

Université de Sherbrooke

Rôle du microenvironnement hypoxique dans la formation des métastases: Impact de la relocalisation intracellulaire de la furine dans l'invasion cellulaire

Par

Dominique Arsenault

Département de pédiatrie
Programme d'immunologie
Sous la direction du Dre Claire M. Dubois

Thèse présentée à la faculté de Médecine et des Sciences de la Santé
En vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.) en immunologie

Date : 12 avril 2013

Liste des évaluateurs :

Pre Claire M. Dubois, Département de pédiatrie, FMSS
Pr Jean-Luc Parent, Département de médecine, FMSS
Pre Nathalie Rivard Département d'anatomie et biologie cellulaire, FMSS
Pr Yves St-Pierre, INRS, Institut Armand Frappier



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-499-00427-7

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-499-00427-7

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

RÉSUMÉ :

La compréhension des mécanismes impliqués dans la formation des métastases est l'un des défis majeurs de la recherche sur le cancer. En effet, la formation de métastases est la cause principale de mortalité chez les patients atteints du cancer. L'influence du microenvironnement tumoral fait partie intégrante de la recherche et plusieurs études démontrent qu'il joue un rôle primordial dans l'invasion des cellules tumorales.

L'une des caractéristiques du microenvironnement tumoral est l'hypoxie. Les cellules cancéreuses ont développé différentes stratégies afin de survivre dans ce microenvironnement. Des études récentes rapportent que des mécanismes post-transcriptionnels sont induits par l'hypoxie tels que le routage intracellulaire de molécules d'adhésion, de protéases et l'activation de facteurs de croissance, et qu'ils influencent le phénotype métastatique des cellules cancéreuses.

L'étape importante dans l'initiation de la formation des métastases est la dégradation de la membrane basale de la tumeur et de la matrice extracellulaire. Les cellules cancéreuses ont développé des stratégies afin de faciliter leur migration dont l'une est la formation d'invadopodes. Malgré plusieurs études sur la biogenèse et les fonctions de ces structures, peu de travaux ont été accomplis concernant l'influence du microenvironnement tumoral hypoxique sur la formation et les fonctions des invadopodes.

Les travaux présentés dans cette thèse portent sur l'étude des mécanismes induits par l'hypoxie dans l'invasion des cellules cancéreuses. Dans le premier chapitre de la section résultats, nous démontrons que l'hypoxie induit une relocalisation stratégique de la furine, une convertase de pro-protéines, dans une boucle de recyclage en périphérie cellulaire. Nous démontrons que la redistribution de la furine favorise l'invasion cellulaire en condition hypoxique.

Dans le deuxième chapitre, nous avons étudié l'impact de la relocalisation de la furine en hypoxie sur la maturation de substrats tumorigéniques. Nos résultats indiquent que l'hypoxie favorise la maturation du TGF β par la furine dans des vésicules acides. Nous démontrons que la présence d'une histidine, sensible au pH, située au site de clivage du pro-TGF β par la furine influence la capacité de cette dernière à cliver la pro-protéine.

Enfin, dans le dernier chapitre, nous démontrons que l'induction hypoxique de la formation des invadopodes est principalement causée par la signalisation dépendante de Smad3 du TGF β . Nous identifions la HDAC6 comme étant un régulateur de la signalisation du TGF β en hypoxie. La HDAC6 permettrait la libération de Smad3 du réseau de tubuline, et suite à la liaison du TGF β sécrété à son récepteur, permettrait la phosphorylation et la translocation nucléaire de Smad3 afin d'induire ses gènes cibles.

L'ensemble de ces travaux a permis d'identifier des molécules clés impliquées dans la formation des invadopodes en condition hypoxique. Nos travaux ont contribué de manière substantielle à nos connaissances des mécanismes impliqués dans l'invasion cellulaire dans le microenvironnement hypoxique. Nos résultats permettront en outre l'identification de cibles thérapeutiques potentielles qui pourraient servir à inhiber l'invasion cellulaire et la formation de métastases.

Mots clés : furine, HDAC6, hypoxie, invadopode, invasion, Smad3, TGF β .

Table des matières

RÉSUMÉ :	ii
LISTE DES FIGURES :	v
LISTE DES TABLEAUX :	vii
LISTE DES SCHÉMAS	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS :	ix
INTRODUCTION	12
Le cancer et les métastases	12
Microenvironnement tumoral et hypoxie	15
Régulation génique en hypoxie	17
Influence de l'hypoxie indépendante de l'HIF-1 dans l'invasion cellulaire	19
Invasion cellulaire et structures invasives	20
Les invadopodes	21
Historique des invadopodes.....	21
Définition et fonctions des invadopodes.....	23
Structure des invadopodes.....	24
Biogenèse et composition de l'invadopode.....	25
Routage membranaire dans la formation des invadopodes.....	27
Facteurs initiant la formation des invadopodes.....	29
Les convertases de pro-protéines	30
La convertase de pro-protéines furine.....	32
Localisation intracellulaire de la furine.....	34
Régulation du routage intracellulaire de la furine.....	34
Implication de la furine dans le cancer.....	37
La furine et l'hypoxie.....	38
Activité potentielle de la furine en périphérie cellulaire.....	39
Le « Transforming Growth Factor β » (TGFβ)	40
Le TGF β et le cancer.....	41
Le TGF β dans l'invasion tumorale.....	43
Activation du TGF β	43
Signalisation du TGF β	45
Voies canoniques et Smads.....	45
Voies non-canoniques du TGF β	45
Régulation du pH intracellulaire	47
Le pH cytosolique.....	48
Le pH dans la voie de sécrétion.....	49
Le pH de la voie endocytaire.....	49
Régulation du pH intracellulaire et intra-vésiculaire.....	50
Localisation intracellulaire des NHEs des organites.....	51
Régulation du pH dans les organites.....	52
Hypoxie et pH intracellulaire.....	53
Influence du pH intracellulaire sur la conformation des protéines	54
Présence d'histidines dans le site de maturation du TGF β	56
Les histones déacétylases	58
Historique.....	58
Rôle des histones déacétylases.....	59

Classification des HDACs.....	63
Tirée de (Lucio-Eterovic et al., 2008)	64
Les HDACs et le cancer.....	64
La HDAC6	68
Structure et fonctions de la HDAC6	68
La HDAC6 dans le cancer	69
Activateurs de la HDAC6	71
HDAC6 et les microtubules	72
HDAC6 et les invadopodes	73
OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	75
RÉSULTATS	76
CHAPITRE 1: HYPOXIA ENHANCES CANCER CELL INVASION THROUGH RELOCALIZATION OF THE PROPROTEIN CONVERTASE FURIN FROM THE TRANS- GOLGI NETWORK TO THE CELL SURFACE.....	76
CHAPITRE 2: INFLUENCE DU pH ACIDE SUR LA MATURATION DU TGFβ.....	112
Matériel et Méthodes:.....	132
CHAPITRE 3: HDAC6 DEACETYLASE ACTIVITY IS REQUIRED FOR HYPOXIA-INDUCED INVADOPIA FORMATION AND CELL INVASION	137
DISCUSSION.....	177
CONCLUSION.....	214
REMERCIEMENTS.....	217
RÉFÉRENCES.....	218
ANNEXE (liste des publications et présentations)	249

LISTE DES FIGURES :

INTRODUCTION:

Figure (Intro) 1: Les sept caractéristiques typiques des cellules cancéreuses	13
Figure (Intro) 2: Schématisation de la cascade invasion-métastase	14
Figure (Intro) 3. Mécanismes de régulation du facteur de transcription HIF-1.....	18
Figure (Intro) 4. Structure des invadopodes	24
Figure (Intro) 5. Schématisation de la structure et des composantes des invadopodes.....	27
Figure (Intro) 6. Le routage intracellulaire et la formation des invadopodes.....	28
Figure (Intro) 7. Représentation schématique de l'organisation structurale des PCs	31
Figure (Intro) 8. Motifs de signalisation dans le domaine cytoplasmique de la furine	34
Figure (Intro) 9. Modèle de régulation du routage intracellulaire de la furine.....	36
Figure (Intro) 10. Implication de la furine (PCs) dans la pathogenèse du cancer	38
Figure (Intro) 11. Régulation hypoxique de la furine et impact sur la tumorigenèse.....	39
Figure (Intro) 12. Rôles bi-fonctionnels du TGF β dans la progression tumorale	42
Figure (Intro) 13. Sécrétion et activation du TGF β	44
Figure (Intro) 14. Les voies de signalisation du TGF β	47
Figure (Intro) 15. Régulation du pH cytosolique par les différents échangeurs/transporteurs membranaires.....	49
Figure (Intro) 16. Régulation du pH intracellulaire dans les différents compartiments.....	50
Figure (Intro) 17. Localisation cellulaire des NHEs et le pH	52
Figure (Intro) 18. Illustration de la régulation du pH des organites	53
Figure (Intro) 19. Modes d'action des HATs et HDACs sur la transcription génique	60
Figure (Intro) 20. Domaines fonctionnels de la HDAC6	68
Figure (Intro) 21. Rôle potentiel de la HDAC6 dans la régulation de l'activité du TGF β ...	73

RÉSULTATS :

CHAPITRE 1 :

Figure (Chapitre 1) 1: Hypoxia triggers furin relocalization to the basal plasma membrane	89
Figure (Chapitre 1) 2. Furin cycles back to the TGN after reoxygenation of hypoxic cells	90
Figure (Chapitre 1) 3. Cell surface-associated furin is active	91
Figure (Chapitre 1) 4. Furin internalization in hypoxic cells involves both clathrin and lipid rafts	94
Figure (Chapitre 1) 5. Recycling of furin to the plasma membrane involves Rab4.....	96
Figure (Chapitre 1) 6. Filamin-A is essential for hypoxia-driven relocalization of furin to the plasma membrane	97
Figure (Chapitre 1) 7. Hypoxia-driven furin relocalization is associated with increased cell invasion.....	98
Figure supplémentaire (Chapitre 1) 1: Hypoxia induces the relocalization of untagged furin	104

Figure supplémentaire (Chapitre 1) 2. The relative proportions of the pro- and mature forms of furin are not altered by hypoxia	105
Figure supplémentaire (Chapitre 1) 3. In vivo localization of furin in tumor xenografts ..	106
Figure supplémentaire (Chapitre 1) 4. CK-II is involved in furin relocalization in hypoxic cells	107

CHAPITRE 2 :

Figure (Chapitre 2) 1: La neutralisation du pH intracellulaire inhibe la maturation du TGF β	115
Figure (Chapitre 2) 2. Conservation des histidines dans le site de clivage protéolytique furine-dépendant du TGF β 1	117
Figure (Chapitre 2) 3. La maturation du TGF β est dépendante de la protonation des histidines	119
Figure (Chapitre 2) 4. La basification des compartiments intracellulaires affecte la maturation du TGF β	123
Figure (Chapitre 2) 5. La relocalisation déficiente de la furine à la périphérie cellulaire inhibe la maturation du TGF β	124
Figure (Chapitre 2) 6. La maturation du TGF β dépendante du pH influence la capacité des cellules cancéreuses à former des invadopodes	126
Figure (Chapitre 2) 7: Schématisation de la problématique de notre modèle d'étude en condition hypoxique	127
Figure (Chapitre 2) 8: L'hypoxie induit l'acidification des vésicules intracellulaires	129

CHAPITRE 3 :

Figure (Chapitre 3) 1: Hypoxia promotes invadopodia formation	149
Figure (Chapitre 3) 2. Endogenous TGF β is involved in hypoxia-induced invadopodia formation	151
Figure (Chapitre 3) 3. The Smad3-dependent signalling pathway is involved in hypoxia-induced invadopodia formation	153
Figure (Chapitre 3) 4. HDAC6 is involved in hypoxia-induced invadopodia formation ...	157
Figure (Chapitre 3) 5. Hypoxia induces HDAC6 deacetylase activity	158
Figure (Chapitre 3) 6. The EGF/EGFR signalling pathway is involved in hypoxia-induced HDAC6 activation	160
Figure (Chapitre 3) 7. EGF enhances TGF β signalling and Smad3 nuclear accumulation	161
Figure (Chapitre 3) 8. Mechanism of invadopodia formation under hypoxia	162
Figure supplémentaire (Chapitre 3) 1: Hypoxia induces the phosphorylation of Smad3...	168
Figure supplémentaire (Chapitre 3) 2. Hypoxia does not cause p-Smad2 nuclear translocation	169
Figure supplémentaire (Chapitre 3) 3. Inhibition of HDACs influences invadopodia formation	170

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1: Influence de l'hypoxie et de HIF sur les caractéristiques typiques du cancer	16
Tableau 2. Adaptations cellulaires en condition hypoxique régulées par HIF	19
Tableau 3. Similarités et différences entre les podosomes et les invadopodes	23
Tableau 4. Protéines impliquées dans les fonctions et la formation des invadopodes	26
Tableau 5. Facteurs initiant la formation des invadopodes	29
Tableau 6. Liste partielle de pro-protéines clivées par la furine.....	33
Tableau 7. Acides aminés et pHiso à pH physiologique	55
Tableau 8. Changements conformationnels de protéines influencés par le pH et les histidines.....	56
Tableau 9. Sites de maturation de substrats de la furine et présence d'histidines.....	57
Tableau 10. TGF β 1 et présence d'histidines.....	58
Tableau 11. Liste partielle des substrats des HDACs autres que les histones.....	62
Tableau 12. Classification des HDACs et localisation cellulaire	64
Tableau 13. Implication des HDACs dans le cancer	66
Tableau 14. Effets des inhibiteurs pharmacologiques des HDACs (HDACi) dans la tumorigenèse.....	67
Tableau 15. Substrats de la HDAC6 et fonctions biologiques	69
Tableau 16. Vue d'ensemble des rôles de la HDAC6 dans le cancer.....	71

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma 1: Hypothèse du chapitre 1.....	78
Schéma 2. Hypothèse du chapitre 2.....	113
Schéma 3. Hypothèse du chapitre 3.....	139
Schéma 4: Récapitulation du chapitre 1	189
Schéma 5: Récapitulation du chapitre 2	203
Schéma 6: Récapitulation du chapitre 3	211
Schéma 8: Conclusion générale.....	216

LISTE DES ABRÉVIATIONS :

Aa : acide aminé

ADAM: *A Disintegrin and Metalloprotease*

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AE : Transporteur d'acide

AP- : *Adaptor Protein-*

ARNm : Acide Ribonucléique « messenger »

ATP : Adénosine tri-phosphate

bHLH: Hélice-Boucle-Hélice

BMP : *Bone Morphogenic Protein*

BNP : *Brain Natriuretic Peptide*

CK-II : Caséine Kinase 2

EAT: Transition Épithéliale-Améboïde

ECM: Matrice Extracellulaire

EGF: *Epidermal Growth Factor*

EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor*

EMT: Transition Épithéliale-Mésenchymale

EPO: Erythropoïétine

ER : Réticulum Endoplasmique

ERK : *Extracellular Signal-Regulated Kinase*

FAK: *Focal Adhesion Kinase*

HA : Hémagglutinine

HAT : Histones Acétyl-Transférase

HDAC : Histone Déacétylase

HGF : *Hepathocyte Growth Factor*

HIF-: *Hypoxia-Inducible Factor*

HRE: Élément de réponse à l'hypoxie

HSF1 : *Heat Shock Protein Factor 1*

HSP : *Heat Shock Protein*

hTERT: *Telomerase Reverse Transcriptase*

IAP-: *Apoptosis Inhibitory Protein-*

IGF-: *Insulin Growth Factor-*

IGF-R : *Insulin Growth Factor Receptor*

LAP : Peptide associé à la latence

LLC : *Large Latent Complex*

LOX: *Lysyl Oxidase*

LTBP : *Latent TGF β -Binding Protein*

MAPK: *Mitogen-Activated-Protein Kinase*

MCT: Transporteur du monocarboxylate

MDM: *Murine Double Minute*

MMP: *Matrix Metalloproteinase*

MT1-MMP : *Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase*

NBC : Transporteur de HCO₃⁻ couplé au Na⁺

NGF : *Nerve Growth Factor*

NHE: *Na⁺/H⁺ Exchanger*

PACS-1 : *Phosphofurin Acidic Cluster Sorting Protein-1*

PC : Convertase de pro-protéines

PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor*

PHD: *Proline Hydroxylase*

pHe : pH extracellulaire

pHiso : pH iso-électrique

PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase

PP2A : Protéine Phosphatase 2A

PTEN: *Phosphatase and Tensin Homolog*

pVHL: protéine von Hippel-Lindau

RACK1 : *Receptor for Activated C Kinases*

RECK : *Reversion-inducing-cystein-rich protein with Kazal Motifs*

RSV: Virus du Sarcome de Rous

Sirt: Sirtuine

STRAP : *Serine-threonine kinase receptor-associated protein*

TAK1: Kinase dépendante de l'ubiquitine

TGF β : *Transforming Growth Factor β*

TGF β R: *Transforming Growth Factor β Receptor*

TGN : Réseau trans-Golgi

TIMP : *Tissue Inhibitor of Metalloproteases*

VEGF-R: *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*

WASP: *Wiskott-Aldrich Syndrom Protein*

WD40 : Motif structural de 40 acides aminés se terminant pas le dipeptide tryptophane et acide aspartique

WIP: *WASP-Interacting Protein*

INTRODUCTION

Le cancer et les métastases

La tumorigenèse est un processus impliquant une acquisition séquentielle d'altérations génétiques, épigénétiques et somatiques qui résultent en une instabilité du génome causée par des défauts dans le cycle cellulaire (Hanahan and Weinberg, 2000). Ces altérations permettent aux cellules cancéreuses d'acquérir des attributs différents des cellules normales. Ces attributs ont été classés en sept caractéristiques typiques des cellules cancéreuses. Premièrement, les cellules cancéreuses affichent une autosuffisance en signaux de croissance, par exemple par une activation constitutive de l'oncogène K-Ras, et sont également insensibles aux signaux antiprolifératifs, par exemple en perdant l'expression du suppresseur de tumeur p53. De plus, on note également une expression des télomérases, ce qui permet aux cellules cancéreuses de croître de façon indépendante de leur environnement. En plus d'avoir une croissance illimitée, les cellules cancéreuses échappent à l'apoptose, par exemple en produisant des facteurs de survie tel que l'IGF-1, ce qui accentue leur pouvoir de prolifération. De plus, elles induisent une angiogenèse soutenue par la production de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF. Les cellules cancéreuses d'origines épithéliales adoptent également un caractère invasif en inactivant par exemple la E-cadhérine, et induisent la transition épithéliale-mésenchymale (EMT) (discutée plus loin) permettant ainsi aux cellules tumorales de perdre leurs interactions cellule-cellule et de migrer vers des nouveaux sites tissulaires. Finalement, le microenvironnement tumoral permet l'évasion du système immunitaire. Par exemple, les macrophages associés à la tumeur (TAMs) sont enrichis dans les tumeurs hypoxiques et facilitent l'angiogenèse, la migration des cellules tumorales et exercent des effets immunosuppresseurs (Condeelis and Pollard, 2006; Kroemer and Pouyssegur, 2008) (Figure 1).

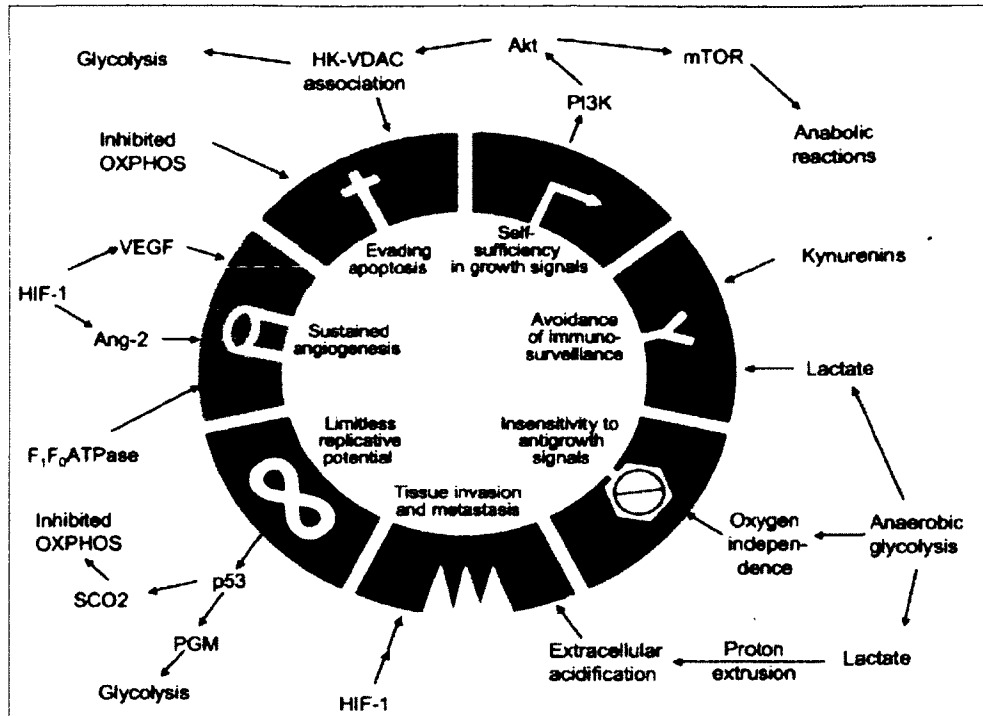


Figure (Intro) 1: Les sept caractéristiques typiques des cellules cancéreuses

Schématisation des capacités acquises des cellules cancéreuses. 1- autosuffisance en signaux de croissance, 2- évasion de l'apoptose, 3- insensibilité aux signaux antiprolifératifs, 4- angiogenèse soutenue, 5- capacité illimitée de croissance, 6- invasion des tissus et métastases, 7- évasion du système immunitaire. Tirée de (Kroemer and Pouyssegur, 2008).

La croissance illimitée des cellules cancéreuses donne naissance à une tumeur primaire au site initial de conversion d'une cellule normale en cellule cancéreuse. Lorsque les cellules cancéreuses demeurent au site initial de la tumeur, le cancer est de moindre importance clinique (carcinome *in situ*). Malheureusement, les cellules tumorales ne restent pas toujours au site primaire mais migrent par l'intermédiaire de deux mécanismes. Ces mécanismes impliquent l'invasion, ou le mouvement des cellules dans un site tissulaire environnant, et la formation de métastases, c'est-à-dire la propagation des cellules à des sites distants, soit par les vaisseaux sanguins ou le système lymphatique. Le processus de la formation de métastases a été décrit comme une séquence d'étapes, souvent appelée la cascade d'invasion-métastase (Fidler, 2003; Talmadge and Fidler, 2010). Cette cascade comprend six étapes fondamentales :

1. Invasion locale de la membrane basale;
2. Intravasation des cellules tumorales dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques;
3. Transit des cellules tumorales dans le système lymphatique ou sanguin;
4. Extravasation des cellules tumorales de la lumière des vaisseaux sanguins vers le parenchyme des tissus distants;
5. Formation de petits nodules de cellules tumorales (micrométastases);
6. Croissance des micrométastases en tumeurs macroscopiques (colonisation).

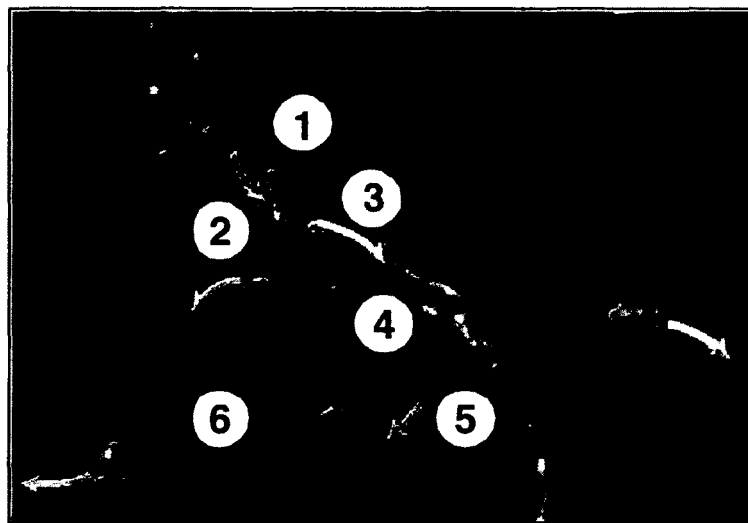


Figure (Intro) 2: Schématisation de la cascade invasion-métastase

Le processus de formation de métastases est séparé en six séquences d'évènements. 1- Invasion locale de la membrane basale, 2- Intravasation des cellules tumorales dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques, 3- Transit des cellules tumorales dans le système lymphatique ou sanguin, 4- Extravasation des cellules tumorales des vaisseaux sanguins/lymphatiques vers les tissus distants, 5- Formation de petits nodules de cellules tumorales, 6- Croissance des micrométastases en tumeurs macroscopiques.

Le développement de métastases dans des organes distants ou dans les ganglions lymphatiques a un impact important sur le pronostic des patients porteurs des tumeurs solides. Dans la plupart des cas, la croissance métastatique représente la plaque tournante à une maladie systémique incurable. En effet, l'invasion et la formation de métastases sont les causes majeures de morbidité et de mortalité dues au cancer (Sporn, 1996). En tant que processus hautement régulé, la formation de métastases suit un patron distinct et unique à

chaque type de cancer. Ainsi, la formation de métastases et les stratégies afin de la prévenir sont d'un intérêt fondamental dans la biologie du cancer.

Durant la dernière décennie, la biologie du cancer est passée d'un point de vue réductionniste qui tente d'élucider les différents mécanismes cellulaires impliqués dans la progression tumorale à un système complexe où le microenvironnement tumoral, c'est-à-dire l'environnement de la tumeur qui inclut la matrice extracellulaire (ECM), le système immunitaire et les cellules stromales environnantes, a une influence majeure sur la tumorigenèse.

Microenvironnement tumoral et hypoxie

Le microenvironnement tumoral est maintenant considéré comme étant un facteur critique dans la progression tumorale et la formation de métastases (Hanahan and Weinberg, 2000; Roskelley and Bissell, 2002). Parmi les différents facteurs environnementaux de la tumeur, l'une des différences fondamentales entre les tissus normaux et tumoraux est la vascularisation. Lorsqu'une tumeur solide croît, le ratio de cellules en prolifération dépasse la capacité des vaisseaux sanguins à apporter les nutriments, les facteurs de croissance et de l'oxygène (Brown and Giaccia, 1998). Ainsi, les tumeurs solides sont caractérisées par une faible tension en oxygène, c'est-à-dire l'hypoxie. Parce que la vascularisation tumorale est souvent déficiente et la demande en oxygène des cellules cancéreuses est grande, une majorité des tumeurs solides contiennent des régions hypoxiques (Hockel et al., 1991). Il est connu et accepté que l'hypoxie est un des stress les plus répandus et une caractéristique commune des tumeurs solides. Plusieurs études ont démontré le rôle important et complexe de l'hypoxie à réguler chacune des caractéristiques typiques du cancer. Dans un microenvironnement hypoxique, les cellules cancéreuses développent des mécanismes adaptatifs qui vont leur permettre de survivre à cet environnement. Tous ces événements sont influencés directement ou indirectement par l'hypoxie et le facteur de transcription HIF-1 (discuté plus loin) (Tableau 1).

Tableau 1: Influence de l'hypoxie et de HIF sur les caractéristiques typiques du cancer

Caractéristiques typiques	Exemples de mécanismes	Références
Autosuffisance en signaux de croissance	Augmentation de l'expression : EGF Insuline IGF-2 PDGF	(Maxwell et al., 2001; Powis and Kirkpatrick, 2004)
Insensibilité aux signaux antiprolifératifs	Mutation ou expression à la baisse de PTEN : inhibition de la voie PI3K/Akt	(Harris, 2002; Zundel et al., 2000)
Évasion de l'apoptose	Augmentation de l'expression de molécules anti-apoptotiques : IAP-2 MDM2	(Schmid et al., 2004; Zhang and Hill, 2004)
Capacité illimitée de croissance	Activation de la voie MAPK : Augmentation de l'activité des télomérases (hTERT)	(Seimiya et al., 1999)
Angiogenèse soutenue	Expression à la hausse de molécules pro-angiogéniques : VEGF Ang-2	(Laderoute et al., 2000; Maisonpierre et al., 1997; Pouyssegur et al., 2006)
Invasion des tissus et formation de métastases	Induction de l'EMT : Baisse de l'expression de E-cadhérine, Augmentation de l'expression de LOX	(Erler et al., 2006; Imai et al., 2003; Krishnamachary et al., 2003; Yang et al., 2008a)

Ainsi, des études ont démontré que le microenvironnement hypoxique des tumeurs est un déterminant majeur de la dissémination des cellules tumorales. De ce fait, plusieurs études démontrent l'importance du facteur de transcription HIF-1 en tant que régulateur critique de la formation de métastases, où les cellules hypoxiques sont plus agressives et tolérantes aux thérapies anti-cancer (Chang et al., 2006; Krishnamachary et al., 2003; Liao et al., 2007).

Régulation génique en hypoxie

La réponse cellulaire en hypoxie est un processus complexe. Plusieurs réponses cellulaires sont orchestrées de façon transcriptionnelle par les facteurs de transcription inductibles en hypoxie (HIFs). Ces facteurs de transcription sont des hétérodimères composés de sous-unité α et β et sont membres de la famille des protéines hélice-boucle-hélice (bHLH) (Wang et al., 1995). HIF-1 β n'est pas sensible à l'oxygène, mais il est nécessaire à la formation et aux fonctions du complexe HIF. Une fois formé, l'hétérodimère HIF-1 α/β se lie au promoteur de ses gènes cibles. La liaison de HIF aux éléments de réponse à l'hypoxie (régions HRE) de ses promoteurs résulte en général en une régulation à la hausse de la transcription des gènes entraînant de multiples réponses adaptatives de la cellule (Figure 3).

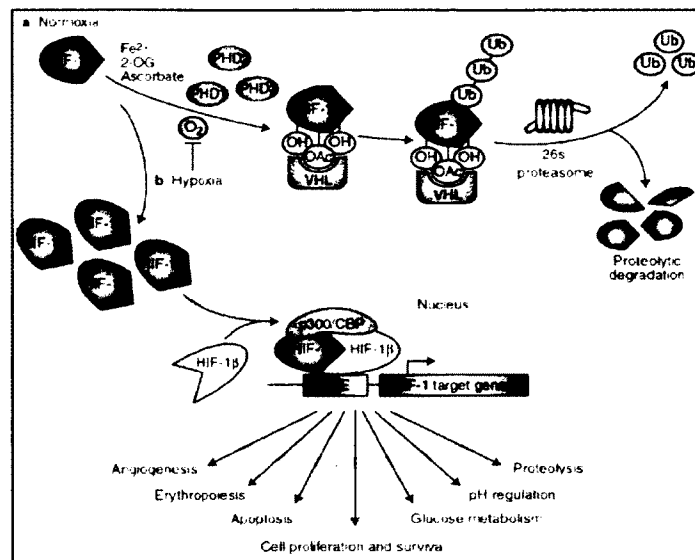


Figure (Intro) 3. Mécanismes de régulation du facteur de transcription HIF-1

A) En normoxie, HIF-1 α est hydroxylé par les prolines hydroxylases (PHD1, 2 et 3) en présence de O₂, Fe²⁺, 2-oxoglutarate (2-OG) et l'ascorbate. HIF-1 α hydroxylé est reconnu par le pVHL (le produit du gène suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau) lequel, avec un complexe d'ubiquitine-ligase, étiquette HIF-1 α avec la polyubiquitine. Ceci permet la reconnaissance par le protéasome et mène à sa dégradation. B) En réponse à l'hypoxie, l'hydroxylation des prolines est inhibée. VHL n'est pas capable de lier et cibler HIF-1 α pour la dégradation, ce qui mène à l'accumulation de HIF-1 α et à sa translocation au noyau. HIF-1 α dimérise avec HIF-1 β , lie les régions HRE au promoteur des gènes cibles et recrute les co-activateurs de la transcription tel p300/CBP pour une activité transcriptionnelle complète. Une multitude de fonctions cellulaires sont régulées par les gènes cibles. Tirée de (Expert Reviews in Molecular Medicine 2005).

Les différents gènes ciblés par le facteur de transcription HIF-1 influencent différents mécanismes qui permettent à la cellule cancéreuse de s'adapter à son microenvironnement hypoxique. Par exemple, une transition de son métabolisme, la régulation du pH, le transport de l'oxygène et l'angiogenèse (Tableau 2).

Tableau 1. Adaptations cellulaires en condition hypoxique régulées par HIF

Adaptation cellulaire	Conséquences	Exemples de protéines	Références
Métabolisme	Métabolisme glycolytique	Transporteurs de glucose (GLUT1-3) Hexokinases 1-2 Phosphoglycerate kinase 1 Déhydrogénase lactique-1	(Semenza, 2001)
Régulation du pH	Acidification du microenvironnement	NHE1-6 MCT Anhydrase carbonique	(Ullah et al., 2006; Wykoff et al., 2000)
Transport de l'O₂	Production de globules rouges	EPO Transferrine Récepteur de la transferrine Hepcidine	(Haase, 2010; Mukhopadhyay et al., 2000; Peyssonnaud et al., 2008; Semenza, 2001)
Angiogenèse	Remodelage et formation de nouveaux vaisseaux sanguins	VEGF VEGF-R MMP2 MMP9 PDGF	(Forsythe et al., 1996; Gerber et al., 1997; Rankin and Giaccia, 2008)

Influence de l'hypoxie indépendante de l'HIF-1 dans l'invasion cellulaire

Comme nous avons pu le constater, la grande majorité des études des dernières décennies sur le rôle de l'hypoxie dans la tumorigenèse portait sur la régulation génique de protéines impliquées dans la transformation néoplasique et l'invasion cellulaire via le facteur de transcription HIF-1. Récemment, plusieurs évidences supportent un rôle indépendant de la transcription génique dans les mécanismes induits par le microenvironnement hypoxique. En effet, plusieurs études démontrent que l'hypoxie influence l'invasion des cellules cancéreuses de façon indépendante de HIF-1. À titre d'exemples, des événements de routage intracellulaire et de relocalisation membranaire de protéines sont induits en hypoxie, ce qui augmente le potentiel invasif des cellules

tumorales. Ainsi, il a été démontré que l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est relocalisée des régions périnucléaires vers la membrane plasmique par l'intermédiaire de vésicules Rab11 (Yoon et al., 2005). Une autre étude a révélé que l'hypoxie augmente la localisation membranaire de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ et l'invasion de cellules de mélanomes (Cowden Dahl et al., 2005). De plus, une étude de protéomique a démontré un enrichissement des protéines de routage intracellulaire dans les tissus d'hippocampe soumis à l'hypoxie (Van Elzen et al., 2010). Globalement, ces études indiquent que le microenvironnement hypoxique peut influencer l'invasion cellulaire en altérant le transport intracellulaire de protéines.

Invasion cellulaire et structures invasives

Afin de coloniser de nouveaux tissus et ainsi mener à la formation de métastases, les cellules cancéreuses doivent migrer de la tumeur primaire vers les sites secondaires. Deux types de transformation induisent des changements cellulaires morphologiques et permettent à la cellule tumorale de migrer. Premièrement, la transition épithéliale-améboïde (EAT) promeut la dissémination des cellules cancéreuses par la rupture des contacts cellule-cellule et en modulant les interactions cellule-ECM. Ce mode de locomotion dépend du bourgeonnement dynamique de cellules arrondies qui propulse la cellule à travers l'ECM. Celui-ci est privilégié lorsque la densité de l'ECM est faible et est indépendant de la production de métalloprotéases. Par contre, il a été proposé que les étapes initiales de la formation de métastases, c'est-à-dire la dégradation de la membrane basale et de l'ECM, impliquent la transition de type épithéliale-mésenchymale (EMT) (Polyak and Weinberg, 2009; Yang et al., 2004). L'EMT est un processus à plusieurs étapes dans lequel la cellule polarisée et adhésive est convertie en une cellule non-polarisée. Au cours de ce processus, il y a perturbation des adhésions intercellulaires et perte de la polarité apico-basale, une réorganisation du cytosquelette et dégradation de la membrane basale. De façon intéressante, l'hypoxie et la surexpression de HIF-1 α sont capables de promouvoir l'EMT et le phénotype métastatique (Krishnamachary et al., 2006; Peinado et al., 2007; Yang et al., 2008a).

Afin de former des métastases, les cellules cancéreuses doivent dégrader l'ECM, migrer dans les tissus environnants, transmigrer dans les vaisseaux sanguins ou

lymphatiques afin de coloniser de nouveaux tissus. La migration cellulaire requiert un mouvement soutenu de la membrane plasmique vers l'avant. La cellule est capable de former quatre types de protrusions membranaires différentes qui permettent la migration cellulaire: les lamellipodes, les filipodes, les bourgeonnements membranaires, et les invadopodes/podosomes. Chacune de ces structures a une morphologie propre et des fonctions distinctes. Par exemple, les lamellipodes sont capables de se prolonger sur de longues distances et poussent la cellule à travers les tissus (Friedl and Gilmour, 2009). Les filopodes sont des extensions qui explorent l'environnement de la cellule et qui sont particulièrement importants dans la croissance neuronale et l'angiogenèse de vaisseaux sanguins (Eilken and Adams, 2010; Gupton and Gertler, 2007). Le bourgeonnement cellulaire a été décrit comme étant un mécanisme qui induit la migration cellulaire directionnelle durant le développement (Charras and Paluch, 2008). Finalement, les invadopodes sont des protrusions membranaires qui permettent la dégradation localisée de l'ECM (Buccione et al., 2009). Il est important de constater que ces différents types de structures peuvent coexister dans la cellule pour permettre la migration cellulaire.

Les invadopodes

Historique des invadopodes

C'est en 1980 que David-Pfeuty et Singer ont démontré que la transformation de fibroblastes d'embryons de poulet avec le virus du sarcome de Rous (RSV), qui contient l'oncogène v-Src, causait la relocalisation de la vinculine et l' α -actinine, des protéines du cytosquelette, aux points d'adhésion focaux (points de contact entre la cellule et l'ECM) pour former des agrégats circulaires qu'ils ont appelés rosettes (David-Pfeuty and Singer, 1980). Quelques années plus tard, soit en 1985, Tarone, Marchisio et ses collègues ont démontré que ces protéines se localisaient dans des protrusions de la membrane basolatérale et qu'elles contenaient de l'actine et des protéines phosphorylées sur des résidus tyrosine (Tarone et al., 1985). Ils ont considéré ces structures comme étant des pieds cellulaires et les ont appelées podosomes. Durant la même année, Chen, Parsons et leurs collègues ont observé que la tyrosine kinase v-Src se localisait aux points d'adhésion focaux et que ces structures dégradait l'ECM aux points de contact cellule-ECM (Chen et

al., 1985). Ce n'est qu'en 1989 que Chen démontra que ces structures enrichies en v-Src étaient des podosomes (Chen, 1989). De par ces capacités d'adhésion et de dégradation, il a nommé ces structures les invadopodes. Les recherches subséquentes ont démontré que les invadopodes pouvaient également se retrouver dans des lignées de cellules cancéreuses humaines. Pendant ce temps, Marchisio et ses collègues ont démontré que les ostéoclastes en culture pouvaient former des podosomes (Zambonin-Zallone et al., 1988). Les podosomes ont maintenant été mis en évidence dans différents types cellulaires incluant les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Gimona et al., 2008). Étant donné que les termes podosome et invadopode ont été utilisés pour décrire la même structure dans les mêmes cellules, il y eut confusion au sujet de leur nomenclature. Aujourd'hui, le terme podosome est utilisé lorsque ces structures se retrouvent sur des cellules dites normales et le terme invadopode est réservé pour les cellules cancéreuses et les cellules transformées avec l'oncogène Src. Tel qu'illustré au tableau 3, les podosomes et les invadopodes partagent plusieurs similitudes dans leur composition mais se distinguent au niveau de leur morphologie et du type cellulaire qui les expriment. Plus récemment, le terme invadosome a été introduit pour décrire toutes les structures impliquées dans la dégradation de l'ECM.

Tableau 2. Similarités et différences entre les podosomes et les invadopodes

		PODOSOMES	INVADOPODES
SIMILARITÉS	Apparence Localisation Composition	Ponctuation d'actine Contact cellule-ECM Cortactine, N-WASP, Arp2/3, pY	
DIFFÉRENCES	Nombre Taille Durée de vie Dégradation	20-100/cellule Max. 1µm x 0.4µm 2-12 min +	1-10/cellule Max. 8µm x 5µm 1 heure +++
TYPES CELLULAIRES		Ostéoclastes Monocytes Cellules endothéliales Muscles lisses Cellules transformées-Src	Cellules cancéreuses Cellules transformées-Src

Adapté de (Linder, 2007)

Définition et fonctions des invadopodes

Les invadopodes ont été initialement définis comme des protrusions stables riches en actine émanant de la surface ventrale des cellules tumorales invasives (Kelly et al., 1994) et dégradant de façon focalisée l'ECM. Ainsi, les invadopodes permettent à la cellule de coordonner la dégradation de l'ECM avec la motilité cellulaire afin de favoriser la migration dans les tissus environnants. Ils sont particulièrement efficaces lorsque la cellule cancéreuse traverse la membrane basale de la tumeur (Schoumacher et al., 2011). L'importance de la formation des invadopodes dans l'invasion cellulaire a été mise en évidence par le fait que la présence d'invadopodes corrèle avec la capacité des cellules cancéreuses à envahir les tissus et à former des métastases (Hwang et al., 2012).

Structure des invadopodes

Les études initiales de microscopie électronique suggèrent que les invadopodes sont de minces protrusions de la membrane plasmique qui s'intègrent dans l'ECM (Bowden et al., 1999). Plus tard, des techniques de microscopie confocale ont démontré que les invadopodes provenaient d'invaginations profondes de la membrane cellulaire ventrale d'environ 8 μm de largeur et 2 μm de profondeur (Baldassarre et al., 2003). De ces invaginations, plusieurs protrusions d'environ 50 nm sont formées et celles-ci pénètrent parfois l'ECM. Récemment, des études de microscopie optique diffractive tomographique ont démontré que l'invadopode est très rapproché du corps cellulaire, et qu'il y a polarisation et juxtaposition du système du Golgi et du système de sécrétion, suggérant une relation entre l'activité protéolytique de l'invadopode et le transport de protéines membranaires (Baldassarre et al., 2006) (discuté plus loin).

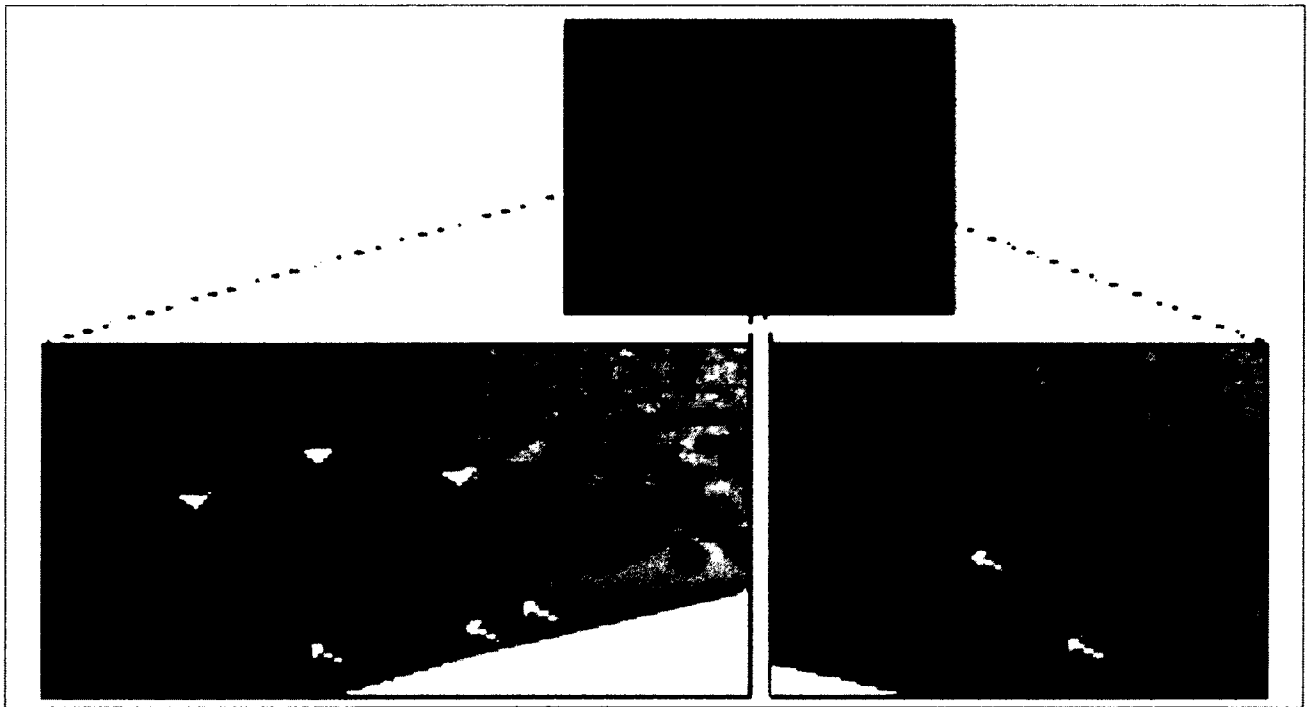


Figure (Intro) 4. Structure des invadopodes

Figure 4 : Structure des invadopodes. Le panneau supérieur représente une cellule marquée à la phalloïdine et analysée par microscopie à fluorescence. On peut y observer dans l'encadré une focalisation riche en actine qui représente l'invadopode. Les deux sections inférieures représentent une analyse par microscopie électronique démontrant des invadopodes individuels qui se prolongent de la surface ventrale de la cellule. Les têtes de flèche représentent le Golgi et les flèches pleines représentent les invadopodes. Tirée de (Buccione et al., 2009).

Biogenèse et composition de l'invadopode

Plusieurs études ont démontré que l'activation de la kinase Src était suffisante pour induire la formation des invadopodes (Brandt et al., 2002; Chen et al., 1985; Chen et al., 1984; Spinardi et al., 2004). Src est une kinase cytoplasmique qui est activée suite à des signaux d'adhésion ou à la liaison de facteurs de croissance à leurs récepteurs. Par contre, il est maintenant bien accepté que le mécanisme principal qui initie la formation des invadopodes est l'engagement des intégrines à la surface cellulaire par les composantes de l'ECM (Mueller et al., 1999; Nakahara et al., 1998; Nakahara et al., 1996). Par exemple, l'activation de l'intégrine $\alpha 1\beta 3$ promeut la phosphorylation dépendante de Src et de p190RhoGap qui affecte le cytosquelette d'actine par l'entremise de Rho GTPases. Ainsi, il y a formation de la protrusion membranaire et formation de l'invadopode par une relocalisation stratégique du cytosquelette d'actine. Plus récemment, les caractéristiques de la matrice extracellulaire ont été reconnues comme étant primordiales pour l'initiation de la formation de l'invadopode. Des travaux de Weaver et ses collègues ont démontré que la rigidité de la matrice extracellulaire influençait la formation et les fonctions de dégradation des invadopodes (Alexander et al., 2008; Parekh et al., 2011; Parekh and Weaver, 2009). Ils ont démontré que la protéine p130cas, un mécanosenseur, permettait de sonder la rigidité de la matrice. Ainsi, une matrice dense entraîne un changement conformationnel de p130cas et permet l'activation de la protéine Src et de la voie de signalisation subséquente, menant à la formation de l'invadopode (Alexander et al., 2008). La rigidité de la matrice influencerait donc le type de migration que la cellule emprunte, tel que décrit précédemment. Une matrice dense favoriserait une migration de type EMT, donc via l'intermédiaire de la formation d'invadopodes, et une matrice moins dense favoriserait la migration de type améboïde. Plusieurs protéines associées à Src se localisent aux sites d'invadopodes et sont impliquées dans leur formation. On peut citer à titre d'exemples, les protéines régulatrices et structurales du cytosquelette telles que Tks5/FISH, ASAP1, AMAP-1, N-WASP, la dynamine-2 et la cortactine (Bowden et al., 1999; Frame et al., 2002; Mizutani et al., 2002; Onodera et al., 2005; Seals et al., 2005; Yamaguchi et al., 2005).

La cortactine a initialement été identifiée comme un substrat de la kinase Src qui agit en tant que régulateur de l'assemblage de l'actine. Elle se lie au complexe Arp2/3, un

nucléateur qui permet la polymérisation des filaments d'actine dans la cellule (Goley and Welch, 2006). De ce fait, la cortactine est une composante critique des invadopodes et est essentielle pour l'invasion de la matrice (Bryce et al., 2005; Rothschild et al., 2006; Weaver, 2006).

Les fonctions de dégradation de l'invadopode sont assurées par une vaste gamme de protéases. Les protéases membranaires associées aux invadopodes comprennent la MT1-MMP, la séprase, la dipeptidyl depeptidase IV et les métalloprotéases de la famille ADAM. Des protéases sont également sécrétées et activées aux sites d'invadopodes, telles que la MMP2 et la MMP9. La MT1-MMP et la séprase ciblent les macromolécules de l'ECM telles que le collagène, la fibronectine et les laminines (Monsky et al., 1994; Nakahara et al., 1997).

Tableau 3. Protéines impliquées dans les fonctions et la formation des invadopodes

Catégorie	Protéines	Références
Protéases	MMP2 MMP9 MMP13 MT1-MMP	(Chen and Wang, 1999; Monsky et al., 1993; Monsky et al., 1994; Vishnubhotla et al., 2007)
Protéines du cytosquelette et protéines régulatrices	F-actine Arp2/3 N-WASP Cortactine Rac Cdc42 WIP Cofiline	(Bowden et al., 1999; Garcia et al., 2012; Nakahara et al., 2003; Yamaguchi et al., 2005)
Kinases/protéines d'échafaudage	Src FAK p130cas	(Chen, 1989; Hauck et al., 2002)
Intégrines	$\alpha 5\beta 1$ $\alpha 6\beta 1$ $\alpha 2\beta 1$ $\alpha 3\beta 1$ $\alpha V\beta 3$ $\alpha V\beta 5$	(Mueller and Chen, 1991; Mueller et al., 1992; Takkunen et al., 2010)

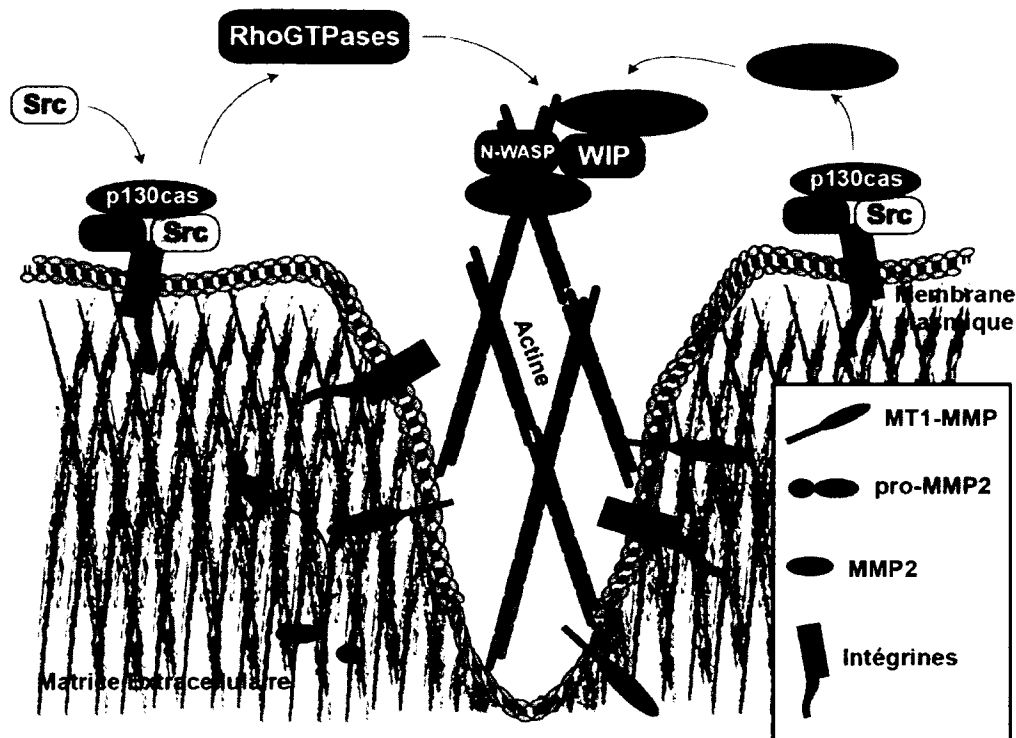


Figure (Intro) 5. Schématisation de la structure et des composants des invadopodes

Les invadopodes sont des protrusions riches en actine qui émanent de la surface ventrale de la cellule. La formation de l'invadopode est initiée par l'engagement des intégrines par l'ECM et une activation des protéines kinases telles que Src et FAK. L'activation subséquente de Rho GTPases mène à la formation du complexe de nucléation de l'actine coordonnée par la cortactine et la synthèse de nouveaux filaments d'actine qui poussent la membrane cellulaire dans l'ECM. La biosynthèse et la sécrétion focalisée de métalloprotéases de la matrice aux sites de formation de l'invadopode assurent ses fonctions de dégradation de l'ECM.

Routage membranaire dans la formation des invadopodes

Étant donné la nécessité de rassembler plusieurs protéines aux sites de dégradation, l'initiation et la formation des invadopodes nécessitent le recrutement rapide et précis des composantes structurelles et des régulateurs de l'invadopode. Par exemple, les intégrines peuvent jouer un rôle de support pour recruter des métalloprotéases de la matrice aux sites d'invadopodes afin d'assurer les fonctions immédiates de dégradation (Baciu et al., 2003; Galvez et al., 2002). Malgré tout, un rôle important de la voie de sécrétion assure le prolongement et la continuation de la dégradation de l'ECM aux sites d'invadopodes.

Celle-ci nécessite un transport actif des protéases du Golgi vers les sites de dégradation de l'ECM. Certaines évidences supportent le rôle du transport actif dans la formation de l'invadopode. Premièrement, le complexe du Golgi est souvent à proximité et orienté vers les invadopodes (Baldassarre et al., 2003). De plus, la progression de la dégradation de l'ECM par l'invadopode est bloquée de façon efficace par la Brefeldine A, un inhibiteur intracellulaire de la voie de sécrétion (Fujiwara et al., 1988). Finalement, la cortactine, une protéine essentielle à la formation de l'invadopode, promeut la sécrétion de la MMP2 et MMP9 et le routage focalisé de la MT1-MMP aux sites de dégradation de l'invadopode (Clark et al., 2007). Ainsi, la coordination de plusieurs événements dans la voie de sécrétion assure la formation et les fonctions de dégradation de l'invadopode.

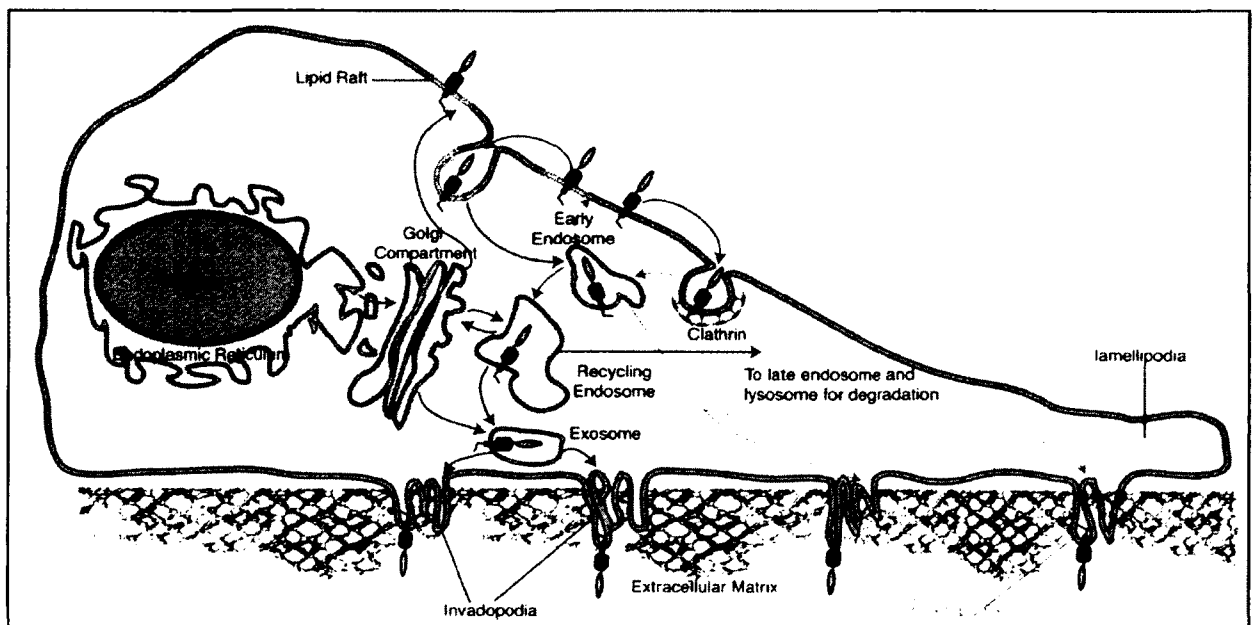


Figure (Intro) 6. Le routage intracellulaire et la formation des invadopodes

Modèle hypothétique de l'implication de la voie de biosynthèse/sécrétion et des voies de recyclage dans la formation des invadopodes. La MT1-MMP est synthétisée dans le réticulum endoplasmique et clivée par la furine dans le réseau du trans-Golgi (TGN) avant d'être transportée à la membrane plasmique. Suivant l'adhésion à l'ECM et l'activation des intégrines, l'invadopode est formé. La sécrétion polarisée de la MT1-MMP des compartiments du Golgi ou des endosomes de recyclage vers les exosomes la dirige aux sites d'invadopodes et assure la protéolyse ciblée de l'ECM. La voie d'endocytose/exocytose est essentielle à la livraison ciblée de la MT1-MMP aux sites d'invadopodes en réponse à divers stimuli tels que l'EGFR et le HGF. Ces facteurs sont des inducteurs de la formation de structures de migration et de protéolyse péricellulaire. Tirée de (Frittoli et al., 2011).

Facteurs initiant la formation des invadopodes

Tel que décrit précédemment, l'activation des intégrines avec l'interaction de l'ECM ainsi que l'activation de la protéine mécano-sensible p130cas, permettent l'initiation de la signalisation menant à la formation des invadopodes. Par contre, plusieurs facteurs environnementaux peuvent également induire et influencer la formation des invadopodes. Différentes études démontrent l'importance de facteurs exogènes tels que des cytokines et des facteurs de croissance. D'autres facteurs environnementaux sont également capables d'initier la formation des invadopodes. Récemment, il a été observé que certaines caractéristiques du microenvironnement tumoral telle que l'hypoxie et le pH entraînent l'activation de diverses voies de signalisation résultant en la formation d'invadopodes (Tableau 5).

Tableau 4. Facteurs initiant la formation des invadopodes

Catégorie	Exemples	Références
Facteurs exogènes	TGF β HGF EGF Autotaxine VEGF	(Harper et al., 2010; Kimura et al., 2010; Lucas et al., 2010; Mandal et al., 2008; Rottiers et al., 2009)
Facteurs environnementaux	Contact cellule-ECM : Activation de l'intégrine β 1 Hypoxie : Activation de NHE-1, production de ROS EMT : induction de TWIST pH extracellulaire acide	(Busco et al., 2010; Destaing et al., 2010; Diaz et al., 2009; Eckert et al., 2011; Lucien et al., 2011; Nakahara et al., 1998)

Ainsi, la compréhension des mécanismes biologiques qui régulent la formation et les fonctions des invadopodes fait l'objet de plusieurs études. Quelques études récentes tentent d'établir un lien entre le microenvironnement tumoral et la formation des invadopodes (Busco et al., 2010; Lucien et al., 2011; Md Hashim et al., 2013), mais des recherches supplémentaires seront nécessaires afin de caractériser les mécanismes régissant l'interaction entre le microenvironnement de la tumeur et la formation des invadopodes.

Malgré le rôle établi de l'invadopode dans la dégradation de la matrice extracellulaire, plusieurs études seront nécessaires afin de mieux caractériser ces structures et établir des cibles thérapeutiques potentielles. Jusqu'à ce jour, la grande majorité des études ont été effectuées dans des modèles *in vitro* et l'implication de ces structures *in vivo* reste à être démontrée.

Les convertases de pro-protéines

La biogenèse de l'invadopode et l'invasion cellulaire nécessitent le recrutement de protéines à des sites localisés et celles-ci doivent être activées afin d'assurer les fonctions de dégradation de l'ECM. Une fois synthétisées, certaines de ces protéines doivent subir un clivage protéolytique dans la voie de sécrétion afin d'être biochimiquement actives et distribuées dans leurs compartiments cellulaires respectifs.

De façon générale, les protéines sécrétées telles que les hormones, les enzymes et les récepteurs, constituent un groupe de molécules biochimiquement actives essentielles aux fonctions cellulaires. La maturation post-traductionnelle de leurs précurseurs, qui se produit par un clivage endoprotéolytique, résulte en la formation de protéines biologiquement actives qui sont sécrétées et dirigées à des sites cibles. Il s'agit d'un mécanisme évolutif par lequel les espèces complexes maintiennent leur homéostasie. Plus du tiers des enzymes protéolytiques sont des protéases de type sérine, nommées ainsi pour le rôle essentiel que la sérine joue au site catalytique (Di Cera, 2009). Une petite famille de protéases de type sérine, les convertases de proprotéines (PCs), joue un rôle clé dans l'activation de pro-protéines impliquées dans des fonctions cellulaires critiques autant chez les humains qu'autres organismes (Artenstein and Opal, 2011; Scamuffa et al., 2006; Seidah, 2011; Taylor et al., 2003). Cette famille comprend sept membres : la convertase de proprotéines subtilisin/kexin de type 1 (PCSK1, anciennement PC1/3), la PCSK2 (PC2), la furine, la PCSK4 (PC4), la PCSK5 (PC5/6), la PCSK6 (PACE4) et la PCSK7 (PC7). Les convertases partagent une structure semblable constituée de différents domaines à fonctions biochimiques distinctes (Molloy et al., 1999) (Figure 7).

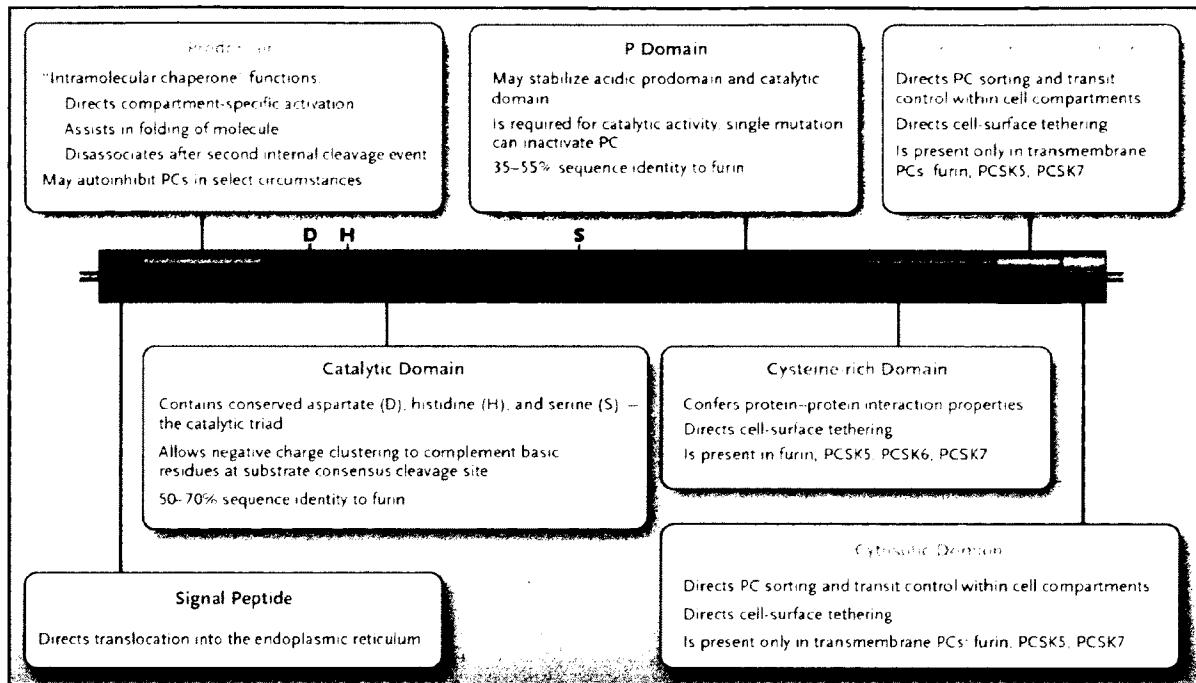


Figure (Intro) 7. Représentation schématique de l'organisation structurale des PCs

Les différents domaines des PCs. Le peptide signal dirige la translocation de la protéine dans le réticulum endoplasmique. Le pro-domaine a un rôle de chaperone, il dirige l'activation de la protéine dans des compartiments spécifiques, assiste au repliement de la protéine et peut également servir de peptide auto-inhibiteur dans certaines circonstances. Le domaine catalytique contient une séquence conservée appelée la triade catalytique (aspartate (D), histidine (H) et sérine (S)). Le domaine P est nécessaire à l'activité du domaine catalytique et peut stabiliser le pro-domaine et le domaine catalytique. Le domaine riche en histidine confère les propriétés d'interaction protéine-protéine et dirige l'ancrage à la surface cellulaire. Le domaine transmembranaire permet la localisation de l'enzyme à la surface membranaire et contrôle la localisation dans les différents compartiments. Finalement, le domaine cytosolique dirige et régule le transport de l'enzyme dans les différents compartiments ainsi qu'à la surface cellulaire. Tirée de (Artenstein and Opal, 2011).

Le concept voulant que les protéines peuvent nécessiter une activation par clivage post-traductionnel d'un précurseur inactif a été initialement démontré par la découverte de la pro-insuline (Steiner et al., 1967). Un quart de siècle plus tard, la découverte de la furine, une endoprotéase de mammifère analogue à l'endoprotéases « subtilisin-like kexin » de la levure, a galvanisé la recherche pour d'autres PCs et leurs substrats (van de Ven et al., 1990). Depuis ce temps, il a été démontré que ces enzymes jouent un rôle important dans l'homéostasie chez l'humain, ainsi que dans divers états physiopathologiques, incluant

l'endocrinopathie, le cancer, les maladies infectieuses, l'athérosclérose et les maladies neurodégénératives. Elles représentent ainsi des cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de nombreuses maladies. De plus, l'expression des PCs pourrait servir de biomarqueur pour certains cancers. Par exemple, l'expression de la furine corrèle avec la progression tumorale dans le cancer des ovaires (Page et al., 2007).

La convertase de pro-protéines furine

La furine est une endoprotéase de type sérine et est une protéine transmembranaire de type I de 794 acides aminés (aa) exprimée de façon ubiquiste chez tous les vertébrés et plusieurs invertébrés (Seidah et al., 1998; Thacker and Rose, 2000). Elle a un pH optimal d'activité protéolytique qui se situe entre 5 et 8, ce qui lui permet de cliver ses substrats dans différents compartiments cellulaires (Brennan and Nakayama, 1994). La furine, comme les autres membres de la famille de PCs, clive de façon typique ses substrats en C-terminal d'une paire d'acides aminés basiques (ex. -Lys-Arg-X, Arg-Arg-X). De façon plus spécifique, la furine nécessite une arginine supplémentaire (Arg-X-Lys/Arg-Arg-X) afin de cliver efficacement son substrat (Hosaka et al., 1991). Son expression ubiquiste et sa capacité d'être enzymatiquement active dans différents compartiments cellulaires en font une protéase avec un large spectre de substrats (Tableau 6).

Tableau 5. Liste partielle de pro-protéines clivées par la furine

Catégories	Exemples
Protéines sériques	Pro-albumine Pro-facteur IX Pro-protéine-C Pro-facteur-von-Willebrand
Hormones et facteurs de croissances	Pro- β -NGF Pro-BMP4 Pro-BNP Pro-hormone parathyroïde Pro-semaphorine D Pro-TGF β 1
Récepteurs membranaires	Pro-récepteur de l'insuline Pro-récepteur Notch-1 Pro-récepteur de la vitamine B12
Chaperones	Pro-7B2
Protéines de l'ECM	Pro-BMP-1 Pro-MT1-MMP Chaîne α des intégrines Pro-fibrilline Pro-stromelysine
Toxines Bactériennes	Toxine PA de l'anthrax α -toxine de Clostridium septicum toxine diphtérique exotoxine A de Pseudomonas Toxine Shiga
Protéines virales	Influenza aviaire HA Cytomegalovirus gB Virus Epstein-Barr gB Gp160 du HIV Enveloppe du virus du sarcome Rous

Adapté de (Molloy et al., 1999)

Localisation intracellulaire de la furine

La furine est localisée principalement au réseau trans-Golgi (TGN), une structure qui est responsable de la sécrétion dirigée de protéines à leur destination finale, incluant la surface cellulaire, les endosomes, les lysosomes et les granules sécrétoires (Griffiths and Simons, 1986; Gu et al., 2001). Du TGN, la furine suit un itinéraire hautement régulé qui implique les endosomes et la surface cellulaire (Molloy et al., 1999). Cet itinéraire explique en partie la capacité de la furine à maturer un large éventail de substrats *in vivo*.

Régulation du routage intracellulaire de la furine

La localisation au TGN et le recyclage de la furine sont contrôlés par une séquence de 56 aa située dans son domaine cytoplasmique (figure 8).

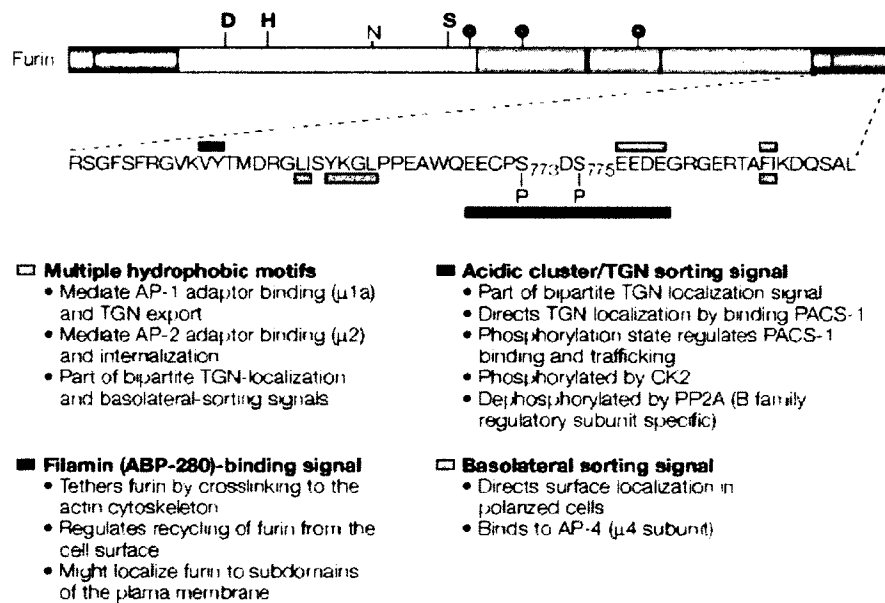


Figure (Intro) 8. Motifs de signalisation dans le domaine cytoplasmique de la furine

Les motifs hydrophobes contrôlent la liaison à la sous-unité μ 1 de AP-1 pour l'export du TGN, contrôlent la liaison à la sous-unité μ 2 de AP-2 pour l'internalisation, et permettent la localisation au TGN et l'aiguillage basolatéral. Le domaine acide permet la localisation au TGN en permettant la liaison avec PACS-1 selon son état de phosphorylation par la CK-II. Les signaux d'aiguillage basolatéraux permettent de diriger la furine à la surface des cellules polarisées et lient la sous-unité μ 4 de AP-4. Le motif de liaison à la filamine-A permet l'ancrage de la furine au cytosquelette d'actine et régule son recyclage de la surface membranaire. Il pourrait également diriger la furine dans des domaines spécialisés de la membrane plasmique. Tirée de (Thomas, 2002).

La localisation de la furine au TGN requiert un motif de reconnaissance par la caséine-kinase-II (CK-II) (EECPpSDpSEEDE) et un segment contenant deux motifs hydrophobes soit le YKGL et le LI (Bosshart et al., 1994; Jones et al., 1995; Molloy et al., 1994; Schafer et al., 1995; Takahashi et al., 1995). Le segment hydrophobe est nécessaire au bourgeonnement de la furine du TGN vers les endosomes et le motif CK-II dirige le retour de la furine des endosomes vers le TGN (Wan et al., 1998). On connaît peu de choses des mécanismes impliqués dans le bourgeonnement de la furine du TGN vers les endosomes. Il a été démontré que la furine se localise aux puits de clathrine du TGN et que les motifs YKGL et LI lient la molécule adaptatrice AP-1 (Teuchert et al., 1999b). Inversement, le retour de la furine des endosomes vers le TGN est assuré par le motif CK-II qui lie PACS-1 (*phosphofurin acidic cluster sorting protein-1*), un connecteur qui lie la furine à AP-1 (Crump et al., 2001; Wan et al., 1998). Plusieurs motifs impliqués dans la localisation de la furine au TGN dirigent également son itinéraire endocytaire. L'endocytose est principalement régulée par le motif YKGL qui lie la sous-unité $\mu 2$ de l'adaptateur AP-2 (Teuchert et al., 1999b). Le recrutement de la furine à la membrane plasmique est régulé par le motif VY qui lie la filamine-A, une protéine corticale impliquée dans la locomotion cellulaire et la signalisation (Stossel et al., 2001). Lorsqu'elle est localisée aux endosomes précoces, la furine peut être recyclée à la membrane plasmique ou redirigée vers le TGN. Le recyclage à la membrane plasmique nécessite la phosphorylation par la CK-II, et le transport vers le TGN requiert une déphosphorylation par la protéine phosphatase 2A (PP2A) (Molloy et al., 1998). Ainsi, PACS-1 et CK-II dirigent la furine dans une des deux voies de recyclage TGN-endosomes et endosomes-membrane plasmique. Le routage entre ces 2 boucles de recyclage nécessite l'intervention de la PP2A.

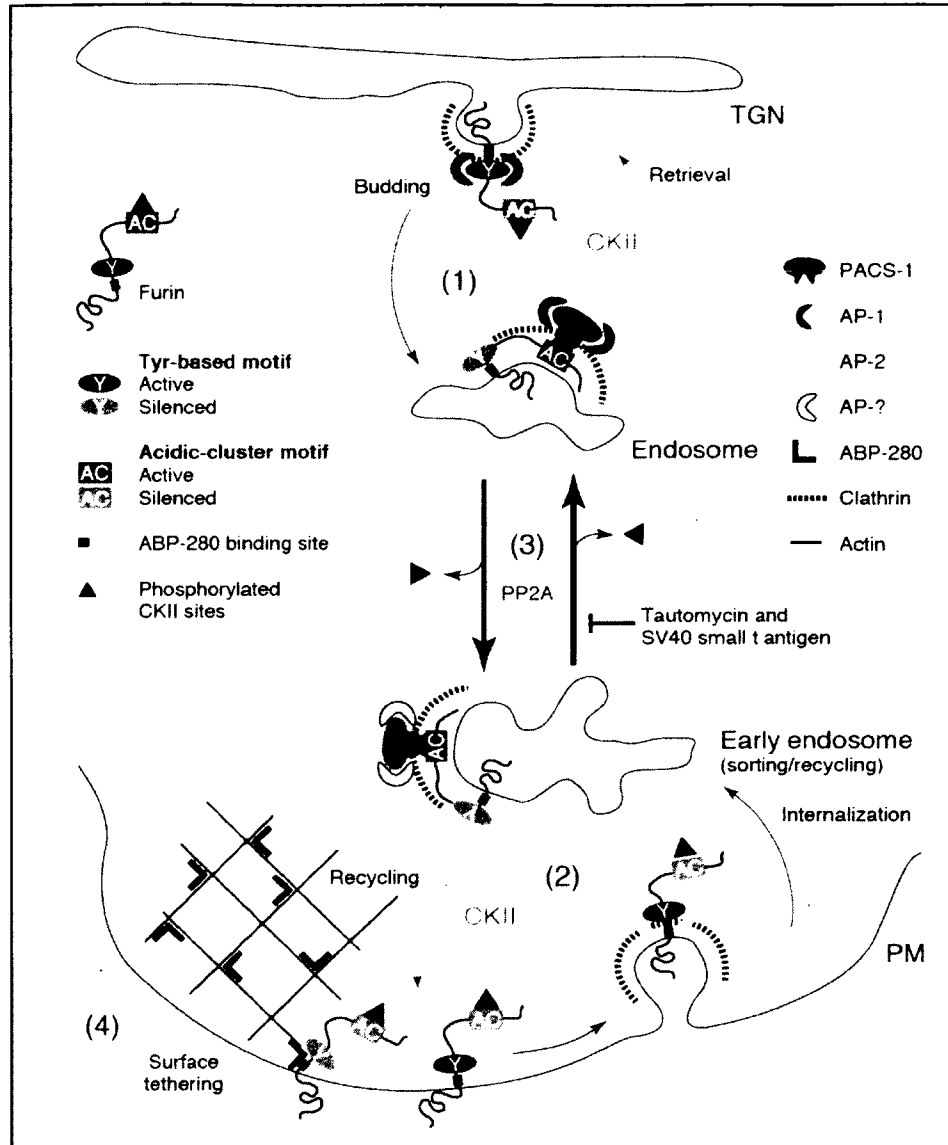


Figure (Intro) 9. Modèle de régulation du routage intracellulaire de la furine

(1) Boucle de recyclage du TGN. Le bourgeonnement de la furine à un compartiment endosomal est contrôlé par des motifs hydrophobiques qui lient l'adaptateur pour la clathrine AP-1. Le motif dileucine et phenylalanine joue également un rôle. (2) Boucle de recyclage membrane cellulaire et endosomes. L'internalisation dépendante de la clathrine est contrôlée par les motifs hydrophobiques qui lient AP-2. Une fois dans les endosomes, la furine phosphorylée par la CK-II est redirigée vers la membrane plasmique d'une façon dépendante de PACS-1. (3) Le routage entre les deux voies de recyclage. La furine qui est déphosphorylée dans les endosomes par la PP2A est redirigée vers le TGN. La PP2A pourrait également permettre de diriger la furine du TGN vers la périphérie cellulaire. Tirée de (Molloy et al., 1999).

