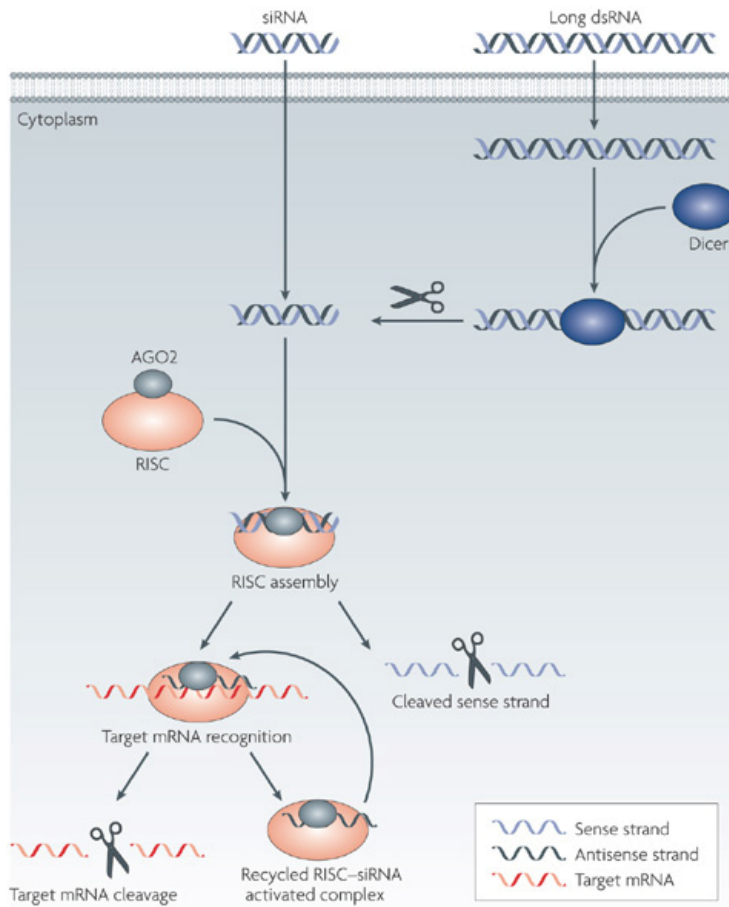
observe ainsi une réduction de l'expression de la E-cadhérine, protéine d'adhésion intercellulaire, et l'apparition de marqueurs d'origine mésenchymateuse tels que la vimentine et la N-cadhérine (Gilles *et al.* 1996; Sahai *et al.* 2002). Suite à la perte de polarité, les cellules tumorales acquièrent 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 messager 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
NUCB1000	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).