



**HAL**  
open science

# Etude des voies de signalisation associées aux effets du peptide vasoactif urotensine II sur la migration et l'adhésion des cellules tumorales gliales

Céline Lecointre

## ► To cite this version:

Céline Lecointre. Etude des voies de signalisation associées aux effets du peptide vasoactif urotensine II sur la migration et l'adhésion des cellules tumorales gliales. Sciences du Vivant [q-bio]. université de Rouen, 2013. Français. NNT: . tel-02415633

**HAL Id: tel-02415633**

**<https://normandie-univ.hal.science/tel-02415633>**

Submitted on 17 Dec 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Thèse

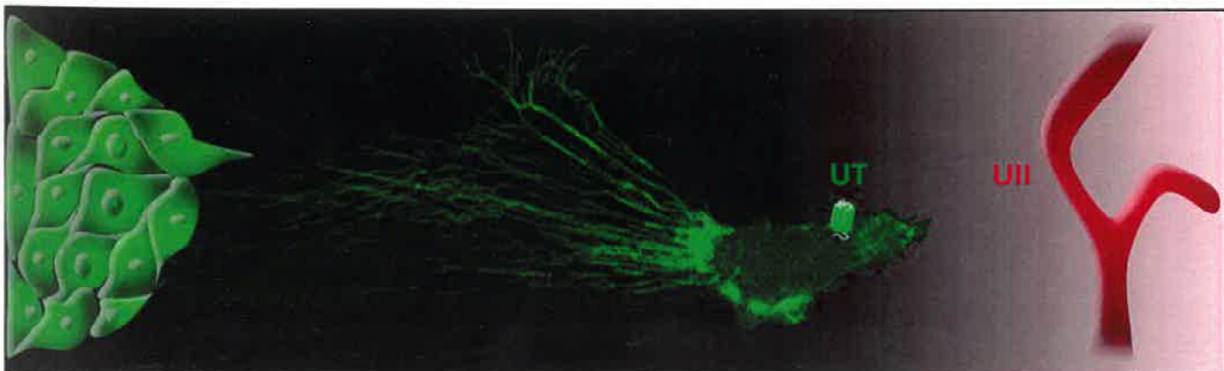
*Présentée à l'Université de Rouen*  
*En vue de l'Obtention du Doctorat en Sciences*  
*Discipline: Biologie Cellulaire*  
*Spécialité: Neurosciences*

## Etude des voies de signalisation associées aux effets du peptide vasoactif urotensine II sur la migration et l'adhésion des cellules tumorales gliales

*Par*  
**Céline Lecointre**

Soutenue le 12 Juillet 2013 devant le jury composé de:

<b>Mr S. Gasman</b>	Directeur de Recherche Inserm, Strasbourg	Rapporteur
<b>Mr L. Prézeau</b>	Directeur de Recherche CNRS, Montpellier	Rapporteur
<b>Mr B. Gonzalez</b>	Directeur de Recherche Inserm, Rouen	Examineur
<b>Mme A. Sharif</b>	Maître de Conférences, Université de Lille	Examineur
<b>Mr F. Morin</b>	Maître de Conférences, Université de Rouen	Examineur
<b>Mme H. Castel</b>	Chargée de Recherche Inserm, Rouen	Directeur



---

## Sommaire

<b>Curriculum vitae</b> .....	7
<b>Liste des figures</b> .....	11
<b>Liste des tableaux</b> .....	13
<b>Liste des abréviations</b> .....	15
<b>Résumé</b> .....	21
<b>Summary</b> .....	25
<b>Introduction</b> .....	29
<b>Chapitre I: la migration cellulaire</b> .....	32
1. Aspects cellulaires et moléculaires des étapes de la migration .....	32
1.1. Polarisation .....	32
1.1.1. La migration directionnelle .....	33
1.1.2. Complexes moléculaires impliqués dans la migration directionnelle .....	34
1.1.3. Répartition subcellulaire et gradients moléculaires: « la boussole cellulaire » .....	38
1.2. Protrusions membranaires .....	38
1.2.1. Les lamellipodes .....	38
1.2.2. Les filopodes .....	40
1.2.3. Les podosomes et les invadopodes .....	41
1.2.4. Les <i>blebs</i> .....	43
1.3. Adhésion .....	45
1.3.1. Constituants de la matrice extracellulaire .....	45
1.3.2. Les différents types d'adhésion .....	46
1.3.3. Formation et maturation des adhésions .....	48
1.4. Contraction-traction-retraction .....	53
1.4.1. Mécanismes cellulaires .....	53
1.4.2. Rôle du désassemblage des adhésions .....	54
2. Les récepteurs régulant la migration cellulaire .....	56
2.1. Les récepteurs tyrosines kinases (RTKs) .....	56
2.2. Les récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G .....	59
2.2.1. Classification des RCPGs .....	59
2.2.2. Principaux ligands de RCPGs impliqués dans la migration cellulaire .....	61
2.2.3. Les voies de signalisation impliquées dans la migration .....	64
3. Migration en conditions physiopathologiques: les tumeurs cérébrales gliales .....	74
3.1. Généralité sur les gliomes .....	74

---

3.1.1. Classification des gliomes .....	74
3.1.2. Epidémiologie .....	76
3.1.3. Principales mutations somatiques .....	77
3.1.4. Traitements des gliomes .....	78
3.2. Néoangiogenèse tumorale.....	79
3.3. Recrutement du système immunitaire .....	85
3.4. Invasion tumorale .....	87
3.4.1. Etapes de l'invasion tumorale.....	87
3.4.2. Sources de l'attraction tumorale .....	91
3.5. Stratégies thérapeutiques ciblant la migration cellulaire.....	94
<b>Chapitre II: le système urotensinergique.....</b>	<b>96</b>
1. L'urotensine II et l' <i>urotensin II-related peptide</i> .....	96
1.1. Découverte et structure des peptides .....	96
1.2. Les gènes codant l'UUI et l'URP.....	98
1.3. Localisation de l'UUI et de l'URP.....	100
1.3.1. Localisation périphérique .....	100
1.3.2. Localisation centrale .....	103
2. Le récepteur de l'urotensine II .....	104
2.1. Découverte et structure .....	104
2.2. Localisation de l'UT.....	108
2.2.1. Localisation périphérique .....	108
2.2.2. Localisation centrale .....	110
2.3. Pharmacologie .....	110
2.4. Désensibilisation de l'UT .....	116
3. Activités cellulaires du système urotensinergique .....	117
3.1. Effets vasoactifs.....	117
3.2. Effets sur la prolifération, la survie et l'hypertrophie .....	119
3.3. Effets sur la migration cellulaire .....	121
3.4. Effets sur la néoangiogenèse .....	123
4. Activités physiologiques et physiopathologiques du système urotensinergique .....	124
4.1. Sur le système cardiovasculaire.....	124
4.2. Sur le système rénal .....	126
4.3. Sur le système endocrinien .....	127

4.4. Sur le système immunitaire .....	128
4.5. Sur le comportement animal.....	128
4.6. Dans le développement tumoral .....	129
<b>Objectifs .....</b>	<b>131</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>137</b>
<b>Partie 1. Signaling switch of the vasoactive peptide urotensin II receptor:</b>	
<b>Chemotaxic control of glioma migration .....</b>	<b>139</b>
<b>Partie 2. Recherche des partenaires protéiques de l'UT: Étude de l'interaction</b>	
<b>fonctionnelle entre l'UT et la filamine A .....</b>	<b>205</b>
1. Introduction .....	206
1.1. Transactivation UT-EGFR et prolifération, survie et/ou hypertrophie .....	206
1.2. Implication du domaine C-terminal cytosolique de l'UT dans la signalisation .....	207
2. Matériel et méthodes .....	208
2.1. Produits chimiques .....	208
2.2. Constructions plasmidiques.....	209
2.3. Le double-hybride.....	211
2.4. Transfection.....	213
2.5. GST-pull down .....	213
2.6. <i>Bioluminescence resonance energy transfer</i> (BRET) .....	215
2.7. Culture cellulaire .....	216
2.8. Culture d'explants tumoraux .....	217
2.9. Co-immunoprécipitation.....	217
2.10. Migration .....	218
2.11. Western blot.....	218
2.12. Immunocytochimie .....	219
2.13. Cytométrie en flux .....	220
3. Résultats .....	221
3.1. Identification par double-hybride des protéines interagissant avec l'UT.....	221
3.2. Caractérisation du (ou des) domaine(s) d'interaction de l'UT <sub>Cterm</sub> à la filamine A .....	224
3.3. Résultats préliminaires de validation de l'interaction entre UT <sub>Cterm</sub>	

et filamine A .....	226
3.3.1. GST-pull down .....	226
3.3.2. Interaction UT-filamine A .....	228
3.3.2.1. Interaction UT-UT dépendante de la filamine A ? .....	228
3.3.2.2. Difficultés de la mise en évidence <i>in situ</i> d'une interaction UT-filamine A.....	229
3.4. Rôle potentiel de la filamine A dans les effets de l'UII .....	232
3.4.1. Rôle de la filamine A dans la localisation subcellulaire de l'UT .....	232
3.4.2. Rôle de la filamine A dans l'internalisation de l'UT .....	233
3.4.3. Rôle de la filamine A dans la migration cellulaire .....	235
3.5. Expression de la filamine A dans les gliomes .....	237
3.6. Effet de l'UII sur la filamine A exprimée dans les gliomes .....	239
4. Discussion-conclusion.....	240
4.1. Rôle des protéines partenaires cytosoliques .....	240
4.2. Rôle des protéines partenaires nucléaires ou périnucléaires .....	241
4.3. Caractérisation de l'interaction fonctionnelle entre UT et filamine A .....	242
 <b>Partie 3. Etude des niveaux de protéines phosphorylées en réponse à l'activation de l'UT par une concentration homogène d'UII dans une lignée de glioblastome</b> .....	247
1. Introduction .....	248
2. Matériel et méthodes .....	249
2.1. Culture cellulaire, traitement et préparation des extraits peptidiques .....	249
2.2. Enrichissement en phosphopeptides .....	250
2.3. Analyse par spectrométrie de masse.....	251
2.4. Interprétation des données de spectrométrie de masse .....	251
3. Résultats .....	252
3.1. Analyse globale des phosphopeptides .....	252
3.2. Analyse quantitative des phosphopeptides .....	253
3.2.1. Effets de l'UII sur la phosphorylation de peptides .....	254
3.2.2. Effets de l'UII sur la déphosphorylation de peptide .....	258
4. Conclusion.....	264
 <b>Discussion-conclusion</b> .....	267

<b>Perspectives</b> .....	283
1. Caractérisation du système urotensinergique dans le système nerveux central sain et pathologique tumoral.....	286
2. Conformation du récepteur UT, localisation subcellulaire et chimiotactisme.....	287
3. Rôle de certains partenaires/protéines cibles de l'UT.....	289
4. Rôle physiopathologique du système urotensinergique dans le développement des gliomes de haut grade.....	291
<b>Références bibliographiques</b> .....	293
<b>Travaux annexes</b> .....	349

---



## Curriculum vitae

### Parcours universitaire

- 2003: Baccalauréat Scientifique (Verneuil-sur-Avre, 27), *Mention Bien*.
- 2006: Licence Biologie Cellulaire et Physiologie (BCP, Université de Rouen), *Mention Assez-Bien*.
- 2008: Master spécialité Biologie Cellulaire, parcours Neurosciences (Université de Rouen), *Mention Très Bien*.
- 2008: Stage doctoral de Biologie Cellulaire Option Neurosciences (Université de Rouen)  
Titre: Etude des voies de signalisation associées aux effets du peptide vasoactif urotensine II sur la migration et l'adhésion des cellules tumorales gliales.  
Directeur de Thèse: Docteur Hélène Castel. Bourse doctorale du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR).
- 2012: Attachée temporaire de Recherche et de l'Enseignement Supérieur

### Stages

- 2006: Stage volontaire en L3 BCP (1 mois) effectué au sein de l'Unité Inserm 413 (Rouen) sous la direction du Dr H. Castel: clonage du récepteur humain de l'urotensine II.
- 2007: Stage de M1 (4 mois) effectué au sein de l'U413 (Rouen), sous la direction du Dr H. Castel: recherche des partenaires protéiques du fragment C-terminal du récepteur de l'urotensine II (UII) par la technique du double-hybride.
- 2007: Stage Hygiène et Sécurité (Université de Rouen).
- 2008: Stage de M2 (4 mois) effectué au sein de l'EA4310-U413 (Rouen) sous la direction du Dr H. Castel: recherche des partenaires protéiques du récepteur de l'UII impliqués dans le développement des tumeurs cérébrales gliales.
- 2008: Stage (2 mois) réalisé au sein de l'Institut de Génomique Fonctionnel (IGF, Montpellier) dans le cadre d'une collaboration entre les Drs H. Castel (U413) et L. Prézeau (IGF): analyse des différences de couplage entre l'UII et l'URP par la technique de BRET.
- 2009: Stage (1 mois) réalisé au sein de l'IGF (Montpellier) dans le cadre d'une collaboration entre les Drs H. Castel (U413) et L. Prézeau (IGF): recherche d'une interaction physique entre le récepteur de l'urotensine II et le récepteur GABA<sub>A</sub> par les techniques de BRET et de FRET-HTRF.

### Formations

- 2009: Cours d'anglais, Ecole Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement (EdNBISE, Rouen).
- 2009: Cours d'aisance verbale, EdNBISE (Rouen).
- 2009: Microdissection laser couplée à l'analyse transcriptomique (2 jours, Rouen).
- 2010: Expérimentation animale – Niveau 1 (2 semaines, Rouen).
- 2010: Communication scientifique et professionnelle en anglais (4 jours, Rouen).
- 2010: Formation ImageJ (2 jours, Rouen).

### Compétences techniques

**Techniques de laboratoire:** biologie moléculaire (PCR, clonage, étiquetage, mutagenèse, séquençage, double-hybride), biologie cellulaire (culture cellulaire, transfection, test de prolifération, test de migration, test d'adhésion, test de motilité), biochimie (Western Blot, GST-pull down), imagerie cellulaire (time laps vidéomicroscopie, fluorescence sur cellule vivante, immunocytochimie), calcimétrie, BRET, FRET, expérimentation animale (manipulation de souris, pesée, injection intra-péritonéale et intra-tumorale).

**Matériel de laboratoire maîtrisé:** thermocycleur, séquenceur capillaire, électrophorèse, Nanodrop, microscopie (microscope classique, macroscopie, microscopes confocaux droit et inversé, vidéomicroscope), compteur cellulaire, lecteurs de plaque (luminomètre, FL600, Flexstation III, Victor V, Mithras)

**Analyses et interprétation de données:** logiciel d'analyse statistique (GraphPad Prism 5), logiciel d'analyse d'image (ImageJ, Métamorph), outils bureautiques (excel, word, powerpoint, endnote, Zotero) recherches bibliographiques (Internet, pubmed, sciencedirect).

### Activité d'enseignement

- 2006-2007: Animatrice de TP en L2 SVTE (Rouen, 17,3 h eq. TD): étude des grandes fonctions (systèmes cardiovasculaire et ventilatoire).
- 2008-2009: Vacataire dispensant des TD de génie génétique en L2 SVTE (6 h eq. TD) et TD de biologie moléculaire en L3BCP (6 h eq. TD).
- 2009-2010: Vacataire dispensant des TD de biostatistiques en L3BCP (3 h eq. TD) et en L3BBM (4 h eq. TD).
- 2011-2012: Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche dispensant entre autre des TP d'histologie en L1 (28 h eq. TD), des TP de physiologie animale en L2 (20 h eq. TD), des TD de physiologie animale en L2 (12 h eq. TD), des TD de biostatistiques en L2 et en L3 (18 h eq. TD), des TD et TP de sciences du cerveau en L3 (4 h eq. TD).

### Activité d'encadrement

- 2009: M<sup>r</sup> Vadim Le Joncour (4 mois), étudiant stagiaire du M1 Recherche parcours Neurosciences Moléculaire, Cellulaire et Comportementale (Université de Rouen). J'ai formé M<sup>r</sup> Le Joncour aux techniques de cultures cellulaires, de Western blot, d'immunocytochimie et de tests de migration.
- 2011: M<sup>elle</sup> Elodie Le Monnier (4 mois), étudiante stagiaire du M2 Professionnel de Protéomique (Université de Lille). J'ai formé M<sup>elle</sup> Le Monnier aux techniques de cultures cellulaires, de Western blot et de BRET.
- 2011: M<sup>elle</sup> Jane-Eileen Joubert (4 mois), étudiante du M1 Recherche parcours Neurosciences Moléculaire, Cellulaire et Comportementale (Université de Rouen). J'ai formé M<sup>elle</sup> Joubert aux techniques de biologie moléculaire, de culture cellulaire, de transfection, et de migration.

### Publications

#### Publications dans des périodiques internationaux à comité de lecture

- Articles dans des périodiques à comité de lecture
1. Jarry, M., Diallo, M., **Lecointre, C.**, Desrues, L., Tokay, T., Chatenet, D., Leprince, J., Rossi, O., Vaudry, H., Tonon, M.-C., Prézeau, L., Castel, H., and Gandolfo, P. (2010) The vasoactive peptides urotensin II and urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation. *Biochem. J.*, **428**, 113–124.
  2. Desrues, L., Lefebvre, T., **Lecointre, C.**, Schouft, M.-T., Leprince, J., Compère, V., Morin, F., Proust, F., Gandolfo, P., Tonon, M.-C., and Castel, H. (2012) Down-regulation of GABA(A) receptor via promiscuity with the vasoactive peptide urotensin II receptor. Potential involvement in astrocyte plasticity. *Plos One*, **7**, e36319.
  3. Dubois, M., Lapinte, N., Villier, V., **Lecointre, C.**, Roy, V., Tonon, M.-C., Gandolfo, P., Joly, F., Hilber, P., and Castel, H. (2013) Neuroprotective role of glucose on chemotherapy-induced altered executive functions and neurogenesis in mice. *Neuropharmacology*. *In press*

4. Chevalier, A., Dubois, M., Le Joncour, V., Dautrey, S., **Lecointre, C.**, Romieu, A., Renard, P-Y., Castel, H., Sabot, C. (2013) Synthesis, Biological Evaluation and in vivo Imaging of the first Camptothecin-Fluorescein Conjugate. *Bioconjugate Chemistry*. *In press*
5. Jarry, M., **Lecointre, C.**, Malleval, C., Desrues, L., Schouft, M-T., Le Joncour, V., Liger F., Lyvinec, G., Joseph, B., Meijer, L., Honnorat, J., Gandolfo, P., and Castel, H. (2013) Impact of meriolins, a new class of cyclin-dependent kinase inhibitors, on malignant glioma proliferation and angiogenesis. *Cancer Research*. *Soumis*

■ Articles en préparation pour soumission dans des périodiques à comité de lecture

1. **Lecointre, C.**, Desrues, L., Joubert, J-E., Le Joncour, V., Brulé, C., Perzo, N., Leduc, R., Laquerrière, A., Proust, F., Gandolfo, P., Morin, F. and Castel, H. Signaling switch of the vasoactive peptide urotensin II receptor: Chemotaxic control of glioma migration.
2. **Lecointre, C.**, Morin, F., Desrues, L., Le Joncour, V., Schouft, M-T, Gandolfo, P and Castel, H. Filamin A plays a key role in the urotensin II-induced glioma invasion.

### Communications orales

1. **Lecointre C.**, Morin F., Jarry M., Le Joncour V., Desrues L., Schouft M.T., Lefebvre T., Langlois O., Proust F., Gandolfo P. and Castel H. Rôle de l'urotensine II et des partenaires protéiques de l'UT dans la migration des cellules tumorales gliales. 15<sup>ème</sup> journée de l'IFRMP23, Rouen, 5 Juin 2009. *Prix de la meilleure communication*.
2. **Lecointre C.**, Morin F., Jarry M., Le Joncour V., Desrues L., Schouft M.T., Lefebvre T., Hachem R., Tonon M.C., Langlois O., Proust F., Compère V., Gandolfo P. and Castel H. GPCR dimerization and chemoattraction in glioma. Workshop: Progress in cellular imaging for neurosciences research, Rouen, 8 Juillet 2010.
3. **Lecointre C.**, Morin F., Jarry M., Le Joncour V., Desrues L., Schouft M.T., Langlois O., Proust F., Compère V., Gandolfo P. and Castel H. Urotensin II regulates migration and cell-cell adhesion during glioma development. Colloque annuel de la Société Cerveau et Maladie Cérébrovasculaire, Caen, 20-21 Janvier 2011.
4. **Lecointre C.**, Morin F., Jarry M., Le Joncour V., Desrues L., Schouft M.T., Langlois O., Proust F., Compère V., Gandolfo P. and Castel H. Urotensin II induces chemotaxic migration or cell-cell adhesion during gliomagenesis. Journée de l'EdNBise, Le Havre, 9 Juin 2011.
5. **Lecointre C.**, Le Joncour V., Jarry M., Desrues L., Schouft M.-T., Morin F., Langlois O., Proust F., Compère V., Gandolfo P., Castel H.. The neuropeptide urotensin II as a new chemokine in glioma development activating biased migration/adhesion signaling pathways. 19th International Symposium on Regulatory Peptides, Copenhagen, Danemark, 20-23 Aout 2012.

### Actes de congrès

1. **Lecointre C.**, Morin F, Jarry M, Le Joncour V, Desrues L, Schouft MT, Lefebvre T, Vaudry H, Tonon MC, Langlois O, Proust F, Gandolfo P and Castel H (2009) Role of the urotensin II and UT partners in glioma cell migration. *Glia* **57**:168.
2. **Lecointre C.**, Le Joncour V, Jarry M, Schouft MT, Desrues L, Morin F, Langlois O, Proust F, Compère V, Gandolfo P and Castel H (2011) The vasoactive peptide urotensin II induces chemotaxic migration or cell-cell adhesion during gliomagenesis. *Glia* **59**:42-3.
3. **Lecointre C.**, Le Joncour V, Jarry M, Desrues L, Schouft MT, Morin F, Langlois O, Proust F, Compère V, Gandolfo P and Castel H (2012) The neuropeptide urotensin II as a new chemokine in glioma development activating biased migration/adhesion signaling pathways. *Regpep* **177**:25-6.

4. Le Joncour V, **Lecointre C**, Jarry M, Joubert JE, Schouft MT, Morin F, Castel H and Gandolfo P (2012) Urotensin II receptor endogenous ligands as new candidates involved in high grade glioma tumor growth and neo-angiogenesis. *Regpep* **177:26**.

**Communications affichées**

Je suis actuellement premier auteur de 19 communications affichées dont 6 dans des colloques internationaux.

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Représentation schématique des 5 étapes de la migration cellulaire .....	32
<b>Figure 2.</b> Illustration de la répartition des principaux acteurs moléculaires de la polarisation cellulaire.....	37
<b>Figure 3.</b> Représentation schématique de la formation des différents types de Protrusion.....	44
<b>Figure 4.</b> Représentation schématique des caractéristiques des différents types de structures adhésives .....	48
<b>Figure 5.</b> Représentation schématique de la formation et de la maturation des adhésions .....	52
<b>Figure 6.</b> Représentation schématique des principales voies de signalisation de la migration associées aux récepteurs tyrosine kinase .....	58
<b>Figure 7.</b> Modélisation moléculaire des TM2 des récepteurs en fonction de la position de la proline .....	61
<b>Figure 8.</b> Représentation schématique des principales voies de signalisation de la migration, associées aux protéines G hétérotrimériques .....	66
<b>Figure 9.</b> Représentation schématique des principales voies de signalisation secondaires intervenant dans la migration cellulaire .....	69
<b>Figure 10.</b> Représentation des principales anomalies histologiques et génétiques répertoriées dans la classification des astrocytomes .....	75
<b>Figure 11.</b> Représentation schématique des étapes de la néoangiogenèse tumorale.....	81
<b>Figure 12.</b> Rôle du système immunitaire dans le développement des gliomes.....	87
<b>Figure 13.</b> Représentation schématique des étapes de l'invasion tumorale .....	88
<b>Figure 14.</b> Modèle d'invasion des cellules tumorales gliales.....	90
<b>Figure 15.</b> Représentation schématique du mode d'action de différentes thérapies anti-invasives testées en phase clinique .....	95
<b>Figure 16.</b> Comparaison des séquences de l'UII et de l'URP chez différentes espèces de vertébrés en fonction de leur évolution .....	97
<b>Figure 17.</b> Comparaison des séquences peptidiques et des structures tridimensionnelles de l'UII et de l'URP .....	98
<b>Figure 18.</b> Schéma de l'évolution des gènes de la somatostatine, de l'UII et de l'URP....	99
<b>Figure 19.</b> Représentation schématique de la structure de l'UT humain .....	106
<b>Figure 20.</b> Alignements des séquences correspondant au fragment cytosolique C-terminal de l'UT et identification de motifs protéiques consensus .....	107
<b>Figure 21.</b> Représentation schématique des principales voies de signalisation associées au récepteur UT et impliquées dans les effets cellulaires de l'UII.....	122
<b>Figure 22.</b> Représentation schématique du principe du double-hybride appliqué à la recherche de partenaires protéiques de l'UT humain.....	211
<b>Figure 23.</b> Identification des clones positifs issus du criblage de la banque d'ADNc de cerveau humain adulte .....	212
<b>Figure 24.</b> Représentation schématique du principe du GST-pull down appliqué à la recherche de partenaires protéiques de l'UT humain.....	214
<b>Figure 25.</b> Représentation schématique du principe du BRET appliqué à la recherche de partenaires protéiques de l'UT humain .....	215

<b>Figure 26.</b> Structure et domaines d'interaction de la filamine A .....	224
<b>Figure 27.</b> Identification des séquences d'interaction de l'UT <sub>Cterm</sub> avec la filamine A .....	226
<b>Figure 28.</b> Expérience préliminaire de validation de l'interaction entre l'UT <sub>Cterm</sub> et la filamine A par GST-pull down.....	227
<b>Figure 29.</b> Rôle potentiel de la filamine A dans la dimérisation de l'UT .....	229
<b>Figure 30.</b> Tentative de confirmation de l'interaction entre l'UT et la filamine A par la technique de BRET.....	231
<b>Figure 31.</b> Rôle potentiel de la filamine A dans la localisation subcellulaire de l'UT .....	232
<b>Figure 32.</b> Rôle potentiel de la filamine A dans l'internalisation/trafic de l'UT .....	234
<b>Figure 33.</b> Rôle potentiel de la filamine A dans la migration cellulaire .....	235
<b>Figure 34.</b> Rôle potentiel de la filamine A dans la polymérisation de l'actine et la formation des protrusions.....	236
<b>Figure 35.</b> Expression de la filamine A dans les gliomes .....	238
<b>Figure 36.</b> Effets de l'UII sur la phosphorylation de la filamine A dans les gliomes .....	239
<b>Figure 37.</b> Rôles hypothétiques de la filamine A dans les effets induits par l'UII .....	245
<b>Figure 38.</b> Analyse globale des peptides et protéines identifiés par Mascot.....	253
<b>Figure 39.</b> Représentation de la fréquence de distribution des acides aminés dans les peptides phosphorylés après un traitement à l'UII.....	255
<b>Figure 40.</b> Représentation schématique des différentes voies de phosphorylation et déphosphorylation associées à l'activation de l'UT dans une lignée de glioblastome.....	265
<b>Figure 41.</b> Schéma final hypothétique du mode d'action du système urotensinergique dans le mécanisme de migration des cellules tumorales gliales.....	280

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Ligands de la MEC et récepteurs respectifs .....	49
<b>Tableau 2.</b> Facteurs pro- et anti-angiogéniques présents dans les gliomes et leur régulation.....	84
<b>Tableau 3.</b> Localisation périphérique de l'UII et de l'URP chez quatre mammifères .....	102
<b>Tableau 4.</b> Localisation centrale de l'UII et de l'URP chez quatre mammifères.....	104
<b>Tableau 5.</b> Pourcentages d'identité des séquences protéiques de l'UT entre les différentes espèces de mammifères .....	105
<b>Tableau 6.</b> Localisation périphérique de l'UT chez quatre espèces de mammifères .....	109
<b>Tableau 7.</b> Localisation centrale de l'UT chez quatre espèces de mammifères.....	111
<b>Tableau 8.</b> Principaux composés agonistes (Bleu) et antagonistes (Rouge) du récepteur UT.....	114
<b>Tableau 9.</b> Voies de transduction associées au récepteur UT impliquées dans les effets vasoactifs de l'UII .....	118
<b>Tableau 10.</b> Voies de transduction associées au récepteur UT impliquées dans les effets pro-mitogènes de l'UII.....	120
<b>Tableau 11.</b> Voies de transduction associées au récepteur UT impliquées dans la migration cellulaire .....	121
<b>Tableau 12.</b> Voies de transduction associées au récepteur UT impliquées dans la Néoangiogenèse .....	123
<b>Tableau 13.</b> Localisation de l'UII et de l'UT dans différents types de tumeurs humaines	
<b>Tableau 14.</b> Amorces sens (s) et anti-sens (as) utilisées pour réaliser les différents construits .....	210
<b>Tableau 15.</b> Validation de la spécificité de l'interaction de l'UT <sub>Cterm</sub> aux différentes protéines identifiées par double-hybride.....	222
<b>Tableau 16.</b> Description des localisations et fonctions générales des protéines identifiées par double-hybride et interagissant avec l'UT <sub>Cterm</sub> .....	223
<b>Tableau 17.</b> Description des protéines dont la quantité de peptide est augmentée après un traitement à l'UII de 5 à 30 min .....	254
<b>Tableau 18.</b> Descriptif des protéines dont la quantité de peptides est diminuée après un traitement à l'UII.....	259





## Liste des abréviations

16KDa PRL:	<i>16KDa prolactin</i>
A2:	récepteur de l'adénosine de type 2
AA:	acide arachidonique
aa:	acide aminé
AC:	adénylate cyclase
ADAM:	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
ADM:	adrénomédulline
ADN:	acide désoxyribonucléique
ADNc:	acide désoxyribonucléique complémentaire
aFGF:	<i>acidic fibroblast growth factor</i>
AMPC:	<i>3'-5'-cyclic adenosine monophosphate</i>
Ang-2:	angiopoïétine 2
ANG-II:	angiotensine II
ANP:	<i>natriuretic peptide</i>
AP-2:	<i>adaptator protein-2</i>
aPKC:	<i>atypical protein kinase C</i>
ARN:	acide ribonucléique
ARNm:	acide ribonucléique messenger
Arp2/3:	<i>actine-related protein 2/3</i>
AT1R:	récepteur de l'angiotensine II de type 1
BAI-1:	<i>brain-specific angiogenesis inhibitor 1</i>
BDK:	bradykinine
bFGF:	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BHE:	barrière hémato-encéphalique
BMPR:	<i>bone morphogenetic protein receptor</i>
BRET:	<i>bioluminescence resonance energy transfer</i>
BSA:	<i>bovin serum albumin</i>
Ca <sup>2+</sup> :	calcium
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> :	concentration cytosolique de calcium
CALCRL:	<i>calcitonin receptor-like</i>
CamK:	calmoduline kinase
cAR1:	récepteur de l'AMPC de type 1
CBTRUS:	<i>Central Brain Tumor Registry of the United States</i>
Cdc42:	<i>cell division control protein 42</i>
CDK4/5:	<i>cyclin-dependent kinase 4/5</i>
CENP-V:	<i>centromere protein 5</i>
CGRP:	<i>calcitonin gene-related peptide</i>
CHD4:	<i>chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4</i>
CHO:	<i>chinese hamster ovary</i>
CIP4:	<i>Cdc42 interacting protein 4</i>
COX:	cyclooxygénase
CPAs:	cellules présentatrices d'antigène
CREB:	<i>cAMP response element-binding protein</i>

CRIB:	<i>Cdc42/Rac interactive binding</i>
CSF:	<i>colony stimulating factor</i>
CXCR4:	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
D2/3:	récepteurs dopaminergiques de type 2 et 3
DA:	domaine d'activation
DAG:	diacylglycérol
DAPI:	4',6'-diamidino-2-phenylindole
DCC:	<i>deleted in colorectal cancer</i>
DLA:	domaine de liaison à l'ADN
DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DPC:	dodecylphosphocholine
DTT:	dithiotreitol
EDTA:	acide éthylène diamine tétraacétique
EGF:	<i>epidermal growth factor</i>
eGFP:	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGFR:	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGFRvIII:	variant III de l'EGFR
eNOS:	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
EP1-5:	<i>prostaglandin E receptor 1-5</i>
Eph:	ephreine
ERK:	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ET-1:	endothéline 1
ETA/B:	récepteurs de l'endothéline de type A et B
eYFP:	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
FAK:	<i>focal adhesion kinase</i>
FGF:	<i>fibroblast growth factor</i>
FGF10:	<i>fibroblast growth factor 10</i>
FGFR:	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
FIH-1:	<i>factor Inhibiting HIF</i>
Fila:	filamine A
FLIM:	<i>multiphoton time-domain fluorescence lifetime imaging microscopy</i>
FRET:	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
FSH:	<i>follicle-stimulating hormone</i>
FSHR:	<i>follicle-stimulating hormone receptor</i>
GABA <sub>A</sub> :	<i>gamma-aminobutyric acid receptor A</i>
GAP:	<i>GTPase activating protein</i>
GC:	guanylate cyclase
GDI:	<i>GDP dissociation inhibitor</i>
GDP:	guanosine diphosphate
GEF:	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP:	<i>green fluorescent protein</i>
G <sub>i/o</sub> , G <sub>q</sub> , G <sub>s</sub> , G <sub>12/13</sub> :	protéines G de type i/o, q, s et 12/13
GPIb $\alpha$ :	sous-unité $\alpha$ de la glycoprotéine Ib
GRAFS:	<i>glutamate, rhodopsin, adhesion, frizzled/taste2, secretin</i>
Grb2:	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>

GRK:	<i>G protein-coupled receptor kinase</i>
GSK:	glycogen synthase kinase
GST:	glutathione S transférase
GTP:	guanosine triphosphate
GTPase:	guanosine triphosphatase
HB-EGF:	<i>heparin binding-epidermal growth factor</i>
HEK293:	<i>human embryonic kidney 293</i>
HEPES:	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HGF/SF:	<i>hepatocyte growth factor/scatter factor</i>
HGF:	<i>hepatocyte growth factor</i>
HIF-1:	<i>hypoxia inducible factor-1</i>
HNRPU:	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U</i>
HPLC:	<i>high-performance liquid chromatography</i>
HRE:	<i>hypoxia responsive element</i>
HRP:	<i>horseradish peroxidase</i>
HSP90:	<i>heat shock protein 90</i>
HSPG:	<i>heparan sulfate proteoglycan</i>
HUVEC:	<i>human umbilical vein endothelial cell</i>
Icv:	intracérébroventriculaire
IFNAR-1:	<i>interferon alpha/beta receptor 1</i>
IL-1/6/8:	interleukine 1/6/8
IL-4RA:	<i>interleukin-4 receptor subunit alpha</i>
IL-6R:	<i>interleukin-6 receptor</i>
IL-8R:	<i>interleukin-8 receptor</i>
IP:	inositol phosphate
IP <sub>3</sub> :	inositol trisphosphate
IQGAP1:	<i>IQ motif containing GTPase activating protein 1</i>
IR:	<i>insulin receptor</i>
IRSp53:	<i>insulin receptor phosphotyrosine 53 kDa substrate</i>
IUPHAR:	Union Internationale de la Pharmacologie de Base et Clinique
KAT-5:	<i>K(lysine) acetyltransferase 5</i>
KDa:	kilo dalton
KDM6A:	<i>lysine (K)-specific demethylase 6A</i>
Kiss1R:	récepteur du kisspeptine de type 1
KO:	<i>knock out</i>
LCR:	liquide céphalo rachidien
LIMK:	LIM kinase
LOH:	<i>loss of heterozygosity</i>
LPA:	<i>lysophosphatidic acid</i>
LPA1/2:	<i>lysophosphatidic acid receptor type 1/2</i>
LPS:	lipopolysaccharides
M1R:	récepteur de l'acétylcholine de type 1
MAP1A:	<i>microtubule-associated protein 1A</i>
MAPK:	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1:	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>

mDia1/2:	<i>mammalian Diaphanous 1/2</i>
MDM2:	<i>murine double minute 2</i>
MEC:	matrice extracellulaire
MEK:	<i>mitogen-activated protein kinase/ERK kinase</i>
MEM:	<i>Minimum Essential Medium</i>
MLC:	<i>myosine light chain</i>
MLCK:	<i>myosin light-chain kinase</i>
MMP:	métalloprotéase matricielle
MMP2/9:	métalloprotéase matricielle 2/9
MT1-MMP:	<i>membrane type 1 metalloprotease</i>
mTor:	<i>mammalian target of rapamycin.</i>
N.D.:	non déterminé
NCAM:	<i>neural cell adhesion molecule</i>
NDS:	<i>normal donkey serum</i>
NEAA:	acides aminés non essentiels
NO:	<i>nitric oxide</i>
NOX:	NADP oxydase
NP-40:	nonyl phenoxyethoxyethanol
NPR-1:	<i>neuropilin-1</i>
NPY:	neuropeptide Y
NTS:	neurotensine
OMS:	Organisation Mondiale de la Santé
OXTR:	<i>oxytocin receptor</i>
p115RhoGEF:	<i>115 kDa guanine nucleotide exchange factor</i>
p14ARF:	<i>p14 alternate reading frame</i>
P2Y2:	récepteur purinergique de type 2
p300/CBP:	<i>cAMP response element-binding protein (CREB)-binding protein</i>
P38MAPK:	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>
PAF:	<i>platelet-activating factor</i>
PAI-1:	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
PAK1:	<i>p21 activated kinase</i>
PAR1/2:	<i>protease-activated receptor 1/2</i>
PAR6:	<i>partitioning-defective protein 6</i>
PBS:	<i>phosphate buffered saline</i>
PCNP:	<i>PEST proteolytic signal containing nuclear protein</i>
PCR:	<i>polymerase chain reaction</i>
PDB:	<i>protein data bank</i>
PDE:	phosphodiesterase
PDGF:	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFB:	<i>platelet-derived growth factor subunit B</i>
PDGFR $\alpha/\beta$ :	<i>platelet-derived growth factor receptor <math>\alpha/\beta</math></i>
PDGF $\alpha$ :	<i>platelet-derived growth factor <math>\alpha</math></i>
PEDF:	<i>pigment epithelium-derived factor</i>
PEX:	<i>c-terminal hemopexin-like domain of MMP-2</i>
PFA:	paraformaldéhyde

PG:	prostaglandine
PGF-2:	<i>placenta growth factor-2</i>
PHD:	<i>prolyl hydroxylase domain</i>
PI3K:	phosphatidylinositol-3 kinase
PIP <sub>2</sub> :	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP <sub>3</sub> :	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PIPs:	polyphosphoinositides
PIX:	<i>PAK-associated guanine nucleotide exchange factor</i>
pJNK:	c-Jun N-terminal kinase
PKA:	protéine kinase A
PKC:	protéine kinase C
PKD:	protéine kinase D
PLA2:	phospholipase A2
PLC:	phospholipase C
PLC $\gamma$ :	phospholipase C $\gamma$
PRP:	<i>proliferin-related protein</i>
PTEN:	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PTPs:	protéines tyrosines phosphatases
PTX:	toxine pertussique
pVHL:	ligase <i>von Hippel-Lindau</i>
RAMP:	<i>receptor activity-modifying protein</i>
RANTES:	<i>regulated upon activation normal T-cell expressed and presumably secreted</i>
Rb:	<i>retinoblastoma</i>
RCPG:	récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G
REM:	<i>rapid eye movements</i>
RGs:	protéines régulatrices des protéines G
Ruc:	<i>renilla luciferase</i>
RMN:	résonance magnétique nucléaire
ROCK:	<i>rho-associated protein kinase</i>
ROS:	<i>reactive oxygen species</i>
RPTP $\zeta$ :	<i>receptor-type tyrosine protein phosphatase <math>\zeta</math></i>
R-SAT:	<i>receptor selection and amplification technology</i>
RTK:	récepteur tyrosine kinase
S100A10:	<i>S100 calcium binding protein A10</i>
S1P:	<i>sphingosine-1-phosphate</i>
S1P1/2:	<i>sphingosine-1-phosphate receptor type 1/2</i>
SDF-1:	<i>stromal cell-derived factor 1</i>
SDS:	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE:	<i>Sodium dodécyl sulfate- Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis</i>
SENR:	<i>sensory epithelium neuropeptide-like receptor</i>
SH2/3:	<i>src homology 2/3</i>
SHP-2:	<i>src homology 2 containing tyrosine phosphatase</i>
shRNA:	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA:	<i>small interfering RNA</i>

SMRC1:	<i>SWI/SNF complex subunit SMARCC1</i>
SNC:	système nerveux central
Sos:	<i>son of sevenless</i>
SP:	substance P
SPARC:	<i>secreted protein acidic and rich in cysteine</i>
SS:	somatostatine
SS2R:	<i>somatostatin receptor type 2</i>
sVEGFR1:	<i>soluble VEGFR type 1</i>
SVF:	sérum de veau foetal
SVN:	sérum de veau nouveau né
TBS:	<i>tris buffered saline</i>
TAM:	<i>tumor-associated macrophage</i>
TFA:	acide trifluoroacétique
TGFBR-1:	<i>transforming growth factor <math>\beta</math> receptor type-1</i>
TGF $\alpha/\beta$ :	<i>transforming growth factor <math>\alpha/\beta</math></i>
Tie-2:	<i>tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains-2</i>
TIMP-2/3:	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases-2/3</i>
TIRF:	<i>total internal reflection fluorescence</i>
TM:	domaine transmembranaire
TMZ:	témazolomide
TNF- $\alpha$ :	<i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
TRPM7:	<i>transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7</i>
TSP-1:	<i>thrombospondin-1</i>
UII:	urotensine II
uPA:	<i>urokinase-type plasminogen activator</i>
uPAR:	<i>urokinase receptor</i>
URP:	urotensin II-related peptide
UT:	récepteur de l'urotensine II
UT <sub>Cterm</sub> :	domaine C-terminal de l'UT
v/v:	volume/volume
VASP:	<i>vasodilatator-stimulated phosphoprotein</i>
VEGF:	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR1/2:	<i>vascular endothelial growth factor receptor 1/2</i>
VEGI:	<i>vascular endothelial growth inhibitor</i>
VIP:	<i>vasoactive intestinal peptide</i>
VP:	vasopressine
w/w:	weight/weight
WASH:	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein and scar homolog</i>
WASP:	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
WAVE:	<i>WASP family Verprolin-homologous protein</i>
WHAMM:	<i>WASP homolog-associated protein with actin, membranes and microtubules</i>
ZMYND19:	<i>zinc finger, MYND type-containing 19</i>
ZNF264:	<i>zinc finger protein 254</i>
ZNF668:	<i>zinc finger protein 668</i>

## Résumé

Le chimiotactisme est un mécanisme de guidage comprenant une première étape de génération **par diffusion d'un gradient de concentration d'un médiateur spécifique, une deuxième étape de détection** de ce gradient chimique (étant défini comme chimio-attractant ou chimio-repoussant) par les cellules ou organismes, et une troisième étape de modification de la direction du déplacement. Bien que le chimiotactisme et la migration directionnelle représentent un mécanisme universel et que les processus impliqués soient très étudiés, ils constituent un enjeu majeur de recherche dont les applications s'étendent à l'embryogenèse, la réparation et la régénération tissulaire, la réponse inflammatoire mais aussi au cancer.