Implication de la furine dans le cancer

Plusieurs évidences indiquent que la furine est surexprimée dans différents types de cancer tels que le cancer de la tête et du cou, du poumon et le cancer du sein. On propose même une valeur pronostique à l'expression de la furine dans les tumeurs. En effet, les niveaux d'expression d'ARNm et protéiques de la furine corrèlent avec l'agressivité et la capacité invasive de lignées cellulaires tumorales (Bassi et al., 2001; Cheng et al., 1997; Schalken et al., 1987). Des études *in vivo* récentes démontrent que l'inhibition sélective de la convertase de proprotéines furine diminue le potentiel métastatique des cellules cancéreuses du colon (Scamuffa et al., 2008). Ainsi, de nombreux efforts sont présentement consacrés au développement d'inhibiteurs pharmacologiques sélectifs de la furine afin d'inhiber la progression tumorale (Basak et al., 2009; Becker et al., 2010; Coppola et al., 2008; Komiyama et al., 2009).

L'importance de la furine dans le cancer est mise en évidence par son implication dans différentes étapes de la tumorigenèse (Bassi et al., 2005; Bassi et al., 2000; Thomas, 2002). La furine est essentielle autant dans la pathogenèse de la transformation néoplasique, la prolifération, l'invasion et la formation des métastases. La capacité de la furine à se retrouver dans différents compartiments intracellulaires favorise son interaction avec différents types de substrats impliqués dans ces processus (Thomas, 2002). Par exemple, des facteurs de croissance, des récepteurs, des métalloprotéases et des molécules d'adhésion sont connus pour être impliqués dans différents mécanismes menant à la formation de métastases (Bassi et al., 2005).

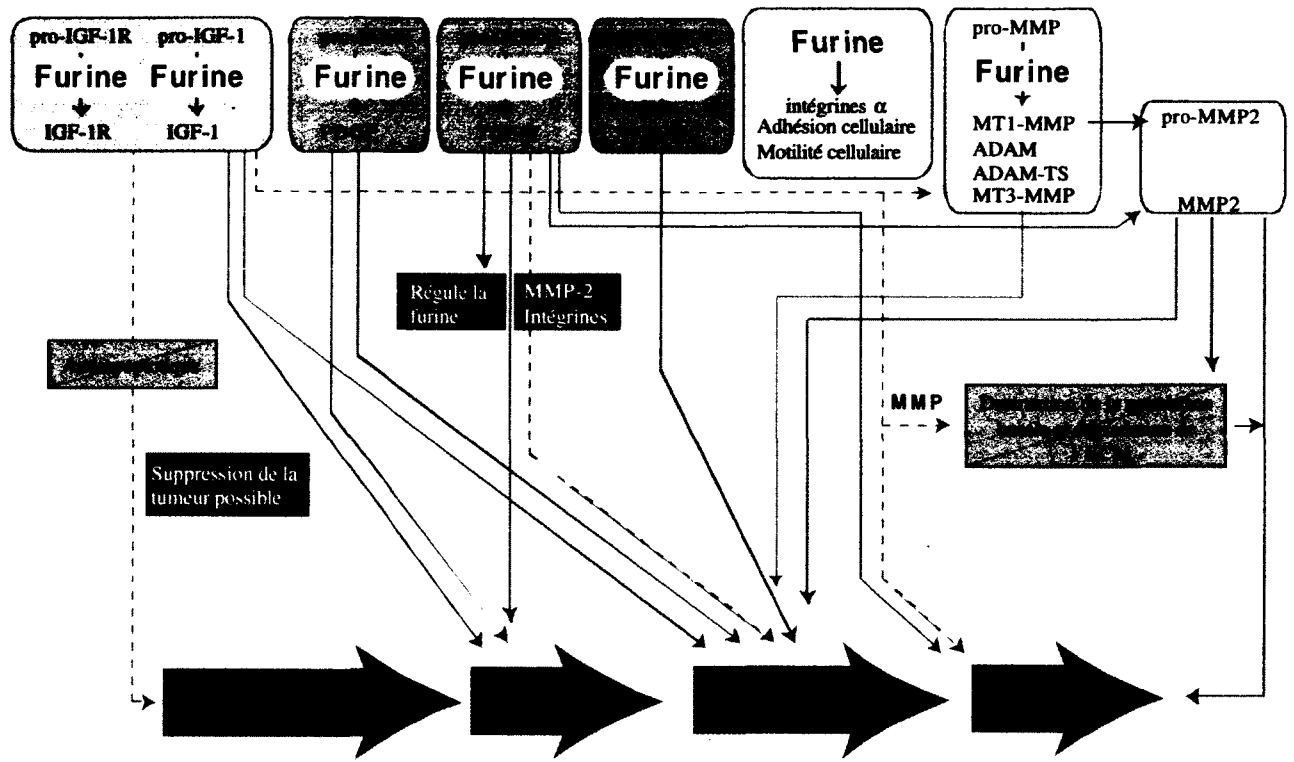


Figure (Intro) 10. Implication de la furine (PCs) dans la pathogénèse du cancer

La localisation cellulaire de la furine dans les différents compartiments lui permet d'être en contact avec différents substrats tumorigéniques : par exemple, des facteurs de croissance et leurs récepteurs tels que l'IGF-R, le PDGF et le TGF β qui sont impliqués dans l'acquisition du phénotype tumoral, la prolifération et l'invasion. Des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, des intégrines impliquées dans l'invasion et la migration cellulaire et des métalloprotéases de la matrice nécessaires à la dégradation de l'ECM et à la formation des métastases. Tirée de (Artenstein and Opal, 2011)

La furine et l'hypoxie

Le microenvironnement hypoxique de la tumeur a une influence directe sur l'expression de la furine (McMahon et al., 2005). Dans notre laboratoire, il a été démontré que le promoteur du gène de la furine contient des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) permettant au facteur de transcription HIF-1 de réguler et d'augmenter son expression en hypoxie (McMahon et al., 2005). Conséquemment, l'activité protéolytique de la furine est augmentée et s'en suit une activation accrue de substrats tumorigéniques tels que la MT1-MMP, le TGF β 1, le VEGF et l'IGFR-1R.

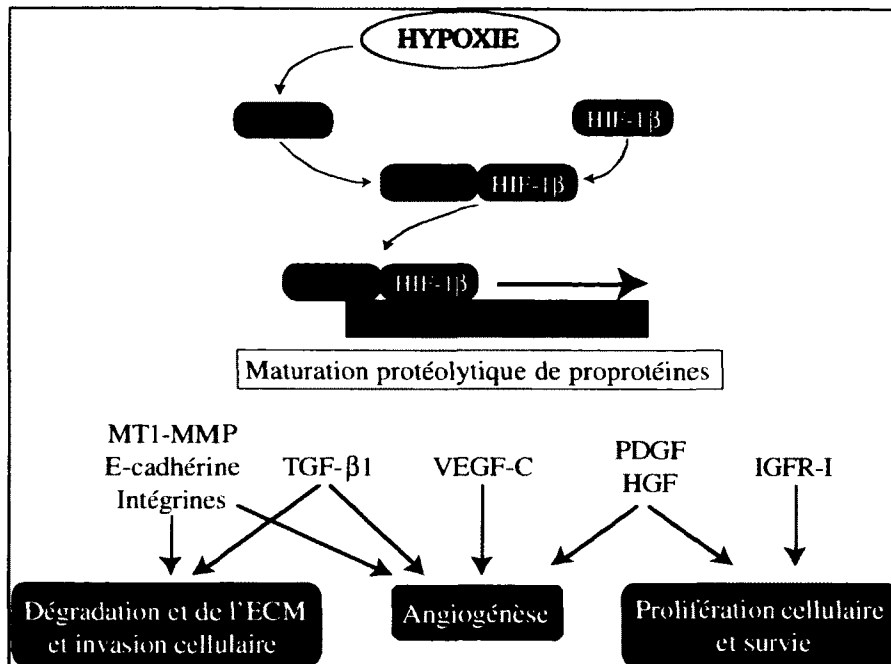


Figure (Intro) 11. Régulation hypoxique de la furine et impact sur la tumorigénèse

La sous-unité HIF-1 α est stabilisée en hypoxie et permet la formation du complexe HIF-1 α/β . Ce complexe se lie au promoteur HRE de la furine et son expression est augmentée. La surexpression de la furine augmente son activité de maturation protéolytique globale et permet l'activation accrue de pro-protéines tumorigéniques. L'activation de ces facteurs va mener à la progression tumorale en favorisant l'invasion cellulaire, l'angiogénèse, la prolifération et la survie cellulaire. Adaptée de (McMahon et al., 2003)

Activité potentielle de la furine en périphérie cellulaire

Malgré que la localisation cellulaire prédominante de la furine se situe au TGN, environ 5% de la totalité de la furine se retrouve au niveau de la membrane plasmique. Comme nous l'avons vu précédemment, la furine peut se retrouver dans deux boucles de recyclages : l'une entre le TGN et les endosomes, et la suivante entre la membrane plasmique et les endosomes de recyclage. Malgré sa faible quantité en périphérie cellulaire, plusieurs évidences laissent présager une importance significative de la furine membranaire dans l'invasion des cellules cancéreuses. Une première observation consiste en son interaction avec la MT1-MMP. En effet, plusieurs groupes ont démontré que la pro-MT1-MMP, un substrat de la furine, est localisée à la membrane plasmique de lignées cellulaires tumorales (Sternlicht and Werb, 2001). De plus, la présence de la MT1-MMP dans les radeaux lipidiques est un mécanisme permettant les interactions entre la protéine et l'ECM

(Wang et al., 2009a). Mayer et ses collègues ont démontré que la furine interagissait avec la MT1-MMP et l'intégrine αV dans des régions spécialisées de la membrane plasmique de cellules de rein (Mayer et al., 2003). Une autre observation de l'importance potentielle de la furine membranaire découle de son interaction avec les intégrines. La furine contient un motif RGD dans son domaine P capable de lier les intégrines (Lusson et al., 1997). Elle interagit avec l'intégrine αV dans des domaines spécialisés (Mayer et al., 2003), et l'association des intégrines aux radeaux lipidiques est un mécanisme important pour leur activation. Ainsi, la capacité de la furine à se retrouver dans des régions membranaires où l'on retrouve la MT1-MMP et les intégrines pourrait permettre une activation de ses substrats directement à la membrane plasmique ou dans la voie de sécrétion qui achemine les substrats de la furine à la membrane plasmique. Tout récemment, l'activité membranaire de la furine a été mise en évidence. L'étude a démontré que la furine forme un complexe de maturation à la membrane plasmique en s'associant avec la protéine Cripto pour permettre la maturation et l'activation de la protéine Nodal, un membre de la famille du TGF β (Blanchet et al., 2008). Il est donc pertinent de proposer que d'autres pro-protéines, membres ou non-membres de la famille du TGF β , peuvent être clivées par la furine dans des complexes membranaires similaires à ceux impliquant Cripto ou dans la voie de sécrétion.

Le « Transforming Growth Factor β » (TGF β)

Le TGF β est le prototype d'une famille de facteurs de croissance sécrétés. Plus de 33 gènes reliés au TGF β ont été identifiés dans le génome des mammifères. Ceux-ci comprennent les BMPs, les activines/inhibines, nodal et l'hormone anti-Mullerian. Le TGF β joue un rôle essentiel dans le développement durant l'embryogenèse et est crucial pour l'homéostasie des tissus. Il contrôle la prolifération, la différenciation, l'apoptose, l'adhésion cellulaire et l'invasion (Heldin et al., 2009; Ikushima and Miyazono, 2010; Massague, 2008; Yang et al., 2010). Conséquemment, un mauvais fonctionnement de sa signalisation et/ou de l'inactivation de composantes de ses voies de signalisation sont centraux à plusieurs pathologies incluant le développement de la tumorigenèse et la progression tumorale.

Le TGF β et le cancer

Des mutations dans les composantes centrales du TGF β , c'est-à-dire les récepteurs du TGF β ainsi que les protéines de transduction du signal telles que les Smads, ont été observées dans plusieurs types de cancer humain (Levy and Hill, 2006). Ces observations suggèrent que le TGF β joue un rôle de suppresseur de tumeur, et que le contournement de ses voies de signalisation mène à la tumorigenèse. Ainsi, grâce son rôle de suppresseur de la prolifération, le TGF β a été perçu comme étant une cytokine potentiellement intéressante pour le traitement du cancer. Cependant, des analyses de tissus cancéreux humains suggèrent un rôle de promoteur tumoral du TGF β dans le cancer (Gambichler et al., 2007). Au fait, les immuno-marquages du TGF β corrèlent avec la formation de métastases chez les cancers du colon, du sein et de la prostate (Friedman et al., 1995; Walker and Dearing, 1992; Wikstrom et al., 1998). De plus, le TGF β augmente la motilité et l'invasion de certaines cellules cancéreuses (Ten Dijke et al., 2002). Ainsi, la dualité entre les fonctions anti-tumorales et pro-tumorales varie selon le stade de la tumorigenèse. Dans les stade précoces, les effets inhibiteurs du TGF β sur la prolifération seraient médiés via la baisse d'expression de c-myc et une augmentation de l'expression des inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines (CDK) tels que p15, p21 et p27 (Datto et al., 1995; Hannon and Beach, 1994; Mulder et al., 1990). De plus, le TGF β exerce également ses effets anti-prolifératifs via son influence dans le sentier de signalisation pro-apoptotique en modulant à la hausse des protéines pro-apoptotiques telles que BAX et PUMA et en réprimant l'expression de BCL-2 et BCL-xL (Elliott and Blobel, 2005). Dans un stade plus avancé de la tumorigenèse, les tumeurs acquièrent généralement une résistance aux effets suppresseurs de tumeur du TGF β via des altérations au niveau des médiateurs de la réponse de cette cytokine. À titre d'exemple, l'inhibition de la voie des Smads suite à l'activation des voies de signalisation PI3K et Raf par le TGF β protège contre les effets pro-apoptotiques et anti-prolifératifs du TGF β (Chen et al., 1998; Lehmann et al., 2000). De plus, l'expression à la baisse des récepteurs du TGF β a également été observée dans différents types de cancers ainsi que des mutations qui inhibent l'activité kinase des récepteurs du TGF β . Par exemples, des mutations dans le TGF β RII ont été observées dans plusieurs types de cancers (Levy and Hill, 2006). De plus, des mutations qui inactivent des

éléments de la voie de transduction du signal du TGF β en réponse à la cytokine ont également été observées. Par exemple, une mutation dans le locus 18q21 qui encode pour Smad4 est présente dans 90% des cas de cancer pancréatique et cette mutation confère un avantage prolifératif aux cellules pancréatiques et à l'initiation de la tumeur (Xu et al., 2000). Outre les événements moléculaire permettant la transition entre les effets anti et pro-tumorigéniques, il est clair que le TGF β confère un avantage relatif au développement des tumeurs via son rôle défini dans l'angiogénèse (Tuxhorn et al., 2002), dans l'évasion de l'immuno-surveillance (Levy and Hill, 2006; Li et al., 2006) ainsi que dans l'induction de l'EMT (Mani et al., 2008). Ainsi, le TGF β joue un rôle bi-fonctionnel dans le cancer, soit un rôle de suppresseur de tumeur dans les stades précoces et un rôle de promoteur de tumeur dans les stades avancés.

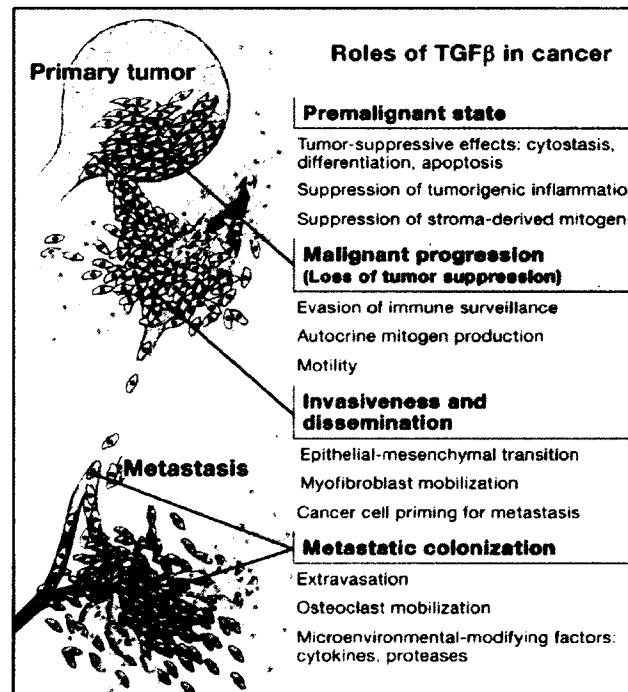


Figure (Intro) 12. Rôles bi-fonctionnels du TGF β dans la progression tumorale

Dans les tumeurs pré-malignes, le TGF β joue un rôle de suppresseur de tumeur. Il contrôle la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Lorsque la tumeur atteint un stage malin, son rôle de suppresseur de tumeur s'inverse et il favorise alors l'évasion de la surveillance immunitaire ainsi que la motilité cellulaire. Il favorise également l'EMT, l'extravasation et promeut la formation des métastases. Tirée de (Sino Biological Inc)

Le TGF β dans l'invasion tumorale

Plusieurs études démontrent l'implication et l'importance du TGF β dans l'invasion tumorale. Le pro-TGF β est un substrat de la furine. L'expression de la furine est augmentée en hypoxie ce qui résulte en une plus grande activité protéolytique. L'hypoxie favorise donc la maturation du pro-TGF β et le TGF β , de façon autocrine, régule la transcription de son gène ce qui génère une boucle d'amplification (Dubois et al., 2001; Dubois et al., 1995). Différentes études ont démontré que le TGF β favorisait l'invasion des cellules du cancer du sein telles que les MCF10A et induit également l'expression de plusieurs métalloprotéases de la matrice telles que la MMP2 et la MMP9 (Chou et al., 2006; Kim et al., 2004; Liu et al., 2005; Safina et al., 2007). De façon intéressante, l'implication du TGF β dans l'invasion cellulaire a été mise en évidence en démontrant que le TGF β induisait la formation des podosomes de cellules endothéliales et des invadopodes dans les cellules cancéreuses (Mandal et al., 2008; Varon et al., 2006).

Activation du TGF β

L'ADNc du TGF β 1 code pour une protéine de 392 aa qui forme un homodimère dont les deux chaînes polypeptidiques sont reliées par des ponts disulfures. La molécule précurseure est clivée en position 279 (suite à un motif di-arginine), par une protéase de type furine (Dubois et al., 1995; Gentry and Nash, 1990). Par analogie avec d'autres substrats clivés par la furine, on croit que ce processus se produit au niveau de l'appareil de Golgi (Molloy et al., 1999). Suite au clivage, le fragment C-terminal (aa 280-392), qui constitue le TGF β 1 mature, demeure associé par des interactions non covalentes avec le propeptide N-terminal, également appelé peptide associé à la latence (LAP). La plupart des cellules sécrètent le TGF β latent sous forme d'un complexe plus large, appelé complexe large associé à la latence (LCC). Celui-ci comprend le TGF β mature, le LAP et une glycoprotéine de 120-240 kDa appelée protéine de liaison au TGF β latent (LTBP) (Miyazono et al., 1988). Le LTBP s'associe au LAP durant la sécrétion. Suivant la sécrétion, le LTBP s'intègre à l'ECM et participe à la régulation de la bio-disponibilité du TGF β latent (Taipale et al., 1994). Le processus d'activation du complexe latent implique des protéases normalement exprimées de façon constitutive par les cellules cancéreuses. Par

exemple, les métalloprotéases de la matrice MMP2 et MMP9 ainsi que la plasmine vont dégrader les pro-segments et libérer le dimère actif de TGF β 1 (Karsdal et al., 2002; Lyons et al., 1990; Sato and Rifkin, 1989; Yu and Stamenkovic, 2000). D'autres mécanismes indépendants des protéases ont également été mis en évidence. Par exemple, l'intégrine α V β 6 et la thrombospondine, des protéines de l'ECM exprimées à la surface cellulaire des cellules épithéliales lors de l'inflammation, peuvent induire l'activation du TGF β 1 par des changements conformationnels (Crawford et al., 1998; Munger et al., 1999).

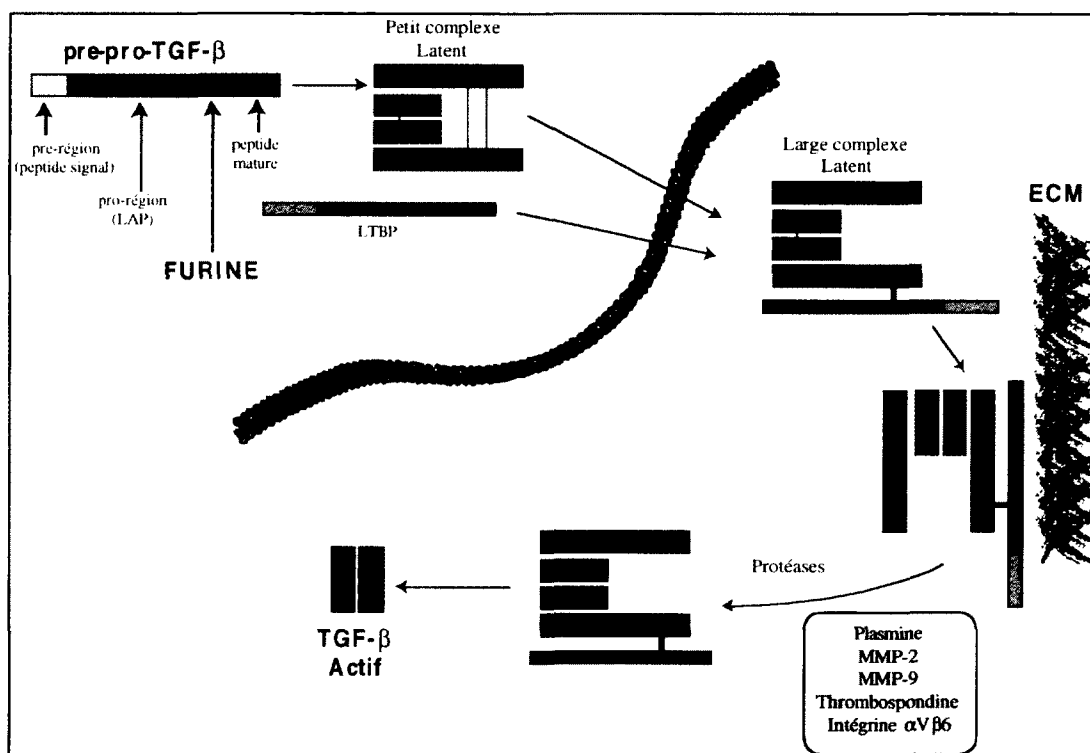


Figure (Intro) 13. Sécrétion et activation du TGF β

Le TGF β est synthétisé sous forme de précurseur protéique qui nécessite un clivage endoprotéolytique par la furine afin de devenir actif. Le TGF β clivé et sécrété sous forme d'un complexe qui comprend le pro-peptide (LAP) et le LTBP. Le complexe sécrété se lie à l'ECM et doit être libéré par des protéases extracellulaires afin de libérer le TGF β actif.

Signalisation du TGF β

Voies canoniques et Smads

Le TGF β se lie à des récepteurs membranaires de type I et II (TGF β R1 et TGF β R2) qui contiennent une activité sérine/thréonine kinase (Feng and Derynck, 2005; Heldin et al., 1997; Shi and Massague, 2003). La liaison du TGF β avec le TGF β R2 entraîne la formation d'un complexe hétérotétramérique avec le TGF β R1, ce qui mène à la phosphorylation du TGF β R1 par le TGF β R2. Le récepteur de type I transmet le signal en recrutant et en phosphorylant les Smads régulateurs (R-Smads) soit le Smad2 et le Smad3. Les Smads activés forment un complexe avec le Smad commun (co-Smad) et transloquent au noyau (Hill, 2009). Puisque les Smads activés ont une faible affinité pour l'ADN, d'autres co-facteurs sont requis afin de former un complexe de liaison spécifique de haute affinité. Parmi ces facteurs, on retrouve le p300/CBP, l'AP-1 et les Ets (Czuwara-Ladykowska et al., 2002; Massague and Wotton, 2000; Nakamura et al., 1976; Zhang and Derynck, 1999). La diversité des combinaisons entre les Smads et les co-facteurs régulent la transcription d'un vaste groupe de gènes cibles (Itoh et al., 2000). Plusieurs évidences soulignent l'importance de la voie canonique dans l'invasion cellulaire et tout particulièrement l'implication de Smad3. Par exemple, l'activation de Smad3 a été associée avec l'invasion cellulaire en contrôlant l'expression de la MMP2 et la MMP9 (Wiercinska et al., 2011). Différentes études lient l'activation de Smad3 avec l'EMT, un évènement associé avec la formation des invadopodes et l'invasion cellulaire (Eckert et al., 2011; Roberts et al., 2006; Takkunen et al., 2010).

Voies non-canoniques du TGF β

Le TGF β emprunte une multitude de voies de signalisation intracellulaires en plus des signaux régulés par les Smads. Ces voies non-canoniques, ou indépendantes des Smads, sont activées directement lorsque le ligand interagit avec le récepteur et permet de renforcer, d'atténuer ou de moduler différentes réponses cellulaires (Zhang, 2009). Une première voie de signalisation indépendante des Smads est le sentier d'activation impliquant Erk. Le TGF β RII peut s'autophosphoryler sur trois résidus tyrosines (Y259,

Y336 et Y424) (Lawler et al., 1997). De plus, Src peut également phosphoryler le TGF β RII sur la tyrosine 284 (Gallier and Schiemann, 2007). Une étude a également démontré que le TGF β RI pouvait être phosphorylé sur des résidus tyrosines mais le mécanisme n'est pas défini (Lee et al., 2007). Ainsi, les tyrosines phosphorylées permettent le recrutement d'un complexe de GTPases comprenant Grb2/SOS qui active Erk1/2 par l'intermédiaire de Ras, Raf et des kinases MEK1/2. Par la suite, les Erk1/2 phosphorylées par les MEK1/2, régulent la transcription de différents gènes (Mulder, 2000). Deuxièmement, les récepteurs phosphorylés du TGF β peuvent interagir avec TRAF6 et permettre le recrutement de la kinase TAK1 qui peut par la suite activer la signalisation menant à l'activation des kinases JNK et p38. Des études démontrent également que la GTPase RhoA peut être activée par les récepteurs du TGF β et induire la formation de fibres de stress lors de l'EMT (Bhowmick et al., 2001; Tavares et al., 2006). Finalement, le TGF β peut activer la PI3K et conséquemment Akt pour contrôler les réponses traductionnelles par le complexe mTOR/S6K (Zhang, 2009).

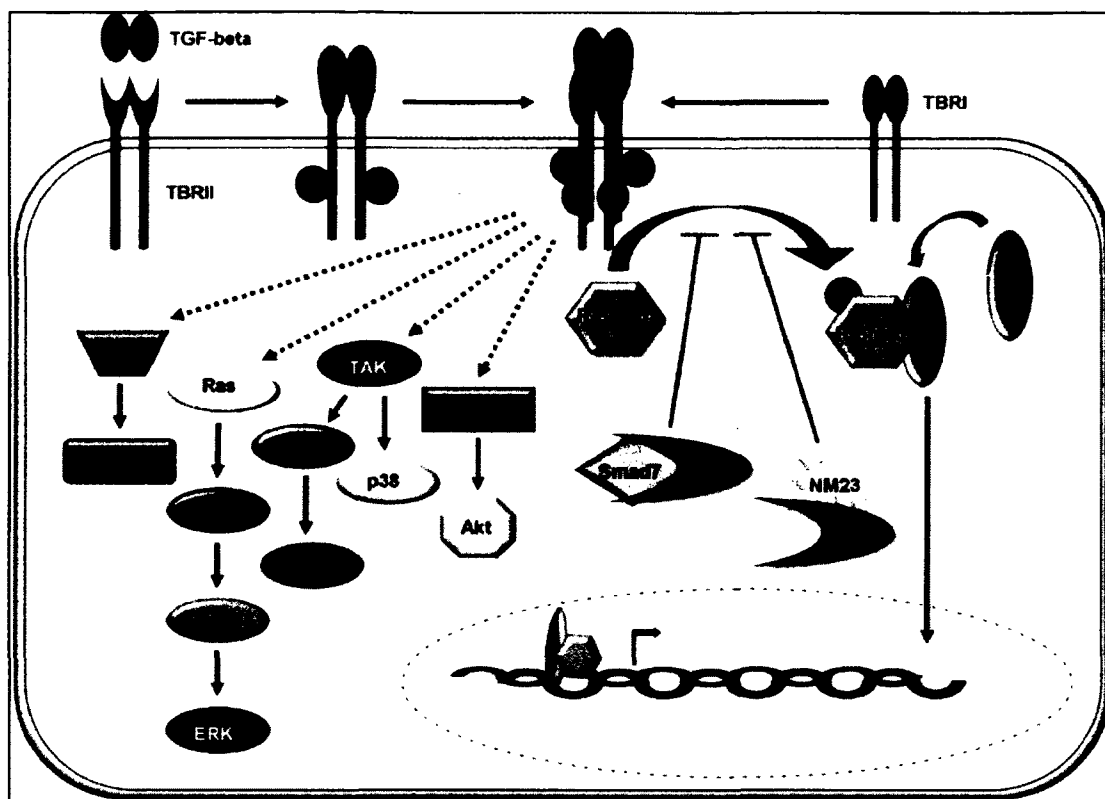


Figure (Intro) 14. Les voies de signalisation du TGF β

La signalisation du TGF β peut être propagée par des voies Smad-dépendantes et indépendantes. Dans la voie Smad-dépendante, le complexe de récepteurs du TGF β phosphoryle les R-Smad, Smad-2 et Smad-3. Les R-Smads phosphorylés s'associent à Smad-4 et transloquent vers le noyau où ils jouent le rôle d'activateur de la transcription et de répresseurs de l'expression génique. Le Smad inhibiteur, Smad-7, inhibe l'activation du R-Smad en s'associant avec le TGF β R1. La protéine de domaine WD40, STRAP, fonctionne aussi comme un inhibiteur de la signalisation dépendante des Smads en s'associant avec le Smad-7 et le TGF β R1. En plus de l'activation des Smads, le complexe du récepteur du TGF β peut induire la signalisation par les voies impliquant Ras, RhoA, TAK1 et PI3K. Tirée de (Reiner and Datta, 2011)

Régulation du pH intracellulaire

Les cellules de mammifères sont hautement compartimentalisées et chaque compartiment, ou organelle, assure des fonctions précises dans la cellule. La compartimentalisation a évolué afin d'assurer des conditions environnementales précises pour les différentes voies métaboliques. Dans ce contexte, les protons ont un rôle crucial. Virtuellement toutes les protéines dépendent du pH pour maintenir leur structure et leurs fonctions. Ainsi, les événements de protonation et de déprotonation dictent la charge biologique qui est importante dans plusieurs réactions métaboliques (Whitten et al., 2005).

Le pH cytosolique

Sous les conditions physiologiques, le pH extracellulaire (pHe) est légèrement alcalin (7.3-7.4) tandis que le pH cytosolique est légèrement plus acide (7.0-7.2) (Pastoriza-Munoz et al., 1987; Wray, 1988). Les réactions métaboliques comme la production d'ATP dans le cytoplasme par la glycolyse et la phosphorylation oxydative dans les mitochondries génèrent des protons qui acidifient le cytosol. Afin de prévenir leur accumulation, les protons doivent être activement exportés du cytosol à travers la membrane plasmique. L'une des familles de protéines impliquées dans le transport de protons à l'extérieur de la cellule est celle des échangeurs cations-alcalins-protons. Ce sont des complexes homodimériques qui transfèrent les protons à travers les membranes biologiques en échange de cations monovalents tels que le Na⁺ et le K⁺ (Casey et al., 2010). Cette famille de protéines comprend les échangeurs Na⁺/H⁺ (NHEs). Neuf membres de cette famille sont décrits à ce jour et seront discutés plus en détails dans la prochaine section. Une autre classe de transporteurs est celle des co-transporteurs de lactate-H⁺ dont font partie les transporteurs de monocarboxylates (MCT). Les MCTs permettent le co-transport du lactate avec un proton (Halestrap and Meredith, 2004). L'accumulation cytosolique de lactate se produit lorsque les tissus passent d'un métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie, comme lors d'épisodes hypoxiques (Perez de Heredia et al., 2010). Une autre catégorie d'échangeurs est celle des transporteurs de bicarbonate. Le microenvironnement tissulaire contient normalement 25mM de HCO³⁻, et les cellules ont développé une stratégie pour utiliser le HCO³⁻ afin de basifier leur cytosol. Dans ce processus, l'acide carbonique est produite et est subséquentement convertie en CO₂ et H₂O par les anhydrases carboniques. Parmi ces transporteurs de HCO³⁻ se retrouvent les transporteurs de HCO³⁻ couplés au Na⁺ (NBCs) qui comptent six membres (Cordat and Casey, 2009). Les NBCs permettent la translocation des Na⁺ et du HCO³⁻ dans la même direction. Finalement, la dernière catégorie de protéines membranaires qui régulent le pH cytosolique est les échangeurs d'anions (AE). Contrairement aux NBCs, les AEs permettent l'échange de Cl⁻ extracellulaire pour exporter du HCO³⁻ intracellulaire vers l'extérieur de la cellule (Romero et al., 2013). Tous ces échangeurs et transporteurs membranaires fonctionnent en collaboration afin de maintenir et réguler l'homéostasie du pH cytosolique de la cellule.

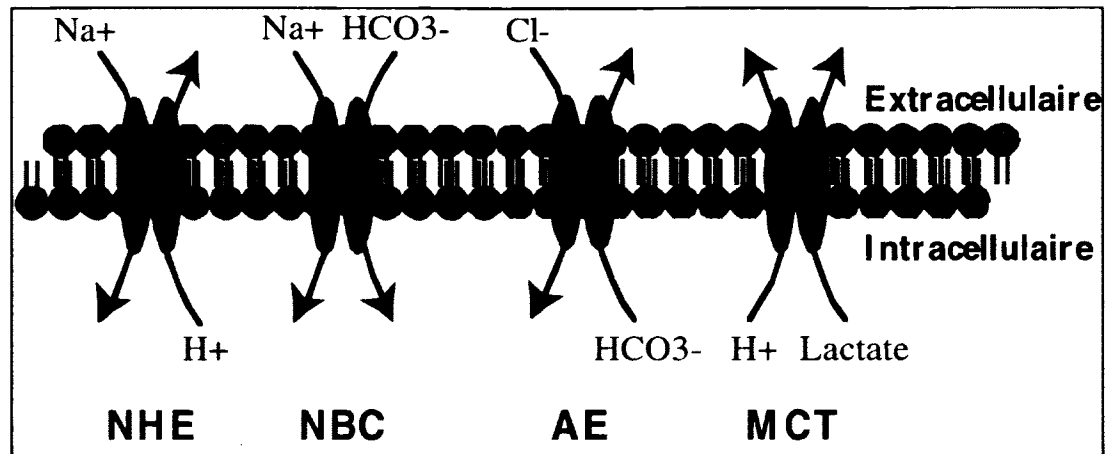


Figure (Intro) 15. Régulation du pH cytosolique par les différents échangeurs/transporteurs membranaires

Le pH cytosolique est hautement régulé grâce à la coopération de différents échangeurs membranaires. Les NHEs permettent en général l'efflux de protons du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule en échange de Na⁺. Les NBCs utilisent le HCO₃³⁻ extracellulaire pour basifier le cytoplasme. Les AEs agissent de façon opposée et permettent la sortie extracellulaire de HCO₃³⁻. Finalement, les MCTs permettent l'efflux de protons intracellulaires produits lors du métabolisme anaérobie.

Le pH dans la voie de sécrétion

Le pH des différentes vésicules de la voie de sécrétion n'est pas homogène (Paroutis et al., 2004). Le pH du réticulum endoplasmique (ER) est neutre, similaire au cytosol, et les compartiments sécrétoires sont de plus en plus acides. Le cis-Golgi est beaucoup plus acide que le ER (pH = 6.7) et l'acidification est plus marquée dans le TGN (pH= 6.0). Le pH des vésicules sécrétoires a été observé à 5.2 (Figure 16)(Paroutis et al., 2004).

Le pH de la voie endocytique

Le matériel endocytique capturé par les cellules progresse dans un environnement croissant en acidité. Les vésicules endocytiques sont les moins acides tandis que les lysosomes peuvent atteindre un pH très acide de 4.5-4.7 (Ohkuma and Poole, 1978). L'acidification luminale progressive est un mécanisme clé dans différents aspects de l'endocytose et de la phagocytose. Par exemple, la libération des ligands de leurs récepteurs (Maeda et al., 2002), l'activation de protéases (Dillon et al., 2012; Williamson et al., 2013),

et d'autres réactions essentielles dépendent des changements de pH dans les compartiments endosomaux (Mellman et al., 1986).

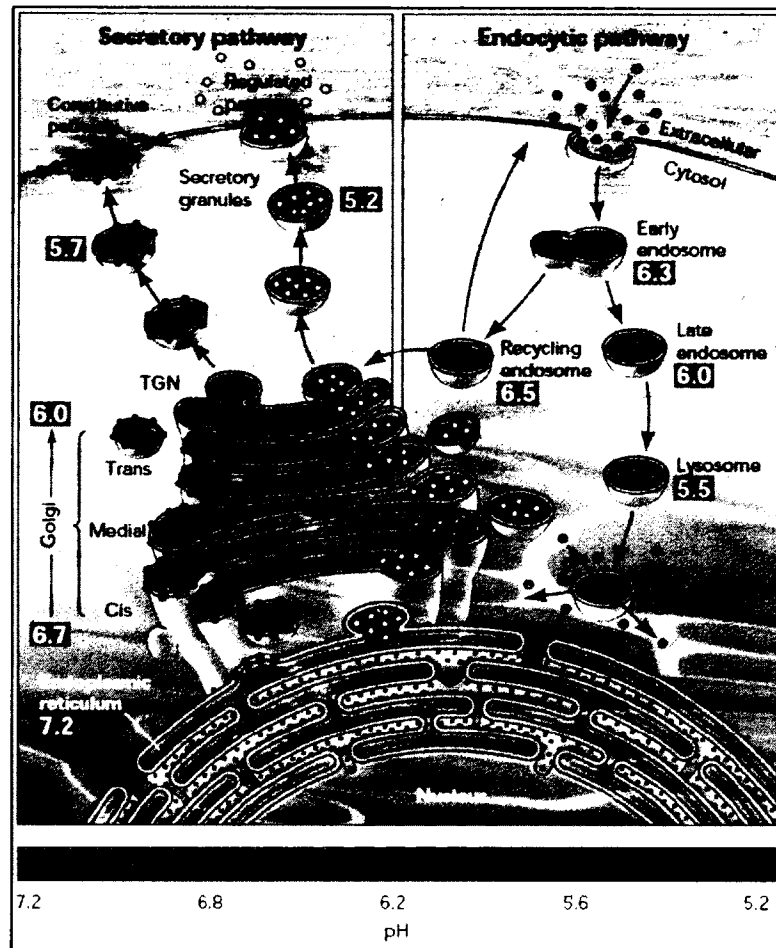


Figure (Intro) 16. Régulation du pH intracellulaire dans les différents compartiments

Variabilité du pH des organites cellulaires et de compartiments intracellulaires dans une cellule de mammifère. De façon générale, dans la voie de sécrétion, les vésicules en périphérie cellulaire ont un pH luminal plus acide. Le pH du TGN est légèrement acide (pH 6.0) tandis que le pH des endosomes et des vésicules sécrétoires est plus acide (pH 5.2-5.7). Dans la voie d'endocytose, le pH des endosomes est également acide et s'acidifie davantage dans les lysosomes. Tirée de (Paroutis et al., 2004)

Régulation du pH intracellulaire et intra-vésiculaire

Le maintien du pH intracellulaire et intra-vésiculaire est d'une importance capitale dans la physiologie cellulaire. De façon générale, l'homéostasie est accomplie par la relation entre différents transporteurs membranaires qui soit importent ou exportent des protons à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule. Les échangeurs Na^+/H^+ de mammifères (NHEs) jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'environnement ionique cellulaire

(Casey et al., 2010; Malo and Fliegel, 2006; Slepko et al., 2007). Les NHEs sont des échangeurs d'ions intégrés à la membrane qui permettent l'échange de H^+ avec le Na^+ ou le K^+ . Tous les NHEs possèdent 12 domaines transmembranaires. La partie N-terminale constitue le domaine de translocation d'ions et la partie C-terminale cytoplasmique joue un rôle important dans la liaison de différentes protéines régulatrices. Jusqu'à ce jour, neuf isoformes de NHE ont été identifiées. Celles-ci démontrent une variabilité dans leur patron d'expression, leur localisation cellulaire, leurs caractéristiques de transport d'ion, leurs propriétés pharmacologiques et leurs mécanismes de régulation (Malo and Fliegel, 2006). Sur la base de leur localisation cellulaire et des analyses phylogéniques, les NHEs sont catégorisés en deux types : les NHEs de la membrane plasmique (NHE1-5) et les NHEs des organites (NHE6-9). De façon générale, les NHEs de la membrane plasmique échangent un H^+ cytoplasmique pour un Na^+ extracellulaire et les NHEs des organites échangent autant le Na^+ que le K^+ pour un H^+ (Bianchini and Poussegur, 1994).

Localisation intracellulaire des NHEs des organites

Les quatre NHEs des organites sont en général exprimés de façon ubiquiste dans les tissus (Numata et al., 1998). NHE6 et NHE9 se localisent aux niveaux des endosomes précoces et des endosomes de recyclage (Brett et al., 2002; Nakamura et al., 2005). NHE7 et NHE8 sont principalement localisés au TGN (NHE7) et au complexe du Golgi médian (NHE8) (Figure 17) (Numata and Orłowski, 2001).

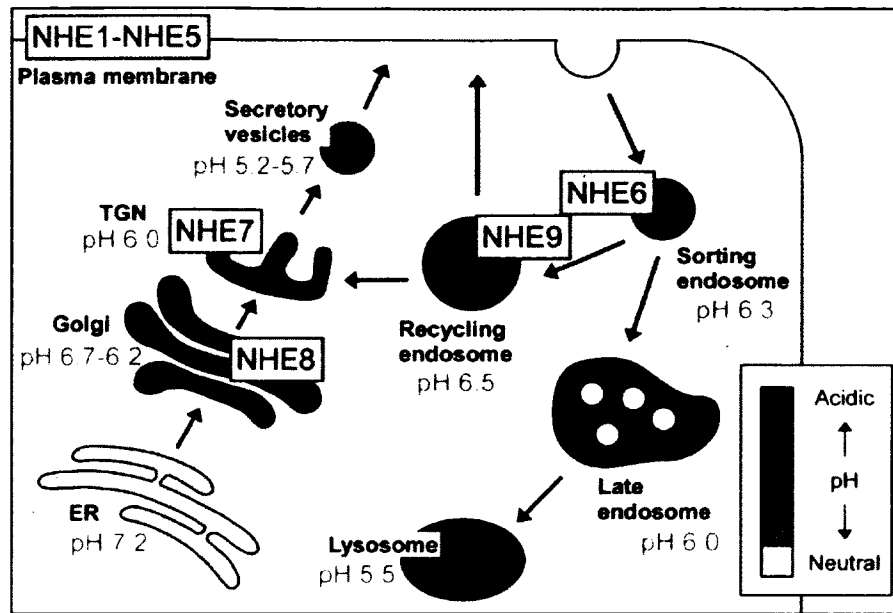


Figure (Intro) 17. Localisation cellulaire des NHEs et le pH

Sur les neuf isoformes de NHE, les NHE1-5 sont principalement localisés à la membrane plasmique, tandis que les NHE6-9 sont aux organites. Le NHE6 et le NHE9 colocalisent dans une certaine mesure aux endosomes de recyclage. Le NHE7 est localisé au TGN et le NHE8 au complexe du Golgi médian. Chaque compartiment intracellulaire est maintenu à un pH acide, ce qui est important pour divers processus biologiques. Tirée de (Ohgaki et al., 2011).

Régulation du pH dans les organites

Les valeurs de pH luminal dans les organites de la voie de sécrétion et dans le sentier endocytique forment un gradient allant de pH 5.0 à pH 7.0 (Demaurex, 2002; Paroutis et al., 2004). Le pH des organites est contrôlé par une balance complexe entre les influx et les efflux de protons à travers la membrane des compartiments. La V-ATPase est le principal responsable de l'acidification des organites (Forgac, 2007; Futai et al., 2000). La V-ATPase est responsable de l'influx de protons à l'intérieur des organites et son activité est dépendante de l'ATP. Inversement, les NHEs sont responsable de l'efflux de protons à l'extérieur de l'organe. Plusieurs études démontrent que l'augmentation de l'expression des NHEs résulte en une basification des organites dans lesquels ils se retrouvent (Nakamura et al., 2005; Ohgaki et al., 2010) et qu'inversement, l'inhibition des NHEs par des siRNA résulte en une acidification de la lumière des organites (Ohgaki et al., 2010; Roxrud et al., 2009) (Figure 18).

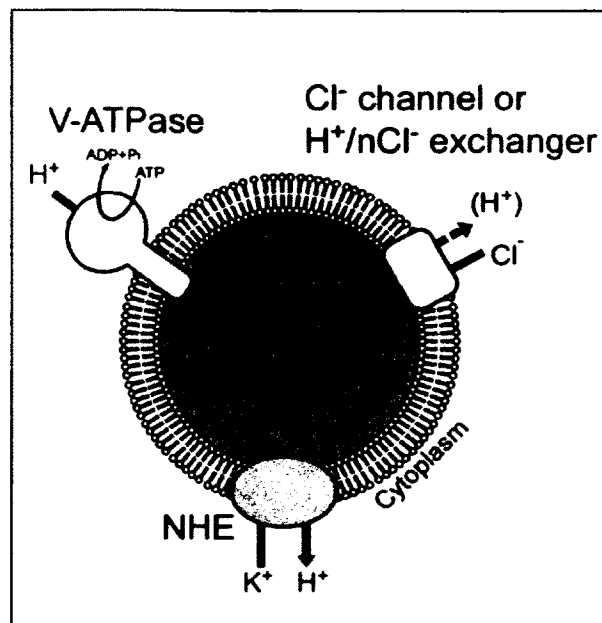


Figure (Intro) 18. Illustration de la régulation du pH des organites

Le maintien d'un pH acide est accompli par les activités soigneusement équilibrées d'influx et d'efflux de protons. La V-ATPase facilite principalement l'acidification des organites par le pompage actif de protons dans la lumière de l'organite. Cette étape d'acidification est favorisée par un flux de contre-anion, soit par des canaux Cl^- ou les échangeurs Cl^-/H^+ . Les NHEs des organites permettent l'efflux de H^+ des organites, par un échange de Na^+ ou K^+ qui sont abondamment présents dans le cytoplasme. Tirée de (Ohgaki et al., 2011).

Hypoxie et pH intracellulaire

Une des conséquences majeures sur les cellules en conditions hypoxiques est le transfert de la respiration cellulaire, dépendante de l'oxygène, à l'activation de la glycolyse anaérobie afin d'assurer l'apport nécessaire en énergie à la cellule, soit l'ATP (Pouyssegur et al., 2006; Semenza, 2003). La glycolyse se déroule dans le cytoplasme et nécessite du glucose et a comme produit le pyruvate. En conditions anaérobiques, ce dernier est métabolisé en lactate qui engendre la production de protons. Pour chaque molécule de glucose métabolisée, deux molécules d'ATP et deux protons sont produits ($\text{glucose} + 2 \text{NAD}^+ + 2 \text{pyruvates} + 2 (\text{NADH} + \text{H}^+)$). Les cellules hypoxiques doivent exporter les protons intracellulaires afin de régulariser le pH intracellulaire. Ainsi, les cellules cancéreuses ont un déséquilibre du pH intra- et extracellulaire. Les cellules normales ont un pH cytoplasmique neutre (6.99-7.2) et un pH extracellulaire basique (7.3-7.4). Dans le cas des cellules cancéreuses, le pH cytoplasmique est basique (7.12-7.65) et le

pH extracellulaire est acide (6.2-6.9) (Lindner and Raghavan, 2009) (Gillies et al., 2002). Un des mécanismes impliqués dans ce débalancement est la surexpression et l'activation constitutive induites par des oncogènes ou par HIF-1 α , en hypoxie, de certains échangeurs ou transporteurs d'ions à la surface cellulaire tels que le NHE-1 et la MCT-4 (Lucien et al., 2011; Ullah et al., 2006). Par conséquent, les protons issus de la glycolyse anaérobie sont systématiquement exportés hors de la cellule et ceux-ci acidifient le milieu extracellulaire tout en basifiant le milieu intracellulaire.

Influence du pH intracellulaire sur la conformation des protéines

Toutes les protéines dépendent du pH pour maintenir leur structure et leur fonction. Un des mécanismes importants dans le maintien structural des protéines implique leur structure primaire. Les protéines sont formées d'une combinaison d'acides aminés (aa) et ceux-ci possèdent des propriétés acido-basiques. Les différents aa possèdent un pHiso différent à pH physiologique, c'est-à-dire un pH auquel la charge globale de l'acide aminé est nulle (Tableau 7). Si le pH physiologique < pHiso, la charge globale de l'aa est positive, car l'aa a tendance à conserver ses protons ou en capter du milieu acide. Inversement, si le pHiso < que le pH physiologique, la charge globale est négative, car l'aa a tendance à céder ses protons au milieu basique (Biochemistry, Donald Voet and Judith G. Voet, 1998, p.61). Il est intéressant de constater que l'histidine a un pHiso de 7.6, donc très près du pH physiologique. Par conséquent, de faibles variations de pH intracellulaire vont mener à la protonation ou à la déprotonation de l'histidine et ainsi influencer la structure de la protéine. Différentes protéines subissent des changements de conformation suite aux variations de pH et ceux-ci sont directement influencés par l'état de protonation des histidines présentes dans leur structure primaire (Dillon et al., 2012; Mueller et al., 2008; Zhang et al., 2013). Ce sont par exemple des protéines d'enveloppe virale lorsqu'elles sont endocytosées, des toxines bactériennes et des protéines transmembranaires et cytoplasmiques de l'hôte (Tableau 8).

Tableau 6. Acides aminés et pHiso à pH physiologique

Groupes		pHiso (pH physiologique 7.4)
Aliphatiques hydrophobes	Glycine	6.0
	Alanine	6.0
	Valine	6.0
	Leucine	6.0
	Isoleucine	6.1
	Proline	6.3
Aromatiques hydrophobes	Phénylalanine	5.5
	Tryptophane	5.9
Amidés	Asparagine	5.4
	Glutamine	5.7
Aromatiques hydroxylés	Tyrosine	5.9
Hydrophiles hydroxylés	Sérine	5.7
	Thréonine	6.5
Soufrés	Cystéine	5.0
	Méthionine	5.8
Dibasiques	Lysine	9.8
	Arginine	10.8
	Histidine	7.6
Diacides	Aspartate	3.0
	Glutamate	3.2

pH physiologique < pHiso : charge positive, conservation des protons

pH physiologique > pHiso : charge négative, perte des protons

Tirée de (<http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/acideamine/acideaminc.htm>)

Tableau 7. Changements conformationnels de protéines influencés par le pH et les histidines

	Exemples	Références
Protéines d'enveloppe virale	Influenza Stomatite vésiculaire Rhabdovirus Alpha virus Flavivirus	(Stiasny and Heinz. 2006; Wengler. 1989; White et al., 1982; Zimmerberg et al., 1993)
Toxines bactériennes	Exotoxine de Pseudomonas A Toxine de l'anthrax Toxine botulique Toxine diphtérique	(Chenal et al., 2002; Koriazova and Montal, 2003; Krantz et al., 2006; Menetrey et al., 2005; Mere et al., 2005)
Protéines de l'hôte	OGR1 V-ATPase Cofiline	(Ludwig et al., 2003; Marshansky, 2007; Oser and Condeelis, 2009)

Présence d'histidines dans le site de maturation du TGF β

Les évènements de protonation/déprotonation causés par les changements de pH peuvent influencer la structure globale des protéines. Ces changements conformationnels peuvent favoriser l'activation des protéines (Dillon et al., 2012), l'accessibilité d'une enzyme pour un substrat (Kim et al., 2010) et également l'affinité d'un ligand à son récepteur (Kelly et al., 2002). De façon intéressante, plusieurs substrats de la furine possèdent des histidines à proximité ou directement au site de reconnaissance dibasique de la furine. Des facteurs de croissance, des métalloprotéases et des intégrines, tous des substrats potentiellement tumorigéniques, présentent des histidines au site de clivage de leur pro-domaine (la position « P » représente la position par rapport au site de reconnaissance di-basique de la furine (Arg-X-X-Arg) où P1 est l'arginine) (Tableau 9).

Tableau 8. Sites de maturation de substrats de la furine et présence d'histidines.

Site(s) de maturation	P6 P5 P4 P3 P2 P1 P'1 P'2
Facteurs de croissance	
PDGF-D	H D R K S K V D
VEGF-C	H S I I R R S L
TGFβ1	S S R H R R A L
BMP-4	H V R I S R S L
BMP-7	H F R S I R S T
NODAL	G K R H R R H H
MT-MMPs	
MT3-MMP	H I R R K R Y A
ADAMs	
ADAM17	V H R V K R R A
Intégrines	
Intégrine α4	H V I S K R S T
Intégrine α5	H H Q Q K R E A
Intégrine α8	H L V R K R D V
Intégrine αV	H L I T K R D L

*Position P1 P2 P3 P4 représente le site dibasique de reconnaissance minimale par la furine (R-X-X-R)

La présence d'une histidine à la position P3 (dans le site de reconnaissance de la furine) et à la position P9 (distant du site de reconnaissance de la furine) du TGFβ chez différentes espèces suggère un rôle important de cet acide aminé dans l'évolution (Tableau 10). Étant donné les propriétés physico-chimiques de l'histidine, sa présence au site de maturation du TGFβ1 suggère que l'environnement acide et basique pourrait influencer la capacité de clivage de la pro-protéine par la furine. De ce fait, différentes études ont démontré que la présence d'histidine au site de maturation de substrats de la furine favorisait le clivage de la pro-protéine dans des compartiments acides. Par exemple, une

étude a démontré que la mutation de l'histidine en position P6 de l'intégrine $\alpha 4$ par une alanine diminuait de trois fois sa capacité de maturation par la furine (Bergeron et al., 2003). Une autre étude a démontré que l'histidine en position P6 de la pro-BMP4 était responsable d'un clivage dépendant du pH. À pH neutre, l'histidine déprotonée adopte une conformation qui masque le site de clivage tandis qu'à pH acide, cette conformation est détruite, ce qui permet le clivage par la furine (Degnin et al., 2004). Finalement, une étude récente a démontré que l'alcalinisation du TGN par des drogues lysosomotropiques inhibe la maturation du TGF β 1 (Basque et al., 2008). Ainsi, le microenvironnement acide semble favoriser le clivage de substrats de la furine, dont le TGF β 1, via la protonation d'histidine au site de clivage protéolytique. Ceci suggère donc que la maturation du TGF β aurait lieu dans un compartiment acide et que l'acidification du milieu extracellulaire des cellules cancéreuses pourrait favoriser le clivage du pro-TGF β 1 dans la voie de sécrétion ou dans un complexe protéique situé à la membrane plasmique.

Tableau 9. TGF β 1 et présence d'histidines

Site(s) de maturation	P9	P8	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P'1	P'2
TGFβ1											
Humain	H	L	Q	S	S	R	H	R	R	A	L
Souris	H	L	H	S	S	R	H	R	R	A	L
Rat	H	L	H	S	S	R	H	R	R	A	L
Mouton	H	L	H	S	S	R	H	R	R	A	L
Poisson	H	L	T	S	-	R	K	K	R	S	T
Cochon	H	L	H	S	S	R	H	R	R	A	L

Les histones déacétylases

Historique

Le cancer est considéré comme le résultat d'altérations génétiques et génomiques (Baylin and Jones, 2011; Boubber and Issa, 2011; You and Jones, 2012). Par exemple, des amplifications de gènes, des délétions et des mutations ponctuelles peuvent mener à l'activation d'oncogènes ou à la suppression de gènes suppresseurs de tumeurs (Goetsch et

al., 2013; Katoh et al., 2013). Ainsi, l'expression inappropriée de gènes joue un rôle essentiel lors de la tumorigenèse. Par contre, le développement du cancer ne se restreint pas seulement aux changements génétiques, mais également aux modifications épigénétiques. Les modifications épigénétiques principales sont la méthylation de l'ADN (Shen and Laird, 2013; Suzuki and Bird, 2008) et des modifications post-traductionnelles des histones (Barneda-Zahonero and Parra, 2012; Zentner and Henikoff, 2013). Par exemple, l'hyperméthylation des promoteurs de gènes suppresseurs de tumeurs est une modification qui a été intensivement étudiée durant les dernières années (Estecio and Issa, 2011; Kondo and Issa, 2010).

Il y a plus de 30 ans, Allfrey et ses collègues ont rapporté une forte corrélation entre les niveaux d'acétylation des histones et la surexpression de gènes (Allfrey et al., 1964). Plus récemment, des études ont démontré des motifs aberrants dans la modification des histones lors du développement du cancer. En particulier, l'acétylation des résidus lysines des histones 3 et des histones 4 sont devenues les modifications les plus étudiées à ce jour (Drogaris et al., 2012; Fraga et al., 2005; Kouzarides, 2007).

Rôle des histones déacétylases

Les niveaux d'acétylation de protéines sont le résultat d'une balance entre l'activité des histones acétyl-transférases (HATs) et les histones déacétylases (HDACs). Les HATs transfèrent un groupement acétyle sur les résidus lysines conservés des histones, tandis que les HDACs catalysent le retrait d'un groupement acétyle sur les résidus lysines des histones. La présence de lysines acétylées des histones se traduit par une relaxation locale de la chromatine, donc une accessibilité accrue des facteurs de régulation de l'ADN et une activation de la transcription (Figure 19). À l'opposé, le retrait de groupements acétyles mène à la condensation de la chromatine et la répression de la transcription (Iizuka and Smith, 2003; Johnstone, 2002).

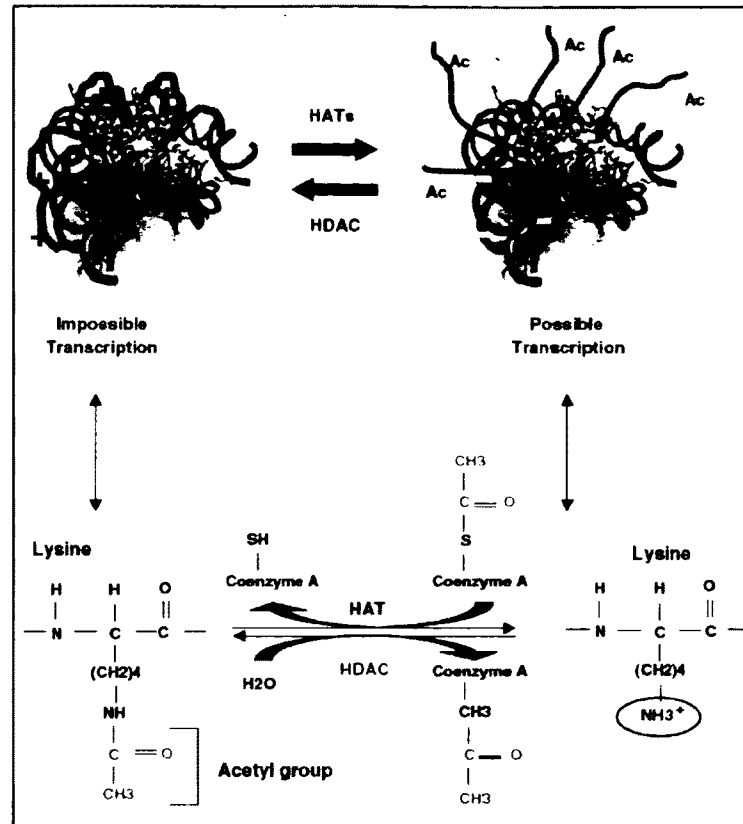


Figure (Intro)19. Modes d'action des HATs et HDACs sur la transcription génique

Les histones acétyl transférase (HATs) transfèrent un groupement acétyle sur les résidus lysines conservés des histones, créant une expansion locale de la chromatine et en une accessibilité accrue des protéines régulatrices de l'ADN qui favorisent une activation de la transcription. D'autre part, les histones déacétylases (HDACs) catalysent le retrait d'un groupement acétyle sur les résidus lysines des histones menant à une condensation de la chromatine et à une répression de la transcription. Tirée de (Mottet and Castronovo, 2008).

L'identification de la première HDAC a été rapportée par Taunton et ses collègues en 1996 (Taunton et al., 1996). Initialement, les HDACs étaient considérées comme des répresseurs transcriptionnels. La déacétylation des histones par les HDACs favorise l'interaction ionique entre les histones positivement chargés et l'ADN négativement chargé, ce qui mène à une structure de la chromatine plus compacte et réprime la transcription en limitant l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle (Kurdistani and Grunstein, 2003; Roth et al., 2001; Struhl, 1998). Par contre, plusieurs évidences indiquent que les HDACs peuvent également activer la transcription (Jin et al., 2013; Sharma et al., 2007; Xu et al., 2003). Le rôle ambivalent des HDACs peut être expliqué par plusieurs mécanismes. Par exemple, un gène peut être transcrit suite à une inactivation dépendante d'une HDAC

agissant sur un gène codant pour un répresseur transcriptionnel. De plus, la déacétylation des histones peut mener au remodelage de la chromatine, ce qui altère le recrutement de répresseurs de la transcription. D'autres études démontrent que les HDACs peuvent réguler l'expression d'un éventail large de gènes par une interaction directe avec des facteurs de transcription tels que E2F, Stat3, p53, NF- κ B et TFIIE (Ashburner et al., 2001; Harms and Chen, 2007; Lin et al., 2006; Yuan et al., 2005). Finalement, les HDACs sont impliquées dans la déacétylation de protéines non-histones, qui régulent des fonctions importantes de l'homéostasie cellulaire. Outre que les facteurs de transcription, celles-ci incluent des médiateurs de transduction du signal, des enzymes de réparation de l'ADN, des régulateurs de l'import nucléaire, des protéines chaperones, des protéines structurales, des médiateurs de l'inflammation et des protéines virales (Tableau 11). Ces substrats des HDACs sont indirectement impliqués dans de nombreuses voies de signalisation cellulaires qui contrôlent l'expression de gènes, la régulation de la prolifération, la différenciation, la migration et la mort cellulaire (Bolden et al., 2013; Marks and Xu, 2009; Minucci and Pelicci, 2006; Reichert et al., 2012).

Tableau 10. Liste partielle des substrats des HDACs autres que les histones

Catégories	Exemples de protéines
Motilité cellulaire	α -tubuline cortactine
Chaperones	Hsp90 Hsp70
Facteurs de transcription et co-régulateurs	GATA1-2-3 p53 p73 E2F1-2-3 BCL-2 Rb
Structure de la chromatine	HMG-A1, B1, B2, N1 et N2 SRY
Récepteurs nucléaires	Récepteur de l'androgène Récepteur de glucocorticoïdes Récepteur α de l'estrogène
Médiateurs de la signalisation	Stat3 Smad7 β -caténine
Réparation de l'ADN	Ku70 WRN
Import nucléaire	Importine- α 7
Médiateurs de l'inflammation	HMGB1
Protéines virale	E1A L-HDAg S-HDAg

Tiré de (Marks and Xu, 2009)

Classification des HDACs

Jusqu'à ce jour, 18 HDACs humaines ont été identifiées et sont sous-divisées en différentes classes selon leurs homologies avec leurs équivalents chez la levure. Les membres de la classe 1, homologue à Rpb3 chez la levure, contient les HDAC1, 2, 3 et 8 et sont strictement nucléaires (Fu et al., 2007). Les membres de la classe 2a et 2b sont homologue à la Hda1 et comprennent les HDAC4, 5, 7 et 9 (classe 2a) et HDAC6 et 10 (classe 2b). Ce groupe d'HDAC peut voyager entre le noyau et le cytoplasme, ce qui suggère une implication dans la déacétylation de protéines non-histones (Verdin et al., 2003). La HDAC11 est le seul membre de la classe 4 (Gao et al., 2002) alors que la classe 3 inclut un groupe de protéines qui sont homologues à Sir2 de la levure. Cette classe comprend les sirtuines 1 à 7 (Sirt1-7) et ont différentes localisations cellulaires (Blander and Guarente, 2004; Trapp and Jung, 2006).

Tableau 11. Classification des HDACs et localisation cellulaire

Classes	Identification	Localisation cellulaire
Classe 1	HDAC1	Noyau
	HDAC2	Noyau
	HDAC3	Noyau
	HDAC8	Noyau
Classe 2a	HDAC4	Noyau/Cytoplasme
	HDAC5	Noyau/Cytoplasme
	HDAC7	Noyau/Cytoplasme
	HDAC9	Noyau/Cytoplasme
Classe 2b	HDAC6	Cytoplasme
	HDAC10	Cytoplasme
Classe 4	HDAC11	Noyau/Cytoplasme
Classe 3	Sirt1	Noyau
	Sirt2	Cytoplasme
	Sirt3	Cytoplasme/Mitochondries
	Sirt4	Mitochondries
	Sirt5	Mitochondries
	Sirt6	Noyau
	Sirt7	Noyau

Tirée de (Lucio-Eterovic et al., 2008)

Les HDACs et le cancer

De nombreuses études suggèrent que la dérégulation de l'acétylation et de la déacétylation joue un rôle important dans la régulation anormale de gènes impliqués dans plusieurs formes de cancer (Barneda-Zahonero and Parra, 2012; Khan and La Thangue, 2012; Muntean and Hess, 2009; Russo et al., 2013). L'hypo-acétylation résultant d'une activité accrue des HDACs est reliée directement à l'initiation et à la progression de plusieurs tumeurs (Lehmann et al., 2009; Suzuki et al., 2009). Par exemple, l'expression accrue de la HDAC2 et la HDAC3 a été observée dans des tissus de tumeurs du sein agressives (Muller et al., 2013). De plus, l'expression de HDAC1 et HDAC2 est élevée

dans le cancer de la prostate (Halkidou et al., 2004), le cancer du poumon (Sasaki et al., 2004), les tumeurs colorectales (Huang et al., 2005; Zhu et al., 2004) et le cancer de l'estomac (Song et al., 2005). Par contre, certaines évidences démontrent également que l'expression diminuée de certaines HDACs est une caractéristique de certains types de cancer (Lucio-Eterovic et al., 2008; Niegisch et al., 2012). Au tableau 13, nous pouvons observer l'implication des différentes HDACs dans le cancer ainsi qu'un estimé de leur expression dans le cancer.

Tableau 12. Implication des HDACs dans le cancer

Groupes	Identification	Implication	Expression dans la tumeur
Classe 1	HDAC1	Indicateur de pronostique pour le cancer du poumon et du sein. Surexprimé dans le cancer de la prostate, de l'estomac et du colon.	+
	HDAC2	Surexprimée dans le cancer de l'estomac et du colon.	+
	HDAC3	Surexprimée dans le cancer du poumon et plusieurs tumeurs solides.	+
	HDAC8	K-O inhibe la croissance cellulaire dans plusieurs tumeurs humaines	-
Classe 4	HDAC11	Inconnue	
Classe 2	HDAC4	Inconnue	+
	HDAC5	Régulée à la baisse dans le cancer du colon et la leucémie myéloïde.	-
	HDAC6	Pronostique ambigu dans le cancer du sein.	
	HDAC7	Inconnue	
	HDAC9	Inconnue	
	HDAC10	Inconnue	

Tiré de (Bertrand, 2010).

De plus, on estime qu'entre 2 et 17% des gènes exprimés dans le cancer sont régulés par les HDACs (Della Ragione et al., 2001; Glaser et al., 2003; Mariadason et al., 2000; Mitsiades et al., 2004; Munster et al., 2001; Van Lint et al., 1996). De ces gènes, nombreux sont impliqués dans le cycle cellulaire et la croissance, la différenciation et l'apoptose, l'angiogenèse, la migration cellulaire, l'invasion et la formation des métastases. Le développement d'inhibiteurs pharmacologiques des HDACs (HDACi) permet donc d'avoir

des outils thérapeutiques ayant des mécanismes multiples pour induire l'arrêt de la tumorigénèse.

Tableau 13. Effets des inhibiteurs pharmacologiques des HDACs (HDACi) dans la tumorigénèse

	Gènes	Inhibiteurs	Types cellulaires	Effets des HDACi	Références
Invasion	MMP2	TSA	-Carcinomes de l'œsophage	Baisse de l'expression	(Laurenzana et al., 2013; Papi et al., 2012; Wang et al., 2013)
	MMP9	VPA TSA VPA (S)-2	-HT-29 -Carcinomes de l'œsophage -HT-29 -PC3	Baisse de l'expression	
Suppresseurs de métastases	TIMP-1	(S)-2	PC3	Hausse de l'expression	(Laurenzana et al., 2013; Liu et al., 2003; Qian et al., 2008)
	RECK	belinostat (PXD101) TSA	Cellules pulmonaires humaine	Hausse de l'expression	
Angiogenèse	VEGF VEGFR1-2	TSA SAHA	HUVEC	Baisse de l'expression Baisse de l'expression	(Deroanne et al., 2002)
Hypoxie	pVHL	TSA	HepG2	Hausse de l'expression (diminution de HIF-1a)	(Kim et al., 2001b)
Oncogènes	Src	NaB TSA	SW480 HT-29	Baisse de l'expression	(Kim et al., 2001b; Kostyniuk et al., 2002)
	p53	SAHA NaB	HepG2 T47-D HaCaT	Baisse de l'expression	

La HDAC6

Structure et fonctions de la HDAC6

La HDAC6 est un membre unique de la classe 2 parce qu'elle contient deux domaines catalytiques homologues qui sont entièrement fonctionnels et qui contribuent de façon indépendante à son activité globale (Figure 20). Elle contient également un domaine de liaison à l'ubiquitine dans sa région C-terminale et un domaine de liaison à la dynéine (Seigneurin-Berny et al., 2001). Ces deux domaines lui permettent d'avoir des fonctions dans la dégradation de protéines et la formation des agrésomes. Contrairement aux autres HDACs, la HDAC6 est située de façon prédominante dans le cytoplasme et sa localisation est dictée par ses motifs NES et SE14 (Valenzuela-Fernandez et al., 2008).

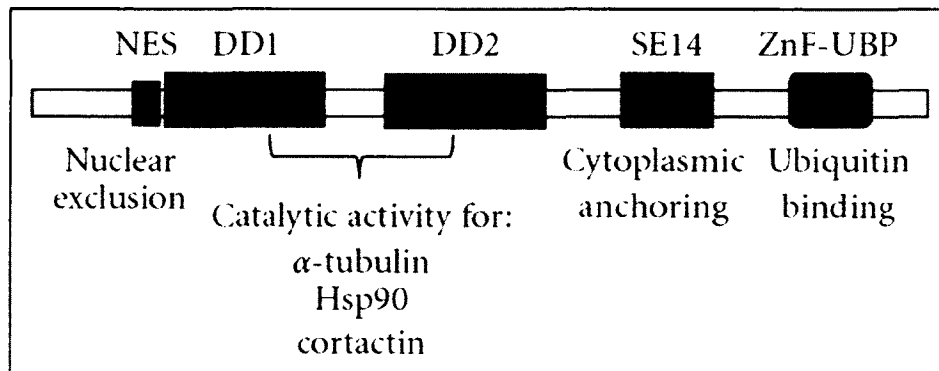


Figure (Intro) 20. Domaines fonctionnels de la HDAC6

La HDAC6 est la seule HDAC ayant 2 domaines catalytiques (DD1 et DD2). La tubuline, la cortactine et la Hsp90 sont des substrats de la HDAC6. Le signal d'export nucléaire (NES) empêche l'accumulation de la protéine au noyau et le térapeptide contenant Ser-Glu (SE14) assure l'ancrage stable de l'enzyme dans le cytoplasme. La région entre les deux domaines catalytiques est capable de lier la dynéine et le domaine de liaison à l'ubiquitine (Znf-UBP). Tirée de (Boyault et al., 2007).

Puisque la HDAC6 a une localisation cytoplasmique, celle-ci assure des fonctions de déacétylation des protéines non-histones. Plusieurs substrats ont été identifiés à ce jour ainsi que plusieurs partenaires de liaison (Tableau 15). La grande variété de substrats de la HDAC6 en fait une HDAC importante dans différentes fonctions biologiques et du fait même, sa dérégulation mène souvent à de nombreuses pathologies tel que le cancer (Aldana-Masangay and Sakamoto, 2011).

Tableau 14. Substrats de la HDAC6 et fonctions biologiques

Catégories		Fonctions
Substrats	α-tubuline	Déacétylation de la tubuline : -Migration cellulaire et chimiotaxie -EMT : régulation de la signalisation de Smad3 -Formation des invadopodes
	Cortactine	Déacétylation de la cortactine : -Régulation de la migration cellulaire et liaison à la F-actine -Formation des invadopodes
	Hsp90	Déacétylation de Hsp90 : -Clairance et dégradation des protéines mal repliées -Régulation des récepteurs glucocorticoïdes et activation de la transcription
	β-caténine	Déacétylation de la β -caténine : -Inhibe la phosphorylation de la β -caténine et son accumulation nucléaire
Protéines d'interaction	p97	AAA-ATPase du protéasome associé au réticulum endoplasmique
	mDia2	Maturation des ostéoclastes
	Ubiquitine	Dégradation des protéines et endocytose
	NF-κB	Facteur de transcription dans l'inflammation et la croissance cellulaire
	PP1	Phosphatase, régulation de l'interaction entre PP1 et Akt

Tiré de (Valenzuela-Fernandez et al., 2008) et (Li et al., 2008b; Rey et al., 2011; Shan et al., 2008)

La HDAC6 dans le cancer

Différentes études ont démontré un lien entre les niveaux d'expression de la HDAC6 et le développement du cancer. Par exemple, les niveaux d'expression élevés en ARN de tumeurs du sein corrént avec la taille de la tumeur (Zhang et al., 2004) et les

niveaux d'expression de la HDAC6 sont plus élevés dans les tumeurs malignes de carcinomes des ovaires comparativement aux lésions bénignes (Bazzaro et al., 2008). La surexpression de la HDAC6 a également été observée dans les cas de leucémie myéloïde primaire aiguë (Bradbury et al., 2005). De plus, la surexpression de la HDAC6 est observée dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses et des modèles de tumeurs chez la souris. À titre d'exemple, la HDAC6 est surexprimée dans les lignées de carcinomes spinocellulaires oraux (Sakuma et al., 2006) ainsi que dans plusieurs lignées cellulaires exprimant l'oncogène Ras (Lee et al., 2008). Ainsi, la surexpression de la HDAC6 dans diverses tumeurs et lignées cellulaires cancéreuses suggère un rôle important pour cette enzyme dans le cancer. La surexpression de la HDAC6 et la grande quantité de substrats et de partenaires de liaison démontrent l'étendue des fonctions cellulaires auxquelles la HDAC6 est associée. En effet, la HDAC6 est impliquée dans différentes étapes du développement du cancer. Elle est requise pour la transformation oncogénique, dans le cycle cellulaire et l'apoptose, la motilité cellulaire et la migration ainsi que dans la réponse transcriptionnelle et traductionnelle (Aldana-Masangkay and Sakamoto, 2011; Valenzuela-Fernandez et al., 2008) (Tableau 16).