Le développement des tumeurs cérébrales d'origine gliale s'accompagne de mécanismes invasifs, néoangiogéniques, et de chimioattraction de cellules macrophagiques pro-angiogéniques. En dépit des progrès réalisés en neurooncologie, les patients atteints de tumeurs de haut grade telles que les glioblastomes, présentent une médiane de survie de seulement 15 mois. Ainsi, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) et leurs ligands exprimés dans les glioblastomes et relayant des effets sur la migration, l'invasion et la néoangiogenèse représentent des cibles thérapeutiques potentielles. Les RCPGs sont en effet capables de recruter certaines protéines G hétérotrimériques, ainsi que des récepteurs tyrosine kinase (RTKs) *via* notamment la formation de complexes macromoléculaires au niveau de leurs domaines C-terminal cytosoliques. Parmi les principaux acteurs du chimiotactisme, les ligands de RCPGs, *i.e.* chimiokines, lipides et peptides vasoactifs, stimulent la migration/invasion de divers types cellulaires et notamment des cellules cancéreuses.

L'urotensine II (UII) et son paralogue l'*urotensin II-related peptide* (URP) sont les ligands endogènes d'un RCPG nommé UT et sont considérés comme les facteurs vasoactifs les plus puissants caractérisés à ce jour. Les travaux réalisés dans l'équipe ont précédemment mis en évidence l'expression de l'UT dans les astrocytes corticaux de Rat en culture, dans des astrocytes humains et dans une lignée de gliome de haut grade, ainsi que le rôle spécifique de l'UII sur la prolifération/survie des astrocytes. Ces données suggèrent que le système urotensinergique joue un rôle majeur dans l'activité des astrocytes en conditions physiologique et physiopathologique, et contribuerait au développement des gliomes de haut grade.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail de thèse visait donc à déterminer le rôle du système urotensinergique dans le développement des tumeurs cérébrales d'origine gliale, par une analyse des mécanismes de signalisation relayés par l'UT *in vitro*. Ce projet de recherche a consisté à *i)* rechercher l'expression du système urotensinergique dans les gliomes,

déterminer les effets de l'UII sur la prolifération, la migration et l'adhésion des cellules tumorales gliales et caractériser les voies de signalisation impliquées dans ces effets à l'aide d'outils pharmacologiques et moléculaires, *ii*) identifier par double-hybride des partenaires protéiques du domaine C-terminal cytosolique de l'UT, potentiellement impliqués dans les voies de signalisation activées par l'UII et *iii*) rechercher, par une approche phosphoprotéomique, un ensemble de protéines phosphorylées et déphosphorylées dans une lignée de glioblastome exposée au peptide UII.

Dans la première partie de mes travaux, nous avons montré l'expression de l'UT et de l'UII dans des lignées humaines d'astrocytomes et de glioblastomes, dans des explants tumoraux issus de patient ainsi que dans des sections de glioblastome obtenues en collaboration avec le service d'anatomopathologie du CHU de Rouen. Sur les lignées tumorales gliales et des explants tumoraux, nous avons démontré que l'UT n'est pas couplé à la voie classique  $IP_3/Ca^{2+}$ , ne modifie pas la prolifération, la progression du cycle cellulaire, et n'active pas les voies ERK1/2 et AKT. Nous avons établi pour la première fois qu'un gradient d'UII induit la migration cellulaire chimiotactique des gliomes. Cet effet est concentration-dépendant et est bloqué par les antagonistes peptidique (urantide) et non peptidique (palosuran) de l'UII. Des outils pharmacologiques, *i.e.* des inhibiteurs de  $G_{i/o}$  (PTX), de PI3K (LY294002) et de ROCK (Y27632), et moléculaires (UT muté sur le domaine ERY d'interaction aux protéines G et siRNA anti  $G_{\alpha 13}$ ), nous ont permis de déterminer que les effets de l'UII sur la migration sont principalement relayés par la voie  $G_{13}/Rho/ROCK$  et que la voie  $G_{i/o}/PI3K$  est également impliquée. A l'inverse, une forte concentration homogène d'UII inhibe la motilité cellulaire et stimule les adhésions cellule-matrice et provoque la polymérisation d'actine, la formation et la maturation d'adhésions focales. Le processus d'adhésion cellule-matrice est dépendant de l'interaction de l'UT à la protéine  $G_{i/o}$  et implique en partie la PI3K. En conclusion, ces résultats suggèrent que l'UT se comporte comme un récepteur chimiotactique professionnel relayant les changements de signalisation entre la migration directionnelle et l'adhésion cellulaire en réponse à un gradient ou à une concentration homogène d'UII respectivement, et pourrait participer au développement des gliomes de haut grade.

Dans la deuxième partie de mes travaux de thèse, nous avons recherché par double-hybride les partenaires protéiques du domaine C-terminal de l'UT et identifié 8 protéines dont la filamine A, une protéine de liaison à l'actine impliquée dans les processus de migration et d'adhésion cellulaires. Nous avons déterminé que cette protéine *via* ses domaines 16 à 19 interagit avec le fragment 332-351 de l'UT humain. Bien qu'encourageantes, les tentatives de



confirmation de l'interaction entre l'UT et la filamine A par GST-pull down ou *bioluminescence resonance energy transfer* (BRET) seront encore à mettre au point. Grâce aux lignées déficientes en filamine A (M2) et exprimant stablement la filamine A (A7), nous avons déterminé que cette protéine présentant de multiples domaines d'intérêt, est importante pour la dimérisation de l'UT et la localisation subcellulaire du récepteur. Des études d'immunocytochimie ont révélé que l'UT est colocalisé avec la filamine A au niveau des lamellipodes dans les cellules A7, ou bien se trouve principalement localisé à la membrane plasmique dans les cellules M2. Après exposition à l'agoniste, l'UT semble transporté à la membrane plasmique des cellules A7, tandis qu'il est internalisé (marquage ponctiforme cytoplasmique) dans les cellules M2. Sur les deux types cellulaires (M2 et A7), l'U11 stimule la migration cellulaire et la polymérisation d'actine avec un effet plus prononcé sur les cellules déficientes en filamine A. Par cytométrie en flux et immunocytochimie, nous avons montré que la filamine A est hautement exprimée dans les lignées de gliomes SW1088 et U87 et dans des explants de glioblastome issus de patients et qu'elle est colocalisée avec l'UT dans des protrusions et dans des cellules de morphologie fusiforme. Dans une lignée de gliome, l'U11 entraîne la déphosphorylation de la filamine A (Ser 2151) et son clivage. L'ensemble de ces résultats suggère que la filamine A favorise la formation de dimères, la localisation principalement cytosolique de l'UT, est clivée après traitement U11, et participe à la migration cellulaire. Une des hypothèses est que la translocation de dimères d'UT à la membrane plasmique, consécutive à l'activation d'une population de récepteurs membranaires mobiles, relayerait, au sein de radeaux lipidiques, les voies de signalisation de l'adhésion cellulaire.

Afin d'identifier les acteurs cellulaires de la migration et de l'adhésion effecteurs du système urotensinergique, nous avons réalisé l'analyse phosphoprotéomique de cellules de lignée de gliome U87 en présence ou en absence d'U11. Cette étude, réalisée en collaboration avec la plate-forme de protéomique PISSARO (Philippe Chan, Pascal Cosette, Julie Hardouin, Antoine Obry) nous a permis d'identifier 13 et 32 protéines dont les niveaux de phosphorylation et de déphosphorylation sont augmentés, parmi lesquelles 13 sont impliquées dans la migration et/ou l'adhésion cellulaire dont la filamine A et C, la LIMK et la taline. La validation par Western blot et l'étude plus précise des protéines identifiées nous permettra de mieux comprendre la complexité des voies de signalisation de l'UT relayant les mécanismes de migration et d'adhésion.

Ainsi, nous envisageons le développement de ligands urotensinergiques qui activeraient uniquement la voie d'adhésion des cellules tumorales gliales. De tels ligands, en favorisant les

adhésions cellule-matrice et cellule-cellule confinerait la masse tumorale en inhibant l'invasion, la néoangiogenèse, et la chimioattraction de macrophages pro-angiogéniques.

---

## Summary

Chemotaxis is a guiding mechanism including a **first processing** phase through diffusion of a gradient concentration of specific mediators, and a **second detection phase** of this chemical gradient (defined as a chemoattractant or chemorepellant signal), by cell or organisms, and the adaptation of the movement direction. Although chemotaxis and directional migration finally represent universal mechanisms, and that detailed involved processes are widely studied, they constitute a major challenge for research exhibiting a number of physiopathological applications from embryogenesis, tissue repair and regeneration, inflammation to cancer.

The development of cerebral glial tumors required specific features as tumoral cell invasion, neoangiogenesis and chemoattraction of proangiogenic macrophage cells. Despite intense research in neuro-oncology, the survival median of patients with high-grade tumors such as glioblastoma is only 15 months. Thus, G protein-coupled receptors (GPCRs) and their ligands expressed in glioblastoma and relaying effects on migration, invasion and angiogenesis, represent potential therapeutic targets. GPCRs are indeed able to recruit heterotrimeric G proteins and tyrosine kinase receptors (RTKs) likely through the formation of macromolecular complexes involving GPCR C-terminal cytosolic domains. Among major chemotaxis players, GPCR ligands, *i.e.* chemokines, lipids and vasoactive peptides, stimulate migration/invasion of various cell types, including tumor cells.

Urotensin II (UII) and its paralog urotensin II-related peptide (URP) are the endogenous ligands of a GPCR named UT and are considered as most potent vasoactive factors characterized to date. The work performed in the team had previously shown the expression of UT in rat cortical astrocytes, in human astrocytes and in a high grade glioma cell line, and a specific role of UII in astrocyte proliferation/survival. These data suggested that the urotensinergic system would play a major role in astrocyte activity in physiological and pathophysiological conditions, and contribute to the development of high grade glioma.

In this context, the aim of my thesis work was to determine the role of the urotensinergic system in the development of brain tumors of glial origin through *in vitro* investigation of signaling events relayed by UT. This research project aimed to *i)* investigate urotensinergic system expression in glioma, determine the effects of UII on proliferation, migration and adhesion of glial tumor cells and characterize the signaling pathways involved in these effects using pharmacological and molecular tools, *ii)* identify, by using two-hybrid strategy, protein partners of the C-terminal cytosolic domain of UT, potentially involved in transduction pathways activated by UII and *iii)* identify by means of a phosphoproteomics approach, a set

of proteins phosphorylated and dephosphorylated in a glioblastoma cell line exposed to the UII peptide.

In the first part of my work, we showed the expression of UT and UII in human astrocytoma and glioblastoma cell lines, in tumor explants from patients as well as in glioblastoma tissue sections obtained in collaboration with the anatomocytopathology department of the Rouen University Hospital. In fresh glioblastoma tumor explants and glioma cell lines, we demonstrated that UT was not coupled to the classical  $IP_3/Ca^{2+}$  pathway and failed to modify proliferation, cell cycle progression as well as ERK1/2 and AKT pathways. We have established for the first time that a gradient of low UII concentration induced chemotactic migration of glioma cells. This effect was concentration-dependent and blocked by peptidic (urantide) and non-peptidic (palosuran) UT antagonists. Pharmacological agents, *i.e.*  $G_{i/o}$  (PTX), PI3K (LY294002), and ROCK (Y27632) inhibitors, and molecular tools (UT mutated in the G protein interacting motif ERY or siRNA anti  $G_{\alpha 13}$ ), highlighted that UII-mediated migration is mainly relayed by the  $G_{13}/Rho/ROCK$  cascade but also involved the  $G_{i/o}/PI3K$  pathway. Conversely, a high homogeneous concentration of UII inhibited cell motility and stimulated cell-matrix adhesions likely through actin polymerization, formation and maturation of focal adhesions. Glioma cell-matrix adhesion was shown to be mainly mediated by  $G_{i/o}$  and partially involved PI3K. In conclusion, these results suggest that UT behaves like a professional chemotactic receptor activating a signaling switch between the directional cell migration and adhesion in response to a gradient or a uniform concentration of UII respectively and thus should play a role during high-grade glioma development.

In the second part of this work, by means of the two-hybrid system, we aimed to characterize protein partners of the UT C-terminal domain. Thus, we identified 8 proteins including filamin A, an actin binding protein classically known to be involved in cell adhesion and migration. We showed that this large and multidomain protein interacted with the 332-351 C-terminal fragment of the human UT, through its 16 to 19 domains. We obtained some encouraging data confirming the interaction between UT and filamin A by GST-pull down, but our co-immunoprecipitation and bioluminescence resonance energy transfer (BRET) experiments have to be reproduced with modifications in the strategy. By using cell lines deficient for filamin A (M2) or stably expressing filamin A (A7), we determined that this multifunctional protein is important for the dimerization of UT and the subcellular localization of the receptor. By immunocytochemistry, we observed that UT is colocalized with filamin A at the lamellipodia in A7 cells, or is mainly localized at the plasma

membrane in M2 cells. After exposure to the agonist, UT appeared translocated to the plasma membrane in A7 whereas internalized (punctiform cytoplasmic labeling) in M2 cells. In both cell types (M2 and A7), UII stimulated cell migration and actin polymerization with a more pronounced effect on cells lacking filamin A. By flow cytometry and immunocytochemistry, we finally detected high filamin A expression in glioma cell lines U87 and SW1088 and in glioblastoma explants from patients. In these tumor cells, filamin A was colocalized with UT in protrusions and in cells exhibiting a fusiform morphology, and UII led to the dephosphorylation (Ser 2151) and cleavage of filamin A. Taken together, these results suggest that filamin A favors the formation of oligomeric structures, the cytosolic localization of UT, the translocation of UT at the plasma membrane and plays a role in cell migration. One hypothesis is that translocation of UT oligomers to the plasma membrane maybe subsequent to the activation of a subpopulation of mobile membrane UT, relays within lipid rafts, signaling pathways of cell adhesion.

To identify the cellular actors of migration and adhesion, effectors of the urotensineric system, we conducted a phosphoproteomics analysis of glioma cell line U87 in the absence or the presence of UII. This study, conducted in collaboration with the Proteomic platform PISSARO (Philippe Chan, Pascal Cosette, Julie Hardouin, Antoine Obry) allowed us to identify 13 and 32 proteins whose levels of phosphorylation and dephosphorylation were increased. Among them, 13 including filamin A, filamin C, LIMK or talin are involved in cell migration and/or adhesion. Validation by Western blot and the more detailed study of the identified proteins, will allow us to better understand the complexity of UT signaling pathways relaying mechanisms of migration and adhesion.

Thus, we aim to initiate the development of urotensineric ligands that would only activate adhesion pathways of glial tumor cells. Such ligands, promoting cell-matrix and cell-cell adhesions would confine the tumor mass by inhibiting invasion, neoangiogenesis, and chemoattraction of proangiogenic macrophages.

---

---

---

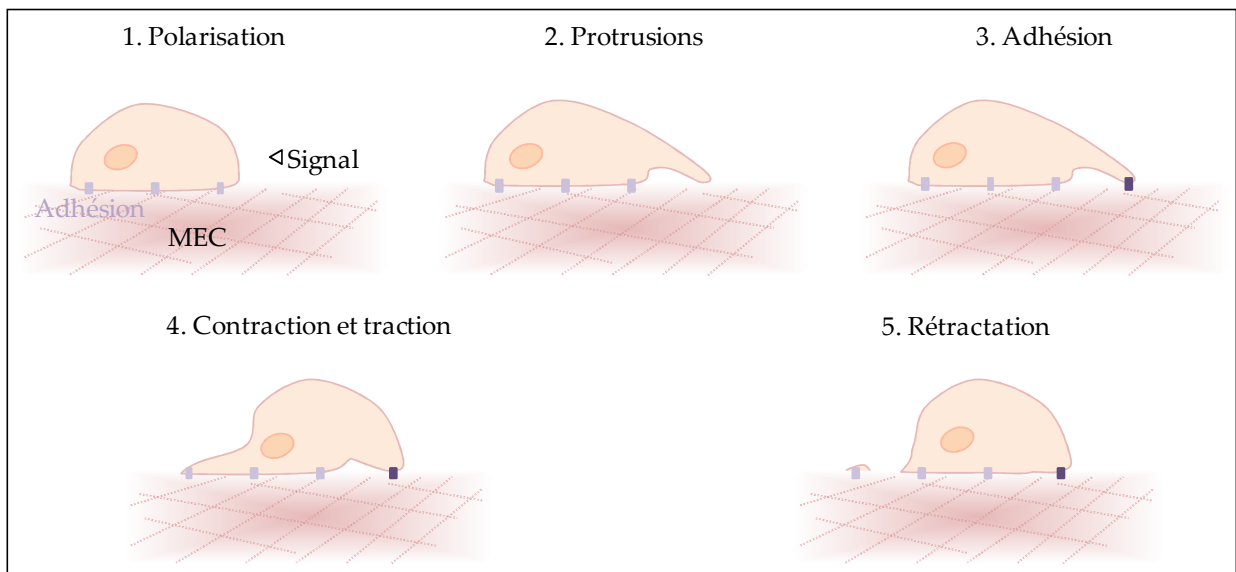


L'essor de la microscopie à la fin du XVI<sup>ème</sup> siècle a permis à Antoni van Leeuwenhoek, drapier de profession, de décrire pour la première fois dans une lettre publiée dans « *Phylosophical Transactions of the Royal Society of London* » en 1675, des mouvements cellulaires de ce que nous nommons aujourd'hui, des protozoaires. Aux alentours des années 1900, le scientifique Russe Elie Metchnikoff sera le premier à décrire le processus de phagocytose des neutrophiles et leur migration au site infectieux (Metchnikoff, 1905). Ce n'est que dans les années 1970 que les théories modernes de la migration cellulaire ont été établies avec les recherches de Michael Abercrombie publiées dans une série de 5 articles dans *Experimental Cell Research*. Il a suggéré que les cellules se déplacent en émettant des protrusions, en formant de nouveaux contacts avec le substrat et en hissant leur corps cellulaire vers ces nouvelles adhésions *via* « *un système de filaments contractiles* », donnant naissance au concept « protrusion-contraction » (Abercrombie and Dunn, 1975). Sur la base de ces études, de nombreuses recherches ont été menées dont le but principal était d'identifier les différents acteurs de la migration cellulaire et de définir leur rôle et leur importance. Ce mécanisme de migration par protrusion-contraction, qui s'étend des amibes *Dictyostelium discoideum* aux neutrophiles humains, peut être « dirigé » en réponse à l'accumulation locale de certaines molécules de signalisation, est appelé le chimiotactisme. Le chimiotactisme est un mécanisme de guidage comprenant une première étape de génération **par diffusion d'un gradient de concentration d'un produit chimique spécifique**. L'autre étape est la **détection** de ce gradient chimique (étant défini comme chimio-attractant ou chimio-repoussant), par les cellules ou les organismes, et la modification de la direction du déplacement. Bien que le chimiotactisme et la migration directionnelle représentent un mécanisme universel et que les processus impliqués soient très étudiés, ils constituent un enjeu majeur de recherche dont les applications s'étendent à l'embryogenèse, la réparation et la régénération tissulaire, la réponse inflammatoire mais aussi au cancer (Lauffenburger and Horwitz, 1996; Midwood *et al.*, 2004; Luster *et al.*, 2005; Kurosaka and Kashina, 2008; Friedl and Gilmour, 2009).

## Chapitre I: la migration cellulaire

### 1. Aspects cellulaires et moléculaires des étapes de la migration

Depuis les observations pionnières d'Abercrombie (Abercrombie *et al.*, 1970), la migration cellulaire est maintenant présentée comme un procédé cyclique composé de 5 étapes, *i.e.* la polarisation, l'apparition des protrusions cellulaires, la formation d'adhésions stabilisant ces protrusions, la contraction-tractation cellulaire à partir de ces adhésions, et enfin la rétractation du pôle arrière de la cellule (Lauffenburger and Horwitz, 1996) (Figure 1).



**Figure 1. Représentation schématique des 5 étapes de la migration cellulaire.** En réponse à un signal intrinsèque ou extracellulaire, la cellule va se polariser (1) pour mener à la formation d'une face avant et d'une face arrière. La cellule émettra ensuite des protrusions à l'avant (2) qui seront stabilisées par l'apparition de nouvelles adhésions (3). Ces adhésions serviront d'ancrage à la cellule pour se contracter et se mouvoir vers l'avant (4). L'arrière de la cellule va ensuite se rétracter (5), laissant parfois quelques morceaux résiduels de membrane plasmique. MEC: matrice extracellulaire.

#### 1.1. Polarisation

Afin que la cellule puisse réaliser un mouvement de façon directionnelle, il est nécessaire qu'elle présente une polarisation au cours de laquelle certains composants du cytosquelette se relocalisent de façon différentielle aux deux pôles de la cellule. Il s'ensuit la formation d'un bord dit « d'attaque » et d'un bord dit « de fuite » correspondant à l'avant et à l'arrière de la cellule, respectivement. Cette relocalisation peut être due à une propriété intrinsèque de la cellule comme dans l'exemple de la cellule épithéliale qui possède un pôle apical muni de cils, et un pôle basal dont la fonction est d'attacher la cellule à la lame basale, ou correspondre

à une réponse adaptative à un signal directionnel tel qu'un gradient de concentration. La polarisation cellulaire adaptative est présente chez de nombreux organismes tels que la bactérie *Caulobacter crescentus* (Gober *et al.*, 1991), la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Chant and Pringle, 1991), les plantes (Hepler *et al.*, 2001) et les cellules animales (Drubin and Nelson, 1996). Ces caractéristiques de la migration cellulaire ont particulièrement été étudiées chez *Dictyostelium discoideum*, un eucaryote unicellulaire du groupe des amibes capable de migrer en réponse à un gradient de molécule chimioattractante, le 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate (AMPC). Ce modèle a permis d'établir les séquences d'évènements régissant l'orientation spatiale de la polarisation, des mécanismes similaires à ceux gouvernant la migration des leucocytes, des cellules particulièrement motiles du système immunitaire.

### 1.1.1. La migration directionnelle

La migration directionnelle de cellules individuelles a longtemps été étudiée afin de caractériser les mécanismes moléculaires régissant les étapes de la migration. Elle intervient dans de nombreux mécanismes tels que le développement, la surveillance immunitaire et les métastases cancéreuses. Moins étudiée, mais pourtant aussi importante que la migration individuelle, la migration directionnelle collective participe à l'embryogenèse et à l'invasion tumorale. Elle est globalement définie comme le mouvement collectif de deux cellules ou plus, dont les jonctions sont maintenues. En 1966, Vaughan et Trinkaus ont pour la première fois observé la migration directionnelle collective de cellules épithéliales d'embryon de Poulet. Ce type de migration fait intervenir les mêmes étapes que celles décrites pour la migration d'une cellule individuelle (Chapitre I, §1) excepté qu'il s'agit dans ce cas d'une cohorte de cellules liées les unes aux autres par des protéines de jonctions adhérentes telles que les cadhérines et les intégrines (Friedl and Gilmour, 2009). Ces jonctions permettent de connecter le cytosquelette d'actine des cellules et de favoriser une organisation supra-

cellulaire du cytosquelette qui permet une coordination des mouvements du groupe. La polarisation de ce groupe de cellules suppose l'identification, à l'avant du groupe, d'une cellule *leader*, capable de détecter un gradient de signaux extracellulaires et de générer une importante dynamique du cytosquelette conduisant à une migration directionnelle collective (Vitorino and Meyer, 2008).

A l'inverse de la migration désordonnée, la migration directionnelle consiste en une motilité cellulaire persistante dans un seul sens. Elle peut provenir de la capacité intrinsèque d'une cellule à évoluer dans une même direction sans tourner, ou impliquer un signal extérieur entraînant une migration directionnelle persistante. De la nature de ce stimulus extracellulaire va dépendre la réponse cellulaire: un gradient de facteur soluble induira du chimiotactisme, un gradient d'un ligand immobile sera associé au phénomène d'haptotactisme, une force mécanique exercée sur la cellule mènera au mécanotactisme ou durotactisme, et enfin dans le cas d'un champ électrique, on parlera d'électrotactisme. Quel que soit la nature du stimulus, il sera intégré par la cellule *via* des récepteurs spécifiques conduisant dans tous les cas à une polarisation cellulaire robuste nécessaire à la persistance de la migration directionnelle. En effet, il a été démontré qu'une stabilité de la polarisation, caractérisée par une distribution asymétrique des signaux intracellulaires, favorise la migration directionnelle (Weiger *et al.*, 2010). La répartition asymétrique des signaux intracellulaires lors de la polarisation dépend de la distribution asymétrique du ligand. Dans le cas du chimiotactisme, les cellules peuvent détecter un gradient de molécules qui peut différer de seulement 2% entre l'avant et l'arrière de la cellule (Parent and Devreotes, 1999; Chung *et al.*, 2001; Katanaev, 2001; Weiner, 2002).

### **1.1.2. Complexes moléculaires impliqués dans la migration directionnelle**

L'ensemble des mécanismes responsables de la polarisation a longtemps été regroupé sous le concept de « boussole cellulaire » (Weiner, 2002) ou du « *directionnal sensing* » (Meili and

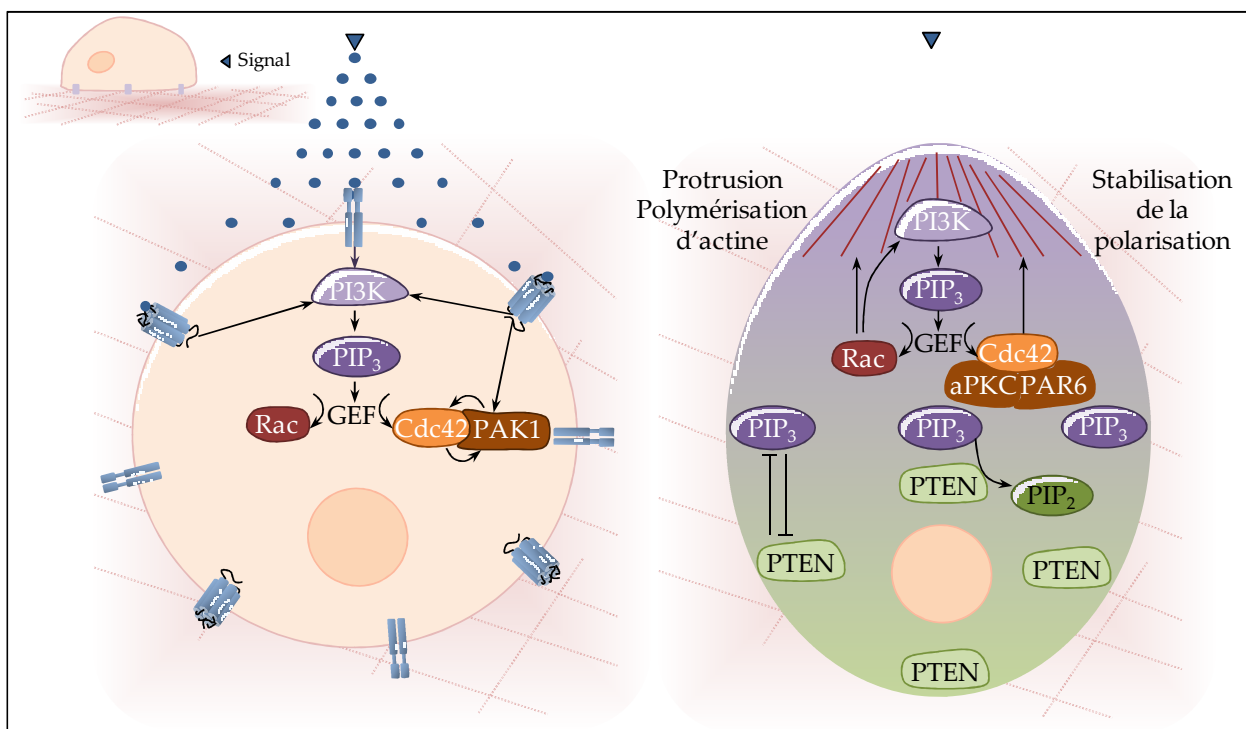
Firtel, 2003). Ce concept implique la détection d'un signal extracellulaire non homogène par un pôle de la cellule, dont l'interprétation locale (par exemple « plus haute concentration du ligand ») permet de déclencher la polarisation. Le signal extracellulaire correspond le plus souvent à une molécule chimioattractante qui lie des récepteurs membranaires de type récepteur tyrosine kinase (RTK) de facteurs de croissance, ou récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G (RCPG). Afin de détecter un gradient de concentration de façon optimale, ces derniers seraient uniformément répartis à la surface membranaire (Xiao *et al.*, 1997; Servant *et al.*, 1999). En effet, l'observation dynamique de protéines étiquetées à l'aide de la *green fluorescent protein* (GFP), a permis de montrer que le récepteur à l'AMPc cAR1 chez *D. discoideum*, et le récepteur du complément C5a dans une lignée cellulaire de leucémie ne subissaient aucune relocalisation lorsque ces modèles sont soumis à un gradient moléculaire de leur ligand respectif. Ces données suggèrent que l'activation locale des récepteurs au pôle cellulaire le plus exposé, entraîne une cascade d'activation intracellulaire (Servant *et al.*, 2000). D'après le concept de la « boussole », il est maintenant admis que la première étape signalisante se caractérise par l'activation locale de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) (Figure 2) qui génère alors l'accumulation de produits lipidiques tels que le phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP<sub>3</sub>). Chez *D. discoideum* (Meili *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 2000), les neutrophiles (Servant *et al.*, 2000) et les fibroblastes (Haugh *et al.*, 2000), la distribution des produits lipidiques dans la cellule suit un gradient identique à celui du chimioattractant, *i.e.* des concentrations les plus fortes au niveau sous-membranaire aux plus faibles au niveau cytosolique.

**Les PIP<sub>3</sub> accumulés** vont actionner le *guanine nucleotide exchange factor* (GEF), qui à son tour stimule les petites guanosines triphosphatases (GTPases) de type Rho, Rac et *cell division control protein 42* (Cdc42). Les formes actives de ces GTPases, associées au guanosine triphosphate (GTP), interagissent avec des protéines effectrices (Takai *et al.*, 2001), et sont souvent responsables de la polymérisation de l'actine à l'avant de la cellule. Il est à

noter que ces formes actives peuvent être contrôlées par *i*) la *GTPase activating protein* (GAP) qui lie la GTPase et stimule son activité hydrolytique entraînant à terme l'inactivation de la protéine et par *ii*) le *GDP dissociation inhibitor* (GDI) capable de s'associer à la GTPase et de la séquestrer dans le cytoplasme sous sa forme inactive (Rossman *et al.*, 2005).

**Le rôle moléculaire et cellulaire de Cdc42** a notamment été mis en évidence dans des cellules natives. La surexpression d'un dominant négatif de Cdc42 dans des astrocytes de Rat en culture inhibe leur polarisation lors d'un test de lésion cicatriciel d'un tapis cellulaire (Etienne-Manneville and Hall, 2001) et l'inhibition de Cdc42 dans des neutrophiles empêche la stabilisation de la polarisation (Srinivasan *et al.*, 2003; Keymeulen *et al.*, 2006). L'effet de Cdc42 dans les astrocytes est relayé par d'autres protéines telles que l'*atypical protein kinase C* (aPKC) et la *partitioning-defective protein 6* (PAR6), qui maintiennent la polarisation en stabilisant les microtubules (Etienne-Manneville and Hall, 2003; Etienne-Manneville *et al.*, 2005). En 2003, Li et coll. ont montré qu'en réponse à un signal extracellulaire, l'activation du récepteur du complément C5a provoque l'interaction des sous-unités  $\beta\gamma$  des protéines G trimériques à une sérine/thréonine kinase *p21 activated kinase* (PAK1) qui peut stimuler la GEF *PAK-associated guanine nucleotide exchange factor* (PIX) qui elle-même actionne Cdc42 (Li *et al.*, 2003b). Ainsi, l'activation de Cdc42 peut emprunter une autre voie que celle des PIP<sub>3</sub>. Par ailleurs, PAK1 présente un domaine conservé d'environ vingt résidus capable de lier à la fois Rac et Cdc42, ainsi nommé *Cdc42/Rac interactive binding* (CRIB) (Burbelo *et al.*, 1995). L'interaction de Cdc42 avec PAK1, a élégamment été montrée par Parsons et coll. en 2005 à l'aide de la technique de *multiphoton time-domain fluorescence lifetime imaging microscopy* (FLIM). Dans cette étude réalisée sur un modèle de carcinome mammaire, Cdc42 entraîne la phosphorylation de PAK1 spécifiquement à l'avant de la cellule, le long des protrusions. Ainsi, proche des récepteurs et des complexes  $\beta\gamma$ , Cdc42 peut être activée à l'avant de la cellule par PAK1 sur lequel elle exerce en retour un rétrocontrôle positif, maintenant ainsi son action à l'avant de la cellule.

Plusieurs études ont permis de démontrer que Rac, en favorisant la polymérisation de l'actine à l'avant de la cellule, est indispensable à l'établissement des protrusions et entraîne une boucle de rétrocontrôle positif sur la PI3K, responsable de l'accumulation de PIP<sub>3</sub> à l'avant de la cellule (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Srinivasan *et al.*, 2003). Le mécanisme qui sous-tend ce rétrocontrôle positif de Rac sur la PI3K n'est pas encore bien caractérisé. Néanmoins, des études *in vitro* réalisées sur des fibroblastes (Tolias *et al.*, 1995) et des neutrophiles (Bokoch *et al.*, 1996) ont révélé une liaison directe entre Rac et la PI3K d'une part, et la potentialisation de son activité d'autre part.



**Figure 2. Illustration de la répartition des principaux acteurs moléculaires de la polarisation cellulaire.** A l'origine de la polarisation (à gauche), des récepteurs membranaires sont localement activés par un signal (▼, par exemple un gradient de concentration de ligands extracellulaires) capable d'induire le recrutement de la PI3K. Celle-ci entraîne l'accumulation de PIP<sub>3</sub>, la stimulation consécutive de protéines GEF, relayant le recrutement des formes actives des GTPases Rac et Cdc42. Cdc42 peut également être stimulée par la protéine PAK1, une des kinases effectrices des voies de signalisation de certains récepteurs membranaires. L'activation des Rho-GTPase Rac et Cdc42 permet l'établissement d'un gradient moléculaire et une différenciation entre l'avant et l'arrière de la cellule (à droite). En effet, Rac catalyse la polymérisation de l'actine ainsi que l'apparition de protrusions à l'avant de la cellule et provoque, par un phénomène de rétrocontrôle positif sur la PI3K, l'accumulation de PIP<sub>3</sub> à l'avant de la cellule. Cdc42 stabilise la polarisation en agissant sur de nombreuses protéines effectrices telles que PAR6 et aPKC qui elles-mêmes stabilisent les microtubules. L'accumulation de PIP<sub>3</sub> est restreinte à l'avant de la cellule par la phosphatase PTEN, qui, elle-même est limitée à l'arrière de la cellule par les PIP<sub>3</sub>. aPKC: *atypical protein kinase C*; Cdc42: *cell division control protein 42*; GEF: *guanine nucleotide exchange factor*; PAK1: *p21 activated kinase*; PAR6: *partitioning-defective protein 6*; PI3K: *phosphatidylinositol-3 kinase*; PIP<sub>3</sub>: *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*; PTEN: *phosphatase and tensin homolog*.

### 1.1.3. Répartition subcellulaire et gradients moléculaires: « la boussole cellulaire »

La restriction de l'activité de PI3K à l'avant de la cellule est due à un rétrocontrôle négatif sur les faces latérales, et à l'arrière de la cellule par la *phosphatase and tensin homolog* (PTEN). La fonction principale de PTEN est de contrecarrer les effets de PI3K en hydrolysant les PIP<sub>3</sub>, agissant ainsi comme un anti-oncogène majeur (Sansal and Sellers, 2004). Chez *D. discoideum*, les cellules qui n'expriment pas PTEN présentent des défauts de polarisation et de migration directionnelle (Funamoto *et al.*, 2002; Iijima and Devreotes, 2002). Chez les mammifères, l'absence d'activité de PTEN dans des fibroblastes entraîne une augmentation de la migration des lymphocytes B (Suzuki *et al.*, 2003), accompagnée d'une stimulation de Cdc42 et de Rac (Liliental *et al.*, 2000), suggérant que cet anti-oncogène régule la quantité de PIP<sub>3</sub> en l'absence de signal extracellulaire. Là encore, le mécanisme n'est pas clairement élucidé. Une étude récente de Gerisch et coll., dans laquelle la technique de *total internal reflection fluorescence microscopy* (TIRF) a été utilisée pour observer la localisation et la dynamique de PIP<sub>3</sub> et de PTEN, a révélé que ces deux entités exercent un rétrocontrôle négatif l'une sur l'autre (Gerisch *et al.*, 2012). Ainsi, une diminution de PIP<sub>3</sub> limitée à une portion de la membrane cellulaire provoque une augmentation locale de PTEN et *vice versa*.

## 1.2. Protrusions membranaires

Une des conséquences importantes de la polarisation est l'extension de protubérances membranaires actives à l'avant de la cellule, et nécessaires à la migration. Il en existe cinq types: les lamellipodes, les filopodes, les invadopodes, les podosomes et les *blebs* (Ridley, 2011) (Figure 3A).

### 1.2.1. Les lamellipodes

Les lamellipodes (Figure 3B) sont des structures larges et plates observées pour la première fois sur des fibroblastes par Abercrombie qui leur a donné ce nom (Abercrombie *et*



*al.*, 1971). A l'heure actuelle, la description de ces structures s'étend des bactéries telles que *Listeria monocytogenes* (Welch *et al.*, 1997), aux cellules épithéliales de *Drosophila* (Verkhusha *et al.*, 1999), et aux cellules humaines telles que les fibroblastes ou les cellules cancéreuses (Condeelis *et al.*, 2001). La protrusion du lamellipode est provoquée par la polymérisation continue des filaments d'actine à l'avant de la cellule (Lauffenburger and Horwitz, 1996). Cette polymérisation est conduite par le complexe *actine related protein 2/3* (Arp2/3), composé d'une association de sept polypeptides incluant ARP2, ARP3 et ARPC1-ARPC5. Le complexe Arp2/3 est activé lorsqu'il est associé (par son domaine C-terminal) aux protéines de la famille *Wiskott-Aldrich syndrome protein* (WASP), comprenant les membres WASP, N-WASP, *WASP family Verprolin-homologous protein* (WAVE), *Wiskott-Aldrich syndrome protein and scar homolog* (WASH) et *WASP homolog-associated protein with actin, membranes, and microtubules* (WHAMM) (Ridley, 2011). Le complexe Arp2/3-WASP, présent à l'avant du lamellipode (Lai *et al.*, 2008) se lie aux filaments d'actine préexistants et crée de nouveaux filaments qui permettent de ramifier les filaments « mères » (Welch and Mullins, 2002; Campellone and Welch, 2010). D'autres facteurs peuvent contribuer à l'extension du lamellipode tels que les membres de la famille des formines (Chhabra and Higgs, 2007), comprenant notamment les protéines *mammalian Diaphanous 1* (mDia1) et 2 (mDia2), qui engendrent l'élongation des filaments d'actine sans ramification. Les WASPs et les formines sont activées à la membrane par les RhoGTPases Rac1 (Miki *et al.*, 1998) et Cdc42 (Yang *et al.*, 2007). Rac1 active WAVE tandis que Cdc42 stimule WASP et mDia2. Rac1 pourrait être déterminante dans l'apparition des lamellipodes car la photo-activation de Rac1 dans des fibroblastes embryonnaires de Souris déclenche l'extension des lamellipodes (Wu *et al.*, 2009). Le maintien des lamellipodes se fait d'une part, grâce à l'action de la cofiline, qui par sectionnement des filaments d'actine préexistants, procure au complexe Arp2/3 de nouvelles extrémités C-terminales libres d'actine (Van Rheezen *et al.*,

2009), et d'autre part, par l'intermédiaire de la cortactine qui stabilise le complexe Arp2/3 en se liant spécifiquement à ce dernier ainsi qu'à l'actine (Lai *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2009).

### 1.2.2. Les filopodes

Fins et cylindriques (Lauffenburger and Horwitz, 1996), les filopodes (Figure 3C) sont des extensions exploratrices de la membrane plasmique formées de paquets de filaments parallèles d'actine. Leur principale fonction est d'explorer l'environnement extracellulaire (Davenport *et al.*, 1993) grâce aux récepteurs comme l'*epidermal growth factor receptor* (EGFR) qu'ils contiennent et qui fixent leur ligand l'*epidermal growth factor* (EGF), présent dans le milieu extracellulaire (Lidke *et al.*, 2005). En travaillant sur des cellules de mélanome, Svitkina et coll. (2003) ont montré que la formation des filopodes à partir du lamellipode est initiée par la liaison, aux extrémités libres du réseau d'actine préexistant, de la fascine, une protéine qui réticule les filaments d'actine grâce à ses deux sites de liaison à l'actine (Adams, 2004), et de la *vasodilator-stimulated phosphoprotein* (VASP), une protéine membre du complexe Ena/VASP impliqué dans l'élongation des filaments d'actine et leur stabilisation dans les filopodes (Breitsprecher *et al.*, 2011). Les filopodes peuvent également apparaître *de novo*, *i.e.* sans tirer leur origine des lamellipodes préexistants, *via* l'activation de la formine mDia2 (Schirenbeck *et al.*, 2005). Dans ce dernier exemple, durant l'initiation de la formation d'un filopode, la Rho-GTPase Cdc42 va activer trois cibles principales, *i.e.* WASP, mDia2 et la protéine *insulin receptor phosphotyrosine 53 kDa substrate* (IRSp53) (Ahmed *et al.*, 2010). La protéine IRSp53 contient un domaine I-BAR, dont l'interaction avec la membrane plasmique par des liaisons électrostatiques conduit à l'incurvation de la membrane, initiant ainsi la formation des filopodes (Ahmed *et al.*, 2010). IRSp53 possède à la fois un domaine CRIB qui lui permet d'être recrutée par Cdc42, et un domaine *src homology 3* (SH3) grâce auquel elle peut à son tour lier mDia2 et WASP au niveau du filopode, et permettre ainsi la polymérisation de l'actine à ce niveau (Ahmed *et al.*, 2010). On peut enfin noter que ces deux

dernières protéines vont agir sur les mêmes effecteurs que lors de la formation d'un lamellipode.

### 1.2.3. Les podosomes et les invadopodes

Les podosomes et les invadopodes (Figure 3D) sont des protrusions spécialisées riches en filaments d'actine, qui se situent sur la membrane ventrale des cellules et qui ont un contact étroit avec la matrice extracellulaire (MEC). Ces protrusions peuvent dégrader la MEC en modulant la sécrétion et l'activation de protéases telles que les métalloprotéases matricielles (MMPs) permettant ainsi aux cellules de franchir la barrière tissulaire (Sibony-Benyamini and Gil-Henn, 2012). Le terme de « podosome » est pour la première fois employé en 1977 par Davies et Stossel pour décrire des sacs de plasmalemme présents sur les macrophages contenant de l'actine, de la myosine et des protéines de liaison à l'actine. Les podosomes ont ensuite été plus précisément caractérisés en tant que structures adhésives capables de dégrader la MEC dans les fibroblastes transformés par le virus du sarcome de Rous (David-Pfeuty and Singer, 1980; Chen *et al.*, 1985; Tarone *et al.*, 1985). Ces protrusions ont également été décrites dans les cellules normales telles que les ostéoclastes (Zambonin-Zallone *et al.*, 1988). Dans le même temps, le terme d'« invadopode » a été attribué à des structures similaires aux podosomes pour souligner leur capacité à lyser la MEC (Chen, 1989).

Ces deux structures se distinguent néanmoins par le type de cellules sur lesquelles on les trouve, leur taille, leur abondance et leur durée de vie. En effet, les podosomes sont principalement présents sur des cellules saines ayant une motilité très élevée telles que les monocytes (Gaidano *et al.*, 1990), les macrophages (Linder *et al.*, 1999), les ostéoclastes (Zambonin-Zallone *et al.*, 1988), ou encore les cellules endothéliales (Moreau *et al.*, 2003). Plus précisément, les podosomes sont des structures de taille réduite (1  $\mu\text{m}$  de diamètre et 0,4  $\mu\text{m}$  de profondeur) présentes en grand nombre (20 à 100 par cellules) et ont une durée de vie limitée à quelques minutes (Linder, 2007). Les invadopodes sont quant à eux principalement

présents sur les cellules cancéreuses telles que les cellules de mélanomes (Monksy *et al.*, 1994), les cellules de carcinomes mammaires (Coopman *et al.*, 1998), ou les cellules d'astrocytomes de Rat (Maestro *et al.*, 2001). Ils sont de grande taille (8  $\mu\text{m}$  de diamètre et 5  $\mu\text{m}$  de profondeur), en faible nombre sur les cellules (de 1 à 10 par cellule) et relativement stables avec une durée de vie de l'ordre de quelques heures (Linder, 2007).

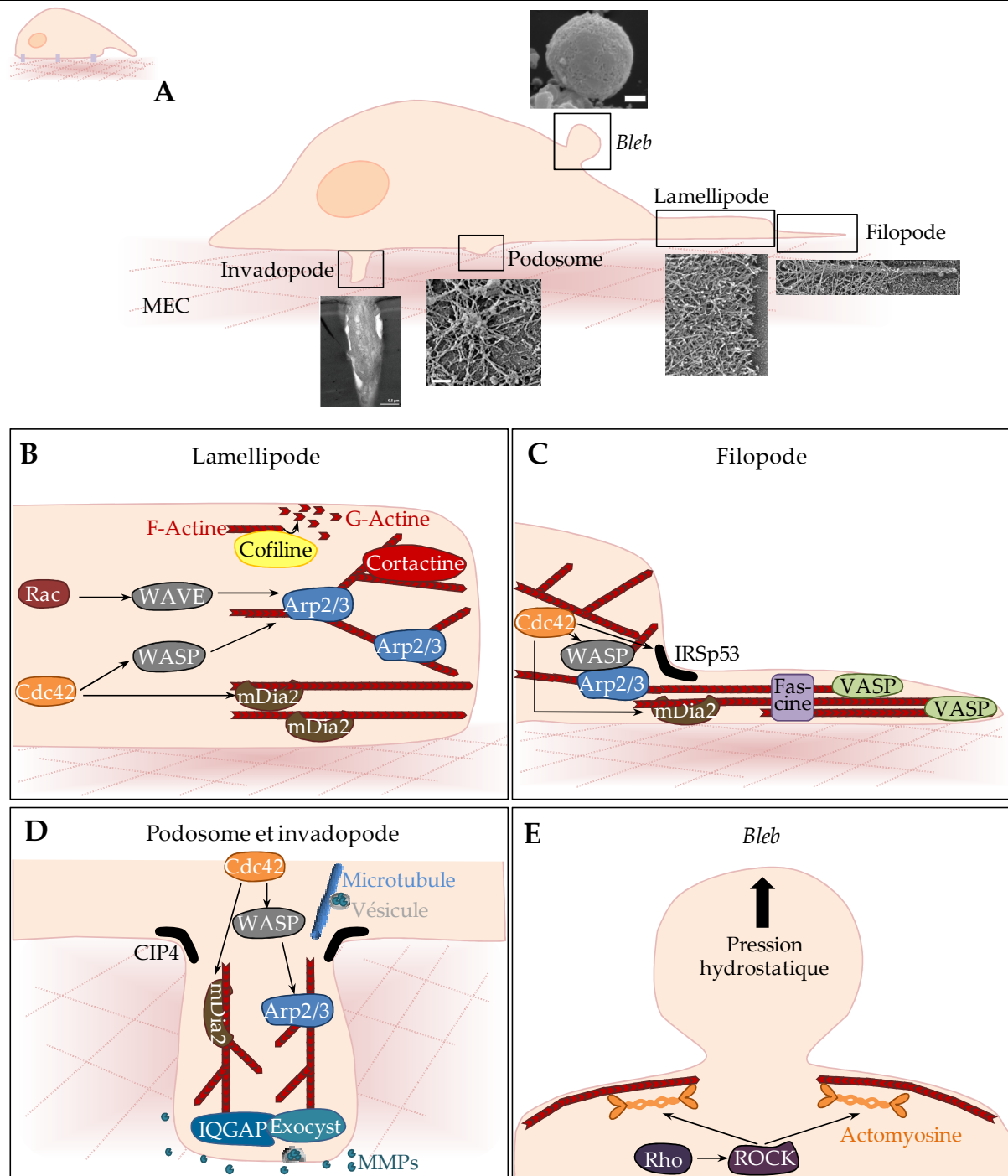
Malgré ces différences, podosomes et invadopodes émergent selon un processus similaire. En réponse à un signal pro-migratoire, la GTPase Cdc42, recrute les protéines WASPs qui à leur tour recrutent le complexe Arp2/3, responsable de la polymérisation de l'actine. Cdc42 peut également activer les formines, un mécanisme décrit notamment dans les cellules de carcinome de sein, dans lesquelles ces protéines jouent un rôle majeur dans l'invasion cellulaire dans une matrice (de type Matrigel) (Lizárraga *et al.*, 2009). L'incurvation de la membrane est là encore importante pour la formation des invadopodes et des podosomes. Récemment, il a été montré qu'une protéine contenant un motif F-BAR, appelée *Cdc42 interacting protein 4* (CIP4), se lie aux protéines Cdc42 et WASP et permet l'incurvation membranaire indispensable à la formation des invadopodes (Pichot *et al.*, 2010).

La particularité des podosomes et des invadopodes réside dans le fait que ces structures sont capables de libérer des MMPs pour dégrader la MEC. Les mécanismes de libération des MMPs au niveau des invadopodes n'ont pas été complètement élucidés à ce jour. Une étude réalisée sur des cellules cancéreuses du sein et du colon a suggéré que le transport des MMPs pourrait s'effectuer grâce aux microtubules (présents à la base de l'invadopode) qui achemineraient des vésicules contenant des MMPs (Schoumacher *et al.*, 2010). La libération des vésicules au niveau du podosome nécessiterait quant à elle la présence de la protéine *IQ motif containing GTPase activating protein 1* (IQGAP1) pour assurer la stabilisation des extrémités positives des microtubules (Watanabe *et al.*, 2004) et du complexe « exocyst » composé de huit sous-unités protéiques dont le rôle est de lier les vésicules de sécrétion à la membrane plasmique (Heider and Munson, 2012). L'étude de Sakurai-Yageta *et coll.* (2008) a

d'ailleurs démontré que l'inhibition par ARN interférents du complexe « exocyst » empêche l'accumulation de la *Membrane type 1 metalloprotease* (MT1-MMP) au niveau de la membrane de l'invadopode.

#### 1.2.4. Les *blebs*

Pour la première fois observés en 1919 par Hogue, les *blebs* (Figure 3E) sont des protrusions membranaires sphériques qui ressemblent à des cloques ou des bulles (Holtfreter, 1943). Ces structures sont généralement associées à une des phases du processus d'apoptose cellulaire (Robertson *et al.*, 1978), bien qu'elles apparaissent également à la surface de cellules saines lors de la division (Tokumitsu and Maramorosch, 1967) ou lors de l'étalement cellulaire (Erickson and Trinkaus, 1976). Des études plus récentes se sont intéressées aux rôles de ces *blebs* au cours de la migration cellulaire (Fackler and Grosse, 2008). Ainsi, il a été montré que les cellules de nombreuses lignées tumorales telles que les mélanomes M2 (Cunningham, 1995) ou les carcinomes Walker issus d'une tumeur mammaire spontanée de Rat (Keller and Bebie, 1996) émettent des *blebs* lorsqu'elles migrent. Leur apparition résulte d'une rupture du cortex cellulaire (Keller and Egli, 1998) ou de son détachement de la membrane plasmique (Cunningham, 1995) initié par la GTPase Rho et son effecteur *Rho-associated protein kinase* (ROCK) (Sahai and Marshall, 2003). En effet, l'activation de ROCK entraîne une phosphorylation de la *myosine light chain* (MLC) de la myosine II et par conséquent, une augmentation des contractions de l'actomyosine qui déstabilisent ainsi le cortex d'actine. Le *bleb* va ensuite croître sous la pression hydrostatique qui s'exerce sur la membrane plasmique (Cunningham, 1995). Ainsi, les *blebs* se distinguent des autres protrusions précédemment décrites par leur croissance qui ne requiert pas la polymérisation des filaments d'actine. Finalement, la rétractation du *bleb* succède à la reformation du cortex d'actomyosine de la cellule par la myosine II (Charras *et al.*, 2008).



**Figure 3. Représentation schématique de la formation des différents types de protrusion.** **A.** Localisation subcellulaire et photographies en microscopie électronique des cinq types de protrusions détectables à la surface cellulaire au cours de la migration. Les lamellipodes (extrait de Svitkina *et al.*, 1997) sont localisés à l’avant de la cellule; les filopodes (extrait de Svitkina *et al.*, 2003) peuvent émerger des lamellipodes mais sont également retrouvés sur d’autres régions cellulaires; les podosomes (extrait de Luxenburg *et al.*, 2007) et les invadopodes (extrait de Schoumacher *et al.*, 2010) se situent sur la face ventrale de la cellule et s’ancrent dans la MEC; les *blebs* (extrait de Barros *et al.*, 2003) peuvent se développer sur l’ensemble de la surface membranaire. **B.** Modèle de formation d’un lamellipode. Suite à la polarisation cellulaire, les deux Rho-GTPases Rac et Cdc42 sont activées à l’avant de la cellule. Rac et Cdc42 activent WAVE et WASP, respectivement, qui à leur tour entraînent la polymérisation et la ramification de l’actine en stimulant le facteur de nucléation Arp2/3. Cdc42 stimule également la formine mDia2 conduisant à la polymérisation d’actine. La cofiline, en clivant les filaments d’actine préexistants, fournit au complexe Arp2/3, de nouvelles extrémités libres. Enfin, en se liant au complexe Arp2/3 et aux filaments d’actine, la cortactine stabilise le réseau d’actine et le lamellipode. **C.** Modèle de formation d’un filopode. L’action de la GTPase Cdc42 va

conduire à la formation du filopode soit à partir du réseau d'actine préexistant au niveau du lamellipode, soit *de novo*. Dans le premier cas, Cdc42 active WASP qui, comme au niveau du lamellipode, entraîne l'activation de Arp2/3 conduisant à la polymérisation d'actine à partir du réseau d'actine préexistant. Dans le second cas, Cdc42 active mDia2 qui polymérise l'actine et crée de nouveaux filaments. La fascine réticule ces filaments formant ainsi les paquets de filaments parallèles d'actine qui caractérisent les filopodes. La protéine VASP stabilise le filopode en se liant aux extrémités des filaments d'actine. Cdc42 peut également activer la protéine IRSp53 responsable de l'incurvation de la membrane plasmique à la base du filopode. **D.** Modèle de formation d'un podosome ou d'un invadopode, qui ressemble à celui d'un filopode, mais se différencie par la libération de MMPs qui lysent la MEC. Encore mal connu, ce mécanisme impliquerait la présence de microtubules pour acheminer les vésicules jusqu'au podosome, puis l'association d'IQGAP1 et du complexe « exocyst » pour libérer les vésicules au niveau du podosome. **E.** Modèle de formation d'un *bleb*. La formation d'un *bleb* nécessite l'activation de Rho et de son effecteur ROCK responsable de la phosphorylation de la MLC de la myosine II. Cette phosphorylation contracte l'actomyosine et déstabilise le cortex d'actine. Celui-ci est rompu ou décollé de la membrane plasmique, et la pression hydrostatique intracellulaire pousse la membrane conduisant au *bleb*. Arp2/3: *actine-related protein 2/3*; Cdc42: *cell division control protein 42*; CIP4: *Cdc42 interacting protein 4*; IQGAP1: *IQ motif containing GTPase activating protein 1*; IRSp53: *insulin receptor phosphotyrosine 53 kDa substrate*; mDia2: *mammalian Diaphanous 2*; MEC: matrice extracellulaire; ROCK: *Rho-associated protein kinase*; VASP: *vasodilator-stimulated phosphoprotein*; WASP: *Wiskott-Aldrich syndrome protein*; WAVE: *WASP family verprolin-homologous protein*.

### 1.3. Adhésion

Les protrusions peuvent être ensuite stabilisées par la liaison du cytosquelette d'actine à la MEC ou à une autre cellule adjacente. Cette liaison va se faire par l'intermédiaire de nombreux récepteurs situés à la surface membranaire tels que les intégrines, les plus étudiés, qui permettent l'apparition de structures adhésives à la surface cellulaire.

#### 1.3.1. Constituants de la matrice extracellulaire

La MEC est présente dans tous les tissus et procure un support essentiel à l'ancrage des cellules. Elle est produite par les cellules qui composent les différents tissus et elle est, par conséquent, propre à chacun d'entre eux. La matrice est principalement composée d'eau et de deux grandes classes de macromolécules, *i.e.* les protéoglycanes et les protéines fibreuses (Järveläinen *et al.*, 2009).

Les protéoglycanes occupent la majorité de l'espace interstitiel dans les tissus sous la forme d'un gel (Järveläinen *et al.*, 2009). Ils remplissent un large éventail de fonctions qui

leur permettent de maintenir l'homéostasie tissulaire en jouant le rôle de tampon, et en favorisant l'hydratation et l'adhésion.

Les protéines fibreuses les plus abondantes sont les collagènes, les élastines, les fibronectines et les laminines (Frantz *et al.*, 2010). Parmi elles, le collagène est majoritaire et représente plus de 30% de la masse totale d'un organisme multicellulaire. Il existe de nombreux types de collagène incluant les types I, III, IV et V (Hulmes, 2002). La première fonction du collagène est d'agir comme un support à la liaison des autres protéines de la MEC. Il procure par ailleurs une élasticité au tissu, régule l'adhésion et la migration cellulaire (Rozario and DeSimone, 2010). La plupart du collagène interstitiel est sécrété par les fibroblastes (De Wever *et al.*, 2008). L'une des protéines liant le collagène est l'élastine, la protéine structurelle majeure de la matrice (Kielty *et al.*, 2002).

Les protéines de la MEC ne jouent pas seulement un rôle dans le support des cellules, mais interviennent aussi dans de nombreux processus biologiques grâce à leur capacité à lier divers partenaires protéiques tels que les autres protéines de la MEC, des facteurs de croissance et des récepteurs. Le meilleur exemple est celui de la fibronectine qui est principalement produite par les fibroblastes et qui lie le collagène et l'*heparan sulfate proteoglycan* (HSPG) (Ruoslahti and Engvall, 1980). La fibronectine contient également un motif RGD (Arg-Gly-Asp) de liaison aux intégrines (Ruoslahti and Pierschbacher, 1987). La laminine quant à elle, est largement présente dans la membrane basale et participe à l'élasticité du tissu (Domogatskaya *et al.*, 2012).

### **1.3.2. Les différents types d'adhésion**

Plusieurs types d'adhésions peuvent être observés à l'interface cellule-matrice. Elles apparaissent successivement et sont caractérisées par leur composition protéique, leur taille, leur stabilité dans le temps et leur degré de maturation (Figure 4).



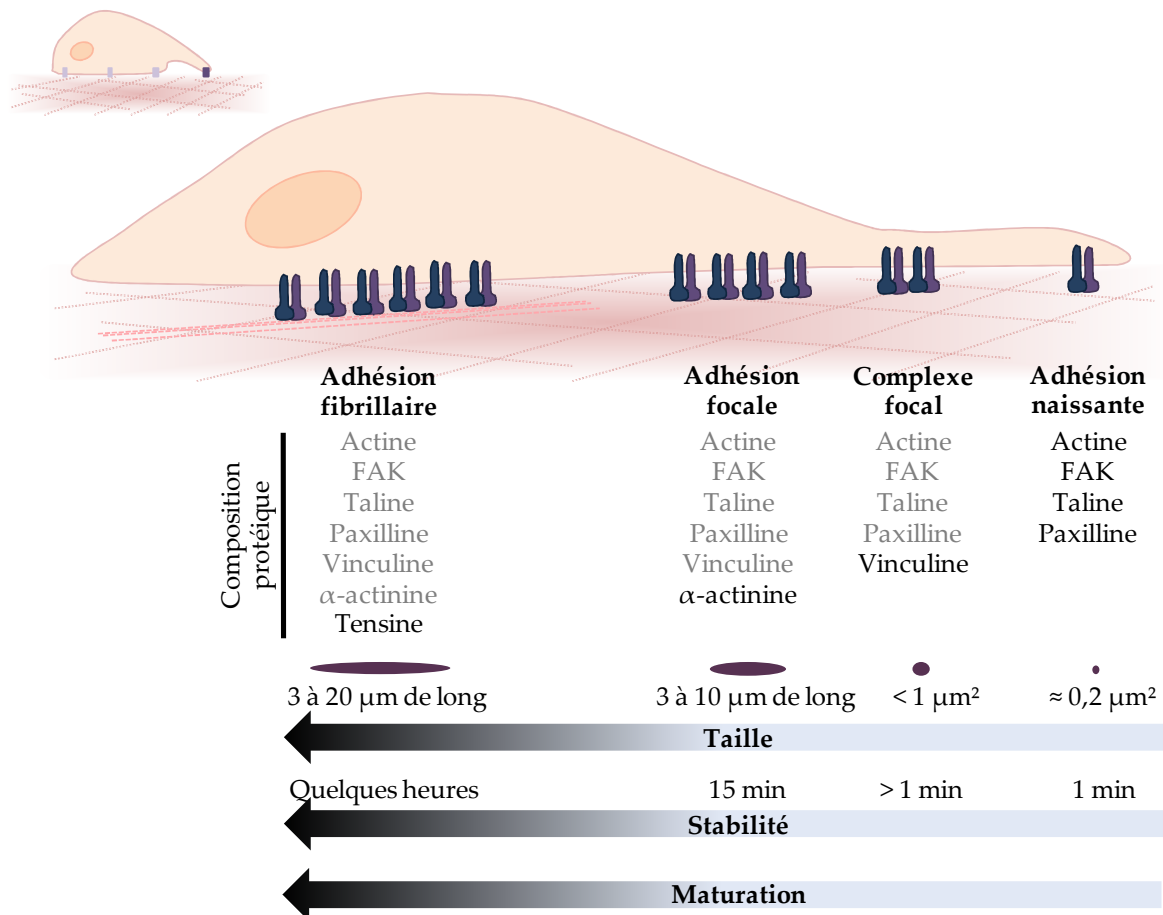
**Les adhésions naissantes** sont les premières structures adhésives observables, formées à partir et au cours de l'extension du lamellipode (Alexandrova *et al.*, 2008; Gardel *et al.*, 2010). Elles sont petites ( $0,2 \mu\text{m}^2$  environ) avec une durée de vie très courte de l'ordre de quelques secondes à 1 min (Alexandrova *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2008). Elles sont d'ailleurs difficilement observables, et c'est grâce à l'utilisation de la microscopie TIRF qu'il a été possible de décrire en détail la structure et la dynamique de ces adhésions (Choi *et al.*, 2008). Ainsi, il a été mis en évidence que ces structures contiennent de l'actine, la *focal adhesion kinase* (FAK), la taline et la paxilline, puis évoluent soit vers des structures plus stables que l'on appelle des complexes focaux, soit vers un processus de désassemblage (Choi *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2011; Lawson *et al.*, 2012).

Les formes stables permettent à la cellule de générer des zones d'adhésion différentielles, de l'avant vers l'arrière de la cellule (Figure 4). **Les complexes focaux** ainsi formés ( $< 1 \mu\text{m}^2$ ) sont localisés près du front de migration ainsi qu'au niveau des lamellipodes (Izzard, 1988). Caractérisée par le recrutement de la vinculine, la formation de ces complexes (DePasquale and Izzard, 1987), permet la liaison « focale » de la MEC au cytosquelette d'actine. Les complexes focaux nouvellement formés sont des structures dépendantes de l'activation de Rac et contiennent, avec la vinculine et la paxilline, des phosphoprotéines telles que la FAK (Nobes and Hall, 1995). Ces structures vont persister quelques minutes et vont évoluer en structures plus larges appelées adhésions focales (Parsons *et al.*, 2010).

**Les adhésions focales** ont été initialement décrites dans les années 60-70 suite à l'observation par *interference reflection microscopy* d'aires sombres représentant des régions de contacts très serrés entre la face ventrale de la cellule et le substrat (Curtis, 1964; Izzard and Lochner, 1976; Heath and Dunn, 1978). La même observation fut simultanément faite par microscopie électronique (Abercrombie *et al.*, 1971; Heath and Dunn, 1978; Couchman and Rees, 1979). Les adhésions focales mesurent environ  $2 \mu\text{m}$  de large sur 3 à  $10 \mu\text{m}$  de long et sont présentes à l'extrémité des fibres de stress d'actine. Elles peuvent se désassembler dans

les 15 min (Gupton and Waterman-Storer, 2006) ou atteindre un stade plus important de maturation.

Enfin les **adhésions fibrillaires** sont des structures ressemblant à des fibres d'une longueur variant entre 3 et 20  $\mu\text{m}$ . Ce type de structures représente la dernière étape de maturation des adhésions et provient des adhésions focales (Pankov *et al.*, 2000). Ces adhésions fibrillaires sont caractérisées par la présence sous la cellule de larges fibres de stress de tensine et de fibronectine fibrillaire (Zamir *et al.*, 1999).



**Figure 4. Représentation schématique des caractéristiques des différents types de structures adhésives.** De droite à gauche, les structures adhésives sont représentées en fonction de leur apparition dans la cellule. Elles diffèrent les unes des autres par leur composition protéique globale, leur taille et leur stabilité. FAK: *focal adhesion kinase*.

### 1.3.3. Formation et maturation des adhésions

Les adhésions naissantes, précurseurs des adhésions, se forment dans le lamellipode des cellules en migration. Les mécanismes qui régulent leur formation ne sont pas pleinement élucidés, mais deux modèles ont été proposés (Parsons, *et al.*, 2010). Le premier modèle

hypothétique est basé sur la quantité importante d'intégrines activées présentes dans les lamellipodes. Il suggère un mécanisme dans lequel les intégrines activées interagissent avec leur ligand de la MEC (Tableau 1), conduisant au regroupement des intégrines ainsi qu'au recrutement de protéines intracellulaires (Kiosses *et al.*, 2001). Dans le second modèle, l'assemblage est initié par la polymérisation de l'actine, le réseau d'actine dendritique du lamellipode servant d'ancrage aux protéines d'adhésion et celles-ci entraînant, à leur tour, l'agrégation des intégrines. A l'appui de ce dernier modèle, l'utilisation d'inhibiteurs de polymérisation d'actine prévient la formation des adhésions naissantes, confirmant que celle-ci est directement couplée au taux de polymérisation de l'actine, à l'avant de la cellule (Alexandrova *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2008). En réalité, la polymérisation de l'actine ainsi que la liaison des intégrines à la MEC sont toutes deux indispensables à la formation des adhésions (Hotchin and Hall, 1995).

Ligands de la MEC	Intégrines et syndécanes
<b>Collagène</b>	$\alpha 1\beta 1$ ; $\alpha 2\beta 1$ ; $\alpha 10\beta 1$ ; $\alpha 11\beta 1$ ; syndécane 4; syndécane 1; syndécane 2; CD44
<b>Fibronectine</b>	$\alpha v\beta 1$ ; $\alpha v\beta 3$ ; $\alpha v\beta 5$ ; $\alpha v\beta 6$ ; $\alpha 4\beta 1$ ; $\alpha 5\beta 1$ ; $\alpha 8\beta 1$ ; $\alpha IIb\beta 3$ ; $\alpha M\beta 2$ ; syndécane 4; syndécane 2; CD44
<b>Laminine</b>	$\alpha 1\beta 1$ ; $\alpha 2\beta 1$ ; $\alpha 3\beta 1$ ; $\alpha 6\beta 1$ ; $\alpha 7\beta 1$ ; $\alpha 6\beta 4$ ; syndécane 4; syndécane 1
<b>Tenascine</b>	$\alpha 2\beta 1$ ; $\alpha v\beta 3$ ; $\alpha v\beta 6$
<b>Fibrinogène</b>	$\alpha v\beta 3$ ; $\alpha v\beta 5$ ; $\alpha v\beta 6$ ; $\alpha IIb\beta 3$ ; $\alpha X\beta 2$ ; $\alpha M\beta 2$ ; CD44
<b>Ostéopontine</b>	$\alpha v\beta 1$ ; $\alpha v\beta 3$ ; $\alpha v\beta 5$ ; CD44
<b>Thrombospondine</b>	$\alpha v\beta 3$ ; $\alpha v\beta 5$ ; $\alpha 3\beta 1$ ; $\alpha 5\beta 1$ ; $\alpha 6\beta 1$ ; $\alpha 9\beta 1$
<b>Vitronectine</b>	$\alpha v\beta 1$ ; $\alpha v\beta 3$ ; $\alpha v\beta 5$ ; $\alpha v\beta 6$ ; $\alpha v\beta 8$ ; $\alpha D\beta 2$
<b>Fibrilline-1</b>	$\alpha v\beta 3$ ; $\alpha v\beta 6$ ; $\alpha 5\beta 1$
<b>Héparine</b>	$\alpha X\beta 2$ ; $\alpha M\beta 2$
<b>Plasminogène</b>	$\alpha D\beta 2$
<b>Von Willebrand Factor</b>	$\alpha v\beta 3$ ; $\alpha IIb\beta 3$
<b>Acide hyaluronique</b>	CD44

**Tableau 1. Ligands de la MEC et récepteurs respectifs.** Les intégrines sont des récepteurs composés des sous-unités  $\alpha$ (1-11, IIb, v, D, M, X) et  $\beta$ (1-8). Modifié et complété d'après Niu, 2011. MEC: matrice extracellulaire.

Les intégrines sont des hétérodimères de récepteurs composés de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  variables (Tableau 1). Elles sont ancrées dans la membrane plasmique et sont capables de lier, au niveau de leur longue partie extracellulaire, les molécules de la MEC telles que le collagène ou la fibronectine (Margadant *et al.*, 2011). Le récepteur peut se présenter sous

différentes conformations lui conférant une basse-, moyenne- ou haute affinité pour son ligand (Margadant *et al.*, 2011). Les intégrines sont normalement présentes à la surface cellulaire dans leur conformation inactive, *i.e.* qui ne leur permet pas de se lier efficacement à la MEC. Cette particularité joue un rôle majeur dans les cellules du système immunitaire qui circulent dans les vaisseaux sanguins avec un minimum d'interaction et dans lesquelles une activation physiopathologique des intégrines pourrait provoquer une thrombose (He *et al.*, 2003).

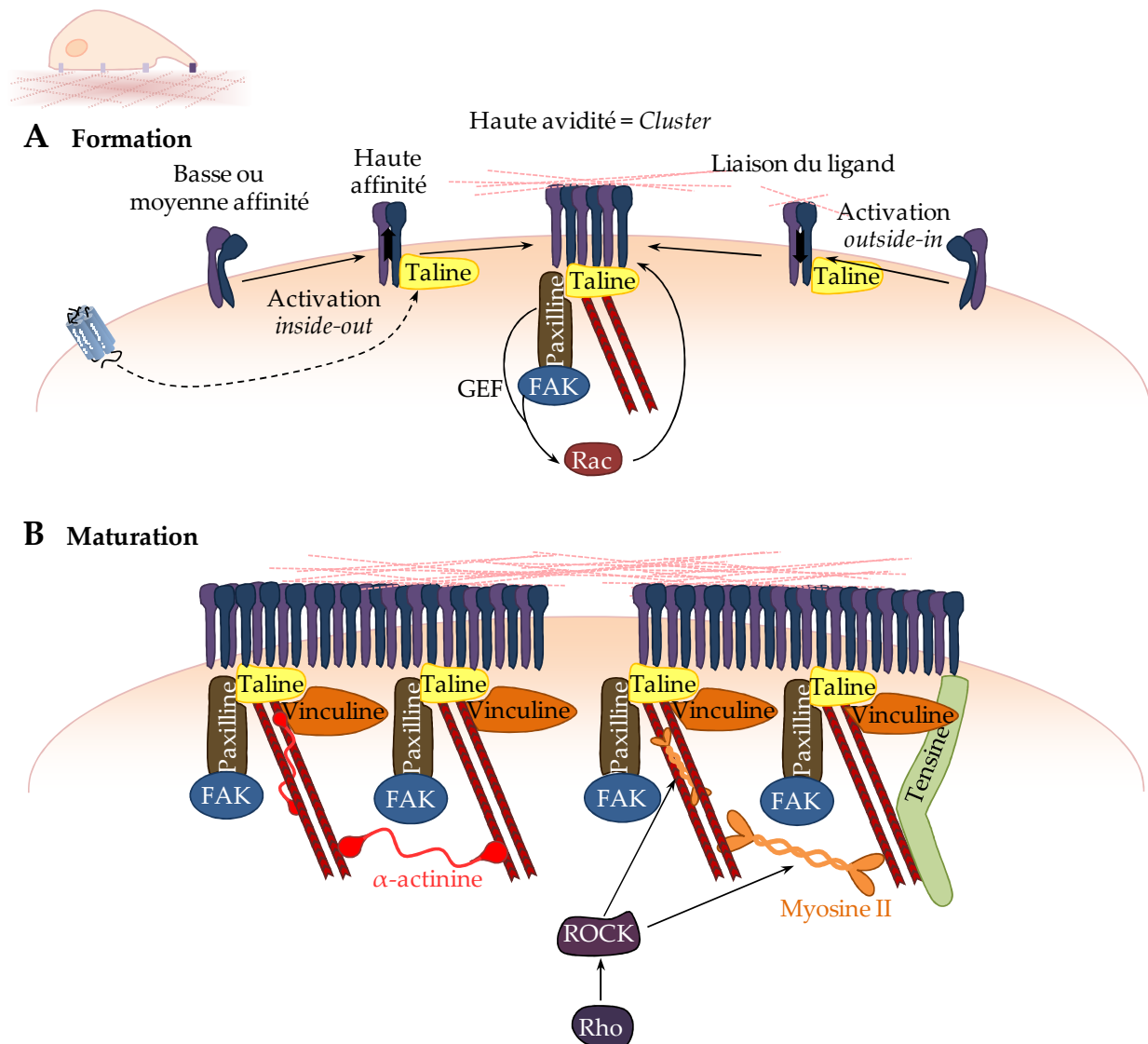
L'activation des intégrines peut se faire de deux manières (Figure 5): *i)* la liaison du ligand extracellulaire au récepteur induit une réponse intracellulaire, on parle d'activation *outside-in*, *ii)* la liaison d'une protéine adaptatrice intracellulaire au récepteur entraîne une réponse extracellulaire, on parle d'activation *inside-out* (Margadant *et al.*, 2011). Ce dernier mécanisme est très répandu dans les cellules circulantes. En effet, leur stimulation catalyse une cascade de signalisation responsable du recrutement de la taline à l'extrémité cytoplasmique des  $\beta$ -intégrines provoquant ainsi leur activation (Tadokoro *et al.*, 2003). Cette activation augmente leur affinité pour des éléments de la MEC de type fibronectine (elles passent alors d'une basse- ou moyenne affinité à une haute affinité) (Margadant *et al.*, 2011) mais l'adhésion de la cellule au substrat requiert la formation locale de *cluster* d'intégrines leur conférant une haute avidité pour les éléments de la MEC (Figure 5).

Les intégrines ainsi activées et regroupées, vont relayer des signaux intracellulaires (Legate *et al.*, 2009). Quel que soit le mode d'activation des intégrines (*inside-out* ou *outside-in*), la première protéine recrutée est la taline qui établit le premier lien entre les intégrines et le cytosquelette (Jiang *et al.*, 2003). L'importance de ce lien est soulignée par des études *in vivo* montrant que la délétion chez la Souris du gène de la taline est létale dès le stade de la gastrulation, les cellules présentant un défaut d'organisation du cytosquelette et de la migration (Monkley *et al.*, 2000). La liaison de la taline est rapidement suivie par le recrutement d'autres protéines telles que la paxilline, l'une des premières protéines détectées

au niveau des adhésions naissantes. Elle agit comme une véritable plate-forme protéique qui régule l'interaction entre les intégrines et le cytosquelette en modulant la composition protéique des adhésions (Turner, 2000). Là encore, la génération d'une souris *knock out* (KO) a permis de démontrer l'importance de cette protéine dans le développement et la migration, particulièrement au niveau des structures dérivées du mésoderme telles que le cœur ou les somites (Hagel *et al.*, 2002). La paxilline recrute, entre autres, la FAK qui n'est pas nécessaire à la formation des adhésions (Llić *et al.*, 1995) mais qui stabilise ces dernières en phosphorylant ses effecteurs. Une autre protéine recrutée par la taline, la vinculine, joue un rôle important dans la croissance et la maturation des adhésions. Des fibroblastes déficients en vinculine forment de petites adhésions instables comparées à celles présentes sur les fibroblastes sauvages (Saunders *et al.*, 2006). La vinculine permet d'ailleurs la stabilisation des adhésions en consolidant l'interaction entre la taline et l'actine par sa liaison directe à ces deux protéines (Humphries *et al.*, 2007). L' $\alpha$ -actinine peut quant à elle se lier directement aux  $\beta$ -intégrines (Otey *et al.*, 1990) et participe à l'élasticité et à la stabilité du couple intégrine-actine en reliant les filaments d'actine (Choi *et al.*, 2008). A un stade plus tardif, la tensine est recrutée au niveau des adhésions (Zamir *et al.*, 1999). Par l'intermédiaire de ses trois domaines de liaison à l'actine, la tensine lie fermement les intégrines à l'actine (Lo *et al.*, 1994).

Les RhoGTPases semblent, là encore, jouer un rôle dans la formation des adhésions (Nobes and Hall, 1995). Néanmoins, les mécanismes moléculaires précis par lesquels Rho, Rac et Cdc42 participent à l'assemblage des adhésions restent encore obscurs. L'explication la plus simple est que Rac et Cdc42 provoquent la formation des protrusions qui vont aller au contact de la MEC, et par conséquent induire l'activation des intégrines. Il a également été montré que Rac permet la localisation d'intégrines en conformation de haute affinité à l'avant du lamellipode, favorisant la formation de nouvelles adhésions à ce niveau (Kiosses *et al.*, 2001). Dans le cas des intégrines, il est observé une activation locale de Rac par le biais de

diverses GEFs elles-mêmes activées par la FAK ou la paxilline (Kiyokawa *et al.*, 1998; Nayal *et al.*, 2006). Il s'agit d'une véritable communication entre Rac et les intégrines qui favorise l'extension du lamellipode couplée à la formation de nouvelles adhésions.



**Figure 5. Représentation schématique de la formation et de la maturation des adhésions.** **A.** La formation des adhésions est initiée par l'activation des intégrines qui peut être une activation de type *inside-out* ou de type *outside-in*. Dans le premier cas, l'activation de voies intracellulaires résultant, dans certains cas, de l'activité d'un récepteur, entraîne le recrutement de la taline à l'extrémité cytoplasmique des intégrines. La taline conduit alors au changement conformationnel des intégrines qui acquièrent une haute affinité pour leur ligand. Dans le deuxième cas, c'est la liaison du ligand aux intégrines qui provoque le changement de conformation et le recrutement de la taline. Les intégrines vont ensuite se regrouper, augmentant ainsi leur avidité. La taline établit le contact entre les intégrines et l'actine et recrute très rapidement la paxilline qui lie elle-même la FAK. Ces deux protéines stimulent des GEF responsables de l'activation locale de Rac. Cette RhoGTPase a en retour la capacité d'activer les intégrines. **B.** Lors de la maturation, de nouvelles protéines sont recrutées, notamment la vinculine qui se lie à la taline et stabilise sa liaison à l'actine, et l' $\alpha$ -actinine et la myosine II qui relient les filaments d'actine entre eux. La myosine II est activée par la voie Rho-ROCK. Enfin, à un stade de maturation avancée, la tensine stabilise davantage les adhésions en reliant les intégrines aux filaments d'actine. FAK: *focal adhesion kinase*; GEF: *guanine nucleotide exchange factor*; ROCK: *Rho-associated protein kinase*.

La GTPase Rho serait davantage impliquée dans la maturation et la stabilisation des adhésions (Ridley and Hall, 1992; Hotchin and Hall, 1995). Une microinjection de la forme constitutivement active de RhoA dans des cellules quiescentes est capable de générer la formation rapide d'adhésions focales. Cette GTPase est d'abord inhibée durant la phase initiale de l'adhésion par une GAP (dont l'activation résulte d'un couplage intégrine/Src, Arthur *et al.*, 2000), puis activée pour conduire à l'apparition de fibres de stress d'actine et à la maturation des adhésions. En effet, le regroupement des filaments d'actine est relayé par un effecteur de Rho, la protéine ROCK capable de phosphoryler la MLC de la myosine II (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996; Kimura *et al.*, 1996).

Malgré leur grand nombre, les intégrines ne sont pas les seuls récepteurs de l'adhésion. Appelés syndécanes, un autre type de récepteurs participe également à la formation des adhésions (Morgan *et al.*, 2007). Ils constituent une famille de protéoglycanes à héparane sulfate transmembranaires contenant une partie protéique enchâssée dans la membrane plasmique et une chaîne de sucres glycosaminoglycanes extracellulaire qui reconnaît les ligands de la MEC (Tableau 1). Chez les mammifères, on compte quatre syndécanes dont trois (syndécanes 1 à 3) sont exprimés de façon spécifique dans certains tissus et un (syndécane 4) exprimé de façon ubiquiste. Ils se comportent à la fois comme des récepteurs de facteurs de croissance et comme des molécules de la MEC (Bernfield and Sanderson, 1990).

## **1.4. Contraction-traction-rétractation**

### **1.4.1. Mécanismes cellulaires**

La formation et la stabilisation des adhésions permettent aux cellules d'exercer une force de contraction sur le substrat. Nécessaire pour faire avancer la cellule, cette force dépend de l'interaction de la myosine II avec les filaments d'actine reliés aux sites d'adhésion (Ridley, 2003). La contraction d'actomyosine est activée par de nombreuses voies intracellulaires

impliquant la phosphorylation de la MLC par la MLC kinase (MLCK) ou par ROCK (Ridley, 2003). La MLCK peut être activée par l'*extracellular signal-regulated kinase* (ERK) (Klemke *et al.*, 1997) et la PAK (Sells *et al.*, 1999). A l'avant de la cellule en migration, les adhésions naissantes ou les complexes focaux induisent une importante force de contraction alors que les adhésions focales, plus matures et plus larges, exercent une faible traction (Beningo *et al.*, 2001). A l'inverse, dans les cellules plus adhérentes, la force de traction est proportionnelle à la taille des adhésions focales (Balaban *et al.*, 2001). Enfin, la rétractation de la cellule résulte de la contraction du corps cellulaire qui favorise le désassemblage des adhésions situées à l'arrière de la cellule. Ces deux phénomènes combinés conduisent à la translocation du corps cellulaire permettant à la cellule d'avancer.

#### 1.4.2. Rôle du désassemblage des adhésions

Le désassemblage des adhésions s'observe à la fois à l'avant de la cellule (où il accompagne la formation de nouvelles protrusions) et à l'arrière de la cellule (où il permet la rétractation).