Tableau 15. Vue d'ensemble des rôles de la HDAC6 dans le cancer

Rôles	Fonctions	Références
Tumorigenèse	L'activation de HSF1 contrôlée par l'expression de HDAC6 est essentielle pour la croissance tumorale et le maintien du phénotype oncogénique en permettant la prolifération indépendante de l'ancrage des cellules transformées.	(Dai et al., 2007; Saji et al., 2005)
Survie cellulaire	La HDAC6 lie les agrégats de protéines ubiquitinées et mène à l'activation de l'agrésome L'inhibition de la HDAC6 induit l'apoptose	(Bazzaro et al., 2008; Garcia-Mata et al., 2002; Hideshima et al., 2005)
Motilité cellulaire et métastases	La surexpression de la HDAC6 augmente la motilité cellulaire L'inhibition de la HDAC6 influence la dynamique des microtubules	(Haggarty et al., 2003; Tran et al., 2007; Zilberman et al., 2009)
Réponse transcriptionnelle	La HDAC6 déacétyle Hsp90 et prévient la maturation des récepteurs des androgènes et des glucocorticoïdes	(Ai et al., 2009; Kovacs et al., 2005; Murphy et al., 2005)
Réponse traductionnelle	La HDAC6 forme un complexe avec SGs et G3BP1 et supprime de façon réversible la traduction	(Kwon et al., 2007)

Activateurs de la HDAC6

Malgré les indications croissantes sur l'implication de la HDAC6 dans le cancer, nous savons peu des mécanismes qui régissent l'activation de la HDAC6. Tout d'abord, il a été démontré que le gène de la HDAC6 est régulé par l'estrogène (Inoue et al., 2002). L'estrogène joue un rôle important dans la croissance normale des glandes mammaires mais également dans le développement des cancers du sein dépendants de l'estrogène (Zhang et al., 2004). De plus, des facteurs de croissance tels que le TGF β et l'EGF augmentent l'activité de la HDAC6 *in vitro* (Shan et al., 2008; Wang et al., 2010). La phosphorylation a été suggérée comme étant un mécanisme d'activation de la HDAC6. Par exemple, une étude a démontré que la HDAC1 et 2 sont activées en hypoxie par la phosphorylation de résidus sérine par la CK-II (Pluemsampant et al., 2008). Des évidences récentes indiquent également que la HDAC6 est activée par sa phosphorylation. Il a été

démontré que la phosphorylation de la tyrosine 570 par l'EGFR réduisait l'activité déacétylase de l'enzyme et augmentait les niveaux d'acétylation de l' α -tubuline (Deribe et al., 2009). Une autre étude a identifié la CK-II en tant que modulateur crucial de l'activité de la HDAC6 en phosphorylant la sérine 458. Cette phosphorylation augmente l'activité cytoplasmique de l'enzyme en régulant la formation et la clairance des agrégosomes en réponse au stress (Watabe and Nakaki, 2011). Ainsi, différents états de phosphorylation semblent induire des réponses différentes sur l'activité de la HDAC6. Par contre, plusieurs autres recherches sont nécessaires afin d'établir et de clarifier les mécanismes d'activation de la HDAC6.

HDAC6 et les microtubules

Le substrat le mieux caractérisé de la HDAC6 est l' α -tubuline. L' α -tubuline et la β -tubuline forment des dimères qui polymérisent pour former des proto-filaments rigides, les microtubules. Les microtubules jouent un rôle dans le cycle de division cellulaire, le routage intracellulaire de protéines, la morphologie cellulaire, la motilité et la transduction du signal (Nogales, 2000). La HDAC6 déacétyle l' α -tubuline par un processus qui requiert son deuxième domaine catalytique (DD2) ce qui résulte en une augmentation de la motilité cellulaire (Haggarty et al., 2003; Hubbert et al., 2002). En plus de son rôle dans la migration et la motilité cellulaire, il a été proposé que les microtubules régulent l'activité du TGF β en liant les Smads et en les séquestrant afin de contrôler l'association et la phosphorylation de ceux-ci par le TGF β R1 activé (Dong et al., 2000). Il a été démontré que la HDAC6 était un régulateur clé de l'EMT en régulant l'activation et la translocation nucléaire de Smad3 (Shan et al., 2008). Cette étude a démontré l'implication de la HDAC6 dans la régulation des gènes induits par le TGF β . L'inhibition de la HDAC6 réprimait l'expression de gènes inductibles par le TGF β via la stabilisation du réseau de tubuline et la séquestration de Smad3 empêchant celui-ci de transloquer au noyau. Ainsi, la déacétylation de la tubuline par la HDAC6 déstabilise les microfilaments et permet à la molécule Smad3 d'être recrutée et phosphorylée par le TGF β R1 et de transloquer au noyau pour induire la transcription des gènes cibles (Figure 21).

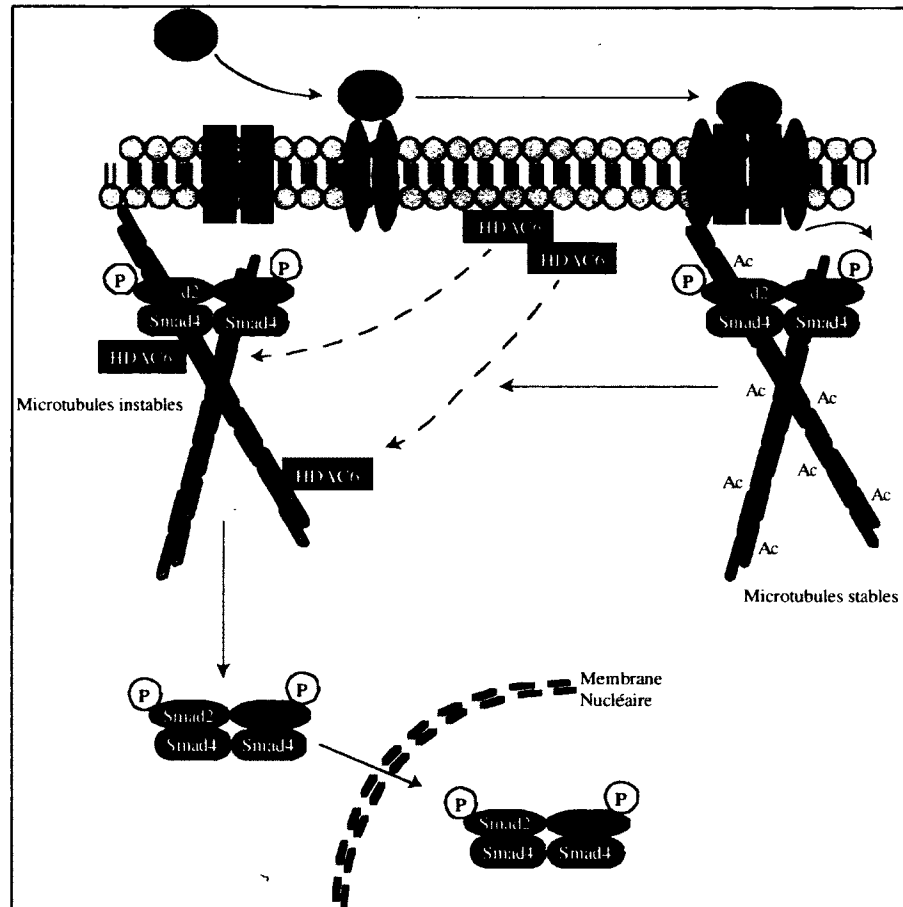


Figure (Intro) 21. Rôle potentiel de la HDAC6 dans la régulation de l'activité du TGFβ

Les Smads lient la tubuline et sont séquestrés dans le réseau de microtubules. Lorsque le TGFβR1 est activé, celui-ci recrute les Smads au récepteur où ils sont phosphorylés pour par la suite former un complexe qui va transloquer au noyau pour induire la transcription de gènes cibles. La HDAC6 déacétyle l'α-tubuline, ce qui déstabilise la structure des microtubules, et permet la déséquestration des Smads. Ceux-ci peuvent donc être recrutés au récepteur TGFβR1 et transloquer au noyau une fois phosphorylés.

HDAC6 et les invadopodes

Une seule étude a démontré l'implication de la HDAC6 dans la formation des invadopodes (Rey et al., 2011). Cette étude a suggéré que l'inhibition de la HDAC6 entraînait une hyperacétylation de l'α-tubuline, donc une stabilisation des microtubules, ce qui interférait avec l'activité des invadopodes et empêchait la dégradation de la matrice. De plus, les chercheurs ont démontré que la cortactine, une composante essentielle à la formation des invadopodes, et également un substrat de la HDAC6, colocalise avec la

HDAC6 en périphérie cellulaire. La déacétylation de la cortactine favorise son interaction avec la F-actine, ce qui suggère que la déacétylation de la cortactine est nécessaire afin de former le complexe de polymérisation de l'actine et induire la formation de l'invadopode. Par contre, les mécanismes précis de l'implication de la HDAC6 dans la formation des invadopodes restent inexplorés.

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Le microenvironnement hypoxique joue un rôle prédominant dans la cascade d'invasion-métastases en favorisant l'expression de gènes qui vont permettre à la cellule cancéreuse de s'adapter et de tirer avantage de cette condition. Par l'intermédiaire du facteur de transcription HIF-1, la cellule cancéreuse va stratégiquement induire l'expression de gènes qui vont lui conférer des caractéristiques invasives. Des phénomènes post-transcriptionnels sont également influencés par l'hypoxie, mais nos connaissances concernant les mécanismes indépendants de la transcription génique sont assez limitées.

L'objectif principal mon projet de doctorat consistait donc à approfondir les mécanismes impliqués dans l'invasion cellulaire et la formation des invadopodes en hypoxie. Plus précisément, nos objectifs spécifiques étaient :

1. Étudier le rôle de l'hypoxie dans la localisation intracellulaire de la convertase de pro-protéines furine.
2. Étudier le rôle potentiel de la relocalisation stratégique de la furine en périphérie cellulaire dans la maturation de substrats tumorigéniques tels que le TGF β .
3. Étudier les mécanismes hypoxiques qui régulent la formation des invadopodes en nous concentrant sur la production du TGF β bio-activable.
4. Étudier le rôle de la HDAC6, dans la régulation de la signalisation du TGF β .

RÉSULTATS

CHAPITRE 1: HYPOXIA ENHANCES CANCER CELL INVASION THROUGH RELOCALIZATION OF THE PROPROTEIN CONVERTASE FURIN FROM THE TRANS-GOLGI NETWORK TO THE CELL SURFACE.

Dominique Arsenault, Fabrice Lucien and Claire M. Dubois *

Immunology Division, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences,
Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4.

Article publié dans la revue:

J Cell Physiol. 2012 Feb;227(2):789-800

Avant propos:

Plusieurs études démontrent que le microenvironnement hypoxique est associé à la progression tumorale en induisant l'invasion des cellules cancéreuses qui mène à la formation des métastases. Ces études ont démontré le rôle de l'hypoxie dans l'induction de gènes impliqués dans le phénotype invasif des cellules cancéreuses. Par contre, la contribution des mécanismes post-transcriptionnels tels que le routage intracellulaire de protéines et l'activation des pro-protéines impliquées dans l'invasion cellulaire reste un domaine peu étudié. La convertase de pro-protéines furine, la principale enzyme de conversion de la voie de sécrétion, est localisée surtout au niveau du réseau trans-Golgi et la plupart des études suggèrent que la bio-activation des pro-protéines s'effectue dans ce compartiment. Dans cette étude, nous démontrons que le microenvironnement hypoxique induit la relocalisation inattendue de la furine du réseau du trans-Golgi à une boucle de recyclage entre la membrane plasmique et les compartiments endosomaux et que cette relocalisation de l'enzyme est hautement régulée. Nos données démontrent que le mécanisme impliqué dans la redistribution de la furine en périphérie cellulaire utilise à la fois la GTPase Rab4 et l'interaction avec la filamine-A, une protéine d'ancrage au cytosquelette. En utilisant un mutant de la furine qui a perdu la capacité de s'associer avec

la filamine-A, nos données démontrent que la relocalisation membranaire de la furine est abolie ainsi que la capacité des cellules cancéreuses à migrer dans la matrice extracellulaire en réponse à l'hypoxie. Ainsi, nos observations supportent l'hypothèse voulant que l'hypoxie promeut la formation d'un compartiment d'activation de pro-protéines en périphérie cellulaire où la furine se relocalise afin d'activer des substrats tumorigéniques.

Contribution de l'étudiant:

En ce qui concerne les travaux contenus dans le premier chapitre de cette thèse, Dominique Arsenault a activement contribué à l'écriture de cet article sous la supervision de sa directrice de thèse. Il a également participé à la conception du plan de recherche. L'étudiant a également réalisé toutes les expériences présentées dans ce chapitre et Fabrice Lucien a participé à quelques expériences afin de compléter des figures (figure supplémentaire 1).

Schématisation de l'étude et hypothèse

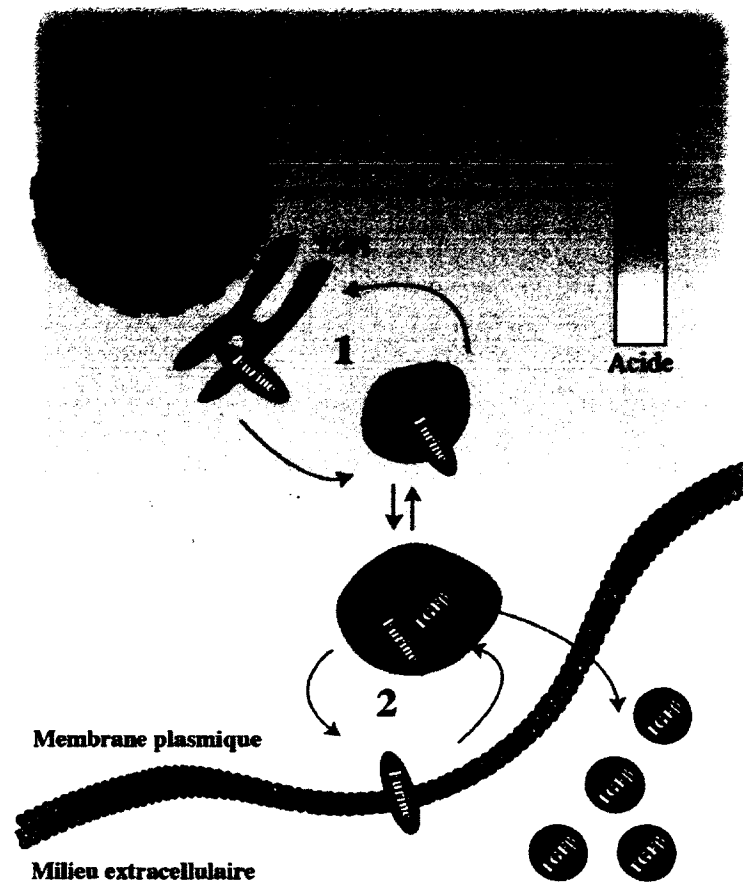


Schéma 1: Hypothèse du chapitre 1

La convertase de pro-protéines furine est localisée dans deux boucles de recyclage; entre le TGN et les endosomes précoces, et entre la membrane plasmique et les endosomes de recyclage. Il a été démontré que les cellules cancéreuses sont caractérisées par une augmentation de métalloprotéases et d'intégrines à la surface cellulaire ainsi qu'une surproduction de certains facteurs de croissance qui leurs confèrent un phénotype métastatique. De plus, des études récentes supportent le rôle de l'hypoxie dans la modification du routage intracellulaire de protéines. Ainsi, le microenvironnement hypoxique pourrait induire la relocalisation de la furine dans la boucle de recyclage entre la membrane plasmique et les endosomes de recyclage et favoriser son interaction avec des substrats impliqués dans l'invasion cellulaire.

ABSTRACT

Tumor hypoxia is strongly associated with malignant progression such as increased cell invasion and metastasis. Although the invasion-related genes affected by hypoxia have been well described, the contribution of post-transcriptional mechanisms such as protein trafficking and proprotein processing associated with the hypoxic response remains poorly understood. The proprotein convertase furin, the major processing enzyme of the secretory pathway, resides in the *trans*-Golgi network and most studies support a model where endogenous substrates are processed by furin within this compartment. Here, we report that hypoxia triggered an unexpected relocalization of furin from the *trans*-Golgi network to endosomal compartments and the cell surface in cancer cells. Exposing these cells back to normoxic conditions reversed furin redistribution, suggesting that the tumor microenvironment modulates furin trafficking in a highly regulated manner. Assessment of the mechanisms involved revealed that both Rab4GTPase-dependent recycling and interaction of furin with the cytoskeletal anchoring protein, filamin-A, are essential for the cell surface relocalization of furin. Interference with the association of furin with filamin-A, prevented cell surface relocalization of furin and abolished the ability of cancer cells to migrate in response to hypoxia. Our observations support the notion that hypoxia promotes the formation of a peripheral processing compartment where furin translocates for enhanced processing of proproteins involved in tumorigenesis.

INTRODUCTION

Furin, an ubiquitously expressed member of the subtilisin-like proprotein convertase (PC) family, is involved in prodomain cleavage of many proproteins traveling along the constitutive secretory pathway. The biological importance of this endoprotease stems from its crucial role in the generation of bioactive proteins involved in physiological as well as pathological settings, such as cancer progression (Bassi et al., 2005). This property has been linked to its ability to activate a wide range of cancer-promoting factors that include adhesion molecules, growth factors, growth factor receptors, and metalloproteinases (Bassi et al., 2005; Bontemps et al., 2007; Khatib et al., 2005). Furin is mostly a trans-Golgi network (TGN) resident protein (Bosshart et al., 1994; Chapman and Munro, 1994; Molloy et al., 1994; Shapiro et al., 1997). However, its ability to process a broad range of substrates is facilitated by its ubiquitous expression and, possibly, by the fact that a proportion of the furin molecules cycles between the TGN and the cell surface.

Cancer progression and metastatic dissemination require that cancer cells migrate and penetrate through the extracellular tissues. A process that is facilitated by proteolytic events that occur at discrete regions of the plasma membrane rich in metalloproteases and integrins in contact with the extracellular matrix (ECM). The expression of the active form of MT1-MMP and integrins at the cell surface of invasive cells has been shown to be a key step in cell invasion and metastasis (Belien et al., 1999; Hotary et al., 2000; Sato et al., 1997). In this context, it has been proposed that MT1-MMP and integrin precursors are processed by furin in the TGN/secretory pathway. However, different studies have shown that the unprocessed form of MT1-MMP (pro-MT1-MMP) localizes at the plasma membrane of cancer cells (Sato et al., 1994; Sternlicht and Werb, 2001) and that furin interacts with proMT1-MMP and integrin α V at specialized domains of renal cell plasma membrane (Mayer et al., 2003). In addition, the processing of the integrin α 4 chain by furin was shown to be restricted to acidic compartments such as endosomes (Bergeron et al., 2003). Therefore, it would appear that some proprotein substrates can escape, at least in part, furin processing at the TGN, and are processed in the endosomal compartment or at the cell surface. This implies that furin processing activity and trafficking to the cell surface might be increased in tumor cells in order to meet the processing demand.

Previous studies have proposed a model to explain the mechanism by which furin cycles between the cell surface and the TGN. In this model, furin trafficking includes two local recycling loops – one at the TGN and one at the cell surface/early endosome (Thomas, 2002). Efficient recycling depends on sequence motifs within furin cytoplasmic domain that promotes interaction with the adaptor protein complex-1 (AP-1) and -2 (AP-2), resulting in sorting/internalization into clathrin-coated vesicles (Crump et al., 2001; Teuchert et al., 1999; Wan et al., 1998). Once inside early endosomes, furin can be dephosphorylated by phosphatases and delivered to the TGN (Molloy et al., 1998). On the other hand, casein kinase 2 (CK2) phosphorylates furin for its recycling back to the plasma membrane (Jones et al., 1995). Furthermore, a VY⁷⁵⁰ motif allows direct interaction of furin with filamin-A, a subcortical actin binding protein involved in cell migration and signaling. This interaction tethers furin at the cell surface in addition to regulating its endocytic rate (Liu et al., 1997).

One characteristic of solid tumors that profoundly influences cancer cell invasion is the low oxygen tension (hypoxia) found within the tumor microenvironment. In fact, low pO_2 tension within a neoplastic lesion is considered as a metastasis switch that selects for the survival of aggressive, highly invasive cells that have the propensity to metastasize (Gort et al., 2008). Previous studies of the mechanisms by which hypoxia stimulates tumor cell invasion have focused largely on the ability of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) to stimulate the transcription of a variety of genes including the invasion facilitating proteases, such as furin, and protease receptors (Krishnamachary et al., 2003; McMahon et al., 2005). Recent evidence indicates that additional regulatory processes that involved protein localization and trafficking might also be involved. For example, Rab11GTPase-mediated vesicle transport was found to be a target of hypoxic stimulation that facilitated the transport of $\alpha 6\beta 4$ integrin from the perinuclear region to the plasma membrane (Yoon et al., 2005). In addition, hypoxia was shown to enhance $\alpha v\beta 3$ integrin plasma membrane localization and invasion of melanoma cells (Cowden Dahl et al., 2005). Moreover, a proteomic study revealed an enrichment of protein trafficking and targeting in hippocampus tissues after a global hypoxic stress (Van Elzen et al., 2010). These findings imply that the

hypoxic tumor microenvironment may have an impact on the cellular invasion process by altering the transport and recycling of cell-surface proteins.

In this report, we present evidence that hypoxia induces the relocalization of the proprotein convertase furin from the TGN to Rab4+ recycling endosomes and the cell surface in fibrosarcoma cells. Interference within this recycling loop, using a furin plasma membrane tethering mutant, abolished hypoxia-driven cell invasion, showing the contribution of this process to tumorigenic events.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and reagents

Antibodies used for immunofluorescence (IF) microscopy or Western blotting (WB) were used at the indicated dilutions: mouse anti-filamin-A (IF 1:200; WB 1:1000) (Chemicon International, Temecula, CA, USA), sheep anti-TGN46 (IF 1:200) (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK), rabbit anti-caveolin-1 (IF 1:500; WB 1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), mouse anti-clathrin (IF 1:200; WB 1:1000) and rabbit anti-furin (IF 1:200) (ABR Affinity BioReagents, Golden, CO, USA). Oregon-488-conjugated phalloidin, DiI and 4',6-diamidino-2-phenylindole diacetate (DAPI) were from Molecular Probes (Eugene, OR, USA), rabbit anti-HA antibody (IF 1:200) was from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). The following reagents were used at the indicated concentrations: chlorpromazine (5 μ M), cytochalazine D (10 μ M) and methyl- β -cyclodextrin (M β CD) (300 μ M) were from Sigma-Aldrich. Secondary anti-mouse-conjugated horseradish peroxidase (HRP) and anti-rabbit-conjugated HRP were obtained from Amersham Biosciences (Amersham, Buckinghamshire, UK.) All other secondary antibodies for IF were from Santa Cruz Biotechnology. HypoxyprobeTM-1 kit was purchased from Chemicon International.

Plasmids

pGEM7ZF-hfur was a generous gift of Dr. Gary Thomas (Vollum Institute, Portland, Oregon, USA). pGEM7ZF-hfur was digested with EcoRI and EcoICRI and inserted into

pcDNA3 (Promega, Madison, WI, USA) digested with EcoRI and EcoRV. pcDNA3-hfur was then digested with HindIII and MluI and inserted into pGFP2 plasmid (BioSignal Packard, Montreal, QC, CANADA). pGFP2-hfur was then digested with MluI and EcoRV and ligated into pcDNA3 to obtain pcDNA3-GFP-furin. pcDNA3-GFP-fur-VA⁷⁵⁰ was produced by point mutation in the pcDNA3-GFP-furin using the 3 PCR technique with the following primer 5'-GGGGTGAAGGTGGCCACCATGGACCGTGGC. HA-Rab11-WT, HA-Rab11S25N HA-Rab4-WT and HA-Rab4N123I plasmids were a generous gift of Dr Jean-Luc Parent (Theriault et al., 2004).

Cell culture and transfection

Fibrosarcoma HT-1080 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Cells were cultured in complete media consisting of minimal essential medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum. HT-1080 cells were stably transfected with a C-terminal eGFP-tagged furin or pcDNA3-hfur using the TransIT®-LT1 Transfection Reagent (Mirrus, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. All stably transfected cells were maintained in complete media containing G-418 (600 µg/ml) as a selecting agent. Cell populations expressing low levels of eGFP-tagged furin were enriched using a Vantage fluorescence-activated cell Sorter (FACS) (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). Hypoxic conditions were used as follows. Cells were serum-starved and placed in a sealed humidified chamber maintained at 1% O₂, 5% CO₂ and balanced in N₂ for different periods of time, as indicated legends of the figures.

Immunofluorescence staining

Cells were seeded at a density of 50 X 10³ cells/cm² in circular 15-mm diameter glass coverslips coated with type IV collagen (0.1 mg/mL). The coverslips were placed in 12-well plates and incubated for 24 h. The cells were serum starved for 3 h prior to exposure to normoxic or hypoxic conditions for 4 h. All agents were added 30 min before exposure. Following incubations, the cells were washed with PBS, fixed with 2% paraformaldehyde (30 min, 4⁰C) permeabilized with 0.05% saponin, and immunostained for 2 h with the

primary antibody. The cells were then washed and incubated with Rhodamine Red X- or TRITC-labeled secondary antibodies at 4⁰C for 1 h. Incubation with DiI, a cell membrane labeling reagent, were done at 4⁰C for 15 min at a concentration of 10 µg/mL in BSA (2%). As a negative control, species- and isotype-matched immunoglobulin G were used instead of the primary antibody.

Confocal microscopy

Cells were examined with a scanning confocal microscope (FV1000, Olympus, Tokyo, Japan) equipped with an inverted microscope and a 63X oil immersion objective (Olympus). Specimens were laser-excited at 488 nm (40 mW argon laser) and 563 nm (helium-neon laser). In order to avoid cross-over between the emitted eGFP and rhodamine fluorescence, they were collected sequentially at wavelengths 525-550 and >590 nm, respectively. Serial horizontal optical sections of 512 x 512 pixels with 2 times line averaging were taken at 0.11 µm intervals through the entire thickness of the cell (optical resolution: lateral - 0.18 µm; axial - 0.25 µm). Images were acquired during the same day, typically from 10 cells of similar size from each experimental condition under identical settings.

Image analysis and quantitative measurements

In the case of eGFP/Rhodamine-RedX merged fluorescence images, dot fluorograms were obtained by plotting pixel values of each marker in the vertical and horizontal axes, respectively. Thresholds were determined using single markers and noise and background were removed. Quadrant markers were adjusted forming background (C), red-only (D), green-only (A) and colocalization areas (B). Colocalization index were calculated as $(B)/(B+D)$, and % of colocalization as $(B)/(B+D) \times 100$, according to Manders et al. (Manders et al. 1993). For plasma membrane furin quantification, only the basal cell surface layer (first layer in contact with the matrix) was scanned and furin and plasma membrane colocalization index were calculated as described above. To determine fluorescence quantification, images were processed for a total of 35 slices per cell on 10 size-matched cells for each experimental condition, and experiments were performed at least three times. Images were shown in pseudo-color, according to their original

fluorochromes, merged (FluoView software (Olympus), then cropped and assembled (Adobe Photoshop software, Adobe Systems, Mountain View, CA, USA).

Western blots

Cells (1×10^6 per 100-mm petri dishes) were incubated overnight and serum-starved for 3 to 4 h prior to exposure to normoxic (21% O₂) or hypoxic (1% O₂) conditions for 16 h. The cells were washed in ice-cold PBS and lysed with a M-RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Na-deoxycholate, 8 mM EDTA pH 8.0, 10% NP-40 and complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Indianapolis, IN, USA). Immunoblotting was performed as described (Blanchette et al., 2001).

Co-immunoprecipitation experiments

HT-1080 cells (2×10^7 per 150-mm petri dishes) were incubated overnight and serum starved 3 to 4 h prior to stimulation under normoxic (21% O₂) or hypoxic (1% O₂) conditions for 16 h. Cells were then washed with ice-cold PBS, then lysed with NP-40 phosphate buffer (1% NP-40, 150 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate, complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail tablet (Roche Applied Science). One mg total protein was immunoprecipitated with anti-furin antibody PA1-062 (1:100) and blotted with anti-filamin-A antibody (1:500), clathrin antibody (1:1000) or anti-caveolin-1 antibody (1:1000) as described in the Western blot section.

3D invasion assays

Collagen type I matrix was prepared as follows: Aliquots (50 μ L) of agarose containing 10% FBS were deposited in 96 well culture plates. Aliquots (50 μ L) of fibrillar collagen type I (3 mg/mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) were then prepared following the manufacturer's instructions and layered on top of the agarose layer. Cells (2×10^4 /100 μ l of MEM) were serum-starved overnight, deposited on top of the collagen layer and incubated for 24 h under normoxic or hypoxic conditions. The cells were then labeled with CellTrace™ Calcein Green AM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1 h prior to the end of incubation. The cells were then washed with PBS and fixed with 3% glutaraldehyde for 30 min followed by confocal microscopy analysis using a FV1000

Olympus confocal microscope. Collagen matrix pellets were scanned along the Z-axis. Cells that had invaded the collagen gel were imaged and quantitated at each 5 μm layers within the gel. Cell invasion was expressed as a ratio of the fluorescence intensity of each 5 μm layer/ fluorescence intensity of the top 5 μm layer (non invading cells).

Cell-surface furin activity assay

The assay developed by Hobson *et al.* (Hobson *et al.*, 2006) was used for measurement of cell-surface furin activity. Briefly, 4×10^4 HT-1080-eGFP-fur cells were seeded in 96 well plates coated with collagen type IV (3 mg/mL). The cells were allowed to grow for 2 days prior to exposure to hypoxic conditions (1% O_2) for 4 h. Cells were then incubated with the anthrax toxin protective antigen mutant PrAg-33 (26 nM) and the anthrax toxin lethal factor fused to β -lactosidase (LF- β -lac) (90 nM) for 1 h under normoxic or hypoxic conditions. As a negative control, cells were incubated without PrAg-33. The cells were then washed and loaded with the CCF2/AM substrate (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. The cells were analyzed under confocal microscopy and excited at 409 nm. An intact molecule of CCF2/AM emits fluorescence at 520 nm (green light). Hydrolysis of CCF2/AM by β -lactamase leads to emitted fluorescence at 450 nm (blue light). Thus, after excitation at 409 nm, cells with cell-surface furin activity are emitting blue light, whereas cells with no activity are emitting green light. Results are presented as cell-surface activity index that corresponds to the ratio of fluorescence intensities (450 nm/520 nm values).

***In vivo* tumor growth**

In vivo studies were carried out in accordance with the guidelines of the local Institutional animal care facility. HT-1080 cells (1×10^6 cells/100 μl PBS) were injected subcutaneously into the flanks of 5- to 7-week-old female CD1 nude mice. When tumors reached approximately 1,000 mm^3 , pimonidazole was injected intraperitoneally (60 mg/kg) 1 h before excision of the tumors. Tumors were fixed in 10% formalin and primary antibodies for pimonidazole, furin, and/or TGN were applied to paraffin-embedded tumor sections and signals visualized using biotinylated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) and either the peroxidase technique (Sigma-Aldrich)

or the alkaline phosphatase technique (Dako Cytomation K0391) according to the manufacturer's instructions or fluorochrome-labeled secondary antibodies.

Statistical analysis

Unpaired Student's *t*-test was used to assess statistical significance. A *p*-value of < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Hypoxia triggers the relocation of furin to the basal plasma membrane

A furinGFP fusion construct was generated to investigate furin trafficking in normoxic and hypoxic cells. Based on the knowledge that the C-terminal domain of furin contains the motifs involved in its trafficking (Schafer et al., 1995), we inserted a flexible proline-rich 25 amino acid linker between the C-terminal residue of furin and the N-terminal residue of GFP. This furinGFP construct was transfected into HT-1080 fibrosarcoma cells and its subcellular distribution was observed by confocal microscopy. Earlier reports have shown that furin mainly localized to the trans-Golgi network (TGN) (Molloy et al., 1994). Likewise, our results indicated that furinGFP expressed in HT-1080 cells was distributed at the perinuclear region that colocalizes with the TGN marker, TGN-46 (Fig. 1A). A similar colocalization was observed with cells expressing untagged furin (Supplementary Fig. 1A). Previous reports, including our own, have demonstrated that furin processes/activates various proproteins that are critically involved in cell invasion (Khatib et al., 2005; McMahon et al., 2005). We therefore measured the activity of furinGFP and compared it to that of untagged furin in a cell invasion assay. When seeded on top of type I collagen gels, both HT-1080 cells overexpressing furinGFP or untagged furin displayed an enhanced ability to migrate as seen by the increased proportion of cells that invaded the collagen gels as well as the increase in maximal invasion depth, compared to untransfected cells (supplementary Fig. 1C,D). FurinGFP cells were more invasive than cells overexpressing untagged furin (HT-1080-hfur), which is consistent with further enrichment of this particular cell population through cell sorting. Taken together, these

results demonstrate that furinGFP is a suitable reporter protein that could be used in experiments of furin localization and function.

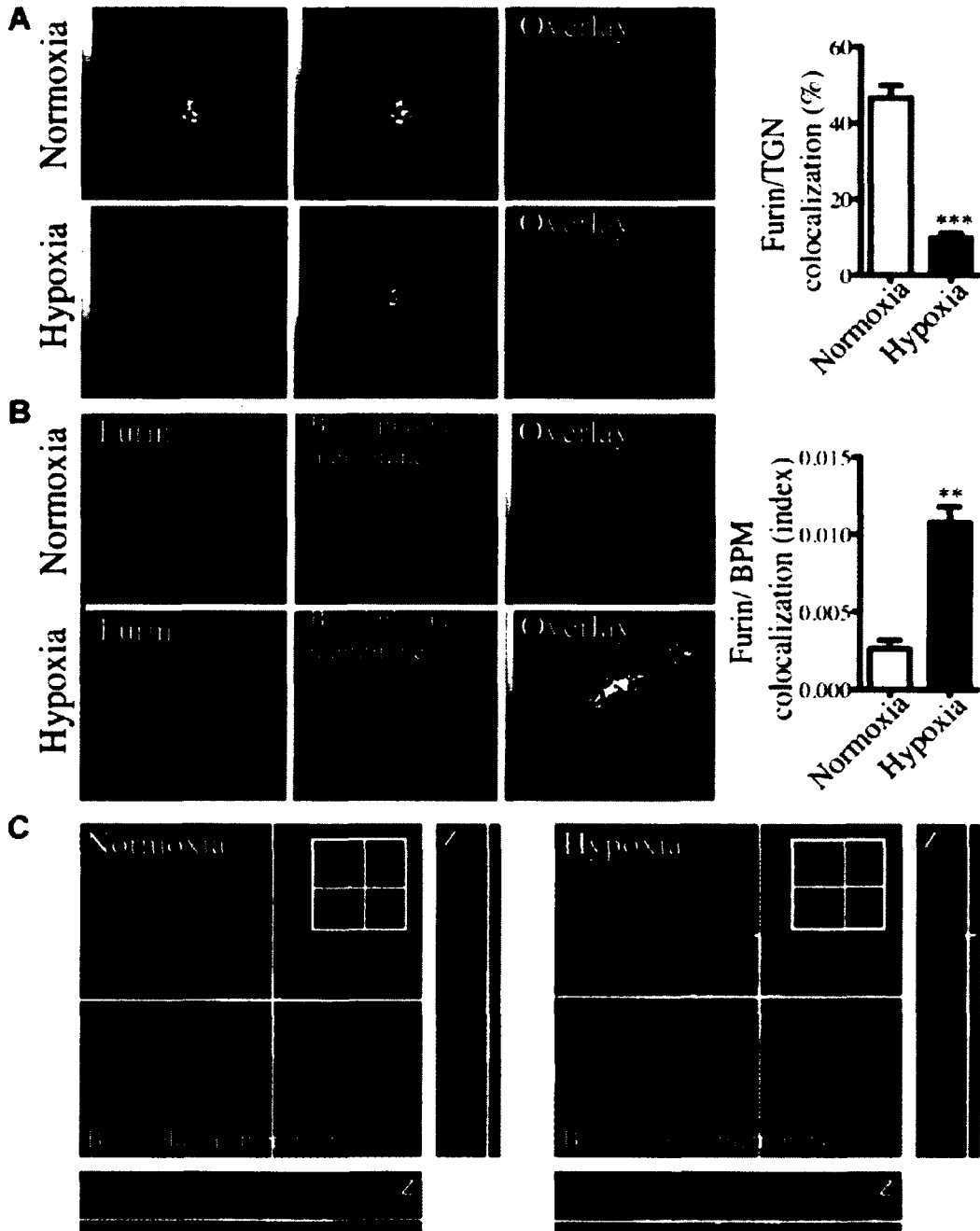


Figure (Chapitre 1) : Hypoxia triggers furin relocation to the basal plasma membrane

HT-1080-eGFPfur cells were seeded on collagen type IV-coated slides and cultured in normoxic or hypoxic chambers for 4 h. **(A)** Micrographs of furin (eGFP), TGN (TGN46; red) and merged images. The associated graph shows the percentage of furin with TGN as described under Materials and Methods. **(B)** Micrographs of furin (eGFP), plasma membranes (DiI; red) and merged images (binary mask-overlay). The associated graph shows furin with the basal plasma membrane. The index was calculated as described under Materials and Methods. **(C)** Three-dimensional reconstruction of a normoxic or hypoxic cell showing furin relocation to the plasma membrane. Large central images show the basal plasma membrane of the cells, inset squares represent the middle section of the cells and horizontal and vertical Z-axis are shown for each cell. Column, mean; bar, SE; BPM, basal plasma membrane; ** P = 0.003, *** P < 0.0001; scale bars correspond to 5 μ m.

To examine the influence of hypoxia on furin localization, furinGFP HT-1080 cells were exposed to standard (21%) or low (1%) oxygen concentration. Furin localization was observed and quantitated by confocal microscopy. In contrast to furin localization to the TGN in normoxia, exposure of the cells to 1% O₂ for 4 h, resulted in a significant decrease in colocalization of furin and TGN-46, together with a dispersion of small furin-containing vesicles throughout the cytoplasm (Fig. 1A). Co-staining with the cell membrane labeling reagent DiI, revealed an increased redistribution of furin to the basal plasma membrane (Fig. 1B). A similar redistribution was observed in the case of untagged furin (supplementary Fig. 1B). To determine whether the relocation of furin was polarized toward the plasma membrane, an image projection was produced by stacking each of the individual z-sections of the two fluorescent probes into one image, resulting in a three-dimensional (3D) representation and an overlay of both furin and cell membrane staining. Furin in hypoxic cells was redistributed mainly toward the basal plasma membrane (bottom of the cell), with fewer staining present at the top of the cell (Fig. 1C). These changes in furin redistribution were not due to cell alterations such as decrease in cell viability and/or general impairments in cell trafficking mechanisms. Indeed, HT-1080 cells exhibit no significant increase in cell death as determined by trypan blue staining (data not shown). Moreover, re-exposition of the cell culture resulted in a rapid (30 min) relocation of furin back to perinuclear TGN-46 positive location (Fig. 2A,B). Also, Western blot analysis of furin overexpressing cell lysates showed no changes within the relative proportion of the proform and the mature form of furin (supplementary Fig.2). Because the multistep process

of furin activation, through excision of the propeptide, necessitates correct routing of the enzyme within the TGN/endosomal system (Anderson et al., 1997), it also suggests that the biosynthetic pathway is not altered by hypoxia.

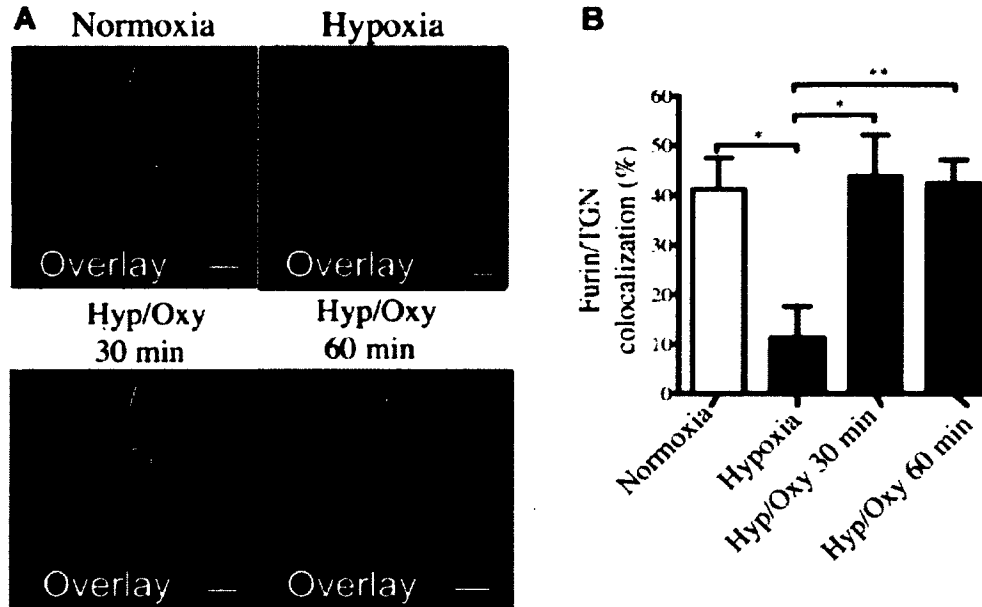


Figure (Chapitre 1) 1. Furin cycles back to the TGN after reoxygenation of hypoxic cells

Cells were cultured in normoxic or hypoxic chambers for 4 h followed by reoxygenation (21%) for the indicated time-period. **(A)** Merged image of micrographs of furin (eGFP), TGN (TGN-46; red) and nucleus (DAPI; blue). **(B)** Graph showing the percentage of furin with TGN as described under Materials and Methods. Column, mean; bar, SE; * $P = 0.01$, ** $P = 0.004$; scale bars correspond to 5 μm .

To ensure that furin at the cell surface was active, we used a modified anthrax toxin activity assay (Hobson et al., 2006). This assay takes advantage of the absolute requirement for endoproteolytic cleavage of cell surface-bound anthrax toxin protective antigen (PrAg) by cell-surface furin for its capacity to translocate an anthrax toxin lethal factor- β -lactamase fusion protein (LF- β -Lac) to the cytoplasm. HT-1080 cells were maintained for 4 h under normoxia or hypoxia, incubated with LF- β -Lac alone or in the presence of PrAg, and cells were loaded with the fluorogenic β -Lac substrate CCF2/AM. Assessment of the activity of internalized LF- β -Lac was performed by confocal microscopy. A larger number of cells exposed to hypoxic conditions emitted a blue fluorescence, indicating cleavage of

the CCF2/AM substrate and thereby activity of cell-surface furin, as compared to cells maintained under normoxic conditions (Fig. 3A). Results represented as cell-surface activity index (450nm/520nm values), revealed a 2-fold increase in the activity of cell-surface furin in cells exposed to hypoxic conditions (Fig. 3B).

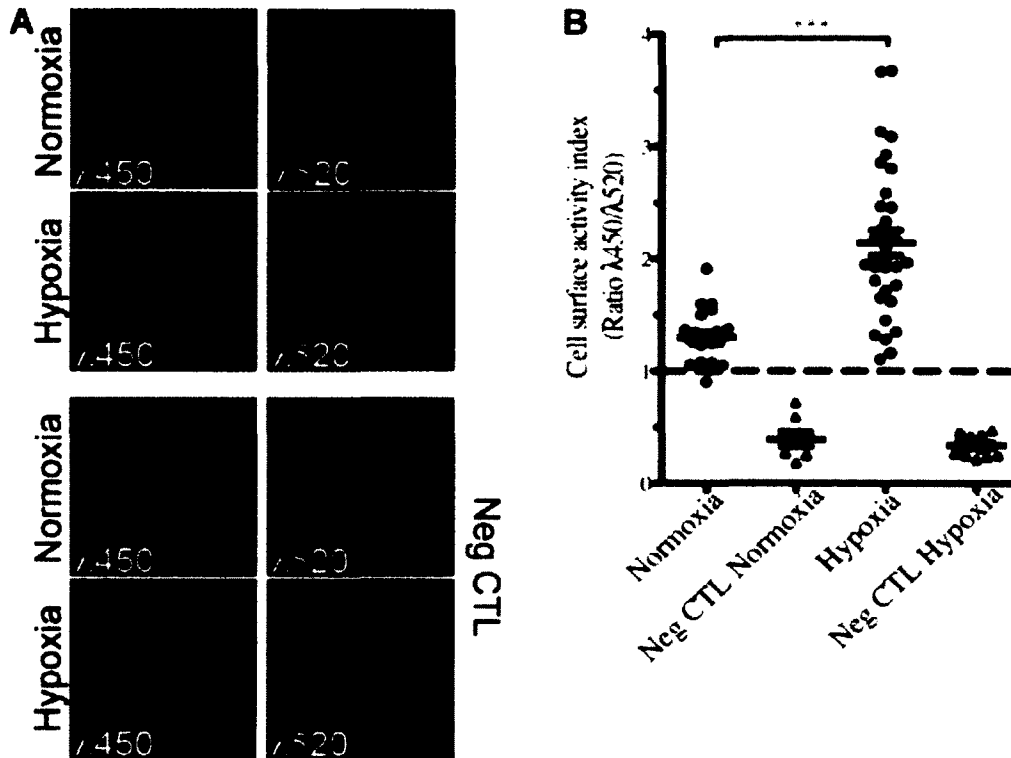


Figure (Chapitre 1) 2. Cell surface-associated furin is active

A modified Antrax cell-surface furin activity assay was performed as described under Materials and Methods. **(A)** Representative confocal microscopy images of CCF2-AM substrate emission. Emission at 450 nm (blue) corresponds to hydrolysis of CCF2-AM. Emission at 520 nm corresponds to intact CCF2-AM. **(B)** Cell-surface activity index of furin activity in normoxic and hypoxic cell. *** $P < 0.0001$.

Furin internalization in hypoxic cells involves both clathrin and lipid raft pathways

Regulation of the cell-surface expression levels of many proteins is mediated by endocytosis and routing through recycling endosomes (Fletcher and Rappoport, 2009), so our next step was to determine the involvement of these pathways in furin relocalization. Two main endocytic pathways have been well characterized in cells, the clathrin-dependent and the caveolae-mediated endocytic pathways (Grant and Donaldson, 2009). To define the involvement of these pathways in furin endocytosis, HT-1080 cells were maintained in

normoxia or hypoxia for 4 h and labeled for clathrin and caveolin-1. Confocal analysis revealed that in hypoxic cells, furin colocalized with clathrin and caveolin-1 in areas of plasma membrane invaginations/protrusions. Under normoxia, furin did not colocalize with caveolin-1 and the majority of furin-clathrin was observed at the trans-Golgi/late endosomes (Fig. 4A,B). Results from co-immunoprecipitation experiments indicated that the interactions between furin and caveolin-1 were drastically increased in hypoxia whereas a modest increase in clathrin co-immunoprecipitation was observed (Fig. 4C). To further investigate the relationship between these endocytosis pathways and furin internalization, we examined the effect of chlorpromazine, a blocker of clathrin-mediated endocytosis (Wang et al., 1993), and methyl β -cyclodextrin that is known to disrupt lipid raft-mediated endocytosis through cholesterol depletion (Rodal et al., 1999) on the accumulation of furin at the basal plasma membrane. The chlorpromazine treatment significantly increased basal plasma membrane accumulation of furin under both normoxia and hypoxia, whereas M β CD treatment caused enhancement of furin accumulation only in hypoxic cells. Therefore, while the major route of furin internalization involves clathrin-dependent endocytosis in normoxic HT-1080 cells, an additional caveolae/raft-mediated endocytosis pathway seems to be activated by hypoxia.

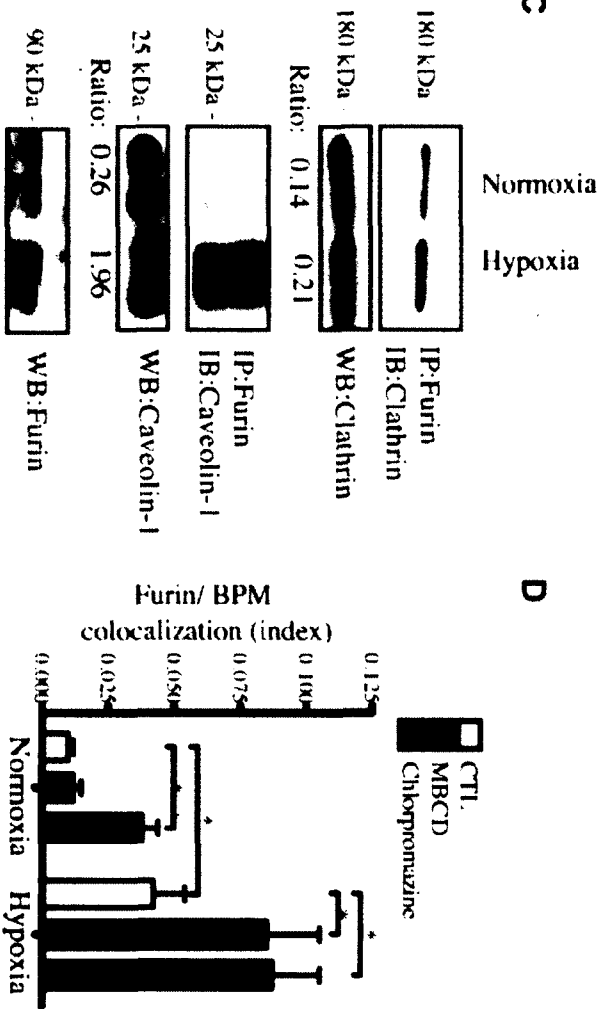
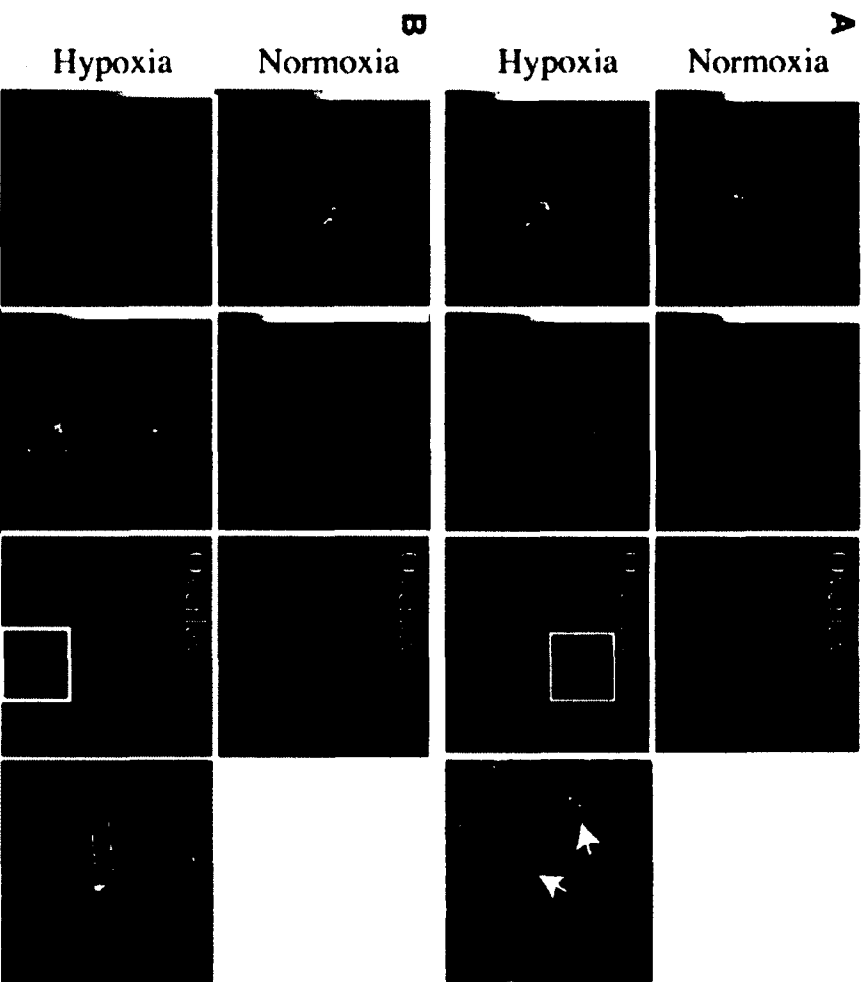


Figure (Chapitre 1) 3. Furin internalization in hypoxic cells involves both clathrin and lipid rafts

Cells were seeded on collagen type IV-coated slides, cultured in normoxic or hypoxic chambers for 4 h. (A) Micrographs of furin (eGFP), clathrin (red) and merged images. (B) Micrographs of furin (eGFP), caveolin-1 (red) and merged images. (C) Co-immunoprecipitation of furin with clathrin and caveolin-1 in HT-1080 cells incubated in normoxia or hypoxia. (D) Graph showing the percentage of furin with the basal plasma membrane. Cells were seeded on collagen type IV-coated slides, left either untreated (control; CTL) or pretreated with M β CD (300 μ M) or chlorpromazine (5 μ M) prior to culture in normoxic or hypoxic chambers for 4 h. Cells were then labeled with DiI processed for confocal microscopy and fluorogram analysis were performed as described under Materials and Methods. Column, mean; bar, SE; BPM, basal plasma membrane; * $P \leq 0.04$; scale bars correspond to 5 μ m.

The increase in cell-surface furin involves a Rab4 recycling pathway

Internalized proteins can be recycled back to the plasma membrane by two main GTPase associated pathways. These involve a short and rapid loop pathway from early endosomes to the plasma membrane via Rab4, and a Rab11-dependent long-loop pathway from the perinuclear recycling endosomes to the plasma membrane. To study the potential involvement of these pathways in hypoxia-induced cell-surface furin expression, HT-1080 cells were transfected with wild type Rab4 or Rab11 GTPases and incubated under normoxic or hypoxic conditions. Results indicated that furin colocalized with both Rab4 and Rab11 at perinuclear areas in normoxic and hypoxic cells. Moreover, significant colocalization between furin and Rab4, but not Rab11, was observed at the periphery of hypoxic cells (Fig. 5A,B). To define the implication of these recycling pathways in cell-surface furin expression, HT-1080 cells were transfected with dominant negative forms of either Rab4 (Rab4N123I, which is unable to bind to guanosine nucleotides (Cormont et al., 1996) or Rab11 (Rab11S25N, which preferentially binds guanosine diphosphate (Ullrich et al., 1996), followed by quantification of basal plasma membrane-associated furin. Overexpression of Rab4WT increased the amounts of plasma membrane-associated furin in normoxic cells, mimicking the effect of hypoxia on furin relocalization (Fig.5C). Conversely, overexpression of Rab4N123I significantly decreased the amounts of plasma membrane-associated furin in hypoxic cells. In contrast, overexpression of Rab11WT or Rab11S25N had no impact on plasma membrane associated furin accumulation in

normoxic or hypoxic cells. These observations suggested that the Rab 4 recycling pathway was involved in the increased plasma membrane expression of furin in response to hypoxia.

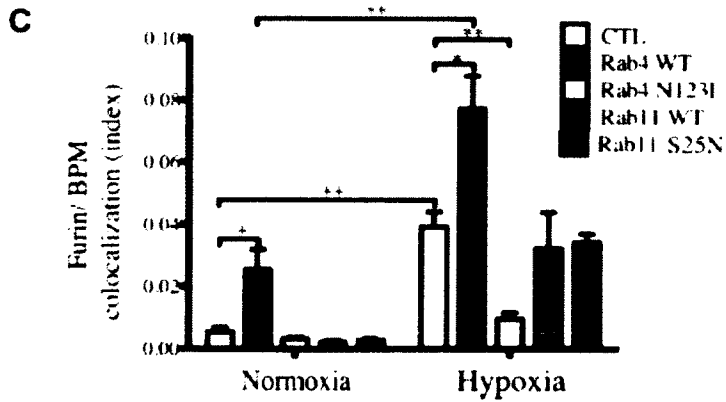
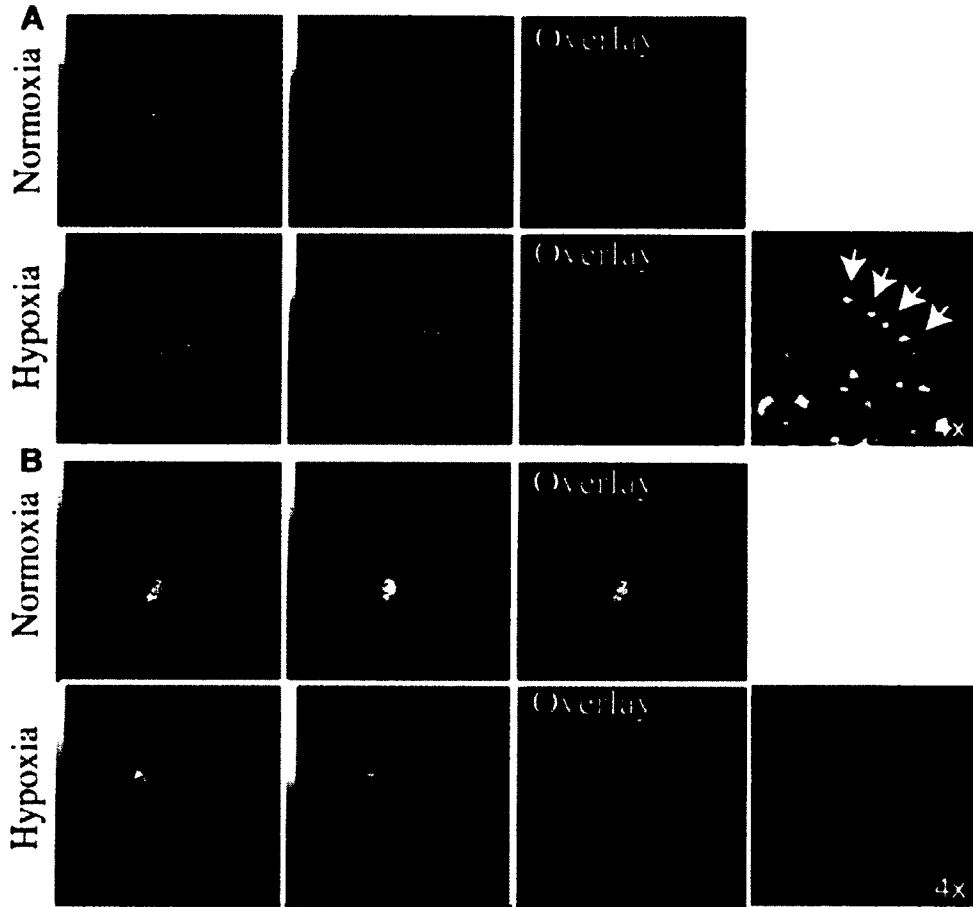


Figure (Chapitre 1) 4. Recycling of furin to the plasma membrane involves Rab4

Cells were transfected with HA-Rab4WT or HA-Rab11WT, seeded on collagen type IV-coated slides, and cultured in normoxic or hypoxic chambers for 4 h. (A) Micrographs of furin (eGFP), Rab4 (HA; red) and merged images. (B) Micrographs of furin (eGFP), Rab11 (HA; red) and merged images. (C) Graph showing the percentage of furin with the basal plasma membrane. Cells were transfected with HA-Rab4WT, or HA-Rab4N123I, or HA-Rab11WT, or HA-Rab11S25N, cultured in normoxic or hypoxic chambers for 4 h and labeled with DiI. Fluorogram analyses were performed as described under Materials and Methods. Column, mean; bar, SE; BPM, basal plasma membrane; * $P = 0.02$, ** $P \leq 0.005$; scale bars correspond to 5 μm .

Disruption of furin-filamin A interaction impairs furin relocation to the cell periphery.

Furin was shown to associate with the underlying actin cytoskeleton by direct association with the subcortical actin-binding protein, filamin A (FLNA). FLNA, which serves as a docking site for various cell receptors, has been shown to tether furin to the cell surface (Liu et al., 1997). To define the implication of the actin cytoskeleton in furin relocation under hypoxic conditions, cells were treated with cytochalasin D and exposed to normoxia or hypoxia. Disruption of the actin cytoskeleton was found to impair furin redistribution to the cell periphery in hypoxic cells (data not shown). Colocalization and co-immunoprecipitation experiments were done to determine whether furin relocation under hypoxia involved its interaction with FLNA. Data showed that in hypoxic cells, furin was redistributed to regions enriched in FLNA, whereas little or no FLNA colocalization was observed in normoxic cells (Fig. 6C). In addition, hypoxic treatments resulted in a large increase in FLNA-furin association (Fig. 6B).

The cytoplasmic tail of furin embodies a dipeptidic sequence (VY⁷⁵⁰) that is essential for its interaction with FLNA (Liu et al., 1997). We investigated the effect of over-expressing either wild type furin or a mutated furin (furVA⁷⁵⁰) where the FLNA binding site was disrupted. Disruption of the furin-FLNA interactions motif impaired furin redistribution to the cell periphery and abolished furin relocation to the basal plasma membrane (Fig. 6C) in HT-1080 cells. These results indicated that tethering of furin by FLNA was a necessary event in the process of furin relocation to the basal plasma membrane under hypoxia.

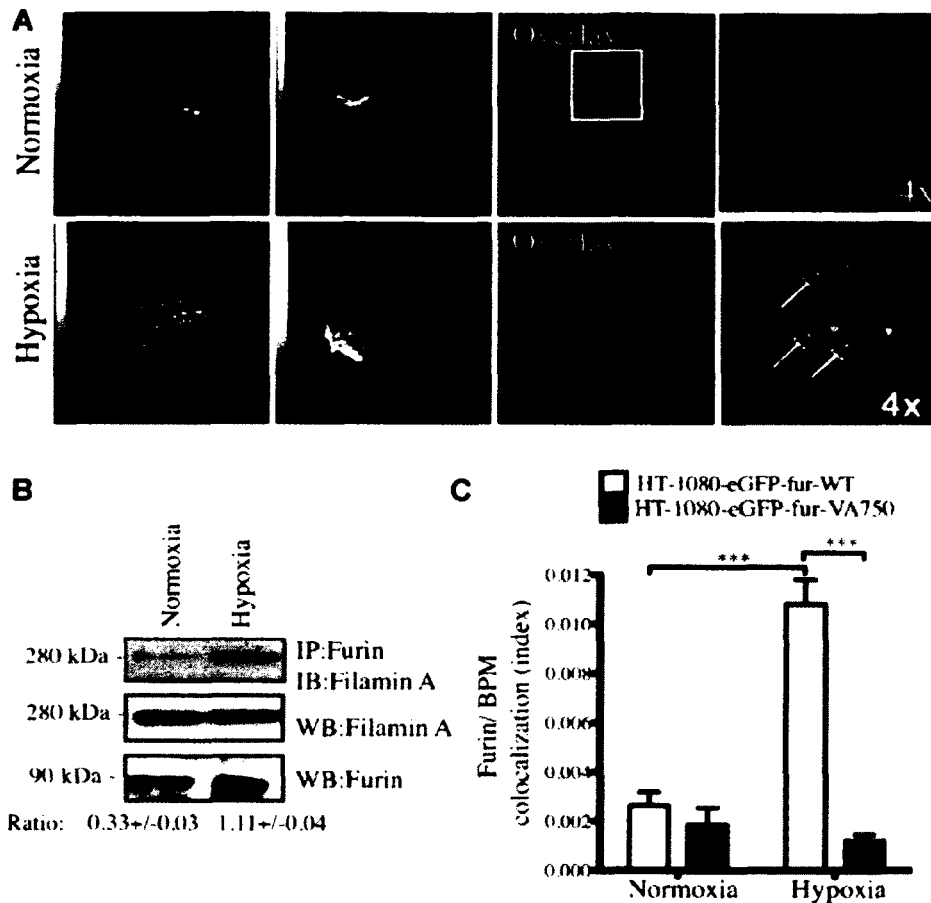


Figure (Chapitre 1) 5. Filamin-A is essential for hypoxia-driven relocalization of furin to the plasma membrane

Cells were seeded on collagen type IV-coated slides and cultured in normoxic or hypoxic chambers for 4 h. (A) Micrographs of furin (eGFP), filamin-A (red) and merged images. (B) Co-immunoprecipitation of furin and filamin-A in normoxic or hypoxic cells. (C) Graph showing the percentage of furin with the basal plasma membrane. HT-1080-eGFP-fur and HT-1080-eGFP-fur-VA⁷⁵⁰ were seeded on top of collagen IV-coated slides and cultured either in normoxic or hypoxic chambers for 4 h and labeled with DiI. Fluorogram analyses were performed as described under Materials and Methods. Column, mean; bar, SE; BPM, basal plasma membrane; *** $P < 0.0007$; scale bars correspond to 5 μ m.

FLNA-dependent tethering of furin is needed for hypoxia-induced cell invasion in 3D matrices.

An important property of tumor cells exposed to hypoxia is that they exhibit an enhanced propensity to invade (Le et al., 2004). Because hypoxia was also shown to affect the trafficking of invasion-triggering furin substrates to the cell surface (Yoon et al., 2005),

we asked whether hypoxia also increased the ability of HT-1080 cells to invade through collagen gels. For this purpose, cells were seeded on top of a fibrillar type I collagen layer and allowed to migrate under normoxia or hypoxia for 24 h. Cells were then stained with calcein-AM and cells that invaded the collagen gels were imaged and quantitated at each 5 μm layer within the gel using confocal microscopy. Results showed that hypoxia increases the ability of HT-1080 cells to invade in a the collagen matrix (Fig. 7 A,B,). We next investigated the effect of furin relocalization at the cell surface on migration by comparing the hypoxia-induced migration of furVA⁷⁵⁰ overexpressing HT-1080 cells to those overexpressing the wild type gene. Whereas disruption of furin-FLNA interaction did not significantly affect the capacity of the cells to invade under normoxic conditions, it completely blocked the ability of the cells to enhance their migration in response to hypoxia (Fig 7B,C). These results suggested that furin relocalization at the cell surface was an important event in hypoxia-induced cell invasion.

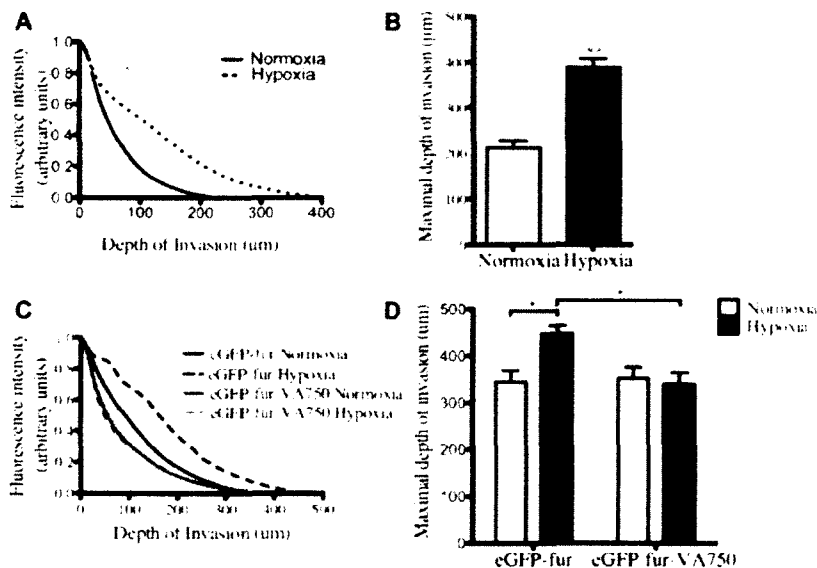


Figure (Chapitre 1) 6. Hypoxia-driven furin relocalization is associated with increased cell invasion

(A, B) Cells were allowed to invade collagen gels for 24 h in normoxia or hypoxia and stained as described under Materials and Methods. (A) Relative fluorescence intensity of the cells according to the depth of invasion. Arbitrary index of invasion was calculated as described under Materials and Methods. (B) Maximal depth of invasion following 24 h incubation. (C, D) Cells stably transfected with eGFP-tagged-furin or eGFP-tagged-furin-VA⁷⁵⁰ were allowed to invade collagen gels for 24 h under normoxia or hypoxia. (E) Relative intensity of the cells according to the depth of invasion. (F) Maximal depth of invasion following 24 h incubation. Column, mean; bar, SE; * P = 0.03, ** P = 0.004.

DISCUSSION

Hypoxia is a common feature of solid tumors that correlates with poor prognostic and enhanced metastasis (Lunt et al., 2009). Most studies have associated the ability of hypoxia to promote metastasis with its ability to regulate the expression of specific genes including the proprotein convertase furin, which are associated with the cell invasion process (McMahon et al., 2005). Here, we have presented evidence that hypoxia induced the relocalization of furin from the TGN to the cell periphery and promoted its localization at the plasma membrane. We showed that under hypoxic conditions, membrane-associated furin was internalized through both clathrin and lipid raft-dependent endocytic pathways. We further showed that under these conditions, furin recycled in a short and rapid loop between the plasma membrane and the recycling endosomes, a process mediated by the Rab4GTPase. In addition, we observed that the localization of furin at the cell surface was mediated through its interaction with FLNA, a process that was enhanced by hypoxia. Disruption of this interaction did not impair the basal invasive capacity of the cells but blocked their response to hypoxia. The data led us to conclude that trafficking of furin to the cell surface/recycling endosomes was likely to be an important mechanism of the functional regulation of this proprotein convertase in cancer invasion processes induced by the tumor hypoxic microenvironment.

Among the genes that are affected by hypoxia, earlier studies have indicated that furin was markedly enhanced through HIF-1 dependent transcriptional activation of the furin promoter, leading to the activation of precursor proteins involved in the invasion/metastasis process (McMahon et al., 2005). Furin is frequently overexpressed in a variety of human tumors and its role in many aspects of tumor metastasis has been documented (McMahon et al., 2003; Siegfried et al., 2003; Siegfried et al., 2005). *In vivo* results using HT-1080 xenograft tumors clearly showed that furin was overexpressed in hypoxic zones (pimonidazole colocalization) of the tumor, indicating that the hypoxic microenvironment contributes to furin regulation in solid tumors (supplementary Fig 3A). Interestingly, even though furin in hypoxic zones showed some overlap with the TGN-46 marker, the majority of the staining was found throughout the cytoplasm of the cells (supplementary Fig. 3B), suggesting that similar trafficking/recruitment of furin to the cell

periphery might also occur *in vivo*. Thus, in hypoxic areas of tumors, transcriptional activation of the *fur* gene combined with the trafficking of the convertase to the plasma membrane may represent complementary, or perhaps synergistic, mechanisms that promote tumor cell invasion. Whether HIF-1 is also implicated in the regulation of the trafficking processes involved is currently unknown but the rapid kinetic of furin relocalization in response to hypoxia/reoxygenation and the lack of regulation of the furin gene at 2 h and 4 h (data not shown) suggest a mechanism unrelated to HIF-1 dependent gene regulation.

Anchoring of furin at the plasma membrane has been proposed to provide a mechanism for concentrating this low-abundance protease in discrete cell-surface areas of the cells (Thomas, 2002). Our data using a FLNA interaction mutant strongly support the notion that furin association with FLNA is a necessary step for furin relocalization to the basal plasma membrane under hypoxia. Because hypoxia treatment also resulted in a marked increase in FLNA-furin association, this further suggests that one of the mechanisms by which furin is relocalized under hypoxia involves an increase in furin tethering to FLNA. Even though the detailed molecular mechanism by which hypoxia regulates the binding of furin to FLNA remains to be defined, the FLNA binding motif within the cytoplasmic tail of furin overlaps with a motif ⁷⁴⁷VXVYTX⁷⁵³ that resembles the consensus recognition sequence for Src homology 2 (SH2) domains of the phosphatases SHP-1/2 (Sweeney et al., 2005). In addition, it has been shown hypoxia/reoxygenation regulates the activation of SHP-2 and its translocation into lipid raft microdomains where FLNA was found located (Park et al., 2009). This suggests that phosphorylation/dephosphorylation events might regulate the observed increase in furin tethering to the plasma membrane under hypoxia.

The pathway of furin internalization has previously been shown to be clathrin-dependent (Crump et al., 2001; Teuchert et al., 1999). Here we report that in addition to this pathway, hypoxia induces a caveolae/raft-mediated endocytic pathway that is associated with colocalization as well as enhanced interaction of furin with caveolin-1. In line with this, co-localization of furin with caveolin-1 has been previously reported in basolateral endosomes of rat hepatocytes (Mayer et al., 2003). Several lines of evidence suggest that

furin in caveolae/lipid raft microdomains is proteolytically active. The glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteoglycan Cripto has recently been shown to recruit furin into lipid raft microdomains, resulting in enhanced proteolytic maturation of Nodal and Notch-1 (Blanchet et al., 2008; Watanabe et al., 2009). In addition, MT1-MMP and integrins, two important mediators of cell invasion, have been shown to interact with caveolin-1 (Labrecque et al., 2004) and MT1-MMP was shown to be proteolytically processed into a furin-mediated active form in caveolae of cancer cells (Annabi et al., 2001). We have previously reported that hypoxia enhanced MT1-MMP processing by furin (McMahon et al., 2005). Furthermore, hypoxia triggers the compartmentalization of furin in peripheral vesicles that colocalized with MT1-MMP (Arsenault et al., unpublished observation). Therefore, the observed translocation of furin into the caveolae of hypoxic cells may favor the activation of subgroups of proteins interacting with caveolin-1. In addition to furin interaction with caveolin-1, a recent study has demonstrated that the interaction between FLNA and caveolin-1 at the plasma membrane promotes caveolae-mediated transport by regulating vesicle internalization and trafficking (Sverdlov et al., 2009). In view of our findings, that the association of furin with FLNA is essential for its redistribution to the plasma membrane, the furin-FLNA interaction observed under hypoxic conditions may be an important event in the process whereby furin translocates into lipid raft microdomains, allowing caveolin-1-dependent internalization of the convertase in peripheral recycling compartments.

Other furin substrates that are involved in cell invasion are the α -chains of integrins (Lissitzky et al., 2000). It is well established that endocytic vesicle-mediated integrin trafficking pathways serves to establish and maintain cell polarity and to control adhesion events associated with cellular responses. Important modulators of integrin vesicular trafficking are the RabGTPases, which have been shown to be implicated in cell migration and invasion. Whereas Rab11-mediated transport has been shown to be involved in tumor cell invasion and to be up-regulated by hypoxia (Yoon et al., 2005), few studies have investigated the role of the short Rab4-driven recycling path. The finding that furin is recycled to the plasma membrane through Rab4-positive vesicles, established for the first time a relationship between hypoxia and Rab4-mediated furin trafficking. The trafficking of

furin through the Rab4 recycling pathway could reduce the possibility for sorting furin to a degradative pathway, as indicated by the lack of colocalisation of furin with LAMP-1 (data not shown). The skewing of furin recycling may explain, at least in part, the observed sustained levels of the convertase at the cell periphery. In addition, recent studies have demonstrated that the α V β 3 integrin recycles through Rab4, leading to persistent and polarized cell migration (di Blasio et al., 2010; White et al., 2007). It is well known that integrin activation, mobilization, and subsequent interaction with ECM protein counter-receptors potentiate signaling events critical to early events in cell migration and invasion. Therefore, localized redistribution of furin into Rab4 recycling pathway could allow furin to interact and process rapidly recycling substrates, such as the integrins α -chain, that are essential for directed cell invasion.

The detailed mechanism by which hypoxia keeps furin into the plasma membrane/Rab4 recycling loop is currently unknown. However, this redistribution is consistent with casein kinase II (CK-II)-induced changes in the phosphorylation state of the furin acidic cluster located within its cytoplasmic tail (Jones et al., 1995). Interestingly, hypoxia was recently shown to regulate CK-II expression and activity in hepatoma cells (Pluemsampant et al., 2008). Preliminary data from our laboratory have revealed that exposure of HT-1080 cells to hypoxic conditions resulted in the relocalization of the CK-II subunits to the cell periphery. In addition, inhibition of CK-II activity in hypoxic cells significantly interfered with the redistribution of furin from the TGN to the plasma membrane (supplementary Fig.4). Based on these findings, it can be suggested that the relocalization of CK-II at the cell periphery under hypoxic conditions results in a prolonged phosphorylation state of the furin CK-II motif, keeping the enzyme within the cell surface/early endosome compartment.