**A l'avant de la cellule**, les adhésions présentes à la base de la protrusion se désassemblent rapidement alors qu'au même moment, d'autres adhésions se forment à l'avant de cette protrusion afin d'assurer l'avancement de la cellule, on parle alors de *turnover* (Webb *et al.*, 2002). De nombreuses protéines sont impliquées dans le désassemblage des adhésions (Webb *et al.*, 2002; Nagano *et al.*, 2012). Parmi elles, les microtubules jouent un rôle très important (Ezratty *et al.*, 2005). En effet, le traitement de cellules adhérentes avec du nocodazole, une drogue perturbant la polarisation des microtubules, stabilise les adhésions focales en inhibant leur désassemblage et, de ce fait, augmente l'adhésion des cellules à la MEC (Kaverina *et al.*, 1999; Ezratty *et al.*, 2005). Ce mécanisme requiert la présence d'une protéine motrice, la kinésine-1 (Krylyshkina *et al.*, 2002), qui jouerait un rôle dans le transport des protéines de désassemblage des adhésions, le long des microtubules polarisés (Hirokawa *et al.*, 2009).



L'inhibition de la kinésine-1 entraîne la stabilisation des adhésions focales accompagnée par une augmentation de leur taille et une réduction de leur nombre, mais ne perturbe ni la direction des microtubules vers les adhésions focales ni leur polymérisation (Krylyshkina *et al.*, 2002). Ces données suggèrent que des facteurs de désassemblage des adhésions focales sont acheminés le long des microtubules par un mécanisme dépendant de la kinésine-1 (Nagano *et al.*, 2012). Les microtubules sont également capables de lier la GTPase dynamine (Shpetner and Vallee, 1989) qui, recrutée au niveau des adhésions focales avec la FAK et la Src (Wang *et al.*, 2011b), initie l'internalisation des intégrines (Ezratty *et al.*, 2005; Chao and Kunz, 2009).

La FAK aurait à la fois un rôle dans la maturation des adhésions et dans leur *turnover* (Mitra *et al.*, 2005). Cependant, il apparaît que l'absence de FAK a davantage d'impact sur le désassemblage des adhésions que sur leur formation. En effet, Llić et coll. (1995) ont montré une réduction de la motilité des fibroblastes issus d'une lignée de souris transgéniques déficientes en FAK, *via* l'augmentation du nombre des adhésions focales. Sur des modèles cellulaires exprimant normalement la FAK, son état de phosphorylation semble nécessaire au recrutement de la dynamine, elle-même impliquée dans le désassemblage des adhésions, alors que sa déphosphorylation par les protéines tyrosines phosphatases (PTPs) PTP-PEST (Zheng *et al.*, 2009), *src* homology 2 containing phosphotyrosine phosphatase (SHP-2) (de Oliveira *et al.*, 2009) et PTP-1B (Liang *et al.*, 2005), consécutive à l'extension des microtubules, conduit au désassemblage des adhésions focales (Ezratty *et al.*, 2005). En particulier, la déphosphorylation de FAK par SHP-2, serait responsable de l'arrêt de la phosphorylation de l' $\alpha$ -actinine (von Wichert *et al.* 2003), qui dans cet état, peut lier l'actine et stabiliser les adhésions (maturation). Ainsi, le rôle de la FAK pourrait dépendre de sa localisation cellulaire, *i.e.* elle entraînerait le *turnover* des adhésions à l'avant de la cellule, au niveau des adhésions naissantes, et participerait à leur maturation lorsqu'elle est présente au milieu de la cellule, au niveau des adhésions focales.

A l'arrière de la cellule, les adhésions sont fortement liées au substrat, leur clivage résulte le plus souvent de la forte tension exercée par les forces de contraction (Crowley and Horwitz, 1995; Palecek *et al.*, 1996). Dans ces conditions, les intégrines restent associées avec le substrat sous forme de structures fibreuses tandis que le reste de la cellule progresse vers l'avant (Laukaitis *et al.*, 2001). La myosine II jouerait un rôle dans le désassemblage de ces adhésions. En effet, des monocytes ou des neutrophiles dans lesquels l'assemblage de myosine II est bloqué, présentent un défaut de rétractation et l'apparition de nombreux pseudopodes (Xu *et al.*, 2003). La FAK et les autres régulateurs du *turnover* des adhésions à l'avant de la cellule peuvent également jouer un rôle indirect à l'arrière de la cellule. La tension générée par les adhésions dans les cellules en migration provoque l'ouverture des canaux calciques mécano-sensibles (Lee *et al.*, 1999). L'influx de calcium qui en résulte va alors activer les protéases calpaïnes, dont la calpaïne II, qui clive de nombreuses protéines des adhésions focales telles que la FAK, la taline et la paxilline (Franco *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2010; Cortesio *et al.*, 2011) mais aussi les intégrines (Lee *et al.*, 1999).

L'ensemble des mécanismes décrit précédemment (polarisation, protrusion, adhésion, contraction et rétractation) contribue à la migration cellulaire directionnelle. Néanmoins, les capacités invasives des cellules en conditions physiologiques et physiopathologiques requièrent également la dégradation de la MEC, un mécanisme qui est abordé dans le §3.

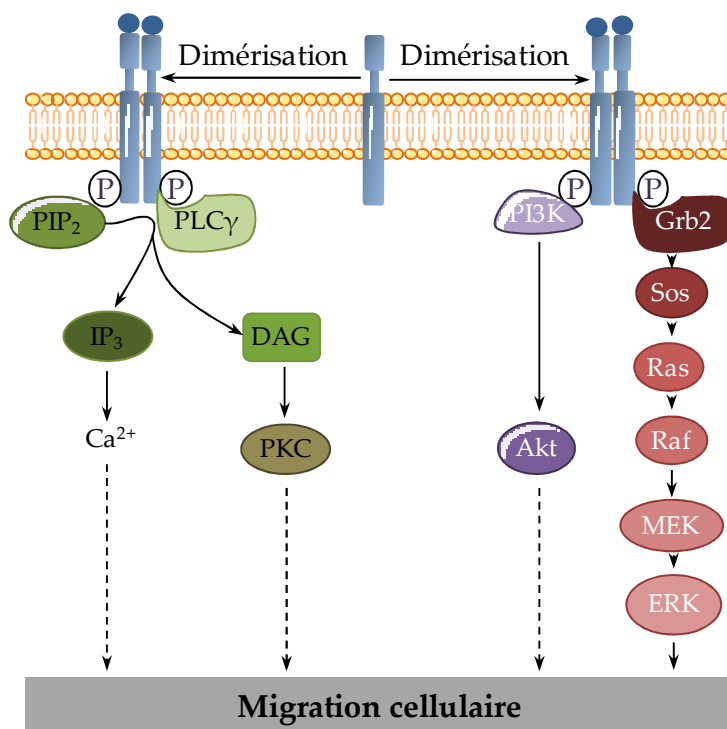
## 2. Les récepteurs régulant la migration cellulaire

### 2.1. Les récepteurs tyrosine kinase (RTKs)

Les RTKs sont des récepteurs membranaires qui contrôlent de nombreux processus cellulaires tels que la survie, la prolifération, la différenciation et la migration (Schlessinger, 2000). Ils possèdent un seul domaine transmembranaire abritant un site de liaison pour son ligand extracellulaire et un domaine kinase intracellulaire qui leur a valu leur appellation (Hubbard and Till, 2000). Chez l'Homme, 58 RTKs ont été identifiés et regroupés en 20

familles, classés selon la nature de leurs ligands et la composition moléculaire de leur domaine extracellulaire. Parmi les RTKs les plus communément impliqués dans la migration, on peut citer la famille de l'EGFR, du *fibroblast growth factor receptor* (FGFR), du *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) et du *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR). A l'exception des représentants de la famille de l'*insulin receptor* (IR) (Ward *et al.*, 2007), les RTKs sont exprimés sous forme monomérique à la membrane plasmique et c'est la liaison du ligand qui induit leur dimérisation, catalysant l'autophosphorylation de tyrosines au niveau des domaines cytoplasmiques (Ullrich and Schlessinger, 1990). Les résidus phosphorylés sont alors reconnus par des protéines adaptatrices. Parmi elles, la phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) est la première à avoir été identifiée (Meisenhelder *et al.*, 1989). Grâce au domaine *src homology 2* (SH2) qu'elle possède, elle lie la tyrosine phosphorylée du récepteur. Il en résulte une augmentation du *turnover* des polyphosphoinositides (PIPs), une augmentation du calcium cytosolique et l'activation de la protéine kinase C (PKC). La deuxième protéine adaptatrice, la *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) (Lowenstein *et al.*, 1992) est capable d'activer une GEF nommée *son of sevenless* (Sos), identifiée pour sa capacité à échanger le guanosine diphosphate (GDP) de la protéine Ras contre un GTP (Downward *et al.*, 1990; Wolfman and Macara, 1990). La protéine Ras peut ensuite lier la sérine/thréonine kinase Raf (Hallberg *et al.*, 1994), elle-même recrute la *mitogen-activated protein kinase/ERK kinase* (MEK) qui phosphoryle ERK1/2 (Kolch, 2000). L'ensemble de ces travaux a permis de caractériser cette cascade de signalisation RTKs-Grb2-Sos-Ras jouant un rôle majeur dans les mécanismes physiologiques et physiopathologiques (McCormick, 1993). La voie PI3K/Akt est une autre voie majeure activée par les RTKs (Bjorge *et al.*, 1990; Franke *et al.*, 1995). De fait, les RTKs sont des éléments essentiels de la signalétique cellulaire mais la dérégulation d'un certain nombre d'entre eux participe au développement tumoral. Nous pouvons citer le cas de l'EGFR dont l'amplification et la présence du mutant constitutivement actif EGFRvIII sont retrouvés dans de nombreux glioblastomes (Smith *et al.*,

2001; Shinojima *et al.*, 2003). De plus, la surexpression de l'EGFR dans des lignées cellulaires de cancer du sein induit la migration/processus métastatique *via* une voie dépendante des MEKs (Verbeek *et al.*, 1998), tandis que l'inhibition de l'activation de l'EGFR bloque la migration d'une lignée de cellules de cancer du sein (Hsieh *et al.*, 2013). Dans cette étude, l'utilisation d'inhibiteurs a permis de démontrer que les effets de l'EGFR sur la migration passe par la voie PI3K/Akt et l'expression de la métalloprotéinase matricielle 9 (MMP9) (Hsieh *et al.*, 2013).



**Figure 6. Représentation schématique des principales voies de signalisation de la migration associées aux récepteurs tyrosine kinase.** DAG: diacylglycérol; ERK: *extracellular signal-regulated kinase*; Grb2: *growth factor receptor-bound protein 2*; IP<sub>3</sub>: inositol trisphosphate; MEK: *mitogen-activated protein kinase/ERK kinase*; PI3K: phosphatidylinositol-3 kinase; PIP<sub>2</sub>: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PKC: protéine kinase C; PLC $\gamma$ : phospholipase C  $\gamma$ ; Sos: *son of sevenless*.

Il a également été établi que l'activation de l'EGFR induit une déphosphorylation d'une tyrosine de la FAK entraînant un *turnover* des adhésions, responsable de l'augmentation de la motilité et de l'invasion des cellules tumorales (Lu *et al.*, 2001b). De même, l'activation du FGFR2 par le *fibroblast growth factor 10* (FGF10) induit la migration et l'invasion de cellules cancéreuses pancréatiques *via* l'expression d'une autre métalloprotéase, la MT1-MMP (Nomura *et al.*, 2008). Le VEGF favorise lui-aussi la migration cellulaire de kératinocytes tumoraux (lignée HaCaT) en activant son récepteur de type 2. Le traitement de ces cellules par du VEGF conduit à l'autophosphorylation de la tyrosine du récepteur, à l'activation de la

PLC $\gamma$  et au recrutement de ERK1/2 (Yang *et al.*, 2006). Deux des récepteurs du *platelet-derived growth factor* (PDGF), le PDGFR $\alpha$  et le PDGFR $\beta$ , sont recrutés lors de la migration de cellules de la lignée fibroblastique NIH 3T3 (Yu *et al.*, 2001). Les récepteurs des éphrines forment la plus grande famille de RTKs, un certain nombre d'entre eux sont d'ailleurs impliqués dans la migration cellulaire, notamment au cours du développement (Klein, 2012). La liaison de l'éphrine A1 au récepteur EphA2 stimule la migration de cellules souches cardiaques après infarctus *in vivo* (Goichberg *et al.*, 2011). La surexpression du récepteur EphB3 dans les cancers du poumon non à petites cellules favorise le processus métastatique tumoral (Ji *et al.*, 2011).

## **2.2. Les récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G**

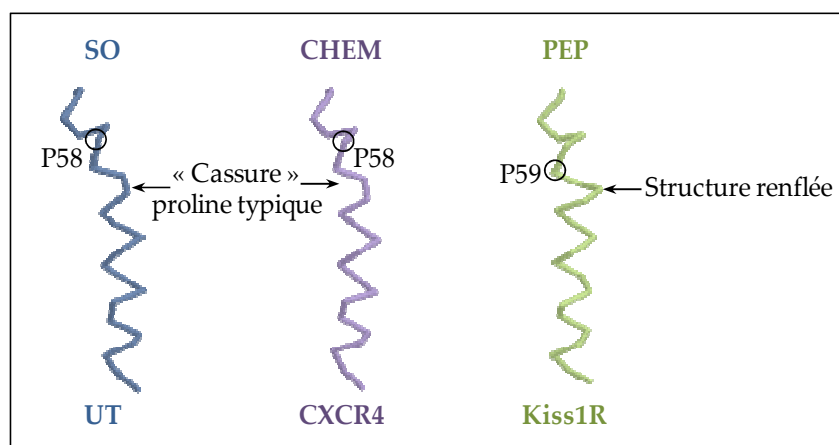
Avec plus de 800 gènes codant dans le génome humain, les RCPGs représentent la plus grande famille de récepteurs membranaires (Fredriksson *et al.*, 2003). Leur rôle principal est de traduire un stimulus extracellulaire en un signal intracellulaire. Ainsi, l'activation des RCPGs par leur ligand induit un large éventail de réponses cellulaires, et la dérégulation de l'un d'entre eux peut être à l'origine de diverses pathologies. Le nombre, la localisation et la fonction des RCPGs font de ces récepteurs des cibles d'intérêt potentiel pour de nombreuses molécules à visée thérapeutique et/ou pharmaceutique.

### **2.2.1. Classification des RCPGs**

Sur la base de leur homologie avec la Rhodopsine, les RCPGs contiennent sept hélices transmembranaires séparées par des boucles intra- et extracellulaires, un fragment extracellulaire N-terminal et un domaine intracellulaire C-terminal. La diversité des RCPGs est due à la fois à la grande variété des signaux qui peuvent les stimuler (neurotransmetteurs, hormones, molécules olfactrices, protéines, peptides, acides aminés, etc.) et à la diversité des voies intracellulaires qu'ils peuvent activer. Plusieurs classifications ont été proposées pour

tenter de faire un tri dans cette grande famille de récepteurs. L'une des plus utilisées est la répartition des RCPGs en six classes de A à F: Rhodopsine, Sécrétine, Métabotrope glutamate, *Fungal pheromone*, AMPc et *Frizzled smoothed* (Attwood and Findlay, 1994). Cette répartition permet de classer tous les RCPGs identifiés chez les vertébrés et les invertébrés et suppose que certaines familles de récepteurs ne sont pas présentes chez l'Homme, *e.g.* familles D et E. Une nouvelle classification, appelée GRAFS, et ne prenant en compte que les séquences des RCPGs identifiés dans le génome humain a donc été proposée en 2003 par Fredriksson et coll. Dans ce cas, les RCPGs humains sont répartis en cinq familles: Glutamate (G, 15 RCPGs), Rhodopsine (R, 701 RCPGs), Adhésion (A, 24 RCPGs), *Frizzled/taste2* (F, 24 RCPGs) et Sécrétine (S, 15 RCPGs). Compte tenu de son importance, la famille Rhodopsine (classe A), a été subdivisée en treize branches dont celle des chimiokines dans laquelle se trouvent des RCPGs impliqués dans la migration cellulaire tels que le récepteur du *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1) le *C-X-C chemokine receptor type 4* (CXCR4), ceux de l'angiotensine II (ANG-II) ou des bradykinines (BDK). De manière surprenante, 23 récepteurs n'ont pas pu être classés, parmi lesquels figure le récepteur de l'urotensine II (Fredriksson *et al.*, 2003). Une étude récente basée sur l'analyse phylogénétique et le « *multidimensional scaling* » permet d'affiner la classification des récepteurs de la famille Rhodopsine en considérant la position des prolines dans les domaines transmembranaires (TM) des récepteurs (Chabbert *et al.*, 2012). Il est en effet établi que les prolines jouent un rôle majeur dans la conformation des récepteurs; leur position est de ce fait hautement conservée dans tous les TM à l'exception du TM2. Ainsi, la sous-famille des RCPGs Rhodopsine est divisée en plusieurs groupes, tels que le groupe CHEM qui comprend les récepteurs aux chimiokines et aux peptides vasoactifs, le groupe PEP qui regroupe de nombreux récepteurs peptidiques, ou le groupe SO qui correspond aux récepteurs somatostatinerigiques. L'équipe du Dr Marie Chabbert (UMR CNRS 6214 - Inserm U771, Angers, France) avec laquelle notre équipe collabore, a montré que les récepteurs SO et

CHEM ont la particularité, en raison d'une délétion ancestrale, de contenir une proline en « position P2.58 » dans le deuxième domaine transmembranaire (TM2), suggérant une origine commune de ces récepteurs (Deville *et al.*, 2009). Grâce aux structures de RCPGs actuellement résolues, il a été observé que l'hélice 2 est déformée par un renflement qui est dû soit à une proline en position 2.59 soit à un motif glycine-glycine (GG). Il s'avère que la présence d'une proline en position 2.58 pour les familles SO et CHEM résulte de la délétion d'un résidu dans le groupe de récepteur ayant une proline en position 2.59 (récepteurs PEP, par exemple) et l'hypothèse actuellement voudrait que la position de cette proline en « 58 » conduise à une structure en coude proline « typique » et non à un renflement (Figure 7). Très récemment, cette hypothèse a reçu une validation expérimentale avec la résolution de la structure cristallographique du CXCR4, un prototype des récepteurs chimiotactiques professionnels (Wu *et al.*, 2010a).



**Figure 7. Modélisation moléculaire des TM2 des récepteurs en fonction de la position de la proline.** La proline en position 2.58 induit un coude proline typique dans la structure des TM2 des récepteurs CHEM (CXCR4) et SO (récepteur UT). En revanche, une structure renflée est observée dans le TM2 des récepteurs PEP (exemple du

récepteur Kiss1R) qui possèdent une proline en position 2.59. Extraction des données 3D de la *Protein Data Bank* (PDB) et modélisation moléculaire (Rasmol, <http://rasmol.org/>). Kiss1R: récepteur du kisséptine de type 1; UT: récepteur de l'urotensine II.

### 2.2.2. Principaux ligands de RCPGs impliqués dans la migration cellulaire

Parmi les RCPGs, plusieurs sont sollicités dans le processus de migration. Dans ces cas, leurs ligands sont considérés comme des molécules chimioattractantes et sont répartis en trois groupes, *i.e.* les chimiokines, les lipides bioactifs et les peptides vasoactifs.

**Les chimiokines** sont des molécules sécrétées de faible masse moléculaire, caractérisées par la présence de motifs cystéine très spécifiques dans leur séquence peptidique. La plupart des chimiokines contiennent quatre résidus cystéines et sont classifiées selon la position des deux premiers en CXC, CC, C ou CX3C. Deux ponts disulfures sont respectivement formés entre la première et la troisième cystéine, et entre la deuxième et la quatrième cystéine. Les récepteurs des chimiokines sont classés et nommés selon la nature de leurs ligands. Ainsi, on peut associer les récepteurs CXCR1 à CXCR5 avec les chimiokines CXC, CCR1 à CCR9 avec les CC, CX3CR1 avec CX3C et enfin, XCR1 avec C (Murphy *et al.*, 2000). Les premières chimiokines ont été caractérisées pour leurs propriétés pro-migratoires exercées sur des cellules du système immunitaire, à l'image de l'interleukine 8 (IL-8), identifiée par Baggiolini et coll. en 1989. En marge de leur rôle important dans le système immunitaire, les chimiokines et leurs récepteurs sont impliqués dans de nombreuses pathologies incluant les maladies auto-immunes (Godessart and Kunkel, 2001), les troubles cardiovasculaires (Charo and Taubman, 2004) et le cancer (Vicari and Caux, 2002). Dans le cas du cancer, la chimiokine la plus étudiée est le SDF-1 qui est le ligand endogène du CXCR7 et CXCR4. Le couplage SDF-1/CXCR4 provoque la migration et les processus métastatiques de nombreuses cellules tumorales comme précédemment démontré dans le cas des cancers du sein (Smith *et al.*, 2004), du poumon (Phillips *et al.*, 2003), du rein (Pan *et al.*, 2006), de la prostate (Taichman *et al.*, 2002), et dans les mécanismes invasifs des gliomes (Ehtesham *et al.*, 2006).

**Les lipides** sont les constituants majeurs de la membrane cellulaire. Certains d'entre eux sont communément appelés lipides bioactifs ou médiateurs lipidiques car ils ont la capacité d'exercer des effets biologiques. Parmi eux se trouvent les prostaglandines (PGs), le *platelet-activating factor* (PAF), le *lysophosphatidic acid* (LPA) et le *sphingosine-1-phosphate* (S1P). Ces lipides sont produits par une succession de réactions enzymatiques à partir de phospholipides membranaires et agissent sur des RCPGs de classe A (famille des Rhodopsines). Le premier RCPG de lipide identifié est le récepteur du PAF (Honda *et al.*,



1991). De nombreux lipides bioactifs ont été caractérisés pour leurs effets sur la migration cellulaire en général et tumorale en particulier. C'est le cas de la prostaglandine E<sub>2</sub> qui augmente la motilité de cellules de carcinome colorectal (Sheng *et al.*, 2001) *via* le récepteur EP4, ou encore du PAF qui stimule la migration de cellules issues d'une tumeur mammaire (Bussolati *et al.*, 2000). De même, le LPA induit la migration de cellules souches mésenchymateuses (Song *et al.*, 2010), de cellules tumorales prostatiques (Hao *et al.*, 2007) et de cellules de muscles lisses vasculaires (Kim *et al.*, 2006). En revanche, le S1P inhibe la migration de neutrophiles (Kawa *et al.*, 1997), de cellules musculaires lisses vasculaires extraites de bronches (Kawata *et al.*, 2005) et de myoblastes (Becciolini *et al.*, 2006), tandis qu'il stimule celle de cellules endothéliales vasculaires (Okamoto *et al.*, 2000) et de cellules de muscles lisses vasculaires (Fegley *et al.*, 2003). Cette diversité dans les réponses cellulaires peut être imputée à l'existence de cinq récepteurs du S1P (Spiegel and Milstien, 2003).

**Un certain nombre de peptides dits « vasoactifs »** ont une action directe sur les vaisseaux et les cellules musculaires lisses. Il s'agit principalement de l'ANG-II, la vasopressine (VP), la BDK, la substance P (SP) (Bisset and Lewis, 1962), l'endothéline 1 (ET-1) (Yanagisawa *et al.*, 1988), le neuropeptide Y (NPY) (Lundberg and Tatemoto, 1982), l'UII (Itoh *et al.*, 1987), le natriuretic peptide (ANP) (Currie *et al.*, 1983), le *vasoactive intestinal peptide* (VIP) (Larsson *et al.*, 1976), la neurotensine (NTS) (Rosell *et al.*, 1976), le *calcitonin gene-related peptide* (CGRP) (Brain *et al.*, 1985), et l'adrénomédulline (ADM) (Perret *et al.*, 1993). Ces peptides vasoactifs lient des RCPGs de classe A, excepté l'ADM et le CGRP qui peuvent interagir avec des complexes composés du *calcitonin receptor-like* (CALCRL) de la classe B et d'un récepteur avec un seul domaine transmembranaire de la famille des *receptor activity-modifying proteins* (RAMP), qui relayent des effets vasoconstricteurs, vasodilatateurs et/ou cardiaques. D'autres peptides agissent également sur la migration cellulaire, particulièrement sur les cellules endothéliales, vasculaires lisses et/ou les cellules du système immunitaire. A titre d'exemple, de nombreuses publications ont

rapporté les effets de l'ANG-II sur la migration des cellules de muscles lisses vasculaires (Jia *et al.*, 2008; Jung, *et al.*, 2010a; Mugabe *et al.*, 2010). L'ET-1, quant à elle, stimule la migration de cellules de trophoblaste (Chakraborty *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2012), de cellules endothéliales (Daher *et al.*, 2008) et de progéniteurs neuronaux (Nishikawa *et al.*, 2011), mais inhibe la migration de HEK293 qui expriment constitutivement le récepteur de l'ET-1 (Yamauchi *et al.*, 2002). En revanche, peu d'études publiées sont consacrées aux effets du NPY sur la migration même s'il a récemment été montré qu'il augmente la migration et la prolifération de cellules d'une lignée de cancer du sein (Medeiros *et al.*, 2012). De telles propriétés ont également été observées avec la BDK sur des cellules du système immunitaire (Paegelow and Lange, 1982; McFadden and Vickers, 1989) et des cellules tumorales, qu'elles soient issues de gliomes (Lu *et al.*, 2010) ou d'une lignée de tumeur de la prostate (Yu *et al.*, 2012). De façon surprenante, le VIP exerce des effets ambivalents sur la migration des leucocytes sur lesquels il augmente ou diminue la migration à faible (subpicomolaire) ou forte (suprananomolaire) concentration respectivement (Bondesson *et al.*, 1991).

### 2.2.3. Les voies de signalisation impliquées dans la migration

#### *Les protéines G trimériques*

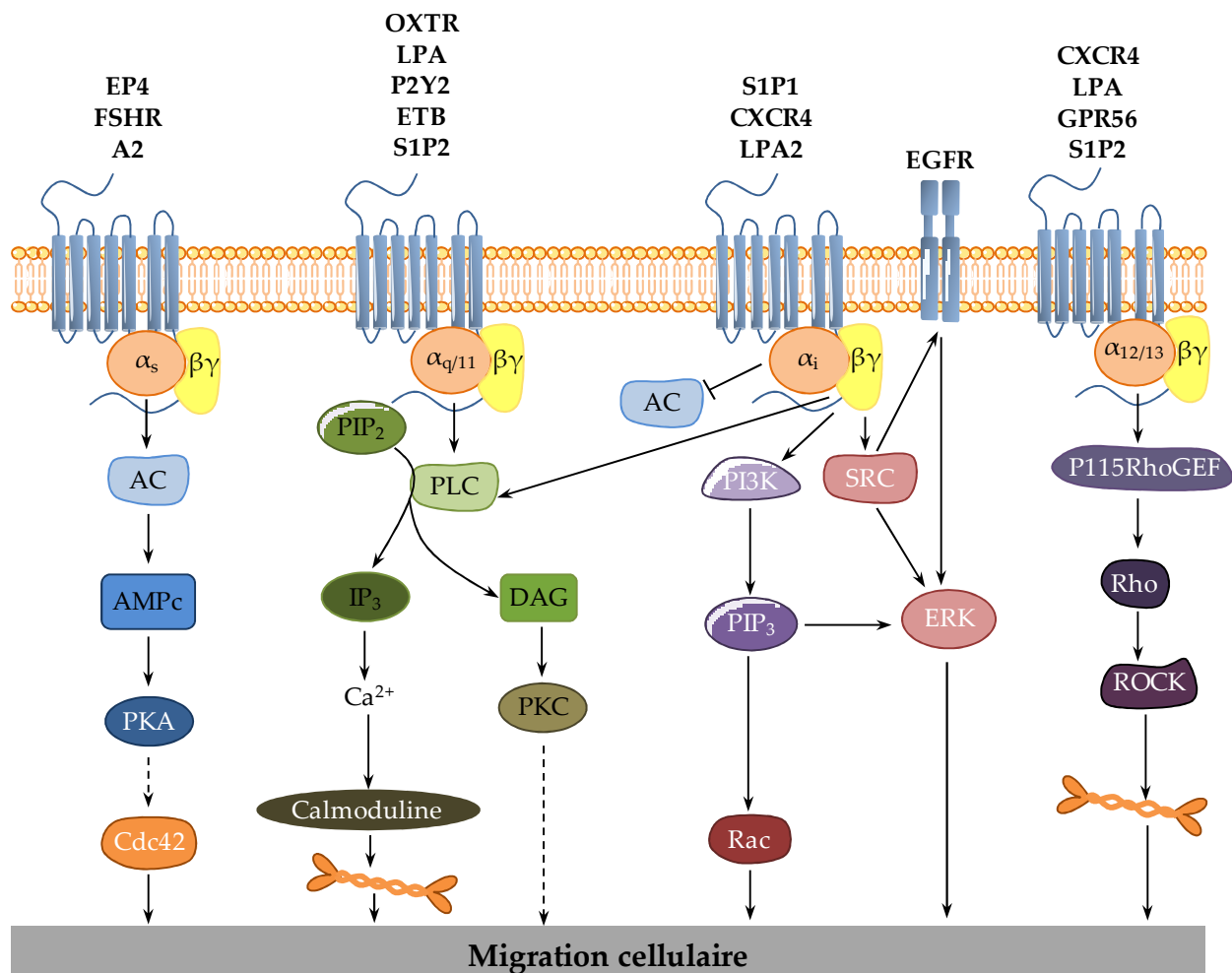
Les RCPGs transmettent classiquement leur signal *via* l'activation d'une protéine G hétérotrimérique ou *guanine nucleotide-binding protein* qui contient des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$  (Neer and Clapham, 1988). A l'heure actuelle, vingt sous-unités  $\alpha$  sont répertoriées (Neves *et al.*, 2002) et classées en quatre familles:  $\alpha_s$ ,  $\alpha_{i/o}$ ,  $\alpha_{q/11}$ ,  $\alpha_{12/13}$ , sur la base de leur séquence (Simon *et al.*, 1991). Six sous-unités  $\beta$  et onze sous-unités  $\gamma$  ont également été identifiées. Les RCPGs disposent d'un motif consensus E/DRY dans leur deuxième ou troisième boucle intracellulaire qui leur permettent d'interagir avec la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G (Rovati *et al.*, 2007). La liaison de l'agoniste induit une réorientation de la structure tridimensionnelle du récepteur qui conduit à la fixation d'un GTP à la place d'un GDP sur la sous-unité  $\alpha$  de la

protéine G, entraînant la dissociation des sous-unités  $\beta\gamma$ . Ces deux entités peuvent alors agir sur leurs effecteurs respectifs. L'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité  $\alpha$  hydrolyse ensuite le GTP permettant à la sous-unité  $\alpha$ -GDP de se lier à nouveau au complexe  $\beta\gamma$  (Neer and Clapham, 1988). Cette signalisation des RCPGs par les protéines G relaye de nombreuses modulations de la machinerie cellulaire provoquant prolifération, sécrétion, modulation de la transcription, contraction et bien sûr migration cellulaire.

Les données disponibles dans la littérature démontrent que la plupart de ces protéines G peuvent être recrutées dans le processus de migration cellulaire (Cotton and Claing, 2009) (Figure 8). Néanmoins, les exemples sont restreints dans le cas de la protéine  $G_s$  qui entraîne classiquement l'activation d'une adénylyl cyclase (AC) et la production d'AMPc. De manière atypique, la prostaglandine E2 *via* l'activation de son récepteur EP4, permet le recrutement d'une protéine  $G_s$ , l'accumulation d'AMPc et l'activation consécutive de la protéine kinase A (PKA), impliquée dans la migration de cellules de cancer du sein (Timoshenko *et al.*, 2003). Par ailleurs, la voie AC/AMPc est liée à la formation des lamellipodes et des filopodes de cellules ovariennes de Rat, suite à l'activation du récepteur de la *follicle-stimulating hormone* (FSH) (Grieshaber *et al.*, 2000). La stimulation du récepteur de l'adénosine A2, présent sur des mastocytes humains, active quant à elle la voie AC/AMPc/PKA ainsi que la protéine Cdc42 (Feoktistov *et al.*, 2000), suggérant que les effets de la voie AC/AMPc/PKA sur les protrusions impliqueraient la protéine Cdc42. Cependant, ces mêmes auteurs ont déterminé que Cdc42 n'est pas un bon substrat pour la PKA et qu'implicitement l'activation de Cdc42 nécessite des protéines intermédiaires qui n'ont pas encore été identifiées (Feoktistov *et al.*, 2000).

En ce qui concerne la protéine  $G_q$ , son recrutement conduit à l'activation d'une PLC responsable de l'hydrolyse de  $PIP_2$  en inositol trisphosphate ( $IP_3$ ) et en diacylglycérol (DAG). La liaison de l' $IP_3$  sur son récepteur localisé à la surface du réticulum endoplasmique entraîne l'ouverture de canaux calciques qui libèrent du calcium dans le cytosol. Le calcium est un

second messenger majeur dans de nombreuses réponses cellulaires, en agissant notamment sur la calmoduline. Le DAG peut lui aussi lier un certain nombre d'effecteurs comme la protéine kinase C (PKC). Comme cela a été démontré dans le cas du récepteur à l'ocytocine sur une lignée de cellules endothéliales humaines, les *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) (Cattaneo *et al.*, 2008), certains RCPGs présentent un couplage à la voie  $G_q$ /PLC impliquée dans la migration cellulaire. De la même manière, l'utilisation d'un peptide interférant dirigé contre la protéine  $G_q$  a permis de démontrer que les effets du LPA sur la migration des cellules de muscles lisses vasculaires sont relayés par la protéine  $G_q$  via l'activation de ERK1/2 et Akt (Kim *et al.*, 2006).



**Figure 8. Représentation schématique des principales voies de signalisation de la migration associées, aux protéines G hétérotrimériques.** A2: récepteur de l'adénosine de type 2; AC: adénylyl cyclase; AMPc: 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate; CXCR4: C-X-C chemokine receptor type 4; DAG: diacylglycérol; EGFR: epidermal growth factor receptor; EP4: prostaglandin E receptor 4; ERK: extracellular signal-regulated kinase; ETB: récepteurs de l'endothéline de type B; FSH: follicle-stimulating hormone receptor; IP<sub>3</sub>: inositol trisphosphate; LPA1/2: lysophosphatidic acid receptor type 1/2; OXTR: ocytocin receptor; P115RhoGEF: 115 kDa guanine nucleotide exchange factor; P2Y2: récepteur purinergique de type 2; PI3K: phosphatidylinositol-3 kinase; PIP<sub>2</sub>: phosphatidylinositol 4,5-

bisphosphate; PIP<sub>3</sub>: phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate; PKA: protéine kinase A; PKC: protéine kinase C; PLC: phospholipase C; ROCK: *Rho-associated protein kinase*; S1P1/2: *sphingosine-1-phosphate receptor type 1/2*. → : effet stimulateur; —: effet inhibiteur; --> : non déterminé.

Le récepteur purinergique (P2Y<sub>2</sub>) induit la migration d'une lignée cellulaire hybride neuroblastome/glioblastome (NG 108-15) par l'intermédiaire de la voie G<sub>q</sub>/PLC/Ca<sup>2+</sup> (Ando *et al.*, 2010). L'implication de cette voie dans la migration reste néanmoins controversée puisque dans de nombreux cas, ce couplage des récepteurs à G<sub>q</sub> conduit au contraire à l'inhibition de la migration cellulaire, *e.g.* cas du récepteur à l'endothéline ETB sur des progéniteurs neuronaux (Mizuno *et al.*, 2005), ou du récepteur au sphingosine-1-phosphate S1P2 sur des cellules de muscles lisses vasculaires (Takashima *et al.*, 2008).

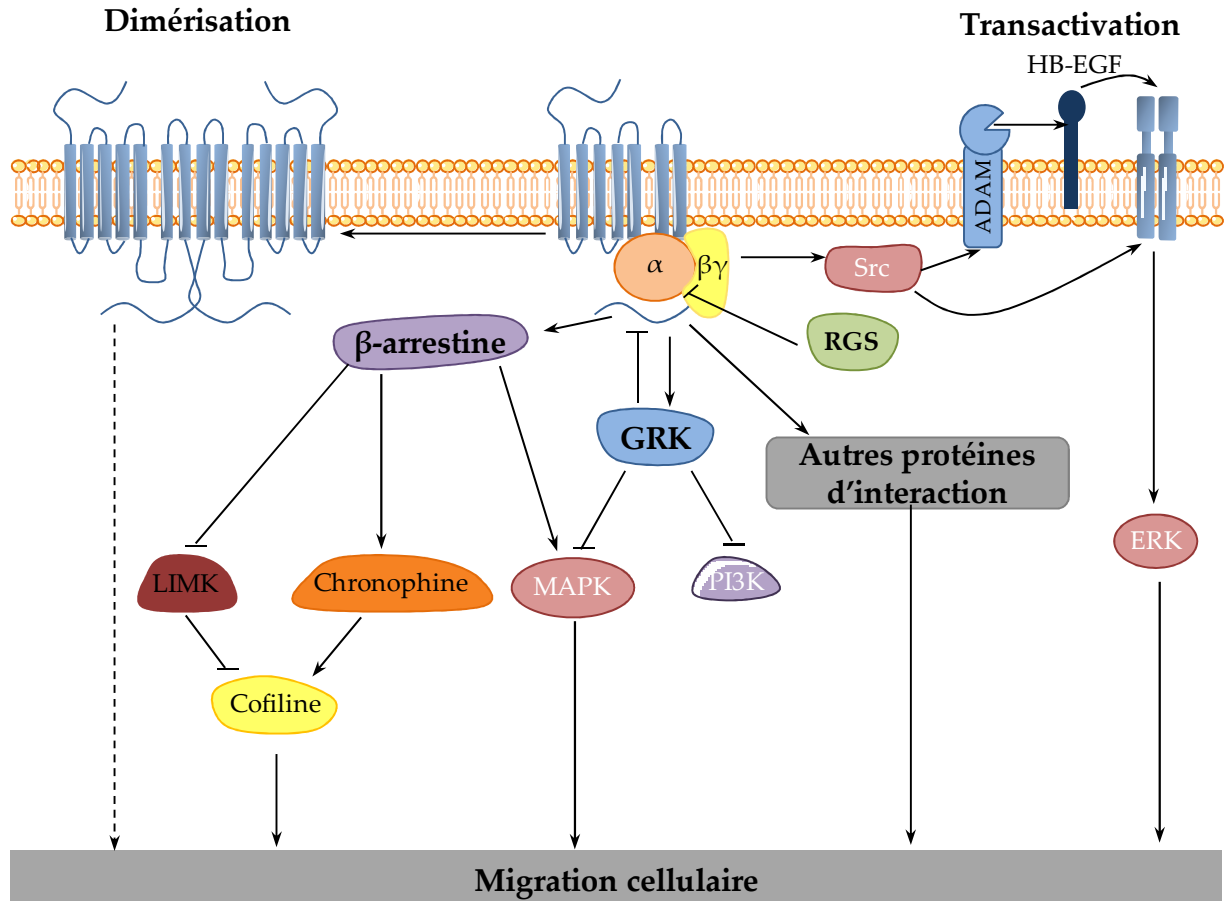
L'étude de la famille des protéines G<sub>i</sub> a été facilitée par l'utilisation de la toxine pertussique (PTX) qui catalyse l'ADP-ribosylation d'un résidu cystéine situé sur l'extrémité C-terminale de la sous-unité  $\alpha$ , prévenant ainsi la liaison de la protéine G au récepteur (Kaslow and Burns, 1992). L'utilisation de la PTX dans de nombreux types cellulaires a mis en évidence le rôle important de G<sub>i</sub> dans la migration cellulaire. Son activation est en effet responsable de l'augmentation de la migration de leucocytes en réponse au PAF (Brown *et al.*, 2006). La stimulation du récepteur au sphingosine S1P1, situé sur des cellules de capillaires lymphatiques, induit la migration et la formation de tubes, un effet bloqué par la PTX, indiquant que le S1P1 est couplé à la protéine G<sub>i</sub>. Néanmoins, le bloqueur de PLC, l'U73122, ainsi qu'un chélateur de calcium, le BAPTA-AM, inhibent ces effets, suggérant que la voie PLC/Ca<sup>2+</sup> pourrait également être impliquée (Yoon *et al.*, 2008). L'utilisation d'outils pharmacologiques a également permis de déterminer que le SDF-1 stimule la migration des lymphocytes T *via* la voie G<sub>i</sub>/PI3K/PIP<sub>3</sub>/ERK (Sotsios *et al.*, 1999), mais que cette voie n'est pas responsable de la contraction de l'actine dans la cellule. En effet, l'étude de Tan *et coll.* (2006) a confirmé le fait que la migration des lymphocytes T induite par le SDF-1 passe non seulement par G<sub>oi</sub> mais aussi par  $\beta\gamma$  et Rac. Dans le cas du LPA, la migration de cellules cancéreuses ovariennes est induite par la liaison sur le récepteur LPA2

conduisant à l'activation de la voie de signalisation  $G_i$ /Src. De façon intéressante, le blocage de l'EGFR et de ERK prévient la migration, suggérant que Src pourrait transactiver l'EGFR dans ces cellules (Jeong *et al.*, 2008).

Parmi les quatre familles de protéine G, la  $G_{12/13}$  est celle pour laquelle il y a le moins de connaissances car ses effecteurs sont restés inconnus pendant des années et que les outils disponibles pour interférer avec les voies de signalisation de  $G_{12/13}$  étaient inexistantes. Un tournant dans la compréhension des mécanismes de signalisation de  $G_{12/13}$  fut la démonstration par Buhl et coll. en 1995 que des mutants actifs de  $G_{12}$  et  $G_{13}$  stimulent fortement la GTPase Rho entraînant ainsi la formation de fibres de stress d'actine et d'adhésions focales dans des cellules de la lignée Swiss 3T3. Peu de temps après, la découverte d'une protéine stimulée directement par  $G_{12/13}$  nommée p115RhoGEF (une GEF ciblant Rho), a permis de compléter la cascade de signalisation de  $G_{12/13}$  (Hart *et al.*, 1998; Kozasa *et al.*, 1998). Dans la mesure où Rho est le principal effecteur de  $G_{12/13}$ , les récepteurs couplés à cette protéine G sont souvent impliqués dans la migration cellulaire. A titre d'exemple, la migration des cellules Jurkat (lignée de lymphocytes T), induite par le ligand du CXCR4, le SDF-1, nécessite l'activation de la voie de signalisation  $G_{12/13}$ /Rho/ROCK/MLC (Tan *et al.*, 2006). De même, le récepteur au LPA est couplé à la protéine  $G_i$  relayant la migration, mais la présence du couplage  $G_{12/13}$ /Rho/ROCK contribue aussi à ce mécanisme (Bian *et al.*, 2006). Ainsi, le blocage de  $G_{12/13}$  dans un modèle de xénogreffe de tumeur mammaire de souris ne perturbe pas la croissance tumorale mais réduit le nombre de métastases (Kelly *et al.*, 2006a). Des résultats similaires sont observés *in vitro*, où l'expression des formes activées de  $G_{12}$  et  $G_{13}$  entraîne l'invasion de cellules tumorales prostatiques dans du matrigel (Kelly *et al.*, 2006b). Néanmoins, cette voie de signalisation des RCPGs reste controversée puisqu'elle peut à l'inverse être responsable d'une inhibition de la migration, comme cela a été démontré dans le cas du récepteur orphelin GPR56 sur des

cellules progénitrices neurales (Iguchi *et al.*, 2008), ou du récepteur S1P2 sur des cellules de muscles lisses vasculaires (Takashima *et al.*, 2008).

La diversité des voies de signalisation des récepteurs est encore étoffée par leur interaction à d'autres protéines relayant de nombreuses voies de signalisation secondaire, pouvant elle-même intervenir dans les processus de migration cellulaire (Figure 9).



**Figure 9. Représentation schématique des principales voies de signalisation secondaires intervenant dans la migration cellulaire.** ADAM: *a disintegrin and metalloproteinase*; ERK: *extracellular signal-regulated kinase*; HB-EGF: *heparin binding EGF*; GRK: *G protein-coupled receptor kinase*; LIMK: *LIM kinase*; MAPKs: *mitogen-activated protein kinases*; PI3K: *phosphatidylinositol-3 kinase*; RGS: *regulator of G protein signaling*. → : effet stimulateur; —| : effet inhibiteur; --> : non déterminé.

### **Les kinases de récepteurs couplés aux protéines G ou GRKs**

Les GRKs constituent une famille de sept sérine-thréonine kinases qui lient et phosphorylent des RCPGs activés. Cette phosphorylation de récepteurs permet de créer des sites de haute affinité nécessaires pour la liaison des arrestines, entre autres responsables de la désensibilisation des RCPGs (Claing *et al.*, 2002). Or, l'absence de GRK2 dans des lymphocytes T augmente leur migration induite par le CCR5 (Vroon *et al.*, 2004a). De la

même manière, la migration de granulocytes et de neutrophiles déficients en GRK6, en réponse au leukotriène B<sub>4</sub>, à l'anaphylatoxine C5 ou au SDF-1, est plus élevée que celle des cellules sauvages (Kavelaars *et al.*, 2003; Vroon *et al.*, 2004b; Tarrant *et al.*, 2008). L'ensemble de ces données indique qu'en favorisant la désensibilisation des récepteurs, les GRKs joueraient un rôle inhibiteur sur la migration cellulaire. A l'inverse, l'absence de GRK6 dans des cellules B et T inhibe leur migration induite par le CXCR4, suggérant un effet potentiel des GRKs dans transduction du signal (Fong *et al.*, 2002). Cette hypothèse est confortée par la capacité d'interaction de ces kinases avec de nombreux partenaires protéiques impliqués dans la migration cellulaire. En effet, GRK2 interagit directement avec la PI3K (Naga Prasad *et al.*, 2001) et participe à l'internalisation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique (Naga Prasad *et al.*, 2005). GRK2 et la MEK, une MAP kinase kinase (Jiménez-Sainz *et al.*, 2006) se trouvent dans le même complexe multimoléculaire et cette co-localisation est corrélée à l'inhibition de ERK. Ainsi, il a été montré qu'un niveau élevé de GRK2 entraîne l'inhibition de l'activation de ERK en réponse à une chimiokine (Jiménez-Sainz *et al.*, 2006).

### ***Les $\beta$ -arrestines***

A l'heure actuelle, quatre formes d'arrestines ont été clonées chez les mammifères, dont deux ( $\nu$ -arrestine et c-arrestine) sont exclusivement exprimées au niveau de la rétine tandis que les deux autres ( $\beta$ -arrestine 1 et  $\beta$ -arrestine 2) sont ubiquistes. Principalement connues pour leur rôle dans la désensibilisation des récepteurs, les  $\beta$ -arrestines agissent aussi comme de véritables plate-formes protéiques (Xiao *et al.*, 2007). Elles lient par exemple les protéines *adaptor protein-2* (AP-2) et les clathrines, et provoquent ainsi l'internalisation des récepteurs *via* la formation de puits de clathrines (Wolfe and Trejo, 2007). Les  $\beta$ -arrestines participent également à la transduction du signal, conduisant notamment à la migration cellulaire. A titre d'exemple, la  $\beta$ -arrestine 2 relaye les effets du SDF-1 et de l'ANG-II sur la migration cellulaire *via* entre autres la p38 MAPK (Sun *et al.*, 2002; Hunton *et al.*, 2005). En



accord avec ces données, des lymphocytes issus de souris KO délétées du gène codant la  $\beta$ -arrestine 2 ne migrent plus après activation du CXCR4 par le SDF-1 (Fong *et al.*, 2002). Dans le cas du peptide vasoactif ANG-II, il a également été démontré que l'activation de son récepteur AT1R, permet le recrutement de  $G_{q/11}$  et de la  $\beta$ -arrestine 1, toutes deux responsables de la stimulation de RhoA et de la formation consécutive de fibres de stress d'actine (Barnes *et al.*, 2005). De plus, les  $\beta$ -arrestines relayent les effets du récepteur PAR2 sur l'activation de ERK, favorisant ainsi la migration de cellules de cancer du sein (Ge *et al.*, 2004). Pour ce même récepteur, la  $\beta$ -arrestine peut aussi entraîner l'inhibition de la LIM kinase (LIMK) et l'activation de la chronophine, favorisant la forme active de la cofiline, et le *turnover* de l'actine (Zoudilova *et al.*, 2007). La même équipe a démontré qu'en l'absence de  $\beta$ -arrestine 2, l'association de la cofiline avec la chronophine, son activation et la migration cellulaire étaient abolies (Zoudilova *et al.*, 2010). Par ailleurs, la liaison des  $\beta$ -arrestines à une autre protéine de liaison à l'actine (la filamine A) est nécessaire à la migration cellulaire induite par l'activation des récepteurs à l'ANGII (AT1R) ou à l'acétylcholine (M1R) (Scott *et al.*, 2006). Ce complexe protéique est responsable de l'activation des MAPKs et de la modulation du cytosquelette d'actine (Scott *et al.*, 2006).

### ***Les protéines régulatrices des protéines G ou les Regulator of G protein signaling (RGSs)***

Les RGSs sont des GTPases qui interagissent directement avec les sous-unités  $\alpha$  des protéines G pour catalyser l'hydrolyse des GTPs et ainsi inhiber l'activité du complexe hétérotrimérique (De Vries *et al.*, 2000). Une étude menée en 1998 a révélé que la sur-expression des RGS1, RGS2 et RGS3 se traduit par une baisse de la migration des cellules lymphoïdes sous le contrôle de la protéine  $G_{i/o}$  (Bowman *et al.*, 1998). Par la suite, d'autres travaux ont confirmé le rôle inhibiteur des RGSs dans le contrôle de la migration cellulaire comme ceux de Grüning et coll. (1999) menés sur des cellules rénales, ou ceux de Reif et Cyster (2000) réalisés sur les lymphocytes B. Cet effet inhibiteur serait sous-tendu par une

diminution de la phosphorylation et du recrutement de la FAK au niveau membranaire par RGS1 (Le *et al.*, 2005).

### ***La transactivation***

Comme décrit dans le §2.1, les RTKs sont capables, une fois dimérisés, d'entraîner la migration cellulaire. Cette activation peut être liée à celle des RCPGs par un phénomène appelé transactivation, pour la première fois décrit en 1996 par Daub et coll.. Dans cette étude, la mobilisation de la voie MAPK induite par l'interaction de différents ligands (ET-1, thrombine et LPA) avec leurs RCPGs respectifs est bloquée par un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase ou un dominant négatif de l'EGFR. Différents médiateurs des RCPGs peuvent conduire à la transactivation des RTKs, *e.g.* le calcium (Eguchi *et al.*, 1998; Zwick *et al.*, 1997), la PKC (Tsai *et al.*, 1997) ou la src (Luttrell *et al.*, 1997; Andreev *et al.*, 2001). Parmi les effecteurs de protéines G, la src (Pierce *et al.*, 2001) mais aussi la PLC (Mifune *et al.*, 2005) stimulent des métalloprotéases membranaires appelées ADAMs pour *a disintegrin and metalloproteinase*. La transactivation de RTKs de type EGFR peut faire intervenir une métalloprotéase membranaire capable de cliver l'*heparin binding EGF* (HB-EGF) (Prenzel *et al.*, 1999). Ainsi, les mécanismes relayés par des RTKs et surtout l'EGFR, permettent le recrutement de la voie des MAPKs, impliquée dans la migration cellulaire. Dans certains cas, les effets promigratoires des récepteurs requièrent exclusivement cette transactivation. C'est le cas de la thrombine sur des cellules de muscles lisses vasculaires (Kalmes *et al.*, 2000), de l'ANG-II sur des kératinocytes et des fibroblastes (Yahata *et al.*, 2006), ou du LPA sur des cellules d'un carcinome squameux (Gschwind *et al.*, 2002).

### ***L'oligomérisation***

Bien que certaines études *in vitro* montrent que les RCPGs peuvent fonctionner sous forme de monomère (Ernst *et al.*, 2007; Kuszak *et al.*, 2009; Bayburt *et al.*, 2011), de nombreux

RCPGs incluant les récepteurs aux chimiokines s'associent entre eux (homodimères) ou avec d'autres récepteurs (hétéro-dimères ou -oligomères). Un nombre croissant d'études suggère que la structure dimérique ou oligomérique des récepteurs représente la structure fonctionnelle constitutive des RCPGs. L'un des enjeux actuel est de comprendre le rôle exact et la plasticité de ces structures. Les travaux concernant les récepteurs de chimiokines évoquent l'implication de l'oligomérisation dans la migration cellulaire. En effet, un certain nombre de ces récepteurs comme le CCR2 (Sohy *et al.*, 2009), le CCR5 (Issafras *et al.*, 2002), le CXCR1 (Wilson *et al.*, 2005), le CXCR2 (Trettel *et al.*, 2003), et le CXCR4 (Babcock *et al.*, 2003; Percherancier *et al.*, 2005) possèdent des structures dimériques ou oligomériques. Il a été montré que le CCR2 entraîne une réponse fonctionnelle uniquement sous forme de dimère (Rodríguez-Frade *et al.*, 1999), et qu'une forme tronquée du CXCR2, inapte à former des dimères, n'a plus d'action sur le chimiotactisme (Trettel *et al.*, 2003). L'utilisation d'un peptidomimétique du 4<sup>ème</sup> domaine transmembranaire (TM4) du CXCR4 sur les cellules, abolit la dimérisation, bloquant ainsi les effets du SDF-1 sur la polymérisation d'actine et la migration cellulaire (Wang *et al.*, 2006). Enfin, l'hétéro-oligomérisation de CXCR4 avec CXCR7 semble augmenter la migration de cellules de cancer du sein en réponse au SDF-1 (Décaillot *et al.*, 2011). L'ensemble de ces études indique que l'oligomérisation des récepteurs peut jouer un rôle important dans les voies de signalisation conduisant à la migration cellulaire.

### ***Les autres protéines d'interaction***

Un nombre important de protéines capables de lier les RCPGs et moduler leur localisation subcellulaire et/ou leur signalisation a été identifié (Bockaert *et al.*, 2003). Le plus souvent, elles interagissent avec l'extrémité cytoplasmique C-terminale du récepteur ou avec la boucle intracellulaire 3 (la plus longue de toutes). Ces interactions protéine-protéine se font généralement *via* des domaines spécifiques tels que les PDZ ou les *src homology 3* (SH3).

L'interaction de la *myosin heavy chain IIA* avec l'extrémité C-terminale du CXCR4 pourrait participer à la migration des lymphocytes T (Rey *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'interaction de la filamine A avec l'extrémité C-terminale du P2Y2 est nécessaire à la migration des cellules de muscles lisses vasculaires (Yu *et al.*, 2008), indiquant que certaines de ces protéines d'interaction sont impliquées dans ce processus.

L'ensemble de ces données permet d'entrevoir la complexité et la diversité des voies de signalisation conduisant à la migration cellulaire. Ainsi, il est légitime de penser qu'une dérégulation de l'une de ces voies pourrait aboutir à une migration cellulaire inappropriée, elle-même associée à un processus pathologique.

### **3. Migration en conditions physiopathologiques: les tumeurs cérébrales gliales**

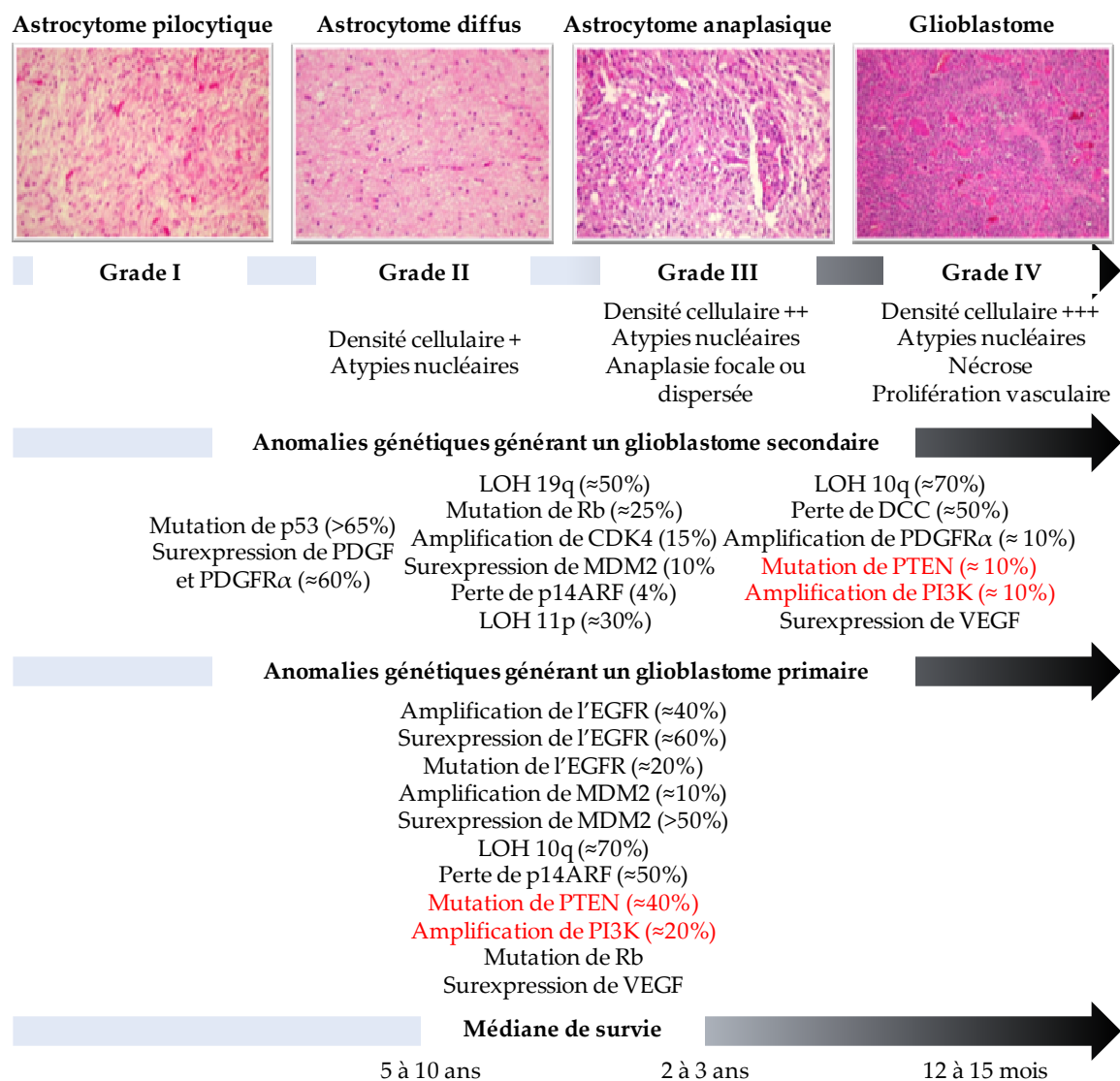
#### **3.1. Généralité sur les gliomes**

##### **3.1.1. Classification des gliomes**

Le médecin pathologiste allemand Rudolf Virchow fut le premier vers 1860 à introduire le terme de « gliomes », en les distinguant des autres tumeurs primaires cérébrales. Basée sur des critères histologiques définis et sur leurs origines histogénétiques supposées, la classification originelle des gliomes a été initialement menée par Bailey et Cushing en 1926. Grâce à la progression des techniques cytologiques et histologiques, une classification plus aboutie a été publiée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1979 puis révisée par le même organisme en 1993, 2000 et 2007 (Louis *et al.*, 2007). Selon l'origine cellulaire des gliomes, on distingue les astrocytomes, les oligodendrogliomes, les épendymomes et les gliomes mixtes. Enfin, sur la base de critères histologiques, l'OMS a répertorié les astrocytomes en quatre grades de malignité croissante (I à IV) (Figure 10).

Le grade I ou astrocytome pilocytique est circonscrit, bénin et se traite par simple exérèse. Faiblement malin, le grade II ou astrocytome diffus, présente un fort degré de différenciation et une densité cellulaire modérée, mais il évolue fréquemment vers des grades supérieurs.

Comme son nom l'indique, l'astrocytome anaplasique ou grade III est constitué de cellules indifférenciées regroupées ou dispersées et comportant des atypies nucléaires. Enfin, le grade IV ou glioblastome, très agressif, peut apparaître *de novo* (glioblastome primaire) ou provenir de l'évolution de grades inférieurs (glioblastome secondaire) (Maher *et al.*, 2006). Les glioblastomes possèdent également des atypies nucléaires ainsi qu'une forte densité cellulaire associée à une activité mitotique importante, des zones nécrotiques et une néo-vascularisation élevée (Figure 10).



**Figure 10. Représentation des principales anomalies histologiques et génétiques répertoriées dans la classification des astrocytomes.** CDK4: cyclin-dependent kinase 4; DCC: deleted in colorectal cancer; EGFR: epidermal growth factor receptor; LOH: loss of heterozygosity; MDM2: murine double minute 2; p14ARF: p14 alternate reading frame; PDGF: platelet-derived growth factor; PDGFRα: platelet-derived growth factor receptor α; PI3K: phosphatidylinositol-3 kinase; PTEN: phosphatase and tensin homolog; Rb: retinoblastoma; VEGF: vascular growth factor receptor.

### 3.1.2. Épidémiologie

Les gliomes représentent 2% des cancers chez l'adulte et 20% chez l'enfant (Baldwin and Preston-Martin, 2004). Plus de 70% de l'ensemble des tumeurs cérébrales sont des gliomes et parmi eux, le glioblastome, considéré comme le plus agressif d'entre eux, est aussi le plus fréquent (60 à 70%). D'après les données épidémiologiques recueillies aux Etats-Unis de 2000 à 2004 par le *Central Brain Tumor Registry of the United States* (CBTRUS), l'incidence annuelle des gliomes chez l'adulte est approximativement de 5 cas pour 100 000 individus, avec une légère augmentation au cours de ces trois dernières décennies, principalement en raison du vieillissement de la population (Fisher *et al.*, 2007), mais aussi en raison de l'amélioration de l'imagerie diagnostique (Radhakrishnan *et al.*, 1995). Plusieurs facteurs de risque seraient impliqués dans le développement de ces gliomes, dont l'âge en particulier, puisque chez des patients adultes diagnostiqués pour un gliome de haut-grade, l'âge médian est de 64 ans (Fisher *et al.*, 2007). Le sexe est aussi un paramètre significatif car les gliomes sont 40% plus fréquents chez les hommes que chez les femmes (Fisher *et al.*, 2007). Selon certains auteurs, cette disproportion pourrait être liée aux effets « anti-oncogènes » des œstrogènes (Plunkett *et al.*, 1999; McKinley *et al.*, 2000). De nombreuses études ont par ailleurs montré que l'exposition aux radiations thérapeutiques peut être responsable de l'apparition de glioblastomes multiformes (Madden *et al.*, 2010; Joh *et al.*, 2011; Ahn and Kim, 2012). Bien que l'utilisation à long terme du téléphone portable soit pointée du doigt (Hardell *et al.*, 2007), notamment en raison d'études menées sur des rongeurs soumis à des expositions fortes et prolongées (Repacholi, 2001), un lien clair avec l'apparition de gliomes n'a pas encore été avéré (Ahlbom *et al.*, 2009; Little *et al.*, 2012). Egalement suspecté, l'impact des pesticides sur le développement des tumeurs cérébrales n'est pas non plus clairement prouvé (Ruder *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Provost *et al.*, 2007). Enfin, certains cas de gliomes ont été décrits chez des patients ayant subi un traumatisme crânien quelques années auparavant (Magnavita *et al.*, 2003; Salvati *et al.*, 2004; Anselmi *et al.*, 2006).

Sur le plan génétique, environ 5% des patients qui développent un gliome présentent des antécédents familiaux de tumeur cérébrale. Certains de ces cas familiaux sont associés à des syndromes génétiques rares tels que le syndrome de Li-Fraumeni dû à la présence d'une mutation au sein du gène codant p53, le syndrome de Turcot associant un spectre tumoral cérébral et colorectal, et les neurofibromatoses de types 1 et 2 (Farrell and Plotkin, 2007).

### 3.1.3. Principales mutations somatiques

Ces dernières années, d'importants progrès ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes moléculaires du développement tumoral. La transformation maligne des gliomes résulte de l'accumulation séquentielle d'aberrations génétiques et de la dérégulation de la cascade de signalisation liée aux facteurs de croissances (Furnari *et al.*, 2007) (Figure 10). Nettement majoritaires, les glioblastomes primaires (90%) sont prédominants chez des patients de plus de 50 ans et caractérisés par l'amplification et la mutation de l'EGFR, la perte d'hétérozygotie du chromosome 10q, la délétion de PTEN et de P14ARF. Les glioblastomes secondaires, qui ne représentent que 10% environ des glioblastomes, apparaissent chez des sujets plus jeunes. Ils résultent de la transformation d'un astrocytome de bas grade ou d'un astrocytome anaplasique, principalement liée à une mutation de p53 et à une surexpression du PDGFR, et possèdent un profil transcriptionnel et des aberrations du nombre de copie d'ADN qui diffèrent largement de ceux retrouvés dans les glioblastomes primaires. En dehors de leurs particularités génétiques, ces deux types de cancers partagent le même profil histologique et répondent de façon identique à une thérapie conventionnelle.

Le travail récemment mené par le groupe de Hayes (2010) sur la base des données génomiques collectées par le *Cancer Genome Atlas Network*, a fait significativement évoluer la classification des glioblastomes (Verhaak *et al.*, 2010). Ainsi, quatre sous-types de glioblastomes ont été caractérisés selon les aberrations et les expressions géniques qu'ils présentent, *i.e.* proneural, neural, classique et mésenchymateux. Principalement défini par des

anomalies de *PDGFR $\alpha$* , des mutations d'*IDH1* et de *TP53*, le sous-type proneural exprime des marqueurs génétiques des oligodendrocytes, tel que *Olig2*. La plupart des glioblastomes secondaires référencés par Verhaak font partie de ce sous-type. Le sous-type neural, quant à lui, est associé à des marqueurs cellulaires neuronaux et son profil moléculaire est le plus proche du parenchyme cérébral sain. Le sous-type classique présente les aberrations génétiques les plus fréquemment retrouvées dans les glioblastomes, 100% d'entre eux portant une amplification du chromosome 7 associée à une délétion du chromosome 10. Ces tumeurs se caractérisent également par un niveau d'amplification élevé de l'*EGFR*. Enfin, le sous-type mésenchymateux porte une délétion de la région chromosomique 17q11.2 où se situe le gène *NF1* et l'expression de marqueurs mésenchymateux (*CHI3L1* et *MET*) et astrocytaires.

#### 3.1.4. Traitements des gliomes

Le traitement classique des gliomes consiste quasi-systématiquement en une résection maximale de la masse tumorale par chirurgie. Efficace pour éradiquer un astrocytome pilocytique, la chirurgie s'avère insuffisante dans le cas d'astrocytomes de plus haut grade, très invasifs. Pour autant, la résection de la masse tumorale augmente clairement l'espérance de vie des patients porteurs d'un glioblastome (Sanai and Berger, 2008). Généralement, la chirurgie est associée à une prise *per os* de témozolomide (TMZ, Temodal®), un agent dérivé imidazotétrazine de seconde génération (Dhodapkar *et al.*, 1997; Prados, 2000). Son activité cytotoxique s'effectue par méthylation des sites ADN spécifiques conduisant à un appariement aberrant des bases lors de la réplication, à une cassure des brins d'ADN (Friedman *et al.*, 2000), puis à l'apoptose des cellules tumorales. Enfin, six semaines environ après exérèse de la tumeur, les patients sont soumis à une radiothérapie (Stupp *et al.*, 2005).

Malgré ces traitements, les tumeurs malignes, et plus particulièrement celles de grade IV, sont sujettes à de nombreuses récurrences liées à l'intense capacité d'invasion des cellules



tumorales dans le tissu sain, rendant quasi impossible l'exérèse complète de la tumeur. Ainsi, la médiane de survie d'un patient atteint d'un glioblastome se situe entre 12 et 15 mois.

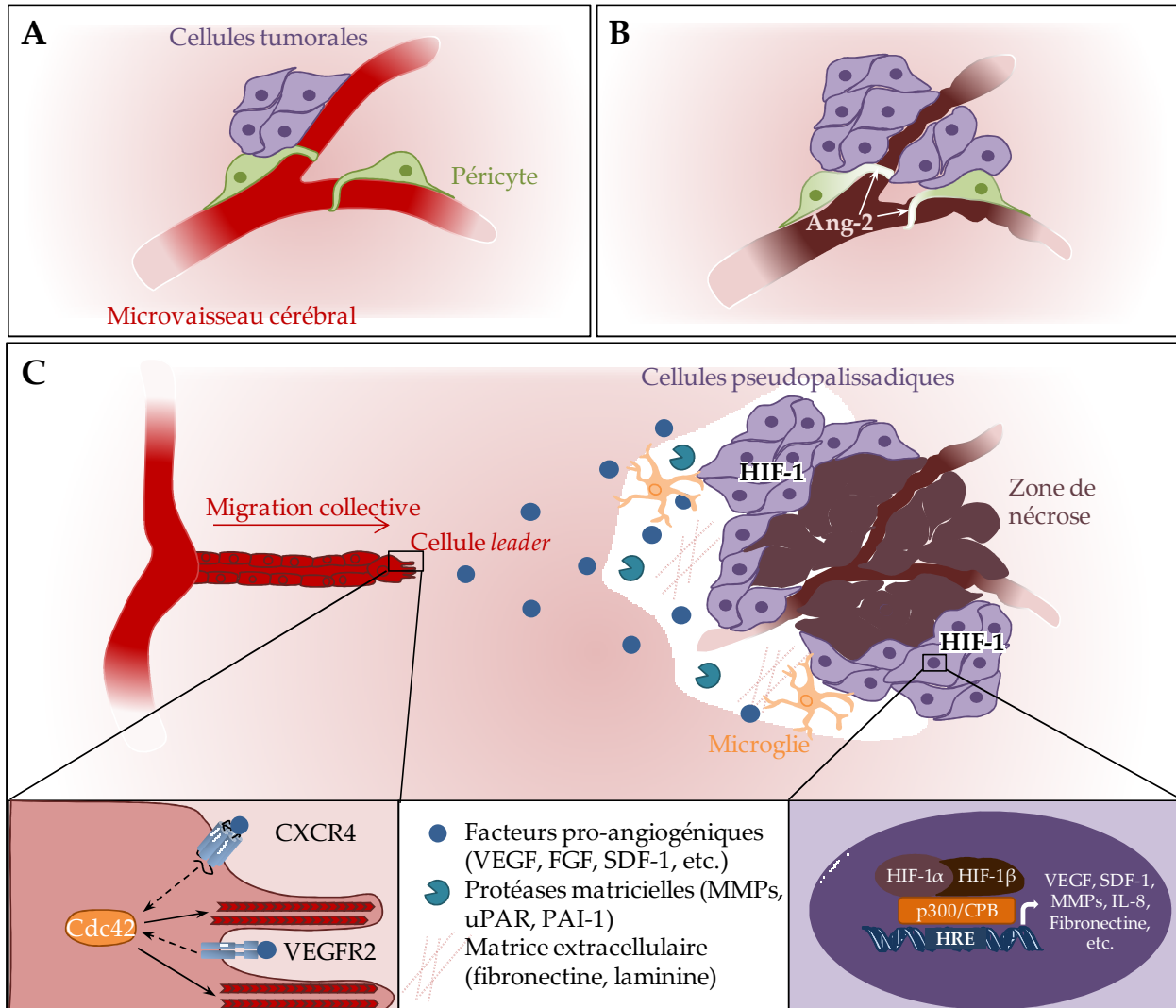
### 3.2. Néangiogenèse tumorale

La néangiogenèse est un événement clef de la progression tumorale de certains types de cancer (Bello *et al.*, 2004). La néovascularisation des tumeurs cérébrales est directement corrélée à leur agressivité, leur degré de malignité et à la rechute des patients (Birlik *et al.*, 2006). Le fort potentiel néoangiogénique de ces tumeurs a été pour la première fois décrit en 1976 grâce à un test d'angiogenèse classique consistant en la greffe d'un explant de glioblastome sur la cornée de lapin (Brem, 1976). La néoangiogenèse tumorale conduit à la formation d'un réseau vasculaire anormal caractérisé par un grand nombre de vaisseaux tortueux, dilatés et hyper-perméables responsables de conséquences cliniques importantes (Kaal and Vecht, 2004) telles que les hémorragies intra-tumorales (Liwnicz *et al.*, 1987) et des pressions intracrâniennes (Rees, 2012).

Il y a quelques années, il était considéré que la croissance tumorale s'effectuait en deux phases, *i.e.* avasculaire puis vasculaire. Dans ce modèle, les tumeurs développaient une activité néoangiogénique uniquement lorsqu'elles avaient atteint une taille limite, provoquant un déficit d'approvisionnement des cellules de la masse en nutriments par simple diffusion (Zetter, 1998). Il est maintenant admis que la croissance tumorale s'effectue en deux phases vasculaires. La première correspond à l'utilisation par les cellules tumorales des vaisseaux cérébraux préexistants (cooption), la seconde à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, par angiogenèse, vasculogenèse ou intussusception. Considérée comme le principal mode de formation de nouveaux vaisseaux dans les gliomes, l'angiogenèse se fait par remodelage ou réorientation de vaisseaux existants (Tate and Aghi, 2009). La vasculogenèse s'appuie quant à elle sur des précurseurs de cellules endothéliales, tandis que l'intussusception correspond à la scission d'un vaisseau sanguin préexistant.

Comme évoqué précédemment, la croissance des tumeurs cérébrales s'effectue d'abord par un mécanisme de cooption des vaisseaux sanguins, *i.e.* par recrutement de vaisseaux sanguins préexistants pour croître (Holash *et al.*, 1999; Leenders *et al.*, 2002) (Figure 11A). L'injection dans le cerveau de souris de cellules de lignée gliomale exprimant une protéine fluorescente a permis de constater qu'une destruction des vaisseaux natifs précède la phase de néoangiogenèse (Zagzag *et al.*, 2000a). En effet, avec la croissance tumorale, les cellules compressent et destabilisent les vaisseaux sanguins natifs conduisant à leur destruction (Padera *et al.*, 2004) (Figure 11B). Dans le cerveau sain, l'angiopoïétine-1 active Tie-2 et stimule l'association des péricytes et des cellules endothéliales stabilisant ainsi le réseau vasculaire (Papapetropoulos *et al.*, 1999; Augustin *et al.*, 2009). Dans le glioblastome, Tie-2 et l'angiopoïétine-2 sont surexprimés dans les cellules endothéliales tandis que l'angiopoïétine-1 l'est au niveau des cellules tumorales (Stratmann *et al.*, 1998). Or, l'angiopoïétine-2 agit en tant qu'antagoniste sur Tie-2 et perturbe les contacts entre les cellules endothéliales et péri-endothéliales. Ceci conduit à la régression des vaisseaux sanguins natifs précédant la phase d'angiogenèse tumorale (Holash *et al.*, 1999) (Figure 11B).

Suite à la dégradation des vaisseaux sanguins natifs, une zone nécrotique ainsi qu'un climat hypoxique s'installent au cœur de la tumeur (Figure 11C). L'hypoxie, la mort cellulaire, ainsi que les mutations acquises par les cellules tumorales peuvent alors entraîner la sécrétion de nombreux facteurs pro-angiogènes. En particulier, l'hypoxie induit l'expression du complexe transcriptionnel *hypoxia inducible factor-1* (HIF-1) autour de la zone nécrotique entourée de cellules pseudopalissadiques (Zagzag *et al.*, 2000b). HIF-1 est un hétérodimère composé de deux sous-unités HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$ . Alors que la sous-unité  $\beta$  est constitutivement exprimée dans la cellule, la sous-unité  $\alpha$  est soumise à une régulation complexe. De façon globale, deux enzymes régulent l'expression de HIF-1 $\alpha$ , *i.e.* le *factor inhibiting HIF* (FIH-1) et la *prolyl hydroxylase domain* (PHD) (Semenza, 2003). Ces deux enzymes nécessitent la présence d'O<sub>2</sub> pour exercer leur fonction.



**Figure 11. Représentation schématique des étapes de la néoangiogenèse tumorale.** **A.** Cooption des vaisseaux sanguins natifs. Les cellules tumorales se développent au voisinage de vaisseaux sanguins natifs. **B.** Destruction des vaisseaux sanguins natifs. Les cellules tumorales prolifèrent et compressent les vaisseaux sanguins dont les cellules libèrent de l'Ang-2 qui agit sur le récepteur Tie-2 présent sur les cellules endothéliales, inhibant alors les interactions entre les péricytes et les cellules endothéliales. **C.** Néoangiogenèse tumorale. Une zone nécrotique se développe au centre de la tumeur, tandis qu'en périphérie, au niveau de la zone pseudopalissadique, les cellules souffrant d'hypoxie expriment HIF-1. Ceci entraîne la libération de facteurs pro-angiogéniques, de chimiokines et de protéases matricielles. La dégradation de la matrice ainsi que la microglie recrutée au site tumorale libèrent davantage de facteurs pro-angiogéniques. Ces facteurs, en particulier le VEGF et le SDF-1, vont agir sur les vaisseaux sanguins distants, provoquant l'apparition de filopodes sur une cellule leader (*Tip cell*). Celle-ci va guider de la migration collective en réponse aux facteurs pro-angiogéniques vers la tumeur. La dégradation de la matrice par des protéases combinée à la sécrétion de molécules de la matrice par les cellules tumorales, favorise la migration et l'invasion des cellules endothéliales. Ang-2: angiopoïétine 2; Cdc42: *cell division control protein 42*; CXCR4: *C-X-C chemokine receptor type 4*; FGF: *fibroblast growth factor*; HIF-1: *hypoxia inducible factor-1*; HRE: *hypoxia responsive elements*; IL-8: *interleukine 8*; MMPs: *métalloprotéases matricielles*; p300/CBP: *cAMP response element-binding protein (CREB)-binding protein*; PAI-1: *plasminogen activator inhibitor-1*; SDF-1: *stromal cell-derived factor 1*; uPAR: *urokinase receptor*; VEGF: *vascular endothelial growth factor*; VEGFR2: *vascular endothelial growth factor receptor*.

En condition normoxique, FIH-1 catalyse l'hydroxylation de HIF-1 $\alpha$  au niveau de l'asparagine 803 et empêche le recrutement du coactivateur *cAMP response element-binding protein (CREB)-binding protein* (p300/CBP), ce qui inhibe la réponse transcriptionnelle. La présence d'O<sub>2</sub> permet également l'hydroxylation des résidus proline 402 et 564 de HIF-1 $\alpha$  par PHD, et conduit à sa dégradation protéosomale *via* sa liaison au complexe ubiquitine ligase *von Hippel-Lindau* (pVHL).

En condition hypoxique, les hydroxylases sont inactives, ce qui va permettre à HIF-1 $\alpha$  de s'accumuler dans le cytoplasme, pour être alors transloquée dans le noyau où il forme un dimère avec HIF-1 $\beta$  et recrute p300/CBP. Le complexe se lie aux *hypoxia responsive elements* (HREs) présents au niveau des promoteurs de nombreux gènes cibles de HIF pour réguler leur transcription. Le plus important des gènes régulés est celui du VEGF (Shweiki *et al.*, 1992). Corrélié au grade des astrocytomes (Figure 10), son niveau d'expression est particulièrement élevée dans les cellules pseudopalissadiques (Plate *et al.*, 1992). Une fois libéré, le VEGF se lie au récepteur VEGFR2 (cascade de signalisation décrite au §2.1) présent sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins distants et se comporte comme un chimioattractant en induisant l'extension des filopodes d'une cellule *leader*. Cette cellule va alors guider la migration collective de cellules endothéliales vers la tumeur (Gerhardt *et al.*, 2003). HIF-1 agit également sur l'expression des MMPs (Fujiwara *et al.*, 2007), de l'*urokinase receptor* (uPAR) (Büchler *et al.*, 2009) et de *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) (Liao *et al.*, 2007), qui contribuent ensemble à la destruction de la MEC, facilitant ainsi la migration des cellules endothéliales (Arai *et al.*, 1998; Sandström *et al.*, 1999; Gondi *et al.*, 2004). En dégradant la MEC, ces protéases libèrent les stocks de facteurs de croissance séquestrés par la matrice, amplifiant leurs effets sur la croissance et l'angiogenèse tumorales (Roy *et al.*, 2006). En plus du classique VEGF, le FGF est aussi largement exprimé dans les gliomes (Takahashi *et al.*, 1990) et son inhibition réduit l'angiogenèse et la croissance gliomales (Cuevas *et al.*, 1999; Auguste *et al.*, 2001). D'autres molécules sont considérées

pro-angiogéniques comme l'interleukine 8 (IL-8), libérée par la microglie qui envahit la zone tumorale par un mécanisme inflammatoire. En interagissant avec ses récepteurs CXCR1 et CXCR2 exprimés sur les cellules endothéliales, l'IL-8 augmente la survie, la prolifération et la migration cellulaires (Li *et al.*, 2003a). Cette cytokine est également produite au niveau des cellules pseudopalissadiques, l'hypoxie stimulant son expression (Brat *et al.*, 2005).

Une autre chimiokine, le SDF-1 ainsi que son récepteur, le CXCR4, sont hautement exprimés dans les glioblastomes, particulièrement dans les cellules pseudopalissadiques et les microvaisseaux en prolifération (Komatani *et al.*, 2009). L'expression du couple SDF-1/CXCR4 dépend d'ailleurs de l'expression de HIF-1 (Schioppa *et al.*, 2003) et peut être régulée par le VEGF (Hong *et al.*, 2006). La sécrétion du VEGF peut être en retour stimulée par l'activation de l'axe SDF-1/CXCR4 (Kijowski *et al.*, 2001). Des études *in vitro* et *in vivo* ont révélé que le SDF-1 contribue à la néovascularisation *i)* en participant à l'activation de la cellule *leader* lors de la migration collective conduisant à la néoangiogenèse (Unoki *et al.*, 2010) et *ii)* en recrutant des progéniteurs vasculaires responsables de la vasculogenèse au niveau du site tumorale (Aghi *et al.*, 2006).

Dans les gliomes, les molécules pro-angiogéniques cohabitent avec des molécules anti-angiogéniques également présentes dans la tumeur (Tableau 2). Il existe une véritable balance entre les molécules pro-angiogéniques et anti-angiogéniques avec une évolution en faveur de la néoangiogenèse. En effet, dans les gliomes, la somme de ces forces pro- et anti-angiogéniques modulées par l'hypoxie et les altérations génétiques provoque ce que l'on appelle le *switch* angiogénique favorisant la néoangiogenèse tumorale (Bergers and Benjamin, 2003).