Overexpression of furin is a hallmark of various cancers. This observation may be related to the fact that hypoxia has been shown to be a major regulator of furin expression. The findings reported here indicate for the first time that the hypoxic microenvironment triggers the relocalization of furin to Rab4-positive recycling vesicles as well as to caveolin-enriched microdomains. The redistribution of furin to the plasma membrane was

found to be essential to the promotion of invasion under hypoxic conditions. The fact that several invasion-related substrates were found associated with furin in these cell compartments and activated by hypoxia leads us to propose that this strategic redistribution of furin enhances its interaction with tumorigenic substrates that are involved in cell invasion and metastasis. Inhibitors of furin activity are currently being developed for testing in preclinical settings for tumor therapy (Basak et al., 2009; Hajdin et al., 2010; Remacle et al., 2010). Also, several drugs and prodrugs that specifically target levels of hypoxia that are common in tumors but rare in normal tissues are currently undergoing preclinical and clinical studies (Arabi and Piert, 2010; Denny, 2010). Because furin is a ubiquitously expressed protein essential for cellular homeostasis, particular concern ought to be raised regarding clinical translation of therapies based solely on inhibition of activity. We believe that our findings of furin translocation to the cell periphery in hypoxic zones of tumors are timely and should encourage the development of cell surface furin-specific targeting approaches.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs Stephen Leppla and Thomos Bugge for providing the LF- β -lac and PrAg-33 reagents. We also thank Drs Gilles Dupuis and Jana Stankova for critical reading of the manuscript and Dr Leonid Volkov for assistance with confocal microscopy experiments. This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). C.M.D is a member of the FRSQ-funded Centre de Recherche de Recherche Clinique Étienne-LeBel and D.A. is the recipient of a scholarship from CIHR.

Figures supplémentaires:

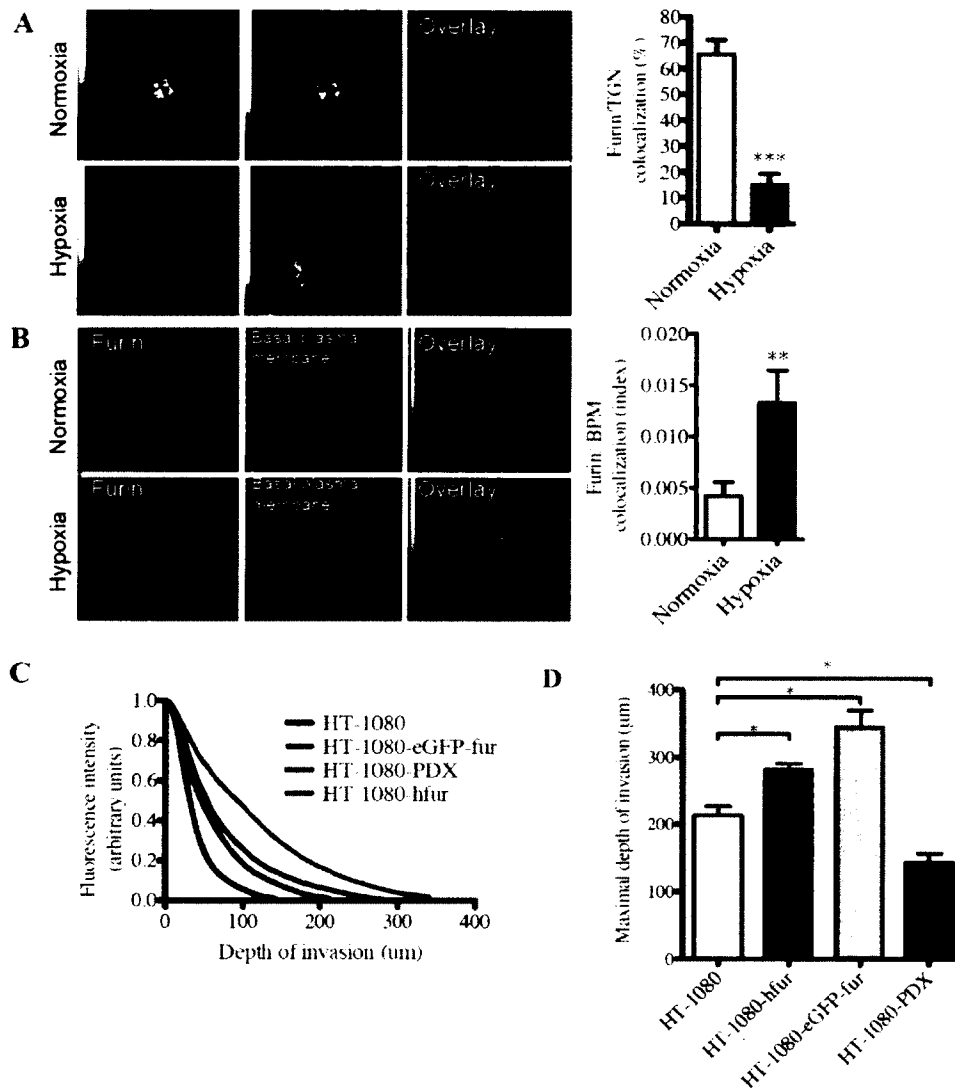


Figure supplémentaire (Chapitre 1) 1: Hypoxia induces the relocalization of untagged furin

HT-1080-hFur cells were seeded on collagen type IV-coated slides and cultured under normoxic or hypoxic atmosphere for 4 h. (A) Micrographs of furin (PAI-062; green), TGN (TGN46; red) and merged images are shown. The associated graph shows the percentage of furin colocalization with TGN. (B) Micrographs of furin (PAI-062; green), plasma membranes (DiI; red) and merged images (binary mask-overlay) are shown. The associated graph shows furin localization at the basal plasma membrane. The colocalization index was calculated as described under Materials and Methods. (C,D) In vitro cell invasion was assessed as described under Materials and Methods. HT-1080 cells stably transfected with eGFP-tagged furin, untagged furin and furin inhibitor $\alpha 1$ -PDX were allowed to invade collagen gels for 24 h. (C) Relative fluorescence intensity of the cells according to the depth of invasion. (D) Maximal depth of invasion. Column, mean; bar, SE, * $P \leq 0.047$, ** $P = 0.008$, *** $P = 0.0002$, scale bars = 5 μm , BMP, basal plasma membrane.

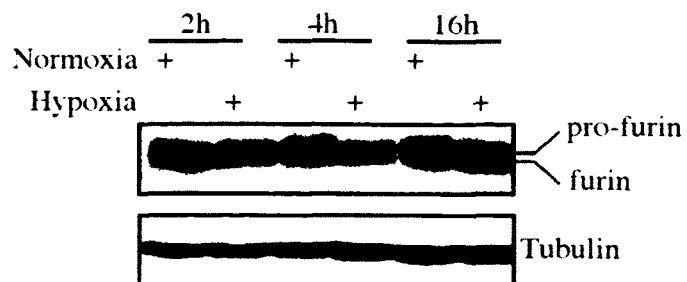


Figure supplémentaire (Chapitre 1) 1. The relative proportions of the pro- and mature forms of furin are not altered by hypoxia

HT1080 cells overexpressing furin were incubated for the indicated times under normoxic or hypoxic conditions and Western blot analysis of furin was performed using the anti-furin PAI-062 antibody. Tubulin was used as a loading control.

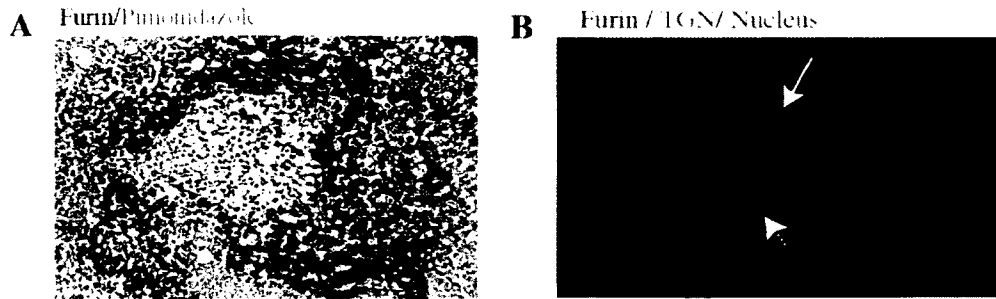


Figure supplémentaire (Chapitre 1) 2. In vivo localization of furin in tumor xenografts

HT-1080 cells were injected s.c. into CD1 nude mice. At 25 days, the tumors were excised, fixed, and processed for immunohistochemistry. Tumor xenografts were prelabeled in vivo with pimonidazole, (injection of 60 mg /kg 1 h before tumor excision) followed by immunodetection of (A) furin (peroxidase; brown) and tumor-bound pimonidazole (alkaline phosphatase; purple). These images were processed by photoshop for color enhancement. Magnification 40X. (B) Confocal micrograph showing detection of furin (green), TGN (red) and nucleus (blue) in hypoxic zones of HT-1080 xenograft tumor. Solid arrow indicates TGN that does not co-localize with furin and dashed arrow indicates furin immunostaining. Magnification 400X.

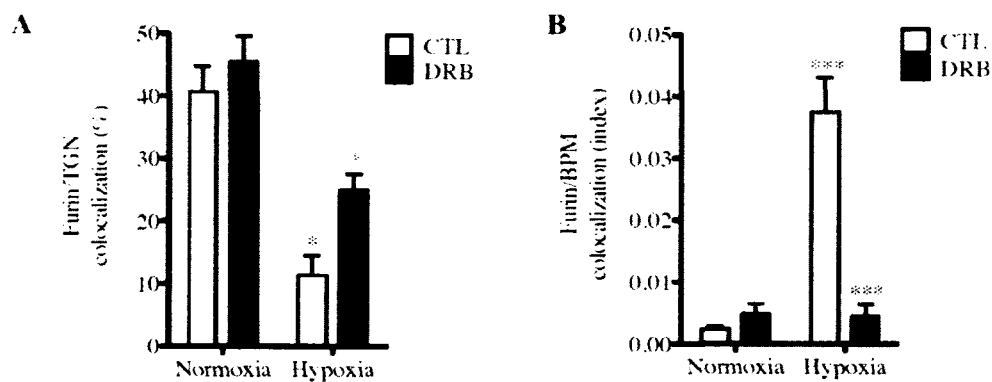


Figure supplémentaire (Chapitre 1) 3. CK-II is involved in furin relocation in hypoxic cells

(A,B) HT-1080-eGFPfur cells were seeded on collagen type IV-coated slides and incubated in the presence or absence of DRB (50 μ M) for 4 h under normoxic or hypoxic conditions. (A) Cells were fixed and immunolabelled for TGN using anti-TGN46 antibody. Percentage of colocalization of furin with TGN-46 (n= 10 cells). (B) Cells were fixed and stained with DiI for membrane visualization. Relative quantification of plasma membrane associated furin (n=10 cells). Column, mean; bar, SEM; * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.002$; BMP, basal plasma membrane.

REFERENCES

- Anderson ED, VanSlyke JK, Thulin CD, Jean F, Thomas G. 1997.** Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage. *EMBO J* 16(7):1508-1518.
- Annabi B, Lachambre M, Bousquet-Gagnon N, Page M, Gingras D, Beliveau R. 2001.** Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains. *Biochem J* 353(Pt 3):547-553.
- Arabi M, Piert M. 2010.** Hypoxia PET/CT imaging: implications for radiation oncology. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 54(5):500-509.
- Basak A, Khatib AM, Mohottalage D, Basak S, Kolajová M, Bag SS. 2009.** A novel enediynyl peptide inhibitor of furin that blocks processing of proPDGF-A, B and proVEGF-C. *PLoS One* 4(11):e7700.
- Bassi DE, Fu J, Lopez de Cicco R, Klein-Szanto AJ. 2005.** Proprotein convertases: "master switches" in the regulation of tumor growth and progression. *Mol Carcinog* 44(3):151-161.
- Belien AT, Paganetti PA, Schwab ME. 1999.** Membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter. *J Cell Biol* 144(2):373-384.
- Bergeron E, Basak A, Decroly E, Seidah NG. 2003.** Processing of alpha4 integrin by the proprotein convertases: histidine at position P6 regulates cleavage. *Biochem J* 373(Pt 2):475-484.
- Blanchet MH, Le Good JA, Mesnard D, Oorschot V, Baflast S, Minchiotti G, Klumperman J, Constam DB. 2008.** Cripto recruits Furin and PACE4 and controls Nodal trafficking during proteolytic maturation. *EMBO J* 27(19):2580-2591.
- Blanchette F, Rivard N, Rudd P, Grondin F, Attisano L, Dubois CM. 2001.** Cross-talk between the p42/p44 MAP kinase and Smad pathways in transforming growth factor beta 1-induced furin gene transactivation. *J Biol Chem* 276(36):33986-33994.
- Bontemps Y, Scamuffa N, Calvo F, Khatib AM. 2007.** Potential opportunity in the development of new therapeutic agents based on endogenous and exogenous inhibitors of the proprotein convertases. *Med Res Rev* 27(5):631-648.
- Bosshart H, Humphrey J, Deignan E, Davidson J, Drazba J, Yuan L, Oorschot V, Peters PJ, Bonifacino JS. 1994.** The cytoplasmic domain mediates localization of furin to the trans-Golgi network en route to the endosomal/lysosomal system. *J Cell Biol* 126(5):1157-1172.
- Chapman RE, Munro S. 1994.** Retrieval of TGN proteins from the cell surface requires endosomal acidification. *EMBO J* 13(10):2305-2312.
- Cormont M, Bortoluzzi MN, Gautier N, Mari M, van Obberghen E, Le Marchand-Brustel Y. 1996.** Potential role of Rab4 in the regulation of subcellular localization of Glut4 in adipocytes. *Mol Cell Biol* 16(12):6879-6886.
- Cowden Dahl KD, Robertson SE, Weaver VM, Simon MC. 2005.** Hypoxia-inducible factor regulates alpha5beta3 integrin cell surface expression. *Mol Biol Cell* 16(4):1901-1912.
- Crump CM, Xiang Y, Thomas L, Gu F, Austin C, Tooze SA, Thomas G. 2001.** PACS-1 binding to adaptors is required for acidic cluster motif-mediated protein traffic. *EMBO J* 20(9):2191-2201.

- Denny WA. 2010.** Hypoxia-activated prodrugs in cancer therapy: progress to the clinic. *Future Oncol* 6(3):419-428.
- di Blasio L, Droetto S, Norman J, Bussolino F, Primo L. 2010.** Protein kinase D1 regulates VEGF-a-induced alphavbeta3 integrin trafficking and endothelial cell migration. *Traffic* 11(8):1107-1118.
- Fletcher SJ, Rappoport JZ. 2009.** The role of vesicle trafficking in epithelial cell motility. *Biochem Soc Trans* 37(Pt 5):1072-1076.
- Gort EH, Groot AJ, van der Wall E, van Diest PJ, Vooijs MA. 2008.** Hypoxic regulation of metastasis via hypoxia-inducible factors. *Curr Mol Med* 8(1):60-67.
- Grant BD, Donaldson JG. 2009.** Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(9):597-608.
- Hajdin K, D'Alessandro V, Niggli FK, Schafer BW, Bernasconi M. 2010.** Furin targeted drug delivery for treatment of rhabdomyosarcoma in a mouse model. *PLoS One* 5(5):e10445.
- Hobson JP, Liu S, Rono B, Leppla SH, Bugge TH. 2006.** Imaging specific cell-surface proteolytic activity in single living cells. *Nat Methods* 3(4):259-261.
- Hotary K, Allen E, Punturieri A, Yana I, Weiss SJ. 2000.** Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *J Cell Biol* 149(6):1309-1323.
- Jones BG, Thomas L, Molloy SS, Thulin CD, Fry MD, Walsh KA, Thomas G. 1995.** Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation state of a casein kinase II site in its cytoplasmic tail. *EMBO J* 14(23):5869-5883.
- Khatib AM, Bassi D, Siegfried G, Klein-Szanto AJ, Ouafik L. 2005.** Endo/exo-proteolysis in neoplastic progression and metastasis. *J Mol Med* 83(11):856-864.
- Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, Iyer N, LaRusch J, Pak B, Taghavi P, Semenza GL. 2003.** Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 63(5):1138-1143.
- Labrecque L, Nyalendo C, Langlois S, Durocher Y, Roghi C, Murphy G, Gingras D, Beliveau R. 2004.** Src-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 induces its association with membrane type 1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 279(50):52132-52140.
- Le QT, Denko NC, Giaccia AJ. 2004.** Hypoxic gene expression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 23(3-4):293-310.
- Lissitzky JC, Luis J, Munzer JS, Benjannet S, Parat F, Chretien M, Marvaldi J, Seidah NG. 2000.** Endoproteolytic processing of integrin pro-alpha subunits involves the redundant function of furin and proprotein convertase (PC) 5A, but not paired basic amino acid converting enzyme (PACE) 4, PC5B or PC7. *Biochem J* 346 Pt 1:133-138.
- Liu G, Thomas L, Warren RA, Enns CA, Cunningham CC, Hartwig JH, Thomas G. 1997.** Cytoskeletal protein ABP-280 directs the intracellular trafficking of furin and modulates proprotein processing in the endocytic pathway. *J Cell Biol* 139(7):1719-1733.
- Lunt SJ, Chaudary N, Hill RP. 2009.** The tumor microenvironment and metastatic disease. *Clin Exp Metastasis* 26(1):19-34.
- Manders, E. M. M., F. J. Verbeek, and J. A. Aten. 1993.** Measurement of objects in dual-color confocal images. *J. Microsc.* 169:375-382.)
- Mayer G, Boileau G, Bendayan M. 2003.** Furin interacts with proMT1-MMP and integrin alphaV at specialized domains of renal cell plasma membrane. *J Cell Sci* 116(Pt 9):1763-1773.

- McMahon S, Grondin F, McDonald PP, Richard DE, Dubois CM. 2005.** Hypoxia-enhanced expression of the proprotein convertase furin is mediated by hypoxia-inducible factor-1: impact on the bioactivation of proproteins. *J Biol Chem* 280(8):6561-6569.
- McMahon S, Laprise MH, Dubois CM. 2003.** Alternative pathway for the role of furin in tumor cell invasion process. Enhanced MMP-2 levels through bioactive TGFbeta. *Exp Cell Res* 291(2):326-339.
- Molloy SS, Thomas L, Kamibayashi C, Mumby MC, Thomas G. 1998.** Regulation of endosome sorting by a specific PP2A isoform. *J Cell Biol* 142(6):1399-1411.
- Molloy SS, Thomas L, VanSlyke JK, Stenberg PE, Thomas G. 1994.** Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J* 13(1):18-33.
- Park SJ, Kim HY, Kim H, Park SM, Joe EH, Jou I, Choi YH. 2009.** Oxidative stress induces lipid-raft-mediated activation of Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase 2 in astrocytes. *Free Radic Biol Med* 46(12):1694-1702.
- Pluemsampant S, Safronova OS, Nakahama K, Morita I. 2008.** Protein kinase CK2 is a key activator of histone deacetylase in hypoxia-associated tumors. *Int J Cancer* 122(2):333-341.
- Remacle AG, Gawlik K, Golubkov VS, Cadwell GW, Liddington RC, Cieplak P, Millis SZ, Desjardins R, Routhier S, Yuan XW, Neugebauer WA, Day R, Strongin AY. 2010.** Selective and potent furin inhibitors protect cells from anthrax without significant toxicity. *Int J Biochem Cell Biol* 42(6):987-995.
- Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, Sandvig K. 1999.** Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* 10(4):961-974.
- Sato H, Okada Y, Seiki M. 1997.** Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in cell invasion. *Thromb Haemost* 78(1):497-500.
- Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. 1994.** A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370(6484):61-65.
- Schafer W, Stroh A, Berghofer S, Seiler J, Vey M, Kruse ML, Kern HF, Klenk HD, Garten W. 1995.** Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. *EMBO J* 14(11):2424-2435.
- Shapiro J, Sciaky N, Lee J, Bosshart H, Angeletti RH, Bonifacino JS. 1997.** Localization of endogenous furin in cultured cell lines. *J Histochem Cytochem* 45(1):3-12.
- Siegfried G, Basak A, Cromlish JA, Benjannet S, Marcinkiewicz J, Chretien M, Seidah NG, Khatib AM. 2003.** The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J Clin Invest* 111(11):1723-1732.
- Siegfried G, Basak A, Prichett-Pejic W, Scamuffa N, Ma L, Benjannet S, Veinot JP, Calvo F, Seidah N, Khatib AM. 2005.** Regulation of the stepwise proteolytic cleavage and secretion of PDGF-B by the proprotein convertases. *Oncogene* 24(46):6925-6935.
- Sternlicht MD, Werb Z. 2001.** How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516.
- Sverdlov M, Shinin V, Place AT, Castellon M, Minshall RD. 2009.** Filamin A regulates caveolae internalization and trafficking in endothelial cells. *Mol Biol Cell* 20(21):4531-4540.

- Sweeney MC, Wavreille AS, Park J, Butchar JP, Tridandapani S, Pei D. 2005.** Decoding protein-protein interactions through combinatorial chemistry: sequence specificity of SHP-1, SHP-2, and SHIP SH2 domains. *Biochemistry* 44(45):14932-14947.
- Teuchert M, Berghofer S, Klenk HD, Garten W. 1999.** Recycling of furin from the plasma membrane. Functional importance of the cytoplasmic tail sorting signals and interaction with the AP-2 adaptor medium chain subunit. *J Biol Chem* 274(51):36781-36789.
- Therriault C, Rochdi MD, Parent JL. 2004.** Role of the Rab11-associated intracellular pool of receptors formed by constitutive endocytosis of the beta isoform of the thromboxane A2 receptor (TP beta). *Biochemistry* 43(19):5600-5607.
- Thomas G. 2002.** Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(10):753-766.
- Ullrich O, Reinsch S, Urbe S, Zerial M, Parton RG. 1996.** Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol* 135(4):913-924.
- Van Elzen R, Ghesquiere B, Timmerman E, Vandamme S, Moens L, Gevaert K, Dewilde S. 2010.** Integrated proteomic analysis reveals a substantial enrichment of protein trafficking processes in hippocampus tissue after hypoxic stress. *J Proteome Res* 9(1):204-215.
- Wan L, Molloy SS, Thomas L, Liu G, Xiang Y, Rybak SL, Thomas G. 1998.** PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Golgi network localization. *Cell* 94(2):205-216.
- Wang LH, Rothberg KG, Anderson RG. 1993.** Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* 123(5):1107-1117.
- Watanabe K, Nagaoka T, Lee JM, Bianco C, Gonzales M, Castro NP, Rangel MC, Sakamoto K, Sun Y, Callahan R, Salomon DS. 2009.** Enhancement of Notch receptor maturation and signaling sensitivity by Cripto-1. *J Cell Biol* 187(3):343-353.
- White DP, Caswell PT, Norman JC. 2007.** alpha v beta3 and alpha5beta1 integrin recycling pathways dictate downstream Rho kinase signaling to regulate persistent cell migration. *J Cell Biol* 177(3):515-525.
- Yoon SO, Shin S, Mercurio AM. 2005.** Hypoxia stimulates carcinoma invasion by stabilizing microtubules and promoting the Rab11 trafficking of the alpha6beta4 integrin. *Cancer Res* 65(7):2761-2769.

CHAPITRE 2: INFLUENCE DU pH ACIDE SUR LA MATURATION DU TGF β

Résultats (format traditionnel)

Le premier article présenté dans cette thèse démontrait que le microenvironnement hypoxique influence la localisation intracellulaire de la convertase de pro-protéines furine. En effet, suite à une stimulation en condition hypoxique des cellules HT-1080, la furine était relocalisée dans une boucle de recyclage entre la membrane plasmique et les endosomes de recyclage. Cette relocalisation induisait un phénotype invasif des cellules cancéreuses et favorisait l'invasion de la matrice extracellulaire. Afin d'élucider davantage le rôle de la relocalisation de la furine en périphérie cellulaire, nous nous sommes intéressés à ses fonctions d'activation de pro-protéines, en utilisant comme modèle le TGF β . Nous avons tout d'abord vérifié si le pH acide des vésicules intracellulaires favorisait la maturation du TGF β . D'un point de vue biochimique, nous avons par la suite vérifié le rôle des histidines, des senseurs de pH, dans le site de clivage du TGF β et dans la maturation de la pro-protéine. Finalement, nous avons étudié dans quels compartiments cellulaires la maturation du TGF β avait lieu, en intervenant dans la régulation du pH des vésicules intracellulaires. Nous avons également évalué l'impact fonctionnel de la maturation du TGF β dépendante du pH dans l'invasion cellulaire.

Contribution de l'étudiant :

En ce qui concerne les travaux contenus dans le deuxième chapitre de cette thèse, Dominique Arsenault a réalisé toutes les expériences présentées dans cette section à l'exception des figures 4D et 8 qui ont été réalisées par Fabrice Lucien. Dominique Arsenault a également participé à l'ébauche du plan de travail avec sa directrice, P^{re} Claire M. Dubois.

Schématisation de l'étude et hypothèse

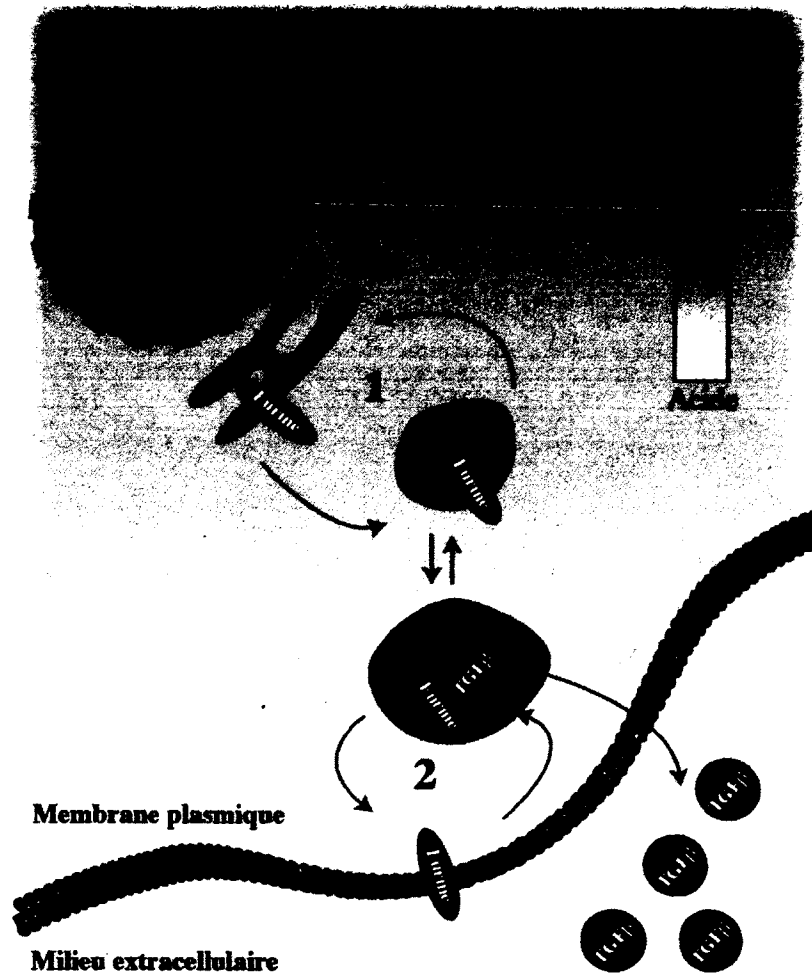


Schéma 1. Hypothèse du chapitre 2

Au chapitre 1, nous avons vu que l'hypoxie induisait la relocalisation de la furine dans une boucle de recyclage entre la membrane plasmique et les endosomes en périphérie cellulaire (1). Ces endosomes sont caractérisés par un pH intravésiculaire acide. De plus, le site de maturation du pro-TGFβ par la furine contient des histidines, des acides aminés senseurs de pH, qui sont protonés en milieu acide. Ainsi, la présence d'histidines dans le site de clivage du TGFβ pourrait favoriser son interaction avec son enzyme de conversion, la furine. Cette dernière est relocalisée en hypoxie dans des vésicules acides localisées en périphérie cellulaire, une situation qui favorise le clivage protéolytique du TGFβ (2).

Influence du pH acide dans la maturation du TGF β .

Tel que mentionné dans l'introduction, le pH des vésicules intracellulaires varie selon le compartiment. En effet, les vésicules de recyclage localisées en périphérie cellulaire sont plus acides que les compartiments périnucléaires où l'on retrouve un pH neutre. Nous nous sommes donc intéressés à l'influence du pH acide sur la maturation du TGF β . Les cellules HT-1080 produisent des quantités faibles de TGF β endogène, ce qui rend difficile sa détection par immunobuvardage. Nous avons donc surexprimé de façon transitoire le TGF β de type sauvage afin de le détecter adéquatement. Suite à la transfection, les cellules ont été incubées 24h avant d'être privées de sérum pour 16h. Par la suite les cellules ont été incubées 16h en présence d'agents neutralisants. Les surnageants ont été récoltés, dialysés et lyophilisés avant d'effectuer des immunobuvardages à l'aide d'anticorps dirigés contre le peptide LAP. Cette technique nous permet de détecter la pro-forme ainsi que sa forme mature du TGF β . Tel qu'illustré à la figure 1A, la maturation basale du TGF β chez les HT-1080 est d'environ 80%. Suite à la neutralisation du pH intracellulaire avec le NH₄Cl à des concentrations de 5mM et 50mM, la maturation du TGF β diminue significativement à 75% et 20% respectivement. De plus, l'utilisation de la chloroquine à des concentrations de 10 μ M et 30 μ M inhibe complètement la maturation du TGF β . Ces résultats suggèrent que le milieu intracellulaire acide est important pour le clivage protéolytique du pro-TGF β par la furine et que la neutralisation du pH influence directement la capacité de maturation du TGF β par la furine. L'utilisation de bases faibles neutralise de façon générale le pH intracellulaire, autant au niveau des endosomes que du cytoplasme. Afin de déterminer l'influence du pH intravésiculaire, nous avons utilisé le tamoxifène, une base faible connue pour neutraliser le pH des compartiments intracellulaires (Miguel et al., 2007) (Figure 1B). Les résultats démontrent que suite à une stimulation avec le tamoxifène à une concentration de 10 μ M, la maturation du TGF β est drastiquement diminuée, passant de 88% chez les cellules contrôles à 55% chez les cellules dont le pH des vésicules intracellulaires a été neutralisé. Ces résultats démontrent que le pH intracellulaire, et plus spécifiquement le pH intravésiculaire acide, favorise le clivage protéolytique du pro-TGF β .

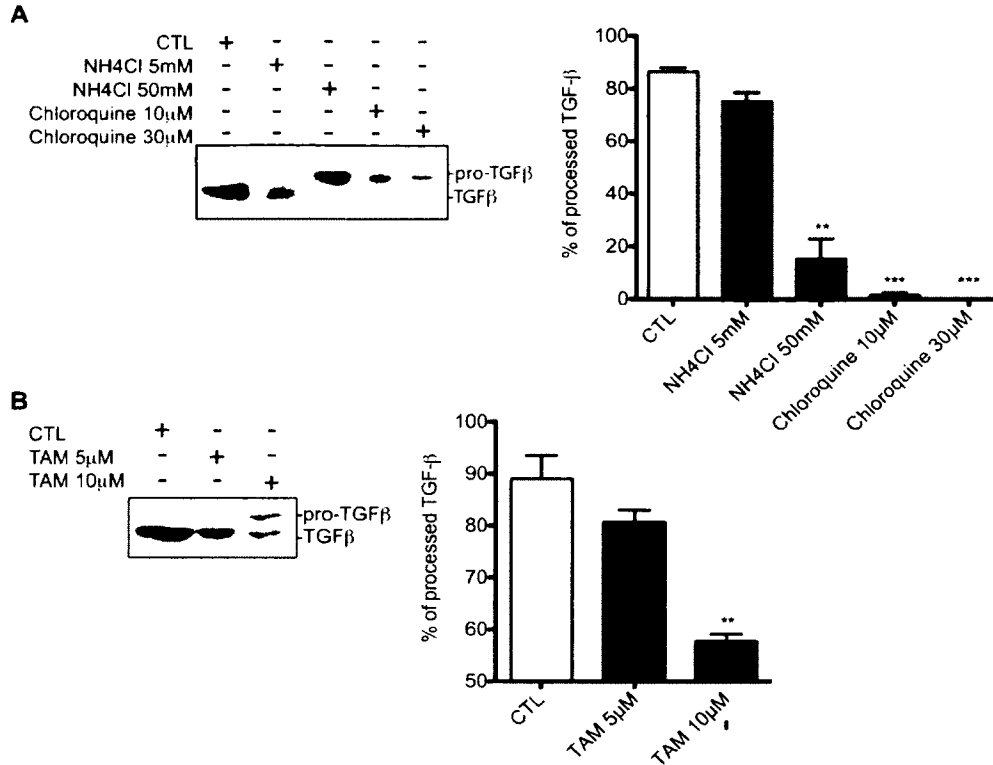


Figure (Chapitre 2) 1: La neutralisation du pH intracellulaire inhibe la maturation du TGF β

Les cellules HT-1080 ont été ensemencées à une concentration de 10×10^6 /pétri et transfectées de façon transitoire avec le CMV-TGF β 1. Les cellules ont été privées de sérum durant 16h et incubées pour 16h avec (A) NH₄Cl ou la chloroquine ou (B) le tamoxifène (TAM) aux concentrations indiquées. Les surnageants ont été récoltés, dialysés et lyophilisés avant d'être révélés par immunobuvardage avec un anticorps contre le LAP. Les colonnes représentent le % moyen de TGF β maturé de 3 expériences indépendantes. Le % de maturation du TGF β a été mesuré par densitométrie de la forme mature de TGF β sur le total de TGF β (pro-TGF β et forme mature du TGF β) en utilisant le logiciel Image J. Colonne, moyenne; p, *** = 0.005, ** < 0.008.

Rôle des histidines dans la maturation du TGF β .

Le TGF β est hautement conservé entre les espèces. De façon intéressante, on retrouve au site de clivage du TGF β par la furine, des histidines, des acides aminés aux propriétés de senseur de pH. Une étude récente a démontré le rôle d'une histidine dans le clivage protéolytique du pro-peptide de la furine. L'étude démontrait que l'histidine 69 situé dans le pro-peptide de la furine agissait comme senseur de pH et qu'en milieu acide, la protonation de l'histidine induisait un changement conformationnel du pro-peptide afin

de permettre l'auto-clivage du pro-peptide de la furine et assurer sa bio-activation (Dillon et al., 2012). Afin de déterminer l'importance de ces acides aminés dans la maturation du TGF β , nous avons aligné les séquences partielles du TGF β 1 de différentes espèces de mammifère. La conservation d'acides aminés entre les espèces reflète un rôle important de cet acide aminé dans ses fonctions biologiques. En figure 2A, nous avons illustré les séquences partielles du TGF β 1 de différents mammifères et identifié en rouge les différentes histidines dans la structure primaire ainsi que leur position. Il est important de noter que l'histidine 276 se retrouve dans le site de clivage du pro-TGF β 1 par la furine et que l'histidine 270 est proximale au site de clivage. Les séquences ont été obtenues de la base de données en ligne Uniprot (<http://www.uniprot.org>). Nous avons par la suite quantifié la valeur de conservation des différentes histidines à l'aide du serveur en ligne Conserf (<http://consurf.tau.ac.il>). En figure 2B, nous avons illustré les valeurs de conservation des histidines par un histogramme. Lorsque la valeur est négative, ceci indique que l'histidine est hautement conservée entre les espèces. À l'opposé, une valeur positive indique une grande variabilité entre les espèces. Les résultats indiquent que les histidines 129, 167, 222, 276, 312, 318 et 346 sont conservées entre les espèces. Puisque nous nous intéressons à la maturation du TGF β 1 par la furine, l'histidine 276 qui se retrouve dans le site de clivage et l'histidine 270 qui est proximale au site de clivage du pro-TGF β par la furine ont été ciblées dans cette étude. Il est intéressant de constater que l'histidine 276 est hautement conservée entre les espèces tandis que l'histidine proximale a une plus grande variabilité. Ces résultats suggèrent un rôle important de l'histidine 276 dans les fonctions biologiques de la protéine, un phénomène possiblement relié au clivage protéolytique par la furine. Ainsi, la présence d'une histidine conservée dans le site de clivage du pro-TGF β par la furine pourrait jouer un rôle de senseur du pH et favoriser le clivage protéolytique du pro-TGF β en milieu acide.

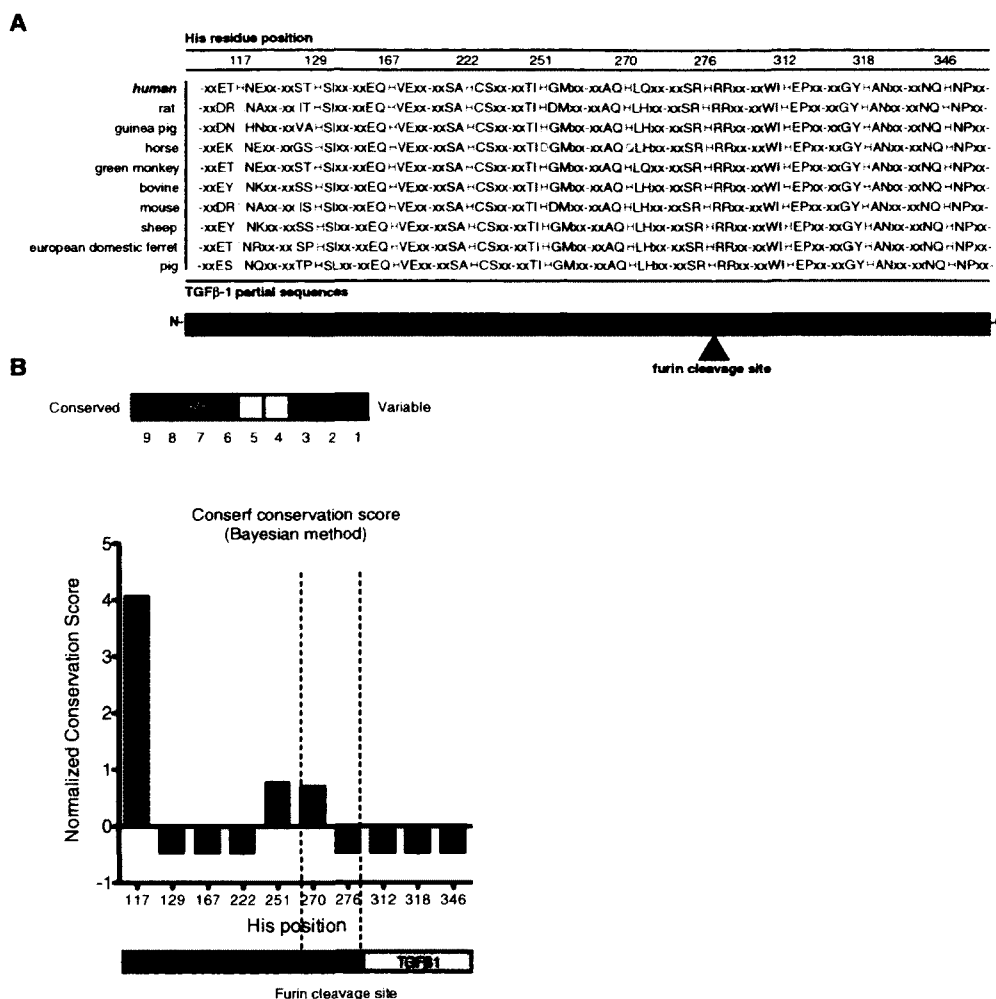


Figure (Chapitre 2) 1. Conservation des histidines dans le site de clivage protéolytique furine-dépendant du TGFβ1

(A) Alignement partiel des séquences de mammifères du TGFβ1 identifiant les résidus histidines aux différentes positions. (B) Valeurs de conservation du TGFβ1 humain comparé aux différentes séquences de mammifères. Les valeurs normalisées de conservation ont été obtenues en utilisant le serveur Conserf. Les lignes pointillées encadrent les deux résidus histidines à l'intérieur ou à proximité du site de clivage du TGFβ1 par la furine.

Les histidines sont des acides aminés senseurs de pH dont l'état de protonation est très sensible aux variations faibles de pH physiologiques. Les résultats précédents suggèrent que le pH intracellulaire influence la maturation du TGFβ. Ainsi, nous avons voulu étudier l'importance de l'état de protonation des histidines au site de clivage du pro-TGFβ1 dans sa maturation par la furine. Pour cela, nous avons construit différents mutants

du TGF β 1 où nous avons muté l'histidine 276 (P3) et 270 (P9) par une alanine, qui mime un état non-protoné, ou par une arginine, qui mime un état protoné (figure 3A). Nous avons par la suite transfecté de façon transitoire des cellules HEK293 et HT-1080 avec les différents mutants du TGF β afin de vérifier l'efficacité des constructions et l'expression adéquate de la protéine. Tel que démontré à la figure 3B, la surexpression du TGF β chez les cellules HEK293 entraîne une forte sécrétion de TGF β dans le milieu extracellulaire et la grande majorité du TGF β sécrété est sous forme mature (70-85%). Il est à noter que le TGF β intracellulaire se retrouve sous forme immature (Dubois et al., 1995), ainsi, seul le TGF β sécrété est présenté dans les figures suivantes. La surexpression du mutant CMV-TGF β -P3A, qui mime l'état non protoné du pro-TGF β , diminue la production de la forme mature de TGF β autant chez les cellules HT-1080 (figure 3C) que chez les cellules HEK293 (figure 3D). À l'opposé, la surexpression du mutant CMV-TGF β -P3R, qui mime l'état protoné de l'histidine P3, augmente significativement la maturation du TGF β sécrété chez les HT-1080 et n'influence pas celle des HEK293 par rapport aux cellules contrôles. Ces résultats suggèrent que l'état de protonation de l'histidine en P3 est important pour la maturation du pro-TGF β par la furine dans les cellules HT-1080. Par ailleurs, la mutation P9A semble affecter la production du TGF β (Figure 3B). Il a donc été impossible de détecter la protéine encodée par le mutant CMV-TGF β -P9A suite à la surexpression. Ces résultats suggèrent que le milieu acide des compartiments intracellulaires affecte la protonation de l'histidine 276, qui lorsque chargée positivement, favorise le clivage protéolytique de pro-TGF β par la furine. Par contre, d'autres études par spectrométrie de masse et de simulation de dynamique moléculaires sont nécessaires afin de déterminer si le milieu acide intracellulaire induit la protonation de l'histidine 276 et si cette protonation entraîne un changement conformationnel de la pro-protéine.

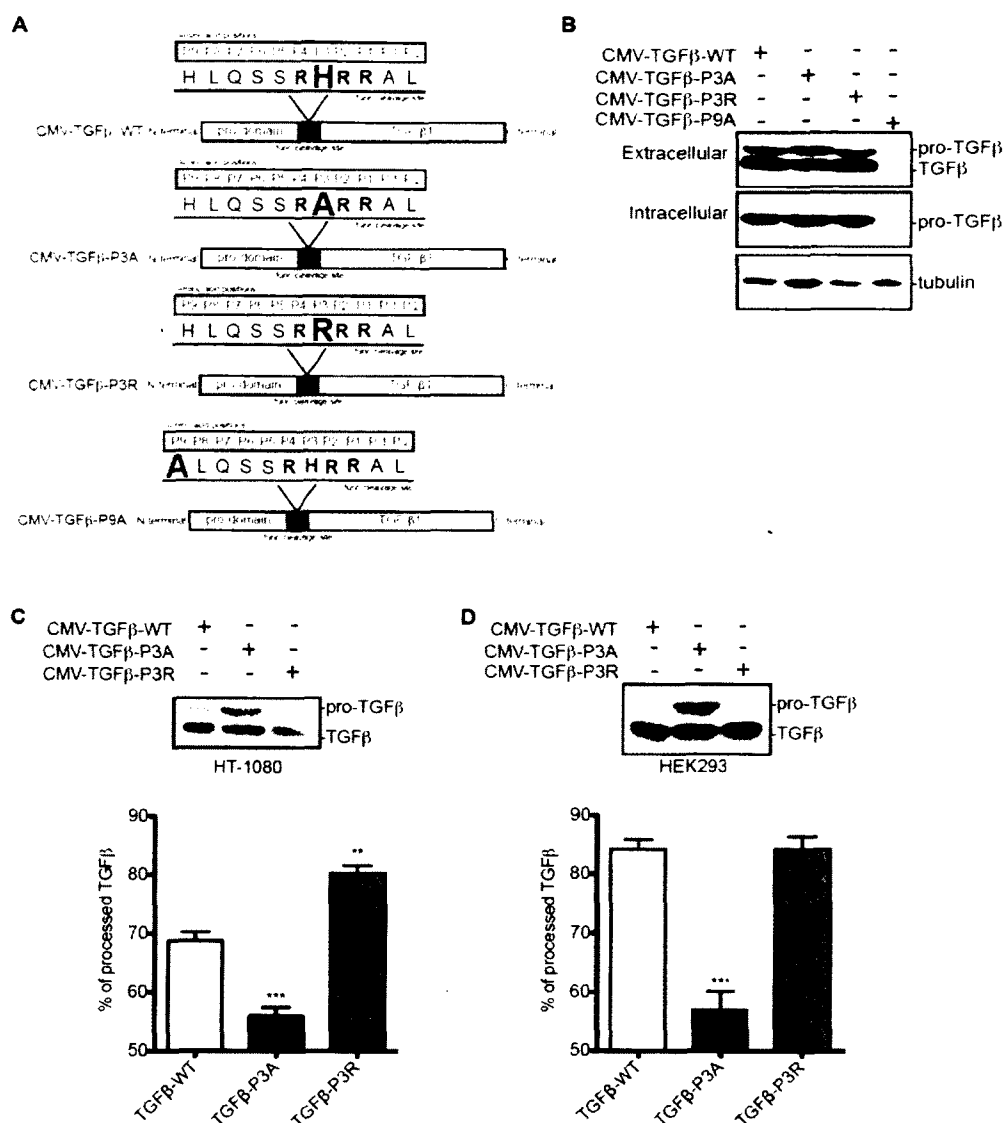


Figure (Chapitre 2) 2. La maturation du TGFβ est dépendante de la protonation des histidines

(A) Représentation schématique des mutants du pro-TGFβ. CMV-TGFβ-P3A mime un état non-protoné de l'histidine 276 (P3), CMV-TGFβ-P3R mime un état protoné de l'histidine 276 (P3) alors que CMV-TGFβ-P9A mime un état non-protoné de l'histidine 270 (P9). (B-D) Les cellules HEK293 ou (C) HT-1080 ont été transfectées de façon transitoire avec les plasmides CMV-TGFβ-P3A, CMV-TGFβ-P3R et CMV-TGFβ-P9A. Les cellules ont été privées de sérum durant 16h et les surnageants ont été récoltés après une incubation de 16h. Les surnageants ont été dialysés et lyophilisés avant d'être révélés par immunobuvardage avec un anticorps contre le LAP. Les colonnes représentent le % de TGFβ maturé de 3 expériences indépendantes. Le % de maturation du TGFβ a été mesuré par densitométrie de la forme mature de TGFβ sur le total de TGFβ (pro-TGFβ et forme mature de TGFβ) en utilisant le logiciel Image J. Colonnes, moyenne; p, *** = 0.001, p, ** = 0.005.

La maturation du pro-TGF β par la furine a lieu dans des vésicules de recyclage en périphérie cellulaire.

Étant donné que le pH intracellulaire acide semble important pour le clivage protéolytique du pro-TGF β et que la mutation de l'histidine 276 par une arginine favorise la maturation du pro-TGF β par la furine, nous avons voulu identifier dans quels compartiments cellulaires le clivage protéolytique avait lieu. Premièrement, afin de déterminer si la maturation du TGF β avait lieu dans des compartiments endosomaux/lysosomaux acides, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique de la V-ATPase, la bafilomycine A1. La V-ATPase est une pompe à protons qui se localise principalement à la surface des endosomes et des lysosomes et qui a pour rôle d'acidifier les vésicules par un transport actif de protons à l'intérieur du compartiment. À la figure 4A, les cellules HT-1080 ont été transfectées de façon transitoire avec le TGF β et incubées durant 16h avec la bafilomycine A1 à des concentrations de 50 et 100nM. Les résultats indiquent que l'inhibition pharmacologique de la V-ATPase diminue significativement la maturation du TGF β sécrété. On peut donc conclure que la maturation du TGF β s'effectue dans des vésicules intracellulaires acides, possiblement les endosomes et/ou les lysosomes.

Par la suite, nous avons voulu déterminer de façon plus spécifique la nature des vésicules dans lesquelles le clivage protéolytique du pro-TGF β avait lieu. Pour ce faire, nous avons surexprimé différents échangeurs de protons, les NHEs. Les NHEs sont des échangeurs de cations localisés soit à la membrane plasmique (NHE1-5) ou dans différents compartiments cellulaires (NHE6-9). La surexpression des NHEs vésiculaires a pour effet de basifier le compartiment dans lequel ils sont localisés (Nakamura et al., 2005), nous permettant ainsi d'identifier par immunobuvardage le compartiment dans lequel la maturation pH-dépendante du TGF β a lieu. À la figure 4B, la co-expression du TGF β et du NHE6, un échangeur localisé aux endosomes précoces et de recyclage, diminue drastiquement la maturation du TGF β , passant de 66% chez le contrôle à 9% chez les cellules surexprimant le NHE6. Par ailleurs, la surexpression de NHE7, un échangeur localisé au TGN, influence de façon beaucoup moins importante la maturation du TGF β diminuant le pourcentage de maturation du TGF β à 43%. De plus, la surexpression de NHE9, un échangeur localisé aux endosomes tardifs, n'a pas ou très peu d'influence sur la

maturation du TGF β . Ces résultats suggèrent que la maturation du TGF β s'effectue en majorité dans les endosomes précoces et/ou les endosomes de recyclage et de façon moins importante au TGN. Ils démontrent également l'importance du pH acide de ces compartiments dans la maturation du TGF β . Afin de vérifier si l'état de protonation du site P3H joue un rôle important dans la maturation du TGF β dans les compartiments NHE6 positifs, nous avons surexprimé le mutant TGF β -P3R, qui simule un état constitutivement protoné, en présence ou en absence de NHE6 surexprimé. La surexpression du mutant TGF β -P3R augmente faiblement la maturation du TGF β , tel que vu précédemment, passant de 69% pour le TGF β de type sauvage à 87% pour le mutant. Lorsque le mutant TGF β -P3R est co-exprimé avec NHE6, il n'y a aucune différence significative dans la maturation du TGF β (Figure 4C). Ces résultats indiquent que l'état de protonation de l'histidine P3H est un facteur prédominant pour la maturation du TGF β dans les compartiments NHE6 positifs, soit les endosomes précoces et les endosomes de recyclage.

Étant donné que parmi les NHE étudiés, c'est la surexpression de NHE6 qui influence le plus la maturation du TGF β , nous avons vérifié l'impact de cette surexpression sur le pH vésiculaire. À l'aide de la microscopie confocale, nous avons mesuré le pH endosomal/lysosomal suite à une incubation de 16h avec la sonde HPTS tel que décrit dans la section matériel et méthodes. À la figure 4D, nous observons que la surexpression de NHE6 mène à l'augmentation du pH endosomal/lysosomal, c'est-à-dire à la basification de l'endosome, ce qui corrobore les résultats d'études précédentes qui démontrent que la surexpression des NHEs vésiculaires basifie le compartiment dans lequel ils sont localisés (Nakamura et al., 2005).

Afin de vérifier la localisation du NHE6 surexprimé dans notre système cellulaire, nous avons utilisé différents marqueurs de compartiments intracellulaires chez les cellules surexprimant le NHE6GFP. À la figure 4E, le NHE6 colocalise avec le EEA1, un marqueur des endosomes précoces, ainsi qu'avec la transferrine et le Rab4, deux marqueurs des endosomes de recyclages. Par contre, aucune colocalisation n'est observée entre NHE6 et Rab7, un marqueur des endosomes tardifs et des lysosomes. Ces résultats démontrent que le NHE6 surexprimé se localise au niveau des endosomes précoces et de recyclages et que la surexpression de NHE6 n'entraîne pas sa relocalisation ou un débordement au niveau des

endosomes tardifs. Mis ensemble, ces résultats démontrent que la maturation du pro-TGF β a lieu dans les endosomes de recyclages qui sont positifs pour NHE6.

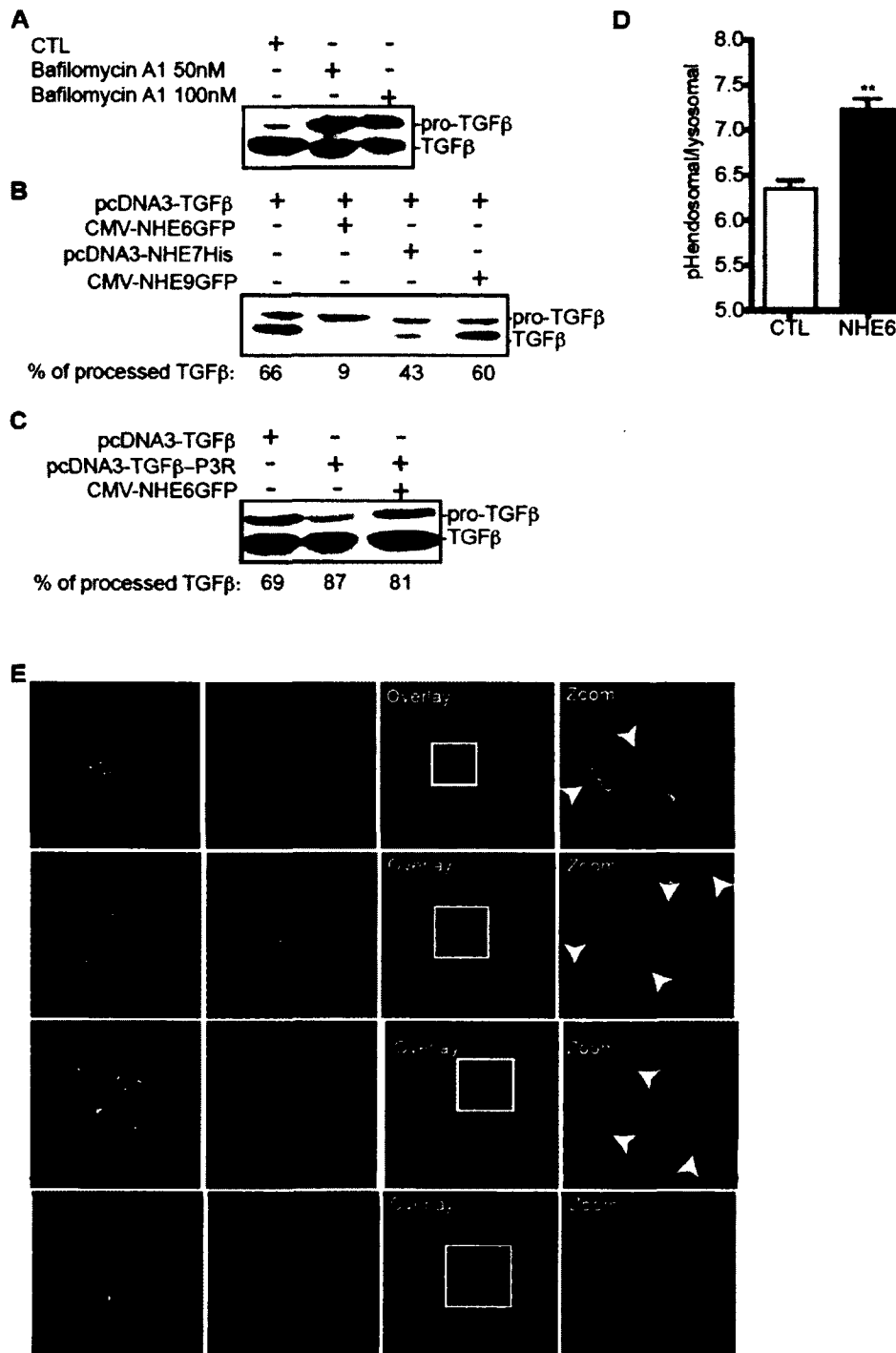


Figure (Chapitre 2) 3. La basification des compartiments intracellulaires affecte la maturation du TGF β

(A) Les cellules HT-1080 ont étéensemencées à une concentration de 10×10^6 /pétri et transfectées de façon transitoire avec le TGF β 1. Les cellules ont été privées de sérum durant 16h et incubées 16h avec de la bafilomycine A1 aux concentrations indiquées. Les surnageants ont été récoltés, dialysés et lyophilisés avant d'être révélés avec un anticorps contre le LAP par immunobuvardage. (B) Les plasmides TGF β 1, NHE6GFP, NHE7his, NHE9GFP ou (C) TGF β 1, TGF β 1-P3R et NHE6GFP ont été transfectés de façon transitoire dans les cellules HT-1080. Les cellules ont été privées de sérum durant 16h et les surnageants ont été récoltés après 16h de stimulation. Les surnageants ont été dialysés et lyophilisés avant d'être révélés par un anticorps contre le LAP par immunobuvardage. (D) Mesure du pH des vésicules endosomales/lysosomales suite à l'endocytose de la sonde HPTS dans des cellules transfectées avec NHE6GFP. (E) Micrographies de NHE6GFP (vert) démontrant la colocalisation entre NHE6GFP et EEA1, Tfn et Rab4 (rouge). NHE6GFP ne démontre pas de colocalisation avec NHE7 (rouge). Colonnes, moyenne; p, * = 0.05. Échelle, 5 μ m.

La localisation de la furine dans la boucle de recyclage membrane plasmique-endosomes de recyclage favorise la maturation du TGF β .

Dans l'étude précédente, nous avons démontré que l'hypoxie induisait la relocalisation de la furine en périphérie cellulaire dans une boucle de recyclage entre la membrane plasmique et les endosomes de recyclage. De plus, la liaison de la furine à la filamine-A était essentielle pour la relocalisation de la furine à la membrane plasmique. Afin de déterminer l'importance de la relocalisation de la furine en hypoxie dans la maturation du TGF β , les cellules HT-1080 ont été co-transfectées avec le TGF β sauvage et la furine GFP ou un mutant du site d'interaction de la filamineA par la furine (eGFP-fur-FilA) qui empêche la localisation de la furine à la membrane plasmique (Arsenault et al., 2012). Suite à une incubation de 16h, les surnageants ont été récoltés et l'analyse de la maturation du TGF β a été fait par immunobuvardage. La surexpression de la furine GFP induit la maturation complète du pro-TGF β . Par ailleurs, lorsqu'on surexprime le mutant furine-filamine-A (eGFP-fur-FilA), ceci a pour effet de diminuer l'efficacité de maturation du TGF β par rapport au contrôle furine GFP (Figure 5A). Par la suite nous avons co-transfecté le Rab4 sauvage ainsi que le dominant négatif de Rab4 (Q67L) avec le TGF β afin d'étudier l'importance de la boucle de recyclage entre la membrane plasmique et les endosomes dans la maturation du pro-TGF β (Figure 5B). La surexpression de Rab4 augmente légèrement la maturation du TGF β passant de 77% au contrôle à 83% avec la

surexpression de Rab4. À l'opposé, l'expression du dominant négatif Rab4Q67L inhibe de façon importante la maturation du TGF β passant à 8% de TGF β mature. Ces résultats indiquent que la localisation de la furine dans la boucle de recyclage entre la membrane plasmique et les endosomes de recyclage favorise la maturation du pro-TGF β . À noter que ces résultats ont été effectués en normoxie. Malgré que l'hypoxie induit fortement la relocalisation de la furine dans cette boucle de recyclage (chapitre 1), un faible pourcentage de la furine recycle en normoxie. D'autres expériences devront être effectuées afin de démontrer l'importance de cette boucle de recyclage en condition hypoxique.

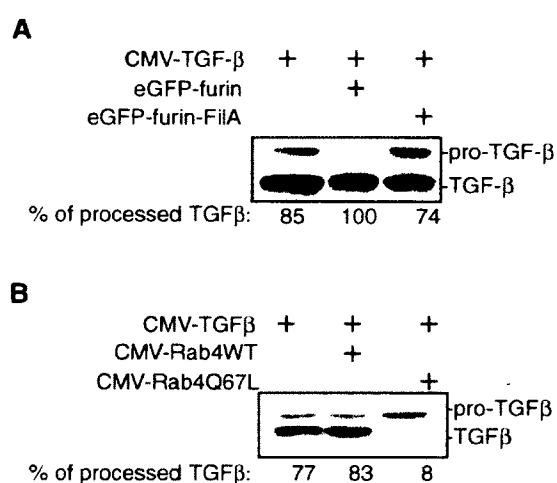


Figure (Chapitre 2) 4. La relocalisation déficiente de la furine à la périphérie cellulaire inhibe la maturation du TGF β

Les cellules HT-1080 ont été co-transfectées de façon transitoire avec le TGF β 1 et (A) furine eGFP ou le mutant eGFP-fur-FilA et (B) Rab4WT ou le dominant négatif Rab4Q67L. Les cellules ont été privées de sérum durant 16h et les surnageants ont été récoltés après 16h de stimulation. Les surnageants ont été dialysés et lyophilisés avant d'être révélés par un anticorps contre le LAP par immunobuvardage. Le % de maturation du TGF β a été mesuré par densitométrie de la forme mature de TGF β sur le total de TGF β (pro-TGF β et forme mature du TGF β) en utilisant le logiciel Image J. Les résultats sont représentatifs de 2 expériences.

Impact physiologique de la maturation du TGF β dépendante du pH

Ayant déterminé que le clivage protéolytique du pro-TGF β par la furine était favorisé par le microenvironnement acide, où l'histidine 276 est potentiellement protonée, et que cette maturation avait lieu dans les endosomes précoces et de recyclage, nous avons

étudié l'impact de ce mécanisme dans l'invasion des cellules cancéreuses. Tel que mentionné dans l'introduction, le TGF β est un promoteur important de l'invasion tumorale ainsi que de la formation des invadopodes, des structures responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire (Mandal et al., 2008). Pour ce faire, nous avons utilisé un système *in vitro* de dégradation de la matrice extracellulaire afin d'observer la capacité des cellules cancéreuses à former des invadopodes. Ainsi, nous avons transfecté les différents mutants du TGF β (CMV-TGF β , CMV-TGF β -P3A et CMV-TGF β -P3R) dans les cellules HT-1080 et ensemencé les cellules sur un gélatine fluorescente. Par immunofluorescence, nous pouvons quantifier la formation des invadopodes par la perte de fluorescence de la matrice suite à sa digestion par les cellules cancéreuses. Tel qu'observé à la figure 6A, la surexpression du TGF β augmente d'environ 2 fois le pourcentage de cellules formant des invadopodes. La surexpression du mutant TGF β -P3A, qui diminue la maturation du TGF β (Figure 3), diminue de façon significative la formation des invadopodes comparativement au contrôle. À l'opposé, la surexpression du mutant TGF β -P3R, augmente de façon importante la formation des invadopodes. En figure 6B, nous avons utilisé le système de surexpression du TGF β avec les différents NHEs (Figure 4B,C). La surexpression du TGF β de type sauvage augmente de façon importante la formation des invadopodes. De façon similaire à l'impact des NHEs dans la maturation du TGF β (Figure 3), la coexpression de NHE6 diminue de façon drastique la formation des invadopodes. De plus, la surexpression de NHE7 diminue faiblement la formation des invadopodes tandis que la surexpression de NHE9 n'a aucune influence. De façon intéressante, la co-expression du mutant TGF β -P3R avec le NHE6 augmente la formation des invadopodes comparativement à l'expression de NHE6 et de TGF β de type sauvage. Ces résultats sont en accord avec ceux indiquant que le mutant TGF β -P3R est insensible à la hausse du pH induite par la surexpression de NHE6 (Figure 4C). Ensemble, ces résultats indiquent que la maturation du TGF β , qui est favorisée en milieu acide, influence directement son activité biologique et induit l'invasion des cellules cancéreuses. En effet, on peut conclure que l'augmentation de la maturation du TGF β , possiblement favorisée par la charge positive de l'histidine 276, induit une augmentation de TGF β sécrété bio-activable qui résulte en une augmentation de la capacité des cellules cancéreuses à former des invadopodes.

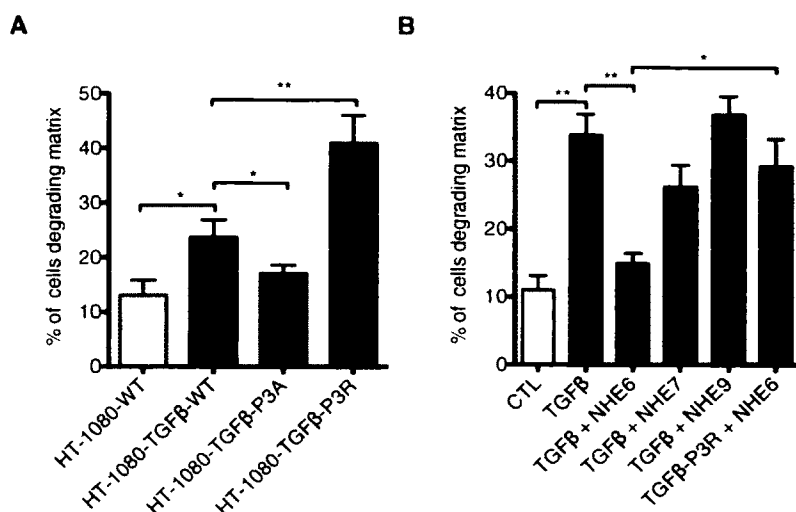


Figure (Chapitre 2) 5. La maturation du TGFβ dépendante du pH influence la capacité des cellules cancéreuses à former des invadopodes

Les cellules HT-1080 ont été transfectées de façon transitoire avec (A) le TGFβ-WT, TGFβ-P3A, TGFβ-P3R ou (B) co-transfectées avec le TGFβ-WT et NHE6, NHE7, NHE9 et TGFβ-P3R avec NHE6. Les cellules ont été ensemencées sur une couche de gélatine couplée avec l'oregon-green durant 10h et marquées avec la phalloïdine-Texas-Red (F-actine) et le DAPI (noyaux). Le pourcentage des cellules formant des invadopodes a été déterminé par microscopie à fluorescence tel que décrit dans la section matériel et méthodes. Colonnes, moyennes; p, * = 0.04, ** = 0.008.

L'hypoxie induit une augmentation de la maturation du TGFβ.

Nous avons vu au chapitre 1, que l'hypoxie induisait une forte relocalisation de la furine en périphérie cellulaire. Afin d'étudier l'impact de l'hypoxie sur la maturation du TGFβ, nous avons dû modifier nos conditions de surexpression. Dans notre laboratoire, nous avons déjà publié que l'hypoxie augmentait la maturation du TGFβ chez les HepG2 (McMahon et al., 2005). Par contre, dans le modèle actuel, nous utilisons un système de surexpression du TGFβ. Ainsi, les cellules en condition normoxique et hypoxique expriment de façon basale une quantité importante de TGFβ. Notre laboratoire a également démontré que le TGFβ était un important inducteur de la furine, l'enzyme de conversion du pro-TGFβ (McMahon et al., 2003). De cette manière, dans notre système, l'expression de la furine endogène est augmentée ce qui induit par le fait même une augmentation de la maturation du TGFβ. Il est donc difficile d'observer l'induction hypoxique de la maturation

du TGF β causée par la relocalisation de la furine. Pour contrer ce phénomène, nous avons pré-incubé les cellules HT-1080 surexprimant le TGF β en présence d'un inhibiteur pharmacologique du récepteur du TGF β (TGF β RI), le Ly364947. Ceci empêche le TGF β sécrété d'activer son récepteur et d'induire l'expression de la furine endogène. De cette façon, nous pouvons observer l'effet hypoxique sur la maturation du TGF β de façon indépendante de l'induction de la furine endogène causée par la surexpression du TGF β (F□□□□□□7).

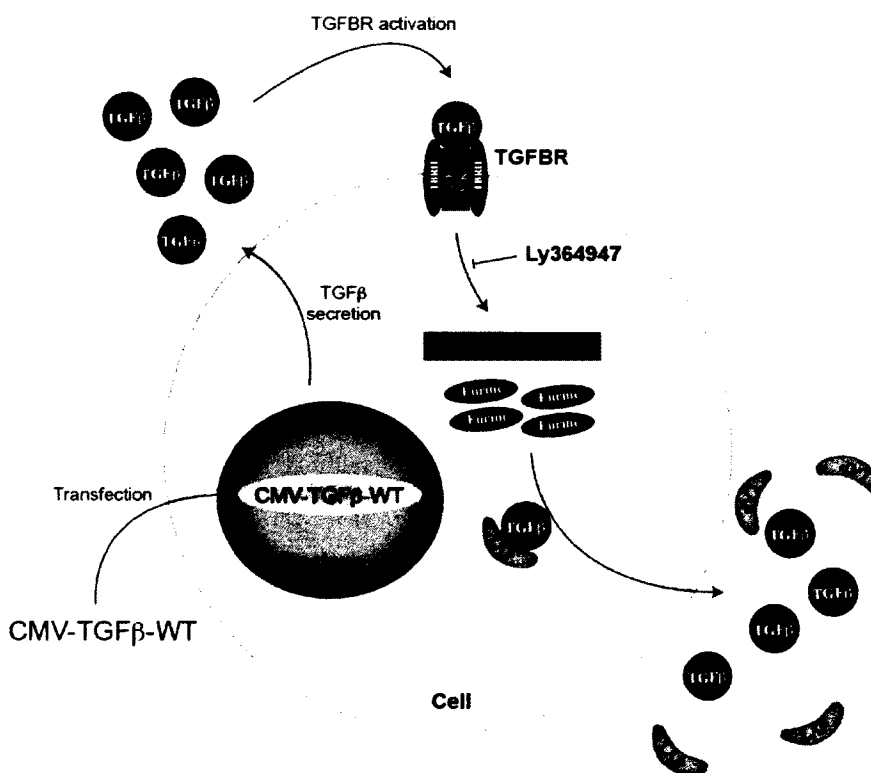


Figure (Chapitre 2) 6: Schématisation de la problématique de notre modèle d'étude en condition hypoxique

La surexpression du TGF β dans les cellules HT-1080 mène à une sécrétion importante de TGF β actif. Le TGF β active son récepteur et induit l'expression de la furine endogène. L'expression importante de furine mène à la bioactivation systématique du TGF β . L'utilisation du Ly364947, un inhibiteur pharmacologique du TGF β RI, inhibe l'induction de la furine endogène causée par la sécrétion importante de TGF β , et permet d'étudier l'impact de l'hypoxie sur la maturation du TGF β de façon indépendante de l'expression de la furine.

Nous avons tout d'abord vérifié que l'utilisation du Ly364947 nous permettait d'observer l'induction hypoxique de la maturation du TGF β . Pour ce, nous avons transfecté les cellules HT-1080 avec le TGF β et traité avec l'inhibiteur du TGF β RI (Ly364947) à une concentration de 250nM. Suite à une stimulation de 16h en normoxie (20% O₂) ou en hypoxie (1% O₂), nous avons récolté les surnageants et vérifié la maturation du TGF β par immunobuvardage. À la figure 9A, nous observons que l'hypoxie seule, sans traitement avec le Ly364947, n'induit pas l'augmentation de la maturation du TGF β de façon significative. Par contre, lorsqu'on utilise l'inhibiteur du TGF β RI (Ly364947), l'hypoxie induit une augmentation significative du pourcentage de maturation du TGF β , passant de 70% en normoxie à 90% en hypoxie (Figure 9A,B). Ce résultat indique que l'inhibition du TGF β RI par le Ly364947 permet de visualiser l'induction hypoxique de la maturation du TGF β pouvant être causée par l'augmentation du pH intracellulaire en hypoxie et la redistribution stratégique de la furine dans la boucle de recyclage en périphérie cellulaire, et ce de façon indépendante de l'expression de la furine endogène.

Par la suite, nous avons utilisé ce même système afin d'étudier l'impact de l'hypoxie sur la maturation du TGF β dépendante de la protonation de l'histidine 276. Pour se faire, nous avons utilisé les différents mutants du TGF β que nous avons stimulés en normoxie ou en hypoxie en présence de Ly364947 (250nM). Nos données démontrent que la mutation P3A du TGF β diminue la maturation du TGF β autant en normoxie qu'en hypoxie tandis que la mutation P3R augmente la maturation du TGF β en normoxie. On peut noter qu'en hypoxie, il n'y a pas de différence entre le contrôle TGF β et la mutation P3R dans laquelle l'argine mime la charge positive de l'histidine. De plus, tel qu'illustré à la figure 8, l'hypoxie induit une acidification des vésicules endosomales, ce qui, selon nos données, favoriserait davantage la maturation du TGF β . Ainsi, il semble que l'acidification des vésicules intracellulaires en hypoxie favorise l'interaction entre la furine et le pro-TGF β , ce qui induit une augmentation de la maturation du pro-TGF β .

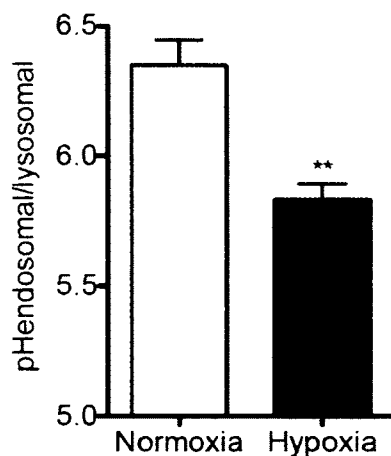


Figure (Chapitre 2) 7: L'hypoxie induit l'acidification des vésicules intracellulaires

Mesure du pH des vésicules endosomales/lysosomales suite à l'endocytose de la sonde HPTS dans des cellules HT-1080 incubées en normoxie (20% O₂) ou en hypoxie (1% O₂). Colonnes, moyenne; p, * = 0.003.

Afin de vérifier l'influence de l'augmentation de TGFβ mature en hypoxie dans un contexte d'invasion cellulaire, les cellules HT-1080 transfectées avec les différents mutants du TGFβ ont été ensemencées sur une matrice de gélatine fluorescente afin d'étudier la formation d'invadopodes. Tel qu'illustré précédemment (Figure 6A), la surexpression du TGFβ augmente la formation d'invadopodes en condition normoxique. La mutation P3A diminue la formation d'invadopodes tandis que la mutation P3R augmente la capacité des cellules à former des invadopodes. On peut observer que l'hypoxie induit la formation des invadopodes chez les contrôles. Le pourcentage de cellules formant des invadopodes en hypoxie est au même niveau que les cellules surexprimant le TGFβ en normoxie. Ceci nous suggère que la maturation induite du TGFβ en hypoxie est en grande partie responsable de l'induction hypoxique de la formation des invadopodes. Comme en condition normoxique, le mutant P3A diminue fortement la formation des invadopodes tandis que le mutant P3R augmente de façon importante la formation des invadopodes en hypoxie. Ensemble, ces résultats démontrent que la régulation de la maturation du TGFβ dans les compartiments acides en normoxie influence l'activité biologique du TGFβ qui est responsable de l'induction de la formation des invadopodes. De plus, l'hypoxie, qui a pour effet d'acidifier les compartiments intracellulaires et d'induire la relocalisation de la furine en périphérie cellulaire, augmente la maturation du TGFβ dépendante du pH. Ceci a pour effet

d'augmenter ses fonctions biologiques soit l'induction de l'invasion cellulaire et la formation des invadopodia.