	Facteurs	Localisation chromosomique des facteurs	Récepteurs	Localisation chromosomique des récepteurs	Références
PRO-ANGIOGENIQUE	<b>Ligands des récepteurs tyrosine kinase</b>				
	Angiopoïétine-1 et -4	8q22, 20p13	Tie-2	9q21	Audero <i>et al.</i> , 2001; Brunckhorst <i>et al.</i> , 2010
	EGF	4q25	EGFR	7p12.3-p12.1	Goldman <i>et al.</i> , 1993
	Ephrines	Nombreuses	Eph	Nombreux	Mosch <i>et al.</i> , 2010
	aFGF et bFGF	5q31, 4q25-q27	FGFR-1/-2	8p11.2-p11.1, 10q26	Cuevas <i>et al.</i> , 1999; Auguste <i>et al.</i> , 2001
	HGF	7q21.1	c-Met	7q31	Abounader and Laterra, 2005
	PDGFB	22q12.3-q13.1	PDGFR $\alpha/\beta$	4q12/5q31-q32	Guo <i>et al.</i> , 2003
	PGF-2	14q24-q31	VEGFR1, NPR-1	13q12, 10p12	Adini <i>et al.</i> , 2002
	TGF $\beta$	19q13.1	TGFBR-1/-2	9q33-q34, 3q22	Platten <i>et al.</i> , 2001
	VEGFA et B	6p12, 11q13	VEGFR1/2, NPR-1	13q12, 4q12, 10p12	Plate <i>et al.</i> , 1992; 1994
	<b>Ligands des autres récepteurs</b>				
	Adrénomédulline	11p15.4	CRLR/RAMP2/3	17q12-q21.1, 7p13-p12	Fernandez-Sauze <i>et al.</i> , 2004
	Endothéline	6p24-p23	ETA/B	4q31.2, 13q22	Stiles <i>et al.</i> , 1997
	IGFBP-2	2q33-q34			Pažanin <i>et al.</i> , 2011
	Interleukine-6	7p21	IL-6R	1q21.3	Liu <i>et al.</i> , 2010b
	Interleukine-8	4q12-q13	IL-8RA/B	2q35, 2q35	Brat <i>et al.</i> , 2005
	Pléiotrophine	7q33	RPTP $\zeta$	7q31.3	Mentlein and Held-Feindt, 2002
	SDF-1	10q11.1	CXCR4	2p21	Komatani <i>et al.</i> , 2009
	PGE2	Absent	EP1, 2, 3 et 4	19p13.1, 14q22, 1p31.2	Kamiyama <i>et al.</i> , 2006
	Sémaphorines	Nombreuses	Neuropiline et plexine	Nombreuses	Neufeld <i>et al.</i> , 2012
<b>Molécules de la MEC</b>					
Ténascine-C	9q33	Intégrines	Nombreuses	Behrem <i>et al.</i> , 2005	
Fibronectine	2q34	Intégrines	Nombreuses	Castellani <i>et al.</i> , 1994	
Laminine-8	1q31	Intégrines	Nombreuses	Fujita <i>et al.</i> , 2006	
ANTI-ANGIOGENIQUE	<b>Ligands de récepteurs</b>				
	Angiopoïétine-2	8p23	Tie-2	9p21	Zadeh <i>et al.</i> , 2010
	Interféron $\alpha$ et $\beta$	9p22, 9p21	IFNAR-1	21q22.1	Hong <i>et al.</i> , 2000
	Interleukine-4	5q31.1	IL-4RA	16p12.1-p11.2	Volpert <i>et al.</i> , 1998
	Phosphatidyl-sérine	Absent	BAI-1, -2 et -3	8q24, 1p35, 6q12	Kaur <i>et al.</i> , 2003
	Platelet factor 4	4q12-q13	CXCR3	8p12-p11.2	Tanaka <i>et al.</i> , 1997
	16kDa PRL	6p22.2-p21.3	16kDa PRL receptor	N.D.	Lee <i>et al.</i> , 2007
	PRP	N.D.	N.D.	N.D.	Bengtson and Linzer, 2000
	Somatostatine	3q28	SS2R et SS3R	17q24, 22q13.1	Barbieri <i>et al.</i> , 2009
	VEGI	9q33	N.D.	N.D.	Zhang and Li, 2012
	sVEGFR1	13q12	sVEGFR1	13q12	Lamszus <i>et al.</i> , 2003
	<b>Autres molécules</b>				
	Angiostatine	6q26			De Boïard <i>et al.</i> , 2003
	Endostatine	21q22.3			De Boïard <i>et al.</i> , 2003
	PEDF	17p13.3			Zhang and Lu, 2005
	PEX	16q13			Pluderi <i>et al.</i> , 2003
	SPARC	5q31.3-q32			Chlenski <i>et al.</i> , 2010
TIMP-3 et -4	22q12.1-q13.2			Zerrouqi <i>et al.</i> , 2012	
TSP-1 et -2	15q15, 6q27			Hsu <i>et al.</i> , 1996; Fears <i>et al.</i> , 2005	
Vasculostatine	8q24			Kaur <i>et al.</i> , 2009	

**Tableau 2. Facteurs pro- et anti-angiogéniques présents dans les gliomes et leur régulation.** En gras figurent les localisations chromosomiques ayant subi des altérations génétiques dans les gliomes. Les facteurs régulés par HIF-1 sont surlignés en violet (Modifié et complété d'après Fischer *et al.*, 2005). 16KDa PRL: 16KDa prolactin; aFGF: acidic fibroblast growth factor; BAI-1: brain-specific angiogenesis inhibitor 1; bFGF: basic fibroblast growth factor; CALCLR: calcitonin receptor-like receptor; ETA/B: endothelin receptors; EGF: epidermal growth factor; EGFR: epidermal growth factor receptor; EP1/4: prostaglandin E2 receptor; FGFR-1: fibroblast growth factor receptor 1; HGF: hepatocyte growth factor; HIF-1: hypoxia-inducible factor 1; IFNAR-1: interferon alpha/beta receptor 1; IL-4RA: interleukin-4 receptor subunit alpha; IL-6R: interleukin-6 receptor; IL-8R: interleukin-8 receptor; NPR-1: neuropilin-1; PDGF $\alpha$ : Platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$ ; PDGFB: platelet-derived growth factor subunit B; PEDF: pigment epithelium-derived factor; PEX: c-terminal hemopexin-like domain of MMP-2; PGE2: prostaglandine E2; PGF-2: placenta growth factor-2; PRP: proliferin-related protein; RAMP2/3: receptor activity-modifying protein 2/3; RPTP $\zeta$ : receptor-type tyrosine protein phosphatase  $\zeta$ ; SDF-1: stromal cell-derived factor 1; SPARC: secreted protein acidic and rich in cysteine; SS2/3R: somatostatin receptor type 2/3; sVEGFR1: soluble VEGFR type 1; TGF $\beta$ : transforming growth factor  $\beta$ ; TGFBR-1: transforming growth factor  $\beta$  receptor type-1; Tie-2: tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains-2; TIMP-3: tissue inhibitor of metalloproteinases; TSP-1: thrombospondin-1; VEGFA: vascular endothelial growth factor A; VEGFR1: vascular endothelial growth factor receptor 1; VEGI: vascular endothelial growth inhibitor.

### 3.3. Recrutement du système immunitaire

L'absence d'un système lymphatique et l'existence de la barrière hémato-encéphalique (BHE) sont généralement considérées comme des éléments empêchant l'invasion du système nerveux central (SNC) par les cellules immunitaires d'origine lymphoïde. Il existe un type de cellule immunitaire propre au SNC d'origine myéloïde, la microglie, considérée comme la forme résidente des macrophages et des cellules présentatrices d'antigène (CPAs) dans le SNC. Les cellules microgliales représentent 5 à 20% de la totalité des cellules « non neuronales » dans le SNC et sont aussi nombreuses que les neurones (Lawson *et al.*, 1990). Nissl, qui fut le premier en 1899 à décrire la microglie, suivi de Santiago Ramon y Cajal en 1913, puis de Pio de Rio-Hortega en 1919, considérait ces cellules comme une « neuroglie » réactive, soulignant leur capacité à migrer et à phagocyter (Tambuyzer *et al.*, 2009).

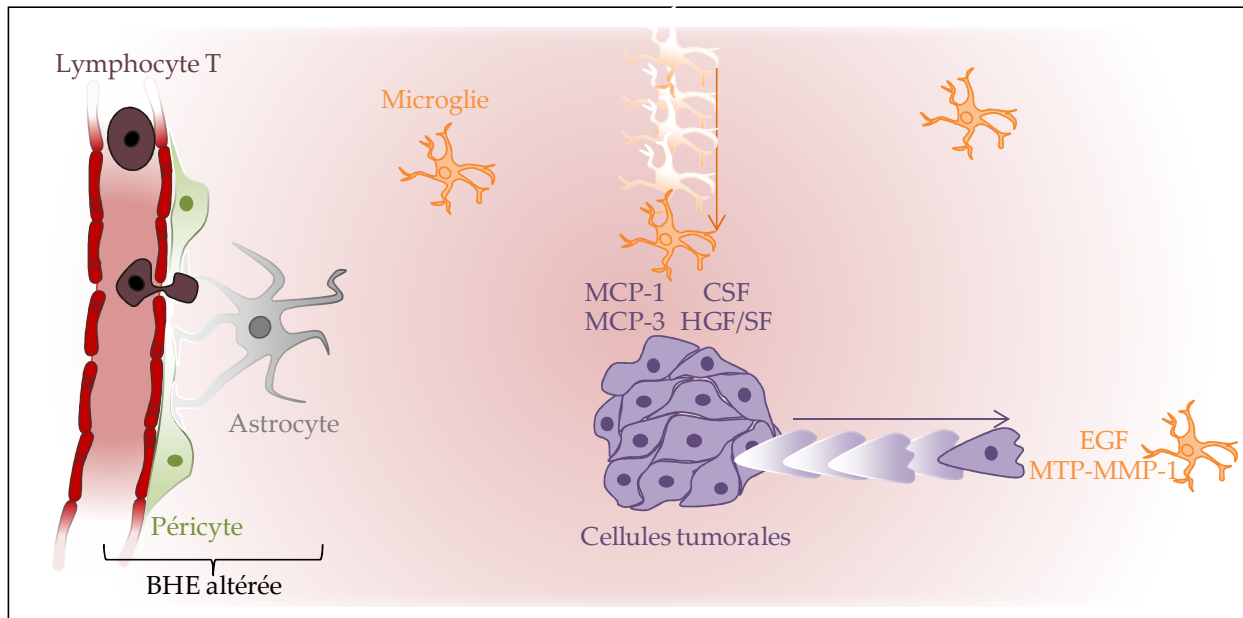
Dans leur forme quiescente, les cellules microgliales contrôlent le microenvironnement en réalisant de la pinocytose ou en interagissant avec les neurones (Nimmerjahn *et al.*, 2005). La détection par la microglie d'un signal pro-inflammatoire, tel que la présence de diverses cytokines, d'interféron- $\gamma$ , de peptide  $\beta$ -amyloïde, de thrombine ou de lipopolysaccharides

(LPS) initie une réponse immunitaire (Dheen *et al.*, 2007) qui consiste en la libération de facteurs dont les cytokines IL-1 (Hartlage-Rübsamen *et al.*, 1999), IL-6 (Suzumura *et al.*, 1996) et *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ; Floden *et al.*, 2005), mais également *regulated upon activation normal T-cell expressed and presumably secreted* (RANTES; Lokensgard *et al.*, 2001) et de multiples chimiokines. Les astrocytes, présents dans ce microenvironnement particulier vont aussi produire des chimiokines et des cytokines pro-inflammatoires (Lau and Yu, 2001) et surexprimer des marqueurs de surface immunomodulateurs (Ridet *et al.*, 1997). Ces changements perturbent la BHE (Lu *et al.*, 2001a) ce qui facilite l'entrée des facteurs solubles et de cellules immunitaires périphériques telles que les macrophages (Kleinschnitz *et al.*, 2003), les lymphocytes T (Minagar and Alexander, 2003) et les *natural killers* (Holmin *et al.*, 1995). Grâce à la transplantation de moelle épinière de souris transgénique GFP dans une souris sauvage irradiée, Schilling et coll. (2003) ont démontré que l'activation de la microglie précède l'infiltration de cellules immunitaires périphériques. La première preuve histologique de la présence de microglie dans les gliomes fut apportée en 1925 par Penfield. Depuis, il a été montré une importante colonisation microgliale et lymphocytaire à proximité et dans ces tumeurs (Badie and Schartner, 2001). Appelées *tumor-associated macrophages* (TAMs), ces cellules contribuent à l'établissement de l'environnement immunosuppresseur des gliomes et favorisent la prolifération et la migration des cellules tumorales (Zhai *et al.*, 2011).

Comme indiqué dans la Figure 12, l'accumulation et l'infiltration des cellules microgliales au niveau du gliome est due à la production de facteurs chimioattractants par les cellules tumorales gliales. L'un d'entre eux, le *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) est produit par les astrocytomes (Prat *et al.*, 2000) et peut interagir avec le récepteur CCR2 présent à la surface des cellules microgliales. L'activation du CCR2 par le MCP-1 favorise la migration de la microglie et son infiltration intratumorale (Platten *et al.*, 2003). Le nombre de cellules microgliales présentes dans les gliomes est corrélé avec le niveau d'expression de MCP-3, un composé de la même famille, indiquant que MCP-3 jouerait un rôle majeur dans l'infiltration



de ces cellules (Okada *et al.*, 2009). De plus, certains facteurs de croissance sécrétés par les gliomes, tels que le *colony stimulating factor* (CSF) (Alterman and Stanley, 1994) ou l'*hepatocyte growth factor/scatter factor* (HGF/SF) (Badie *et al.*, 1999) favorisent aussi la prolifération et l'invasion des cellules microgliales.



**Figure 12. Rôle du système immunitaire dans le développement des gliomes.** Implication de la microglie dans les processus de migration cellulaire. BHE: barrière hémato-encéphalique; CSF: *colony stimulating factor*; EGF: *epidermal growth factor*; HGF/SF: *hepatocyte growth factor/scatter factor*; MCP1/3: *monocyte chemotactic protein 1/3*; MMP: métalloprotéase matricielle.

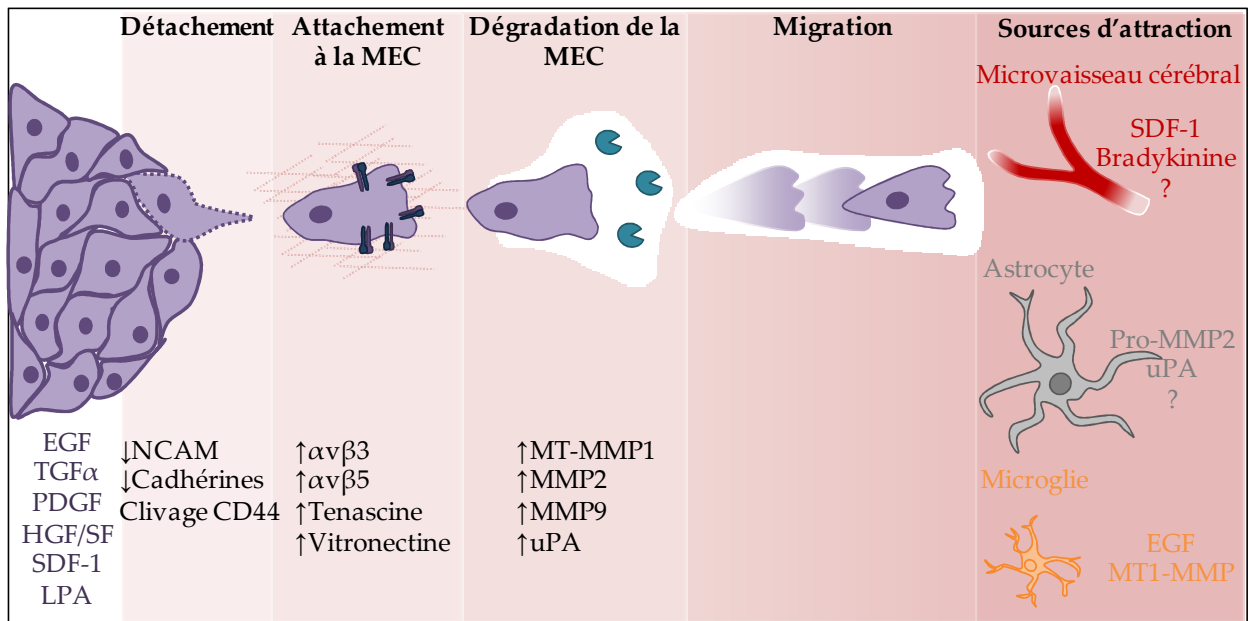
### 3.4. Invasion tumorale

L'invasion tumorale est une des caractéristiques les plus importantes des gliomes car elle est la cause principale de rechute des patients. En effet, dans plus de 90% des cas, une tumeur réapparaît directement autour ou à quelques centimètres de la cavité de résection tumorale.

#### 3.4.1. Étapes de l'invasion tumorale

L'invasion des cellules tumorales dans le tissu sain cérébral implique une combinaison complexe de plusieurs mécanismes cellulaires qui restent encore à ce jour mal compris. La théorie actuelle concernant la diffusion/invasion des cellules tumorales comporte plusieurs étapes, *i.e.* le détachement des cellules de la tumeur primaire, l'attachement à la MEC, la

dégradation de la MEC et finalement la migration directionnelle (Nakada *et al.*, 2007) (Figure 13).



**Figure 13. Représentation schématique des étapes de l'invasion tumorale.** De gauche à droite, la cellule tumorale se détache de la masse tumorale puis s'attache à la MEC. Une sécrétion de protéases permet à la cellule de dégrader la MEC et de progresser dans le parenchyme cérébral jusqu'aux différentes sources d'attraction. EGF: *epidermal growth factor*; HGF/SF: *hepatocyte growth factor/scatter factor*; LPA: *lysophosphatidic acid*; MEC: *matrice extracellulaire*; MMP: *métalloprotéase matricielle*; NCAM: *neural cell adhesion molecule*; PDGF: *platelet-derived growth factor*; SDF-1: *stromal cell-derived factor 1*; TGF $\alpha$ : *transforming growth factor  $\alpha$* ; uPA: *urokinase-type plasminogen activator*.

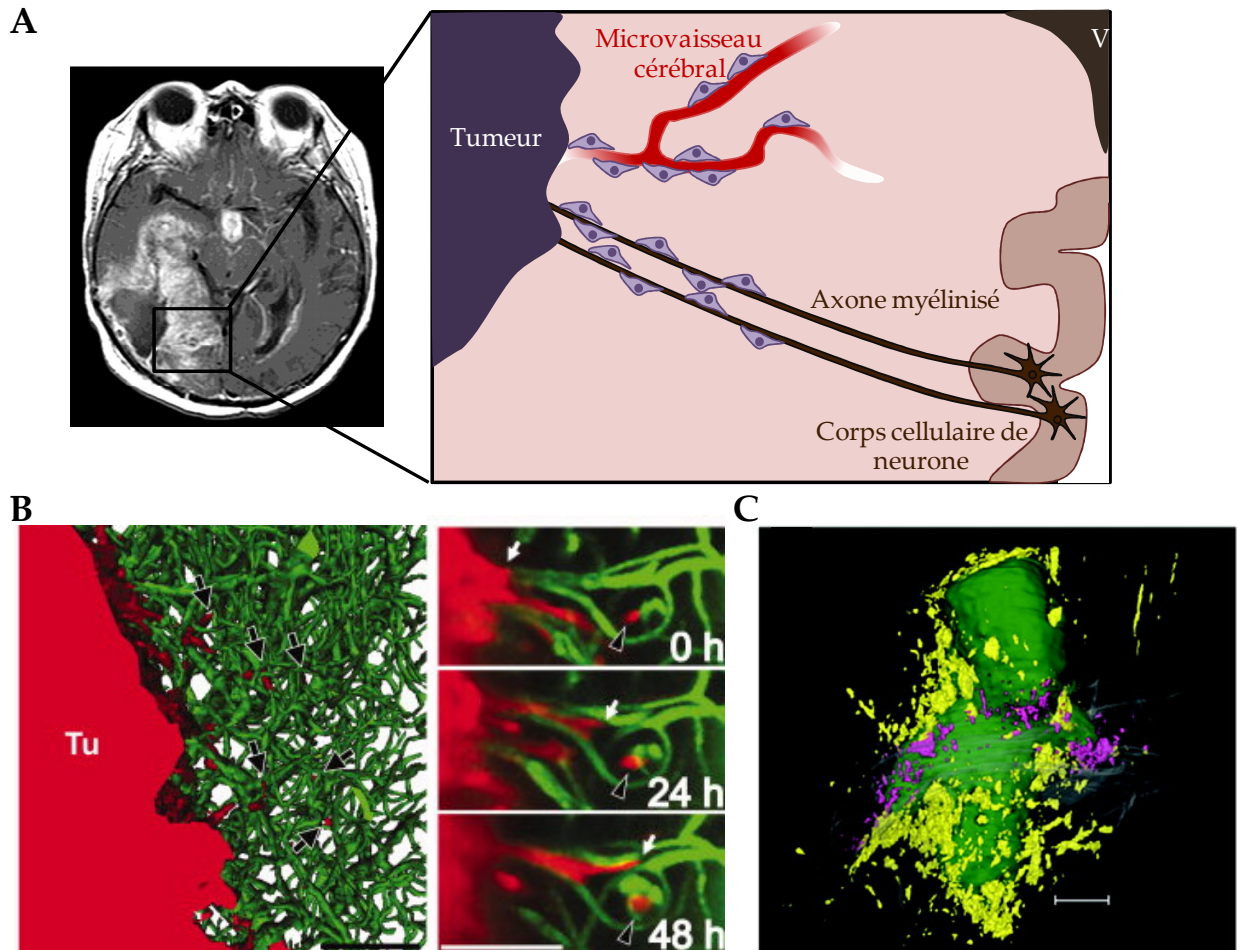
Première étape de l'invasion (Figure 13), le détachement des cellules tumorales est associée à l'inhibition de l'expression de molécules d'adhésion, les *neural cell adhesion molecule* (NCAM). En effet, l'expression de NCAM est inversement corrélée au grade des gliomes (Sasaki *et al.*, 1998), alors que la surexpression et la sous-expression de NCAM inhibe et stimule l'invasion de gliome de Rat, respectivement (Owens *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2005). De plus, des xénogreffes orthotopiques issues de cellules tumorales gliales surexprimant des NCAM recombinantes, présentent un phénotype moins diffus que les tumeurs non modifiées (Edvardsen *et al.*, 1994). L'instabilité et la désorganisation des cadhérines (adhésion cellule-cellule), entraîne la migration et l'invasion des gliomes *in vitro* (Perego *et al.*, 2002; Maret *et al.*, 2010). Enfin, certains récepteurs de constituants de la MEC,

tels que le CD44 liant l'acide hyaluronique, sont surexprimés dans les gliomes de hauts grades (Ranuncolo *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2010) et leur clivage par des MMPs dont la MMP9 provoque le détachement et la migration cellulaires (Okamoto *et al.*, 1999; Chetty *et al.*, 2012).

L'attachement des cellules tumorales à la MEC (Figure 13) fait classiquement intervenir les intégrines (§1.3). L'inhibition de l'expression de la sous-unité  $\beta 1$  de ces molécules dans les gliomes de Rat inhibe l'invasion tumorale (Paulus *et al.*, 1996). De plus, l'expression des intégrines  $\alpha\beta 3$  et  $\alpha\beta 5$  est corrélée au grade des gliomes (Bello *et al.*, 2001; Schnell *et al.*, 2008). L'adhésion des cellules à la MEC est amplifiée par l'expression de molécules constituant la MEC par les cellules tumorales elles-mêmes. Il a d'ailleurs été démontré que l'expression de la ténascine C est elle aussi corrélée au grade des gliomes (Ventimiglia *et al.*, 1992; Herold-Mende *et al.*, 2002) et que cette dernière augmente l'invasion des cellules dans le tissu sain (Hirata *et al.*, 2009). Il en est de même pour la vitronectine, protéine principalement retrouvée au niveau du front de migration du gliome (Gladson and Cheresch, 1991).

L'étape de remodelage de la MEC (Figure 13) est accomplie par l'action de nombreuses protéases incluant des MMPs, des ADAMs, l'uPA et des cathepsines, toutes surexprimées dans les gliomes (Zhang *et al.*, 2000; Levicar *et al.*, 2002; Hagemann *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2012). Parmi les MMPs, MT1-MMP (ou MMP-14), MMP-2 et MMP-9 sont les plus abondantes dans les gliomes (Hagemann *et al.*, 2012). La surexpression de ces MMPs peut être en partie expliquée par l'hyperactivation de la voie PI3K/Akt dans ces tumeurs. En effet, l'inhibition d'Akt abaisse l'expression des MMPs dans les cellules tumorales gliales (Kwiatkowska *et al.*, 2011) et provoque ainsi une réduction de l'invasion des cellules tumorales dans du matrigel (Pu *et al.*, 2004). Le mécanisme d'activation des MMPs est complexe et fait intervenir de nombreuses régulations croisées. A titre d'exemple, l'activation de la MMP-2 résulte du clivage de la pro-MMP2 par un complexe comprenant MT1-MMP et

*tissue inhibitor of metalloproteinases-2* (TIMP-2) (Hernandez-Barrantes *et al.*, 2000). L'activation de MMP-9 nécessite quant à elle l'uPA (Zhao *et al.*, 2008) dont la déplétion supprime l'invasion *in vitro* et la formation de tumeurs dans le cerveau de souris *Nude* (Gondi *et al.*, 2003).



**Figure 14. Modèle d'invasion des cellules tumorales gliales.** **A.** Représentation schématique des deux voies majeures d'invasion des cellules tumorales gliales. Ces cellules envahissent le tissu sain principalement en longeant les microvaisseaux cérébraux ou les fibres de la substance blanche. **B.** Reconstruction tridimensionnelle d'un empilement d'images obtenues par microscopie multiphotonique (à gauche) représentant une masse tumorale (Tu, Rouge) entourée de vaisseaux sanguins (Vert) et images successives de microscopie multiphotonique (à droite) représentant des cellules tumorales (Rouge) migrant le long des vaisseaux sanguins (Vert) au cours du temps (d'après Winkler *et al.*, 2009). **C.** Représentation tridimensionnelle d'une xénogreffe orthotopique de souris obtenue par la technique de cryo-imagerie montrant les cellules tumorales (en magenta), migrant le long des fibres de la substance blanche (d'après Burden-Gulley *et al.*, 2011).

Finalement, la migration des cellules tumorales gliales se déroule comme décrit précédemment (c.f. §1). Elles infiltrent le parenchyme cérébral en migrant le long des

vaisseaux sanguins, des fibres de la substance blanche ou au niveau de la zone sous-épendymaire (Giese *et al.*, 2003; Farin *et al.*, 2006) (Figure 14).

### 3.4.2. Sources de l'attraction tumorale

#### *Cellules tumorales (effet autocrine et/ou paracrine)*

Pour les plus hauts grades, les cellules localisées au sein des tumeurs gliales évoluent dans un environnement acide et hypoxique, et libèrent de nombreux facteurs favorisant la motilité cellulaire, dont les ligands des RTKs (Figure 13). L'un d'entre eux, l'EGF, joue un rôle important dans la prolifération des glioblastomes et participe également à l'invasion tumorale en activant son récepteur EGFR constitutivement actif ou surexprimé (Chicoine and Silbergeld, 1997). D'autres phénomènes auto/paracrines impliqués dans l'invasion ont été décrits pour le TGF $\alpha$  (El-Obeid *et al.*, 1997), le PDGF (Feng *et al.*, 2012) ou encore le HGF/SF (Eckerich *et al.*, 2007) dont les récepteurs RTKs sont exprimés par les cellules tumorales. En accord avec ces données, l'expression du couple ligand HGF/SF-récepteur Met est positivement corrélée au grade des tumeurs (Koochekpour *et al.*, 1997), et l'HGF/SF s'avère être le plus puissant facteur chimiotactique testé sur des lignées de gliome (Brockmann *et al.*, 2003).

Les chimiokines sont également sécrétées par les gliomes. Parmi elles, le SDF-1 et son récepteur CXCR4, sont surexprimés dans les glioblastomes multiformes par rapport au tissu sain (Sehgal *et al.*, 1998; Bajetto *et al.*, 2006). L'impact de SDF-1 sur l'invasion des cellules tumorales gliales a d'abord été mis en évidence *in vitro* (Ehtesham *et al.*, 2006). Son rôle a ensuite été testé *in vivo* dans un modèle murin de tumeur cérébrale à l'aide notamment d'un ARN interférant, montrant une diminution de la croissance tumorale et de l'infiltration cellulaire au niveau des fibres (Wang *et al.*, 2012).

D'autres signaux autocrines impliqués dans la motilité font intervenir les lipides bioactifs. En effet, l'autotaxine, une protéine surexprimée dans les glioblastomes multiformes (Kishi *et*

*al.*, 2006) exerce une activité lysophospholipase D catalysant la production de LPA. Ce dernier, en liant son récepteur LPA1 situé à la membrane des cellules tumorales gliales, entraîne leur invasion dans le parenchyme (Hoelzinger *et al.*, 2008).

Finalement, les cellules tumorales gliales produisent des molécules de la MEC qui vont servir de support à la migration et à l'invasion tumorale. La plupart de ces molécules sont exprimées de façon basale dans le cerveau sain et surexprimées au sein des gliomes (Gritsenko *et al.*, 2012). A titre d'exemple, l'expression de vitronectine (Gladson and Cheresch, 1991), d'ostéopontine (Saitoh *et al.*, 1995), et de ténascine (Herold-Mende *et al.*, 2002) est corrélée au grade de la tumeur.

### ***Cellules endothéliales***

Comme évoqué précédemment, les cellules tumorales gliales migrent préférentiellement vers et le long des vaisseaux sanguins cérébraux (Farin *et al.*, 2006; Winkler *et al.*, 2009). Ce processus sous-entend l'existence de signaux libérés par les vaisseaux sanguins et attractant les cellules tumorales (Figure 13). Il a d'ailleurs été montré *in vitro* qu'un milieu conditionné de cellules endothéliales conduit à la migration des cellules tumorales (von Bülow *et al.*, 2001). Néanmoins, les facteurs relayant cette attraction n'ont pas été identifiés. Le candidat majeur reste le SDF-1, produit par les cellules endothéliales, qui contribue à la migration des cellules tumorales *in vitro* (Kenig *et al.*, 2010). Les peptides vasoactifs, produits et libérés par les cellules endothéliales, et dont l'effet sur la migration de différents types de cellules a été largement démontré (§2.2.2), apparaissent aussi comme de bons candidats dans le recrutement des cellules tumorales gliales par les cellules endothéliales. Une étude récente a d'ailleurs montré qu'un peptide vasoactif, la BDK, est libéré par les cellules endothéliales et agit comme un chimioattractant favorisant l'invasion des tumeurs cérébrales d'origine gliale (Montana and Sontheimer, 2011).

### ***Astrocytes***

Lors de l'infiltration des cellules tumorales gliales au niveau des vaisseaux sanguins, l'organisation des pieds astrocytaires est altérée, stimulant alors la réactivité astrocytaire (Nagano *et al.*, 1993; Zagzag *et al.*, 2000a). Ainsi activés, les astrocytes libèrent différents facteurs dont l'uPA (Figure 13). *In vitro*, la libération de pro-MMP2 par les astrocytes n'est activée qu'en présence des cellules tumorales, *via* un mécanisme qui impliquerait une surexpression astrocytaire d'uPA. En interagissant avec son récepteur uPAR, il permet la conversion du plasminogène libéré par les gliomes en plasmine, qui active alors la pro-MMP2 (Le *et al.*, 2003). Quoi qu'il en soit, même s'il a été démontré que les astrocytes libèrent de nombreux facteurs pouvant participer à l'invasion des cellules tumorales gliales (Dowell *et al.*, 2009), aucune étude n'établit avec certitude un lien direct entre la sécrétion des astrocytes et l'invasion tumorale.

### ***Microglie***

Il est maintenant admis que la microglie infiltre la tumeur, mais participe aussi à l'invasion tumorale. Les études de migration *in vitro* réalisées à l'aide de la technique de chambre de Boyden ont permis de démontrer qu'en présence de microglie (ou de leur milieu conditionné), des cellules de gliomes migrent plus rapidement (Bettinger *et al.*, 2002), suggérant qu'elles sécrètent des molécules chimiottractantes, telles que des cytokines ou des chimiokines (Figure 13). Ainsi, il a été démontré que l'EGF libéré par les cellules microgliales stimule la migration des gliomes (Coniglio *et al.*, 2012). De plus, l'invasion des cellules tumorales gliales dans des tranches de cerveau est réduite lorsque que l'on retire la microglie des tranches (Markovic *et al.*, 2005). Dans cette même étude, les auteurs démontrent qu'en présence des cellules tumorales et de microglie, l'expression de la MMP-2 est augmentée, ce qui favoriserait l'invasion tumorale. Plus récemment une autre étude a révélé que la microglie

exprime la MT1-MMP qui entraîne le clivage de la pro-MMP-2 libérée par les gliomes et sa maturation en MMP2, favorisant ainsi l'invasion tumorale (Markovic *et al.*, 2009).

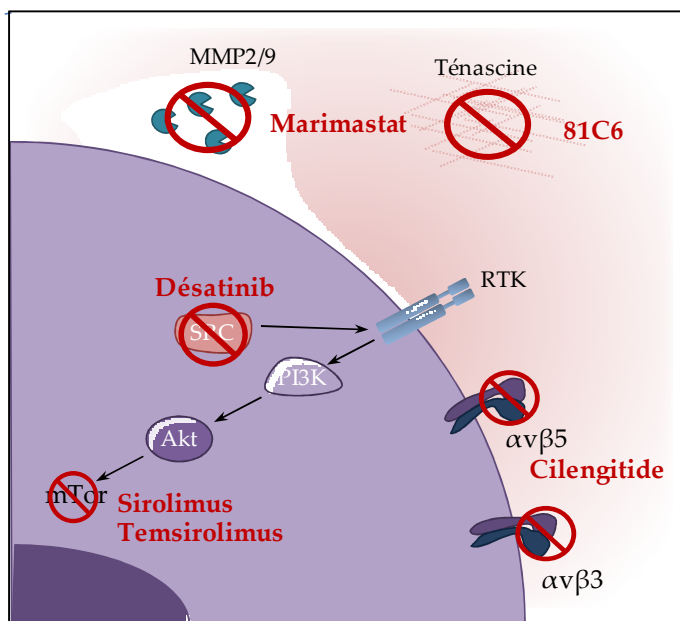
### 3.5. Stratégies thérapeutiques ciblant la migration cellulaire

Bien que des progrès considérables aient été réalisés ces dernières années en neuro-oncologie, le pronostic de survie des patients porteurs d'un glioblastome reste sombre avec une médiane de survie estimée à 14,6 mois après chirurgie puis traitement combiné (radio- et chimiothérapie) (Stupp *et al.*, 2005). Ces résultats décevants sont principalement imputables au potentiel néoangiogénique des glioblastomes et au caractère extrêmement invasif des cellules tumorales gliales. Ce dernier constat a conduit plusieurs équipes de recherche à développer de nouveaux outils thérapeutiques ciblant les voies moléculaires responsables de l'invasion des gliomes. Bien que de nombreuses études réalisées *in vitro* et/ou sur des modèles animaux, offrent de nouvelles pistes thérapeutiques, peu d'entre elles sont encore éprouvées en phase clinique (Figure 15).

L'une des stratégies consiste à associer le Témazolomide (TMZ) et un inhibiteur de MMPs, le Marimastat uniquement en deuxième ligne. Testée en phase clinique II, cette combinaison a peu d'impact sur la progression tumorale et cause, chez certains patients, de fortes douleurs dans les articulations (Groves *et al.*, 2002, 2006). Une combinaison plus prometteuse est celle du TMZ et d'un inhibiteur d'intégrines ciblant spécifiquement  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$ , le Cilengitide. Cette association n'entraîne pas de toxicité chez les patients et dans 69% des cas, on observe une absence de progression tumorale au bout de 6 mois ce qui représente un progrès de 15% par rapport à ceux qui reçoivent uniquement le TMZ (Stupp *et al.*, 2010). L'utilisation, en phase clinique II d'un anticorps dirigé contre la tenascine, le 81C6, prolonge aussi la médiane de survie des patients (Reardon *et al.*, 2002). Le Desatinib, un inhibiteur de Src pourtant prometteur *in vitro*, n'a pas d'effet sur la progression tumorale (Reardon *et al.*, 2012).



D'autres outils thérapeutiques développés à des fins anti-prolifératives et anti-angiogéniques, tels que des inhibiteurs de *mammalian target of rapamycin* (mTor) (Sirolimus et Temsirolimus), présentent là encore peu d'effets bénéfiques (Galanis *et al.*, 2005; Geoerger *et al.*, 2012) excepté chez des patients porteurs d'une mutation somatique PTEN (Cloughesy *et al.*, 2008). Enfin, il a été démontré que l'utilisation d'inhibiteurs de l'activité kinase du VEGFR (Bévacizumab), utilisés pour inhiber ou normaliser la néoangiogenèse tumorale, favorise le phénotype invasif des tumeurs (Norden *et al.*, 2008). Ainsi, l'ensemble de ces études suggèrent l'utilisation de multithérapies composées d'inhibiteurs adaptés au profil moléculaire des gliomes (classification de Verhaak) et permettant de bloquer à la fois les voies de signalisation de la prolifération, la néoangiogenèse et l'invasion. Dans cette optique, la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées passe par la compréhension des signaux cellulaires relayés par les récepteurs de peptides vasoactifs chimiottractants, exprimés à la fois par les cellules endothéliales, les cellules tumorales et les macrophages.



**Figure 15. Représentation schématique du mode d'action de différentes thérapies anti-invasives testées en phase clinique.** En rouge figurent les noms des inhibiteurs. MMP: métalloprotéase matricielle; mTor: *mammalian target of rapamycin*; PI3K: phosphatidylinositol-3 kinase; RTK: récepteur tyrosine kinase.

## Chapitre II: le système urotensinergique

### 1. L'urotensine II et l'urotensin II-related peptide

#### 1.1. Découverte et structure des peptides

A la fin des années 1960, Bern et Lederis ont nommé « urotensines » une série de peptides biologiquement actifs isolés à partir du système neurosécréteur (urophyse) de poissons téléostéens. Parmi eux, l'urotensine II (UII) a été caractérisé pour sa capacité à stimuler l'activité des muscles lisses (Bern and Lederis, 1969). Après avoir été isolée à partir d'extraits d'urophyses de *Gillichthys mirabilis* ou Gobie, la séquence de l'UII a été déterminée par l'équipe de Bern (Pearson *et al.*, 1980). L'UII fut ensuite identifié chez de nombreuses autres espèces de poissons (Figure 16). Une dizaine d'années plus tard, l'équipe du Dr Vaudry fut la première à démontrer la présence du peptide dans le cerveau d'un tétrapode, la Grenouille verte *Rana ridibunda* (Conlon *et al.*, 1992b). Sur la base de ces résultats, le gène codant l'UII a été recherché avec succès chez différentes espèces de mammifères (Figure 16) dont l'Homme (Coulouarn *et al.*, 1998; Ames *et al.*, 1999). Composé de onze (Singe et Homme) à dix-sept (Souris) acides aminés (aa), l'UII possède une structure extrêmement bien conservée au cours de l'évolution, avec notamment la présence d'un hexapeptide cyclique C-terminal Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys rigoureusement identique de la Lamproie à l'Homme, malgré les 560 millions d'années qui séparent ces deux espèces (Coulouarn *et al.*, 1998) (Figure 16). L'UII a été identifié chez une seule espèce d'invertébré, l'Aplysie ou *Aplysia californica* (González *et al.*, 1992) chez laquelle l'UII est composée de vingt aa et l'hexapeptide cyclique comporte deux aa différents par rapport à celui des vertébrés (Romanova *et al.*, 2012).

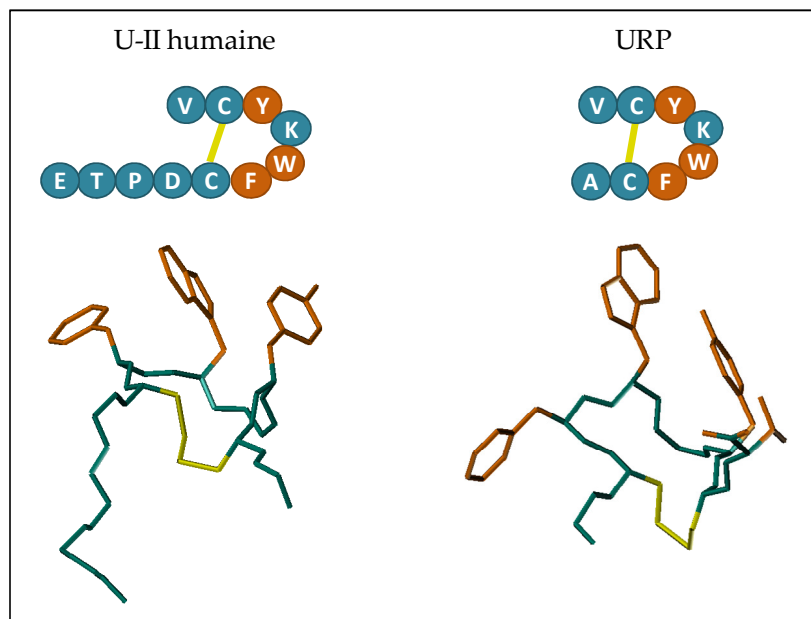
En 2003, un peptide apparenté à l'UII, l'urotensin II-related peptide (URP) a été isolé à partir d'extraits de cerveaux de rats (Sugo *et al.*, 2003). Le clonage des ADNc codant les prépro-URP de l'Homme, de la Souris et du Rat a révélé que les précurseurs possèdent 54% d'identité entre l'Homme et le Rat, contre 47% entre l'Homme et la Souris (Sugo and Mori,

2008). La séquence du peptide est identique chez tous les mammifères et correspond à l'Ala<sup>1</sup>-UII<sub>4-11</sub> humaine (Figures 16 et 17).