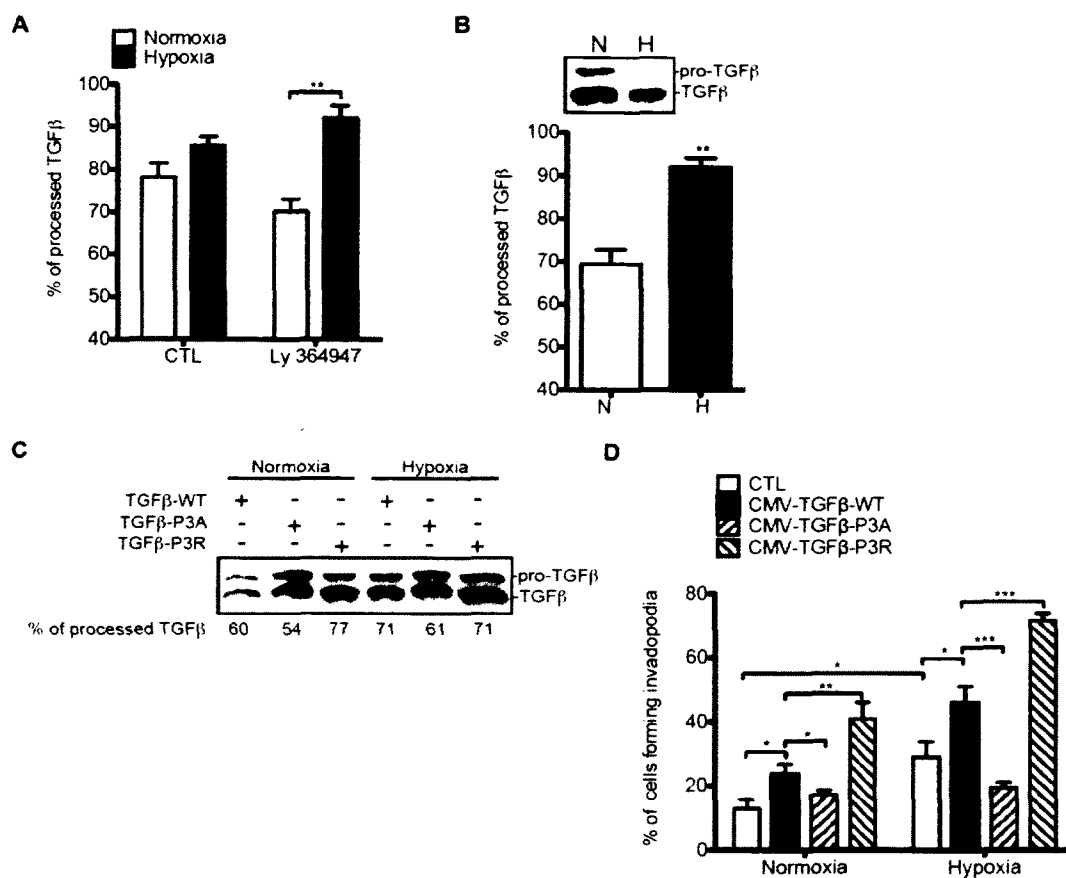


Figure (Chapitre 2) 8: La maturation accrue de TGF β dépendante du pH et induite par l'hypoxie influence la formation des invadopodes

(A, B) Les cellules HT-1080 ont été transfectées de façon transitoire avec le TGF β . Les cellules ont été privées de sérum durant 16h et incubées en condition normoxique (20% O₂) ou hypoxique (1% O₂) pour une période de 16h en présence (A,B) ou non (A) de Ly364947 (250nM). Les surnageants ont été récoltés, dialysés et lyophilisés avant d'être révélés à l'aide d'un anticorps contre le LAP par immunobuvardage. Les colonnes représentent le % de TGF β mûré de 3 expériences indépendantes. Le % de maturation du TGF β a été mesuré par densitométrie de la forme mûre de TGF β sur le total de TGF β (pro-TGF β et forme mûre du TGF β) en utilisant le logiciel Image J. (C) Les cellules HT-1080 ont été transfectées de façon transitoire avec le TGF β -WT, TGF β -P3A et le TGF β -P3R. Les cellules ont été privées de sérum durant 16h avant une incubation de 16h en condition normoxique (20% O₂) ou hypoxique (1% O₂) en présence de Ly364947 (250nM). Les surnageants ont été récoltés, dialysés et lyophilisés avant d'être révélés par un anticorps contre le LAP par immunobuvardage. (D) Les cellules HT-1080 ont été transfectées de façon transitoire avec le TGF β -WT, TGF β -P3A, TGF β -P3R. Les cellules ont été ensemencées sur une couche de gélatine couplée avec l'oregon-green durant 10h en condition normoxique (20% O₂) ou hypoxique (1% O₂) et marquées avec la phalloïdine-Texas-Red (F-actine) et le DAPI (noyaux). Le pourcentage de cellules formant des invadopodes a été déterminé par microscopie à fluorescence tel que décrit dans la section matériel et méthodes. Colonnes, moyennes; p, * = 0.04, ** = 0.008, *** = 0.005.

Matériel et Méthodes:

Analyses et valeurs de conservation des histidines

Séquences : Les séquences de TGF β de mammifères ont été identifiées en utilisant l'ADN génomique de la banque de données *Protein Knowledgebase (UniProtKB)* disponible sur le serveur www.uniprot.org. Seules les séquences complètes de mammifères ont été prises en considération pour l'analyse. Par la suite, les séquences complètes ont été alignées afin d'obtenir une séquence multiple d'alignement (MSA) en utilisant le serveur ClustalW2 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalW2/).

Valeurs de conservation des histidines : La séquence multiple d'alignement (MSA) a été analysée à l'aide du serveur Consurf (<http://consurf.tau.ac.il/>) en utilisant la méthode de calcul Bayesian et le modèle de substitution évolutionniste JTT. La séquence du TGF β 1 humaine a été utilisée en guise de séquence comparative. Seules les valeurs de conservation des histidines ont été prises en considération. Une valeur négative indique une conservation entre les espèces et une valeur positive indique une variabilité de l'acide aminé entre les espèces. Les données sont illustrées sous forme d'histogramme démontrant la valeur normalisée de conservation selon la position de l'histidine dans la séquence du TGF β 1 humain.

Anticorps et réactifs

Les anticorps utilisés en immunofluorescence (IF) et buvardage (WB) ont été utilisés aux dilutions indiquées : l'anti-LAP de chèvre (WB 1:1000) provient de R&D Systems Antibodies (Minneapolis, MN, USA), l'anti-EEA1 de souris (IF 1:200) provient de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), l'anti-HA de lapin (IF 1:200) provient de Sigma Aldrich (St-Louis, Mo, USA), l'anti-Rab7 (IF 1:200) provient de BD Biosciences (Mississauga, ON, Canada), la transferrine Alexa-546 et les anticorps secondaires Alexa-546 proviennent de Invitrogen (Burlington, ON, Canada).

Le NH₄Cl, la chloroquine le tamoxifène, la bafilomycine A1 et le Ly364947 proviennent de Sigma Aldrich (St-Louis, Mo, USA).

Plasmides

Le plasmide pcDNA3-TGF β 1-WT provient de notre laboratoire et a été construit par Sébastien GrandMont (M.Sc). Les différents mutants histidines du TGF β ont été réalisés par mutagénèse dirigée en utilisant la technique des 3 PCRs. Les amorces utilisées sont :

TGF β -P3A : 5'-CAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATA-3'

5'-AAAGCTCCCGGGCACGCCGAGCCCTGGA-3'

TGF β -P3R : 5'-CAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATA-3'

5'-AAAGCTCCCGGAGACGCCGAGCCCTGGA-3'

TGF β -P9A : 5'-CAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATA-3'

5'-TGGAGAGGGGCCAGGCTCTGCAAAGC-3'

Les plasmides CMV-NHE6-GFP, pcDNA3-NHE7-His et CMV-NHE9-GFP nous ont été généreusement donnés par l'équipe du Dr Kanasawa (Osaka University, Osaka, Japon). Les plasmides Rab4-WT et Rab4-Q67L nous ont été généreusement donnés par l'équipe du Dr Parent (Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada).

Pour les constructions de la furine, le plasmide pGEM7ZF-hfur provient du Dr Gary Thomas (Vollum Institute, Portland, Oregon, USA). Le plasmide pGEM7ZF-hfur a été digéré avec EcoRI et EcoICRI et inséré dans le pcDNA3 (Promega, Madison, WI, USA) digéré avec EcoRI et EcoRV. Le plasmide pcDNA3-hfur a ensuite été digéré avec HindIII et MluI et inséré dans le plasmide pGFP2 (Biosignal Packard, Montréal, QC, Canada). Le plasmide pGFP2-hfur a ensuite été digéré avec MluI et EcoRV et ligué dans le plasmide pcDNA3 enfin d'obtenir le plasmide pcDNA3-GFP-furin. Le plasmide pcDNA3-GFP-fur-VA750 est le produit de la mutation dirigé utilisant la technique des 3 PCRs avec l'amorce suivante : 5'-GGGTGAAGGTGGCCACCATGGACCGTGGC-3'.

Culture cellulaire et transfections

Les fibrosarcomes humains HT-1080 et les cellules embryonnaires de reins humains HEK293 proviennent de la collection de cultures cellulaires américaine (ATCC, Rockville, MD, USA). Les cellules ont été cultivées dans un milieu complet MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplémenté avec 10% de sérum bovin. Les cellules HT-1080 ont été

transfectés de façon transitoire avec les différents plasmides en utilisant le réactif Transit-LT1 (Mirus, Madison, WI, USA) selon les instructions du manufacturier. Pour les conditions hypoxiques, les cellules ont été privées de sérum et incubées dans une chambre hypoxique Invivo2 400 maintenue à 1% O₂, 5% CO₂ et balancée avec du N₂ pour une période de 16h.

Marquage par immunofluorescence

Les cellules HT-1080 ont étéensemencées à une concentration de 40×10^3 cellules/cm² sur une lamelle de verre de 15 mm de diamètre. Les lamelles ont été placées dans une plaque à 12 puits et incubées 24h. Les cellules ont été privées de sérum 2h avant d'être incubées pour une période de 4h. Suite à l'incubation, les cellules ont été lavées avec du PBS et fixées à l'aide de la paraformaldéhyde 1% (30 min, 4°C). Les cellules ont été perméabilisées au triton X-100 0.1% et incubées avec l'anticorps primaire durant 2h à température pièce. Les cellules ont ensuite été lavées au PBS et incubées avec l'anticorps secondaire couplé à l'alexa-546 pour 1h à 4°C. Comme contrôle négatif, des immunoglobulines G de la même espèce ont été utilisées à la place de l'anticorps primaire.

Microscopie confocale

Les cellules ont été examinées à l'aide d'un microscope confocal (FV1000, Olympus, Tokyo, Japon) équipé d'un microscope inversé et d'un objectif à immersion dans l'huile 63X (Olympus). Les spécimens ont été excités au laser 488 nm (laser argon 40mW), 563 nm (laser hélium-néon) et diode 405. Plusieurs sections optiques horizontales de 512 x 512 pixels ont été prises à des intervalles de 0.11mm sur toute l'épaisseur de la cellule (résolution optique : latérale – 0.18mm; axiale – 0.25 mm). Les images sont affichées en pseudo-couleurs, selon leurs fluorochromes, superposées (logiciel FluoView, Olympus), coupées et assemblées dans Photoshop (Adobe Systems Mountain View, CA, USA).

Essais d'invadopodes

Les lamelles ont été préparées tel que décrit précédemment (Baldassarre et al., 2006) en utilisant de la gélatine couplée à l'oregon-green (Invitrogen). Trente milles cellules ont étéensemencées sur chaque lamelle, laissées adhérer, et incubées dans un

milieu MEM contenant 0.5% FBS. Après 10h de stimulation en normoxie et/ou hypoxie, les cellules ont été fixées avec de la paraformaldéhyde 1% pour 30 min à 4⁰C et marquées avec du 4',6-diamidino-2 phenylindole (DAPI) pour 5 min à température pièce. Les cellules ont été visualisées en microscopie à fluorescence et les cellules formant des invadopodes ont été dénombrées. Les invadopodes ont été identifiés par les zones de dégradation de la matrice caractérisées par une perte de fluorescence verte. Trois cents cellules ont été comptées par lamelle.

Immunobuvardage

Les cellules (1 x 10⁶/pétri de 100mm) ont été privées de sérum 16h avant une stimulation de 16h en condition normoxique (21% O₂) ou hypoxique (1% O₂). Pour les stimulations hypoxiques, le Ly364947 (250nM) a été ajouté 30 min avant la stimulation. Les surnageants ont été récoltés et conservés à -80⁰C. Les cellules ont été lavées au PBS froid et lysées avec un tampon M-RIPA (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 0.1% Na-Deoxycholate, 8mM EDTA pH 8.0, 10% NP-40 un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche, Indianapolis, IN, USA). L'immunobuvardage a été effectué tel que décrit précédemment (Blanchette et al., 2001). Le pourcentage de maturation du TGFβ a été mesuré avec le ratio d'intensité relative des bandes du TGFβ mature sur les bandes du pro-TGFβ à l'aide du logiciel Image J (National Institutes of Health).

Préparation des surnageants

Les cellules HT-1080 ont étéensemencées à une concentration de 10x10⁶ cellules/pétri et laissées adhérer durant 24 h. Les cellules ont par la suite été privées de sérum durant 16 h avant une stimulation hypoxique de 16 h. Les surnageants ont été récoltés et conservés à -80⁰C.

Préparation des membranes à dialyse : Les membranes à dialyse MWCO 6-8000 proviennent de Spectrum Laboratories Inc. (Rancho Dominguez, CA, USA). Les membranes ont été bouillies dans une solution 2% de sodium bicarbonate + 1mM EDTA pour une période de 10 minutes. Par la suite, les membranes ont été transférées et bouillies dans une solution 1mM EDTA.

Les surnageants ont été transférés dans les membranes à dialyse et dialysés contre une solution d'acide acétique 0,2M à 4⁰C avec agitation durant 16 h.

Les surnageants dialysés ont par la suite été congelés à -80⁰C et lyophilisés pour une période de 24 h. Les lyophilisats ont été resuspendus dans 50µL d'une solution Tris-HCl pH 6.8 (0.5M Tris, 0.4% SDS) avant d'être dosés pour les immunobuvardage.

Imagerie du pH endosomal en temps réel par microscopie confocale

Les cellules HT-1080 ont étéensemencées à une concentration de 30,000 cellules/puit dans une plaque à 12 puits et incubées 24h. Par la suite, la sonde HPTS (8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid, trisodium salt) (Invitrogen) a été ajoutée à une concentration de 1mM pour une période d'incubation de 10h. Les cellules ont par la suite été lavées au PBS et incubées 2 h dans un milieu sans sérum. Une stimulation hypoxique (1% O₂) de 4h a par la suite été effectuée.

Analyse confocale : Les cellules ont été excitées à 405nm et 458nm. Pour obtenir les valeurs de pH, nous avons fait le ratio de fluorescence F458/F405.

La courbe standard a été effectuée avec des solutions à différents pH (6.0, 6.5, 7.0, 7.5 et 8.0) dans une solution de calibration (20mM NaCl, 135mM KCl, 20mM D-Glucose, 1mM MgSO₄, 20mM HEPES, 1mM CaCl₂, 10ug/mL de nigéricine). Les cellules ont été incubées dans la solution de pH pré-défini pour 15 minutes et les ratios F458/F405 ont été enregistrés afin de tracer la courbe standard.

CHAPITRE 3: HDAC6 DEACETYLASE ACTIVITY IS REQUIRED FOR HYPOXIA-INDUCED INVADOPODIA FORMATION AND CELL INVASION

Dominique Arsenault and Claire M. Dubois¹

Immunology Division, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4.

Article publié dans la revue:

PLoS One. 2013;8(2):e55529.

Avant propos:

Malgré les progrès majeurs et significatifs dans le domaine de la recherche sur le cancer, l'invasion des cellules cancéreuses qui mène à la formation des métastases demeure un des défis cliniques majeurs. En effet, la formation de métastases est la cause principale de mortalité chez les patients atteints du cancer. L'invasion des cellules cancéreuses à travers les tissus dépend en grande partie de leur capacité à dégrader la matrice extracellulaire. Dans la dernière décennie, des micro-structures cellulaires que l'on appelle les invadopodes, ont été mises en évidence et ont été définies comme étant des structures spécialisées dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Malgré le fait que le microenvironnement hypoxique des tumeurs solides est reconnu comme un facteur initiateur important de l'invasion cellulaire, peu de travaux ont étudié la relation entre l'hypoxie et la biogenèse des invadopodes. Dans ce chapitre, nous démontrons pour la première fois que l'histone déacétylase 6 (HDAC6), un membre cytoplasmique de la famille des histones déacétylases, est un modulateur de la formation des invadopodes en hypoxie. Nos données démontrent que l'hypoxie augmente l'activité déacétylase de la HDAC6 sur un de ces substrats, la tubuline, suite à l'activation de la voie EGFR. Une fois activée, la HDAC6 permet la phosphorylation de Smad3 résultant en sa translocation nucléaire. Nous démontrons que l'inhibition de l'activité de la HDAC6 empêche la translocation de Smad3 résultant en une inhibition de l'invasion cellulaire induite par l'hypoxie. Ces résultats suggèrent que l'hypoxie induit la formation des invadopodes de

manière bi-phasique, impliquant l'activation dépendante de l'EGFR de la HDAC6, ce qui permet la phosphorylation de Smad3 et son accumulation au noyau. Ainsi, l'identification de la HDAC6 en tant que médiateur clé dans l'invasion cellulaire induite en hypoxie pourrait avoir des implications thérapeutiques importantes dans le traitement des cancers métastatiques.

Contribution de l'étudiant:

En ce qui concerne les travaux contenus dans ce troisième chapitre de cette thèse, Dominique Arsenault a activement contribué à l'écriture de cet article sous la supervision de sa directrice de thèse. Il a également participé à la conception du plan de recherche. L'étudiant a également réalisé toutes les expériences présentées dans ce chapitre. Martine Charbonneau et Karine Brochu-Gaudreau ont complété les expériences nécessaires à la révision de l'article et ont contribué à son acceptation finale.

Schématisation de l'étude et hypothèse

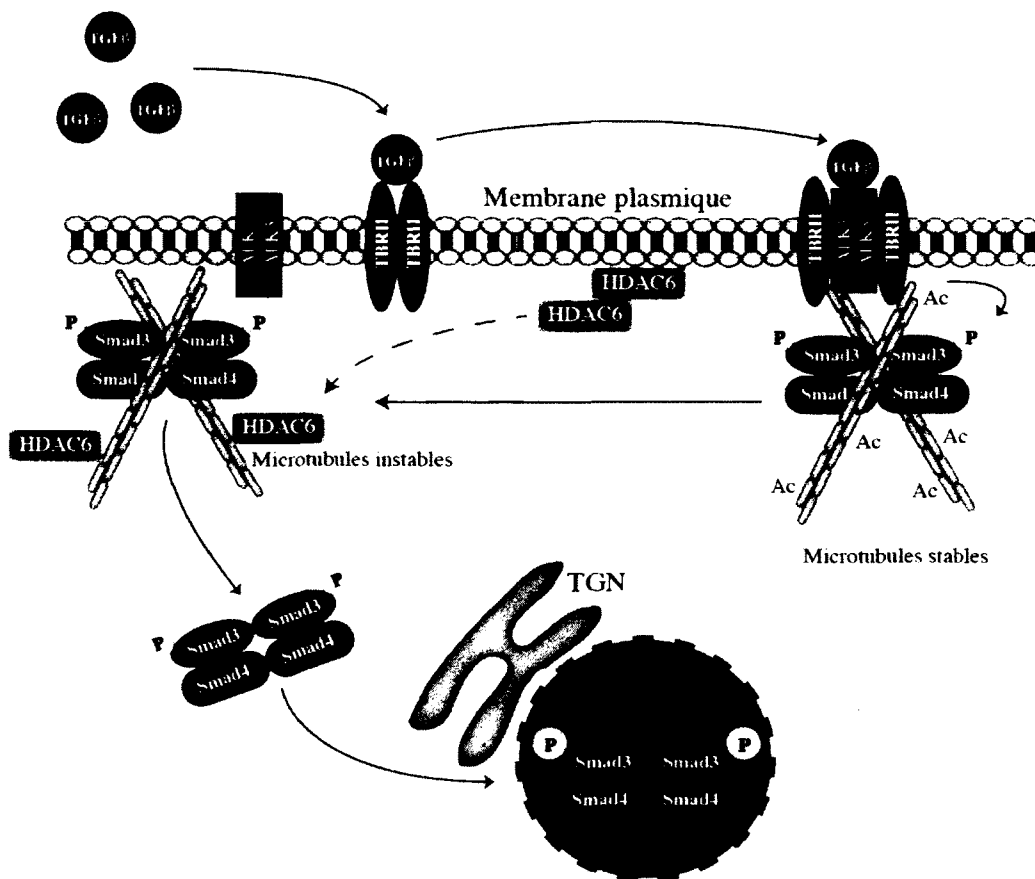


Schéma 2. Hypothèse du chapitre 3

Au chapitre 2, nous avons vu que l'hypoxie induisait une augmentation de la maturation du pro-TGFβ dépendante du pH acide intracellulaire, ce qui entraînait une augmentation de la sécrétion de TGFβ bio-actif dans le milieu extracellulaire. De plus, la formation des invadopodes en hypoxie est en partie induite par le TGFβ via l'action de Smad3. Il est connu que la liaison de Smad3 aux microtubules permet de réguler son activation et sa translocation nucléaire. De plus, la HDAC6 a comme substrat, la tubuline, qui forme les microtubules. La déacétylation de la tubuline par la HDAC6 permet la déséquestration de Smad3 du réseau de microtubules permettant sa translocation nucléaire. Ainsi, l'hypoxie pourrait activer la HDAC6 et permettre la translocation nucléaire de Smad3, l'induction de gènes inducibles par le TGFβ et mener à la formation des invadopodes et à l'invasion de la matrice extracellulaire.

ABSTRACT

Despite significant progress in the cancer field, tumor cell invasion and metastasis remain a major clinical challenge. Cell invasion across tissue boundaries depends largely on extracellular matrix degradation, which can be initiated by formation of actin-rich cell structures specialized in matrix degradation called invadopodia. Although the hypoxic microenvironment within solid tumors has been increasingly recognized as an important driver of local invasion and metastasis, little is known about how hypoxia influences invadopodia biogenesis. Here, we show that histone deacetylase 6 (HDAC6), a cytoplasmic member of the histone deacetylase family, is a novel modulator of hypoxia-induced invadopodia formation. Hypoxia was found to enhance HDAC6 tubulin deacetylase activity through activation of the EGFR pathway. Activated HDAC6, in turn, triggered Smad3 phosphorylation resulting in nuclear accumulation. Inhibition of HDAC6 activity or knockdown of the protein inhibited both hypoxia-induced Smad3 activation and invadopodia formation. Our data provide evidence that hypoxia influences invadopodia formation in a biphasic manner, which involves the activation of HDAC6 deacetylase activity by EGFR, resulting in enhanced Smad phosphorylation and nuclear accumulation. The identification of HDAC6 as a key participant of hypoxia-induced cell invasion may have important therapeutic implications for the treatment of metastasis in cancer patients.

INTRODUCTION

Hypoxia is a hallmark of solid tumor that leads to cell invasion and metastasis, which are the major causes of cancer patient death. Through a complex series of events, hypoxia enhances the propensity of cancer cell to invade. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) transcriptional activity was proposed to be in part responsible for the enhanced invasive properties of cancer cell through the regulation of a variety of extracellular proteases, growth factors and receptors [1,2]. Among these, TGF β , a well-known cytokine involved in many steps of cancer dissemination, has been shown to be increased in cancer cells. Indeed, levels of active TGF β as well as activation of the Smad-dependent signaling pathway have been shown to be augmented under hypoxia through increased processing of the precursor from and/or bioactivation of the latent growth factor [3-5]. Besides transcriptional events regulated by hypoxia, recent data support a role of post-transcriptional mechanisms. For example, strategic relocalization of proteases, integrins and growth factor receptors at recycling endosomes/cell surface and/or increased phosphorylation/activation of kinases was shown to contribute to enhanced invasiveness of cancer cells [6-10]. Despite the progress in understanding how hypoxia regulates cell invasion, the exact mechanisms involved remain poorly defined.

Recent reports have highlighted the implication of histone deacetylases (HDACs) in tumor progression and invasion and their potential use as therapeutic targets for cancer therapy is now emerging [11,12]. Eleven classical HDAC family members have been identified in human. These enzymes are mainly involved in deacetylation of histones [13,14], although a growing list of non-histone proteins such as tubulin, cortactin, heat shock proteins and catenin have been shown to be HDAC substrates [15]. Because these substrates as well as abnormal activation and deactivation of transcription based on histone status have been associated with tumorigenesis, various pan-specific HDAC inhibitors have been evaluated in clinical trials for cancer therapy [16-18]. Data showed that these inhibitors caused numerous side-effects and had poor anti-cancer activity against solid-tumors [19-21], possibly due to the role of HDACs as post-translational modifiers of numerous key proteins [22]. These results fostered the study of the role of individual

HDAC enzymes in cancer progression. Among the HDACs family members, HDAC6 is a cytoplasmic resident protein that is overexpressed in many cancers [23-26] and has been implicated in cell migration and invasion [27-29]. Alpha-tubulin is the major substrate of HDAC6 but emerging evidence indicates that cortactin can also be deacetylated by HDAC6 [29-31]. These cytoskeleton components play various roles in cell division, protein trafficking, cell motility, and signal transduction [32]. Recently, HDAC6 has been shown to be a key regulator during epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) by regulating Smad3 activation and nuclear translocation possibly through desequestration of Smad3 from acetylated α -tubulin [27,33]. HDAC6 has been shown to be an estrogen-regulated gene [34] but growth factors such as TGF β and EGF can also enhance its activity *in vitro* [27,35]. These studies suggested the participation of HDAC6 in cancer cell invasion and metastasis, possibly through a mechanism involving TGF β action/signaling.

During the process of metastasis, tumor cells must degrade extracellular matrix (ECM) in order to migrate through blood vessels and colonize distant sites. To achieve tissue invasion, cancer cells initiate a number of developmental processes. Acquisition of migratory and invasive properties involves reorganization of the actin cytoskeleton and concomitant formation of invadopodia. Invadopodia are dynamic extensions of the plasma membrane enriched in F-actin as well as cortactin, a key signaling protein involved in many cellular processes, including cell adhesion, endocytosis/exocytosis, migration and actin-driven membrane protrusion formation. A number of signaling events, mostly involving tyrosine phosphorylation, occur within invadopodes and they cooperate to up-regulate expression of integrins, metalloproteases and other components involved in invadopodia formation and focal ECM degradation [36-41]. Whereas there is relatively little known concerning environmental factors that stimulate invadopodia formation, growth factors such as TGF β and EGF, acidic pH, and ECM-induced integrin activation have been shown to trigger invadopodia formation [41-45]. In this respect, we have recently shown that hypoxia increased invadopodia formation through activation/phosphorylation of p90 ribosomal S6 kinase (p90RSK) [10].

In this report, we present data showing that hypoxia enhances invadopodia formation and cell invasion through the enhancement of HDAC6 deacetylase activity. Furthermore, we show that this event is regulated through the EGF receptor. The enhanced activity of HDAC6 allowed Smad3 activation and nuclear translocation, which was involved in hypoxia-induced invadopodia production. These findings provide new insight into the molecular mechanisms linking the tumor hypoxic microenvironment and cell invasion and open the way to further investigations aimed at targeting HDAC6 for the treatment of metastasis.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and reagents

Antibodies used for immunofluorescence (IF) microscopy and Western blotting (WB) were used at the following dilutions: mouse anti-cortactin (IF 1:250) and rabbit anti-phospho-smad3 (IF 1:200) antibodies were purchased from Millipore (Billerica, MA), rabbit anti-smad3 (IF 1:200), rabbit anti-EGFR (WB 1:1000) and rabbit anti-phospho-tyrosine (WB 1:1000) antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA), rabbit anti-HDAC6 antibody (IF 1:200, WB 1:1000) was bought from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), mouse anti- α -tubulin (IF 1:1000, WB 1:1000) and mouse anti-acetylated-tubulin (IF 1:200, WB 1:1000) antibodies were from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO), Oregon-488 conjugated phalloidin, 4',6-diamidino-2-phenylindole dilactate (DAPI) were from Molecular Probes (Eugene, OR). All secondary antibodies used for IF were from Molecular Probes (Eugene, OR). Secondary anti-mouse-conjugated horseradish peroxidase (HRP) and anti-rabbit-conjugated HRP were obtained from Amersham Biosciences (Baie d'Urfé, QC). The following reagents were used at the indicated concentrations: TGF β (2 ng/mL, 5 ng/mL) from PerproTech Inc. (Rocky Hill, NJ), Tyrphostin AG-1478 (2 μ M, 10 μ M) from BioMol International (Plymouth, PA), SIS3 (0.5 μ M, 5.0 μ M) from Calbiochem International (La Jolla, CA), Trichostatin A (2.5 μ M, 5.0 μ M) and Ly364947 (50 nM, 500 nM) from Sigma-Aldrich. Tubacin (10 μ M) was purchase from Sigma-Aldrich and Nitubacin (10 μ M) was a generous gift of Dr. Ralph L. Schreiber (Center for System Biology, Massachusetts General Hospital, Boston, MA).

Plasmids

pGEM7ZF-hfur was a generous gift of Dr. Gary Thomas (University of Oregon, Vollum Institute, Portland, OR). pGEM7ZF-hfur was digested with EcoRI and EcoICRI and inserted into pcDNA3 (Promega, Madison, WI) digested with EcoRI and EcoRV. AT-PDX gene, kindly provided by Dr. Gary Thomas was inserted into the EcoRI/ApaI cloning site of pcDNA3 plasmid vector. shRNA against HDAC6 or scramble shRNA (control) were from SABiosciences (Frederick, MD).

Cell culture and transfection

Human fibrosarcoma HT-1080 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Cells were cultured in complete media consisting of minimal essential medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum. HT-1080 cells were stably transfected with pcDNA3-hFur, pcDNA3-PDX and HDAC6 shRNA using the TransIT®-LT1 Transfection Reagent (Mirus, Madison, WI), according to the manufacturer's instructions. pcDNA3-hFur and pcDNA3-PDX stably transfected cells were maintained in complete media containing G-418 (600 µg/ml). HDAC6 shRNA transfected cells were maintained in complete media containing puromycin (2 µg/mL) (InvivoGen, San Diego, CA). Hypoxic conditions were used as follows. Cells were serum-starved and placed in an Invivo2 400 hypoxic workstation maintained at 1% O₂, 5% CO₂ compensated with N₂ for different periods of time, as indicated in the legends of the Figures.

Immunofluorescence staining

Cells were seeded at a density of 5×10^4 cells/cm² in circular 15-mm diameter glass coverslips coated with gelatin (0.2%). The coverslips were placed in 12-well culture plates and incubated for 24 h. The cells were serum-starved for 3 h prior to exposure to normoxic or hypoxic conditions for different periods of time. All reagents were added 30 min prior to cell exposure to experimental conditions. Following incubations, the cells were washed with PBS, fixed with 2% paraformaldehyde (30 min, 4°C) permeabilized (0.1% Triton-X100), and immunostained for 2 h with primary antibody or stained with phalloidin for 45

min. The cells were then washed and incubated with Alexa-conjugated secondary antibodies at 4°C for 1 h. As negative controls, species- and isotype-matched immunoglobulin G were used instead of primary antibody.

Invadopodia assay

Coverslips were prepared as described [46] using Oregon Green gelatin (Invitrogen). Thirty thousand cells were seeded on each coverslip, allowed to adhere, and incubated in MEM containing 0.5% FBS. Following various incubation times, as indicated in the legends of the Figures, cells were fixed with 1% paraformaldehyde for 30 min at 4°C and stained with DAPI for 5 min at room temperature. Cells were visualized by fluorescence microscopy, and cells forming invadopodia were counted. Invadopodia were identified by areas of matrix degradation characterized by loss of green fluorescence. A minimum of three hundred cells were counted per coverslip.

Confocal microscopy

Cells were examined with a scanning confocal microscope (FV1000, Olympus, Tokyo, Japan) equipped with an inverted microscope and a 63X oil immersion objective (Olympus). Specimens were laser-excited at 488 nm, 563 nm and 405 nm. Serial horizontal optical sections of 512 x 512 pixels with 2-times line averaging were taken at 0.11 µm intervals through the entire thickness of the cell (optical resolution: lateral - 0.18 µm; axial - 0.25 µm). Images were acquired on the same day, typically from 10 cells of similar size from each experimental condition, under identical settings.

Image analysis and quantitative measurements

In the case of Alexa-488/DAPI- or Alexa-546/DAPI-merged fluorescence images, dot fluorograms were obtained by plotting pixel values of each marker in the vertical and horizontal axes, respectively. Thresholds were determined using single markers and noise and background were subtracted. Quadrant markers were adjusted forming background (C), red- or green-only (D), blue-only (A) and co-localization areas (B). The percentage of colocalization was calculated as follows $(B)/((B)+(A)) \times 100$. To determine fluorescence quantification, images were processed for a total of 35 slices per cell on 10 size-matched

cells for each experimental condition, and experiments were performed at least three times. Images were shown in pseudo-color, according to their original fluorochromes, merged (FluoView software (Olympus), then cropped and assembled (Adobe Photoshop software, Adobe Systems, Mountain View, CA). To quantify the areas of degradation, pictures of fluorescent gelatin were acquired and captured into ImagePro imaging software (Media Cybernetics Inc, Bethesda, MD) and degradation areas were calculated in pixel intensities for a total of at least 20 cells per coverslip.

Western blots

Cells (1×10^6 per 100-mm petri dishes) were incubated overnight and serum-starved for 4 h prior to exposure to normoxic (21% O₂) or hypoxic (1% O₂) conditions. The cells were washed in ice-cold PBS and lysed with a M-RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Na-deoxycholate, 8 mM EDTA pH 8.0, 10% NP-40 and complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Indianapolis, IN). Immunoblotting was performed as described [47].

Immunoprecipitation

Cells (2×10^7 per 150-mm petri dishes) were incubated overnight and serum-starved 3 to 4 h prior to stimulation under normoxic (21% O₂) or hypoxic (1% O₂) conditions for 30, 60 and 120 min. Cells were then washed with ice-cold PBS and lysed with NP-40 phosphate buffer (1% NP-40, 150 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate, complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail tablet (Roche Applied Science). One mg total protein was immunoprecipitated with anti-EGFR antibody (1:100) and blotted with anti-phosphotyrosine antibody (1:1000) as described in the Western Blot section.

Three-dimensional invasion assays

Collagen type I matrix was prepared as follows, Aliquots (50 μ L) of agarose containing 10% FBS were deposited in 96 well culture plates. Aliquots (50 μ L) of fibrillar type I collagen (3 mg/mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN) were then prepared following the manufacturer's instructions and layered on top of the agarose layer. Cells (2×10^4 /100 μ L of MEM) were serum-starved overnight, seeded on top of the collagen layer and incubated for

24 h under normoxic or hypoxic conditions. The cells were labeled with CellTrace™ Calcein Green AM (Invitrogen) 1 h prior to the end of incubation. Cells were then washed with PBS and fixed with 3% glutaraldehyde for 30 min followed by confocal microscopy analysis using a FV1000 Olympus confocal microscope. Collagen matrix pellets were scanned along the Z-axis. Cells that had invaded the collagen gel were imaged and quantitated at each 5 μ m layers within the gel. Cell invasion was expressed as a ratio of the fluorescence intensity of each 5 μ m layer/ fluorescence intensity of the top 5 μ m layer (non-invading cells).

Statistical analysis

Unpaired Student's *t*-test was used to assess statistical significance. A *p* value < 0.05 was considered to be significant.

RESULTS

Hypoxia enhances invadopodia formation and ECM degradation through the TGF β /Smad3-dependent signaling pathway.

Exposure of HT-1080 human fibrosarcoma cells to hypoxic conditions (1% O₂) for 10 h resulted in a 10-fold increase in the percentage of cells forming invadopodia compared to normoxic conditions (21% O₂) (Figure 1A). Quantification of the number of invadopodia identified by the colocalization of actin and cortactin, two known markers of invadopodia [36], as well as the extend of ECM degradation per cells showed a significant increase in hypoxic cells compared to their normoxic counterpart (Figures 1B, 1C). Similarly to the data recently published by our group [10], these observations showed that hypoxia enhanced both the formation of invadopodia and their capacity to degrade ECM.

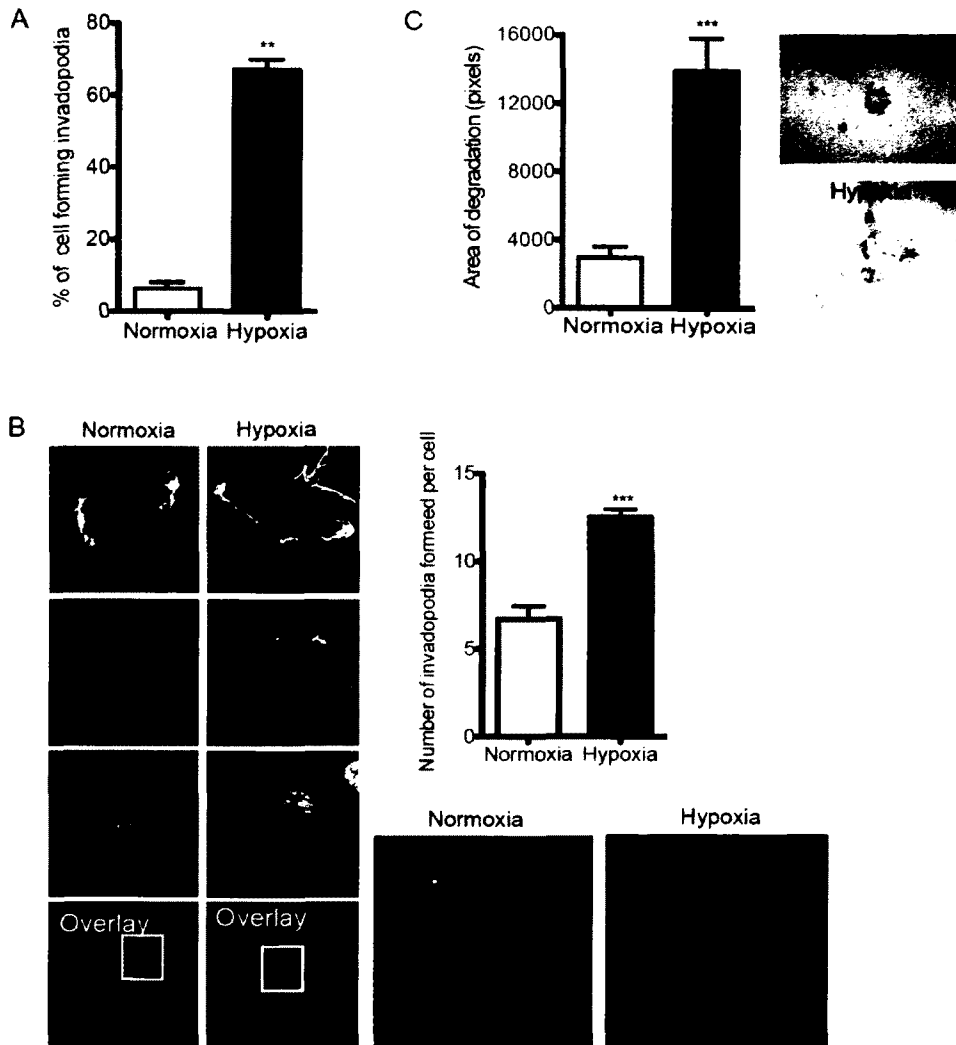


Figure (Chapitre 3) 1: Hypoxia promotes invadopodia formation

HT-1080 cells were cultured on FITC-gelatin-coated slides in normoxia or hypoxia for 4 h (B) or 10 h (A,C). (A) Percentage of cells forming invadopodia. (B) Micrographs of actin (green), cortactin (red) nucleus (blue) and merged images are shown. The associated graph shows the number of F-actin-positive and cortactin-positive invadopodia per cell as described under Materials and Methods. (C) Quantification of ECM degradation (area/cell). The associated micrographs show representative ECM degradation area for a single cell. Columns correspond to the mean \pm SEM; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; scale bars correspond to 5 μm .

We have previously reported that hypoxia induced an increase in pro-TGF β maturation through up-regulation of the proprotein convertase furin [2]. In addition, TGF β

was shown to promote the invasion of cancer cells [48-50] and the formation of F-actin cores in CA1D human breast cancer cells [45] and podosomes in endothelial cells [44]. To address the potential role of TGF β in hypoxia-induced invadopodia formation, we first added TGF β to HT-1080 cells incubated under normoxic or hypoxic conditions. Low concentrations of TGF β increased invadopodia formation and ECM degradation in normoxic cells (Figures 2A, 2B). Alternatively, higher concentrations of TGF β enhanced invadopodia formation and ECM degradation in both normoxic and hypoxic cells as well as the number of invadopodia formed per cell (Figures 2A ,B). These results indicated that TGF β mimicked the impact of hypoxia on invadopodia formation and function and was therefore a candidate mediator by which invadopodia are stimulated by hypoxia.

To investigate the implication of endogenous TGF β in hypoxia-induced invadopodia formation, we took advantage of the ability of the proprotein convertase furin to recognize and cleave at the basic sequences found in TGF β 1,-2 and -3 maturation site, providing an efficient way to interfere with activation of TGF β [51]. Overexpression of furin in HT-1080 cells led to a 2-fold increase in the percentage of cells forming invadopodia in normoxic cells. In contrast, overexpression of α 1-antitrypsin-Portland (α 1-PDX), a modified serpin with potent furin inhibitory activity [52,53] did not modify the capacity of the cells to produce invadopodia under normoxic conditions while it completely blunted invadopodia formation and ECM degradation in cells incubated under hypoxia (Figures 2C,D). Furthermore, the levels of bioactive TGF β 1, as measured using ELISA assays, were 2-fold higher in supernatants from hypoxic cells compared to supernatants from nonhypoxic cells (data not shown). Taken together, these results suggested that endogenous TGF β was involved in hypoxia-induced invadopodia formation and ECM degradation.

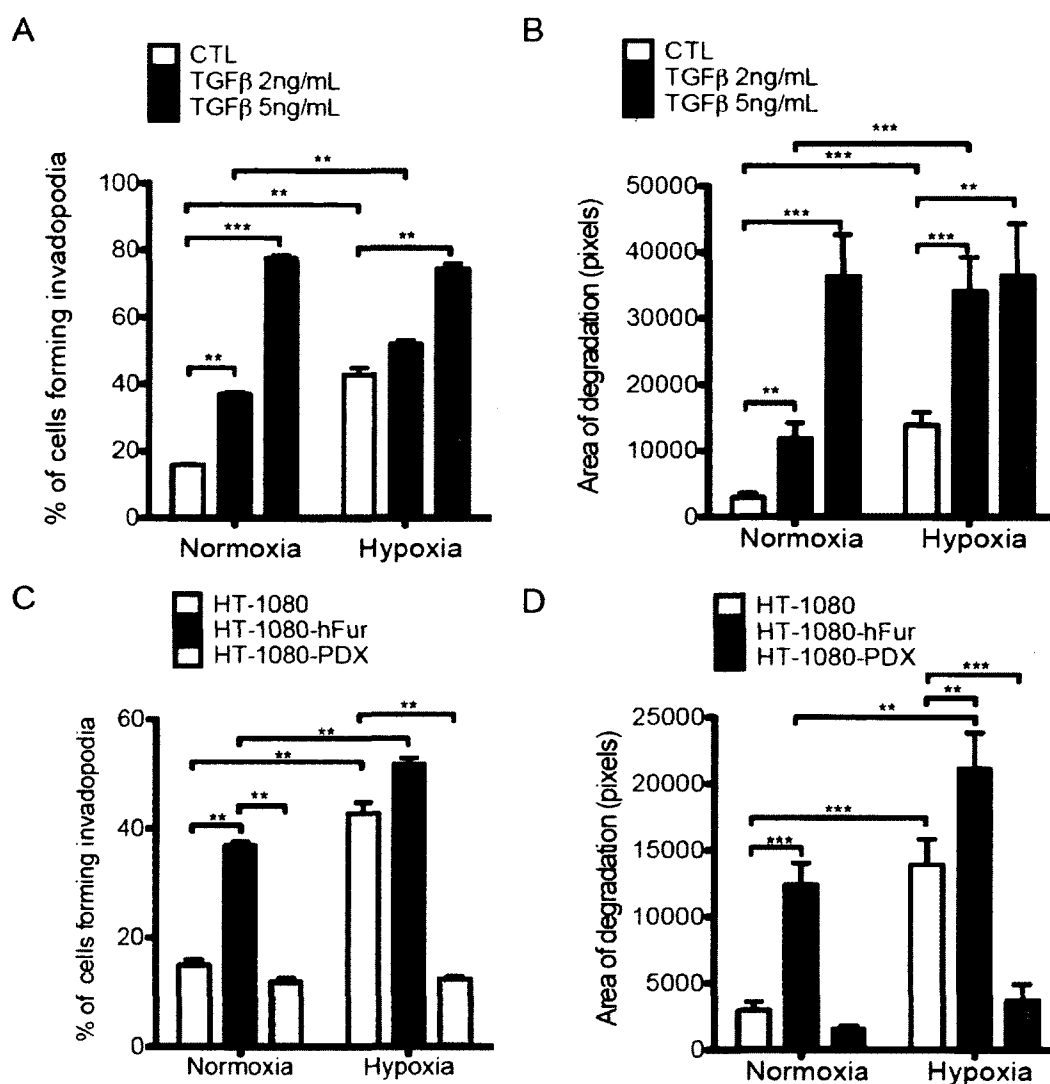


Figure (Chapitre 3) 1. Endogenous TGFβ is involved in hypoxia-induced invadopodia formation

(A,B) HT-1080 cells were cultured on FITC-gelatin-coated slides in normoxia or hypoxia for 10 h in the presence or absence of TGFβ added at the indicated concentrations. (A) Percentage of cells forming invadopodia. (B) Quantification of ECM degradation (area/cell). (C,D) HT-1080, HT-1080-hFur and HT-1080-PDX cells were cultured on FITC-gelatin-coated slides in normoxia or hypoxia for 10 h. (C) Percentage of cells forming invadopodia. (D) Quantification of ECM degradation (area/cell). Columns correspond to the mean ± SEM; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

TGFβ signals, in part, through a canonical pathway involving Smad2/3 and Smad4 that forms a multimeric Smad complex which induces or represses TGFβ responsive genes

once accumulated in the nucleus [54]. Recently, it has been shown that TGF β induced invadopodia production by enhancing MMP-9 production, an event that was associated with Smad-dependent signaling pathway [45]. In addition, hypoxia was shown to induce the expression of various genes through cooperation between Smad3 and HIF-1/-2 [55,56]. To further investigate the role of TGF β in hypoxia-induced invadopodia, we first tested whether exposure to hypoxia led to Smad2 and Smad3 activation and nuclear accumulation using antibodies that detect the activated (phosphorylation on C-terminal serine residues) state of these Smads. TGF β stimulations were used as controls. Results revealed that hypoxia increased the levels of Smad3 phosphorylation (Supplementary Figure S1) and the accumulation of p-Smad3 in the nucleus of HT-1080 cells, with a maximal effect at 6 h (Figures 3A, 3B). In contrast, Smad 2 phosphorylation or nuclear accumulation was only marginally affected by hypoxia (Supplementary Figures S1 and S2). Stimulation of the cells with TGF β under normoxic conditions resulted in a significant increase in nuclear accumulation of both p-Smad2 (Supplementary Figure S2) and p-Smad3 (Figures 3A, 3B). Next, we used pharmacological inhibitors to investigate the role of the Smad3-dependent signaling pathway in hypoxia-induced invadopodia formation. Treatment of HT-1080 cells with either Ly364947, a selective inhibitor of TGF β R-1 [57], or SIS3, a cell-permeable selective inhibitor of TGF β -dependent Smad3 phosphorylation and Smad3-mediated cellular signaling [58], had no significant impact on the percentage of cells forming invadopodia under normoxic conditions (Figure 3C). This result correlated with the previous observation that Smad3 was not activated nor accumulated in the nucleus of normoxic cells. Conversely, the addition of Ly364947 or SIS3 to cells cultured under hypoxic conditions resulted in a concentration-dependent decrease in the percentage of cells forming invadopodia with a complete inhibition observed at the highest concentration (Figure 3C). A similar inhibition was observed upon addition of TGF β 1,-2,-3 neutralizing antibodies (data not shown). Taken together, these results strongly suggested that TGF β played a critical role in hypoxia-induced invadopodia formation in HT-1080 cells through the Smad3-dependent signaling pathway.

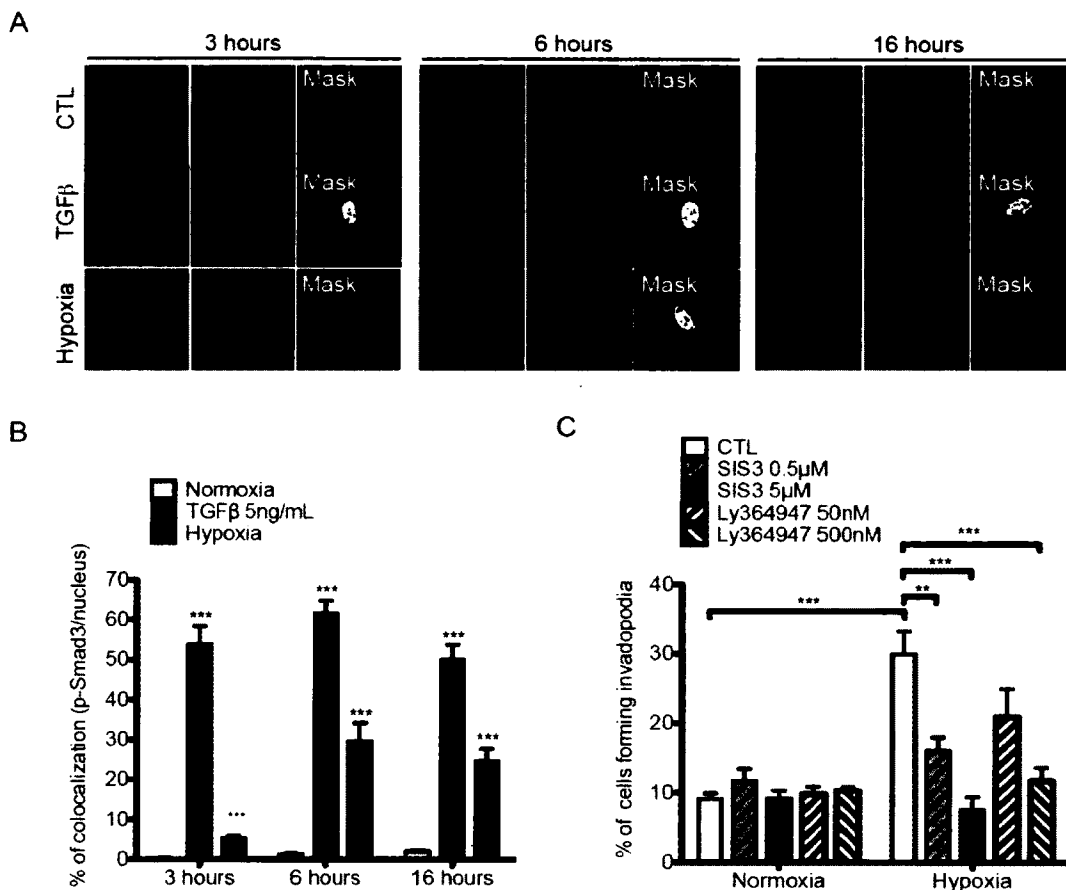


Figure (Chapitre 3) 2. The Smad3-dependent signalling pathway is involved in hypoxia-induced invadopodia formation

(A,B) HT-1080 cells were seeded on gelatin-coated slides and incubated in the presence or absence of TGF β or in hypoxia for 3, 6 or 16 h. Cells were labelled for p-Smad3 and nucleus (DAPI) and analyzed by confocal microscopy. (A) Micrographs of p-Smad3 (red), nucleus (blue) and merged images (binary mask-overlay). (B) Graph showing the percentage of colocalization of p-Smad3 with nucleus measured as described under Materials and Methods. (C) Cells were seeded on FITC-gelatin-coated slides, preincubated in the presence or absence of SIS3 or Ly364947 for 30 min and incubated in normoxia or hypoxia for 10 h. The graph shows the percentage of cells forming invadopodia. Columns correspond to the mean \pm SEM; ** $p = 0.01$, *** $p < 0.001$; Scale bars correspond to 5 μ m.

HDAC6 activity is required for hypoxia-induced Smad3 nuclear translocation and invadopodia formation.

HDAC6 has been shown to be involved in microtubule stability through the regulation of the levels of tubulin acetylation [59]. Moreover, recent studies have indicated that HDAC6 was required for TGF β 1-induced EMT, an event that was correlated with HDAC6-induced deacetylation of tubulin and activation of Smad3 [27]. This finding prompted us to investigate the relationship between HDAC6 and Smad3 signaling in hypoxia-induced invadopodia formation. To define the role of HDAC6 in hypoxia-induced Smad3 nuclear accumulation, HT-1080 cells were transfected with HDAC6-targeted shRNA or control shRNA. Knockdown or inhibition of HDAC6 activity with tubacin, a specific inhibitor of HDAC6 tubulin deacetylase activity[60], resulted in a strong inhibition of hypoxia-induced nuclear localization of p-Smad3 compared to an absence of significant reduction in cells transfected with control shRNA (Figure 4A,B). Immunoblotting results confirmed the efficiency of HDAC6 knockdown (Figure 4A). We therefore concluded that HDAC6 activity was required for hypoxia-induced nuclear accumulation of Smad3. To determine whether HDAC6 and HDAC6 deacetylase activity were involved in hypoxia-induced invadopodia formation, HT-1080 cells were transfected with HDAC6-specific shRNA or incubated with tubacin, or its non-functional structural analog nitubacin [60], during invadopodia assays. Knockdown of HDAC6 with shRNA completely inhibited hypoxia-induced invadopodia formation without affecting the normoxic levels of invadopodia (Figure 4D). In addition, tubacin decreased the percentage of cells forming invadopodia in normoxia while completely abolishing invadopodia formation in response to hypoxia (Figure 4C). In contrast, nitubacin treatment did not affect the percentage of invadopodia formed by cells cultured under normoxic or hypoxic conditions (Figure 4C). Similar inhibition was observed when cells were incubated with trichostatin A (TSA), a large spectrum HDAC inhibitor, during the invadopodia assay (Supplementary Figure S3). To further assess the relevance of HDAC6 in hypoxia-induced cell invasion, we performed three-dimensional invasion assays. HT-1080 cells, transfected with control or HDAC6 shRNAs, were seeded on top of type I collagen matrix and incubated under normoxic or hypoxic conditions for 48 h. Cells that invaded the collagen gels were imaged and quantitated using confocal microscopy. Results showed that HDAC6 knockdown cells lost

the ability to deeply invade collagen gels in response to hypoxia, without changing their invasive capacity under normoxic conditions (Figures 4E, 4F). These results indicated an essential role for HDAC6 and HDAC6 deacetylase activity in hypoxia-induced Smad3 activation and cell invasion. They also suggested that HDAC6 levels and/or activity were regulated by hypoxia.

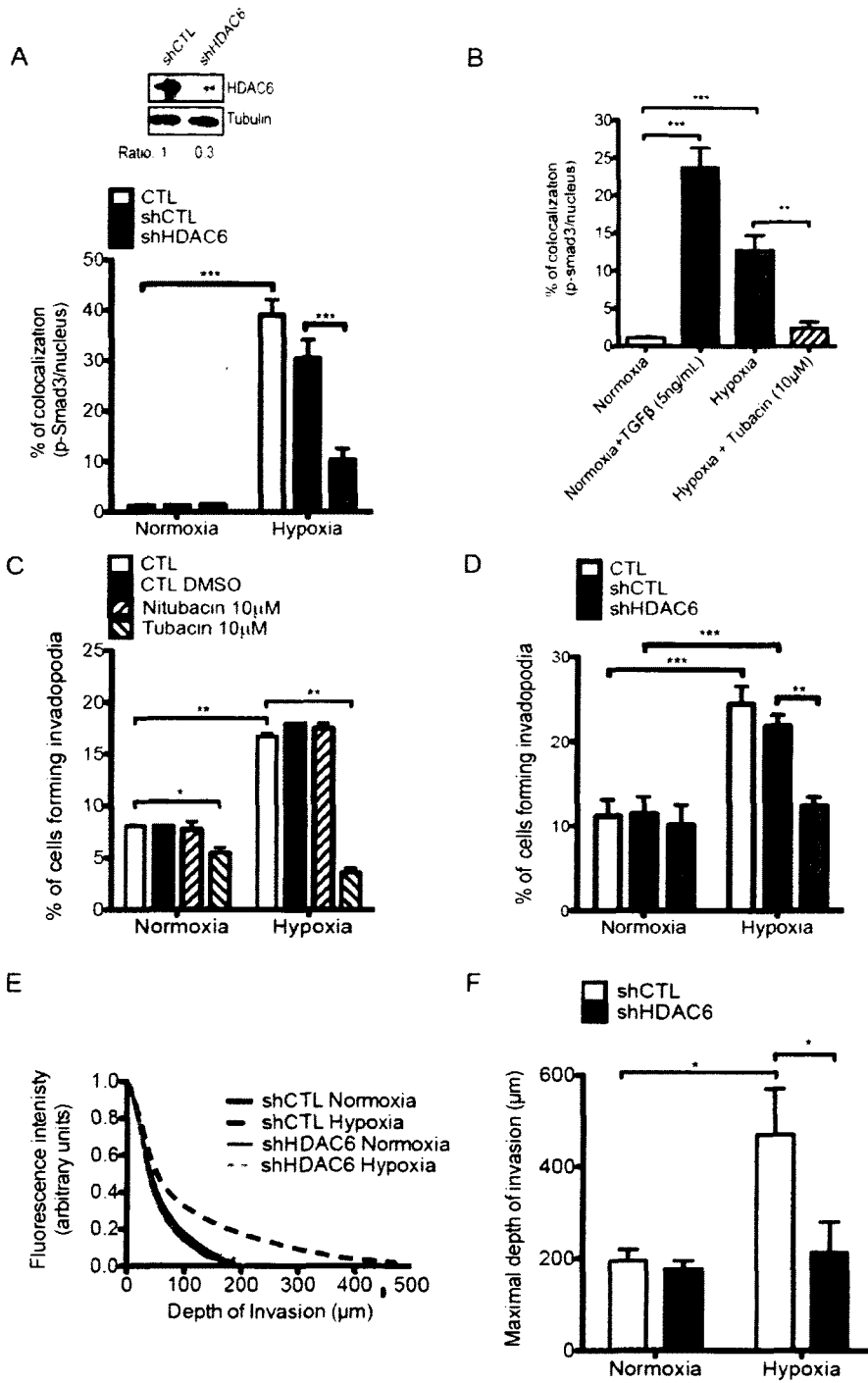


Figure (Chapitre 3) 3. HDAC6 is involved in hypoxia-induced invadopodia formation

(A) HT-1080 (CTL), HT-1080 transfected with control shRNA (sh-CTL) or shRNA targeting HDAC6 (shHDAC6) or (B) untransfected HT-1080 cells incubated in the presence or absence of Tubacin or TGF β were cultured on gelatin-coated slides in normoxia or hypoxia for 6 h. (A,B) Graph showing the percentage of colocalization of p-Smad3 with nucleus (DAPI) measured as described under Materials and Methods. (A) Immunoblot showing inhibition of HDAC6 expression by HDAC6 shRNA. (C) HT-1080 cells were cultured on FITC-gelatin-coated slides in normoxia or hypoxia for 10 h and treated with DMSO (vehicle CTL), Tubacin or Nitubacin (Negative CTL). The graph shows the percentage of cells forming invadopodia. (D-F) HT-1080 (CTL), HT-1080 transfected with shCTL (sh-CTL) and HT-1080 transfected with shHDAC6 (shHDAC6) were cultured on FITC-gelatin-coated slides (D) or allowed to invade collagen gels (E,F) in normoxia or hypoxia. (D) Percentage of cells forming invadopodia for cells incubated for 10 h. (E,F) Cells were allowed to invade collagen gels for 24 h and stained as described under Materials and Methods. (E) Relative fluorescence intensity of the cells according to the depth of invasion. The arbitrary index of invasion was calculated as described under Materials and Methods. (F) Maximal depth of invasion. Columns correspond to the mean \pm SEM; * $p < 0.04$; ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$.

Hypoxia-induced HDAC6 activity involves the EGF/EGFR but not the TGF β pathway.

To define whether hypoxia enhances HDAC6 protein level and/or activity, HT-1080 cells were incubated under normoxic or hypoxic conditions and HDAC6 levels and activity were measured by immunoblotting for HDAC and α -tubulin, respectively. Computation of the ratio of acetylated to total α -tubulin showed that exposure of the cells to hypoxia for 2 and 4 h resulted in a 60% and 80% increase in HDAC6 activity (as visualized by the loss in acetylated tubulin), respectively, without significant modulation in HDAC6 protein levels (Figure 5A). In addition, the levels of HDAC6 activity returned to control (normoxic) conditions upon incubation of the cells for longer periods of time (6 - 24 h; data not shown).

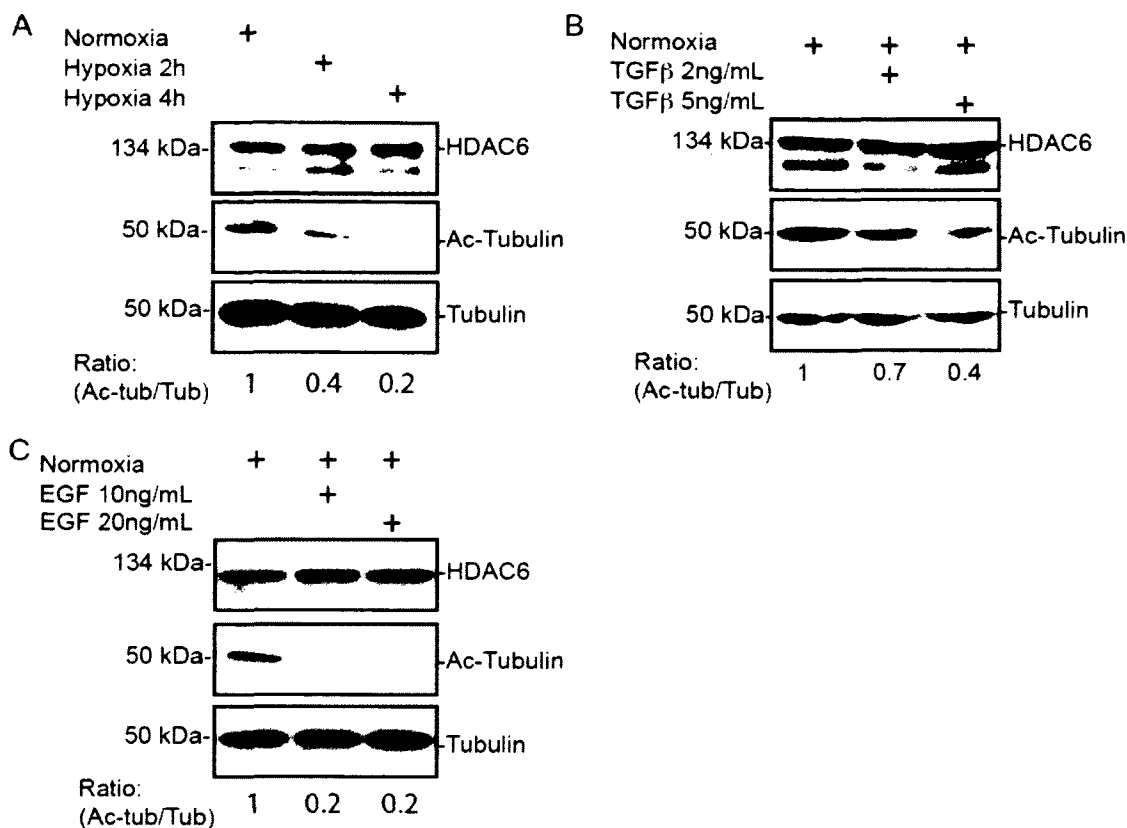


Figure (Chapitre 3) 4. Hypoxia induces HDAC6 deacetylase activity

(A) HT-1080 cells were seeded on gelatin-coated slides and incubated in normoxia or hypoxia for 2 h or 4 h and cell lysates immunoblotted for HDAC6, acetylated-tubulin, and tubulin. (B, C) Cells seeded on gelatin-coated slides were incubated in normoxia for 4 h in the presence or absence of (B) TGF β or (C) EGF at the indicated concentrations. Immunoblots of HDAC6, acetylated-tubulin, and tubulin

Because HDAC6 activity, but not its expression, was affected by hypoxia, we next searched for potential mediators of HDAC6 activation. TGF β through the canonical pathway, and EGF, through activation of the EGFR, are among the few stimuli reported to directly modulate HDAC6 activity [27,35]. Therefore these pathways represent candidate mediators of HDAC6 activation under hypoxic conditions. The results presented above indicated that the TGF β R/Smad3 pathway was activated in HT-1080 cells exposed to hypoxic conditions (Figures 3A, 3B). To define whether TGF β or EGF influenced HDAC6 tubulin deacetylase activity, HT-1080 cells cultured under normoxic conditions, were

incubated for 4 h in the presence or absence of EGF or TGF β . The addition of EGF or TGF β resulted in a significant increase in HDAC6 activity as illustrated by the reduction in the levels of acetylated-tubulin over tubulin, whereas HDAC6 protein levels were not altered by either EGF or TGF β (Figures 5B, 5C). Next, to define whether hypoxia induced the activation of the EGF receptor, HT-1080 cells were incubated for different periods of time under hypoxic conditions. EGFR was then immunoprecipitated followed by immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibodies or anti-EGFR antibodies. Results indicated that hypoxia increased EGFR phosphorylation on tyrosine residues with maximal effect at 60 min, although total levels of EGFR remained unchanged (Figure 6A). Next, to investigate the implication of endogenous growth factors in hypoxia-induced HDAC6 activation, cells were pre-treated with either Tyrphostin AG-1478, or Ly364947 to selectively block kinase activity associated with EGFR or TGF β R1, respectively, followed by incubation under hypoxic conditions for 2 or 4 h. Inhibition of EGFR kinase activity almost completely prevented hypoxia-induced HDAC6 deacetylase activity (Figure 6B). In contrast, inhibition of the TGF β R1 kinase had no significant effect (Figure 6B). These data suggested that although EGFR and TGF β R1 are activated under hypoxic conditions, the ability of hypoxia to activate HDAC6 activity is likely to be mediated by EGFR.

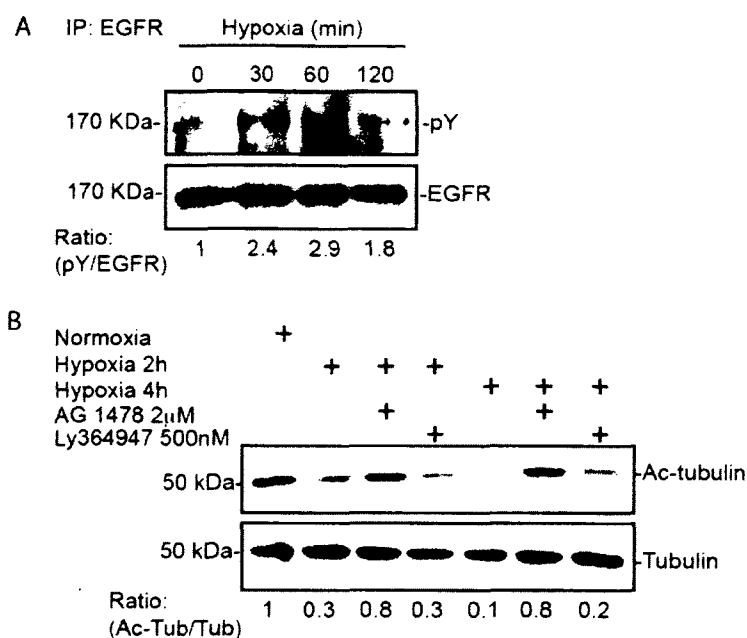


Figure (Chapitre 3) 5. The EGF/EGFR signalling pathway is involved in hypoxia-induced HDAC6 activation

(A) HT-1080 cells were seeded on gelatin-coated slides and incubated in normoxia or hypoxia for the indicated times. Cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-EGFR antibodies and immunoblotted with anti-phosphotyrosine and anti-EGFR antibodies. (B) HT-1080 cells were seeded on gelatin-coated slides and incubated in normoxia or hypoxia for 2 h and 4 h in the presence or absence of Tyrphostin AG1478 or Ly364947 at the indicated concentration. Cell lysates were immunoblotted with acetylated-tubulin and tubulin antibodies.

Results presented above suggested a relationship between the EGF and TGF β signalling pathway in hypoxia-induced Smad3 activation and nuclear accumulation. To explore this possibility further, HT-1080 cells were incubated for 6 h under normoxic conditions in the presence of low concentrations of TGF β with or without EGF, or incubated in hypoxia in the presence or absence of Tyrphostin AG-1478. A low concentration (0.5 ng/mL) of TGF β was sufficient to significantly induce pSmad3 nuclear accumulation, whereas a higher concentration (5 ng/mL) led to a further increase in pSmad3 nuclear accumulation (Figure 7). Interestingly, EGF alone induced a small but significant accumulation of Smad3 in the nucleus, and addition of 0.5 ng/ml of TGF β

resulted in an additive effect on p-Smad3 nuclear accumulation. Furthermore, similar to results found using TGF β R1 or Smad3 inhibitors (Figure 3C), selective inhibition of EGFR kinase activity with Tyrphostin AG-1478 completely abrogated hypoxia-induced nuclear accumulation of p-Smad3 (Figure 7). Taken together, these results suggested that the EGFR and TGF β signaling pathways cooperated for the nuclear accumulation of pSmad3 under hypoxic conditions.

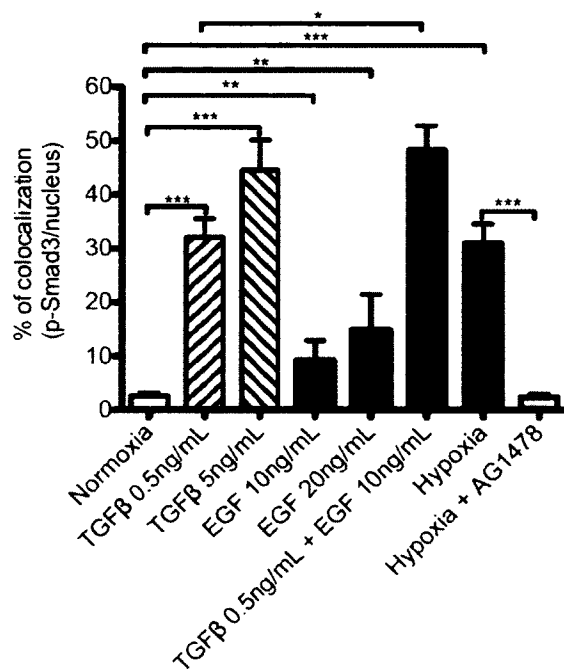


Figure (Chapitre 3) 6. EGF enhances TGF β signalling and Smad3 nuclear accumulation

HT-1080 cells were seeded on gelatin coated-slides and incubated in normoxia or hypoxia for 6 h in the presence or absence of TGF β , EGF and Tyrphostin AG1478 at the indicated concentrations. Percentage of colocalization of p-Smad3 with nucleus measured as described under Materials and Methods.

DISCUSSION

In this study, we showed that exposure of fibrosarcoma cells to hypoxia promoted HDAC6 tubulin deacetylase activity that orchestrated Smad3 activation and nuclear translocation. We identified TGF β and Smad3 signaling pathway as important mediators of hypoxia-induced invadopodia formation. In addition, we demonstrated that the inhibition of HDAC6 expression or deacetylase activity impaired Smad3 activation, an event involved in invadopodia formation and cell invasion triggered by hypoxia. We further provided evidence that hypoxia modulated HDAC6 activity through the activation of EGFR. These results led us to propose that hypoxia promotes invadopodia formation through an EGFR-HDAC6-TGF β /Smad3 axis (Figure 8).

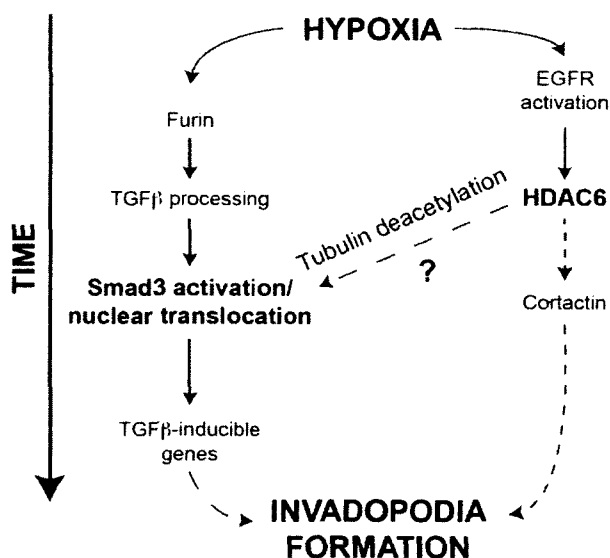


Figure (Chapitre 3) 7. Mechanism of invadopodia formation under hypoxia

The hypoxic microenvironment in solid tumor is proposed to influence invadopodia formation through a biphasic mechanism involving the regulation of HDAC6, followed by activation of the TGF β /Smad3-dependent signaling pathway. First, hypoxia leads to the activation of the EGF/EGFR pathway, which enhances HDAC6 tubulin deacetylase activity. In parallel, hypoxia increases the expression of the proprotein convertase furin, resulting in enhanced TGF β processing and bioactivation. HDAC6 tubulin deacetylation may allow the desequestration of Smad3 from the MT network leading to its activation and nuclear translocation. Smad3 translocation leads to the enhanced transcription of TGF β inducible genes and invadopodia production. In this model, HDAC6 might also translocate to the cell periphery where it was shown to be involved in cortactin deacetylation (Kaluza et al., 2011) an event needed for the formation of actin-rich invadopodia structures.

TGF β is a secreted growth factor that controls numerous biological processes such as proliferation and differentiation. It is synthesized as a precursor protein that requires proteolytic cleavage by proprotein convertases in order to become biologically active [51,61]. TGF β is up-regulated in various types of cancers [62-64] and has been shown to be involved in invadopodia formation [45]. Accordingly, our results support a role for TGF β in hypoxia-induced invadopodia formation. Several reports have shown that hypoxia leads to the bioactivation of latent TGF β [3,65] and we have previously shown that such increase in TGF β bioactivation occurred, at least in part, through up-regulation of the proprotein convertase furin [2]. Our data indicated that hypoxia-induced invadopodia formation was mimicked by overexpression of furin, whereas it was reverted by inhibition of the endogenous convertase strongly suggesting that enhanced bioactivation of endogenous TGF β is one of the mechanism involved in invadopodia formation induced by hypoxia.

Canonical TGF β signaling plays a pivotal role in tumor invasion [66,67]. Our results indicates that Smad3, but not Smad2 (Supplementary Figures S2, S3) is phosphorylated and translocated to the nucleus upon short term (3-6 h) incubation of the cells under hypoxic conditions and that this event persists for up to 16 h. Such activation of Smad3 seems to be a key mechanism by which hypoxia enhanced invadopodia formation since full inhibition of the percentage of cells forming invadopodia was observed in the presence of selective inhibitors of Smad3 phosphorylation/signaling as well as inhibitors of the TGF β activity [3]. It was reported that the cellular response to hypoxia involves signaling via Smad proteins. Indeed, brief exposure of HUVECs to hypoxia was shown to be sufficient to induce Smad phosphorylation through bioactivation of latent TGF β [3]. There is now ample evidence that Smad2 and Smad3 have distinct and non-overlapping roles in TGF β signaling and that these differ in cell types [68]. Interestingly, Smad3 has been linked to TGF β -mediated EMT [69], an important event associated with cell migration and invasion [70-72]. In addition, Smad3 has been shown to be an important contributor to breast cancer cell invasion by controlling the expression of MMP-2 and MMP-9 [73], two metalloproteinases involved in matrix degradation and invadopodia functions [74,75]. In contrast, Smad 2 was shown to be required for TGF β -induced growth

inhibition in various cell context [76,77]. Therefore such strategic activation of Smad 3 under hypoxia might be important for cancer cell transformation into a more aggressive, invadopodia-forming phenotype.

Little is known concerning the selective activation of Smad2 versus Smad3, but this could occur at the level of phosphorylation, gene expression, protein stability, nuclear import/export mechanisms or cytoplasmic/plasma membrane sequestration by retention proteins in a cell-dependent and/or context-dependent fashion. We observed that even though Smad3 protein expression levels remained unchanged, hypoxia consistently and repetitively triggered an increase in Smad3 activation suggesting that hypoxia does not modify Smad3 stability or gene expression. Microtubule binding to Smads has been proposed to regulate TGF β activity by sequestering and controlling the association and phosphorylation of Smads by activated TGF β -receptor I [33]. It was recently reported that TGF β -induced EMT was regulated by HDAC6, a cytoplasmic histone deacetylase that controls acetylated-level of α -tubulin and was shown to promote the activation of Smad3 in response to TGF β [27]. HDAC6-mediated tubulin deacetylation is known to decrease tubulin stability and a recent study indicated that the structural integrity of β -tubulin played an essential role in mediating its interaction with Smad3 [78]. Here we show that selective inhibition of HDAC6 tubulin deacetylase activity restrained Smad3 nuclear accumulation following TGF β stimulation or incubation under hypoxia, further suggesting the role of HDAC6 in the regulation of Smad3 activity in different cell context. We also demonstrated that inhibition or knockdown of HDAC6 resulted in a complete impairment of hypoxia-induced invadopodia formation, strengthening the role of Smad3 signaling pathway in invadopodia formation. Although deacetylation of α -tubulin by HDAC6 and subsequent Smad3 activation seems to be an important event in the induction of invadopodia production in hypoxia, other data link HDAC6 to tumor progression and cancer cell invasion through deacetylation of other cytoplasmic substrates. Indeed, it has been reported that inhibition of HDAC6 leads to hypoacetylation of HSP90 α resulting in a diminution of MMP-2 maturation and decreased cell invasion [79]. An additional study has shown that HDAC6 regulates cell migration by altering acetylation of cortactin, an important component of invadopodia machinery [30] and that HDAC6 was required for

invadopodia activity by regulating acetylated level of tubulin and cortactin [28]. Therefore, these observations suggest that other complementary mechanisms are involved leading to enhanced cell invasion under hypoxia.