	Espèce		Séquences peptidiques		
	Nom scientifique	Nom commun	UII	URP	
TÉLÉOSTÉENS	<i>Lethenteron camtschaticum</i>	Lamproie	NNFSDCFWKYCV (Waugh <i>et al.</i> , 1995)		
	<i>Scyliorhinus canicula</i>	Roussette	NNFSDCFWKYCV (Conlon <i>et al.</i> , 1992a)		
	<i>Acipenser ruthenus</i>	Esturgeon	GSTSECFWKYCV (McMaster <i>et al.</i> , 1992)		
	<i>Anguilla japonica</i>	Anguille	GSGSECFWKYCV		
	<i>Catostomus commersonii</i>	Poisson ventouse	GSGADCFWKYCV (McMaster and Lederis, 1983)		
	<i>Danio rerio</i>	Poisson zèbre	GGGADCFWKYCV	DDTCFWKYCV (Quan <i>et al.</i> , 2012)	
	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpe	GGGADCFWKYCV (Ichikawa <i>et al.</i> , 1984)		
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truite arc-en-ciel	GGNSECFWKYCV (Waugh and Conlon, 1994)		
	<i>Platichthys flesus</i>	Limande	AGTTECFWKYCV (Conlon <i>et al.</i> , 1990)		
	<i>Gillichthys mirabilis</i>	Gobie	AGTADCFWKYCV (Pearson <i>et al.</i> , 1980)		
	<i>Takifugu rubripes</i>	Fugu	TGNNECFWKYCV	SEPCFWKYCV (Quan <i>et al.</i> , 2012)	
	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Choquemort	NDNSECFWKYCV		
	TÉTRAPODES	<i>Pelophylax ridibundus</i>	Grenouille	AGNLSECFWKYCV (Conlon <i>et al.</i> , 1992b)	
		<i>Gallus gallus</i>	Poulet	GNLSECFWKYCV	ACFWKYCI
		<i>Taeniopygia guttata</i>	Mandarin	GNLSECFWKYCV	ACFWKYCI
<i>Felis catus</i>		Chat	GSPSECFWKYCV		
<i>Sus scrofa</i>		Porc	GPPSECFWKYCV (Mori <i>et al.</i> , 1999)		
<i>Ovis aries</i>		Mouton	GPSSECFWKYCV		
<i>Bos taurus</i>		Bovin	GPSSECFWKYCV	ACFWKYCV	
<i>Rattus norvegicus</i>		Rat	QHGTAPECFWKYCI (Coulouarn <i>et al.</i> , 1999)	ACFWKYCV (Sugo <i>et al.</i> , 2003)	
<i>Mus musculus</i>		Souris	QHKQHGAAPECFWKYCI (Coulouarn <i>et al.</i> , 1999)	ACFWKYCV (Pelletier <i>et al.</i> , 2005)	
<i>Otolemur garmettii</i>		Otolemur	GTPSECFWKYCV	ACFWKYCV	
<i>Callithrix jacchus</i>		Marmouset	ETPDCFWKYCV		
<i>Papio anubis</i>		Babouin	ETPDCFWKYCV	ACFWKYCV	
<i>Macaca mulatta</i>		Macaque	ETPDCFWKYCV	ACFWKYCV	
<i>Nomascus leucogenys</i>		Gibbon	ETPDCFWKYCV		
<i>Pongo abelii</i>		Orang-outan	ETPDCFWKYCV	ACFWKYCV	
<i>Gorilla gorilla</i>		Gorille	ETPDCFWKYCV	ACFWKYCV	
<i>Homo sapiens</i>		Homme	ETPDCFWKYCV (Coulouarn <i>et al.</i> , 1998)	ACFWKYCV	
<i>Pan paniscus</i>		Bonobo	ETPDCFWKYCV	ACFWKYCV	
<i>Pan troglodytes</i>	Chimpanzé	ETPDCFWKYCV (Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002)	ACFWKYCV		

**Figure 16. Comparaison des séquences de l'UII et de l'URP chez différentes espèces de vertébrés en fonction de leur évolution.** Les différentes espèces animales ont été classées à l'aide d'un logiciel libre de production d'arbre phylogénétique, basé sur la taxonomie de NCBI, appelé *Interactive Tree of Life* (iTOL v2.2.1; Letunic and Bork, 2007, 2011). La partie biologiquement active des peptides (en rouge) est conservée chez toutes les espèces.

Des études de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont révélé qu'en solution aqueuse, la partie cyclique de l'UII adopte une structure contrainte, mais ne contient pas de tour canonique (Flohr *et al.*, 2002). Les Drs Milazzo et Guilhaudis (COBRA, IRCOF, Rouen) ont aussi démontré que l'UII humaine présente dans l'eau un  $\gamma$ -turn inverse (Lescot *et al.*, 2007) (Figure 17) alors qu'en milieu micellaire sodium dodecyl sulfate (SDS), une forme tronquée de l'UII humaine, l'hUII<sub>4-11</sub>, possède un  $\beta$ '-turn de type II (Carotenuto *et al.*, 2004).



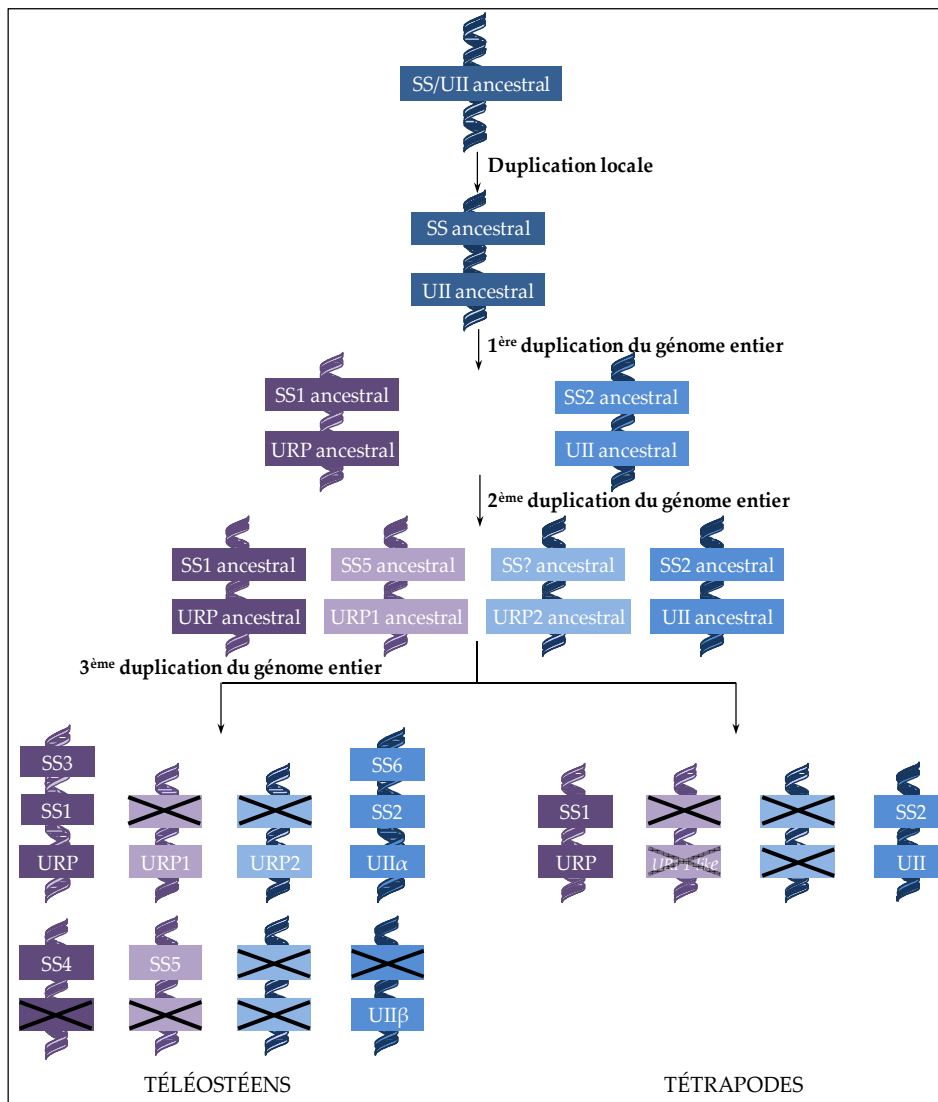
**Figure 17. Comparaison des séquences peptidiques et des structures tridimensionnelles de l'UII et de l'URP.** Le pont disulfure est représenté en jaune, les aa qui figurent en orange correspondent à un *cluster* hydrophobe important pour l'interaction avec le récepteur. Les représentations tridimensionnelles de l'UII et de l'URP ont été réalisées par les Drs Isabelle Milazzo et Laure Guilhaudis du Laboratoire de Chimie Organique Bioorganique Réactivité Analyse (COBRA, UMR 6014 CNRS, Université de Rouen).

Concernant l'URP, une seule étude structurale réalisée par l'équipe du laboratoire COBRA a montré qu'à l'instar de la forme humaine de l'UII, ce paralogue contient dans l'eau un  $\gamma$ -turn inverse (Chatenet *et al.*, 2004) (Figure 17). Des résultats complémentaires obtenus récemment par des expériences de dichroïsme circulaire et de RMN suggèrent qu'en milieu dodecylphosphocholine (DPC) micellaire, l'UII et l'URP adopteraient une structure secondaire différente (collaboration en cours avec l'équipe COBRA).

## 1.2. Les gènes codant l'UII et l'URP

Chez l'Homme, les gènes codant les préproUII et préproURP sont localisés dans les régions p36 du chromosome 1 et q28 du chromosome 3 respectivement (Sugo *et al.*, 2003).

La comparaison des séquences de l'UII et de l'URP avec celle de la somatostatine (SS) révèle de grandes similitudes, notamment au niveau de l'hexapeptide cyclique, région active de la SS (Pearson *et al.*, 1980; Conlon *et al.*, 1997; Tostivint *et al.*, 2006). Le gène de la SS (*SS1*) est situé à proximité de celui de l'URP, et celui de son paralogue, la cortistatine (*SS2*), est localisé sur le même locus que celui de l'UII (Tostivint *et al.*, 2006). Selon ces auteurs, les gènes *UII* et *URP* d'une part et *SS1* et *SS2* d'autre part, dériveraient de deux gènes ancestraux, *protoUII* et *protoSS*, respectivement (Figure 18). A l'appui de cette hypothèse, d'autres gènes comme *MASP2*, *CLCN6* et *TP73* de la région 1p36 possèdent aussi un paralogue dans la région 3q28 (Tostivint *et al.*, 2006). Ces régions 1p36 et 3q28 sont considérées comme des paralogons, *i.e.* des régions ayant subi des duplications à grande échelle.



**Figure 18. Schéma de l'évolution des gènes de la somatostatine, de l'UII et de l'URP.** Les croix noires indiquent les gènes perdus au cours de l'évolution. Les gènes *UIIα* et *UIIβ* présents chez les téléostéens représentent deux copies du même gène (modifié d'après Tostivint *et al.*, 2013). UII: urotensine II; URP: urotensine II-related peptide; SS: somatostatine.

Plus récemment, une étude a suggéré l'existence de deux isoformes de l'URP chez les téléostéens, appelés *URP1* et *URP2*, qui auraient disparu dans le lignage des tétrapodes (Parmentier *et al.*, 2011) (Figure 18). De façon intéressante, la séquence codant le peptide CFWKYCIQN retrouvée sur le chromosome 5 dans le génome humain possède de fortes similitudes avec celle codée par l'*URP1*, et représenterait ainsi un éventuel pseudogène *URP1-like*. En accord avec ces données, d'autres gènes (*PTTG1* et *LMNB1*), localisés au voisinage d'*URP1* chez les téléostéens, se situent aussi au voisinage de cette séquence « *URP1-like* » chez l'Homme (Parmentier *et al.*, 2011). Finalement, alors qu'il était admis que l'URP n'existait que dans la lignée des tétrapodes, son gène a récemment été identifié dans le génome de plusieurs poissons téléostéens (Quan *et al.*, 2012) (Figure 18).

### 1.3. Localisation de l'UII et de l'URP

#### 1.3.1. Localisation périphérique

L'UII et l'URP sont largement distribués au niveau périphérique, mais plus particulièrement au niveau des systèmes cardiovasculaire, rénal et endocrine (Tableau 3). Chez l'Homme, des niveaux élevés d'expression de l'UII sont retrouvés dans le myocarde (Douglas *et al.*, 2002), les oreillettes et les ventricules (Matsushita *et al.*, 2001; Dschietzig *et al.*, 2002; Maguire *et al.*, 2004). L'UII est également détecté dans le cœur de Rat (Ames *et al.*, 1999; Sugo *et al.*, 2003) et de Souris (Elshourbagy *et al.*, 2002; Dubessy *et al.*, 2008). Au niveau vasculaire, les ARNm codant la prépro-UII ont été mis en évidence dans le réseau artériel, principalement dans l'aorte thoracique, les artères pulmonaires et les artérioles. En revanche, ils sont quasiment absents du réseau veineux, à l'exception des veines saphènes et ombilicales (Matsushita *et al.*, 2001; Dschietzig *et al.*, 2002; Maguire *et al.*, 2004).

Des quantités significatives de composés immunologiquement apparentés à l'UII ont été mesurées dans le plasma humain (Dschietzig *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2002; Richards *et al.*, 2002; Totsune *et al.*, 2003). Ce peptide circulant serait le fruit d'une maturation

extracellulaire par une protéase plasmatique, l'*urotensin-II converting enzyme*, d'abord caractérisée à partir de tissu rénal de Porc (Schlüter *et al.*, 2003), puis de cellules endothéliales d'origine humaine (Russell *et al.*, 2004). Cette enzyme présente une activité de type furine (Russell *et al.*, 2004) mais elle n'a pas encore été clairement caractérisée.

Plusieurs travaux tendent à montrer que les reins seraient des sites majeurs de production d'UII circulant chez l'Homme (Matsushita *et al.*, 2001; Totsune *et al.*, 2001, 2003; Sugo *et al.*, 2003). Le peptide est particulièrement abondant au niveau des cellules épithéliales des glomérules, des tubes contournés et des tubes collecteurs (Shenouda *et al.*, 2002; Maguire *et al.*, 2004). Étonnamment, les niveaux d'expression de l'UII dans les reins sont faibles chez le Singe et la Souris (Elshourbagy *et al.*, 2002). L'UII est également exprimé dans des glandes endocrines telles que le pancréas ou les surrénales chez l'Homme et le Rat (Coulouarn *et al.*, 1998; Totsune *et al.*, 2001; Silvestre *et al.*, 2004). Néanmoins, les ARNm codant l'UII sont indétectables dans ces tissus chez le Singe et la Souris (Elshourbagy *et al.*, 2002; Dubessy *et al.*, 2008).

Pourtant identifié il y a 10 ans, les données disponibles sur l'URP sont nettement plus fragmentaires. On peut toutefois mentionner que le préproURP est quant à lui prédominant dans les gonades et le placenta chez l'Homme et dans les testicules chez le Rat (Sugo *et al.*, 2003). L'URP et son ARNm sont également exprimés aux niveaux rénal (Sugo *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2009) et cardiaque, dans les ventricules et le myocarde de Rat (Nakayama *et al.*, 2008; Hirose *et al.*, 2009). L'expression des deux peptides s'étend à la rate, le thymus, le foie, l'estomac, et l'intestin (Coulouarn *et al.*, 1998; Totsune *et al.*, 2001; Elshourbagy *et al.*, 2002; Sugo *et al.*, 2003; Maguire *et al.*, 2004; Dubessy *et al.*, 2008; Kristof *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011a). L'ensemble de ces données indique que l'UII et l'URP sont largement distribués en périphérie, mais que de façon intéressante, leur profil d'expression varie selon les espèces considérées.

Tissus	Homme	Singe	Rat	Souris
<b>Système cardiovasculaire</b>				
Cœur	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Ames <i>et al.</i> , 1999; Totsune <i>et al.</i> , 2001; 2003; Sugo <i>et al.</i> , 2003; Maguire <i>et al.</i> , 2004	Ames <i>et al.</i> , 1999	Ames <i>et al.</i> , 1999; Sugo <i>et al.</i> , 2003	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002; Dubessy <i>et al.</i> , 2008*
Myocarde	Douglas <i>et al.</i> , 2002		Dai <i>et al.</i> , 2008; Nakayama <i>et al.</i> , 2008; Hirose <i>et al.</i> , 2009	
Oreillettes	Matsushita <i>et al.</i> , 2001; Douglas <i>et al.</i> , 2002; Dschietzig <i>et al.</i> , 2002; Maguire <i>et al.</i> , 2004	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Sugo <i>et al.</i> , 2003	
Ventricules	Totsune <i>et al.</i> , 2001; 2003; Douglas <i>et al.</i> , 2002; Dschietzig <i>et al.</i> , 2002; Tzanidis <i>et al.</i> , 2003; Maguire <i>et al.</i> , 2004	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Dai <i>et al.</i> , 2008; Nakayama <i>et al.</i> , 2008; Hirose <i>et al.</i> , 2009	
Aorte thoracique	Matsushita <i>et al.</i> , 2001	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Maguire <i>et al.</i> , 2008	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
Veine saphène	Matsushita <i>et al.</i> , 2001; Dschietzig <i>et al.</i> , 2002; Maguire <i>et al.</i> , 2004			
Plasma	Totsune <i>et al.</i> , 2001; 2003; Dschietzig <i>et al.</i> , 2002; Ng <i>et al.</i> , 2002; Richards <i>et al.</i> , 2002; Russell <i>et al.</i> , 2003; Heringlake <i>et al.</i> , 2004; Lapp <i>et al.</i> , 2004; Joyal <i>et al.</i> , 2006; Ban <i>et al.</i> , 2009		Song <i>et al.</i> , 2006a; Wang <i>et al.</i> , 2011a	
<b>Système endocrinien</b>				
Hypophyse	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Totsune <i>et al.</i> , 2001		Sugo <i>et al.</i> , 2003	Dubessy <i>et al.</i> , 2008
Pancréas	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Totsune <i>et al.</i> , 2001; Sugo <i>et al.</i> , 2003		Sugo <i>et al.</i> , 2003; Silvestre <i>et al.</i> , 2004	
Surrénales	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Totsune <i>et al.</i> , 2001; Maguire <i>et al.</i> , 2004		Sugo <i>et al.</i> , 2003; Albertin <i>et al.</i> , 2006	
Testicules	Sugo <i>et al.</i> , 2003		Sugo <i>et al.</i> , 2003	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002; Dubessy <i>et al.</i> , 2008
Ovaires	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Sugo <i>et al.</i> , 2003		Sugo <i>et al.</i> , 2003	
Placenta	Totsune <i>et al.</i> , 2001; Sugo <i>et al.</i> , 2003; Maguire <i>et al.</i> , 2004			
<b>Systèmes uro-génital et gastro-intestinal</b>				
Reins	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Nothacker <i>et al.</i> , 1999; Matsushita <i>et al.</i> , 2001; Totsune <i>et al.</i> , 2001, 2003; Sugo <i>et al.</i> , 2003; Langham <i>et al.</i> , 2004	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Song <i>et al.</i> , 2006a; Tian <i>et al.</i> , 2008; Mori <i>et al.</i> , 2009*	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
Tube contourné	Shenouda <i>et al.</i> , 2002;		Song <i>et al.</i> , 2006a;	



	Maguire <i>et al.</i> , 2004; Balat <i>et al.</i> , 2007		Tian <i>et al.</i> , 2008
Glomérule	Shenouda <i>et al.</i> , 2002; Maguire <i>et al.</i> , 2004; Balat <i>et al.</i> , 2007		
Tube collecteur	Shenouda <i>et al.</i> , 2002; Maguire <i>et al.</i> , 2004		Song <i>et al.</i> , 2006a
Prostate	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Sugo <i>et al.</i> , 2003		Sugo <i>et al.</i> , 2003
Estomac	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Sugo <i>et al.</i> , 2003*		Sugo <i>et al.</i> , 2003      Dubessy <i>et al.</i> , 2008
Intestin	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Sugo <i>et al.</i> , 2003		Sugo <i>et al.</i> , 2003      Dubessy <i>et al.</i> , 2008*
Foie	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Sugo <i>et al.</i> , 2003		Sugo <i>et al.</i> , 2003*;      Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002 Wang <i>et al.</i> , 2011a
<b>Autres tissus</b>			
Thymus	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Sugo <i>et al.</i> , 2003		Sugo <i>et al.</i> , 2003      Coulouarn <i>et al.</i> , 1999
Rate	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Sugo <i>et al.</i> , 2003	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Sugo <i>et al.</i> , 2003      Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
Poumons	Sugo <i>et al.</i> , 2003; Maguire <i>et al.</i> , 2004		Sugo <i>et al.</i> , 2003*      Qi <i>et al.</i> , 2004
Muscles squelettiques		Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002; Dubessy <i>et al.</i> , 2008; Wang <i>et al.</i> , 2009
Cellules immunitaires	Sugo <i>et al.</i> , 2003; Bousette <i>et al.</i> , 2004; Kristof <i>et al.</i> , 2010		

**Tableau 3. Localisation périphérique de l'UII et de l'URP chez quatre mammifères.** Les références des travaux ayant démontré la présence dans les différents tissus des ARNm de l'UII et de l'URP ou une immunoréactivité *UII-like* apparaissent en noir (UII) et rouge (URP). Une étoile (\*) juxtaposée à la référence indique que les auteurs ont décelé la présence des deux peptides.

### 1.3.2. Localisation centrale

Les premières études réalisées dans les années 1980 ont révélé la présence de l'UII dans le SNC de poissons téléostéens, *i.e.* le Gobie, le Meunier (Yulis and Lederis, 1986), et d'un tétrapode, la Grenouille verte *Rana ridibunda* (Chartrel *et al.*, 1996). Chez cette dernière espèce, l'immunoréactivité est principalement associée aux motoneurons du noyau hypoglosse du tronc cérébral et de la corne ventrale de la moelle épinière. Cette sous-population neuronale exprime également fortement l'UII dans les noyaux des nerfs crâniens abducens, facial, trijumeau et hypoglosse de Rat (Coulouarn *et al.*, 1999; Dun *et al.*, 2001) et ceux de la partie caudale de la moelle épinière de Souris (Coulouarn *et al.*, 1999; Egginger *et al.*, 2006), de Rat (Coulouarn *et al.*, 1999; Dun *et al.*, 2001) et de l'Homme (Coulouarn *et al.*, 1998; Ames *et al.*, 1999) (Tableau 4). De façon inattendue, l'UII est apparemment absente du

tronc cérébral chez le Singe (Ames *et al.*, 1999; Elshourbagy *et al.*, 2002). Enfin, de faibles quantités de ce peptide ont été détectées dans des extraits de liquide céphalo-rachidien (LCR) chez l'Homme (Thompson *et al.*, 2003; Cowley *et al.*, 2005).

Tissus	Homme	Singe	Rat	Souris
Cerveau	Ames <i>et al.</i> , 1999; Totsune <i>et al.</i> , 2001; Sugo <i>et al.</i> , 2003*	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Sugo <i>et al.</i> , 2003	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
Hypothalamus	Totsune <i>et al.</i> , 2001		Egginger <i>et al.</i> , 2011	Dubessy <i>et al.</i> , 2008
Tronc cérébral	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Ames <i>et al.</i> , 1999; Totsune <i>et al.</i> , 2001; Ng <i>et al.</i> , 2002		Coulouarn <i>et al.</i> , 1999; Dun <i>et al.</i> , 2001; Pelletier <i>et al.</i> , 2002	
Moelle épinière	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Ames <i>et al.</i> , 1999; Sugo <i>et al.</i> , 2003	Coulouarn <i>et al.</i> , 2001; Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Coulouarn <i>et al.</i> , 1999; Dun <i>et al.</i> , 2001; Pelletier <i>et al.</i> , 2002; Sugo <i>et al.</i> , 2003	Coulouarn <i>et al.</i> , 1999; Pelletier <i>et al.</i> , 2005; Egginger <i>et al.</i> , 2006; Dubessy <i>et al.</i> , 2008
Cervelet	Sugo <i>et al.</i> , 2003	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Coulouarn <i>et al.</i> , 1999	Coulouarn <i>et al.</i> , 1999; Dubessy <i>et al.</i> , 2008
LCR	Thompson <i>et al.</i> , 2003; Cowley <i>et al.</i> , 2005			

**Tableau 4. Localisation centrale de l'UII et de l'URP chez quatre mammifères.** Les auteurs ayant mis en évidence la présence d'UII et d'URP dans différents tissus apparaissent en noir et rouge, respectivement. Une étoile (\*) juxtaposée à la référence indique que les auteurs ont démontré la co-expression des peptides.

La distribution de l'URP dans le SNC reste encore mal connue. Les données actuellement disponibles indiquent que les ARNm codant le peptide sont localisés dans la moelle épinière chez l'Homme et le Rat, avec des niveaux d'expression largement inférieurs à ceux de l'UII (Sugo *et al.*, 2003). Chez la Souris, ces ARNm sont retrouvés au niveau du tronc cérébral et dans des motoneurons de la corne antérieure de la moelle épinière (Dubessy *et al.*, 2008). Enfin, l'URP serait présent dans les somas neuronaux de l'aire préoptique, au niveau de fibres de l'éminence médiane et de l'organe vasculaire de la lame terminale, impliqué dans les processus de thermorégulation (Egginger and Calas, 2005).

## 2. Le récepteur de l'urotensine II

### 2.1. Découverte et structure

Le récepteur de l'UII a été caractérisé par Tal *et al.* en 1995 à partir d'extraits de tissus sensoriels de rats et fut ainsi dénommé *sensory epithelium neuropeptide-like receptor*

(SENR). Quelques mois plus tard, un autre groupe identifie le même récepteur à partir de banques de données génomiques et attribue à ce récepteur orphelin la nomenclature GPR14 (Marchese *et al.*, 1995). Par stratégie de pharmacologie inverse, consistant à cribler une série de ligands potentiels sur une lignée exprimant le récepteur d'intérêt couplé à un test biologique, plusieurs équipes ont mis en évidence que l'UII est le ligand naturel du GPR14 (Ames *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 1999; Nothacker *et al.*, 1999), rebaptisé depuis par l'Union Internationale de la Pharmacologie de Base et Clinique (IUPHAR), *urotensin II receptor* ou UT (Douglas and Ohlstein, 2000).

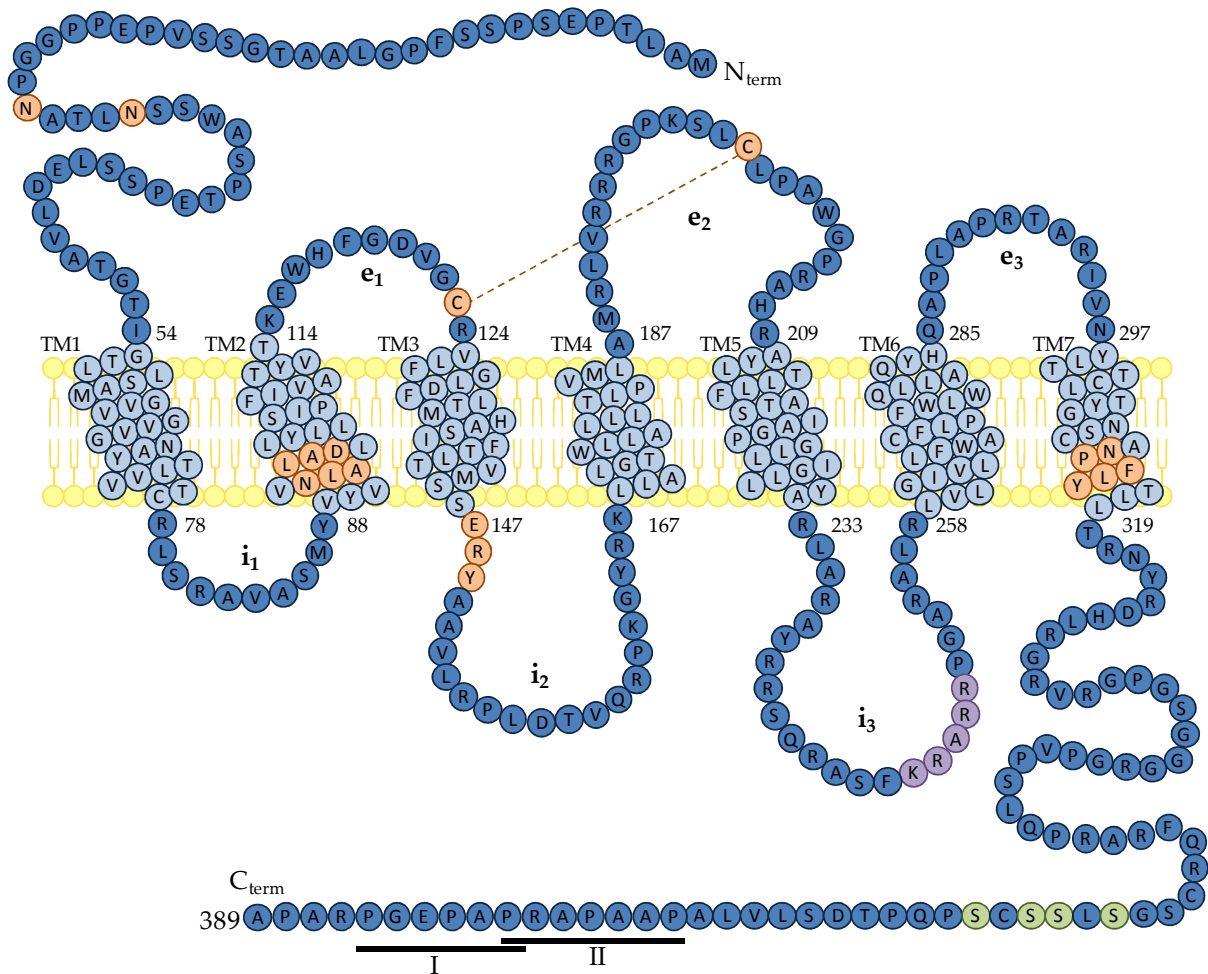
L'UT est retrouvé chez de nombreuses espèces de tétrapodes (Tableau 5). La séquence protéique du récepteur présente un fort pourcentage d'identité entre les primates tandis qu'entre l'Homme et les rongeurs, le pourcentage se limite à 74%.

Bonobo	Homme	Gorille	Gibbon	Babouin	Macaque	Marmouset	Otolemur	Souris	Rat	Vache	Mouton	Chien	Chat	Poulet	
98	98	90	97	95	95	94	77	75	75	72	71	73	75	54	Chimpanzé
	98	86	97	94	94	92	75	71	72	69	60	71	70	54	Bonobo
		89	97	95	95	93	76	74	74	72	70	73	74	54	Homme
			89	88	88	87	75	70	71	70	68	69	71	49	Gorille
				95	95	93	77	75	75	72	70	73	75	54	Gibbon
					98	92	78	74	75	73	71	74	75	54	Babouin
						92	78	74	75	73	71	73	75	54	Macaque
							76	74	74	72	71	72	74	53	Marmouset
								77	77	76	73	79	79	57	Otolemur
									90	75	74	76	77	59	Souris
										76	74	76	77	58	Rat
											93	84	83	56	Bovin
												81	79	55	Mouton
													89	56	Chien
														58	Chat

**Tableau 5. Pourcentages d'identité des séquences protéiques de l'UT entre les différentes espèces de mammifères.** Les valeurs sont calculées à l'aide du logiciel ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>).

Comme tous les RCPGs de classe A à laquelle il appartient (voir Chapitre I, §2.2.1), l'UT possède deux sites de N-glycosylation dans la région N-terminale, un motif NLxxxD (Asn-

Leu-x-x-Asp, où x représente un aa quelconque) dans le TM2, et un pont disulfure entre la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> boucle extracellulaire. Sont également présents un motif E/DRY (Glu/Asp-Arg-Tyr) d'interaction aux protéines G, à la jonction du TM3 et de la 2<sup>ème</sup> boucle intracellulaire, un motif NPxxY (Asn-Pro-x-x-Tyr) dans le TM7, des sites potentiels de phosphorylation par des protéines kinases A et C, la *casein kinase 1* et la *glycogen synthase kinase 3* au niveau des 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> boucles intracellulaires (Marchese *et al.*, 1995; Tal *et al.*, 1995; Proulx *et al.*, 2008a). Plus récemment, une séquence potentielle de localisation nucléaire a été identifiée dans la 3<sup>ème</sup> boucle intracellulaire (Chatenet *et al.*, 2012b) (Figure 19).



**Figure 19. Représentation schématique de la structure de l'UT humain.** Les acides aminés représentés en orange sont des résidus hautement conservés au sein de la classe A des RCPGs: deux sites de N-glycosylation dans la partie N<sub>term</sub>, un motif NLxxxD dans le TM2, un pont disulfure entre la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> boucle extracellulaire (e<sub>1</sub> et e<sub>2</sub>), un motif ERY d'interaction aux protéines G dans la boucle intracellulaire 2 (i<sub>2</sub>) et un motif NPxxY dans le TM7. En plus de ces motifs consensus, l'UT humain possède des sites de phosphorylation (Vert) ainsi que deux motifs polyprolines I et II dans la partie C<sub>term</sub> que nous avons mis en évidence à l'aide du logiciel *Scansite* (<http://scansite3.mit.edu/#home>). Une séquence potentielle de localisation nucléaire (violet) a également été identifiée dans la boucle i<sub>3</sub>.

En comparant les séquences des UT hominoïdes et murins, nous avons mis en évidence d'importantes différences dans l'extrémité C-terminale. Seules les formes hominoïdes du récepteur possèdent deux motifs polyprolines de types I et II permettant l'interaction avec des protéines contenant des domaines de type *src homology 3* (SH3) (Figure 19 et 20). Ces caractéristiques interspèces impliquent que certaines voies de signalisation seraient spécifiquement activées par la liaison des ligands sur les récepteurs de primates ou murins.



**Figure 20. Alignements des séquences correspondant au fragment cytosolique C-terminal de l'UT et identification de motifs protéiques consensus.** Les aa représentés en rouge sont conservés entre les différentes espèces d'hominoïdes ou de murins. **A.** Alignement des extrémités C-terminales des UT d'hominoïdes. Un motif de phosphorylation (Phos) et deux motifs polyprolines (SH3) sont conservés entre ces espèces. **B.** Alignement des extrémités C-terminales d'UT de Souris et de Rat. Seuls deux motifs de phosphorylation sont communs aux deux espèces. Les identifications de motifs consensus ont été réalisées à l'aide du logiciel Scansite 3 (<http://scansite3.mit.edu/#home>).

L'une des premières études d'interaction UII-UT réalisée à l'aide de la technique de marquage par photoaffinité, a montré une implication des résidus Met<sup>184</sup> et/ou Met<sup>185</sup> du TM4 de l'UT de Rat (Boucard *et al.*, 2003). Plus récemment, le même groupe a démontré que des résidus situés dans les TM6 et 7 sont aussi sollicités dans l'interaction ligand/récepteur (Holleran *et al.*, 2009). Concernant l'UT humain, seules les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> boucles extracellulaires adoptent une conformation en hélice  $\alpha$  (Boivin *et al.*, 2006, 2008). En revanche, dépourvue de structure tridimensionnelle particulière, la 1<sup>ère</sup> boucle, n'est pas recrutée dans la liaison avec les peptides (Boivin *et al.*, 2006), indiquant que cette conformation en hélice  $\alpha$  est indispensable. Il a également été proposé que l'Asp<sup>4</sup> de l'UUI humaine se rapproche de la Leu<sup>288</sup> et de l'Ala<sup>289</sup> et que la portion cyclique partage des liaisons hydrophobes avec le TM7 du récepteur (Boivin *et al.*, 2008). Finalement, le développement

d'un modèle tridimensionnel de l'UT humain a confirmé l'implication des boucles extracellulaires 2 et 3 dans l'interaction ligand-récepteur et a démontré que les TM 3, 4, 6 et 7 sont également sollicités dans cette interaction (Lescot *et al.*, 2008).

## **2.2. Localisation de l'UT**

### **2.2.1. Localisation périphérique**

La présence de quantités importantes d'UII dans le système cardiovasculaire, a conduit plusieurs groupes à rechercher l'expression des ARNm de l'UT dans les différents tissus qui le composent. L'UT a été mis en évidence par plusieurs groupes (Tableau 6) chez le Rat (Nothacker *et al.*, 1999; Gartlon *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2004) et la Souris (Liu *et al.*, 1999). Chez l'Homme ou le Singe, des niveaux élevés d'ARNm codant l'UT ont notamment été relevés dans le myocarde (Douglas *et al.*, 2002), les oreillettes (Ames *et al.*, 1999; Matsushita *et al.*, 2001; Totsune *et al.*, 2001; Elshourbagy *et al.*, 2002) et les ventricules (Ames *et al.*, 1999; Maguire *et al.*, 2000; Totsune *et al.*, 2001). Au niveau vasculaire, la présence de l'UT est détectée dans l'aorte thoracique (Ames *et al.*, 1999; Matsushita *et al.*, 2001; Leonard *et al.*, 2009) ainsi que dans les artères pulmonaires et coronaires (Maguire *et al.*, 2000). En revanche, le récepteur est très faiblement exprimé voire absent dans les veines caves (Ames *et al.*, 1999) et saphènes (Matsushita *et al.*, 2001; Maguire *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'UT, comme l'UII, est fortement exprimé au niveau rénal chez le Rat (Gartlon *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2006a; Maguire *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2008; Hirose *et al.*, 2009; Mori *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2012) et l'Homme (Maguire *et al.*, 2000; Matsushita *et al.*, 2001; Totsune *et al.*, 2001, 2003; Langham *et al.*, 2004) avec toutefois des niveaux d'expression modérés chez le Singe (Nguyen *et al.*, 2012).

Tissus	Homme	Singe	Rat	Souris
<b>Système cardiovasculaire</b>				
Cœur	Ames <i>et al.</i> , 1999; Totsune <i>et al.</i> , 2003; Douglas <i>et al.</i> , 2004a		Nothacker <i>et al.</i> , 1999; Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Tzanidis <i>et al.</i> , 2003; Gong <i>et al.</i> , 2004; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Doan <i>et al.</i> , 2012	Liu <i>et al.</i> , 1999; Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
Myocarde	Douglas <i>et al.</i> , 2002		Dai <i>et al.</i> , 2008	
Oreillettes	Ames <i>et al.</i> , 1999; Matsushita <i>et al.</i> , 2001; Totsune <i>et al.</i> , 2001; Leonard <i>et al.</i> , 2009	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Zhang <i>et al.</i> , 2007; Hirose <i>et al.</i> , 2009	
Ventricules	Ames <i>et al.</i> , 1999; Maguire <i>et al.</i> , 2000; Totsune <i>et al.</i> , 2001	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Johns <i>et al.</i> , 2004; Zhang <i>et al.</i> , 2007; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Hirose <i>et al.</i> , 2009	
Aorte thoracique	Ames <i>et al.</i> , 1999; Matsushita <i>et al.</i> , 2001; Leonard <i>et al.</i> , 2009	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Maguire <i>et al.</i> , 2008; Hirose <i>et al.</i> , 2009	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
<b>Système endocrinien</b>				
Hypophyse	Totsune <i>et al.</i> , 2001		Jégou <i>et al.</i> , 2006	
Pancréas	Ames <i>et al.</i> , 1999; Douglas <i>et al.</i> , 2004a	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
Surrénales	Totsune <i>et al.</i> , 2001; Takahashi <i>et al.</i> , 2003; Zeng <i>et al.</i> , 2006; Morimoto <i>et al.</i> , 2008; Giuliani <i>et al.</i> , 2009	Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Albertin <i>et al.</i> , 2006; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
Testicules	Douglas <i>et al.</i> , 2004a		Gartlon <i>et al.</i> , 2001	
Placenta	Totsune <i>et al.</i> , 2001			
<b>Systèmes uro-génital et gastro-intestinal</b>				
Reins	Maguire <i>et al.</i> , 2000; Matsushita <i>et al.</i> , 2001; Totsune <i>et al.</i> , 2001, 2003; Langham <i>et al.</i> , 2004	Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Song <i>et al.</i> , 2006a; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Tian <i>et al.</i> , 2008; Hirose <i>et al.</i> , 2009; Mori <i>et al.</i> , 2009; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
Vessie				Liu <i>et al.</i> , 1999; Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
Estomac		Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002		
Foie			Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
<b>Autres tissus</b>				
Rate			Gartlon <i>et al.</i> , 2001	
Poumons		Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
Muscles squelettiques	Douglas <i>et al.</i> , 2004a; Maguire <i>et al.</i> , 2000; Qi <i>et al.</i> , 2005	Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Maguire <i>et al.</i> , 2008; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002; Wang <i>et al.</i> , 2009
Cellules immunitaires	Bousette <i>et al.</i> , 2004; Segain <i>et al.</i> , 2007		Segain <i>et al.</i> , 2007	

Tableau 6. Localisation périphérique de l'UT chez quatre espèces de mammifères.

L'UT est aussi présent dans le système endocrinien, notamment dans l'hypophyse, le pancréas ou la glande surrénale chez l'Homme (Ames *et al.*, 1999; Totsune *et al.*, 2001), le Singe et la Souris (Elshourbagy *et al.*, 2002). Dans une moindre mesure, des niveaux d'ARNm ont été détectés dans les testicules (Gartlon *et al.*, 2001) et l'hypophyse de Rat (Jégou *et al.*, 2006). Enfin, d'autres tissus périphériques présentent des niveaux d'expression significatifs d'UT, variant selon les espèces (Tableau 6).

### 2.2.2. Localisation centrale

Les ARNm codant l'UT sont très largement exprimés dans le SNC (Tableau 7) et sont particulièrement abondants au niveau du tronc cérébral et de la moelle épinière (Liu *et al.*, 1999; Gartlon *et al.*, 2001; Totsune *et al.*, 2001, 2003; Jégou *et al.*, 2006). Les autres régions du SNC, *e.g.* le cortex, l'hypothalamus ou le thalamus présentent des niveaux d'expression relativement faibles avec une variabilité inter-espèces. L'UT est aussi associé aux vaisseaux sanguins cérébraux, principalement dans les cellules endothéliales des microvaisseaux (Spinazzi *et al.*, 2006). Enfin, l'expression du récepteur a été relevée à la fois dans les neurones (Jégou *et al.*, 2006) et dans une sous-population d'astrocytes du tronc cérébral et de l'hypothalamus (Lin *et al.*, 2003b).

### 2.3. Pharmacologie

Observées dans de nombreux modèles, les puissantes propriétés vasoactives de l'UII ont rapidement conduit au développement d'analogues urotensinergiques, susceptibles d'être utilisés dans le traitement de pathologies du système cardiovasculaire. Les premiers travaux menés dans cette perspective ont consisté à étudier les relations structure/activité de l'UII humaine (hUII) et de l'URP.