Despite growing evidence indicating a role for HDAC6 in cancer invasion, inducers of HDAC6 activity are still poorly characterized. Among the few factors, TGF β has been shown to induce HDAC6 activity through Smad3 activation in lung epithelial cells [27] and we showed here that stimulation of fibrosarcoma cells with TGF β enhanced HDAC6 activity. Even though TGF β has the capacity to activate HDAC6 in different cell systems, including ours, it is unlikely that endogenous TGF β is the main factor involved in the early activation of HDAC6 in response to hypoxia. In fact, our results showed that short exposure of the cells to hypoxia (2-4 h) was sufficient to enhance HDAC6 deacetylase activity, while maximal activation/phosphorylation of Smad3 in response to hypoxia occurred at 6h. In addition, inhibition of the TGF β R1 kinase did not reduce the enhanced HDAC6 action triggered by hypoxia, further suggesting the implication of other mediators/signaling pathways. Accordingly, a recent report has indicated that EGF-induced ERK-MAP kinase pathway enhanced cell migration by inducing deacetylation of tubulin through activation of HDAC6 [35]. EGFR is known to be activated under hypoxia [80,81] and is a well-known growth factor involved in cancer progression. Results presented here showed that hypoxia triggered EGFR phosphorylation and that incubation of the cells with EGF induced HDAC6 activation. Furthermore, inhibition of the EGFR pathway strongly reduced hypoxia-induced HDAC6 deacetylase activity, whereas parallel inhibition of TGF β signaling had no effect. These results provided evidence that the early activation of HDAC6 under hypoxia was triggered by the activation of the EGFR pathway.

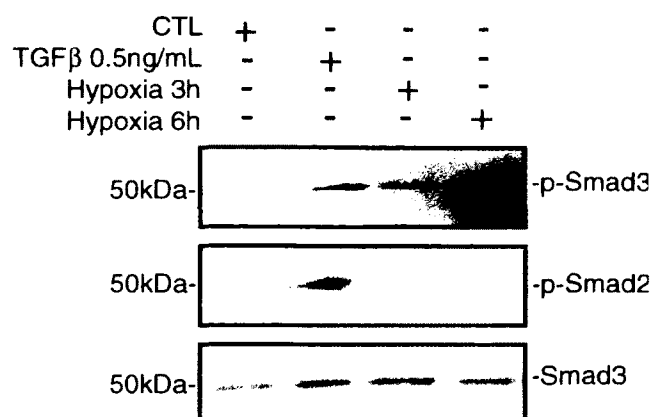
There is increasing evidence that EGF signaling acts in concert with Smads to regulate TGF β responsive genes. EGF signaling through ERK1/2 was shown to promote the phosphorylation of R-Smads, resulting in down regulation of their activity and translocation to the nucleus [82,83] while a recent study revealed that activation of the EGFR-ERK1/2 pathway resulted in the phosphorylation of Smad3 on its linker region leading to increased transcriptional activity [84]. Results presented here showed that EGF

induces a small but significant increase in Smad3 activation/nuclear accumulation and amplified TGF β -induced nuclear accumulation of Smad3 (Figure 7). Although it is possible that EGF directly activates Smad3, our results indicating that EGFR is activated by hypoxia and that inhibition of EGFR strongly reduced hypoxia-induced HDAC6 deacetylase activity. These results are consistent with a mechanism whereby EGF activates HDAC6 and induces its tubulin deacetylase activity that facilitates Smad3 activation and nuclear translocation.

Hypoxia appeared to enhance HDAC6 activity through post-translational mechanisms because total HDAC6 protein levels were not altered by exposure of the cells to hypoxia. Recent data have revealed that HDAC6 activity can be regulated through phosphorylation. HDAC6 possesses several putative EGFR/MAPK phosphorylation sites and phosphorylation on Tyr570 by EGF stimulation has been shown to regulate HDAC6 tubulin deacetylase activity [85]. In addition, casein-kinase II (CK-II) was shown to phosphorylates HDAC6 on Ser458, causing activation of HDAC6 and regulation of aggresome formation in response to stress [86]. Interestingly, both hypoxia and EGF can up-regulate the activity of CK-II through phosphorylation or the enhanced expression of the β -subunit [87], suggesting that activation of HDAC6 under hypoxia could be modulated by EGFR and/or CK-II. Future work would be needed to define the phosphorylation status of HDAC6 under hypoxia and to identify the nature of the protein kinases and phosphorylation sites involved.

A growing body of evidence indicates that the hypoxic microenvironment of solid tumors is a crucial inducer of cell invasion and metastasis. Consequently much interest has been drawn on “targetable” proteins and mechanisms to inhibit hypoxia-induced cell invasion. Hypoxia has previously been shown to induce HDAC6 gene and protein expression [31,88] and here we show that this microenvironment also enhances HDAC6 activity, further strengthening the role of HDAC6 in hypoxia-induced cellular events. We also demonstrate that HDAC6 plays an essential role in hypoxia-induced invadopodia formation and cell invasion through selective activation of Smad3. Several small molecule inhibitors of HDAC6 are being developed and tested in vivo [89,90] so the identification of

HDAC6 as a key participant of hypoxia-induced cell invasion may provide a new and testable target to counter hypoxia-driven cell invasion and metastasis. It might also provide an alternative way to interfere with selective aspects of TGF β signaling in hypoxic cells.

Figures supplémentaires:**Figure supplémentaire (Chapitre 3) 1: Hypoxia induces the phosphorylation of Smad3**

HT-1080 cells were incubated in normoxia with or without TGF β (0.5ng/mL) and in hypoxia for 3 or 6 h. Total cell lysates were immunoblotted for p-Smad2, p-Smad3 and total Smad3.

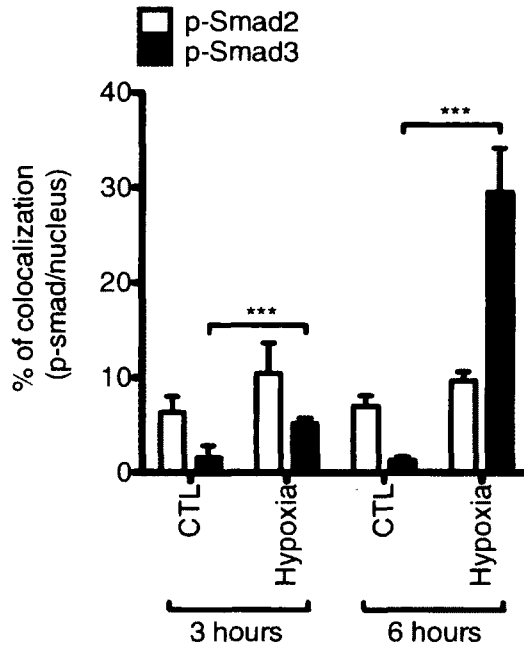


Figure suppl ementaire (Chapitre 3) 1. Hypoxia does not cause p-Smad2 nuclear translocation

HT-1080 cells were cultured on gelatin coated-slides and incubated for 3 and 6 hours in normoxia or hypoxia. Percentage of colocalization of p-Smad2 and p-Smad3 with the nucleus as described under Materials and Methods. Column, mean; bars, SEM, *** $p < 0.001$.

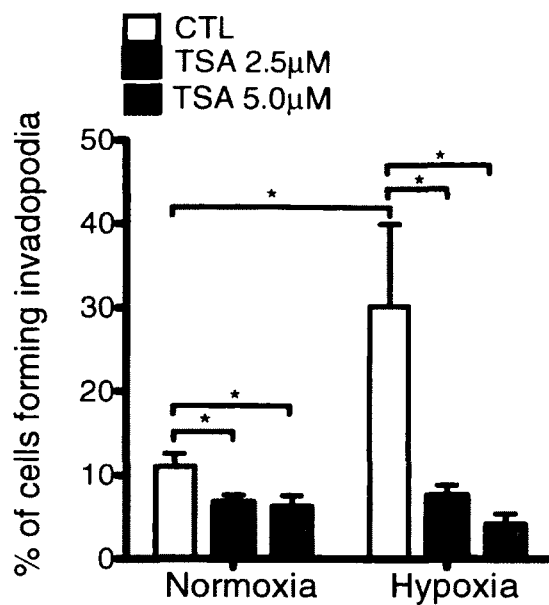


Figure supplémentaire (Chapitre 3) 2. Inhibition of HDACs influences invadopodia formation

HT-1080 cells were cultured on fluorescent gelatin-coated slides and incubated in normoxia or hypoxia for 10 hours in the presence or absence of TSA at the indicated concentrations. The graph shows the percentage of cells forming invadopodia. Column, mean; bars, SEM; * p=0.04.

RÉFÉRENCES

1. Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, et al. (2003) Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 63: 1138-1143.
2. McMahon S, Grondin F, McDonald PP, Richard DE, Dubois CM (2005) Hypoxia-enhanced expression of the proprotein convertase furin is mediated by hypoxia-inducible factor-1: impact on the bioactivation of proproteins. *J Biol Chem* 280: 6561-6569.
3. Zhang H, Akman HO, Smith EL, Zhao J, Murphy-Ullrich JE, et al. (2003) Cellular response to hypoxia involves signaling via Smad proteins. *Blood* 101: 2253-2260.
4. Akman HO, Zhang H, Siddiqui MA, Solomon W, Smith EL, et al. (2001) Response to hypoxia involves transforming growth factor-beta2 and Smad proteins in human endothelial cells. *Blood* 98: 3324-3331.
5. Shi YF, Fong CC, Zhang Q, Cheung PY, Tzang CH, et al. (2007) Hypoxia induces the activation of human hepatic stellate cells LX-2 through TGF-beta signaling pathway. *FEBS Lett* 581: 203-210.
6. Yoon SO, Shin S, Mercurio AM (2005) Hypoxia stimulates carcinoma invasion by stabilizing microtubules and promoting the Rab11 trafficking of the alpha6beta4 integrin. *Cancer Res* 65: 2761-2769.
7. Arsenault D, Lucien F, Dubois CM (2011) Hypoxia enhances cancer cell invasion through relocalization of the proprotein convertase furin from the trans-Golgi network to the cell surface. *J Cell Physiol*.
8. Munoz-Najar UM, Neurath KM, Vumbaca F, Claffey KP (2006) Hypoxia stimulates breast carcinoma cell invasion through MT1-MMP and MMP-2 activation. *Oncogene* 25: 2379-2392.
9. Lin HH, Li X, Chen JL, Sun X, Cooper FN, et al. (2012) Identification of an AAA ATPase VPS4B-dependent pathway that modulates epidermal growth factor receptor abundance and signaling during hypoxia. *Mol Cell Biol* 32: 1124-1138.
10. Lucien F, Brochu-Gaudreau K, Arsenault D, Harper K, Dubois CM (2011) Hypoxia-induced invadopodia formation involves activation of NHE-1 by the p90 ribosomal S6 kinase (p90RSK). *PLoS One* 6: e28851.
11. Park SY, Jun JA, Jeong KJ, Heo HJ, Sohn JS, et al. (2011) Histone deacetylases 1, 6 and 8 are critical for invasion in breast cancer. *Oncol Rep* 25: 1677-1681.
12. Ahmad M, Hamid A, Hussain A, Majeed R, Qurishi Y, et al. (2012) Understanding Histone Deacetylases in the Cancer Development and Treatment: An Epigenetic Perspective of Cancer Chemotherapy. *DNA Cell Biol*.
13. Grozinger CM, Hassig CA, Schreiber SL (1999) Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4868-4873.
14. Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, et al. (2001) Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* 1: 194-202.
15. Kim HJ, Bae SC (2011) Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am J Transl Res* 3: 166-179.
16. Fukuda H, Sano N, Muto S, Horikoshi M (2006) Simple histone acetylation plays a complex role in the regulation of gene expression. *Brief Funct Genomic Proteomic* 5: 190-208.
17. Lin HY, Chen CS, Lin SP, Weng JR, Chen CS (2006) Targeting histone deacetylase in cancer therapy. *Med Res Rev* 26: 397-413.

18. Hess-Stumpp H (2005) Histone deacetylase inhibitors and cancer: from cell biology to the clinic. *Eur J Cell Biol* 84: 109-121.
19. Duvic M, Talpur R, Ni X, Zhang C, Hazarika P, et al. (2007) Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood* 109: 31-39.
20. Modesitt SC, Sill M, Hoffman JS, Bender DP (2008) A phase II study of vorinostat in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 109: 182-186.
21. Luu TH, Morgan RJ, Leong L, Lim D, McNamara M, et al. (2008) A phase II trial of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in metastatic breast cancer: a California Cancer Consortium study. *Clin Cancer Res* 14: 7138-7142.
22. Bruserud O, Stapnes C, Ersvaer E, Gjertsen BT, Rynningen A (2007) Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment: a review of the clinical toxicity and the modulation of gene expression in cancer cell. *Curr Pharm Biotechnol* 8: 388-400.
23. Bazzaro M, Lin Z, Santillan A, Lee MK, Wang MC, et al. (2008) Ubiquitin proteasome system stress underlies synergistic killing of ovarian cancer cells by bortezomib and a novel HDAC6 inhibitor. *Clin Cancer Res* 14: 7340-7347.
24. Lee YS, Lim KH, Guo X, Kawaguchi Y, Gao Y, et al. (2008) The cytoplasmic deacetylase HDAC6 is required for efficient oncogenic tumorigenesis. *Cancer Res* 68: 7561-7569.
25. Sakuma T, Uzawa K, Onda T, Shiiba M, Yokoe H, et al. (2006) Aberrant expression of histone deacetylase 6 in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 29: 117-124.
26. Bradbury CA, Khanim FL, Hayden R, Bunce CM, White DA, et al. (2005) Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia* 19: 1751-1759.
27. Shan B, Yao TP, Nguyen HT, Zhuo Y, Levy DR, et al. (2008) Requirement of HDAC6 for transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem* 283: 21065-21073.
28. Rey M, Irondelle M, Waharte F, Lizarraga F, Chavrier P (2011) HDAC6 is required for invadopodia activity and invasion by breast tumor cells. *Eur J Cell Biol* 90: 128-135.
29. Tsunoda K, Oikawa H, Tada H, Tatemichi Y, Muraoka S, et al. (2011) Nucleus Accumbens-Associated 1 Contributes to Cortactin Deacetylation and Augments the Migration of Melanoma Cells. *J Invest Dermatol*.
30. Zhang X, Yuan Z, Zhang Y, Yong S, Salas-Burgos A, et al. (2007) HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol Cell* 27: 197-213.
31. Kaluza D, Kroll J, Gesierich S, Yao TP, Boon RA, et al. (2011) Class IIb HDAC6 regulates endothelial cell migration and angiogenesis by deacetylation of cortactin. *EMBO J* 30: 4142-4156.
32. Nogales E (2000) Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* 69: 277-302.
33. Dong C, Li Z, Alvarez R, Jr., Feng XH, Goldschmidt-Clermont PJ (2000) Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity. *Mol Cell* 5: 27-34.
34. Inoue A, Yoshida N, Omoto Y, Oguchi S, Yamori T, et al. (2002) Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes. *J Mol Endocrinol* 29: 175-192.
35. Wang J, Lin A, Lu L (2010) Effect of EGF-induced HDAC6 activation on corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 2943-2948.

36. Artym VV, Zhang Y, Seillier-Moisewitsch F, Yamada KM, Mueller SC (2006) Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res* 66: 3034-3043.
37. Baldassarre M, Pompeo A, Beznoussenko G, Castaldi C, Cortellino S, et al. (2003) Dynamin participates in focal extracellular matrix degradation by invasive cells. *Mol Biol Cell* 14: 1074-1084.
38. Lizarraga F, Poincloux R, Romao M, Montagnac G, Le Dez G, et al. (2009) Diaphanous-related formins are required for invadopodia formation and invasion of breast tumor cells. *Cancer Res* 69: 2792-2800.
39. Sakurai-Yageta M, Recchi C, Le Dez G, Sibarita JB, Daviet L, et al. (2008) The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is required for tumor cell invasion downstream of Cdc42 and RhoA. *J Cell Biol* 181: 985-998.
40. Wolf K, Wu YI, Liu Y, Geiger J, Tam E, et al. (2007) Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 9: 893-904.
41. Yamaguchi H, Lorenz M, Kempiak S, Sarmiento C, Coniglio S, et al. (2005) Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J Cell Biol* 168: 441-452.
42. Kimura F, Iwaya K, Kawaguchi T, Kaise H, Yamada K, et al. (2010) Epidermal growth factor-dependent enhancement of invasiveness of squamous cell carcinoma of the breast. *Cancer Sci* 101: 1133-1140.
43. Desmarais V, Yamaguchi H, Oser M, Soon L, Mounemne G, et al. (2009) N-WASP and cortactin are involved in invadopodium-dependent chemotaxis to EGF in breast tumor cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 66: 303-316.
44. Rottiers P, Saltel F, Daubon T, Chaigne-Delalande B, Tridon V, et al. (2009) TGFbeta-induced endothelial podosomes mediate basement membrane collagen degradation in arterial vessels. *J Cell Sci* 122: 4311-4318.
45. Mandal S, Johnson KR, Wheelock MJ (2008) TGF-beta induces formation of F-actin cores and matrix degradation in human breast cancer cells via distinct signaling pathways. *Exp Cell Res* 314: 3478-3493.
46. Baldassarre M, Ayala I, Beznoussenko G, Giacchetti G, Machesky LM, et al. (2006) Actin dynamics at sites of extracellular matrix degradation. *Eur J Cell Biol* 85: 1217-1231.
47. Blanchette F, Rivard N, Rudd P, Grondin F, Attisano L, et al. (2001) Cross-talk between the p42/p44 MAP kinase and Smad pathways in transforming growth factor beta 1-induced furin gene transactivation. *J Biol Chem* 276: 33986-33994.
48. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR (2008) Cadherin switching. *J Cell Sci* 121: 727-735.
49. Shintani Y, Wheelock MJ, Johnson KR (2006) Phosphoinositide-3 kinase-Rac1-c-Jun NH2-terminal kinase signaling mediates collagen I-induced cell scattering and up-regulation of N-cadherin expression in mouse mammary epithelial cells. *Mol Biol Cell* 17: 2963-2975.
50. Maeda M, Johnson KR, Wheelock MJ (2005) Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *J Cell Sci* 118: 873-887.

51. Dubois CM, Blanchette F, Laprise MH, Leduc R, Grondin F, et al. (2001) Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme. *Am J Pathol* 158: 305-316.
52. Cui Y, Jean F, Thomas G, Christian JL (1998) BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *EMBO J* 17: 4735-4743.
53. Jean F, Stella K, Thomas L, Liu G, Xiang Y, et al. (1998) alpha1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7293-7298.
54. Feng XH, Derynck R (2005) Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 659-693.
55. Basu RK, Hubchak S, Hayashida T, Runyan CE, Schumacker PT, et al. (2011) Interdependence of HIF-1alpha and TGF-beta/Smad3 signaling in normoxic and hypoxic renal epithelial cell collagen expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 300: F898-905.
56. Chae KS, Kang MJ, Lee JH, Ryu BK, Lee MG, et al. (2011) Opposite functions of HIF-1alpha isoforms in VEGF induction by TGF-beta1 under non-hypoxic conditions. *Oncogene* 30: 1213-1228.
57. Sawyer JS, Anderson BD, Beight DW, Campbell RM, Jones ML, et al. (2003) Synthesis and activity of new aryl- and heteroaryl-substituted pyrazole inhibitors of the transforming growth factor-beta type I receptor kinase domain. *J Med Chem* 46: 3953-3956.
58. Jinnin M, Ihn H, Tamaki K (2006) Characterization of SIS3, a novel specific inhibitor of Smad3, and its effect on transforming growth factor-beta1-induced extracellular matrix expression. *Mol Pharmacol* 69: 597-607.
59. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, et al. (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417: 455-458.
60. Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, Grozinger CM, Schreiber SL (2003) Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4389-4394.
61. Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE, Leduc R (1995) Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* 270: 10618-10624.
62. Scandura JM, Boccuni P, Massague J, Nimer SD (2004) Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15231-15236.
63. Krasagakis K, Tholke D, Farthmann B, Eberle J, Mansmann U, et al. (1998) Elevated plasma levels of transforming growth factor (TGF)-beta1 and TGF-beta2 in patients with disseminated malignant melanoma. *Br J Cancer* 77: 1492-1494.
64. Ito N, Kawata S, Tamura S, Takaishi K, Shirai Y, et al. (1991) Elevated levels of transforming growth factor beta messenger RNA and its polypeptide in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 51: 4080-4083.
65. Behzadian MA, Wang XL, Al-Shabrawey M, Caldwell RB (1998) Effects of hypoxia on glial cell expression of angiogenesis-regulating factors VEGF and TGF-beta. *Glia* 24: 216-225.
66. Akhurst RJ, Derynck R (2001) TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol* 11: S44-51.
67. Massague J (2008) TGFbeta in Cancer. *Cell* 134: 215-230.

68. Brown KA, Pietenpol JA, Moses HL (2007) A tale of two proteins: differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF-beta signaling. *J Cell Biochem* 101: 9-33.
69. Roberts AB, Tian F, Byfield SD, Stuelten C, Ooshima A, et al. (2006) Smad3 is key to TGF-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev* 17: 19-27.
70. Deckers M, van Dinther M, Buijs J, Que I, Lowik C, et al. (2006) The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res* 66: 2202-2209.
71. Valcourt U, Kowanzetz M, Niimi H, Heldin CH, Moustakas A (2005) TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol Biol Cell* 16: 1987-2002.
72. Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, Heldin CH, ten Dijke P (1999) TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J Cell Sci* 112 (Pt 24): 4557-4568.
73. Wiercinska E, Naber HP, Pardali E, van der Pluijm G, van Dam H, et al. (2010) The TGF-beta/Smad pathway induces breast cancer cell invasion through the up-regulation of matrix metalloproteinase 2 and 9 in a spheroid invasion model system. *Breast Cancer Res Treat*.
74. Nascimento CF, Gama-De-Souza LN, Freitas VM, Jaeger RG (2010) Role of MMP9 on invadopodia formation in cells from adenoid cystic carcinoma. Study by laser scanning confocal microscopy. *Microsc Res Tech* 73: 99-108.
75. Chen WT, Wang JY (1999) Specialized surface protrusions of invasive cells, invadopodia and lamellipodia, have differential MT1-MMP, MMP-2, and TIMP-2 localization. *Ann N Y Acad Sci* 878: 361-371.
76. Stegmuller J, Huynh MA, Yuan Z, Konishi Y, Bonni A (2008) TGFbeta-Smad2 signaling regulates the Cdh1-APC/SnoN pathway of axonal morphogenesis. *J Neurosci* 28: 1961-1969.
77. Ju W, Ogawa A, Heyer J, Nierhof D, Yu L, et al. (2006) Deletion of Smad2 in mouse liver reveals novel functions in hepatocyte growth and differentiation. *Mol Cell Biol* 26: 654-667.
78. Gong K, Xing D, Li P, Hilgers RH, Hage FG, et al. (2011) cGMP inhibits TGF-beta signaling by sequestering Smad3 with cytosolic beta2-tubulin in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Endocrinol* 25: 1794-1803.
79. Yang Y, Rao R, Shen J, Tang Y, Fiskus W, et al. (2008) Role of acetylation and extracellular location of heat shock protein 90alpha in tumor cell invasion. *Cancer Res* 68: 4833-4842.
80. Mishra OP, Ashraf QM, Delivoria-Papadopoulos M (2010) Hypoxia-induced activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase in the cerebral cortex of newborn piglets: the role of nitric oxide. *Neurochem Res* 35: 1471-1477.
81. Wang X, Schneider A (2010) HIF-2alpha-mediated activation of the epidermal growth factor receptor potentiates head and neck cancer cell migration in response to hypoxia. *Carcinogenesis* 31: 1202-1210.
82. Kretzschmar M, Doody J, Massague J (1997) Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature* 389: 618-622.
83. Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I, Massague J (1999) A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* 13: 804-816.

- 84.** Sasseville M, Ritter LJ, Nguyen TM, Liu F, Mottershead DG, et al. (2010) Growth differentiation factor 9 signaling requires ERK1/2 activity in mouse granulosa and cumulus cells. *J Cell Sci* 123: 3166-3176.
- 85.** Deribe YL, Wild P, Chandrashaker A, Curak J, Schmidt MH, et al. (2009) Regulation of epidermal growth factor receptor trafficking by lysine deacetylase HDAC6. *Sci Signal* 2: ra84.
- 86.** Watabe M, Nakaki T (2011) Protein kinase CK2 regulates the formation and clearance of aggresomes in response to stress. *J Cell Sci* 124: 1519-1532.
- 87.** Mottet D, Ruys SP, Demazy C, Raes M, Michiels C (2005) Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity. *Int J Cancer* 117: 764-774.
- 88.** Wang S, Li X, Parra M, Verdin E, Bassel-Duby R, et al. (2008) Control of endothelial cell proliferation and migration by VEGF signaling to histone deacetylase 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7738-7743.
- 89.** Dallavalle S, Pisano C, Zunino F (2012) Development and therapeutic impact of HDAC6-selective inhibitors. *Biochem Pharmacol* 84: 756-765.
- 90.** Bennewith KL, Dedhar S (2011) Targeting hypoxic tumour cells to overcome metastasis. *BMC Cancer* 11: 504.

DISCUSSION

Au cours de cette discussion, certains résultats présentés dans les chapitres précédents seront abordés de nouveau de façon brève afin de faciliter la compréhension des hypothèses et des perspectives expérimentales discutées.

Le microenvironnement hypoxique est une caractéristique typique des tumeurs solides qui corrèle avec la formation des métastases et le mauvais pronostic des patients atteints de cancer (Lunt et al., 2009). La grande majorité des études précédentes ont associé l'augmentation de l'invasion des cellules cancéreuses en condition hypoxique avec leur habileté à réguler stratégiquement l'expression de gènes spécifiques tels que des protéases, des molécules d'adhésion et des facteurs de croissance afin de leur conférer un phénotype invasif. Beaucoup d'emphase a été mise sur l'étude du facteur de transcription HIF-1, un facteur inductible en hypoxie, et le rôle de HIF-1 dans la régulation transcriptionnelle de protéines impliquées dans l'invasion cellulaire. Dans notre laboratoire, nous avons démontré que l'expression de la furine, une convertase de proprotéines largement étudiée et associée au processus d'invasion cellulaire, était induite en hypoxie via le facteur de transcription HIF-1. L'augmentation hypoxique de la furine menait à l'activation de protéines précurseurs impliquées dans le processus de formation des métastases (McMahon et al., 2005).

L'augmentation de l'expression de la furine et son rôle dans différents aspects de la tumorigenèse ont été bien documentés. Au fait, plusieurs études démontrent que l'inhibition sélective de la furine résulte en une diminution des caractéristiques métastatiques des cellules cancéreuses (Basak et al., 2010; Coppola et al., 2008; de Cicco et al., 2007; Scamuffa et al., 2008). Or, malgré les études encourageantes, l'inhibition de la furine dans un système complexe *in vivo* reste problématique. En effet, il est bien connu que la furine joue un rôle primordial dans l'embryogenèse, de part son rôle dans la bioactivation de précurseurs protéiques impliqués dans le développement, tels que les BMPs, la protéine Nodal, le TGF β et le Notch-1 (Constam and Robertson, 1999; Cui et al., 1998; Dubois et al., 1995; Logeat et al., 1998; Pearton et al., 2001). Ainsi, l'absence de l'expression de la furine lors de l'embryogenèse résulte en des défauts de développement causant la mort des embryons de souris (Waibel, 1976). La dualité entre les fonctions biologiques

fondamentales de la furine et son implication dans le processus de tumorigenèse en font une cible thérapeutique problématique.

Devant l'importance de la convertase de pro-protéines furine dans la formation de métastases et son rôle primordial dans l'homéostasie cellulaire, il est essentiel de comprendre les mécanismes qui régulent ses activités dans les conditions normales et pathologiques. Ceci est d'autant plus nécessaire afin d'élaborer des stratégies d'intervention et d'inhibition sélective dans le but de contrôler efficacement les effets néfastes de cette enzyme.

Modèle d'étude

La grande majorité des expériences dans cette thèse ont été effectuées avec les cellules HT-1080, une lignée cancéreuse humaine de fibrosarcome. L'une des caractéristiques de ces cellules est une mutation sur le codon 61 qui résulte en une activation constitutive du gène N-Ras qui maintient son phénotype de cellules transformées et hautement métastatique (Brown et al., 1984; Hall et al., 1983). Étant donné que nous nous intéressons aux mécanismes impliqués dans l'invasion cellulaire et aux mécanismes potentiels qui induisent la formation des invadopodes, une des étapes finales dans la progression tumorale, l'utilisation d'une lignée cancéreuse transformée et invasive était nécessaire. De ce fait, plusieurs études utilisent cette lignée afin d'étudier les mécanismes d'invasion cellulaire dans le cancer (Jeon and Lee, 2010; Kim et al., 2001a; Park et al., 2013; Takino et al., 2011). De plus, les cellules HT-1080 expriment au moins 3 systèmes de collagénase de type 1, soit la sécrétion de MMP1 et de MMP2 ainsi que la protéase ancrée à la membrane MT1-MMP (Li et al., 2008a; Sabeh et al., 2004; Sabeh et al., 2009) qui sont essentielles à l'invasion cellulaire dépendante des protéases ainsi qu'à la formation des invadopodes (Artym et al., 2006; Botta et al., 2012; Chen and Wang, 1999; Clark et al., 2007). Le microenvironnement hypoxique influence également le phénotype métastatique de ces cellules (Zhang and Hill, 2007) et promeut leur capacité invasive (Subarsky and Hill, 2008). Ainsi, cette lignée cancéreuse hautement métastatique est un modèle approprié de part son expression importante de métalloprotéases de la matrice, substrats potentiels de la furine, ainsi que son phénotype invasif et transformé, afin d'étudier les mécanismes menant à la formation des métastases dans le microenvironnement hypoxiques des tumeurs solides.

Influence de l'hypoxie sur la localisation intracellulaire de la furine

Une des caractéristiques intéressantes de la furine est sa capacité à se retrouver dans différents compartiments cellulaires, lui permettant ainsi d'avoir accès à un vaste éventail de substrats. De ce fait, la régulation de la localisation et de routage intracellulaire de la furine ont été bien décrits dans la littérature (Molloy et al., 1999). La localisation prédominante de la furine au TGN laisse présager que son rôle dans la bioactivation de précurseurs protéiques a majoritairement lieu dans ce compartiment et dans la voie de biosynthèse. Par contre, plusieurs évidences récentes démontrent que la furine localisée à la membrane plasmique participe à l'activation de substrats spécifiques. L'étude la plus convaincante démontre la formation d'un complexe d'activation membranaire impliquant la protéine Cripto, une protéine ancrée à la membrane plasmique par un domaine glycosyl-phosphatidylinositol, qui permet le clivage protéolytique de la protéine Nodal, un membre de la super-famille du TGF β (Blanchet et al., 2008). Cette étude démontre que l'activation de proprotéines n'est pas restreinte au TGN et à la voie de sécrétion, et que la localisation de la furine à la périphérie cellulaire peut influencer sa capacité à maturer différents substrats.

Nous savons que le microenvironnement hypoxique des tumeurs solides influence la localisation cellulaire et le routage de différentes protéines impliquées dans la migration et l'invasion cellulaire. Certaines de ces protéines, telles que les intégrines et des métalloprotéases de la matrice, sont des substrats de la furine et sont associées à des régions spécialisées de la membrane plasmique. Ainsi, dans la première partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'influence de l'hypoxie sur la localisation cellulaire de la furine et à son implication potentielle dans l'invasion des cellules cancéreuses. D'après des études réalisées dans notre laboratoire, notre première observation concernant l'influence du microenvironnement hypoxique sur la localisation cellulaire de la furine provient d'un modèle de xéno greffes de cellules HT-1080 chez la souris. Les résultats démontrent clairement que la furine est surexprimée dans les zones hypoxiques de la tumeur, indiquant et confirmant l'hypothèse voulant que le microenvironnement hypoxique contribue à la régulation de la furine dans les tumeurs solides (McMahon et al., 2005). De façon

intrigante, l'observation la plus intéressante provient du fait que malgré que le marquage de la furine colocalise partiellement avec le TGN, la grande majorité de ce marquage de la furine se retrouve au niveau du cytoplasme de la cellule (Figure supplémentaire 3, (chapitre 1)). Ce résultat inédit indique que le microenvironnement hypoxique, en plus de réguler l'expression protéique de la furine (McMahon et al., 2005), régule également sa localisation intracellulaire.

Afin d'étudier la localisation intracellulaire de la furine, nous avons utilisé un système de surexpression de la furine étiquetée eGFP (en C-terminal) dans les cellules HT-1080. Étant donné que le routage intracellulaire de la furine est connu pour être régulé par des motifs de signalisation localisés dans sa queue cytoplasmique (Molloy et al., 1999), nous avons effectué en parallèle des expériences de surexpression d'une furine non-étiquetée. Ceci nous permettait de s'assurer que la protéine de fusion eGFP, une molécule de 29kDa, n'interférait pas avec les motifs de routage de la furine. De plus, nos constructions possèdent un promoteur CMV, contrairement au promoteur contenant des régions HRE (sensible à l'hypoxie) de la furine de type sauvage (McMahon et al., 2005). Ceci nous permettait d'étudier l'influence de l'hypoxie sur le routage de la furine indépendamment de l'induction hypoxique de son expression par le facteur de transcription HIF-1 α . Nos données démontrent de façon convaincante qu'une stimulation de 4 h en condition hypoxique induit la relocalisation de la furine du TGN vers la membrane plasmique (Figure 1, (chapitre 1)). De façon intéressante, cette relocalisation est hautement régulée du fait que la réoxygénation des cellules résulte en un retour de la furine au TGN. De plus, nos essais d'activité enzymatique de la furine à la membrane plasmique nous indiquent que la furine est fonctionnelle et active lorsque redistribuée à cet endroit. Ces résultats démontrent pour la première fois qu'un stimulus du microenvironnement tumoral influence la localisation intracellulaire de la convertase de pro-protéines furine et sont d'une importance capitale pour nos connaissances sur le rôle de cette enzyme dans la tumorigenèse.

Mécanismes potentiels de régulation de la redistribution de la furine à la membrane plasmique

Malgré le fait que la furine est souvent régulée à la hausse chez les cellules cancéreuses et que l'hypoxie induit son expression, elle est normalement faiblement exprimée dans les cellules. Ainsi, il a été proposé que l'ancrage de la furine à la membrane plasmique serait un mécanisme qui permet de concentrer la protéase dans des régions spécialisées de la membrane (Thomas, 2002). Le domaine cytoplasmique de la furine contient un motif VY capable de lier la filamine-A, une protéine d'ancrage au cytosquelette pour plusieurs protéines (Liu et al., 1997). Nos données utilisant le mutant de la furine-filamine-A (eGFP-fur-VA750) supportent l'hypothèse voulant que l'association de la furine avec la filamine-A soit une étape essentielle dans la relocalisation de la furine en hypoxie (Figure 6 (Chapitre 1)). Or, le mécanisme précis régissant l'interaction de la furine avec la filamine-A reste à être élucidé. La présence d'une tyrosine au site d'interaction suggère que des événements de phosphorylation/déphosphorylation pourraient réguler l'interaction entre les deux protéines. De ce fait, le motif de liaison VY à la filamine-A de la queue cytoplasmique de la furine ressemble au motif consensus de reconnaissance pour les domaines d'homologie à Src (SH2) de la phosphatase SHP-1/2 (Sweeney et al., 2005). De façon intéressante, l'activation de SHP-2 est modulée par des événements d'hypoxie et de réoxygénation ainsi que sa translocation dans les radeaux lipidiques où l'on trouve également la filamine-A (Park et al., 2009). Des expériences additionnelles seront nécessaires afin de valider le rôle de SHP-2 dans les événements de phosphorylation/déphosphorylation du motif VY dans la liaison de la furine à la membrane plasmique. Par exemple, des inhibiteurs pharmacologiques de SHP-2 ou des ARN interférents spécifiques à la phosphatase permettraient d'élucider le rôle de la phosphatase dans l'interaction des deux protéines par immunoprécipitation. D'un autre point de vue, il est connu que la phosphorylation de la filamine-A affecte son interaction avec plusieurs protéines (van der Flier and Sonnenberg, 2001). Par exemple, plusieurs kinases ont été démontrées comme étant capables de phosphoryler la ser2152 de la filamine-A telles que PAK1, PKA, Akt et p90 RSK2 (Jay et al., 2004; Ravid et al., 2008; Vadlamudi et al., 2002; Woo et al., 2004). De façon intéressante, l'hypoxie a été décrite comme capable d'activer certaines de ces kinases dont Akt (Beitner-Johnson et al., 2001; Stegeman et al., 2012). De plus, une étude récente de notre laboratoire démontre que l'hypoxie induit l'activation de p90 RSK (Lucien et al., 2011). D'autres kinases ont également été démontrées comme étant

capables de phosphoryler la filamine-A, mais les résidus impliqués n'ont pas été déterminés. De cette manière, en hypoxie, des événements de phosphorylation autant de la filamine-A que du motif VY de la queue cytoplasmique de la furine pourraient réguler l'interaction entre la furine et la filamine-A et ainsi permettre de concentrer la furine à la membrane plasmique.

Une autre possibilité expliquant la présence accrue de furine à la membrane plasmique réside en son interaction avec la protéine Cripto-1, une protéine hautement exprimée dans les cellules souches embryonnaires et les tumeurs humaines (Blanchet et al., 2008). Une étude récente démontre que l'hypoxie induit de façon significative l'expression de Cripto-1 dans des lignées de carcinomes embryonnaires humains et que son expression est régulée par le facteur de transcription HIF-1 α (Bianco et al., 2009). Conséquemment, il serait possible que l'hypoxie induise la formation d'un complexe membranaire comprenant la protéine Cripto-1 afin de recruter la furine à la membrane plasmique et de former un complexe de maturation. Par contre, l'interdépendance du facteur de transcription HIF-1 α et de Cripto-1 suggère un mécanisme de régulation transcriptionnel qui ne serait possiblement pas approprié pour la délocalisation rapide de la furine observée en conditions hypoxiques. Néanmoins, plusieurs expériences seraient nécessaires afin d'étudier le rôle de Cripto-1 dans la relocalisation membranaire de la furine. Il faudrait tout d'abord vérifier si l'hypoxie induit l'expression de Cripto-1 dans notre système, et ce, à des temps courts. L'utilisation d'ARN interférants spécifiques à Cripto-1 nous permettrait de déterminer si la délocalisation de la furine à la membrane plasmique est dépendante de son interaction avec Cripto-1. Étant donné que Cripto interagit avec le domaine P de la furine, un mutant de délétion de ce domaine pourrait également être utilisé afin de valider notre hypothèse (Blanchet et al., 2008).

L'internalisation de la furine a déjà été décrite comme étant un mécanisme dépendant de la clathrine (Crump et al., 2001; Teuchert et al., 1999a). Nos résultats utilisant un inhibiteur de l'internalisation via clathrine, la chlorpromazine, confirment ces données (Figure 4, (chapitre 1)). Par ailleurs, nos résultats démontrent que l'hypoxie induit également l'endocytose de la furine médiée par les cavéoles. Dans la littérature, plusieurs groupes ont observé que la furine est présente dans des microdomaines de la membrane plasmique riches en cavéoline-1, soit les radeaux lipidiques, et que la protéase est active

dans ces régions (Blanchet et al., 2008; Mayer et al., 2003; Watanabe et al., 2009). L'intérêt de la furine à se relocaliser dans les radeaux lipidiques pourrait être expliqué par la présence de certains de ses substrats tumorigéniques dans ces régions. À titre d'exemple, les intégrines et la MT1-MMP, deux médiateurs importants de l'invasion cellulaire, interagissent avec la cavéoline-1 (Labrecque et al., 2004). Il a aussi été démontré que la MT1-MMP est activée par la furine dans les radeaux lipidiques des cellules cancéreuses (Annabi et al., 2001). De ce fait, nous avons observé dans le laboratoire que l'hypoxie induisait la compartimentalisation de la furine avec la MT1-MMP dans des vésicules localisées en périphérie cellulaire (résultats non-présentés). Ainsi, l'induction de la voie d'endocytose dépendante de la cavéoline-1 pourrait être un mécanisme favorisant l'interaction de la furine avec un sous-groupe de substrats directement impliqués dans l'invasion cellulaire. Différentes évidences de la littérature suggèrent également une relation entre la filamine-A et la cavéoline-1. Premièrement, la liaison de la filamine-A avec la cavéoline-1 a été observée par différents groupes (Ravid et al., 2008; Stahlhut and van Deurs, 2000). Les chercheurs ont proposé que l'interaction de la filamine-A avec la cavéoline-1 à la membrane plasmique soit un mécanisme permettant de réguler l'internalisation dépendante des cavéoles et le routage de certaines vésicules (Sverdlov et al., 2009). De plus, une étude récente a observé que la filamine-A était requise pour le confinement des vésicules positives pour la cavéoline-1 situées dans des régions confinées de la membrane plasmique (Muriel et al., 2011). Ainsi, la formation d'un complexe membranaire incluant l'interaction entre la furine, la filamine-A et la cavéoline-1 pourrait permettre le confinement stratégique de la furine à la surface cellulaire et permettre son interaction avec certains précurseurs protéiques.

Les chaînes α des intégrines sont des substrats de la furine impliqués dans l'invasion cellulaire. Il est connu que le routage intracellulaire des intégrines permet d'établir et de maintenir la polarité cellulaire et de contrôler l'adhésion de la cellule à la matrice extracellulaire. Un des médiateurs importants du routage vésiculaire des intégrines sont les RabGTPases. Malgré le rôle bien défini de Rab11 dans l'invasion cellulaire induite en hypoxie (Yoon et al., 2005), nos résultats démontrent que la furine recycle plutôt dans des vésicules positives pour Rab4, qui constituent une boucle de recyclage rapide entre la membrane plasmique et les endosomes (Figure 5, (chapitre 1)). Aucune étude antérieure n'a

démontré une relation entre l'hypoxie et la voie de recyclage dépendante de Rab4. Par contre, des études récentes ont démontré que l'intégrine $\alpha V\beta 3$ est recyclée dans des vésicules positives pour Rab4, permettant ainsi à la cellule de se polariser et de migrer dans la matrice extracellulaire (di Blasio et al., 2010; White et al., 2007). De cette façon, la redistribution localisée de la furine dans les vésicules Rab4 pourrait permettre à la furine d'interagir avec et de maturer rapidement des substrats internalisés qui recyclent et qui sont essentiels à l'induction de la polarité cellulaire et à la migration.

L'ensemble de nos données indique que la furine en condition hypoxique est relocalisée dans une boucle de recyclage entre la membrane plasmique et les endosomes de recyclage. Or, les mécanismes moléculaires par lesquels le microenvironnement hypoxique permet de maintenir la furine en périphérie cellulaire sont indéterminés. Des études précédentes ont démontré le rôle de la CK-II dans la phosphorylation de la queue cytoplasmique de la furine ainsi que l'implication de ce mécanisme dans la localisation cellulaire de l'enzyme (Jones et al., 1995). De plus, l'expression, de même que l'activité de cette kinase sont affectées par l'hypoxie (Mottet et al., 2005). En accord avec nos résultats préliminaires (résultats non-présentés), l'hypoxie affecte également la localisation intracellulaire des sous-unités de la CK-II. La stimulation hypoxique des cellules résulte en une accumulation de la CK-II en périphérie cellulaire. La présence de la kinase en périphérie cellulaire pourrait permettre la phosphorylation de la furine à la membrane plasmique et ainsi prolonger la présence de l'enzyme à la surface cellulaire et dans les compartiments d'endocytose. En relation avec cette hypothèse, nous avons démontré que l'inhibition de la CK-II avec un agent pharmacologique (DRB) interfère avec la capacité de la furine à être redistribuée du TGN vers la membrane plasmique (Figure supplémentaire 4, chapitre 1)). Devant l'éventualité que la CK-II soit un acteur majeur dans la redistribution de la furine à la membrane plasmique en condition hypoxique, des études de phosphorylation de la queue cytoplasmique seraient nécessaires afin de déterminer si l'hypoxie induit la phosphorylation différentielle des résidus de la queue cytoplasmique de la furine. Des mutations ponctuelles des sérines 773 et 775 par des alanines (mimant un état déphosphorylé) ou des aspartates (mimant un état phosphorylé) pourraient nous permettre d'élucider le rôle de ces acides aminés et de la dépendance de la CK-II dans la relocalisation induite en hypoxie de la furine.

Rôle potentiel de la relocalisation de la furine dans la formation des invadopodes

Malgré le fait que la surexpression de la furine soit une caractéristique commune de plusieurs cancers, possiblement dû à sa régulation transcriptionnelle induite par le facteur de transcription HIF-1 en hypoxie, nos résultats mettent l'accent sur l'importance d'un autre mécanisme, soit la redistribution de la furine en périphérie cellulaire, dans la capacité des cellules cancéreuses à dégrader la matrice extracellulaire (Figure 7, chapitre 1)). Nos expériences utilisant le mutant de la furine-filamine-A (eGFP-fur-VA750) démontrent que l'interférence dans la redistribution de la furine en hypoxie inhibe l'invasion des cellules cancéreuses dans la matrice extracellulaire. Le fait que plusieurs substrats activés en hypoxie et impliqués dans l'invasion cellulaire se retrouvent dans les mêmes compartiments cellulaires que la furine suggère fortement que la redistribution stratégique de la furine permet son interaction avec différents substrats tumorigéniques essentiels pour l'invasion et la formation des métastases. Les cellules cancéreuses ont développé des mécanismes afin de dégrader la matrice extracellulaire et ainsi migrer dans les tissus. L'un de ces mécanismes est la formation d'invadopodes, des structures membranaires directement impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire et l'invasion cellulaire. La biogenèse de ces structures est hautement régulée et leur formation nécessite un transport actif des protéines à des régions spécifiques de la membrane plasmique. Parmi ces protéines, des intégrines, des métalloprotéases ainsi que certains facteurs de croissance, qui sont des substrats potentiels de la furine, sont activés et acheminés vers ces structures. Il serait donc envisageable de penser que la redistribution de la furine en périphérie cellulaire soit un mécanisme permettant un accès direct aux différents substrats de la furine qui sont nécessaires à la formation et les fonctions des invadopodes.

Les résultats découlant de nos essais d'invasion cellulaire suggèrent fortement que le mécanisme d'initiation de l'invasion est dépendant de la formation des invadopodes. Des données non-présentées dans cette thèse démontrent que l'utilisation de l'ilomastat (GM-6001), un inhibiteur à large spectre des métalloprotéases de la matrice, inhibe complètement l'invasion des cellules cancéreuses dans notre système, autant en condition normoxique que hypoxique. De ce fait, une des caractéristiques de la migration des cellules cancéreuses est la transition épithéliale-mésenchymale. Cette transformation est

caractérisée par la production et la sécrétion de métalloprotéases essentielles aux fonctions de dégradation des invadopodes (Eckert et al., 2011; Pignatelli et al., 2012). La nécessité de la MT1-MMP à être activée par clivage protéolytique dépendant de la furine renforce l'hypothèse voulant que la relocalisation de la furine puisse permettre l'interaction de l'enzyme avec son substrat et ainsi mener aux fonctions de dégradation de l'invadopode. À l'aide de la microscopie confocale, nous avons observé que la furine relocalisée en hypoxie colocalise avec la cortactine, un marqueur bien documenté de la formation des invadopodes (Bowden et al., 1999; Bowden et al., 2006), dans des régions proximales aux sites de dégradation de la matrice extracellulaire (résultats non-présentés). La présence de la furine aux sites de formation de l'invadopode suggère que l'enzyme pourrait interagir et activer des substrats directement impliqués dans les fonctions des invadopodes, tels que les intégrines et les métalloprotéases de la matrice qui sont recyclées et acheminées à ces structures (Mueller et al., 1999; Nakahara et al., 1997; Nakahara et al., 1998; Nakahara et al., 1996).

Plusieurs autres évidences de la littérature indiquent que la redistribution localisée de la furine à la membrane plasmique pourrait être impliquée dans la formation des invadopodes et mener à l'invasion cellulaire. Comme nous l'avons vu précédemment, l'hypoxie induit la relocalisation de la furine dans des régions spécialisées de la membrane plasmique riches en cavéoline-1. Des études récentes ont déterminé que les radeaux lipidiques ainsi que la cavéoline-1 sont essentiels à la biogenèse de l'invadopode (Caldieri et al., 2009; Yamaguchi and Oikawa, 2010). De plus, une étude a démontré que la cavéoline-1 s'accumule aux invadopodes et colocalise avec les radeaux lipidiques internalisés. L'étude a également observé que la MT1-MMP est localisée dans les radeaux lipidiques et qu'elle est transportée aux sites d'invadopodes dans des vésicules enrichies en cavéoline-1 (Yamaguchi et al., 2009). Cette étude démontre que les invadopodes sont des sites où le routage des radeaux lipidiques est primordial et que la cavéoline-1 est un régulateur essentiel des fonctions de la MT1-MMP dans l'invasion cellulaire dépendante des invadopodes. Ainsi, elle supporte l'hypothèse voulant que le recyclage de la furine dans les radeaux lipidiques induit en hypoxie, pourrait permettre la formation d'un compartiment de maturation de substrats impliqués dans les fonctions de dégradation des invadopodes via son interaction avec la MT1-MMP.

Nous avons également démontré que la capacité de la furine à s'ancrer à la filamine-A est essentielle à la redistribution de la furine en périphérie cellulaire. De ce fait, une étude par microscopie électronique a détecté la présence de filamine-A dans les structures d'invadopodes (Takkunen et al., 2010) suggérant que la filamine-A pourrait permettre de recruter localement la protéase aux invadopodes. Des essais préliminaires démontrent que, tout comme l'essai d'invasion 3D, un blocage de l'interaction entre la furine et la filamine-A diminue significativement la capacité des cellules à dégrader la matrice extracellulaire en condition hypoxique dans les essais d'invadopodes (résultats non-présentés). Ces données suggèrent que les fonctions de la furine dans l'induction de la formation des invadopodes en hypoxie sont associées à des événements localisés à la membrane plasmique ou en périphérie cellulaire dans la voie de recyclage.

L'interaction de la filamine-A avec la cavéoline-1 permet la régulation du routage des vésicules riches en radeaux lipidiques. L'association de ces deux protéines résulte en une phosphorylation de la cavéoline-1 par la kinase Src (Sverdlov et al., 2009). Src est une composante essentielle et critique dans la formation des invadopodes et régit la cascade de signalisation menant à la réorganisation du cytosquelette d'actine. L'activation de Src dépendante des intégrines pourrait non seulement initier la formation de l'invadopode, mais également favoriser l'interaction de la cavéoline-1 avec la filamine-A. La formation de ce complexe membranaire pourrait permettre le recrutement de la furine dans les compartiments de maturation afin d'acheminer les métalloprotéases de la matrice actives aux sites de dégradation des invadopodes.

La kinase Src pourrait également jouer un rôle central dans la relocalisation de la furine en périphérie cellulaire. La CK-II a un rôle prédominant dans le routage intracellulaire de la furine via la phosphorylation des sérines 773-775 situées dans sa queue cytoplasmique. Il a été démontré que la sous-unité catalytique de la CK-II pouvait être phosphorylée par des protéines kinases de la famille Src résultant en l'augmentation de son activité catalytique (Donella-Deana et al., 2003). De plus, l'hypoxie induit l'activité de la kinase Src dans les cellules cancéreuses Caco2 et HT-29, et ce après 4 h d'incubation en hypoxie, période à laquelle la furine est relocalisée dans les cellules HT-1080 (Zeng et al., 2010). Ainsi, l'activation hypoxique de Src pourrait augmenter l'activité catalytique de la CK-II et induire la phosphorylation de la queue cytoplasmique de la furine et du fait même,

prolonger son accumulation à la surface cellulaire. Des expériences supplémentaires devront être effectuées afin de vérifier le rôle de Src dans les mécanismes potentiels régulant le routage intracellulaire de la furine en condition hypoxique. Dans notre laboratoire, nous avons déjà à notre disposition les outils nécessaires afin de valider ces hypothèses. Nous pourrions utiliser des dominants négatifs de Src, et vérifier par immunoprécipitation l'importance de la kinase dans l'association de la filamine-A avec la cavéoline-1. Par immunofluorescence, nous pourrions également étudier la nécessité de l'activité de Src dans la délocalisation de la furine et déterminer si l'activité de la CK-II en condition hypoxique est dépendante de la phosphorylation par Src par des essais kinase.

L'ensemble de nos travaux présentés au chapitre 1 démontre que le microenvironnement hypoxique influence la localisation intracellulaire de la furine et ce indépendamment de sa régulation transcripionnelle par le facteur de transcription HIF-1. La relocalisation stratégique de la furine influence fortement la capacité des cellules cancéreuses à dégrader et à migrer dans la matrice extracellulaire démontrant pour la première fois que l'activité membranaire de la furine est un mécanisme par lequel l'enzyme assure ses fonctions tumorigéniques.

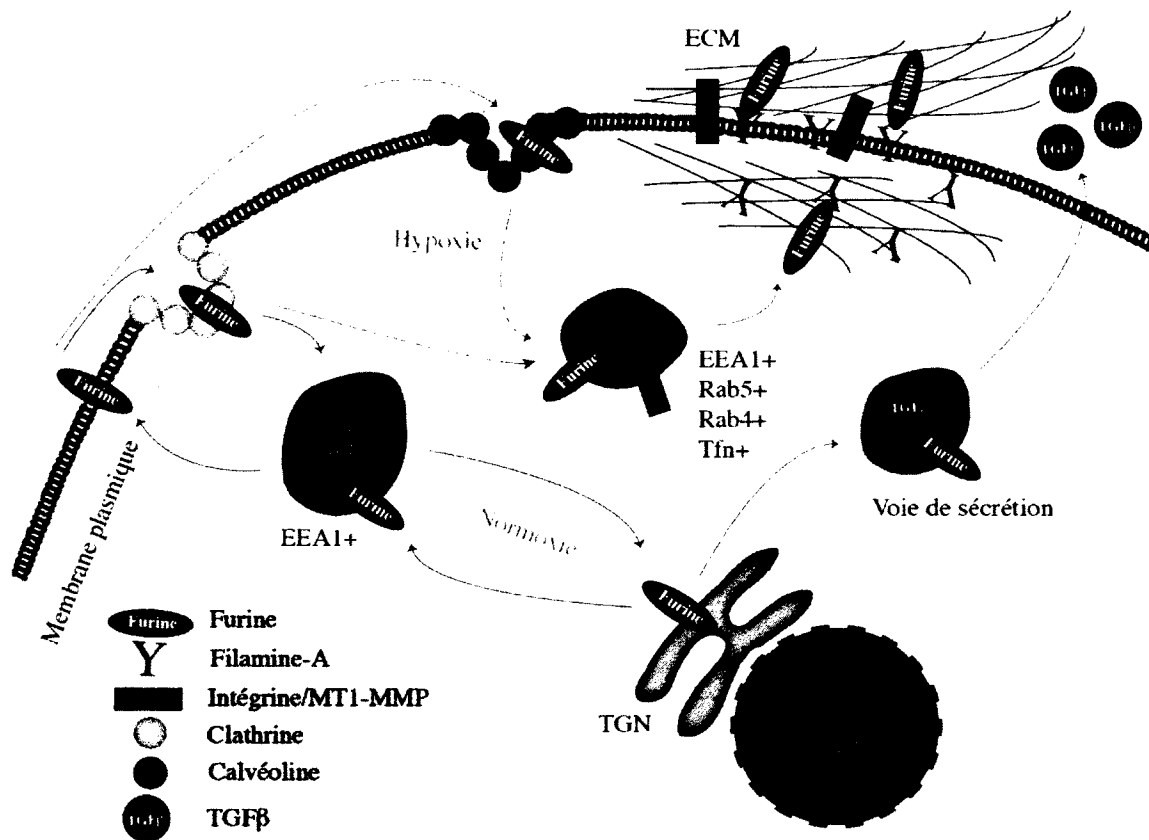


Schéma 3: Récapitulation du chapitre 1

Au chapitre 1, nous avons étudié l'influence de l'hypoxie sur la localisation intracellulaire de la furine. En condition normoxique, la furine est localisée principalement au TGN. Tel qu'indiqué par les flèches bleues, la furine recycle dans 2 boucles de recyclage; une entre le TGN et les endosomes, et la seconde entre la membrane plasmique et les endosomes de recyclage. Dans notre étude, nous avons démontré qu'en condition hypoxique, la furine était relocalisée principalement dans la boucle de recyclage entre la membrane plasmique et les endosomes de recyclage. La liaison à la filamine-A était essentielle pour la relocalisation à la membrane plasmique. De plus, en hypoxie, la furine était internalisée par 2 voies d'endocytose : la voie traditionnelle dépendante de la clathrine, et une voie induite en hypoxie, la voie des cavéoles. Suite à son internalisation, la furine était recyclée dans des vésicules EEA1+, Rab4/5+ et Tfn+ afin d'être retournée à la membrane plasmique. Nos résultats démontrent que la relocalisation de la furine en périphérie cellulaire était importante pour l'induction de l'invasion cellulaire en condition hypoxique et que l'interférence dans la redistribution de la furine inhibait l'invasion des cellules cancéreuses.

Ainsi, plusieurs évidences suggèrent une implication importante de la furine membranaire dans la formation des invadopodes induite en hypoxie. Des résultats présentés au chapitre 3 démontrent que l'inhibition de l'activité de la furine avec l' $\alpha 1$ -PDX diminue significativement la formation des invadopodes en condition hypoxique, démontrant son rôle essentiel dans la biogenèse de ces structures. Ainsi, au chapitre 2, nous nous sommes intéressés aux fonctions de la furine en périphérie cellulaire dans la maturation de substrats tumorigéniques et au rôle potentiel de celle-ci dans la formation des invadopodes.

Rôle de la délocalisation de la furine en hypoxie dans la maturation de substrats tumorigéniques.

Plusieurs facteurs de croissance peuvent induire la formation d'invadopodes suite à leur liaison avec leurs récepteurs membranaires. L'un de ces facteurs de croissance est le TGF β . En plus d'être un substrat de la furine ayant une implication directe dans la tumorigenèse, différentes études ont démontré son rôle dans la biogenèse des invadopodes et l'invasion des cellules cancéreuses (Mandal et al., 2008; Oxmann et al., 2008; Pignatelli et al., 2012). Le TGF β est synthétisé sous la forme d'une protéine précurseur, le pro-TGF β , qui doit être clivé par une protéase de type furine avant de devenir biologiquement actif. Jusqu'à ce jour, aucune étude n'a démontré de façon directe les compartiments intracellulaires impliqués dans bioactivation du pro-TGF β . Étant donné la prédominance de la furine au TGN, on a supposé que la maturation du pro-TGF β a lieu dans ce compartiment ou dans la voie de sécrétion constitutive (Dubois et al., 2001; Takahashi et al., 1994). Or, une étude du groupe du Dr Cantin, de l'Université de Sherbrooke, laisse supposer que la maturation du TGF β n'est pas restreinte au TGN (Basque et al., 2008). L'étude a démontré que l'utilisation d'agents lysosomotropiques tels que la chloroquine ou le NH₄Cl diminue significativement la production de TGF β bioactif. Ces agents neutralisants pénètrent les compartiments acides de la cellule sous forme protonée, ce qui résulte en une augmentation du pH intravésiculaire (de Duve et al., 1974; Oda and Ikehara, 1985; Oda et al., 1986). Ces résultats laissent supposer que le pH intracellulaire est important autant pour la maturation du TGF β que pour la sécrétion de sa forme bioactivable.

Le pH des différents compartiments intracellulaires de la cellule est hautement régulé. Le pH des vésicules de sécrétion et celles de recyclage est plus acide que le pH celui

du TGN. Étant donné que la furine est relocalisée dans des vésicules en périphérie cellulaire, caractérisées par un pH luminal plus acide, et que le pH influence la maturation du TGF β , la relocalisation de la furine dans les vésicules acides pourrait favoriser la maturation du TGF β en conditions hypoxiques.

Maturation dépendante du pH du TGF β

Tel que démontré dans l'étude du Dr Cantin, nos résultats indiquent que la basification du pH intracellulaire avec des agents neutralisants inhibe significativement la maturation du TGF β (Figure 1, (chapitre 2)). Différentes hypothèses peuvent expliquer ce résultat. Premièrement, la neutralisation du pH peut influencer directement l'activité enzymatique de la furine. De ce fait, différentes études ont démontré que la basification du pH endosomal inhibe l'activité enzymatique de la furine. Par exemple, l'utilisation de NH₄Cl et de chloroquine inhibe la conversion protéolytique de la pro-albumine, un substrat de la furine (Arbogast et al., 1976; Oda and Ikehara, 1985). L'augmentation du pH des vacuoles inhibe également le clivage protéolytique de l'exotoxine A, une toxine bactérienne clivée et activée par la furine (Corboy and Draper, 1997). Une autre étude indique que la capacité de la furine à cliver l'enzyme de conversion de l'urotensine-II était inhibée à pH 5.0 (Russell et al., 2004). De plus, des travaux utilisant un substrat synthétique de la furine (boc-RVRR-MAC) ont démontré que le pH influençait la capacité de la furine à cliver ce substrat. L'augmentation du pH (pH > 8.0) ainsi que l'acidification (pH < 6.5) diminue l'activité enzymatique de la furine (Dufour et al., 2005) qui est optimale à pH neutre. Ainsi, les variations de pH intracellulaire influencent directement l'activité endoprotéolytique de la furine pour certains de ses substrats. Il est donc possible que la basification du pH intracellulaire suite au traitement avec les agents neutralisants influence la capacité de la furine à cliver le pro-TGF β et explique la baisse de sa maturation observée dans nos expériences.

Il est bien établi que l'acidification luminale de la voie endocytaire, incluant les endosomes et les lysosomes, est requise pour leurs fonctions (Mellman, 1992; Mellman et al., 1986). Des expériences pionnières par le groupe de Heuser ont clairement démontré que des changements dans le pH intracellulaire altèrent sévèrement la morphologie des organites et leur mouvement (Heuser, 1989). De ce fait, des variations dans le pH luminal

des organites peuvent influencer le routage de ces compartiments. Ainsi, une augmentation du pH intra-endosomal promeut le mouvement des endosomes vers le Golgi (Nieland et al., 2004; van Weert et al., 1995; van Weert et al., 1997). D'autres études ont démontré que l'augmentation locale du pH affectait la formation des vésicules et la machinerie de routage intracellulaire permettant aux vésicules de retourner à la membrane plasmique (Aniento et al., 1996; Maranda et al., 2001; Zeuzem et al., 1992). Ainsi, la hausse du pH intracellulaire et des compartiments intracellulaires pourrait empêcher le routage des vésicules vers la membrane plasmique et les confiner à proximité du TGN. Il est donc possible de penser que le traitement avec des agents neutralisants interfère avec le routage vésiculaire, causant ainsi des altérations dans la voie de sécrétion qui pourrait influencer la maturation du TGF β . La basification des vésicules, qui promeut le transport rétrograde des compartiments pourrait restreindre la furine dans la boucle de recyclage entre les endosomes et le TGN et empêcher son interaction avec le pro-TGF β en périphérie cellulaire. De ce fait, dans notre laboratoire, des essais préliminaires démontrent que le pH acide affecte la localisation intracellulaire de la furine. Suite à l'incubation des cellules dans un milieu conditionné acide, la furine se localise de façon prédominante dans des vésicules cytoplasmiques (résultats non-présentés). Des altérations dans la voie de sécrétion pourraient également affecter la sécrétion du TGF β . Par contre, nos résultats démontrent que malgré l'utilisation d'agents neutralisants, la quantité de TGF β sécrété n'est pas significativement affectée dans les temps étudiés. Ainsi, les effets secondaires de l'utilisation de ses agents sur le routage vésiculaire semblent être négligeables.

L'hypothèse la plus probante concernant l'action des drogues lysosomotropiques sur la maturation du TGF β est une influence directe de la basification des vésicules intracellulaires. Des résultats non-présentés dans cette thèse démontrent clairement que l'incubation des cellules avec le NH₄Cl et la chloroquine résulte en une basification des endosomes. De plus, l'utilisation du tamoxifène renforce l'hypothèse que le pH endosomal est important pour la maturation du TGF β . Le tamoxifène a tout d'abord été décrit comme un antagoniste du récepteur de l'estrogène dans les tissus de sein. Il affecte plusieurs aspects de la physiologie cellulaire, incluant l'activité de protéases sécrétées, l'adhésion à la matrice extracellulaire, la sécrétion de facteurs de croissance et l'activité de nombreux transporteurs membranaires (Williams et al., 1997). Il est d'ailleurs utilisé en clinique dans

le traitement contre les tumeurs du seins métastatiques (Jordan, 1995). Lors de son administration chez le patient, le tamoxifène atteint la concentration de 30 μ M dans les tissus (Dragan et al., 1996). Par contre, une étude a démontré qu'à des concentrations de 0.5 à 10 μ M, le tamoxifène pouvait avoir des effets directs sur l'acidification des organites cellulaires de part son métabolite actif, l'hydroxytamoxifène, ce qui permettait la basification de ces organites (Altan et al., 1999). Dans nos essais, nous avons utilisé des concentrations de 5 et 10 μ M, concentrations auxquelles le pH vésiculaire est affecté. Nos résultats démontrent clairement que la basification des vésicules avec le tamoxifène inhibe la maturation du TGF β , malgré une légère baisse dans les niveaux de sécrétions de TGF β qui peuvent être expliqué par les effets secondaires du tamoxifène. Collectivement, ces résultats démontrent que l'acidité des compartiments intracellulaires affecte la maturation du TGF β par la furine.

Mécanismes moléculaires régulant la maturation du TGF β dépendante du pH

La présence d'une histidine conservée au site de clivage du pro-TGF β par la furine nous suggérait l'importance de cet acide aminé dans la maturation du facteur de croissance. Les histidines sont des acides aminés senseurs de pH et leur protonation en milieu acide peut induire des changements conformationnels dans la structure tertiaire des protéines. À ce jour, seulement deux études ont démontré l'importance des histidines dans le clivage protéolytique de substrats de la furine. Par exemple, la chaîne α de l'intégrine α 4 et la pro-BMP4, contiennent des histidines en positions P6 qui influent la capacité de la furine à cliver les pro-protéines. Ces études suggèrent que la maturation de ces substrats a lieu dans des compartiments acides (Bergeron et al., 2003; Degrin et al., 2004). Nos résultats de mutagenèse dirigée vont en ce sens et démontrent clairement que l'histidine en position P3 est également importante dans la maturation de la pro-protéine du TGF β . La mutation de l'histidine par une arginine favorise la maturation du TGF β et la mutation par une alanine diminue la maturation du TGF β (Figure 3, (chapitre 2)). Malgré que la mutation de l'histidine en arginine ou en alanine mime un état protoné ou déprotoné, il est possible que les mutations induisent un changement conformationnel du pro-TGF β qui serait indépendant de la protonation et du pH vésiculaire. Ainsi, il serait important d'effectuer des expériences *in vitro* afin de vérifier si le pH acide de vésicules intracellulaires induit la

protonation de l'histidine 276 et vérifier l'impact de cette protonation sur la capacité de la furine à cliver le pro-TGF β . Néanmoins, différentes hypothèses peuvent expliquer l'augmentation de la maturation du TGF β suite à la possible protonation de l'histidine. L'une des plus probable est un changement conformationnel induit par la protonation des histidines. Différentes évidences de la littérature supportent cette hypothèse. Par exemple, des histidines conservées dans le domaine « epidermal growth factor-like » de la stabiline-2 modulent la reconnaissance dépendante du pH avec la phosphatidylsérine dans les cellules apoptotiques (Kim et al., 2010). L'étude a démontré que la liaison de la phosphatidylsérine à la stabiline-2 est augmentée à pH acide et qu'une histidine conservée à proximité du site de liaison était critique pour l'interaction des deux protéines. Les auteurs ont proposé que la protonation de l'histidine entraînait un changement conformationnel qui augmentait l'affinité de la liaison à faible pH. Une étude récente a également démontré que l'auto-activation de la furine était dépendante de la présence d'histidines dans son pro-domaine (Dillon et al., 2012). Des études précédentes avaient identifié l'histidine 69 du pro-peptide de la furine en tant que senseur de pH. Il a été démontré que la protonation de cette histidine régule l'activation de la furine au TGN dans des conditions de pH d'environ 6.5 (Felicangeli et al., 2006). Cette étude a également démontré que la sensibilité au pH était dépendante du nombre de résidus histidines présent dans le pro-domaine de la furine. De plus, des expériences de dynamique moléculaire et de spectroscopie démontrent que la protonation des histidines induit le dépliement du pro-peptide afin d'augmenter l'auto-protéolyse (Dillon et al., 2012). Ainsi, on peut postuler qu'une protonation de l'histidine 276 pourrait induire un changement conformationnel du pro-TGF β résultant en un dépliement de la structure tertiaire de la pro-protéine. Ceci pourrait augmenter l'accessibilité du site de clivage protéolytique du TGF β par la furine. Des analyses plus approfondies de spectroscopie moléculaire devront être effectuées afin de vérifier si le pH acide des vésicules induit la protonation de l'histidine 276. Nous pourrions utiliser des milieux dont le pH est pré-défini afin d'étudier la protonation de l'histidine *in vitro*. Nous pourrions également étudier le rôle de l'histidine à l'aide d'essais d'immunoprécipitation, soit avec des milieux conditionnés à différents pH ou à l'aide de nos mutants du TGF β . Les essais d'immunoprécipitation permettent de vérifier l'importance de la protonation dans la liaison du TGF β par la furine et de vérifier si

l'affinité entre les deux protéines est influencée par le pH. Notre étude s'est concentrée sur l'histidine en P3 (His 276) du site de clivage et a démontré un rôle primordial de cet acide aminé dans le clivage dépendant du pH du TGF β . Par contre, nous n'excluons pas la possibilité que la présence d'autres histidines conservées influence la charge globale du TGF β et altère la conformation de la protéine (Figure 2, (chapitre 2)).

Les compartiments de maturation du TGF β .

Nos observations indiquent que le pH acide favorise le clivage protéolytique du TGF β et ce, probablement suite à la protonation de l'histidine 276. La V-ATPase est un régulateur important de l'homéostasie du pH luminal des vésicules et elle est exprimée chez tous les eucaryotes (Forgac, 2007; Kane, 2006). Sa fonction centrale est de transloquer des protons du cytoplasme à la lumière des organites. Outre ses fonctions de régulation du pH intracellulaire, des évidences récentes suggèrent que la V-ATPase module également le routage des vésicules intracellulaires. De ce fait, une étude récente a démontré que la V-ATPase interagit avec Arf6 et ARNO, de façon dépendante du pH et que l'interférence dans l'interaction de ce complexe inhibe l'endocytose (Hurtado-Lorenzo et al., 2006). Ainsi, des altérations dans l'activité de la V-ATPase pourrait influencer non seulement le pH intravésiculaire mais également le routage intracellulaire des vésicules. Nos données démontrent clairement que l'inhibition de la V-ATPase avec la bafilomycine A1 inhibe de façon significative la maturation du TGF β (figure 4, (chapitre 2)). Nous savons que la bafilomycine A1 se lie au complexe V0 de la V-ATPase et inhibe ainsi la translocation de protons du cytoplasme vers la lumière des organites (Crider et al., 1994; Droese and Altendorf, 1997; Hanada et al., 1990; Mattsson and Keeling, 1996; Zhang et al., 1994). Étant donné que le complexe Arf6/ARNO interagit avec la sous-unité C et l'isoforme $\alpha 2$ de la V-ATPase respectivement (Hurtado-Lorenzo et al., 2006), l'utilisation de la bafilomycine A1 influence la capacité de translocation de protons de la V-ATPase et non son implication dans le routage membranaire des vésicules. Ainsi, les résultats que nous avons observés sont probablement en relation directe avec la basification du pH luminal des vésicules régulé par la V-ATPase.

Les variations de pH intravésiculaire avec les inhibiteurs pharmacologiques de la V-ATPase ainsi que les différents agents neutralisants pourraient avoir une influence sur la

capacité de la furine à cliver le pro-TGF β et ce, indépendamment de la protonation possible de l'histidine 276 en milieu acide. Effectivement, les variations de pH influent sur le routage intracellulaire des différents compartiments et pourrait moduler la localisation intracellulaire de la furine et influencer le clivage protéolytique de pro-TGF β par la furine. Il serait également envisageable que le milieu acide induise la protonation d'autres protéines impliquées dans le routage intracellulaire et affecte les fonctions de ces protéines et ainsi perturbe le routage vésiculaire. De plus, il serait important de vérifier si les conditions acides affectent directement l'état de protonation de la furine, ce qui pourrait moduler directement son activité enzymatique. Des expériences supplémentaires devront être effectuées afin de vérifier ces différentes hypothèses.

Nos résultats nous permettent de conclure que la maturation du TGF β a lieu dans des compartiments cellulaires où le pH est acide. À ce jour, aucune étude n'a identifié le compartiment de la maturation du TGF β . Malgré le fait que nous utilisons un système de surexpression du TGF β , il nous a été impossible de détecter le TGF β par immunofluorescence. Par contre, nous n'avons pas tenté d'étiqueter le TGF β . La présence d'une étiquette pourrait interférer dans la dimérisation du TGF β ainsi qu'à sa liaison au récepteur. Nous avons donc utilisé une stratégie alternative afin d'identifier les vésicules de maturation. Tel que décrit dans l'introduction, les NHEs intracellulaires sont localisés de façon spécifique dans des compartiments cellulaires. Le NHE6 est localisé aux endosomes de recyclage, le NHE7 au TGN et le NHE9 aux endosomes tardifs. La surexpression de ces échangeurs induit la basification de leurs compartiments respectifs, nous permettant ainsi d'étudier l'effet de la basification du pH luminal des compartiments sur la maturation du TGF β (Nakamura et al., 2005). Nos résultats démontrent clairement que la surexpression de NHE6 diminue la maturation du TGF β identifiant par le fait même les endosomes de recyclage comme étant les vésicules principales où la maturation de la pro-protéine a lieu (Figure 4, (chapitre 2)). Nos résultats indiquent également que la surexpression de NHE6 résulte en une basification des endosomes, tel que décrit dans la littérature (Xinhan et al., 2011). Une étude récente suggère que la surexpression de NHE6 influence non seulement la régulation du pH des endosomes de recyclage mais également l'endocytose dépendante de la clathrine (Xinhan et al., 2011). Les auteurs ont observé que l'expression à la baisse de NHE6 diminuait l'endocytose de la transferrine via la régulation du pH. Il est donc possible

que la surexpression de NHE6 puisse influencer également l'internalisation et le recyclage d'autres protéines, telles que la furine, et ainsi influencer la maturation du TGF β . Afin de tester cette hypothèse, nous avons utilisé le mutant TGF β -P3R qui est insensible aux variations de pH. Nos résultats démontrent clairement que malgré la basification des endosomes induite par la surexpression de NHE6, la maturation du TGF β -P3R n'est pas affectée. Ceci suggère que la basification des vésicules induite par la surexpression de NHE6 est le mécanisme principal qui influence la maturation du TGF β . De plus, nos résultats d'immunofluorescence démontrent également que la surexpression de NHE6 n'influence pas sa localisation cellulaire. La colocalisation du NHE6 avec des marqueurs des endosomes de recyclage EEA1 et Rab4 suggère que les effets observés suite à la surexpression de NHE6 sont dus spécifiquement à la basification de ces compartiments cellulaires. Il aurait été également intéressant d'utiliser des ARN interférents spécifiques à NHE6 afin de valider nos observations. L'expression à la baisse de NHE6 résulterait en une acidification des endosomes de recyclages et nous devrions observer par le fait même une augmentation de la maturation du TGF β . Ces expériences devront être réalisées ultérieurement.

Rôle de la relocalisation de la furine en hypoxie dans la maturation du TGF β .

Nos expériences indiquent que le clivage protéolytique du pro-TGF β a lieu dans les endosomes de recyclage de la périphérie cellulaire, des compartiments caractérisés par un pH luminal acide. Ainsi, la redistribution de la furine dans une boucle de recyclage entre la membrane plasmique et les endosomes de recyclage observée en condition hypoxique (chapitre 1) favoriserait l'interaction et la maturation du TGF β par la furine. De ce fait, l'interférence dans la redistribution de la furine dans cette boucle de recyclage via le mutant furine-filamine-A (eFGP-fur-VA750) et le dominant négatif Rab4Q67L, diminue de façon significative, mais pas totalement, la maturation du TGF β (Figure 5, (chapitre 2)). Malgré que cette expérience a été réalisée en condition normoxique, elle démontre l'importance de la localisation de la furine en périphérie cellulaire. Il est connu qu'environ 5% de la totalité de la furine se retrouve à la membrane plasmique en condition physiologique normale et recycle de manière dynamique dans les endosomes (Mallet and Maxfield, 1999). Ainsi, malgré une faible concentration de la protéase en périphérie cellulaire, la nécessité de la

furine à se localiser dans les vésicules de recyclage est d'une importance capitale pour la maturation adéquate du TGF β . Des expériences supplémentaires en condition hypoxique devront être effectuées afin de démontrer l'importance de la boucle de recyclage de la furine en périphérie cellulaire dans la maturation du TGF β .

Nos résultats suggèrent également que la maturation du TGF β a lieu partiellement au TGN. La surexpression de NHE7, localisé au TGN, diminue faiblement le clivage protéolytique du TGF β . Il est connu qu'en condition normoxique, la furine est localisée de façon principale au TGN et recycle entre les endosomes et le TGN (Schafer et al., 1995; Takahashi et al., 1995). Étant donné que le pH du TGN est légèrement acide, mais moindre que celui des vésicules de recyclage, la protonation de l'histidine 276 pourrait avoir également lieu dans ce compartiment. Par contre, comme nous l'avons observé, la surexpression de NHE6 régule de façon beaucoup plus importante la maturation du TGF β . Cette observation renforce l'hypothèse que l'environnement acide des endosomes induit de façon plus importante la protonation de l'histidine 276, ce qui favorise l'interaction de la furine avec le pro-TGF β . Ainsi, la délocalisation de la furine dans les compartiments acides en périphérie cellulaire favoriserait le clivage protéolytique du pro-TGF β par la furine malgré qu'une certaine quantité de TGF β pourrait être clivée au niveau du TGN.

De plus, il serait envisageable de proposer que la boucle de recyclage en périphérie cellulaire empruntée par la furine et induite en condition hypoxique permettrait la formation d'un compartiment de maturation, caractérisé par un pH luminal acide, qui favoriserait le clivage protéolytique du TGF β . Effectivement, nos données confirment qu'une stimulation hypoxique augmente la maturation du TGF β (Figure 8, (chapitre 2)).

Maturation protéolytique potentielle du TGF β à la membrane plasmique en condition hypoxique

Le microenvironnement hypoxique a une influence directe sur l'homéostasie du pH intracellulaire et extracellulaire. Il est connu que l'hypoxie induit le cycle de la glycolyse principalement par la régulation transcriptionnelle dépendante de HIF-1 des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT4 ainsi que de certaines enzymes glycolytiques (Marin-Hernandez et al., 2009). La génération de lactate durant la glycolyse anaérobie génère un excès de protons qui sont transloqués dans le milieu extracellulaire par des transporteurs

ioniques résultant en une acidification du microenvironnement tumoral (McCarty and Whitaker, 2010). De ce fait, le pH extracellulaire du microenvironnement des tumeurs malignes oscille entre 6.2 et 6.9 alors que le pH des tissus sains se situe entre 7.2 et 7.5 (Gillies et al., 2002; Kallinowski et al., 1989; Wike-Hooley et al., 1984). À l'opposé, le pH intracellulaire des cellules cancéreuses est plus alcalin que celui des cellules normales. L'un des mécanismes responsables de l'altération du pH intracellulaire et extracellulaire est la présence de NHE1 à la membrane plasmique. Le NHE1 est considéré comme le régulateur principal du pH intracellulaire des cellules cancéreuses (Reshkin et al., 2000). Dans notre laboratoire, nous avons démontré que l'hypoxie induit l'activité de NHE-1 de façon HIF-1-indépendante via l'activation de la kinase p90 ribosomal S6 (p90 RSK) (Lucien et al., 2011). Ainsi, le pH intracellulaire se basifie et le milieu extracellulaire s'acidifie.

Précédemment, nous avons discuté que l'un des mécanismes potentiels de la relocalisation de la furine à la membrane plasmique serait via la formation d'un complexe membranaire avec la protéine Cripto-1. L'étude de Constam et al. (Blanchet et al., 2008) a identifié les résidus 215-226 du pro-peptide Nodal comme étant la région d'interaction avec Cripto. Ces résidus sont hautement conservés entre les différents membres de la super-famille du TGF β . Malgré que les résidus L216 et S223 de la protéine Nodal, des résidus importants dans l'interaction entre Cripto et Nodal, ne se retrouvent pas dans les séquences du TGF β humain, l'interaction entre Cripto et le TGF β est quand même probable. De ce fait, l'étude a démontré que la délétion du motif contenant les résidus L216 et S223 n'était pas suffisante afin d'abroger la liaison entre Nodal et Cripto. Il serait donc envisageable de suggérer que le complexe Cripto/furine puisse favoriser la liaison du TGF β extracellulaire, malgré l'absence de ces résidus, afin de permettre l'interaction de la furine avec le TGF β . Sur le même principe que discuté précédemment, l'acidification du milieu extracellulaire observée en hypoxie induirait la protonation de l'histidine 276 et la maturation accrue du TGF β . Par contre, cette hypothèse implique que le pro-TGF β se retrouve dans le milieu extracellulaire. Nos données indiquent clairement qu'une certaine quantité du TGF β qui se retrouve dans le milieu extracellulaire n'est pas clivée par la furine. Malgré le fait que nos résultats impliquant l'inhibition de la V-ATPase et la surexpression de NHE6 suggèrent que la maturation du TGF β a lieu dans des compartiments intracellulaires, certaines évidences suggèrent un rôle pour ces transporteurs à la membrane plasmique. Par exemple,

la présence de la V-ATPase à la membrane plasmique a été observée dans des lignées cellulaires de carcinome du sein (Martinez-Zaguilan et al., 1999). Une autre étude a également observé que l'échangeur NHE6 pouvait être localisé à la membrane plasmique via son interaction avec RACK1 (discuté plus loin) (Ohgaki et al., 2008). La modulation de l'activité membranaire de ces deux protéines pourrait également influencer le pH extracellulaire et favoriser ou inhiber la maturation potentielle du TGF β à la membrane plasmique.

Influence de l'hypoxie sur le pH intravésiculaire

La relation entre le pH cytoplasmique et le pH intravésiculaire est très complexe et demeure peu connue. L'homéostasie entre le pH cytoplasmique et intravésiculaire nécessite une balance entre l'échange de protons de part et d'autre de la membrane des vésicules. La génération accrue de protons dans le cytoplasme suite à la glycolyse anaérobie pourrait avoir une influence sur l'activité de la V-ATPase dans l'acidification des vésicules intracellulaires (Forgac, 2007). Une étude a démontré que la sous-unité $\alpha 2$ de la V-ATPase est riche en histidine et servirait de senseur de pH afin de moduler son activité (Marshansky, 2007). Par contre, le rôle crucial des résidus histidines dans les changements conformationnels de la V-ATPase et la régulation du pH endosomal reste encore à être défini. Néanmoins, il serait envisageable de penser que l'acidification temporaire du cytoplasme agisse en tant qu'inducteur de l'activité de la V-ATPase et permette le transport actif des protons afin d'acidifier les vésicules intracellulaires. Par contre, le fait que l'activation de NHE1 en hypoxie résulte en une basification du cytoplasme (Lucien et al., 2011), il se pourrait également que l'activité de la V-ATPase soit inhibée. Or, des expériences préliminaires dans notre laboratoire (résultats non-présentés) démontrent que l'inhibition de NHE1 avec l'EIPA, un inhibiteur pharmacologique de NHE1, n'influence pas le pH des endosomes. Des études plus approfondies sont nécessaires afin de déterminer la relation entre les deux échangeurs et leur rôle dans la régulation du pH intravésiculaire en condition hypoxique.

Nos résultats démontrent toutefois que la stimulation hypoxique résulte en une acidification des vésicules intracellulaires. Un des mécanismes potentiels expliquant cette acidification serait via la localisation intracellulaire de l'échangeur NHE6. Tel que

mentionné précédemment, une étude récente a démontré que la queue cytoplasmique de NHE6 interagit directement avec RACK1, une protéine d'échafaudage localisée au cytoplasme (Ohgaki et al., 2008). Les auteurs ont démontré que la liaison de NHE6 avec RACK1 permet de relocaliser NHE6 à la membrane plasmique résultant en une acidification des vésicules intracellulaires. Inversement, l'interférence dans l'interaction des deux protéines résulte en une basification des vésicules intracellulaires. De façon intéressante, RACK1 a récemment été relié à la croissance des tumeurs et son expression est augmentée dans le cancer du sein, du colon, des poumons et les mélanomes (Al-Reefy and Mokbel, 2010; Al-Reefy et al., 2010; Egidy et al., 2008; Nagashio et al., 2010; Saito et al., 2002). Au fait, l'expression de RACK1 est un prédicteur de l'issue clinique des patients atteints de cancer (Cao et al., 2010). Malgré qu'aucune relation directe n'a été démontrée entre l'hypoxie et l'expression ou l'activité de RACK1, certaines évidences suggèrent que l'hypoxie pourrait réguler son activité. Une étude a démontré que RACK1 interagit avec l'IGFR chez les fibroblastes et les cellules MCF-7 ce qui permet de moduler l'activité du récepteur (Griffiths, 2001). De ce fait, l'IGFR est surexprimé dans plusieurs cancers tels que le cancer du sein, du poumon et de la prostate. RACK1 est même considéré comme une cible thérapeutique du cancer du sein (Catterall et al., 2003; Oh et al., 2002; Zhang et al., 2007a). Une étude récente a démontré que suite à l'activation de l'IGFR par l'insuline chez les adipocytes, NHE6 transloque avec GLUT4 des endosomes à la membrane plasmique des adipocytes (Prior et al., 2011). Étant donné que l'hypoxie est bien connue pour induire l'activité de l'IGFR chez les cellules cancéreuses (Elias et al., 2010; Kim et al., 2012), il serait envisageable de penser que l'hypoxie puisse permettre le recrutement du complexe NHE6/RACK1/IGFR à la membrane plasmique afin d'assurer la signalisation du récepteur. Ainsi, NHE6 relocalisé à la membrane plasmique ne se retrouve plus au niveau des endosomes, ce qui en résulte en l'acidification des ces compartiments. De plus, RACK1 a été démontré comme étant un substrat de Src (Chang et al., 2002), une kinase dont l'activité est induite en hypoxie (Zeng et al., 2010). Il serait donc envisageable de penser que la stimulation de Src en hypoxie puisse induire la phosphorylation de RACK1 lui permettant par la suite d'interagir avec NHE6 et de relocaliser l'échangeur à la membrane plasmique. La délocalisation de NHE6 hors des endosomes limiterait l'extrusion de protons hors des vésicules et aurait pour conséquence l'acidification du compartiment ce qui favoriserait la

maturation du TGF β . Des expériences préliminaires dans le laboratoire (résultats non-présentés) vont dans ce sens. Nous observons par immunofluorescence que l'hypoxie induit la relocalisation à la membrane plasmique de NHE6. Par contre les mécanismes moléculaires qui régulent le routage de NHE6 et l'implication potentielle de RACK1 en hypoxie sont indéterminés et font l'objet de travaux au laboratoire.

L'ensemble des travaux présentés au chapitre 2 met en lumière la relation entre la délocalisation de la convertase de pro-protéines furine et la maturation de substrats tumorigéniques tels que le TGF β . Nos résultats démontrent de façon évidente que la maturation du TGF β est favorisée par le microenvironnement acide possiblement via la protonation d'une histidine, un acide aminé senseur de pH situé au site de clivage protéolytique par la furine. L'augmentation de la maturation du TGF β résulte en une augmentation de TGF β bioactivable sécrété, et influence directement la formation des invadopodes et l'invasion de cellules cancéreuses dans le microenvironnement hypoxique (Figure 8, (chapitre 2)).

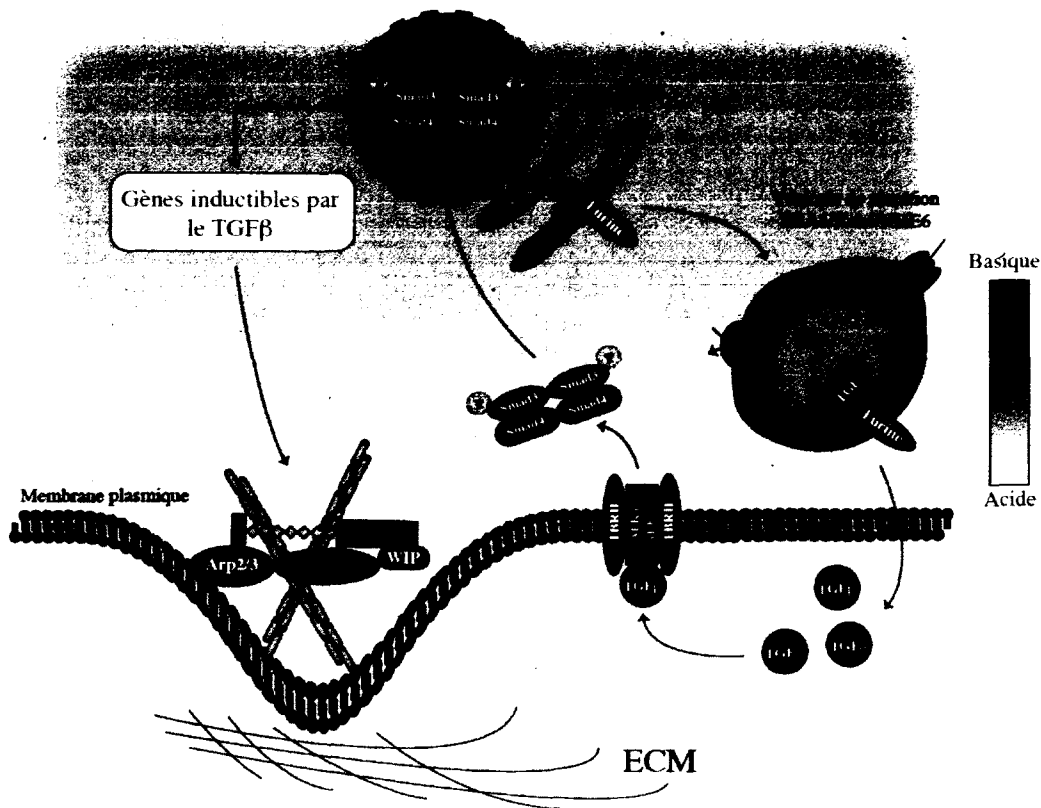


Schéma 4: Récapitulation du chapitre 2

Au chapitre 2, nous avons étudié l'impact de la relocalisation de la furine sur la maturation de substrats tumorigéniques, tel que le TGFβ. Nos résultats démontrent que le pH acide des compartiments intracellulaires favorise la maturation de la pro-protéine. Nos données suggèrent que le microenvironnement acide induit la protonation de l'histidine 276 située au site de clivage du TGFβ par la furine, ce qui pourrait augmenter l'affinité de l'enzyme pour son substrat, le TGFβ. Ainsi, la localisation de la furine en périphérie cellulaire favoriserait le clivage protéolytique du pro-TGFβ dans les vésicules de recyclage EEA1+/Rab4+ et NHE6+. De plus, en condition hypoxique, l'acidification des vésicules intracellulaires en concordance avec la relocalisation de la furine en périphérie augmenterait la maturation du pro-TGFβ. L'augmentation de TGFβ bioactivable en condition hypoxique est importante pour l'augmentation de la formation des invadopodes et l'invasion cellulaire observée dans cette condition. La basification des vésicules intracellulaires ou l'interférence avec la relocalisation de la furine en hypoxie diminue de façon significative la maturation du TGFβ et influence fortement la capacité des cellules cancéreuses à former des invadopodes.

Ainsi, la maturation et l'activation du TGFβ en hypoxie sont des mécanismes primordiaux impliqués dans l'induction de la formation des invadopodes.

Malgré le fait que nos travaux se sont concentrés sur la maturation du TGF β dépendante du pH, il est possible que la maturation d'autres substrats tumorigéniques soit favorisée par le pH acide. Plusieurs substrats de la furine contiennent des histidines au site de clivage protéolytique, tels que des intégrines et des métalloprotéases de la matrice. Le rôle défini de ces protéines dans l'invasion des cellules cancéreuses suggère que le mécanisme décrit dans ce chapitre peut s'appliquer à différents précurseurs protéiques tumorigéniques. Au chapitre 3, nous nous sommes intéressés aux mécanismes hypoxiques qui régulent la signalisation du TGF β dans l'invasion des cellules cancéreuses.

Dépendance de la signalisation Smad3 du TGF β dans l'induction hypoxique des invadopodes

La liaison du TGF β à son récepteur mène à l'activation de différentes voies de signalisation, soit la voie canonique dépendante des Smads, et la voie non-canonique directement reliée à l'activité kinase du récepteur. Malgré le fait que la voie non-canonique ait été directement associée à la formation de l'invadopode via la signalisation de la phosphatidylinositide-3-kinase et de la kinase Src (Rowe and Weiss, 2008), la voie canonique du TGF β est également connue pour jouer un rôle clé dans l'invasion des cellules cancéreuses (Akhurst and Derynck, 2001; Massague, 2008). Effectivement, nos résultats indiquent que Smad3, mais non Smad2, est phosphorylé et transloque au noyau suite à une courte incubation (3-6h) en condition hypoxique. Nos données démontrent clairement que l'activation de Smad3 est un mécanisme clé par lequel l'hypoxie induit la formation des invadopodes puisque l'interférence dans l'activation de Smad3 via l'inhibition sélective de la phosphorylation/signalisation avec l'inhibiteur pharmacologique SIS3 inhibe complètement leur induction hypoxique de la formation des invadopodes (Figure 3, (chapitre 3)). Par ailleurs, ces résultats semblent en conflit avec les résultats d'autres groupes de chercheurs. Effectivement, deux études récentes et indépendantes ont révélé que l'hypoxie induit la déphosphorylation de Smad3. Le groupe de Baggerly et al. (Levin et al., 2012) a utilisé des puces protéiques à phase inverse afin de déterminer le patron de phosphorylation de 121 protéines dans 6 lignées d'adénocarcinomes incubées en condition hypoxique. Parmi les protéines observées, les niveaux de Smad3 phosphorylé (ser423) étaient significativement diminués suite à la stimulation hypoxique. L'autre étude

a démontré que l'hypoxie induisait spécifiquement la déphosphorylation de Smad3 par la phosphatase PP2A (Heikkinen et al., 2010). Les auteurs ont démontré une association directe entre la PP2A et Smad3 et ont observé une diminution de l'accumulation nucléaire de Smad3 induite par le TGF β en condition hypoxique. La concordance entre les deux études est la durée d'exposition des cellules au microenvironnement hypoxique. Effectivement, dans ces deux études, la déphosphorylation de Smad3 a été observée lors d'une incubation des cellules pour des temps de 16h et 24h. Or, nos résultats indiquent qu'une stimulation de 6h est optimale pour induire la translocation de Smad3. Il est possible que dans notre système une période d'incubation plus soutenue en hypoxie aurait induit une déphosphorylation de Smad3 dépendante de la PP2A. Une telle situation pourrait jouer un rôle de mécanisme de rétroaction afin de réguler l'intensité de la réponse Smad3 lors d'une stimulation à long terme. Des expériences supplémentaires devront être réalisées afin de vérifier cette hypothèse. Des périodes prolongées d'exposition en hypoxie devront être effectuées afin de vérifier si Smad3 est déphosphorylé.

Plusieurs évidences indiquent que Smad2 et Smad3 jouent des rôles distincts dans la signalisation du TGF β et ce, selon le type cellulaire (Brown et al., 2007) De façon intéressante, la signalisation dépendante de Smad3 est associée à l'EMT (Roberts et al., 2006), une transformation associée à l'invasion et à la formation des invadopodes (Eckert et al., 2011). À l'opposé, la signalisation dépendante de Smad2 est requise pour l'inhibition de la croissance induite par le TGF β dans plusieurs modèles cellulaires (Ju et al., 2006; Stegmuller et al., 2008). À la lumière de nos résultats, l'activation sélective de Smad3 en condition hypoxique serait un mécanisme important dans l'acquisition d'un phénotype invasif.

Rôle de la HDAC6 dans l'induction hypoxique des invadopodes

La HDAC6 était un régulateur clé de la régulation de la signalisation du TGF β dépendante de Smad3. En effet, l'induction de l'EMT par le TGF β est dépendante de la HDAC6 qui contrôle les niveaux d'acétylation de la tubuline et permet la libération de Smad3 du réseau de tubuline (Shan et al., 2008). Nos résultats vont dans ce sens. L'inhibition sélective de l'activité déacétylase de la HDAC6 par le tubacin restreint l'accumulation nucléaire de Smad3 en hypoxie. De plus, l'expression à la baisse de

HDAC6 par des ARN interférents résulte en l'inhibition complète de la formation des invadopodes et de l'invasion cellulaire induite en hypoxie (Figure 4, (chapitre 3)). Malgré le fait que la déacétylation de la tubuline par la HDAC6 et l'activation subséquente de Smad3 sont des événements importants dans l'induction hypoxique des invadopodes, d'autres mécanismes impliquant la HDAC6 peuvent être impliqués dans l'invasion des cellules cancéreuses. En fait, plusieurs études ont démontré que HDAC6 est essentielle à l'activité des invadopodes et est critique pour l'invasion cellulaire (Park et al., 2011; Rey et al., 2011). De plus, son expression a été suggérée comme bio-marqueur permettant de prédire la formation des métastases intra-hépatiques (Kanno et al., 2012). Certains de ces mécanismes impliquent la HDAC6 de part son rôle dans la déacétylation d'autres substrats cytoplasmiques. En effet, une étude a observé que l'inhibition de la HDAC6 induit l'hyperacétylation de HSP90 α . HSP90 α permet la maturation extracellulaire de la MMP2 qui est impliquée dans l'invasion des cellules cancéreuses. L'hyperacétylation de la HSP90 α diminue sa capacité de liaison avec le MMP2 ce qui résulte en une baisse de maturation de la métalloprotéase de la matrice et une diminution de l'invasion cellulaire (Yang et al., 2008b). Une autre possibilité est via son interaction avec la cortactine, une protéine centrale dans la formation des invadopodes. La cortactine permet la formation du complexe de nucléation d'actine nécessaire au bourgeonnement de la membrane plasmique et à la formation de l'invadopode. Une étude du groupe de Seto et al. (Zhang et al., 2007b) démontre que les deux domaines catalytiques de la HDAC6 sont nécessaires à sa liaison sur des régions répétées de la cortactine. L'interaction entre les deux protéines induit la déacétylation de la cortactine, ce qui empêche sa liaison à la F-actine. L'étude démontre également que la déacétylation de la cortactine prévient la translocation nucléaire de l'enzyme à la périphérie cellulaire. De plus, la phosphorylation de la cortactine par la kinase Src, qui initie la cascade de signalisation pour la formation du complexe de nucléation d'actine, requiert l'association de la cortactine à la F-actine (Head et al., 2003). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse voulant que la cortactine acétylée, qui n'est pas capable de lier efficacement l'actine, ne soit pas phosphorylée, ce qui inhiberait la formation de l'invadopode. Des résultats préliminaires par immunofluorescence (résultats non-présentés) indiquent que la cortactine colocalise avec la HDAC6 en périphérie cellulaire et au site de formation de l'invadopode. Il est donc possible que l'inhibition de la

HDAC6, qui résulte en une hyperacétylation de la cortactine, empêche sa liaison à l'actine et inhibe sa phosphorylation dépendante de Src résultant en l'inhibition de la formation des invadopodes et de l'invasion cellulaire. Le rôle de la cortactine ne se limite pas à la formation du complexe de nucléation d'actine. Des études ont relié la cortactine au transport vésiculaire qui régule la sécrétion de protéases, telles que la MT1-MMP, aux sites d'invadopodes (Clark and Weaver, 2008; Clark et al., 2007). De ce fait, une étude récente démontre que l'acétyltransférase ATAT1/MEC-17 et la HDAC6 contrôlent l'acétylation de la tubuline et de la cortactine et régulent le routage intracellulaire de la MT1-MMP impliquée dans l'invasion des cellules cancéreuses du sein (Castro-Castro et al., 2012). Ces différentes observations suggèrent que d'autres mécanismes complémentaires impliquant l'action de la HDAC6 sont impliqués dans l'induction hypoxique de l'invasion cellulaire.

Induction hypoxique de l'activité de la HDAC6

Les résultats présentés jusqu'ici nous démontrent clairement que la HDAC6 est un régulateur central de la signalisation de Smad3 en hypoxie. L'augmentation de la maturation du TGF β , favorisée par la relocalisation de la furine dans les compartiments périphériques acides, résulte en une augmentation de TGF β bioactif dans le milieu extracellulaire et influence directement la formation des invadopodes. Il était donc plausible de suggérer que le TGF β peut agir comme activateur de la HDAC6 qui à son tour, régule la signalisation de Smad3. Effectivement, dans la littérature, il a été démontré que le TGF β induit l'activité de la HDAC6 via l'activation de Smad3 dans des cellules épithéliales de poumons (Shan et al., 2008). En ce sens, nos résultats confirment que le TGF β augmente l'activité de la HDAC6 chez les cellules HT-1080 (Figure 5, (chapitre 3)). Or, il est peu probable que l'activation de la HDAC6 soit une conséquence d'une modulation du TGF β endogène dans notre système. Nos résultats démontrent que l'exposition des cellules en condition hypoxique pour une période de 2h est suffisante pour induire l'activité de la HDAC6. Précédemment, nous avons observé que la translocation de Smad3 en hypoxie était optimale après 6 h (Figure 3, (chapitre 3)). Ainsi, l'activation de la HDAC6 dépendante de l'activation de Smad3, telle que décrite précédemment, est peu probable, comme le démontre l'inhibition du TGF β R1 avec le Ly364947 qui n'influence pas l'activité de la HDAC6 en hypoxie (Figure 6, (chapitre 3)).

Nos résultats indiquent clairement que l'activation hypoxique de la HDAC6 serait dépendante de l'EGFR. Une étude récente démontre que l'induction de la voie ERK-MAP kinase dépendante de l'EGF induit l'activation de la HDAC6 (Wang et al., 2010). Ainsi, nous observons que l'EGFR est phosphorylé après 30 minutes de stimulation hypoxique et que l'inhibition de la signalisation de l'EGFR réduit significativement l'activité de la HDAC6 induite après 2 h et 4 h d'hypoxie (Figure 6, (chapitre 3)). Ces résultats confirment que l'activation précoce de la HDAC6 en conditions hypoxiques est enclenchée suite à l'activation de l'EGFR. De plus, l'activation de la HDAC6 pourrait également avoir une influence directe sur la signalisation de l'EGFR. De ce fait, une étude récente démontre que la HDAC6 régule la dégradation et le routage intracellulaire de l'EGFR dans des cellules épithéliales de reins (Liu et al., 2012). Les auteurs ont observé que l'inhibition de l'activité de la HDAC6 induisait l'expression à la baisse de l'EGFR. De plus, l'inhibition de la HDAC6 accélère le transport vésiculaire de l'EGFR des endosomes vers la dégradation lysosomale via une hyperacétylation de la tubuline. Ainsi, l'induction de l'activité de la HDAC6 par l'EGF pourrait ralentir la dégradation de l'EGFR et maintenir son activation et prolonger la signalisation dépendante de l'EGFR. On pourrait ainsi proposer une boucle d'amplification entre l'EGFR et la HDAC6. L'EGFR induirait l'activité de la HDAC6 en hypoxie qui à son tour augmenterait l'activité de l'EGFR en interférant dans la voie de dégradation. En relation avec cette hypothèse, une étude précédente a démontré que l'hypoxie prolongeait la signalisation de récepteurs tyrosine kinase, dont l'EGFR, via la régulation à la baisse de la rabaptin-5 (Wang et al., 2009b), un mécanisme qui pourrait être concomitant avec l'activité de la HDAC6. Étant donné que l'activation du TGF β endogène observée aux chapitres précédents implique un mécanisme à plusieurs étapes dont l'activation par la convertase de pro-protéine furine, nos résultats n'excluent pas la participation du TGF β endogène dans l'activation de la HDAC6 dans des périodes prolongées d'hypoxie. Il serait intéressant de vérifier l'activité de la HDAC6 induite en hypoxie à des temps supérieurs à 10h en inhibant l'activité du TGF β R1 avec le Ly364947, tel que mentionné précédemment.

Mécanismes potentiels de l'activation de la HDAC6 en hypoxie

Nos données suggèrent que l'induction hypoxique de l'activité de la HDAC6 implique des mécanismes post-transcriptionnels puisque les niveaux protéiques de la HDAC6 ne sont pas altérés suite à l'exposition hypoxique (Figure 5, (chapitre 3)). Des évidences de la littérature suggèrent que l'activation de la HDAC6 serait dépendante de l'état de phosphorylation de l'enzyme. De ce fait, une étude a démontré que l'hypoxie induisait la phosphorylation de la HDAC1 et HDAC2 par la CK-II dont l'activité est induite en hypoxie (Pluemsampant et al., 2008). Des évidences récentes démontrent également que l'activité de la HDAC6 est régulée par sa phosphorylation. Effectivement, la HDAC6 contient plusieurs sites putatifs de phosphorylation par l'EGFR/MAPK et la phosphorylation sur la Tyr570 par l'EGF régule l'activité déacétylase de la tubuline (Deribe et al., 2009). De plus, il a été démontré que la CK-II phosphoryle la Ser458 de la HDAC6, ce qui induit son activation et la régulation de la formation des agrégomes en réponse au stress (Watabe and Nakaki, 2011). De façon intéressante, des évidences de la littérature suggèrent une relation directe entre la voie de l'EGFR et l'activation de la CK-II. Une étude a démontré que la stimulation à l'EGF induit la phosphorylation de la sous-unité β de la CK-II (Ackerman et al., 1990). Sachant que la sous-unité β est transloquée en périphérie cellulaire en hypoxie (Pluemsampant et al., 2008), sa localisation cellulaire pourrait permettre sa phosphorylation dépendante de l'EGFR en périphérie cellulaire et ainsi induire son activité. Des études démontrent également que la kinase Src influence l'activité de l'EGFR. La phosphorylation dépendante de Src de l'EGFR de la Tyr845 de l'EGFR est essentielle pour sa transactivation et l'activation de Ras (Wu et al., 2002). De plus, cette phosphorylation module les fonctions du récepteur de l'EGFR et la progression tumorale (Biscardi et al., 1999). Il est donc possible de penser que l'hypoxie puisse induire la phosphorylation de la HDAC6 par un mécanisme impliquant l'EGFR et/ou la CK-II. Étant donné que nos résultats indiquent que l'EGFR est phosphorylé après 30 minutes de stimulation hypoxique, il est fort probable que la cascade de signalisation soit enclenchée suite à l'activation de l'EGFR. Des études plus approfondies devront être effectuées afin de déterminer la kinase responsable de l'activité induite de l'HDAC6 en hypoxie. De plus, les sites de phosphorylation de la HDAC6 devront être déterminés afin d'élucider le mécanisme précis de l'activation de la HDAC6. Malgré plusieurs essais, il nous a été

malheureusement impossible de déterminer le patron exact de phosphorylation de la HDAC6 en condition hypoxique.

Les résultats présentés au chapitre 3 mettent en évidence le rôle de la HDAC6 dans la signalisation dépendante de Smad3 du TGF β en conditions hypoxiques. Au chapitre 1 et 2, nous avons vu que le microenvironnement hypoxique induisait la maturation accrue de TGF β suite à la délocalisation de la furine dans des vésicules acides. Dans ce chapitre, nous démontrons que l'induction hypoxique de la formation des invadopodes est régulée de façon principale par l'activation de Smad3 en réponse au TGF β endogène. Nous avons identifié la HDAC6 en tant que modulateur clé de l'induction hypoxique des invadopodes. Une régulation de l'activité de la HDAC6 pourrait permettre d'intervenir dans l'invasion des cellules cancéreuse en condition hypoxique. D'ailleurs, à ce jour, différentes études sont centrées sur le développement d'inhibiteurs pharmacologiques de la HDAC6 afin de tester leur potentiel anti-métastatique (Dallavalle et al., 2012).

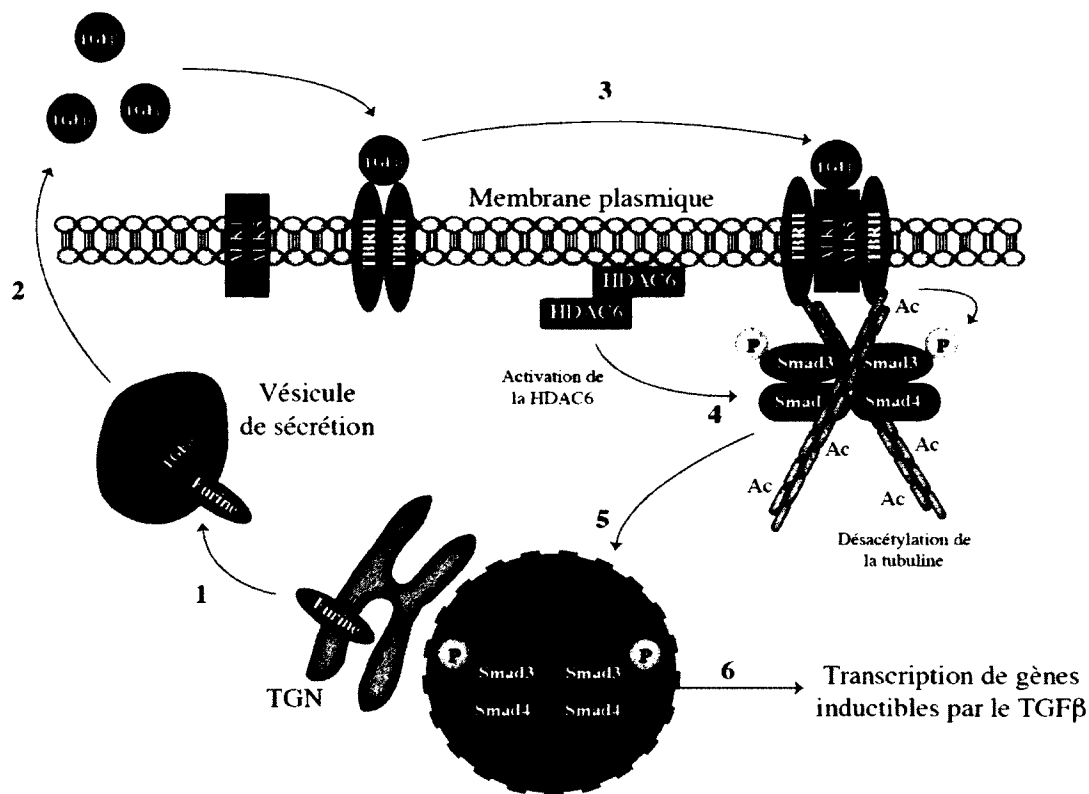


Schéma 5: Récapitulation du chapitre 3

Au chapitre 3, nous avons étudié les mécanismes hypoxiques impliqués dans la formation des invadopodes en hypoxie. (1) La furine relocalisée dans des vésicules acides en hypoxie permet le clivage protéolytique du TGFβ ce qui entraîne une augmentation du TGFβ bioactif dans le milieu extracellulaire (2). Le TGFβ lie son récepteur, ce qui permet le recrutement des Smads (3). De façon concomitante, l'hypoxie active la voie de l'EGFR, ce qui mène à l'activation de la HDAC6. Une fois activée, celle-ci, de par son activité déacétylase, permet la déacétylation de la tubuline et ainsi la déséquestration de Smad3 du réseau de tubuline (4). Le complexe activé de Smad transloque au noyau (6) et permet la transcription de gènes inducibles par le TGFβ (6). Nos résultats démontrent que l'induction hypoxique des invadopodes est principalement régulée par la signalisation dépendante de Smad3 du TGFβ. De plus, nous avons identifié la HDAC6 en tant que régulateur clé de la signalisation de Smad3 en hypoxie. L'interférence dans l'activité de la HDAC6 inhibe l'induction hypoxique de la formation des invadopodes et l'invasion des cellules cancéreuses.

Relation en fonction du temps des mécanismes hypoxiques impliqués dans la formation des invadopodes

Les résultats présentés dans cette thèse soulignent l'importance d'un mécanisme post-transcriptionnel induit en hypoxie menant à la formation des invadopodes et à l'invasion des cellules cancéreuses. Ce mécanisme implique plusieurs étapes qui sont régulées en fonction du temps. Afin de mettre en relation les différentes observations, le schéma suivant résume les mécanismes proposés en fonction du temps (Schéma 7). Premièrement, l'hypoxie induit l'activation de la voie EGFR après 30 minutes de stimulation. L'activation de cette voie résulte en l'activation de la HDAC6, impliquant possiblement la phosphorylation dépendante de l'EGFR activé ou l'intermédiaire de kinases associées telles que Src et CK-II. L'activation de la HDAC6 induit la déacétylation de la tubuline observée après 2 heures de stimulation hypoxique. Après 4 heures, nous observons la délocalisation de la furine dans des compartiments en périphérie cellulaire, qui sont caractérisés par un pH luminal acide. La relocalisation de la furine dans ces compartiments résulte en une augmentation de la maturation du TGF β endogène. La liaison du TGF β actif à son récepteur induit l'activation et la translocation nucléaire de Smad3, qui est optimale après 6 heures de stimulation, suite à la déacétylation de la tubuline. L'activité induite en hypoxie de la HDAC6 pourrait également permettre la déacétylation de la cortactine et ainsi induire la formation du complexe de polymérisation d'actine nécessaire à la formation des invadopodes. Suite à la translocation de Smad3 au noyau, il y aurait transcription et traduction de gènes inductibles par le TGF β tels que la MMP2 et la MMP9 (Chou et al., 2006; Kim et al., 2004; Liu et al., 2005; Safina et al., 2007; Wiercinska et al., 2011). Les protéines ainsi exprimées permettent la formation des invadopodes et assurent les fonctions de dégradation de ces structures. Après 10 heures de stimulation hypoxique, nous observons la dégradation de la matrice extracellulaire suivie par l'invasion des cellules dans la matrice.

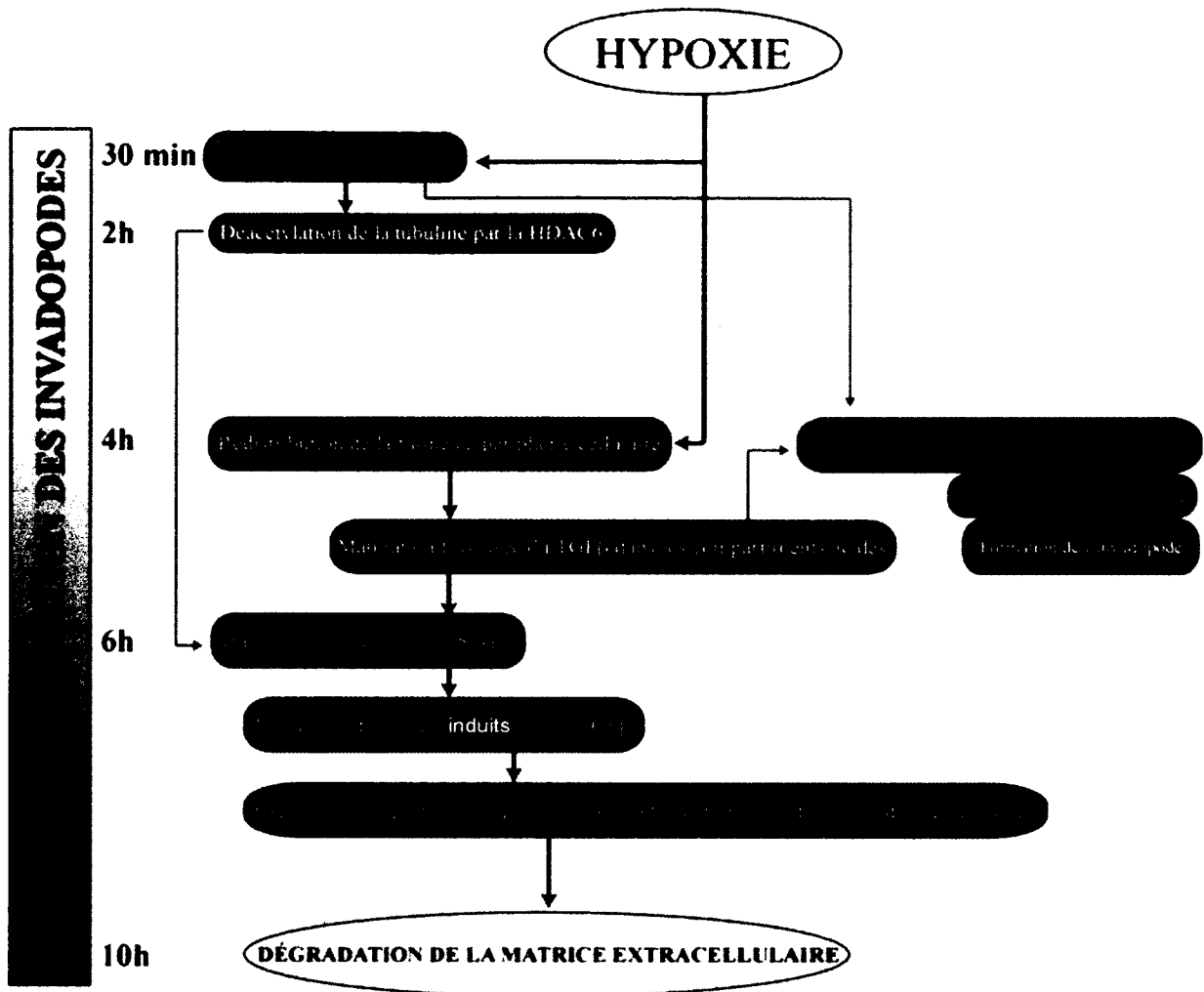


Schéma 6: Relation en fonction du temps des mécanismes impliqués dans la formation des invadopodes en hypoxie

CONCLUSION

Dans la présente thèse, nous avons approfondi nos connaissances des mécanismes moléculaires impliqués dans l'invasion des cellules tumorales dans le microenvironnement hypoxique des tumeurs solides. En effet, nous avons démontré un mécanisme post-transcriptionnel induit par l'hypoxie, séparé en 3 grandes étapes (chapitres) qui favorise l'invasion cellulaire et la formation des invadopodes chez les cellules HT-1080. Ainsi, au chapitre 1, nous avons démontré que l'hypoxie induisait la relocalisation stratégique de la convertase de pro-protéines furine dans une boucle de recyclage en périphérie cellulaire. Nos données démontrent pour la première fois que le microenvironnement tumoral affecte la localisation de l'enzyme. Nous démontrons que la relocalisation de la furine à la membrane plasmique, via son interaction avec la filamine-A, est responsable de l'induction de l'invasion cellulaire en hypoxie (Schéma 4). Au chapitre 2, nous démontrons que la relocalisation de la furine en périphérie cellulaire en hypoxie favorise l'activation sélective de substrats tumorigéniques tel que le TGF β . Nos données indiquent que le pH acide des vésicules intracellulaires pourrait induire la protonation de l'histidine 276 au site de clivage protéolytique du pro-TGF β par la furine, ce qui favoriserait l'interaction de l'enzyme avec son substrat. Nous avons également identifié pour la première fois les endosomes de recyclage NHE6+ comme étant les vésicules dans lesquelles la maturation du TGF β avait lieu. De plus, nous avons démontré que l'hypoxie causait une acidification du pH intravésiculaire et qu'en concordance avec la relocalisation de la furine, celle-ci favorisait la maturation et la sécrétion de TGF β bioactivable, essentielles à la production d'invadopodes (Schéma 5). Finalement, au dernier chapitre, nous avons identifié la HDAC6, une histone déacétylase cytoplasmique, en tant que modulateur critique de la signalisation du TGF β induite en hypoxie. Nos résultats indiquent que l'induction de la formation des invadopodes et l'invasion cellulaire en condition hypoxique sont principalement causées par l'activation de la voie de signalisation du TGF β dépendante de Smad3. La HDAC6, via son activité déacétylase de la tubuline, permet la déséquestration de Smad3 du réseau de tubuline, pour ainsi permettre sa phosphorylation et sa translocation nucléaire et mener à la transcription de gènes inductibles par le TGF β et à la formation des invadopodes (Schéma 6).

Globalement, nos données nous permettent de proposer un mécanisme complexe par lequel l'hypoxie induit l'invasion des cellules cancéreuses. Ce mécanisme implique le routage intracellulaire stratégique de protéases, la bioactivation localisée de substrats tumorigéniques, et l'activation de modulateurs clés de la signalisation intracellulaire (Schéma 8). Nos résultats pavent la voie à l'identification de mécanismes post-transcriptionnels ainsi qu'à des protéines clés et des cibles thérapeutiques potentielles qui pourraient servir à inhiber ou atténuer l'invasion des cellules cancéreuses menant ultimement à la formation des métastases.

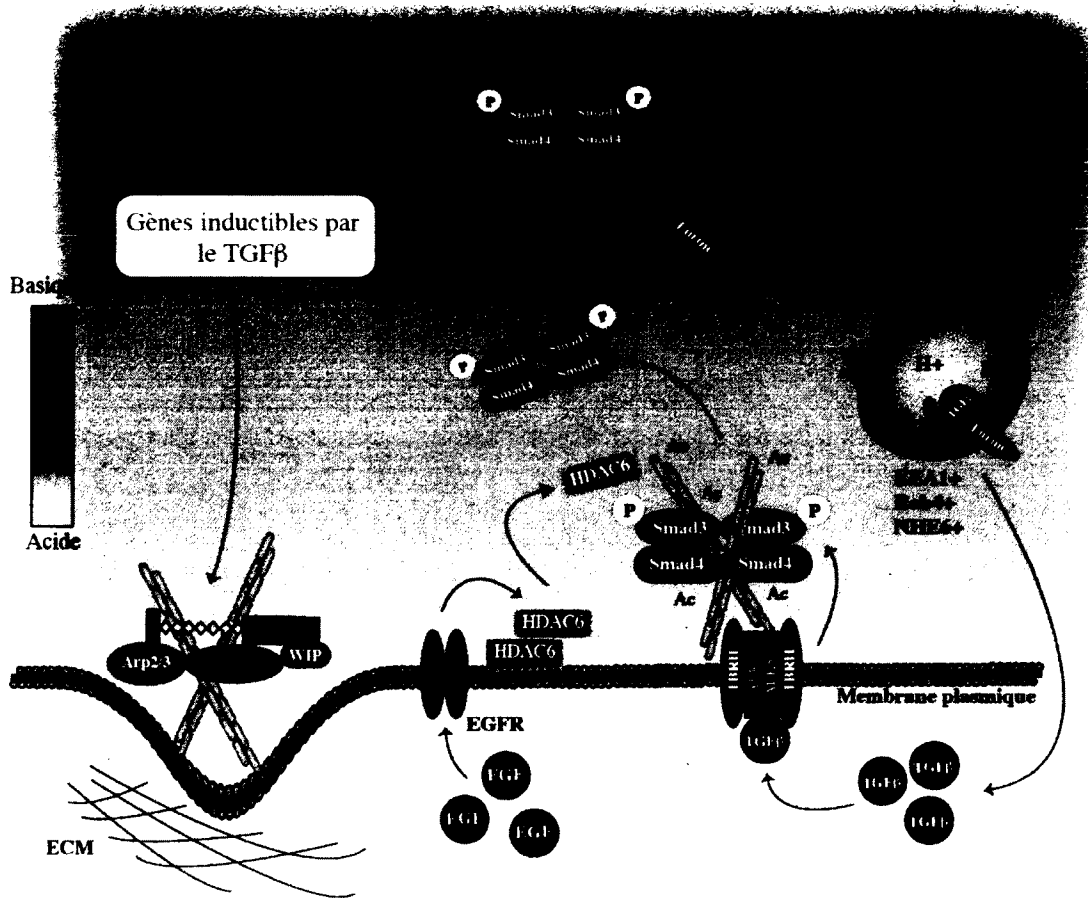


Schéma 7: Conclusion générale

Nos résultats suggèrent la présence d'un mécanisme séquentiel menant à la formation des invadopodes et à l'invasion des cellules cancéreuses en condition hypoxique. Tout d'abord, le microenvironnement hypoxique induit la relocalisation de la convertase de pro-protéines furine dans une boucle de recyclage entre la membrane plasmique et les endosomes de recyclage. Ces endosomes sont caractérisés par un pH luminal acide, ce qui favoriserait la maturation de certains substrats tumorigéniques tels que le TGF β via la présence d'histidines localisées au site de clivage. L'augmentation de la maturation du TGF β en hypoxie mène à une augmentation du TGF β sécrété et bioactif. L'hypoxie induit également l'activation de l'EGFR, ce qui permet l'activation de la HDAC6. Cette enzyme permet la déacétylation de la tubuline, libérant ainsi le Smad3 du réseau de tubuline, ce qui mène à son activation et sa translocation nucléaire suite à la liaison du TGF β à son récepteur. La translocation du complexe Smad3 au noyau permet la transcription de gènes inducibles par le TGF β et la formation d'invadopodes nécessaires à l'invasion des cellules cancéreuses.

REMERCIEMENTS

Cette thèse représente l'aboutissement de plusieurs années d'études et de recherches effectuées dans le cadre de l'obtention d'un doctorat en immunologie. J'aimerais remercier tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce projet d'envergure. Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Claire Dubois pour m'avoir accueilli dans son équipe de recherche et pour avoir eu confiance en moi tout au long des mes études graduées. Claire Dubois m'a accordé la liberté et les moyens nécessaires afin d'exploiter mes idées de recherche et a également su me diriger et me garder dans la bonne direction afin d'atteindre tous mes objectifs. Je la remercie pour son temps, sa patience, son indulgence et sa rigueur scientifique.

Je tiens également à remercier tous les membres de mon comité d'encadrement, le Dr Jean-Luc Parent et le Dr Nathalie Rivard pour leur soutien, commentaires et leur aide précieuse lors de nos discussions.

Ma reconnaissance va également aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ma thèse. Merci à Jean-Luc Parent, Nathalie Rivard et Yves St-Pierre.

Merci à tous les membres, passés et présents, du laboratoire pour leurs nombreuses discussions et pour leur amitié. Un merci particulier à Fabrice Lucien, qui de par le temps, est passé d'un collègue à un conseiller et à un ami. L'expertise de Fabrice Lucien m'a permis de concrétiser le chapitre 2 présenté dans cette thèse et ses connaissances m'ont été d'un grand support.

Je tiens à remercier ma famille (mon père Michel, ma mère Thérèse et mes deux sœurs Catherine et Ève) pour leurs encouragements et leur support tout au long des mes études. Ils ont eu confiance en moi et m'ont permis de persévérer dans les moments difficiles.

Un merci particulier à ma conjointe Chantal pour ses encouragements, son support moral, sa compréhension, sa confiance et plus encore...

Finalement, je remercie les Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) et les Instituts de Recherches en Santé du Canada (IRSC) pour les bourses d'étude qu'ils m'ont accordées et pour le soutien financier du laboratoire.

RÉFÉRENCES

- Ackerman, P., C.V. Glover, and N. Osheroff. 1990. Stimulation of casein kinase II by epidermal growth factor: relationship between the physiological activity of the kinase and the phosphorylation state of its beta subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:821-825.
- Ai, J., Y. Wang, J.A. Dar, J. Liu, L. Liu, J.B. Nelson, and Z. Wang. 2009. HDAC6 regulates androgen receptor hypersensitivity and nuclear localization via modulating Hsp90 acetylation in castration-resistant prostate cancer. *Mol Endocrinol.* 23:1963-1972.
- Akhurst, R.J., and R. Derynck. 2001. TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends in cell biology.* 11:S44-51.
- Al-Reefy, S., and K. Mokbel. 2010. The role of RACK1 as an independent prognostic indicator in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 123:911; author reply 912.
- Al-Reefy, S., H. Osman, W. Jiang, and K. Mokbel. 2010. Evidence for a pro-apoptotic function of RACK1 in human breast cancer. *Oncogene.* 29:5651; author reply 5652.
- Aldana-Masangkay, G.I., and K.M. Sakamoto. 2011. The role of HDAC6 in cancer. *Journal of biomedicine & biotechnology.* 2011:875824.
- Alexander, N.R., K.M. Branch, A. Parekh, E.S. Clark, I.C. Iwueke, S.A. Guelcher, and A.M. Weaver. 2008. Extracellular matrix rigidity promotes invadopodia activity. *Curr Biol.* 18:1295-1299.
- Allfrey, V.G., R. Faulkner, and A.E. Mirsky. 1964. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 51:786-794.
- Altan, N., Y. Chen, M. Schindler, and S.M. Simon. 1999. Tamoxifen inhibits acidification in cells independent of the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:4432-4437.
- Aniento, F., F. Gu, R.G. Parton, and J. Gruenberg. 1996. An endosomal beta COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes. *J Cell Biol.* 133:29-41.
- Annabi, B., M. Lachambre, N. Bousquet-Gagnon, M. Page, D. Gingras, and R. Beliveau. 2001. Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains. *Biochem J.* 353:547-553.
- Arbogast, L.Y., G.H. Rothblat, M.H. Leslie, and R.A. Cooper. 1976. Cellular cholesterol ester accumulation induced by free cholesterol-rich lipid dispersions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73:3680-3684.
- Arsenault, D., F. Lucien, and C.M. Dubois. 2012. Hypoxia enhances cancer cell invasion through relocalization of the proprotein convertase furin from the trans-Golgi network to the cell surface. *J Cell Physiol.* 227:789-800.
- Artenstein, A.W., and S.M. Opal. 2011. Proprotein convertases in health and disease. *N Engl J Med.* 365:2507-2518.
- Artym, V.V., Y. Zhang, F. Seillier-Moiseiwitsch, K.M. Yamada, and S.C. Mueller. 2006. Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res.* 66:3034-3043.

- Ashburner, B.P., S.D. Westerheide, and A.S. Baldwin, Jr. 2001. The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol Cell Biol.* 21:7065-7077.
- Baciu, P.C., E.A. Suleiman, E.I. Deryugina, and A.Y. Strongin. 2003. Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) processing of pro-alpha v integrin regulates cross-talk between alpha v beta 3 and alpha 2 beta 1 integrins in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 291:167-175.
- Baldassarre, M., I. Ayala, G. Beznoussenko, G. Giacchetti, L.M. Machesky, A. Luini, and R. Buccione. 2006. Actin dynamics at sites of extracellular matrix degradation. *Eur J Cell Biol.* 85:1217-1231.
- Baldassarre, M., A. Pompeo, G. Beznoussenko, C. Castaldi, S. Cortellino, M.A. McNiven, A. Luini, and R. Buccione. 2003. Dynamin participates in focal extracellular matrix degradation by invasive cells. *Mol Biol Cell.* 14:1074-1084.
- Barneda-Zahonero, B., and M. Parra. 2012. Histone deacetylases and cancer. *Molecular oncology.* 6:579-589.
- Basak, A., A. Chen, N. Scamuffa, D. Mohottalage, S. Basak, and A.M. Khatib. 2010. Blockade of furin activity and furin-induced tumor cells malignant phenotypes by the chemically synthesized human furin prodomain. *Current medicinal chemistry.* 17:2214-2221.
- Basak, A., A.M. Khatib, D. Mohottalage, S. Basak, M. Kolajova, and S.S. Bag. 2009. A novel enediynyl peptide inhibitor of furin that blocks processing of proPDGF-A, B and proVEGF-C. *PLoS One.* 4:e7700.
- Basque, J., M. Martel, R. Leduc, and A.M. Cantin. 2008. Lysosomotropic drugs inhibit maturation of transforming growth factor-beta. *Can J Physiol Pharmacol.* 86:606-612.
- Bassi, D.E., J. Fu, R. Lopez de Cicco, and A.J. Klein-Szanto. 2005. Proprotein convertases: "master switches" in the regulation of tumor growth and progression. *Mol Carcinog.* 44:151-161.
- Bassi, D.E., H. Mahloogi, L. Al-Saleem, R. Lopez De Cicco, J.A. Ridge, and A.J. Klein-Szanto. 2001. Elevated furin expression in aggressive human head and neck tumors and tumor cell lines. *Mol Carcinog.* 31:224-232.
- Bassi, D.E., H. Mahloogi, and A.J. Klein-Szanto. 2000. The proprotein convertases furin and PACE4 play a significant role in tumor progression. *Mol Carcinog.* 28:63-69.
- Baylin, S.B., and P.A. Jones. 2011. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer.* 11:726-734.
- Bazzaro, M., Z. Lin, A. Santillan, M.K. Lee, M.C. Wang, K.C. Chan, R.E. Bristow, R. Mazitschek, J. Bradner, and R.B. Roden. 2008. Ubiquitin proteasome system stress underlies synergistic killing of ovarian cancer cells by bortezomib and a novel HDAC6 inhibitor. *Clin Cancer Res.* 14:7340-7347.
- Becker, G.L., F. Sielaff, M.E. Than, I. Lindberg, S. Routhier, R. Day, Y. Lu, W. Garten, and T. Steinmetzer. 2010. Potent inhibitors of furin and furin-like proprotein convertases containing decarboxylated P1 arginine mimetics. *J Med Chem.* 53:1067-1075.
- Beitner-Johnson, D., R.T. Rust, T.C. Hsieh, and D.E. Millhorn. 2001. Hypoxia activates Akt and induces phosphorylation of GSK-3 in PC12 cells. *Cellular signalling.* 13:23-27.

- Bergeron, E., A. Basak, E. Decroly, and N.G. Seidah. 2003. Processing of alpha4 integrin by the proprotein convertases: histidine at position P6 regulates cleavage. *Biochem J.* 373:475-484.
- Bertrand, P. 2010. Inside HDAC with HDAC inhibitors. *Eur J Med Chem.* 45:2095-2116.
- Bhowmick, N.A., M. Ghiassi, A. Bakin, M. Aakre, C.A. Lundquist, M.E. Engel, C.L. Arteaga, and H.L. Moses. 2001. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell.* 12:27-36.
- Bianchini, L., and J. Poussegur. 1994. Molecular structure and regulation of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *The Journal of experimental biology.* 196:337-345.
- Bianco, C., C. Cotten, E. Lonardo, L. Strizzi, C. Baraty, M. Mancino, M. Gonzales, K. Watanabe, T. Nagaoka, C. Berry, A.E. Arai, G. Minchiotti, and D.S. Salomon. 2009. Cripto-1 is required for hypoxia to induce cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells. *Am J Pathol.* 175:2146-2158.
- Biscardi, J.S., M.C. Maa, D.A. Tice, M.E. Cox, T.H. Leu, and S.J. Parsons. 1999. c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem.* 274:8335-8343.
- Blanchet, M.H., J.A. Le Good, D. Mesnard, V. Oorschot, S. Baflast, G. Minchiotti, J. Klumperman, and D.B. Constam. 2008. Cripto recruits Furin and PACE4 and controls Nodal trafficking during proteolytic maturation. *EMBO J.* 27:2580-2591.
- Blanchette, F., N. Rivard, P. Rudd, F. Grondin, L. Attisano, and C.M. Dubois. 2001. Cross-talk between the p42/p44 MAP kinase and Smad pathways in transforming growth factor beta 1-induced furin gene transactivation. *J Biol Chem.* 276:33986-33994.
- Blander, G., and L. Guarente. 2004. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annual review of biochemistry.* 73:417-435.
- Bolden, J.E., W. Shi, K. Jankowski, C.Y. Kan, L. Cluse, B.P. Martin, K.L. MacKenzie, G.K. Smyth, and R.W. Johnstone. 2013. HDAC inhibitors induce tumor-cell-selective pro-apoptotic transcriptional responses. *Cell death & disease.* 4:e519.
- Bosshart, H., J. Humphrey, E. Deignan, J. Davidson, J. Drazba, L. Yuan, V. Oorschot, P.J. Peters, and J.S. Bonifacino. 1994. The cytoplasmic domain mediates localization of furin to the trans-Golgi network en route to the endosomal/lysosomal system. *J Cell Biol.* 126:1157-1172.
- Botta, G.P., M.J. Reginato, M. Reichert, A.K. Rustgi, and P.I. Lelkes. 2012. Constitutive K-RasG12D activation of ERK2 specifically regulates 3D invasion of human pancreatic cancer cells via MMP-1. *Molecular cancer research : MCR.* 10:183-196.
- Boumber, Y., and J.P. Issa. 2011. Epigenetics in cancer: what's the future? *Oncology (Williston Park).* 25:220-226, 228.
- Bowden, E.T., M. Barth, D. Thomas, R.I. Glazer, and S.C. Mueller. 1999. An invasion-related complex of cortactin, paxillin and PKCmu associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation. *Oncogene.* 18:4440-4449.
- Bowden, E.T., E. Onikoyi, R. Slack, A. Myoui, T. Yoneda, K.M. Yamada, and S.C. Mueller. 2006. Co-localization of cortactin and phosphotyrosine identifies active invadopodia in human breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 312:1240-1253.
- Boyault, C., K. Sadoul, M. Pabion, and S. Khochbin. 2007. HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene.* 26:5468-5476.

- Bradbury, C.A., F.L. Khanim, R. Hayden, C.M. Bunce, D.A. White, M.T. Drayson, C. Craddock, and B.M. Turner. 2005. Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia*. 19:1751-1759.
- Brandt, D., M. Gimona, M. Hillmann, H. Haller, and H. Mischak. 2002. Protein kinase C induces actin reorganization via a Src- and Rho-dependent pathway. *J Biol Chem*. 277:20903-20910.
- Brennan, S.O., and K. Nakayama. 1994. Furin has the proalbumin substrate specificity and serpin inhibitory properties of an in situ hepatic convertase. *FEBS Lett*. 338:147-151.
- Brett, C.L., Y. Wei, M. Donowitz, and R. Rao. 2002. Human Na(+)/H(+) exchanger isoform 6 is found in recycling endosomes of cells, not in mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol*. 282:C1031-1041.
- Brown, J.M., and A.J. Giaccia. 1998. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res*. 58:1408-1416.
- Brown, K.A., J.A. Pietenpol, and H.L. Moses. 2007. A tale of two proteins: differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF-beta signaling. *J Cell Biochem*. 101:9-33.
- Brown, R., C.J. Marshall, S.G. Pennie, and A. Hall. 1984. Mechanism of activation of an N-ras gene in the human fibrosarcoma cell line HT1080. *EMBO J*. 3:1321-1326.
- Bryce, N.S., E.S. Clark, J.L. Leysath, J.D. Currie, D.J. Webb, and A.M. Weaver. 2005. Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. *Curr Biol*. 15:1276-1285.
- Buccione, R., G. Caldieri, and I. Ayala. 2009. Invadopodia: specialized tumor cell structures for the focal degradation of the extracellular matrix. *Cancer Metastasis Rev*. 28:137-149.
- Busco, G., R.A. Cardone, M.R. Greco, A. Bellizzi, M. Colella, E. Antelmi, M.T. Mancini, M.E. Dell'Aquila, V. Casavola, A. Paradiso, and S.J. Reshkin. 2010. NHE1 promotes invadopodial ECM proteolysis through acidification of the peri-invadopodial space. *FASEB J*. 24:3903-3915.
- Caldieri, G., G. Giacchetti, G. Beznoussenko, F. Attanasio, I. Ayala, and R. Buccione. 2009. Invadopodia biogenesis is regulated by caveolin-mediated modulation of membrane cholesterol levels. *J Cell Mol Med*. 13:1728-1740.
- Cao, X.X., J.D. Xu, X.L. Liu, J.W. Xu, W.J. Wang, Q.Q. Li, Q. Chen, Z.D. Xu, and X.P. Liu. 2010. RACK1: A superior independent predictor for poor clinical outcome in breast cancer. *Int J Cancer*. 127:1172-1179.
- Casey, J.R., S. Grinstein, and J. Orlowski. 2010. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11:50-61.
- Castro-Castro, A., C. Janke, G. Montagnac, P. Paul-Gilloteaux, and P. Chavrier. 2012. ATAT1/MEC-17 acetyltransferase and HDAC6 deacetylase control a balance of acetylation of alpha-tubulin and cortactin and regulate MT1-MMP trafficking and breast tumor cell invasion. *Eur J Cell Biol*. 91:950-960.
- Catterall, F., A.I. Kassimi, M.N. Clifford, and C. Ioannides. 2003. Influence of milk on the antimutagenic potential of green and black teas. *Anticancer research*. 23:3863-3867.
- Chang, B.Y., R.A. Harte, and C.A. Cartwright. 2002. RACK1: a novel substrate for the Src protein-tyrosine kinase. *Oncogene*. 21:7619-7629.

- Chang, Q., R. Qin, T. Huang, J. Gao, and Y. Feng. 2006. Effect of antisense hypoxia-inducible factor 1alpha on progression, metastasis, and chemosensitivity of pancreatic cancer. *Pancreas*. 32:297-305.
- Charras, G., and E. Paluch. 2008. Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:730-736.
- Chen, R.H., Y.H. Su, R.L. Chuang, and T.Y. Chang. 1998. Suppression of transforming growth factor-beta-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Oncogene*. 17:1959-1968.
- Chen, W.T. 1989. Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *J Exp Zool*. 251:167-185.
- Chen, W.T., J.M. Chen, S.J. Parsons, and J.T. Parsons. 1985. Local degradation of fibronectin at sites of expression of the transforming gene product pp60src. *Nature*. 316:156-158.
- Chen, W.T., K. Olden, B.A. Bernard, and F.F. Chu. 1984. Expression of transformation-associated protease(s) that degrade fibronectin at cell contact sites. *J Cell Biol*. 98:1546-1555.
- Chen, W.T., and J.Y. Wang. 1999. Specialized surface protrusions of invasive cells, invadopodia and lamellipodia, have differential MT1-MMP, MMP-2, and TIMP-2 localization. *Ann N Y Acad Sci*. 878:361-371.
- Chenal, A., P. Nizard, V. Forge, M. Pugniere, M.O. Roy, J.C. Mani, F. Guillain, and D. Gillet. 2002. Does fusion of domains from unrelated proteins affect their folding pathways and the structural changes involved in their function? A case study with the diphtheria toxin T domain. *Protein Eng*. 15:383-391.
- Cheng, M., P.H. Watson, J.A. Paterson, N. Seidah, M. Chretien, and R.P. Shiu. 1997. Pro-protein convertase gene expression in human breast cancer. *Int J Cancer*. 71:966-971.
- Chou, Y.T., H. Wang, Y. Chen, D. Danielpour, and Y.C. Yang. 2006. Cited2 modulates TGF-beta-mediated upregulation of MMP9. *Oncogene*. 25:5547-5560.
- Clark, E.S., and A.M. Weaver. 2008. A new role for cortactin in invadopodia: regulation of protease secretion. *Eur J Cell Biol*. 87:581-590.
- Clark, E.S., A.S. Whigham, W.G. Yarbrough, and A.M. Weaver. 2007. Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Res*. 67:4227-4235.
- Condeelis, J., and J.W. Pollard. 2006. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 124:263-266.
- Constam, D.B., and E.J. Robertson. 1999. Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J Cell Biol*. 144:139-149.
- Coppola, J.M., M.S. Bhojani, B.D. Ross, and A. Rehemtulla. 2008. A small-molecule furin inhibitor inhibits cancer cell motility and invasiveness. *Neoplasia*. 10:363-370.
- Corboy, M.J., and R.K. Draper. 1997. Elevation of vacuolar pH inhibits the cytotoxic activity of furin-cleaved exotoxin A. *Infection and immunity*. 65:2240-2242.
- Cordat, E., and J.R. Casey. 2009. Bicarbonate transport in cell physiology and disease. *Biochem J*. 417:423-439.
- Cowden Dahl, K.D., S.E. Robertson, V.M. Weaver, and M.C. Simon. 2005. Hypoxia-inducible factor regulates alphavbeta3 integrin cell surface expression. *Mol Biol Cell*. 16:1901-1912.

- Crawford, S.E., V. Stellmach, J.E. Murphy-Ullrich, S.M. Ribeiro, J. Lawler, R.O. Hynes, G.P. Boivin, and N. Bouck. 1998. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell*. 93:1159-1170.
- Crider, B.P., X.S. Xie, and D.K. Stone. 1994. Bafilomycin inhibits proton flow through the H⁺ channel of vacuolar proton pumps. *J Biol Chem*. 269:17379-17381.
- Crump, C.M., Y. Xiang, L. Thomas, F. Gu, C. Austin, S.A. Tooze, and G. Thomas. 2001. PACS-1 binding to adaptors is required for acidic cluster motif-mediated protein traffic. *EMBO J*. 20:2191-2201.
- Cui, Y., F. Jean, G. Thomas, and J.L. Christian. 1998. BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *EMBO J*. 17:4735-4743.
- Czuwara-Ladykowska, J., V.I. Sementchenko, D.K. Watson, and M. Trojanowska. 2002. Ets1 is an effector of the transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling pathway and an antagonist of the profibrotic effects of TGF-beta. *J Biol Chem*. 277:20399-20408.
- Dai, C., L. Whitesell, A.B. Rogers, and S. Lindquist. 2007. Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell*. 130:1005-1018.
- Dallavalle, S., C. Pisano, and F. Zunino. 2012. Development and therapeutic impact of HDAC6-selective inhibitors. *Biochemical pharmacology*. 84:756-765.
- Datto, M.B., Y. Li, J.F. Panus, D.J. Howe, Y. Xiong, and X.F. Wang. 1995. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:5545-5549.
- David-Pfeuty, T., and S.J. Singer. 1980. Altered distributions of the cytoskeletal proteins vinculin and alpha-actinin in cultured fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77:6687-6691.
- de Cicco, R.L., D.E. Bassi, F. Benavides, C.J. Conti, and A.J. Klein-Szanto. 2007. Inhibition of proprotein convertases: approaches to block squamous carcinoma development and progression. *Molecular carcinogenesis*. 46:654-659.
- de Duve, C., T. de Barsey, B. Poole, A. Trouet, P. Tulkens, and F. Van Hoof. 1974. Commentary. Lysosomotropic agents. *Biochemical pharmacology*. 23:2495-2531.
- Degnin, C., F. Jean, G. Thomas, and J.L. Christian. 2004. Cleavages within the prodomain direct intracellular trafficking and degradation of mature bone morphogenetic protein-4. *Mol Biol Cell*. 15:5012-5020.
- Della Ragione, F., V. Criniti, V. Della Pietra, A. Borriello, A. Oliva, S. Indaco, T. Yamamoto, and V. Zappia. 2001. Genes modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity. *FEBS Lett*. 499:199-204.
- Demaurex, N. 2002. pH Homeostasis of cellular organelles. *News Physiol Sci*. 17:1-5.
- Deribe, Y.L., P. Wild, A. Chandrashaker, J. Curak, M.H. Schmidt, Y. Kalaidzidis, N. Milutinovic, I. Kratchmarova, L. Buerkle, M.J. Fetchko, P. Schmidt, S. Kittanakom, K.R. Brown, I. Jurisica, B. Blagoev, M. Zerial, I. Stagljjar, and I. Dikic. 2009. Regulation of epidermal growth factor receptor trafficking by lysine deacetylase HDAC6. *Sci Signal*. 2:ra84.
- Deroanne, C.F., K. Bonjean, S. Servotte, L. Devy, A. Colige, N. Clause, S. Blacher, E. Verdin, J.M. Foidart, B.V. Nusgens, and V. Castronovo. 2002. Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene*. 21:427-436.

- Destaing, O., E. Planus, D. Bouvard, C. Oddou, C. Badowski, V. Bossy, A. Raducanu, B. Fourcade, C. Albiges-Rizo, and M.R. Block. 2010. beta1A integrin is a master regulator of invadosome organization and function. *Mol Biol Cell*. 21:4108-4119.
- di Blasio, L., S. Droetto, J. Norman, F. Bussolino, and L. Primo. 2010. Protein kinase D1 regulates VEGF-A-induced alphavbeta3 integrin trafficking and endothelial cell migration. *Traffic*. 11:1107-1118.
- Di Cera, E. 2009. Serine proteases. *IUBMB Life*. 61:510-515.
- Diaz, B., G. Shani, I. Pass, D. Anderson, M. Quintavalle, and S.A. Courtneidge. 2009. Tks5-dependent, nox-mediated generation of reactive oxygen species is necessary for invadopodia formation. *Sci Signal*. 2:ra53.
- Dillon, S.L., D.M. Williamson, J. Elferich, D. Radler, R. Joshi, G. Thomas, and U. Shinde. 2012. Propeptides are sufficient to regulate organelle-specific pH-dependent activation of furin and proprotein convertase 1/3. *Journal of molecular biology*. 423:47-62.
- Donella-Deana, A., L. Cesaro, S. Sarno, M. Ruzzene, A.M. Brunati, O. Marin, G. Vilk, A. Doherty-Kirby, G. Lajoie, D.W. Litchfield, and L.A. Pinna. 2003. Tyrosine phosphorylation of protein kinase CK2 by Src-related tyrosine kinases correlates with increased catalytic activity. *Biochem J*. 372:841-849.
- Dong, C., Z. Li, R. Alvarez, Jr., X.H. Feng, and P.J. Goldschmidt-Clermont. 2000. Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity. *Mol Cell*. 5:27-34.
- Dragan, Y.P., S. Fahey, E. Nuwaysir, C. Sattler, K. Babcock, J. Vaughan, R. McCague, V.C. Jordan, and H.C. Pitot. 1996. The effect of tamoxifen and two of its non-isomerizable fixed-ring analogs on multistage rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*. 17:585-594.
- Drogaris, P., V. Villeneuve, C. Pomies, E.H. Lee, V. Bourdeau, E. Bonneil, G. Ferbeyre, A. Verreault, and P. Thibault. 2012. Histone deacetylase inhibitors globally enhance h3/h4 tail acetylation without affecting h3 lysine 56 acetylation. *Scientific reports*. 2:220.
- Drose, S., and K. Altendorf. 1997. Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J Exp Biol*. 200:1-8.
- Dubois, C.M., F. Blanchette, M.H. Laprise, R. Leduc, F. Grondin, and N.G. Seidah. 2001. Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme. *Am J Pathol*. 158:305-316.
- Dubois, C.M., M.H. Laprise, F. Blanchette, L.E. Gentry, and R. Leduc. 1995. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem*. 270:10618-10624.
- Dufour, E.K., A. Desilets, J.M. Longpre, and R. Leduc. 2005. Stability of mutant serpin/furin complexes: dependence on pH and regulation at the deacylation step. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 14:303-315.
- Eckert, M.A., T.M. Lwin, A.T. Chang, J. Kim, E. Danis, L. Ohno-Machado, and J. Yang. 2011. Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis. *Cancer Cell*. 19:372-386.
- Egidy, G., S. Jule, P. Bosse, F. Bernex, C. Geffrotin, S. Vincent-Naulleau, V. Horak, X. Sastre-Garau, and J.J. Panthier. 2008. Transcription analysis in the MeLiM swine model identifies RACK1 as a potential marker of malignancy for human melanocytic proliferation. *Molecular cancer*. 7:34.

- Eilken, H.M., and R.H. Adams. 2010. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 22:617-625.
- Eliasz, S., S. Liang, Y. Chen, M.A. De Marco, O. Machek, S. Skucha, L. Miele, and M. Bocchetta. 2010. Notch-1 stimulates survival of lung adenocarcinoma cells during hypoxia by activating the IGF-1R pathway. *Oncogene.* 29:2488-2498.
- Elliott, R.L., and G.C. Blobe. 2005. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 23:2078-2093.
- Erler, J.T., K.L. Bennewith, M. Nicolau, N. Dornhofer, C. Kong, Q.T. Le, J.T. Chi, S.S. Jeffrey, and A.J. Giaccia. 2006. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature.* 440:1222-1226.
- Estecio, M.R., and J.P. Issa. 2011. Dissecting DNA hypermethylation in cancer. *FEBS Lett.* 585:2078-2086.
- Feliciangeli, S.F., L. Thomas, G.K. Scott, E. Subbian, C.H. Hung, S.S. Molloy, F. Jean, U. Shinde, and G. Thomas. 2006. Identification of a pH sensor in the furin propeptide that regulates enzyme activation. *J Biol Chem.* 281:16108-16116.
- Feng, X.H., and R. Derynck. 2005. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:659-693.
- Fidler, I.J. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 3:453-458.
- Forgac, M. 2007. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:917-929.
- Forsythe, J.A., B.H. Jiang, N.V. Iyer, F. Agani, S.W. Leung, R.D. Koos, and G.L. Semenza. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 16:4604-4613.
- Fraga, M.F., E. Ballestar, A. Villar-Garea, M. Boix-Chornet, J. Espada, G. Schotta, T. Bonaldi, C. Haydon, S. Ropero, K. Petrie, N.G. Iyer, A. Perez-Rosado, E. Calvo, J.A. Lopez, A. Cano, M.J. Calasanz, D. Colomer, M.A. Piris, N. Ahn, A. Imhof, C. Caldas, T. Jenuwein, and M. Esteller. 2005. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature genetics.* 37:391-400.
- Frame, M.C., V.J. Fincham, N.O. Carragher, and J.A. Wyke. 2002. v-Src's hold over actin and cell adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:233-245.
- Friedl, P., and D. Gilmour. 2009. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:445-457.
- Friedman, E., L.I. Gold, D. Klimstra, Z.S. Zeng, S. Winawer, and A. Cohen. 1995. High levels of transforming growth factor beta 1 correlate with disease progression in human colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 4:549-554.
- Frittoli, E., A. Palamidessi, A. Disanza, and G. Scita. 2011. Secretory and endo/exocytic trafficking in invadopodia formation: the MT1-MMP paradigm. *Eur J Cell Biol.* 90:108-114.
- Fu, W., K. Wu, and J. Duan. 2007. Sequence and expression analysis of histone deacetylases in rice. *Biochem Biophys Res Commun.* 356:843-850.
- Fujiwara, T., K. Oda, S. Yokota, A. Takatsuki, and Y. Ikehara. 1988. Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 263:18545-18552.

- Futai, M., T. Oka, G. Sun-Wada, Y. Moriyama, H. Kanazawa, and Y. Wada. 2000. Luminal acidification of diverse organelles by V-ATPase in animal cells. *J Exp Biol.* 203:107-116.
- Galliher, A.J., and W.P. Schiemann. 2007. Src phosphorylates Tyr284 in TGF-beta type II receptor and regulates TGF-beta stimulation of p38 MAPK during breast cancer cell proliferation and invasion. *Cancer Res.* 67:3752-3758.
- Galvez, B.G., S. Matias-Roman, M. Yanez-Mo, F. Sanchez-Madrid, and A.G. Arroyo. 2002. ECM regulates MT1-MMP localization with beta1 or alpha5beta1 integrins at distinct cell compartments modulating its internalization and activity on human endothelial cells. *J Cell Biol.* 159:509-521.
- Gambichler, T., M. Skrygan, J.M. Kaczmarczyk, J. Hyun, N.S. Tomi, A. Sommer, F.G. Bechara, S. Boms, N.H. Brockmeyer, P. Altmeyer, and A. Kreuter. 2007. Increased expression of TGF-beta/Smad proteins in basal cell carcinoma. *European journal of medical research.* 12:509-514.
- Gao, L., M.A. Cueto, F. Asselbergs, and P. Atadja. 2002. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem.* 277:25748-25755.
- Garcia, E., G.E. Jones, L.M. Machesky, and I.M. Anton. 2012. WIP: WASP-interacting proteins at invadopodia and podosomes. *Eur J Cell Biol.* 91:869-877.
- Garcia-Mata, R., Y.S. Gao, and E. Sztul. 2002. Hassles with taking out the garbage: aggravating aggresomes. *Traffic.* 3:388-396.
- Gentry, L.E., and B.W. Nash. 1990. The pro domain of pre-pro-transforming growth factor beta 1 when independently expressed is a functional binding protein for the mature growth factor. *Biochemistry.* 29:6851-6857.
- Gerber, H.P., F. Condorelli, J. Park, and N. Ferrara. 1997. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem.* 272:23659-23667.
- Gillies, R.J., N. Raghunand, G.S. Karczmar, and Z.M. Bhujwala. 2002. MRI of the tumor microenvironment. *J Magn Reson Imaging.* 16:430-450.
- Gimona, M., R. Buccione, S.A. Courtneidge, and S. Linder. 2008. Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Curr Opin Cell Biol.* 20:235-241.
- Glaser, K.B., M.J. Staver, J.F. Waring, J. Stender, R.G. Ulrich, and S.K. Davidsen. 2003. Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther.* 2:151-163.
- Goetsch, L., V. Caussanel, and N. Corvaia. 2013. Biological significance and targeting of c-Met tyrosine kinase receptor in cancer. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library.* 18:454-473.
- Goley, E.D., and M.D. Welch. 2006. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:713-726.
- Griffiths, G., and K. Simons. 1986. The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science.* 234:438-443.
- Griffiths, P.D. 2001. Cytomegalovirus therapy: current constraints and future opportunities. *Current opinion in infectious diseases.* 14:765-768.
- Gu, F., C.M. Crump, and G. Thomas. 2001. Trans-Golgi network sorting. *Cell Mol Life Sci.* 58:1067-1084.

- Gupton, S.L., and F.B. Gertler. 2007. Filopodia: the fingers that do the walking. *Sci STKE*. 2007:re5.
- Haase, V.H. 2010. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol*. 299:F1-13.
- Haggarty, S.J., K.M. Koeller, J.C. Wong, C.M. Grozinger, and S.L. Schreiber. 2003. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:4389-4394.
- Halestrap, A.P., and D. Meredith. 2004. The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch*. 447:619-628.
- Halkidou, K., L. Gaughan, S. Cook, H.Y. Leung, D.E. Neal, and C.N. Robson. 2004. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate*. 59:177-189.
- Hall, A., C.J. Marshall, N.K. Spurr, and R.A. Weiss. 1983. Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1. *Nature*. 303:396-400.
- Hanada, H., Y. Moriyama, M. Maeda, and M. Futai. 1990. Kinetic studies of chromaffin granule H⁺-ATPase and effects of bafilomycin A1. *Biochemical and biophysical research communications*. 170:873-878.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100:57-70.
- Hannon, G.J., and D. Beach. 1994. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*. 371:257-261.
- Harms, K.L., and X. Chen. 2007. Histone deacetylase 2 modulates p53 transcriptional activities through regulation of p53-DNA binding activity. *Cancer Res*. 67:3145-3152.
- Harper, K., D. Arsenault, S. Boulay-Jean, A. Lauzier, F. Lucien, and C.M. Dubois. 2010. Autotaxin promotes cancer invasion via the lysophosphatidic acid receptor 4: participation of the cyclic AMP/EPAC/Rac1 signaling pathway in invadopodia formation. *Cancer Res*. 70:4634-4643.
- Harris, A.L. 2002. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*. 2:38-47.
- Hauck, C.R., D.A. Hsia, D. Ilic, and D.D. Schlaepfer. 2002. v-Src SH3-enhanced interaction with focal adhesion kinase at beta 1 integrin-containing invadopodia promotes cell invasion. *J Biol Chem*. 277:12487-12490.
- Head, J.A., D. Jiang, M. Li, L.J. Zorn, E.M. Schaefer, J.T. Parsons, and S.A. Weed. 2003. Cortactin tyrosine phosphorylation requires Rac1 activity and association with the cortical actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell*. 14:3216-3229.
- Heikkinen, P.T., M. Nummela, S.K. Leivonen, J. Westermarck, C.S. Hill, V.M. Kahari, and P.M. Jaakkola. 2010. Hypoxia-activated Smad3-specific dephosphorylation by PP2A. *J Biol Chem*. 285:3740-3749.
- Heldin, C.H., M. Landstrom, and A. Moustakas. 2009. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol*. 21:166-176.
- Heldin, C.H., K. Miyazono, and P. ten Dijke. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 390:465-471.
- Heuser, J. 1989. Changes in lysosome shape and distribution correlated with changes in cytoplasmic pH. *J Cell Biol*. 108:855-864.

- Hideshima, T., J.E. Bradner, J. Wong, D. Chauhan, P. Richardson, S.L. Schreiber, and K.C. Anderson. 2005. Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:8567-8572.
- Hill, C.S. 2009. Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins. *Cell Res*. 19:36-46.
- Hockel, M., K. Schlenger, C. Knoop, and P. Vaupel. 1991. Oxygenation of carcinomas of the uterine cervix: evaluation by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res*. 51:6098-6102.
- Hosaka, M., M. Nagahama, W.S. Kim, T. Watanabe, K. Hatsuzawa, J. Ikemizu, K. Murakami, and K. Nakayama. 1991. Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem*. 266:12127-12130.
- Huang, B.H., M. Laban, C.H. Leung, L. Lee, C.K. Lee, M. Salto-Tellez, G.C. Raju, and S.C. Hooi. 2005. Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death Differ*. 12:395-404.
- Hubbert, C., A. Guardiola, R. Shao, Y. Kawaguchi, A. Ito, A. Nixon, M. Yoshida, X.F. Wang, and T.P. Yao. 2002. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*. 417:455-458.
- Hurtado-Lorenzo, A., M. Skinner, J. El Annan, M. Futai, G.H. Sun-Wada, S. Bourgoin, J. Casanova, A. Wildeman, S. Bechoua, D.A. Ausiello, D. Brown, and V. Marshansky. 2006. V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. *Nature cell biology*. 8:124-136.
- Hwang, Y.S., Z. Xianglan, K.K. Park, and W.Y. Chung. 2012. Functional invadopodia formation through stabilization of the PDPN transcript by IMP-3 and cancer-stromal crosstalk for PDPN expression. *Carcinogenesis*. 33:2135-2146.
- Iizuka, M., and M.M. Smith. 2003. Functional consequences of histone modifications. *Curr Opin Genet Dev*. 13:154-160.
- Ikushima, H., and K. Miyazono. 2010. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 10:415-424.
- Imai, T., A. Horiuchi, C. Wang, K. Oka, S. Ohira, T. Nikaido, and I. Konishi. 2003. Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *Am J Pathol*. 163:1437-1447.
- Inoue, A., N. Yoshida, Y. Omoto, S. Oguchi, T. Yamori, R. Kiyama, and S. Hayashi. 2002. Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes. *J Mol Endocrinol*. 29:175-192.
- Itoh, S., F. Itoh, M.J. Goumans, and P. Ten Dijke. 2000. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem*. 267:6954-6967.
- Jay, D., E.J. Garcia, and M. de la Luz Ibarra. 2004. In situ determination of a PKA phosphorylation site in the C-terminal region of filamin. *Molecular and cellular biochemistry*. 260:49-53.
- Jeon, H.W., and Y.M. Lee. 2010. Inhibition of histone deacetylase attenuates hypoxia-induced migration and invasion of cancer cells via the restoration of RECK expression. *Mol Cancer Ther*. 9:1361-1370.
- Jin, H., L. Liang, L. Liu, W. Deng, and J. Liu. 2013. HDAC inhibitor DWP0016 activates p53 transcription and acetylation to inhibit cell growth in U251 glioblastoma cells. *J Cell Biochem*. 114:1498-1509.

- Johnstone, R.W. 2002. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 1:287-299.
- Jones, B.G., L. Thomas, S.S. Molloy, C.D. Thulin, M.D. Fry, K.A. Walsh, and G. Thomas. 1995. Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation state of a casein kinase II site in its cytoplasmic tail. *EMBO J.* 14:5869-5883.
- Jordan, V.C. 1995. Tamoxifen for breast cancer prevention. *Proc Soc Exp Biol Med.* 208:144-149.
- Ju, W., A. Ogawa, J. Heyer, D. Nierhof, L. Yu, R. Kucherlapati, D.A. Shafritz, and E.P. Bottinger. 2006. Deletion of Smad2 in mouse liver reveals novel functions in hepatocyte growth and differentiation. *Mol Cell Biol.* 26:654-667.
- Kallinowski, F., K.H. Schlenger, M. Kloes, M. Stohrer, and P. Vaupel. 1989. Tumor blood flow: the principal modulator of oxidative and glycolytic metabolism, and of the metabolic micromilieu of human tumor xenografts in vivo. *Int J Cancer.* 44:266-272.
- Kaluza, D., J. Kroll, S. Gesierich, T.P. Yao, R.A. Boon, E. Hergenreider, M. Tjwa, L. Rossig, E. Seto, H.G. Augustin, A.M. Zeiher, S. Dimmeler, and C. Urbich. 2011. Class IIB HDAC6 regulates endothelial cell migration and angiogenesis by deacetylation of cortactin. *EMBO J.* 30:4142-4156.
- Kane, P.M. 2006. The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR.* 70:177-191.
- Kanno, K., S. Kanno, H. Nitta, N. Uesugi, T. Sugai, T. Masuda, G. Wakabayashi, and C. Maesawa. 2012. Overexpression of histone deacetylase 6 contributes to accelerated migration and invasion activity of hepatocellular carcinoma cells. *Oncology reports.* 28:867-873.
- Karsdal, M.A., L. Larsen, M.T. Engsig, H. Lou, M. Ferreras, A. Lochter, J.M. Delaisse, and N.T. Foged. 2002. Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J Biol Chem.* 277:44061-44067.
- Katoh, M., M. Igarashi, H. Fukuda, H. Nakagama, and M. Katoh. 2013. Cancer genetics and genomics of human FOX family genes. *Cancer letters.* 328:198-206.
- Kelly, M.D., A. Smith, G. Banks, P. Wingrove, P.W. Whiting, J. Atack, G.R. Seabrook, and K.A. Maubach. 2002. Role of the histidine residue at position 105 in the human alpha 5 containing GABA(A) receptor on the affinity and efficacy of benzodiazepine site ligands. *British journal of pharmacology.* 135:248-256.
- Kelly, T., S.C. Mueller, Y. Yeh, and W.T. Chen. 1994. Invadopodia promote proteolysis of a wide variety of extracellular matrix proteins. *J Cell Physiol.* 158:299-308.
- Khan, O., and N.B. La Thangue. 2012. HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunology and cell biology.* 90:85-94.
- Kim, D., S. Kim, H. Koh, S.O. Yoon, A.S. Chung, K.S. Cho, and J. Chung. 2001a. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB J.* 15:1953-1962.
- Kim, E.S., M.S. Kim, and A. Moon. 2004. TGF-beta-induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells. *Int J Oncol.* 25:1375-1382.
- Kim, M.S., H.J. Kwon, Y.M. Lee, J.H. Baek, J.E. Jang, S.W. Lee, E.J. Moon, H.S. Kim, S.K. Lee, H.Y. Chung, C.W. Kim, and K.W. Kim. 2001b. Histone deacetylases

- induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med.* 7:437-443.
- Kim, S., D.J. Bae, M. Hong, S.Y. Park, and I.S. Kim. 2010. The conserved histidine in epidermal growth factor-like domains of stabilin-2 modulates pH-dependent recognition of phosphatidylserine in apoptotic cells. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 42:1154-1163.
- Kim, T.R., E.W. Cho, S.G. Paik, and I.G. Kim. 2012. Hypoxia-induced SM22alpha in A549 cells activates the IGF1R/PI3K/Akt pathway, conferring cellular resistance against chemo- and radiation therapy. *FEBS letters.* 586:303-309.
- Kimura, F., K. Iwaya, T. Kawaguchi, H. Kaise, K. Yamada, K. Mukai, O. Matsubara, N. Ikeda, and N. Kohno. 2010. Epidermal growth factor-dependent enhancement of invasiveness of squamous cell carcinoma of the breast. *Cancer Sci.* 101:1133-1140.
- Komiyama, T., J.M. Coppola, M.J. Larsen, M.E. van Dort, B.D. Ross, R. Day, A. Rehemtulla, and R.S. Fuller. 2009. Inhibition of furin/proprotein convertase-catalyzed surface and intracellular processing by small molecules. *J Biol Chem.* 284:15729-15738.
- Kondo, Y., and J.P. Issa. 2010. DNA methylation profiling in cancer. *Expert reviews in molecular medicine.* 12:e23.
- Koriazova, L.K., and M. Montal. 2003. Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease through the heavy chain channel. *Nat Struct Biol.* 10:13-18.
- Kostyniuk, C.L., S.M. Dehm, D. Batten, and K. Bonham. 2002. The ubiquitous and tissue specific promoters of the human SRC gene are repressed by inhibitors of histone deacetylases. *Oncogene.* 21:6340-6347.
- Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 128:693-705.
- Kovacs, J.J., P.J. Murphy, S. Gaillard, X. Zhao, J.T. Wu, C.V. Nicchitta, M. Yoshida, D.O. Toft, W.B. Pratt, and T.P. Yao. 2005. HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell.* 18:601-607.
- Krantz, B.A., A. Finkelstein, and R.J. Collier. 2006. Protein translocation through the anthrax toxin transmembrane pore is driven by a proton gradient. *J Mol Biol.* 355:968-979.
- Krishnamachary, B., S. Berg-Dixon, B. Kelly, F. Agani, D. Feldser, G. Ferreira, N. Iyer, J. LaRusch, B. Pak, P. Taghavi, and G.L. Semenza. 2003. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res.* 63:1138-1143.
- Krishnamachary, B., D. Zagzag, H. Nagasawa, K. Rainey, H. Okuyama, J.H. Baek, and G.L. Semenza. 2006. Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFHX1A, and ZFHX1B. *Cancer Res.* 66:2725-2731.
- Kroemer, G., and J. Pouyssegur. 2008. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell.* 13:472-482.
- Kurdistani, S.K., and M. Grunstein. 2003. Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:276-284.
- Kwon, S., Y. Zhang, and P. Matthias. 2007. The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response. *Genes Dev.* 21:3381-3394.
- Labrecque, L., C. Nyalendo, S. Langlois, Y. Durocher, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras, and R. Beliveau. 2004. Src-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1

- induces its association with membrane type 1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem.* 279:52132-52140.
- Laderoute, K.R., R.M. Alarcon, M.D. Brody, J.M. Calaoagan, E.Y. Chen, A.M. Knapp, Z. Yun, N.C. Denko, and A.J. Giaccia. 2000. Opposing effects of hypoxia on expression of the angiogenic inhibitor thrombospondin 1 and the angiogenic inducer vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res.* 6:2941-2950.
- Laurenzana, A., M. Balliu, C. Cellai, M.N. Romanelli, and F. Paoletti. 2013. Effectiveness of the histone deacetylase inhibitor (S)-2 against LNCaP and PC3 human prostate cancer cells. *PLoS One.* 8:e58267.
- Lawler, S., X.H. Feng, R.H. Chen, E.M. Maruoka, C.W. Turck, I. Griswold-Prenner, and R. Derynck. 1997. The type II transforming growth factor-beta receptor autophosphorylates not only on serine and threonine but also on tyrosine residues. *J Biol Chem.* 272:14850-14859.
- Lee, M.K., C. Pardoux, M.C. Hall, P.S. Lee, D. Warburton, J. Qing, S.M. Smith, and R. Derynck. 2007. TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J.* 26:3957-3967.
- Lee, Y.S., K.H. Lim, X. Guo, Y. Kawaguchi, Y. Gao, T. Barrientos, P. Ordentlich, X.F. Wang, C.M. Counter, and T.P. Yao. 2008. The cytoplasmic deacetylase HDAC6 is required for efficient oncogenic tumorigenesis. *Cancer Res.* 68:7561-7569.
- Lehmann, A., C. Denkert, J. Budczies, A.C. Buckendahl, S. Darb-Esfahani, A. Noske, B.M. Muller, M. Bahra, P. Neuhaus, M. Dietel, G. Kristiansen, and W. Weichert. 2009. High class I HDAC activity and expression are associated with RelA/p65 activation in pancreatic cancer in vitro and in vivo. *BMC cancer.* 9:395.
- Lehmann, K., E. Janda, C.E. Pierreux, M. Rytomaa, A. Schulze, M. McMahon, C.S. Hill, H. Beug, and J. Downward. 2000. Raf induces TGFbeta production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells. *Genes Dev.* 14:2610-2622.
- Levin, V.A., S. Panchabhai, L. Shen, and K.A. Baggerly. 2012. Protein and phosphoprotein levels in glioma and adenocarcinoma cell lines grown in normoxia and hypoxia in monolayer and three-dimensional cultures. *Proteome science.* 10:5.
- Levy, L., and C.S. Hill. 2006. Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17:41-58.
- Li, M.O., Y.Y. Wan, S. Sanjabi, A.K. Robertson, and R.A. Flavell. 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual review of immunology.* 24:99-146.
- Li, X.Y., I. Ota, I. Yana, F. Sabeh, and S.J. Weiss. 2008a. Molecular dissection of the structural machinery underlying the tissue-invasive activity of membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Mol Biol Cell.* 19:3221-3233.
- Li, Y., X. Zhang, R.D. Polakiewicz, T.P. Yao, and M.J. Comb. 2008b. HDAC6 is required for epidermal growth factor-induced beta-catenin nuclear localization. *J Biol Chem.* 283:12686-12690.
- Liao, D., C. Corle, T.N. Seagroves, and R.S. Johnson. 2007. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res.* 67:563-572.
- Lin, H.Y., C.S. Chen, S.P. Lin, and J.R. Weng. 2006. Targeting histone deacetylase in cancer therapy. *Med Res Rev.* 26:397-413.

- Linder, S. 2007. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol.* 17:107-117.
- Lindner, D., and D. Raghavan. 2009. Intra-tumoural extra-cellular pH: a useful parameter of response to chemotherapy in syngeneic tumour lines. *British journal of cancer.* 100:1287-1291.
- Liu, G., L. Thomas, R.A. Warren, C.A. Enns, C.C. Cunningham, J.H. Hartwig, and G. Thomas. 1997. Cytoskeletal protein ABP-280 directs the intracellular trafficking of furin and modulates proprotein processing in the endocytic pathway. *J Cell Biol.* 139:1719-1733.
- Liu, L.T., H.C. Chang, L.C. Chiang, and W.C. Hung. 2003. Histone deacetylase inhibitor up-regulates RECK to inhibit MMP-2 activation and cancer cell invasion. *Cancer Res.* 63:3069-3072.
- Liu, S., Y. Liang, H. Huang, L. Wang, Y. Li, J. Li, X. Li, and H. Wang. 2005. ERK-dependent signaling pathway and transcriptional factor Ets-1 regulate matrix metalloproteinase-9 production in transforming growth factor-beta1 stimulated glomerular podocytes. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology.* 16:207-216.
- Liu, W., L.X. Fan, X. Zhou, W.E. Sweeney, Jr., E.D. Avner, and X. Li. 2012. HDAC6 regulates epidermal growth factor receptor (EGFR) endocytic trafficking and degradation in renal epithelial cells. *PLoS one.* 7:e49418.
- Logeat, F., C. Bessia, C. Brou, O. LeBail, S. Jarriault, N.G. Seidah, and A. Israel. 1998. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:8108-8112.
- Lucas, J.T., Jr., B.P. Salimath, M.G. Slomiany, and S.A. Rosenzweig. 2010. Regulation of invasive behavior by vascular endothelial growth factor is HEF1-dependent. *Oncogene.* 29:4449-4459.
- Lucien, F., K. Brochu-Gaudreau, D. Arsenault, K. Harper, and C.M. Dubois. 2011. Hypoxia-induced invadopodia formation involves activation of NHE-1 by the p90 ribosomal S6 kinase (p90RSK). *PLoS One.* 6:e28851.
- Lucio-Eterovic, A.K., M.A. Cortez, E.T. Valera, F.J. Motta, R.G. Queiroz, H.R. Machado, C.G. Carlotti, Jr., L. Neder, C.A. Scrideli, and L.G. Tone. 2008. Differential expression of 12 histone deacetylase (HDAC) genes in astrocytomas and normal brain tissue: class II and IV are hypoexpressed in glioblastomas. *BMC cancer.* 8:243.
- Ludwig, M.G., M. Vanek, D. Guerini, J.A. Gasser, C.E. Jones, U. Junker, H. Hofstetter, R.M. Wolf, and K. Seuwen. 2003. Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature.* 425:93-98.
- Lunt, S.J., N. Chaudary, and R.P. Hill. 2009. The tumor microenvironment and metastatic disease. *Clinical & experimental metastasis.* 26:19-34.
- Lusson, J., S. Benjannet, J. Hamelin, D. Savaria, M. Chretien, and N.G. Seidah. 1997. The integrity of the RRGDL sequence of the proprotein convertase PC1 is critical for its zymogen and C-terminal processing and for its cellular trafficking. *Biochem J.* 326 (Pt 3):737-744.
- Lyons, R.M., L.E. Gentry, A.F. Purchio, and H.L. Moses. 1990. Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J Cell Biol.* 110:1361-1367.

- Maeda, K., Y. Kato, and Y. Sugiyama. 2002. pH-dependent receptor/ligand dissociation as a determining factor for intracellular sorting of ligands for epidermal growth factor receptors in rat hepatocytes. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 82:71-82.
- Maisonpierre, P.C., C. Suri, P.F. Jones, S. Bartunkova, S.J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, J. McClain, T.H. Aldrich, N. Papadopoulos, T.J. Daly, S. Davis, T.N. Sato, and G.D. Yancopoulos. 1997. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. 277:55-60.
- Mallet, W.G., and F.R. Maxfield. 1999. Chimeric forms of furin and TGN38 are transported with the plasma membrane in the trans-Golgi network via distinct endosomal pathways. *J Cell Biol*. 146:345-359.
- Malo, M.E., and L. Fliegel. 2006. Physiological role and regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Can J Physiol Pharmacol*. 84:1081-1095.
- Mandal, S., K.R. Johnson, and M.J. Wheelock. 2008. TGF-beta induces formation of F-actin cores and matrix degradation in human breast cancer cells via distinct signaling pathways. *Exp Cell Res*. 314:3478-3493.
- Mani, S.A., W. Guo, M.J. Liao, E.N. Eaton, A. Ayyanan, A.Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C.C. Zhang, M. Shipitsin, L.L. Campbell, K. Polyak, C. Brisken, J. Yang, and R.A. Weinberg. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 133:704-715.
- Maranda, B., D. Brown, S. Bourgoin, J.E. Casanova, P. Vinay, D.A. Ausiello, and V. Marshansky. 2001. Intra-endosomal pH-sensitive recruitment of the Arf-nucleotide exchange factor ARNO and Arf6 from cytoplasm to proximal tubule endosomes. *J Biol Chem*. 276:18540-18550.
- Mariadason, J.M., G.A. Corner, and L.H. Augenlicht. 2000. Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Res*. 60:4561-4572.
- Marin-Hernandez, A., J.C. Gallardo-Perez, S.J. Ralph, S. Rodriguez-Enriquez, and R. Moreno-Sanchez. 2009. HIF-1alpha modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 9:1084-1101.
- Marks, P.A., and W.S. Xu. 2009. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J Cell Biochem*. 107:600-608.
- Marshansky, V. 2007. The V-ATPase a2-subunit as a putative endosomal pH-sensor. *Biochem Soc Trans*. 35:1092-1099.
- Martinez-Zaguilan, R., N. Raghunand, R.M. Lynch, W. Bellamy, G.M. Martinez, B. Rojas, D. Smith, W.S. Dalton, and R.J. Gillies. 1999. pH and drug resistance. I. Functional expression of plasmalemmal V-type H⁺-ATPase in drug-resistant human breast carcinoma cell lines. *Biochemical pharmacology*. 57:1037-1046.
- Massague, J. 2008. TGFbeta in Cancer. *Cell*. 134:215-230.
- Massague, J., and D. Wotton. 2000. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J*. 19:1745-1754.
- Mattsson, J.P., and D.J. Keeling. 1996. [3H]Bafilomycin as a probe for the transmembrane proton channel of the osteoclast vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase. *Biochimica et biophysica acta*. 1280:98-106.

- Maxwell, P.H., C.W. Pugh, and P.J. Ratcliffe. 2001. Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 11:293-299.
- Mayer, G., G. Boileau, and M. Bendayan. 2003. Furin interacts with proMT1-MMP and integrin alphaV at specialized domains of renal cell plasma membrane. *J Cell Sci.* 116:1763-1773.
- McCarty, M.F., and J. Whitaker. 2010. Manipulating tumor acidification as a cancer treatment strategy. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic.* 15:264-272.
- McMahon, S., F. Grondin, P.P. McDonald, D.E. Richard, and C.M. Dubois. 2005. Hypoxia-enhanced expression of the proprotein convertase furin is mediated by hypoxia-inducible factor-1: impact on the bioactivation of proproteins. *J Biol Chem.* 280:6561-6569.
- McMahon, S., M.H. Laprise, and C.M. Dubois. 2003. Alternative pathway for the role of furin in tumor cell invasion process. Enhanced MMP-2 levels through bioactive TGFbeta. *Exp Cell Res.* 291:326-339.
- Md Hashim, N.F., N.S. Nicholas, A.E. Dart, S. Kiriakidis, E. Paleolog, and C.M. Wells. 2013. Hypoxia-induced invadopodia formation: a role for beta-PIX. *Open biology.* 3:120159.
- Mellman, I. 1992. The importance of being acid: the role of acidification in intracellular membrane traffic. *J Exp Biol.* 172:39-45.
- Mellman, I., R. Fuchs, and A. Helenius. 1986. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annual review of biochemistry.* 55:663-700.
- Menetrey, J., D. Gillet, and A. Menez. 2005. Structural features common to intracellularly acting toxins from bacteria. *Toxicon.* 45:129-137.
- Mere, J., J. Morlon-Guyot, A. Bonhoure, L. Chiche, and B. Beaumelle. 2005. Acid-triggered membrane insertion of Pseudomonas exotoxin A involves an original mechanism based on pH-regulated tryptophan exposure. *J Biol Chem.* 280:21194-21201.
- Miguel, D.C., J.K. Yokoyama-Yasunaka, W.K. Andreoli, R.A. Mortara, and S.R. Uliana. 2007. Tamoxifen is effective against Leishmania and induces a rapid alkalization of parasitophorous vacuoles harbouring Leishmania (Leishmania) amazonensis amastigotes. *J Antimicrob Chemother.* 60:526-534.
- Minucci, S., and P.G. Pelicci. 2006. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer.* 6:38-51.
- Mitsiades, C.S., N.S. Mitsiades, C.J. McMullan, V. Poulaki, R. Shringarpure, T. Hideshima, M. Akiyama, D. Chauhan, N. Munshi, X. Gu, C. Bailey, M. Joseph, T.A. Libermann, V.M. Richon, P.A. Marks, and K.C. Anderson. 2004. Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:540-545.
- Miyazono, K., U. Hellman, C. Wernstedt, and C.H. Heldin. 1988. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J Biol Chem.* 263:6407-6415.
- Mizutani, K., H. Miki, H. He, H. Maruta, and T. Takenawa. 2002. Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer Res.* 62:669-674.

- Molloy, S.S., E.D. Anderson, F. Jean, and G. Thomas. 1999. Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol.* 9:28-35.
- Molloy, S.S., L. Thomas, C. Kamibayashi, M.C. Mumby, and G. Thomas. 1998. Regulation of endosome sorting by a specific PP2A isoform. *J Cell Biol.* 142:1399-1411.
- Molloy, S.S., L. Thomas, J.K. VanSlyke, P.E. Stenberg, and G. Thomas. 1994. Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J.* 13:18-33.
- Monsky, W.L., T. Kelly, C.Y. Lin, Y. Yeh, W.G. Stetler-Stevenson, S.C. Mueller, and W.T. Chen. 1993. Binding and localization of M(r) 72,000 matrix metalloproteinase at cell surface invadopodia. *Cancer Res.* 53:3159-3164.
- Monsky, W.L., C.Y. Lin, A. Aoyama, T. Kelly, S.K. Akiyama, S.C. Mueller, and W.T. Chen. 1994. A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells. *Cancer Res.* 54:5702-5710.
- Mottet, D., and V. Castronovo. 2008. Histone deacetylases: target enzymes for cancer therapy. *Clin Exp Metastasis.* 25:183-189.
- Mottet, D., S.P. Ruys, C. Demazy, M. Raes, and C. Michiels. 2005. Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity. *Int J Cancer.* 117:764-774.
- Mueller, D.S., T. Kampmann, R. Yennamalli, P.R. Young, B. Kobe, and A.E. Mark. 2008. Histidine protonation and the activation of viral fusion proteins. *Biochemical Society transactions.* 36:43-45.
- Mueller, S.C., and W.T. Chen. 1991. Cellular invasion into matrix beads: localization of beta 1 integrins and fibronectin to the invadopodia. *J Cell Sci.* 99 (Pt 2):213-225.
- Mueller, S.C., G. Ghersi, S.K. Akiyama, Q.X. Sang, L. Howard, M. Pineiro-Sanchez, H. Nakahara, Y. Yeh, and W.T. Chen. 1999. A novel protease-docking function of integrin at invadopodia. *J Biol Chem.* 274:24947-24952.
- Mueller, S.C., Y. Yeh, and W.T. Chen. 1992. Tyrosine phosphorylation of membrane proteins mediates cellular invasion by transformed cells. *J Cell Biol.* 119:1309-1325.
- Mukhopadhyay, C.K., B. Mazumder, and P.L. Fox. 2000. Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J Biol Chem.* 275:21048-21054.
- Mulder, K.M. 2000. Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11:23-35.
- Mulder, K.M., L.E. Humphrey, H.G. Choi, K.E. Childress-Fields, and M.G. Brattain. 1990. Evidence for c-myc in the signaling pathway for TGF-beta in well-differentiated human colon carcinoma cells. *J Cell Physiol.* 145:501-507.
- Muller, B.M., L. Jana, A. Kasajima, A. Lehmann, J. Prinzler, J. Budczies, K.J. Winzer, M. Dietel, W. Weichert, and C. Denkert. 2013. Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer - overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression. *BMC cancer.* 13:215.
- Munger, J.S., X. Huang, H. Kawakatsu, M.J. Griffiths, S.L. Dalton, J. Wu, J.F. Pittet, N. Kaminski, C. Garat, M.A. Matthay, D.B. Rifkin, and D. Sheppard. 1999. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell.* 96:319-328.

- Munster, P.N., T. Troso-Sandoval, N. Rosen, R. Rifkind, P.A. Marks, and V.M. Richon. 2001. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces differentiation of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 61:8492-8497.
- Muntean, A.G., and J.L. Hess. 2009. Epigenetic dysregulation in cancer. *Am J Pathol.* 175:1353-1361.
- Muriel, O., A. Echarri, C. Hellriegel, D.M. Pavon, L. Beccari, and M.A. Del Pozo. 2011. Phosphorylated filamin A regulates actin-linked caveolae dynamics. *J Cell Sci.* 124:2763-2776.
- Murphy, P.J., Y. Morishima, J.J. Kovacs, T.P. Yao, and W.B. Pratt. 2005. Regulation of the dynamics of hsp90 action on the glucocorticoid receptor by acetylation/deacetylation of the chaperone. *J Biol Chem.* 280:33792-33799.
- Nagashio, R., Y. Sato, T. Matsumoto, T. Kageyama, Y. Satoh, R. Shinichiro, N. Masuda, N. Goshima, S.X. Jiang, and I. Okayasu. 2010. Expression of RACK1 is a novel biomarker in pulmonary adenocarcinomas. *Lung Cancer.* 69:54-59.
- Nakahara, H., L. Howard, E.W. Thompson, H. Sato, M. Seiki, Y. Yeh, and W.T. Chen. 1997. Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:7959-7964.
- Nakahara, H., S.C. Mueller, M. Nomizu, Y. Yamada, Y. Yeh, and W.T. Chen. 1998. Activation of beta1 integrin signaling stimulates tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP and membrane-protrusive activities at invadopodia. *J Biol Chem.* 273:9-12.
- Nakahara, H., M. Nomizu, S.K. Akiyama, Y. Yamada, Y. Yeh, and W.T. Chen. 1996. A mechanism for regulation of melanoma invasion. Ligation of alpha6beta1 integrin by laminin G peptides. *J Biol Chem.* 271:27221-27224.
- Nakahara, H., T. Otani, T. Sasaki, Y. Miura, Y. Takai, and M. Kogo. 2003. Involvement of Cdc42 and Rac small G proteins in invadopodia formation of RPMI7951 cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms.* 8:1019-1027.
- Nakamura, H., T. Mizuno, K. Kawamura, and T. Kamino. 1976. [CSF enzyme activities in patients with head injury--especially on GOT, GPT, LDH, and CPK (AUTHOR'S TRANSL)]. *No shinkei geka. Neurological surgery.* 4:753-762.
- Nakamura, N., S. Tanaka, Y. Teko, K. Mitsui, and H. Kanazawa. 2005. Four Na⁺/H⁺ exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. *J Biol Chem.* 280:1561-1572.
- Niegisch, G., J. Knievel, A. Koch, C. Hader, U. Fischer, P. Albers, and W.A. Schulz. 2012. Changes in histone deacetylase (HDAC) expression patterns and activity of HDAC inhibitors in urothelial cancers. *Urologic oncology.*
- Nieland, T.J., Y. Feng, J.X. Brown, T.D. Chuang, P.D. Buckett, J. Wang, X.S. Xie, T.E. McGraw, T. Kirchhausen, and M. Wessling-Resnick. 2004. Chemical genetic screening identifies sulfonamides that raise organellar pH and interfere with membrane traffic. *Traffic.* 5:478-492.
- Nogales, E. 2000. Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem.* 69:277-302.
- Numata, M., and J. Orłowski. 2001. Molecular cloning and characterization of a novel (Na⁺,K⁺)/H⁺ exchanger localized to the trans-Golgi network. *J Biol Chem.* 276:17387-17394.

- Numata, M., K. Petrecca, N. Lake, and J. Orłowski. 1998. Identification of a mitochondrial Na⁺/H⁺ exchanger. *J Biol Chem.* 273:6951-6959.
- Oda, K., and Y. Ikehara. 1985. Weakly basic amines inhibit the proteolytic conversion of proalbumin to serum albumin in cultured rat hepatocytes. *European journal of biochemistry / FEBS.* 152:605-609.
- Oda, K., Y. Koriyama, E. Yamada, and Y. Ikehara. 1986. Effects of weakly basic amines on proteolytic processing and terminal glycosylation of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *Biochem J.* 240:739-745.
- Oh, J.S., J.E. Kucab, P.R. Bushel, K. Martin, L. Bennett, J. Collins, R.P. DiAugustine, J.C. Barrett, C.A. Afshari, and S.E. Dunn. 2002. Insulin-like growth factor-1 inscribes a gene expression profile for angiogenic factors and cancer progression in breast epithelial cells. *Neoplasia.* 4:204-217.
- Ohgaki, R., N. Fukura, M. Matsushita, K. Mitsui, and H. Kanazawa. 2008. Cell surface levels of organellar Na⁺/H⁺ exchanger isoform 6 are regulated by interaction with RACK1. *J Biol Chem.* 283:4417-4429.
- Ohgaki, R., M. Matsushita, H. Kanazawa, S. Ogihara, D. Hoekstra, and S.C. van Ijzendoorn. 2010. The Na⁺/H⁺ exchanger NHE6 in the endosomal recycling system is involved in the development of apical bile canalicular surface domains in HepG2 cells. *Mol Biol Cell.* 21:1293-1304.
- Ohgaki, R., I.S.C. van, M. Matsushita, D. Hoekstra, and H. Kanazawa. 2011. Organellar Na⁺/H⁺ exchangers: novel players in organelle pH regulation and their emerging functions. *Biochemistry.* 50:443-450.
- Ohkuma, S., and B. Poole. 1978. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75:3327-3331.
- Onodera, Y., S. Hashimoto, A. Hashimoto, M. Morishige, Y. Mazaki, A. Yamada, E. Ogawa, M. Adachi, T. Sakurai, T. Manabe, H. Wada, N. Matsuura, and H. Sabe. 2005. Expression of AMAP1, an ArfGAP, provides novel targets to inhibit breast cancer invasive activities. *EMBO J.* 24:963-973.
- Oser, M., and J. Condeelis. 2009. The cofilin activity cycle in lamellipodia and invadopodia. *J Cell Biochem.* 108:1252-1262.
- Oxmann, D., J. Held-Feindt, A.M. Stark, K. Hattermann, T. Yoneda, and R. Mentlein. 2008. Endoglin expression in metastatic breast cancer cells enhances their invasive phenotype. *Oncogene.* 27:3567-3575.
- Page, R.E., A.J. Klein-Szanto, S. Litwin, E. Nicolas, R. Al-Jumaily, P. Alexander, A.K. Godwin, E.A. Ross, R.J. Schilder, and D.E. Bassi. 2007. Increased expression of the pro-protein convertase furin predicts decreased survival in ovarian cancer. *Cellular oncology : the official journal of the International Society for Cellular Oncology.* 29:289-299.
- Papi, A., A.M. Ferreri, F. Guerra, and M. Orlandi. 2012. Anti-invasive effects and proapoptotic activity induction by the rexinoid IIF and valproic acid in combination on colon cancer cell lines. *Anticancer research.* 32:2855-2862.
- Parekh, A., N.S. Ruppender, K.M. Branch, M.K. Sewell-Loftin, J. Lin, P.D. Boyer, J.E. Candiello, W.D. Merryman, S.A. Guelcher, and A.M. Weaver. 2011. Sensing and modulation of invadopodia across a wide range of rigidities. *Biophysical journal.* 100:573-582.

- Parekh, A., and A.M. Weaver. 2009. Regulation of cancer invasiveness by the physical extracellular matrix environment. *Cell adhesion & migration*. 3:288-292.
- Park, M.K., S.H. Jo, H.J. Lee, J.H. Kang, Y.R. Kim, H.J. Kim, E.J. Lee, J.Y. Koh, K.O. Ahn, K.C. Jung, S.H. Oh, S.Y. Kim, and C.H. Lee. 2013. Novel suppressive effects of cardamonin on the activity and expression of transglutaminase-2 lead to blocking the migration and invasion of cancer cells. *Life sciences*. 92:154-160.
- Park, S.J., H.Y. Kim, H. Kim, S.M. Park, E.H. Joe, I. Jou, and Y.H. Choi. 2009. Oxidative stress induces lipid-raft-mediated activation of Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase 2 in astrocytes. *Free radical biology & medicine*. 46:1694-1702.
- Park, S.Y., J.A. Jun, K.J. Jeong, H.J. Heo, J.S. Sohn, H.Y. Lee, C.G. Park, and J. Kang. 2011. Histone deacetylases 1, 6 and 8 are critical for invasion in breast cancer. *Oncology reports*. 25:1677-1681.
- Paroutis, P., N. Touret, and S. Grinstein. 2004. The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. *Physiology (Bethesda)*. 19:207-215.
- Pastoriza-Munoz, E., R.M. Harrington, and M.L. Graber. 1987. Axial heterogeneity of intracellular pH in rat proximal convoluted tubule. *J Clin Invest*. 80:207-215.
- Pearson, D.J., W. Nirunskiri, A. Rehemtulla, S.P. Lewis, R.B. Presland, and B.A. Dale. 2001. Proprotein convertase expression and localization in epidermis: evidence for multiple roles and substrates. *Experimental dermatology*. 10:193-203.
- Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano. 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. 7:415-428.
- Perez de Heredia, F., I.S. Wood, and P. Trayhurn. 2010. Hypoxia stimulates lactate release and modulates monocarboxylate transporter (MCT1, MCT2, and MCT4) expression in human adipocytes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 459:509-518.
- Peyssonnaud, C., V. Nizet, and R.S. Johnson. 2008. Role of the hypoxia inducible factors HIF in iron metabolism. *Cell Cycle*. 7:28-32.
- Pignatelli, J., D.A. Tumbarello, R.P. Schmidt, and C.E. Turner. 2012. Hic-5 promotes invadopodia formation and invasion during TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*. 197:421-437.
- Pluemsampant, S., O.S. Safronova, K. Nakahama, and I. Morita. 2008. Protein kinase CK2 is a key activator of histone deacetylase in hypoxia-associated tumors. *Int J Cancer*. 122:333-341.
- Polyak, K., and R.A. Weinberg. 2009. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*. 9:265-273.
- Pouyssegur, J., F. Dayan, and N.M. Mazure. 2006. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*. 441:437-443.
- Powis, G., and L. Kirkpatrick. 2004. Hypoxia inducible factor-1alpha as a cancer drug target. *Mol Cancer Ther*. 3:647-654.
- Prior, M.J., M. Larance, R.T. Lawrence, J. Soul, S. Humphrey, J. Burchfield, C. Kistler, J.R. Davey, P.J. La-Borde, M. Buckley, H. Kanazawa, R.G. Parton, M. Guilhaus, and D.E. James. 2011. Quantitative proteomic analysis of the adipocyte plasma membrane. *Journal of proteome research*. 10:4970-4982.

- Qian, X., G. Ara, E. Mills, W.J. LaRochelle, H.S. Lichenstein, and M. Jeffers. 2008. Activity of the histone deacetylase inhibitor belinostat (PXD101) in preclinical models of prostate cancer. *Int J Cancer*. 122:1400-1410.
- Rankin, E.B., and A.J. Giaccia. 2008. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ*. 15:678-685.
- Ravid, D., D. Chuderland, L. Landsman, Y. Lavie, R. Reich, and M. Liscovitch. 2008. Filamin A is a novel caveolin-1-dependent target in IGF-I-stimulated cancer cell migration. *Exp Cell Res*. 314:2762-2773.
- Reichert, N., M.A. Choukrallah, and P. Matthias. 2012. Multiple roles of class I HDACs in proliferation, differentiation, and development. *Cell Mol Life Sci*. 69:2173-2187.
- Reiner, J.E., and P.K. Datta. 2011. TGF-beta-dependent and -independent roles of STRAP in cancer. *Front Biosci*. 16:105-115.
- Reshkin, S.J., A. Bellizzi, S. Caldeira, V. Albarani, I. Malanchi, M. Poignee, M. Alunni-Fabbroni, V. Casavola, and M. Tommasino. 2000. Na⁺/H⁺ exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J*. 14:2185-2197.
- Rey, M., M. Irondelle, F. Waharte, F. Lizarraga, and P. Chavrier. 2011. HDAC6 is required for invadopodia activity and invasion by breast tumor cells. *Eur J Cell Biol*. 90:128-135.
- Roberts, A.B., F. Tian, S.D. Byfield, C. Stuelten, A. Ooshima, S. Saika, and K.C. Flanders. 2006. Smad3 is key to TGF-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 17:19-27.
- Romero, M.F., A.P. Chen, M.D. Parker, and W.F. Boron. 2013. The SLC4 family of bicarbonate (HCO₃⁻) transporters. *Molecular aspects of medicine*. 34:159-182.
- Roskelley, C.D., and M.J. Bissell. 2002. The dominance of the microenvironment in breast and ovarian cancer. *Semin Cancer Biol*. 12:97-104.
- Roth, S.Y., J.M. Denu, and C.D. Allis. 2001. Histone acetyltransferases. *Annual review of biochemistry*. 70:81-120.
- Rothschild, B.L., A.H. Shim, A.G. Ammer, L.C. Kelley, K.B. Irby, J.A. Head, L. Chen, M. Varella-Garcia, P.G. Sacks, B. Frederick, D. Raben, and S.A. Weed. 2006. Cortactin overexpression regulates actin-related protein 2/3 complex activity, motility, and invasion in carcinomas with chromosome 11q13 amplification. *Cancer Res*. 66:8017-8025.
- Rottiers, P., F. Saltel, T. Daubon, B. Chaigne-Delalande, V. Tridon, C. Billottet, E. Reuzeau, and E. Genot. 2009. TGFbeta-induced endothelial podosomes mediate basement membrane collagen degradation in arterial vessels. *J Cell Sci*. 122:4311-4318.
- Rowe, R.G., and S.J. Weiss. 2008. Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends in cell biology*. 18:560-574.
- Roxrud, I., C. Raiborg, G.D. Gilfillan, P. Stromme, and H. Stenmark. 2009. Dual degradation mechanisms ensure disposal of NHE6 mutant protein associated with neurological disease. *Exp Cell Res*. 315:3014-3027.
- Russell, F.D., P. Kearns, I. Toth, and P. Molenaar. 2004. Urotensin-II-converting enzyme activity of furin and trypsin in human cells in vitro. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 310:209-214.

- Russo, D., C. Durante, S. Bulotta, C. Puppini, E. Puxeddu, S. Filetti, and G. Damante. 2013. Targeting histone deacetylase in thyroid cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*. 17:179-193.
- Sabeh, F., I. Ota, K. Holmbeck, H. Birkedal-Hansen, P. Soloway, M. Balbin, C. Lopez-Otin, S. Shapiro, M. Inada, S. Krane, E. Allen, D. Chung, and S.J. Weiss. 2004. Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J Cell Biol*. 167:769-781.
- Sabeh, F., R. Shimizu-Hirota, and S.J. Weiss. 2009. Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *J Cell Biol*. 185:11-19.
- Safina, A., E. Vandette, and A.V. Bakin. 2007. ALK5 promotes tumor angiogenesis by upregulating matrix metalloproteinase-9 in tumor cells. *Oncogene*. 26:2407-2422.
- Saito, A., G. Fujii, Y. Sato, M. Gotoh, M. Sakamoto, G. Toda, and S. Hirohashi. 2002. Detection of genes expressed in primary colon cancers by in situ hybridisation: overexpression of RACK 1. *Molecular pathology : MP*. 55:34-39.
- Saji, S., M. Kawakami, S. Hayashi, N. Yoshida, M. Hirose, S. Horiguchi, A. Itoh, N. Funata, S.L. Schreiber, M. Yoshida, and M. Toi. 2005. Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene*. 24:4531-4539.
- Sakuma, T., K. Uzawa, T. Onda, M. Shiiba, H. Yokoe, T. Shibahara, and H. Tanzawa. 2006. Aberrant expression of histone deacetylase 6 in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 29:117-124.
- Sasaki, H., S. Moriyama, Y. Nakashima, Y. Kobayashi, M. Kiriya, I. Fukai, Y. Yamakawa, and Y. Fujii. 2004. Histone deacetylase 1 mRNA expression in lung cancer. *Lung Cancer*. 46:171-178.
- Sato, Y., and D.B. Rifkin. 1989. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol*. 109:309-315.
- Scamuffa, N., F. Calvo, M. Chretien, N.G. Seidah, and A.M. Khatib. 2006. Proprotein convertases: lessons from knockouts. *FASEB J*. 20:1954-1963.
- Scamuffa, N., G. Siegfried, Y. Bontemps, L. Ma, A. Basak, G. Cherel, F. Calvo, N.G. Seidah, and A.M. Khatib. 2008. Selective inhibition of proprotein convertases represses the metastatic potential of human colorectal tumor cells. *J Clin Invest*. 118:352-363.
- Schafer, W., A. Stroh, S. Berghofer, J. Seiler, M. Vey, M.L. Kruse, H.F. Kern, H.D. Klenk, and W. Garten. 1995. Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. *EMBO J*. 14:2424-2435.
- Schalken, J.A., A.J. Roebroek, P.P. Oomen, S.S. Wagenaar, F.M. Debruyne, H.P. Bloemers, and W.J. Van de Ven. 1987. fur gene expression as a discriminating marker for small cell and nonsmall cell lung carcinomas. *J Clin Invest*. 80:1545-1549.
- Schmid, T., J. Zhou, and B. Brune. 2004. HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *J Cell Mol Med*. 8:423-431.
- Schoumacher, M., D. Louvard, and D. Vignjevic. 2011. Cytoskeleton networks in basement membrane transmigration. *Eur J Cell Biol*. 90:93-99.

- Seals, D.F., E.F. Azucena, Jr., I. Pass, L. Tesfay, R. Gordon, M. Woodrow, J.H. Resau, and S.A. Courtneidge. 2005. The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer Cell*. 7:155-165.
- Seidah, N.G. 2011. The proprotein convertases, 20 years later. *Methods Mol Biol*. 768:23-57.
- Seidah, N.G., R. Day, M. Marcinkiewicz, and M. Chretien. 1998. Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Ann NY Acad Sci*. 839:9-24.
- Seigneurin-Berny, D., A. Verdel, S. Curtet, C. Lemerrier, J. Garin, S. Rousseaux, and S. Khochbin. 2001. Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol*. 21:8035-8044.
- Seimiya, H., M. Tanji, T. Oh-hara, A. Tomida, I. Naasani, and T. Tsuruo. 1999. Hypoxia up-regulates telomerase activity via mitogen-activated protein kinase signaling in human solid tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 260:365-370.
- Semenza, G.L. 2001. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol*. 13:167-171.
- Semenza, G.L. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 3:721-732.
- Shan, B., T.P. Yao, H.T. Nguyen, Y. Zhuo, D.R. Levy, R.C. Klingsberg, H. Tao, M.L. Palmer, K.N. Holder, and J.A. Lasky. 2008. Requirement of HDAC6 for transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem*. 283:21065-21073.
- Sharma, V.M., R.S. Tomar, A.E. Dempsey, and J.C. Reese. 2007. Histone deacetylases RPD3 and HOS2 regulate the transcriptional activation of DNA damage-inducible genes. *Mol Cell Biol*. 27:3199-3210.
- Shen, H., and P.W. Laird. 2013. Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell*. 153:38-55.
- Shi, Y., and J. Massague. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 113:685-700.
- Slepkov, E.R., J.K. Rainey, B.D. Sykes, and L. Fliegel. 2007. Structural and functional analysis of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Biochem J*. 401:623-633.
- Song, J., J.H. Noh, J.H. Lee, J.W. Eun, Y.M. Ahn, S.Y. Kim, S.H. Lee, W.S. Park, N.J. Yoo, J.Y. Lee, and S.W. Nam. 2005. Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS*. 113:264-268.
- Spinardi, L., J. Rietdorf, L. Nitsch, M. Bono, C. Tacchetti, M. Way, and P.C. Marchisio. 2004. A dynamic podosome-like structure of epithelial cells. *Exp Cell Res*. 295:360-374.
- Sporn, M.B. 1996. The war on cancer. *Lancet*. 347:1377-1381.
- Stahlhut, M., and B. van Deurs. 2000. Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell*. 11:325-337.
- Stegeman, H., J.H. Kaanders, D.L. Wheeler, A.J. van der Kogel, M.M. Verheijen, S.J. Waaijjer, M. Iida, R. Grenman, P.N. Span, and J. Bussink. 2012. Activation of AKT by hypoxia: a potential target for hypoxic tumors of the head and neck. *BMC cancer*. 12:463.

- Stegmuller, J., M.A. Huynh, Z. Yuan, Y. Konishi, and A. Bonni. 2008. TGFbeta-Smad2 signaling regulates the Cdh1-APC/SnoN pathway of axonal morphogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 28:1961-1969.
- Steiner, D.F., D. Cunningham, L. Spigelman, and B. Aten. 1967. Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science*. 157:697-700.
- Sternlicht, M.D., and Z. Werb. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 17:463-516.
- Stiasny, K., and F.X. Heinz. 2006. Flavivirus membrane fusion. *J Gen Virol*. 87:2755-2766.
- Stossel, T.P., J. Condeelis, L. Cooley, J.H. Hartwig, A. Noegel, M. Schleicher, and S.S. Shapiro. 2001. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:138-145.
- Struhl, K. 1998. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev*. 12:599-606.
- Subarsky, P., and R.P. Hill. 2008. Graded hypoxia modulates the invasive potential of HT1080 fibrosarcoma and MDA MB231 carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis*. 25:253-264.
- Suzuki, J., Y.Y. Chen, G.K. Scott, S. Devries, K. Chin, C.C. Benz, F.M. Waldman, and E.S. Hwang. 2009. Protein acetylation and histone deacetylase expression associated with malignant breast cancer progression. *Clin Cancer Res*. 15:3163-3171.
- Suzuki, M.M., and A. Bird. 2008. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nature reviews. Genetics*. 9:465-476.
- Sverdllov, M., V. Shinin, A.T. Place, M. Castellon, and R.D. Minshall. 2009. Filamin A regulates caveolae internalization and trafficking in endothelial cells. *Mol Biol Cell*. 20:4531-4540.
- Sweeney, M.C., A.S. Wavreille, J. Park, J.P. Butchar, S. Tridandapani, and D. Pei. 2005. Decoding protein-protein interactions through combinatorial chemistry: sequence specificity of SHP-1, SHP-2, and SHIP SH2 domains. *Biochemistry*. 44:14932-14947.
- Taipale, J., K. Miyazono, C.H. Heldin, and J. Keski-Oja. 1994. Latent transforming growth factor-beta 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-beta binding protein. *J Cell Biol*. 124:171-181.
- Takahashi, S., K. Hatsuzawa, T. Watanabe, K. Murakami, and K. Nakayama. 1994. Sequence requirements for endoproteolytic processing of precursor proteins by furin: transfection and in vitro experiments. *J Biochem*. 116:47-52.
- Takahashi, S., T. Nakagawa, T. Banno, T. Watanabe, K. Murakami, and K. Nakayama. 1995. Localization of furin to the trans-Golgi network and recycling from the cell surface involves Ser and Tyr residues within the cytoplasmic domain. *J Biol Chem*. 270:28397-28401.
- Takino, T., R. Nagao, R. Manabe, T. Domoto, K. Sekiguchi, and H. Sato. 2011. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase regulates fibronectin assembly to promote cell motility. *FEBS Lett*. 585:3378-3384.
- Takkunen, M., M. Hukkanen, M. Liljestrom, R. Grenman, and I. Virtanen. 2010. Podosome-like structures of non-invasive carcinoma cells are replaced in epithelial-

- mesenchymal transition by actin comet-embedded invadopodia. *J Cell Mol Med.* 14:1569-1593.
- Talmadge, J.E., and I.J. Fidler. 2010. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* 70:5649-5669.
- Tarone, G., D. Cirillo, F.G. Giancotti, P.M. Comoglio, and P.C. Marchisio. 1985. Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp Cell Res.* 159:141-157.
- Taunton, J., C.A. Hassig, and S.L. Schreiber. 1996. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science.* 272:408-411.
- Tavares, A.L., M.E. Mercado-Pimentel, R.B. Runyan, and G.T. Kitten. 2006. TGF beta-mediated RhoA expression is necessary for epithelial-mesenchymal transition in the embryonic chick heart. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists.* 235:1589-1598.
- Taylor, N.A., W.J. Van De Ven, and J.W. Creemers. 2003. Curbing activation: proprotein convertases in homeostasis and pathology. *FASEB J.* 17:1215-1227.
- Ten Dijke, P., M.J. Goumans, F. Itoh, and S. Itoh. 2002. Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol.* 191:1-16.
- Teuchert, M., S. Berghofer, H.D. Klenk, and W. Garten. 1999a. Recycling of furin from the plasma membrane. Functional importance of the cytoplasmic tail sorting signals and interaction with the AP-2 adaptor medium chain subunit. *J Biol Chem.* 274:36781-36789.
- Teuchert, M., W. Schafer, S. Berghofer, B. Hoflack, H.D. Klenk, and W. Garten. 1999b. Sorting of furin at the trans-Golgi network. Interaction of the cytoplasmic tail sorting signals with AP-1 Golgi-specific assembly proteins. *J Biol Chem.* 274:8199-8207.
- Thacker, C., and A.M. Rose. 2000. A look at the *Caenorhabditis elegans* Kex2/Subtilisin-like proprotein convertase family. *Bioessays.* 22:545-553.
- Thomas, G. 2002. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:753-766.
- Tran, A.D., T.P. Marmo, A.A. Salam, S. Che, E. Finkelstein, R. Kabarriti, H.S. Xenias, R. Mazitschek, C. Hubbert, Y. Kawaguchi, M.P. Sheetz, T.P. Yao, and J.C. Bulinski. 2007. HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. *J Cell Sci.* 120:1469-1479.
- Trapp, J., and M. Jung. 2006. The role of NAD⁺ dependent histone deacetylases (sirtuins) in ageing. *Current drug targets.* 7:1553-1560.
- Tuxhorn, J.A., S.J. McAlhany, F. Yang, T.D. Dang, and D.R. Rowley. 2002. Inhibition of transforming growth factor-beta activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model. *Cancer Res.* 62:6021-6025.
- Ullah, M.S., A.J. Davies, and A.P. Halestrap. 2006. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 281:9030-9037.
- Vadlamudi, R.K., F. Li, L. Adam, D. Nguyen, Y. Ohta, T.P. Stossel, and R. Kumar. 2002. Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nature cell biology.* 4:681-690.
- Valenzuela-Fernandez, A., J.R. Cabrero, J.M. Serrador, and F. Sanchez-Madrid. 2008. HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions. *Trends Cell Biol.* 18:291-297.

- van de Ven, W.J., J. Voorberg, R. Fontijn, H. Pannekoek, A.M. van den Ouweland, H.L. van Duijnhoven, A.J. Roebroek, and R.J. Siezen. 1990. Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Mol Biol Rep.* 14:265-275.
- van der Flier, A., and A. Sonnenberg. 2001. Structural and functional aspects of filamins. *Biochimica et biophysica acta.* 1538:99-117.
- Van Elzen, R., B. Ghesquiere, E. Timmerman, S. Vandamme, L. Moens, K. Gevaert, and S. Dewilde. 2010. Integrated proteomic analysis reveals a substantial enrichment of protein trafficking processes in hippocampus tissue after hypoxic stress. *J Proteome Res.* 9:204-215.
- Van Lint, C., S. Emiliani, and E. Verdin. 1996. The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr.* 5:245-253.
- van Weert, A.W., K.W. Dunn, H.J. Geuze, F.R. Maxfield, and W. Stoorvogel. 1995. Transport from late endosomes to lysosomes, but not sorting of integral membrane proteins in endosomes, depends on the vacuolar proton pump. *J Cell Biol.* 130:821-834.
- van Weert, A.W., H.J. Geuze, and W. Stoorvogel. 1997. Heterogeneous behavior of cells with respect to induction of retrograde transport from the trans-Golgi network to the Golgi upon inhibition of the vacuolar proton pump. *Eur J Cell Biol.* 74:417-423.
- Varon, C., F. Tatin, V. Moreau, E. Van Obberghen-Schilling, S. Fernandez-Sauze, E. Reuzeau, I. Kramer, and E. Genot. 2006. Transforming growth factor beta induces rosettes of podosomes in primary aortic endothelial cells. *Mol Cell Biol.* 26:3582-3594.
- Verdin, E., F. Dequiedt, and H.G. Kasler. 2003. Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends in genetics : TIG.* 19:286-293.
- Vishnubhotla, R., S. Sun, J. Huq, M. Bulic, A. Ramesh, G. Guzman, M. Cho, and S.C. Glover. 2007. ROCK-II mediates colon cancer invasion via regulation of MMP-2 and MMP-13 at the site of invadopodia as revealed by multiphoton imaging. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* 87:1149-1158.
- Waibel, P. 1976. [The treatment of varicose veins (author's transl)]. *Schweizerische Rundschau fur Medizin Praxis = Revue suisse de medecine Praxis.* 65:393-394.
- Walker, R.A., and S.J. Dearing. 1992. Transforming growth factor beta 1 in ductal carcinoma in situ and invasive carcinomas of the breast. *Eur J Cancer.* 28:641-644.
- Wan, L., S.S. Molloy, L. Thomas, G. Liu, Y. Xiang, S.L. Rybak, and G. Thomas. 1998. PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Golgi network localization. *Cell.* 94:205-216.
- Wang, F., Y. Qi, X. Li, W. He, Q.X. Fan, and H. Zong. 2013. HDAC inhibitor trichostatin A suppresses esophageal squamous cell carcinoma metastasis through HADC2 reduced MMP-2/9. *Clinical and investigative medicine. Medecine clinique et experimentale.* 36:E87-94.
- Wang, G.L., B.H. Jiang, E.A. Rue, and G.L. Semenza. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:5510-5514.
- Wang, J., A. Lin, and L. Lu. 2010. Effect of EGF-induced HDAC6 activation on corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51:2943-2948.

- Wang, X., M.J. Wilson, J.W. Slaton, A.A. Sinha, S.L. Ewing, and D. Pei. 2009a. Increased aggressiveness of human prostate PC-3 tumor cells expressing cell surface localized membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *J Androl.* 30:259-274.
- Wang, Y., O. Roche, M.S. Yan, G. Finak, A.J. Evans, J.L. Metcalf, B.E. Hast, S.C. Hanna, B. Wondergem, K.A. Furge, M.S. Irwin, W.Y. Kim, B.T. Teh, S. Grinstein, M. Park, P.A. Marsden, and M. Ohh. 2009b. Regulation of endocytosis via the oxygen-sensing pathway. *Nature medicine.* 15:319-324.
- Watabe, M., and T. Nakaki. 2011. Protein kinase CK2 regulates the formation and clearance of aggresomes in response to stress. *J Cell Sci.* 124:1519-1532.
- Watanabe, K., T. Nagaoka, J.M. Lee, C. Bianco, M. Gonzales, N.P. Castro, M.C. Rangel, K. Sakamoto, Y. Sun, R. Callahan, and D.S. Salomon. 2009. Enhancement of Notch receptor maturation and signaling sensitivity by Cripto-1. *J Cell Biol.* 187:343-353.
- Weaver, A.M. 2006. Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. *Clin Exp Metastasis.* 23:97-105.
- Wengler, G. 1989. Cell-associated West Nile flavivirus is covered with E+pre-M protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release. *J Virol.* 63:2521-2526.
- White, D.P., P.T. Caswell, and J.C. Norman. 2007. alpha v beta3 and alpha5beta1 integrin recycling pathways dictate downstream Rho kinase signaling to regulate persistent cell migration. *J Cell Biol.* 177:515-525.
- White, J., A. Helenius, and M.J. Gething. 1982. Haemagglutinin of influenza virus expressed from a cloned gene promotes membrane fusion. *Nature.* 300:658-659.
- Whitten, S.T., E.B. Garcia-Moreno, and V.J. Hilser. 2005. Local conformational fluctuations can modulate the coupling between proton binding and global structural transitions in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:4282-4287.
- Wiercinska, E., H.P. Naber, E. Pardali, G. van der Pluijm, H. van Dam, and P. ten Dijke. 2011. The TGF-beta/Smad pathway induces breast cancer cell invasion through the up-regulation of matrix metalloproteinase 2 and 9 in a spheroid invasion model system. *Breast cancer research and treatment.* 128:657-666.
- Wike-Hooley, J.L., J. Van der Zee, G.C. van Rhoon, A.P. Van den Berg, and H.S. Reinhold. 1984. Human tumour pH changes following hyperthermia and radiation therapy. *European journal of cancer & clinical oncology.* 20:619-623.
- Wikstrom, P., P. Stattin, I. Franck-Lissbrant, J.E. Damber, and A. Bergh. 1998. Transforming growth factor beta1 is associated with angiogenesis, metastasis, and poor clinical outcome in prostate cancer. *Prostate.* 37:19-29.
- Williams, J.P., J.M. McDonald, M.A. McKenna, S.E. Jordan, W. Radding, and H.C. Blair. 1997. Differential effects of tamoxifen-like compounds on osteoclastic bone degradation, H(+)-ATPase activity, calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, and calmodulin binding. *J Cell Biochem.* 66:358-369.
- Williamson, D.M., J. Elferich, P. Ramakrishnan, G. Thomas, and U. Shinde. 2013. The mechanism by which a propeptide-encoded pH-sensor regulates spatiotemporal activation of furin. *J Biol Chem.*
- Woo, M.S., Y. Ohta, I. Rabinovitz, T.P. Stossel, and J. Blenis. 2004. Ribosomal S6 kinase (RSK) regulates phosphorylation of filamin A on an important regulatory site. *Mol Cell Biol.* 24:3025-3035.
- Wray, S. 1988. Smooth muscle intracellular pH: measurement, regulation, and function. *The American journal of physiology.* 254:C213-225.

- Wu, W., L.M. Graves, G.N. Gill, S.J. Parsons, and J.M. Samet. 2002. Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on tyrosine 845 is required for zinc-induced Ras activation. *J Biol Chem.* 277:24252-24257.
- Wykoff, C.C., N.J. Beasley, P.H. Watson, K.J. Turner, J. Pastorek, A. Sibtain, G.D. Wilson, H. Turley, K.L. Talks, P.H. Maxwell, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe, and A.L. Harris. 2000. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* 60:7075-7083.
- Xinhan, L., M. Matsushita, M. Numaza, A. Taguchi, K. Mitsui, and H. Kanazawa. 2011. Na⁺/H⁺ exchanger isoform 6 (NHE6/SLC9A6) is involved in clathrin-dependent endocytosis of transferrin. *Am J Physiol Cell Physiol.* 301:C1431-1444.
- Xu, M., L. Nie, S.H. Kim, and X.H. Sun. 2003. STAT5-induced Id-1 transcription involves recruitment of HDAC1 and deacetylation of C/EBPbeta. *EMBO J.* 22:893-904.
- Xu, X., S.G. Brodie, X. Yang, Y.H. Im, W.T. Parks, L. Chen, Y.X. Zhou, M. Weinstein, S.J. Kim, and C.X. Deng. 2000. Haploid loss of the tumor suppressor Smad4/Dpc4 initiates gastric polyposis and cancer in mice. *Oncogene.* 19:1868-1874.
- Yamaguchi, H., M. Lorenz, S. Kempiak, C. Sarmiento, S. Coniglio, M. Symons, J. Segall, R. Eddy, H. Miki, T. Takenawa, and J. Condeelis. 2005. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J Cell Biol.* 168:441-452.
- Yamaguchi, H., and T. Oikawa. 2010. Membrane lipids in invadopodia and podosomes: key structures for cancer invasion and metastasis. *Oncotarget.* 1:320-328.
- Yamaguchi, H., Y. Takeo, S. Yoshida, Z. Kouchi, Y. Nakamura, and K. Fukami. 2009. Lipid rafts and caveolin-1 are required for invadopodia formation and extracellular matrix degradation by human breast cancer cells. *Cancer Res.* 69:8594-8602.
- Yan, W., S. Liu, E. Xu, J. Zhang, Y. Zhang, X. Chen, and X. Chen. 2013. Histone deacetylase inhibitors suppress mutant p53 transcription via histone deacetylase 8. *Oncogene.* 32:599-609.
- Yang, J., S.A. Mani, J.L. Donaher, S. Ramaswamy, R.A. Itzykson, C. Come, P. Savagner, I. Gitelman, A. Richardson, and R.A. Weinberg. 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.* 117:927-939.
- Yang, L., Y. Pang, and H.L. Moses. 2010. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* 31:220-227.
- Yang, M.H., M.Z. Wu, S.H. Chiou, P.M. Chen, S.Y. Chang, C.J. Liu, S.C. Teng, and K.J. Wu. 2008a. Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol.* 10:295-305.
- Yang, Y., R. Rao, J. Shen, Y. Tang, W. Fiskus, J. Nechtman, P. Atadja, and K. Bhalla. 2008b. Role of acetylation and extracellular location of heat shock protein 90alpha in tumor cell invasion. *Cancer Res.* 68:4833-4842.
- Yoon, S.O., S. Shin, and A.M. Mercurio. 2005. Hypoxia stimulates carcinoma invasion by stabilizing microtubules and promoting the Rab11 trafficking of the alpha6beta4 integrin. *Cancer Res.* 65:2761-2769.
- You, J.S., and P.A. Jones. 2012. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell.* 22:9-20.
- Yu, Q., and I. Stamenkovic. 2000. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14:163-176.

- Yuan, Z.L., Y.J. Guan, D. Chatterjee, and Y.E. Chin. 2005. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science*. 307:269-273.
- Zambonin-Zallone, A., A. Teti, A. Carano, and P.C. Marchisio. 1988. The distribution of podosomes in osteoclasts cultured on bone laminae: effect of retinol. *J Bone Miner Res*. 3:517-523.
- Zeng, M., H. Kikuchi, M.S. Pino, and D.C. Chung. 2010. Hypoxia activates the K-ras proto-oncogene to stimulate angiogenesis and inhibit apoptosis in colon cancer cells. *PLoS one*. 5:e10966.
- Zentner, G.E., and S. Henikoff. 2013. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nature structural & molecular biology*. 20:259-266.
- Zeuzem, S., P. Zimmermann, and I. Schulz. 1992. Association of a 19- and a 21-kDa GTP-binding protein to pancreatic microsomal vesicles is regulated by the intravesicular pH established by a vacuolar-type H(+)-ATPase. *The Journal of membrane biology*. 125:231-241.
- Zhang, H., A.M. Pelzer, D.T. Kiang, and D. Yee. 2007a. Down-regulation of type I insulin-like growth factor receptor increases sensitivity of breast cancer cells to insulin. *Cancer Res*. 67:391-397.
- Zhang, J., Y. Feng, and M. Forgacs. 1994. Proton conduction and bafilomycin binding by the V0 domain of the coated vesicle V-ATPase. *J Biol Chem*. 269:23518-23523.
- Zhang, L., and R.P. Hill. 2004. Hypoxia enhances metastatic efficiency by up-regulating Mdm2 in KHT cells and increasing resistance to apoptosis. *Cancer Res*. 64:4180-4189.
- Zhang, L., and R.P. Hill. 2007. Hypoxia enhances metastatic efficiency in HT1080 fibrosarcoma cells by increasing cell survival in lungs, not cell adhesion and invasion. *Cancer Res*. 67:7789-7797.
- Zhang, X., Z. Yuan, Y. Zhang, S. Yong, A. Salas-Burgos, J. Koomen, N. Olashaw, J.T. Parsons, X.J. Yang, S.R. Dent, T.P. Yao, W.S. Lane, and E. Seto. 2007b. HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol Cell*. 27:197-213.
- Zhang, Y., and R. Derynck. 1999. Regulation of Smad signalling by protein associations and signalling crosstalk. *Trends Cell Biol*. 9:274-279.
- Zhang, Y., H. Shen, M. Zhang, and G. Li. 2013. Exploring the proton conductance and drug resistance of BM2 channel through molecular dynamics simulations and free energy calculations at different pH conditions. *The journal of physical chemistry. B*. 117:982-988.
- Zhang, Y.E. 2009. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell research*. 19:128-139.
- Zhang, Z., H. Yamashita, T. Toyama, H. Sugiura, Y. Omoto, Y. Ando, K. Mita, M. Hamaguchi, S. Hayashi, and H. Iwase. 2004. HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 10:6962-6968.
- Zhu, P., E. Martin, J. Mengwasser, P. Schlag, K.P. Janssen, and M. Gottlicher. 2004. Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell*. 5:455-463.
- Zilberman, Y., C. Ballestrem, L. Carramusa, R. Mazitschek, S. Khochbin, and A. Bershadsky. 2009. Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6. *J Cell Sci*. 122:3531-3541.
- Zimmerberg, J., S.S. Vogel, and L.V. Chernomordik. 1993. Mechanisms of membrane fusion. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 22:433-466.

Zundel, W., C. Schindler, D. Haas-Kogan, A. Koong, F. Kaper, E. Chen, A.R. Gottschalk, H.E. Ryan, R.S. Johnson, A.B. Jefferson, D. Stokoe, and A.J. Giaccia. 2000. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev.* 14:391-396.

ANNEXE (liste des publications et présentations)

Publications

Dominique Arsenault and Claire M. Dubois. HDAC6 deacetylase activity is required for hypoxia-induced invadopodia formation and cell invasion. (Plos One 2012, submitted)

Lucien F, **Arsenault D** and Claire M. Dubois. Regulation of tumor cell invadopodia by hypoxia induced NHE-1 activation. **PLoS One**. 2011;6(12):e28851. Epub 2011 Dec 27

Dominique Arsenault, Lucien F and Claire M. Dubois. Hypoxia enhances cancer cell invasion through the relocalization of the convertase furin into a peripheral recycling loop involving filamin A tethering and Rab4-mediated trafficking. **J Cell Physiol**. 2012 Jan;227(2):789-800. doi: 10.1002/jcp.22792

Harper K, **Arsenault D**, Boulay-Jean S, Lauzier A, Lucien F, Dubois CM. Autotaxin promotes cancer invasion via the lysophosphatidic acid receptor 4: participation of the cyclic AMP/EPAC/Rac1 signaling pathway in invadopodia formation. **Cancer Res**. 2010 Jun 1;70(11):4634-43. Epub 2010 May 1

Présentations

Arsenault Dominique, Kelly Harper and Claire M. Dubois. Impact of hypoxia on furin trafficking and the formation of invadopodia. **21st Meeting of the European Association for Cancer Research (EACR)** June 26-29th 2010, Oslo, Norway.

K. Harper, **D. Arsenault**, S. Boulay Jean, A. Lauzier, F. Lucien and Claire M. Dubois. LPA receptor 4 mediates autotaxin-induced invadopodia production and invasion. **21st Meeting of the European Association for Cancer Research (EACR)** June 26-29th 2010, Oslo, Norway.

Arsenault Dominique, GrandMont D, Charbonneau M, Harper K and Claire M. Dubois. Impact of hypoxia on furin trafficking and the formation of invadopodia. **Fifth International Conference on Tumor Microenvironment: Progression, Therapy & Prevention**. October 20-24th 2009, Versailles, France.

Lucien F, **Arsenault D** and Claire M. Dubois. Regulation of invadopodia formation by hypoxia induced NHE-1 activity. **Fifth International Conference on Tumor Microenvironment: Progression, Therapy & Prevention**. October 20-24th 2009, Versailles, France.

Arsenault Dominique, GrandMont Sébastien and Dubois Claire M. Impact of hypoxia on proprotein convertase trafficking. The New-York Academy of Sciences, **Hypoxia and Consequences: From Molecule to Malady**. March 12-14 2009. New-York, NY, USA.

Arsenault D., Grandmont S and Claire M. Dubois*. Impact of hypoxia on furin trafficking

and tumorigenesis. **Gordon Research Conference GRC, Proprotein processing and secretion.** July 11-18th 2008, New-London, New-Hampshire.

Arsenault Dominique, Grandmont S. and Claire M. Dubois. Impact of hypoxia on furin trafficking. **International Conference on Tumor Hypoxia and Malignant Progression.** Kiev, Ukraine, October 1-4th, 2008

Arsenault D., Grandmont S. et Claire M. Dubois. Influence de l'hypoxie sur le routage de la furine et son impact sur la tumorigénèse et l'invasion tumorale. **XIII^e Colloque Annuel d'Immuno-Inflammation (GRIBUS).** Sherbrooke, Qc, Canada, 22 Juin 2007.

Impact du trafficking de la furine sur la formation de nouvelles structures invasives : les invadopodes. **Les Conférences de la Relève Gilles Dupuis.** 12 Décembre 2007. Université de Sherbrooke, Canada