Tissus	Homme	Singe	Rat	Souris
Cerveau		Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Clark <i>et al.</i> , 2001; Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
Amygdale			Jégou <i>et al.</i> , 2006	
Bulbe olfactif			Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006	
Cortex	Maguire <i>et al.</i> , 2000; Totsune <i>et al.</i> , 2001		Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Maguire <i>et al.</i> , 2008 Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
Hippocampe			Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
Hypothalamus	Totsune <i>et al.</i> , 2001		Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Nguyen <i>et al.</i> , 2012; Lin <i>et al.</i> , 2003b	
Thalamus			Jégou <i>et al.</i> , 2006	
Tronc cérébral	Totsune <i>et al.</i> , 2001		Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Lin <i>et al.</i> , 2003b; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Zhang <i>et al.</i> , 2007; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
Moelle épinière	Totsune <i>et al.</i> , 2003	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Liu <i>et al.</i> , 1999
Cervelet			Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	

**Tableau 7. Localisation centrale de l'UT chez quatre espèces de mammifères.**

La délétion des résidus N-terminaux de l'UII humaine a révélé que l'hUII<sub>4-11</sub> correspond à la séquence minimale nécessaire à la pleine activité biologique du peptide. L'hUII<sub>5-11</sub> est quant à lui 200 à 1000 fois moins puissant que le peptide natif (Perkins *et al.*, 1990; Flohr *et al.*, 2002; Labarrère *et al.*, 2003). Le remplacement de chacun des trois résidus N-terminaux par une alanine ou par son énantiomère dextrogyre est sans conséquence sur l'activité biologique de l'UII (Flohr *et al.*, 2002; Kinney *et al.*, 2002; Brkovic *et al.*, 2003; Labarrère *et al.*, 2003). Bien que l'[Ala<sup>11</sup>]UII-NH<sub>2</sub> et la [D-Val<sup>11</sup>]UII-NH<sub>2</sub> conservent tous deux des propriétés contractiles modérées, le second analogue est deux fois moins puissant que le premier, indiquant que l'orientation de la chaîne C-terminale serait essentielle (Labarrère *et al.*, 2003). Concernant la partie cyclique des peptides, toute modification de séquence se traduit par un changement drastique de leur efficacité. En effet, la substitution par une alanine

ou leur énantiomère dextrogyre des résidus Phe<sup>6</sup>, Trp<sup>7</sup>, Lys<sup>8</sup> ou Tyr<sup>9</sup> pour l'UII, et Phe<sup>3</sup>, Lys<sup>5</sup> et Tyr<sup>6</sup> pour l'URP, conduit systématiquement à des analogues inactifs (Brkovic *et al.*, 2003; Labarrère *et al.*, 2003; Chatenet *et al.*, 2004). Le remplacement des résidus cystéine responsables de la formation du pont disulfure supprime également toute activité (Labarrère *et al.*, 2003; Chatenet *et al.*, 2004; Guerrini *et al.*, 2005), montrant ainsi clairement que le cycle et les aa qui le composent sont essentiels pour asseoir une interaction UII/URP-UT fonctionnelle. Toutefois, l'incorporation d'une unité alanyl-alanyl, qui assure le maintien de la structure cyclique malgré l'absence de cystéine, aboutit à des analogues qui se comportent comme des agonistes (Foister *et al.*, 2006). De façon intéressante, le remplacement de la Cys<sup>5</sup> par une pénicillamine (Pen<sup>5</sup>) permet d'obtenir un « super agoniste », [Pen<sup>5</sup>]UII<sub>4-11</sub> ou P5U, plus puissant et plus efficace que le peptide natif (Grieco *et al.*, 2002) (Tableau 8).

Sur la base de ces premières informations, des modifications du domaine cyclique de l'UII et de l'URP ont été réalisées pour chercher à générer des antagonistes (Tableau 8). Les premiers antagonistes peptidiques de l'UT ont été obtenus par substitution de la Lys<sup>8</sup> de l'hUII ou de la Lys<sup>5</sup> de l'URP par une ornithine (Camarda *et al.*, 2002; Vergura *et al.*, 2004; Guerrini *et al.*, 2005). Testée sur la contraction d'anneaux d'aorte de rats induite par l'UII humaine, l'[Orn<sup>8</sup>]hUII se comporte comme un antagoniste compétitif mais conserve paradoxalement une activité agoniste sur la mobilisation calcique de cellules exprimant l'UT de Rat ou d'Homme (Camarda *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'[Orn<sup>5</sup>]URP qui agit comme un antagoniste sur l'UT de Rat (Diallo *et al.*, 2008), conserve une activité agoniste résiduelle sur l'UT humain (Chatenet *et al.*, 2004; Desrues *et al.*, 2012). Ces différentes observations ont été mises à profit pour élaborer l'analogue [Pen<sup>5</sup>, D-Trp<sup>7</sup>, Orn<sup>8</sup>]hUII<sub>4-11</sub> ou urantide, un puissant antagoniste dépourvu d'activité intrinsèque sur des modèles d'aorte de rats (Patacchini *et al.*, 2003; Camarda *et al.*, 2004). Toutefois, testé *in vitro* sur des cellules *chinese hamster ovary* (CHO) exprimant l'UT humain recombinant, ce candidat potentiellement intéressant possède lui aussi une activité agoniste résiduelle (Camarda *et al.*, 2004).

Grâce aux données fournies par les études de relations structure/activité, la modélisation tridimensionnelle de la liaison UII/UT et le criblage à haut débit, plusieurs groupes ont synthétisé et testé différentes séries d'agonistes et d'antagonistes non-peptidiques (Tableau 8). Ainsi, le criblage d'une librairie de plus de 180 000 composés organiques a permis d'identifier le premier agoniste non peptidique de l'UT, nommé isochromanone ou AC-7954 (Croston *et al.*, 2002). En optimisant les propriétés hydrophobes du ligand parent, une équipe suédoise a réussi à développer plusieurs composés, comme le FL68 et le FL104, qui comptent parmi les plus puissants agonistes urotensinergiques non peptidiques (Lehmann *et al.*, 2005, 2006, 2007, 2009, 2010).

En 2004, la société Actelion a développé l'ACT-058362 ou palosuran, un dérivé de l'urée qui se comporte *in vitro* (test de mobilisation de  $Ca^{2+}$  dans des cellules exprimant l'UT humain recombinant) comme un puissant antagoniste de l'UT humain (Clozel *et al.*, 2004). Testé chez des rats atteints d'une insuffisance rénale aiguë ischémique (voir rôle de l'UII dans cette pathologie, cf. §4.2), le palosuran augmente significativement la fonction rénale et diminue les lésions associées à la maladie (Clozel *et al.*, 2004, 2006). Il est important de noter que le palosuran, qui possède une affinité modérée pour l'UT de Rat (Clozel *et al.*, 2004), ne peut efficacement être utilisé comme un antagoniste universel.

Au regard de ses effets prometteurs chez l'Homme, le palosuran fut le premier antagoniste urotensinergique testé sur l'une des pathologies associées au dysfonctionnement du système urotensinergique, le diabète (voir rôle de l'UII dans cette maladie, cf. §4.3.). Les premiers résultats obtenus chez des patients diabétiques présentant une macroalbuminurie, montrant une réduction sensible des troubles rénaux (Sidharta *et al.*, 2006), n'ont malheureusement pas été confirmés sur d'autres cohortes (<http://www.actelion.com/en/our-company/news-and-events/index.page?newsId=1209557>). Le palosuran s'est en outre avéré inefficace sur la synthèse d'insuline et la glycémie de patients souffrant de diabète de type 2 (Sidharta *et al.*, 2009). Chez des sujets hypertendus atteints d'une néphropathie diabétique de type 2, il est

sans effet notable sur l'albuminurie, la pression sanguine ou encore le taux de filtration glomérulaire (Vogt *et al.*, 2010). Ces résultats décevants pourraient s'expliquer par une affinité faible des récepteurs pour le palosuran, lorsqu'ils sont exprimés par des cellules ou des tissus intacts, les études de pharmacologie ayant été réalisées sur des extraits membranaires (Behm *et al.*, 2008).

Nom du composé	Activité du composé	Espèce de l'UT	Modèle biologique	Références
<b>[Pen<sup>5</sup>]UII<sub>4-11</sub> ou P5U</b>	Agoniste peptidique	Rat	Contraction d'aorte	Grieco <i>et al.</i> , 2002
<b>[Orn<sup>8</sup>]hUII</b>	Agoniste peptidique	Homme	Mobilisation calcique	Camarda <i>et al.</i> , 2002
		Rat	Mobilisation calcique Contraction d'aorte	Camarda <i>et al.</i> , 2002
	Antagoniste peptidique	Rat	Contraction d'aorte	Camarda <i>et al.</i> , 2002
<b>[Orn<sup>5</sup>]URP</b>	Antagoniste peptidique	Rat	Contraction d'aorte	Diallo <i>et al.</i> , 2008 Chatenet <i>et al.</i> , 2004
	Agoniste peptidique	Rat	Mobilisation calcique Contraction d'aorte	Diallo <i>et al.</i> , 2008 Chatenet <i>et al.</i> , 2004
<b>[D-Trp<sup>4</sup>]URP</b>	Antagoniste peptidique	Rat	Contraction d'aorte	Diallo <i>et al.</i> , 2008 Chatenet <i>et al.</i> , 2004
	Agoniste peptidique	Rat	Mobilisation calcique	Diallo <i>et al.</i> , 2008
<b>[D-Tyr<sup>6</sup>]URP</b>	Antagoniste peptidique	Rat	Contraction d'aorte	Diallo <i>et al.</i> , 2008 Chatenet <i>et al.</i> , 2004
	Agoniste peptidique	Rat	Mobilisation calcique	Diallo <i>et al.</i> , 2008
<b>[Pen<sup>5</sup>, D-Trp<sup>7</sup>, Orn<sup>8</sup>]hUII<sub>4-11</sub> ou Urantide</b>	Antagoniste peptidique	Rat	Contraction d'aorte	Patacchini <i>et al.</i> , 2003 Camarda <i>et al.</i> , 2004 Behm <i>et al.</i> , 2006
		Rat/Homme	Mobilisation calcique	Camarda <i>et al.</i> , 2006
		Rat	Sécrétion de TGFβ et synthèse de collagène	Dai <i>et al.</i> , 2007
		Rat	Rougisement de l'oreille	Qi <i>et al.</i> , 2007
		Lapin	Rigidité des muscles papillaires de myocarde	Fontes-Sousa <i>et al.</i> , 2007
		Rat	Sécrétion d'insuline	Marco <i>et al.</i> , 2008
		Rat	Synthèse et sécrétion de collagène	Zhang <i>et al.</i> , 2008b
		Rat	Hypertrophie de cardiomyocytes	Gruson <i>et al.</i> , 2010 Gao <i>et al.</i> , 2010 Esposito <i>et al.</i> , 2011
		Homme	Motilité et invasion des cellules LNCaP	Grieco <i>et al.</i> , 2011
		Rat	Phosphorylation d'Akt et ERK	Chen <i>et al.</i> , 2012b
	Rat	Cardio-protection	Gao <i>et al.</i> , 2012	
	Agoniste peptidique	Homme	Mobilisation calcique	Camarda <i>et al.</i> , 2004 Camarda <i>et al.</i> , 2006
Chat		Contraction d'aorte et d'artères	Behm <i>et al.</i> , 2006	
Singe		Contraction d'artères	Behm <i>et al.</i> , 2006	
<b>[Pen<sup>5</sup>, D-Trp<sup>7</sup>, Dab<sup>8</sup>]hUII<sub>4-11</sub> ou UFP-803</b>	Antagoniste peptidique	Rat	Contraction d'aorte Mobilisation calcique	Camarda <i>et al.</i> , 2006
		Homme	Mobilisation calcique	
		Souris	Extravasation de plasma	

		Rat	Mobilisation calcique Sécrétion de neurotransmetteurs	Ono <i>et al.</i> , 2008
	Agoniste peptidique	Homme	Mobilisation calcique	Camarda <i>et al.</i> , 2006
<b>SB710411</b>	Antagoniste peptidique	Rat	Contraction d'aorte	Behm <i>et al.</i> , 2002 Behm <i>et al.</i> , 2004b Behm <i>et al.</i> , 2006
			Formation d'IP	Behm <i>et al.</i> , 2004b
		Chat	Contraction d'artères	Behm <i>et al.</i> , 2006
	Rat	Prolifération de cellules hépatiques, fibrose hépatique, sécrétion de TGF $\beta$	Wang <i>et al.</i> , 2009	
	Agoniste peptidique	Singe	Contraction d'artère	Behm <i>et al.</i> , 2004b Behm <i>et al.</i> , 2006
			Formation d'IP	Behm <i>et al.</i> , 2004b
<b>GSK248451</b>	Antagoniste peptidique	Rat	Contraction d'aorte	Behm <i>et al.</i> , 2006
		Homme		
		Chat	Contraction d'aorte et d'artères	Behm <i>et al.</i> , 2006
		Singe	Contraction d'artères	Behm <i>et al.</i> , 2006
<b>Urocontrin</b>	Antagoniste peptidique	Rat	Contraction d'aorte	Chatenet <i>et al.</i> , 2012a
<b>AC7954 ou Isochromanone</b>	Agoniste non peptidique	Rat/Homme	R-SAT	Croston <i>et al.</i> , 2002
<b>FL68</b>	Agoniste non peptidique	Homme	R-SAT	Lehmann <i>et al.</i> , 2005
<b>FL104</b>	Agoniste non peptidique	Homme	R-SAT	Lehmann <i>et al.</i> , 2007
<b>Palosuran ou ACT-058362</b>	Antagoniste non peptidique	Homme	Mobilisation calcique	Clozel <i>et al.</i> , 2004
			Phosphorylation des MAPKs	
		Rat	Contraction d'aorte	
		Rat	Flux sanguin rénal	Clozel <i>et al.</i> , 2006
		Homme	Excrétion urinaire d'albumine	Sidharta <i>et al.</i> , 2006
		Homme	Angiogenèse	Spinazzi <i>et al.</i> , 2006 Albertin <i>et al.</i> , 2009
		Rat	Flux sanguin rénal et excrétion de sodium	Trebicka <i>et al.</i> , 2008
		Rat	Fibrose pulmonaire	Onat <i>et al.</i> , 2012b
Rat	Hypertension artérielle pulmonaire	Onat <i>et al.</i> , 2012a		
<b>SB-706375</b>	Antagoniste non peptidique	Rat/Homme/Singe/Souris	Mobilisation calcique	Douglas <i>et al.</i> , 2005
		Rat	Contraction d'aorte	
<b>SB-611812</b>	Antagoniste non peptidique	Rat	Resténose après angioplastie	Rakowski <i>et al.</i> , 2005
			Pressions diastoliques et systoliques, œdème pulmonaire, hypertrophie des cardiomyocytes, dilatation ventriculaire	Bousette <i>et al.</i> , 2006a
			Prolifération des fibroblastes cardiaques, fibrose myocardique et expression de collagène	Bousette <i>et al.</i> , 2006b
<b>GSK-1562590</b>	Antagoniste non peptidique	Rat/Homme/Chat/Singe	Contraction d'artères	Behm <i>et al.</i> , 2010

**Tableau 8. Principaux composés agonistes (Bleu) et antagonistes (Rouge) du récepteur UT.** ERK: *extracellular signal-regulated kinase*; IP: inositol phosphate; MAPKs: *mitogen-activated protein kinases*; R-SAT: *receptor selection and amplification technology*; TGF $\beta$ : *transforming growth factor* $\beta$ .

Un autre antagoniste urotensinergique a récemment été développé par Behm et coll. en vue d'augmenter le temps d'occupation du composé sur son récepteur. Il s'agit du GSK1562590 qui se comporterait comme un antagoniste insurmontable de l'UT de Rat, de Chat ou humain et comme un antagoniste compétitif sur le récepteur de Singe (Behm *et al.*, 2010). Le GSK1562590 serait donc le premier antagoniste de l'UT à action réversible lente, améliorant ainsi son efficacité potentielle *in vivo* (Behm *et al.*, 2010).

#### 2.4. Désensibilisation de l'UT

Les données actuellement disponibles sur la désensibilisation de l'UT sont fragmentaires et partiellement contradictoires. L'application répétée d'UUI sur des anneaux d'aorte thoracique de rats (Camarda *et al.*, 2002) ou sur des cellules endothéliales aortiques humaines (Brailoiu *et al.*, 2008) se traduit par une diminution de 50% de l'activité. Au niveau cellulaire, l'internalisation de l'UT de Rat après 30 min de traitement s'élève à environ 70% et 15% dans les cellules de la lignée *human embryonic kidney 293* (HEK293) (Giebing *et al.*, 2005) et les COS-7 (Proulx *et al.*, 2005), respectivement. Selon les travaux menés parallèlement par ces deux mêmes équipes, la perte d'efficacité du neuropeptide implique l'intervention (Proulx *et al.*, 2005) ou non (Giebing *et al.*, 2005) des  $\beta$ -arrestines 1 et 2. La genèse de différents mutants de l'UT a permis de souligner l'importance des résidus sérine situés dans l'extrémité C-terminale de l'UT dans ce phénomène de désensibilisation (Proulx *et al.*, 2005). La mutation du motif ERY de l'UT de Rat inhibe son internalisation et sa co-localisation avec la  $\beta$ -arrestine 2 (Proulx *et al.*, 2008a). Selon les auteurs, la mutation du motif ERY serait responsable d'un changement conformationnel de la boucle i2 dont les dix premiers résidus participerait à la liaison des  $\beta$ -arrestines chez les RCPGs de classe A (Marion *et al.*, 2006).

### 3. Activités cellulaires du système urotensinergique

#### 3.1. Effets vasoactifs

La distribution de l'UT et de ses ligands endogènes a logiquement amené plusieurs groupes à s'intéresser aux effets de l'UII sur le système cardiovasculaire. Appliqué sur des anneaux désendothélialisés d'aorte de rats (Ames *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Labarrère *et al.*, 2003; Chatenet *et al.*, 2004), de Lapin (Opgaard *et al.*, 2000), de Macaque (Ames *et al.*, 1999) ou d'Homme (MacLean *et al.*, 2000; Maguire *et al.*, 2000, 2004, 2008; Russell *et al.*, 2001; Camarda *et al.*, 2002), l'UII provoque une vasoconstriction dose-dépendante. Cet effet est observé à de très faibles doses, à tel point que ce neuropeptide est à ce jour considéré comme le composé vasoactif naturel le plus puissant (Ames *et al.*, 1999; Maguire *et al.*, 2004). A titre d'exemple, sur le modèle murin, l'UII est 660 et 16 fois plus puissant que la sérotonine et l'endothéline, respectivement (Ames *et al.*, 1999). Cette activité vasoconstrictrice serait principalement relayée par une mobilisation de calcium cytosolique (Tableau 9, Figure 21A) (Ames *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999). L'utilisation d'un inhibiteur de PLC et la mesure de l'incorporation d'IP sur des aortes thoraciques de Lapin ont permis à Saetrum Opgaard et coll. (2000) de confirmer l'implication de la voie  $G_q/PLC/IP_3/Ca^{2+}$ . Le  $Ca^{2+}$  recruté par l'UT provient pour une part d'un pool intracellulaire *via* l'activation des récepteurs-canaux sensibles à l' $IP_3$  et pour une autre part du milieu extracellulaire *via* les canaux calciques de type L (Gibson, 1987, 1988; Itoh *et al.*, 1987; Rossowski *et al.*, 2002). Le  $Ca^{2+}$  active la calmoduline dont le blocage inhibe les effets de l'UII de Gobie sur la contraction des anneaux d'aortes de Rat (Gibson, 1987). Enfin, la calmoduline active à son tour la MLCK responsable de la phosphorylation de la MLC-2 et de la contraction d'actomyosine (Russell and Molenaar, 2004; Tasaki *et al.*, 2004). En marge de cette voie principale de signalisation intracellulaire, d'autres voies impliquées dans les activités contractiles de l'UII ont aussi été identifiées comme les voies PKC/ERK ou RhoA/ROCK (Sauzeau *et al.*, 2001; Rossowski *et al.*, 2002; Russell and Molenaar, 2004; Tasaki *et al.*,

2004). Enfin, et bien avant la caractérisation de l'UT, certains travaux avaient aussi établi un lien entre la vasoconstriction induite par l'UII et la production d'acide arachidonique par une phospholipase A<sub>2</sub> (Gibson, 1987), en particulier sur des muscles lisses de Grenouille (Yano *et al.*, 1995). Cette production d'acide arachidonique a ensuite été confirmée dans différentes lignées cellulaires exprimant la forme recombinante humaine de l'UT (Mori *et al.*, 1999; Lehner *et al.*, 2007).

Activité mesurée	Modèle	Voie(s) de transduction	Référence
Contraction	Anneaux d'aorte de Rat	PLA <sub>2</sub> , acide arachidonique, Ca <sup>2+</sup> (canaux calciques extracellulaires), calmoduline	Gibson, 1987
	Muscle lisse de Grenouille	Acide arachidonique, COX, prostaglandine	Yano <i>et al.</i> , 1995
	Aorte thoracique de Rat	PDE, AMPc, NO, Ca <sup>2+</sup> ,	Itoh <i>et al.</i> , 1987
	Aorte de Rat	Ca <sup>2+</sup> (pool extracellulaire puis intracellulaire)	Gibson <i>et al.</i> , 1988
	Aorte thoracique de Lapin	Gq, PLC, IP	Opgaard <i>et al.</i> , 2000
	Aorte thoracique de Rat	RhoA, ROCK	Sauzeau <i>et al.</i> , 2001
	Aorte de Rat	Ca <sup>2+</sup> (canaux de type L), PLC, PKC, tyrosine kinase, ROCK	Rossowski <i>et al.</i> , 2002
	Cœur humain	MLC-2, PKC, RhoA	Russell and Molenaar, 2004
	Aorte de Rat	Ca <sup>2+</sup> /calmoduline/MLCK, PKC, P38MAPK, ERK	Tasaki <i>et al.</i> , 2004
Relaxation	Endothélium humain	NO, prostaglandine	Chen <i>et al.</i> , 2010
	Tissu de corps caverneux humain	eNOS, HSP90, NO	Bianca <i>et al.</i> , 2012
	Aorte de Rat	NO	Bottrill <i>et al.</i> , 2000
	Artère pulmonaire humaine	NO	MacLean <i>et al.</i> , 2000
	Coronaire de Rat	NO	Katano <i>et al.</i> , 2000
	Cœur de Rat	NO	Prosser <i>et al.</i> , 2006
	Artère piale de Porc	NO	Lacza and Busija, 2006
	Cœur de Rat	NO, COX, prostaglandine	Ishihata <i>et al.</i> , 2005
Sécrétion d'acide arachidonique	CHO-rUT		Mori <i>et al.</i> , 1999
	HEK293-hUT CHO-hUT	Ca <sup>2+</sup> , PKC, PLA <sub>2</sub>	Lehner <i>et al.</i> , 2007
	Elasticité cardiaque	Muscle papillaire de Lapin	NO, COX, prostaglandine

**Tableau 9. Voies de transduction associées au récepteur UT impliquées dans les effets vasoactifs de l'UII.** AMPc: 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate; COX: cyclooxygénase; eNOS: endothelial nitric oxide synthase; ERK: extracellular signal-regulated kinase; IP: inositol phosphate; HSP90: heat shock protein 90; MLC2: myosin light-chain 2; NO: nitric oxide; P38MAPK: p38 mitogen-activated protein kinase; PDE: phosphodiesterase; PKC: protéine kinase C; PLA<sub>2</sub>: phospholipase A<sub>2</sub>; PLC: phospholipase C; ROCK: rho-associated protein kinase.

Sur des vaisseaux intacts, *e.g.* artères coronaires et mésentériques murines (Ames *et al.*, 1999; Bottrill *et al.*, 2000) ou félines (Behm *et al.*, 2004a) ou artères pulmonaires humaines



(MacLean *et al.*, 2000; Stirrat *et al.*, 2001), l'UII provoque une vasodilatation relayée par la libération de NO (Bottrill *et al.*, 2000; Katano *et al.*, 2000; MacLean *et al.*, 2000; Prosser *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2010; Bianca *et al.*, 2012). Chez le Rat, la vasodilatation coronaire met également en jeu la production de prostaglandines (Ishihata *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2010). Les études réalisées sur le réseau veineux montrent que le peptide exerce une activité vasoconstrictrice sur les veines saphènes et ombilicales humaines (Maguire *et al.*, 2000) ou sur la veine jugulaire de Lapin (Camarda *et al.*, 2002). Globalement, l'effet vasoactif de l'UII varie selon la nature des vaisseaux et des espèces considérées (Douglas *et al.*, 2000a; Douglas *et al.*, 2000b; Ross *et al.*, 2010).

### 3.2. Effets sur la prolifération, la survie et l'hypertrophie

Le système urotensinergique exerce des effets promitogènes sur de nombreux types cellulaires natifs ou recombinants, et hypertrophique uniquement sur des cardiomyocytes (Tableau 10). L'activation de ERK est un élément central dans ces effets, que ce soit sur les lignées transfectées avec l'UT humain (Ziltener *et al.*, 2002) ou les cellules natives exprimant le récepteur, *i.e.* cellules épithéliales rénales de Porc (Matsushita *et al.*, 2003) ou cellules musculaires lisses de Rat (Zhang *et al.*, 2012) (Figure 21B). Plusieurs voies de signalisation menant à l'activation de ERK et entraînant la prolifération, la survie ou encore l'hypertrophie cellulaire ont été décrites dans la littérature. L'une d'entre elles fait intervenir la transactivation de l'EGFR (Chen *et al.*, 2008; Sue *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2009). Celle-ci est souvent dépendante de la production des *reactive oxygen species* (ROS) par une NADP oxydase (NOX) qui peut être activée par l'UT (Djordjevic *et al.*, 2005). Les ROS vont lever l'inhibition exercée par la protéine *src homology 2 containing tyrosine phosphatase* (SHP-2) sur l'EGFR, permettant la transduction du signal mitogène (Liu *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2009).

Effets	Type cellulaire	Voie(s) de transduction	Références
<b>Prolifération</b>	Cellules de muscles lisses vasculaires de Lapin	Protéine G, PKC, src, MAPK	Watanabe <i>et al.</i> , 2001
	Cellules de muscles lisses vasculaires de Rat	RhoA, ROCK	Sauzeau <i>et al.</i> , 2001
	CHO-UT	G <sub>i/o</sub> , PI3K, PLC, calmoduline, MEK, Ca <sup>2+</sup> extracellulaire	Ziltener <i>et al.</i> , 2002
	Cellules épithéliales rénales de Porc	Ca <sup>2+</sup> (canaux voltage dépendant), PKC, MAPK, ERK, c-myc	Matsushita <i>et al.</i> , 2003
	Cellules musculaires lisses des voies aériennes de Rat	PKC, MAPK, Ca <sup>2+</sup> , calcineurine	Chen <i>et al.</i> , 2001
	Fibroblastes cardiaques de Rat	Transactivation de l'EGFR, ERK, ROS	Chen <i>et al.</i> , 2008
	Cellules tubulaires de Rat	ROS, inhibition de SHP-2, transactivation de l'EGFR <i>via</i> HB-EGF	Sue <i>et al.</i> , 2009
	Cellules de muscles lisses de Rat	Ca <sup>2+</sup> , CamK, ERK, PKD	Iglewski and Grant, 2010
	Cellules progénitrices endothéliales de Rat	ERK, p38MAPK	Xu <i>et al.</i> , 2012
	Cellules de muscles lisses pulmonaires de Rat	ERK, TGFβ	Zhang <i>et al.</i> , 2012
	Cellules de muscles lisses pulmonaires humaines	NOX-4, ROS, FoxO3, pJNK, MMP-2	Diebold <i>et al.</i> , 2011
	Cellules de muscles lisses pulmonaires humaines	NOX, ROS, ERK, p38MAPK, c-Jun, Akt, expression de PAI-1	Djordjevic <i>et al.</i> , 2005
	Astrocytes de Rat	PLC, Ca <sup>2+</sup> (canaux IP <sub>3</sub> dépendants, et type T extracellulaires), IP <sub>3</sub> , G <sub>i/o</sub>	Jarry <i>et al.</i> , 2010
	Fibroblastes de Rat	MAPKs, expression de VEGF, production de collagène	Song <i>et al.</i> , 2012
Cellules de muscles lisses aortiques de Rat	ROS, inhibition de SHP-2, transactivation de l'EGFR, expression d'endothéline-1	Tsai <i>et al.</i> , 2009	
<b>Survie</b>	Cellules de muscles lisses vasculaires de Rat	N.D.	Esposito <i>et al.</i> , 2011
	Cardiomyocytes de Rat	PI3K, ERK	Chen <i>et al.</i> , 2012b
<b>Hypertrophie</b>	Cardiomyocytes de Rat surexprimant l'UT	G <sub>q</sub> , Ras	Tzanidis <i>et al.</i> , 2003
	Cardiomyocytes de Rat surexprimant l'UT	Transactivation de l'EGFR <i>via</i> HB-EGF, ERK, p38MAPK	Onan <i>et al.</i> , 2004
	Cardiomyocytes de Rat	ROS, inhibition de SHP-2, transactivation de l'EGFR	Liu <i>et al.</i> , 2009
	Cardiomyocytes de Rat	PI3K, Akt, GSK-3β	Gruson <i>et al.</i> , 2010

**Tableau 10. Voies de transduction associées au récepteur UT impliquées dans les effets pro-mitogènes de l'UII.** CamK: calmoduline kinase; EGFR: *epidermal growth factor receptor*; ERK: *extracellular signal-regulated kinase*; GSK3β: *glycogen synthase kinase 3β*; HB-EGF: *heparin binding EGF*; IP<sub>3</sub>: inositol trisphosphate; MAPK: *mitogen-activated protein kinase*; MEK: *extracellular signal-regulated kinase*; MMP: métalloprotéase matricielle; N.D.: non déterminée; NOX: NADP oxydase; P38MAPK: *p38 mitogen-activated protein kinases*; PAI-1: *plasminogen activator inhibitor 1*; PI3K: phosphatidylinositol-3 kinase; pJNK: *c-Jun N-terminal kinase*; PKC: protéine kinase C; PKD: protéine kinase D; PLC: phospholipase C; ROCK: *rho-associated protein kinase*; ROS: *reactive oxygen species*; SHP-2: *src homology 2 containing tyrosine phosphatase*; TGFβ: *transforming growth factor β*; VEGF: *vascular endothelial growth factor*.

La transactivation de l'EGFR par l'UT peut également passer par l'activation d'une ADAM et le clivage consécutif d'un précurseur de l'EGF, l'HB-EGF, libérant ainsi le ligand de l'EGFR (Onan *et al.*, 2004; Sue *et al.*, 2009). Finalement, dans les cellules HEK293 exprimant un UT recombinant, la transactivation de l'EGFR fait intervenir les  $\beta$ -arrestines et favorise la survie cellulaire (Esposito *et al.*, 2011). Sont également impliquées dans la prolifération, la PLC et la PI3K *via* une protéine G sensible à la PTX (Ziltener *et al.*, 2002). De fait, le couplage de l'UT avec une protéine G de type *i/o* a été observé sur des cellules exprimant un UT humain recombinant (Ziltener *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2006b; Jarry *et al.*, 2010), sur des astrocytes corticaux de Rat en culture (Desrues *et al.*, 2008; Jarry *et al.*, 2010) et sur des lignées de rhabdomyosarcome (Douglas *et al.*, 2004b). Dans ce dernier exemple, les auteurs ont démontré qu'en présence de PTX, le signal calcique est diminué de 40% suggérant un couplage simultané de l'UT à la fois à la protéine  $G_q$  et  $G_{i/o}$ .

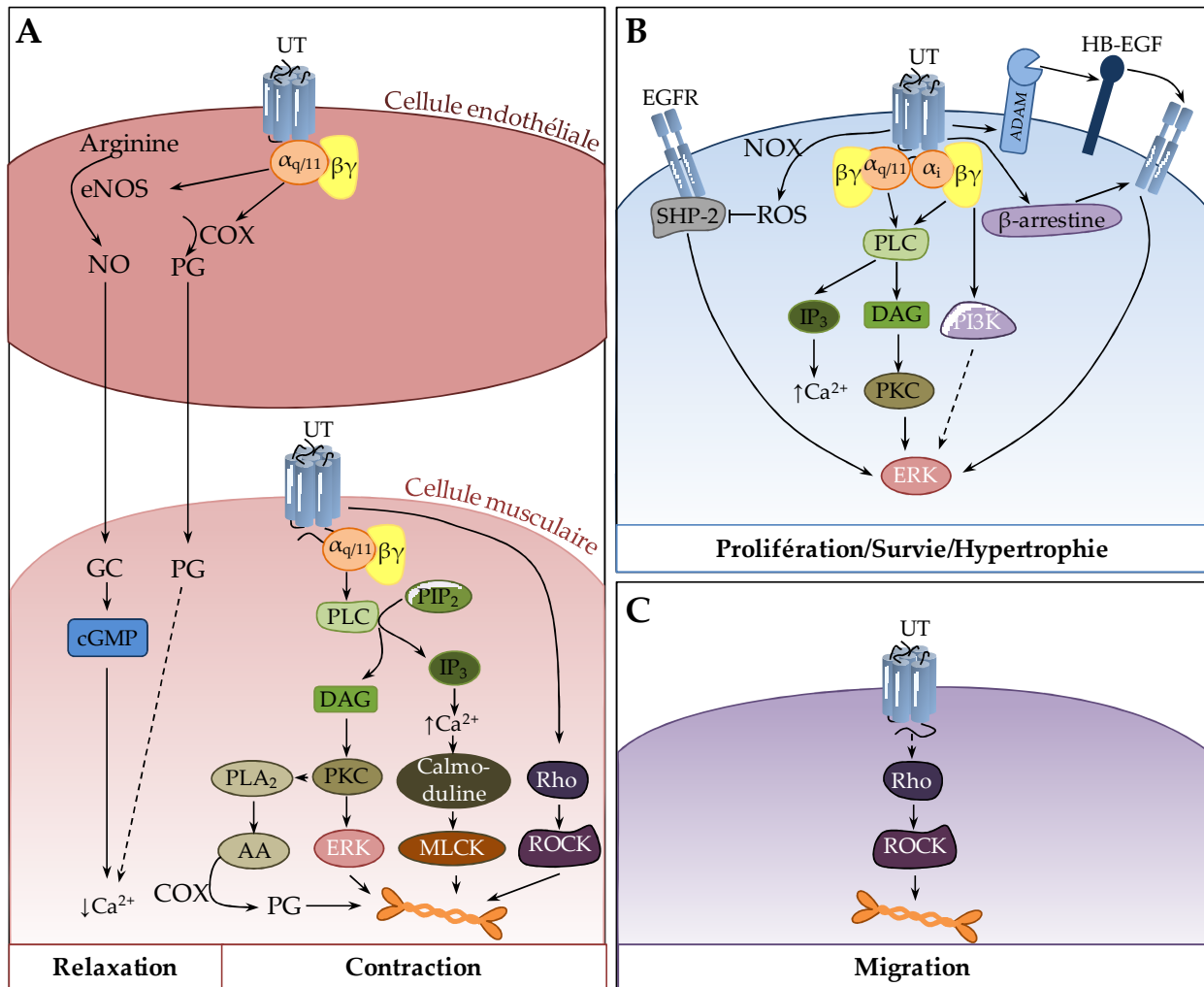
### 3.3. Effets sur la migration cellulaire

Un nombre croissant de travaux indépendants démontrent que l'UUI exerce un effet stimulant sur la migration cellulaire (Tableau 11).

Effet	Type cellulaire	Voie(s) de transduction	Référence
Migration/ Motilité	Monocytes humain	RhoA, ROCK	Segain <i>et al.</i> , 2007
	Cellules progénitrices endothéliales de Rat	RhoA/ROCK, MLC	Xu <i>et al.</i> , 2009
	LnCap	RhoA, FAK, expression d'intégrine	Grieco <i>et al.</i> , 2011
	Cellules musculaires lisses d'aorte humaine	MEK	Matsusaka and Wakabayashi, 2006
	Fibroblastes d'aorte de Rat	PKC, ROCK, calcineurine, MAPKs, expression de collagène I	Zhang <i>et al.</i> , 2008b
	Fibroblastes d'aorte de Rat	Ostéopontine	Zhang <i>et al.</i> , 2011
	Cellules progénitrices endothéliales de Rat	N.D.	Yi <i>et al.</i> , 2012

**Tableau 11. Voies de transduction associées au récepteur UT impliquées dans la migration cellulaire.** FAK: *focal adhesion kinase*; MAPKs: *mitogen-activated protein kinases*; MEK: *extracellular signal-regulated kinase*; MLC: *myosin light chain*; N.D.: non déterminée; PKC: protéine kinase C; ROCK: *rho-associated protein kinase*.

La voie de signalisation Rho/ROCK semble jouer un rôle majeur dans les effets de l'UII sur la migration de fibroblastes de Rat (Zhang *et al.*, 2008b), de cellules progénitrices endothéliales de Rat (Xu *et al.*, 2009) ou encore de monocytes humains (Segain *et al.*, 2007). Dans ce dernier cas, les auteurs considèrent l'UII comme un facteur chimiotactique qui agit sur la réorganisation du cytosquelette d'actine (Figure 21C).



**Figure 21. Représentation schématique des principales voies de signalisation associées au récepteur UT et impliquées dans les effets cellulaires de l'UII. A.** Voies de transduction associées aux effets vasoactifs de l'UII. **B.** Voies de transduction associées aux effets de l'UII sur la prolifération, la survie et l'hypertrophie. **C.** Voies de transduction associées aux effets de l'UII sur la migration. AA: acide arachidonique; AC: adénylate cyclase; ADAM: *a disintegrin and metalloproteinase*; Ca<sup>2+</sup>: calcium; COX: cyclooxygénase; DAG: diacylglycérol; eNOS: *endothelial nitric oxide synthase*; ERK: *extracellular signal-regulated kinase*; GC: guanylate cyclase; HB-EGF: *heparin binding EGF*; IP<sub>3</sub>: inositol trisphosphate; MLCK: *myosin light-chain kinase*; NO: *nitric oxide*; NOX: *NADP oxydase*; PG: prostaglandine; PI3K: phosphatidylinositol-3 kinase; PIP<sub>2</sub>: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PKC: protéine kinase C; PLA<sub>2</sub>: phospholipase A<sub>2</sub>; PLC: phospholipase C; ROCK: *rho-associated protein kinase*; ROS: *reactive oxygen species*; SHP-2: *src homology 2 containing tyrosine phosphatase*.

Dans une étude plus récente, l'utilisation d'un antagoniste de l'UT (urantide), d'un inhibiteur de Rho ou encore d'un ShRNA dirigé contre l'UT, inhibe la motilité de cellules issues d'une lignée cellulaire tumorale prostatique (LnCap), suggérant un effet autocrine/paracrine de l'UII (Grieco *et al.*, 2011). Quelques travaux mettent en cause d'autres éléments de signalisation intracellulaire tels que la PKC, les MAPKs ou l'ostéopontine, mais ces données restent parcellaires et ne permettent pas de conclure sur l'ensemble des voies de signalisation recrutées dans la migration cellulaire induite par l'UII.

### 3.4. Effets sur la néoangiogenèse

Les propriétés vasoactives importantes associées aux effets pro-migratoires et pro-mitogènes de l'UII, suggéraient l'implication du système urotensinergique dans la néoangiogenèse. La première preuve d'une activité proangiogénique de l'UII a été apportée par Spinazzi *et coll.* en 2006. Dans cette étude, l'UII, sans effet sur la prolifération, entraîne une réorganisation de cellules endothéliales issues de microvaisseaux cérébraux de Rat, et stimule la néoangiogenèse. Ces mêmes auteurs ont aussi démontré que la présence d'UII dans un implant de gélatine appliqué sur la membrane chorioallantoïde d'un embryon de Poulet provoque une augmentation du nombre des vaisseaux sanguins (Spinazzi *et al.*, 2006).

Effets	Type cellulaire	Voie(s) de transduction	Références
Néoangiogenèse	HUVEC	PLC, Ca <sup>2+</sup> , PKC, PI3K, ERK1/2, FAK	Guidolin <i>et al.</i> , 2010
	HUVEC	Expression de VEGF, endothéline-1, adrénomédulline	Albertin <i>et al.</i> , 2011
	HUVEC	HIF-1, ROS, NOX-2	Diebold <i>et al.</i> , 2012
	Cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de Rat, Membrane chorioallantoïde d'embryon de Poulet	N.D.	Spinazzi <i>et al.</i> , 2006

**Tableau 12. Voies de transduction associées au récepteur UT impliquées dans la néoangiogenèse.** ERK1/2: *extracellular signal-regulated kinase1/2*; FAK: *focal adhesion kinase*; HIF-1: *hypoxia inducible factor-1*; HUVEC: *human umbilical vein endothelial cells*; N.D.: non déterminée; NOX: *NADP oxydase*; PI3K: *phosphatidylinositol-3 kinase*; PKC: *protéine kinase C*; PLC: *phospholipase C*; ROS: *reactive oxygen species*; VEGF: *vascular endothelial growth factor*.

Les études sur les cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain (HUVEC) ont ensuite permis d'identifier les voies de transduction activées par l'UII (Albertin *et al.*, 2009; Guidolin *et al.*, 2010; Diebold *et al.*, 2012), mais les données récoltées à ce jour sont encore insuffisantes pour établir une signalisation définie et attribuer clairement une fonction physiologique ou physiopathologique à ces mécanismes (Tableau 12).

#### **4. Activités physiologiques et physiopathologiques du système urotensinergique**

##### **4.1. Sur le système cardiovasculaire**

L'administration d'UII sous forme de bolus intra-artériel (au niveau de l'arc aortique) chez la Grenouille taureau ou *Lithobates catesbeianus*, entraîne une élévation de la pression artérielle (Yano *et al.*, 1995). Injecté en bolus intraveineux sur des rats anesthésiés, l'UII (Gardiner *et al.*, 2001; Abdelrahman and Pang, 2002; Hassan *et al.*, 2003) ou l'URP (Sugo *et al.*, 2003) provoque une diminution lente et prolongée de la pression artérielle liée à une vasodilatation. En revanche, une administration chronique d'UII chez ces animaux est sans effet (Kompa *et al.*, 2004). Chez le Macaque, l'UII induit une forte vasoconstriction responsable d'un collapsus et d'un arrêt cardiaque à forte dose (Zhu *et al.*, 2004). Les résultats obtenus chez l'Homme restent quant à eux controversés puisque l'injection intraveineuse d'UII se traduit par une vasoconstriction locale (Böhm and Pernow, 2002) ou est sans effet apparent (Wilkinson *et al.*, 2002; Cheriyan *et al.*, 2009).

Plusieurs groupes se sont intéressés aux effets de l'UII sur le système cardiovasculaire relayés par une action sur le SNC. Les données disponibles dans la littérature montrent que l'injection intracérébroventriculaire (icv) d'UII chez la Truite (Le Mevel *et al.*, 1996; Lancien *et al.*, 2004), l'Anguille (Nobata *et al.*, 2011) ou le Rat normo- (Lin *et al.*, 2003a) ou hypertendu (Lin *et al.*, 2003b) entraîne une élévation du rythme cardiaque et de la pression artérielle. L'augmentation de la pression artérielle moyenne et la dépression dose-dépendante observées après micro-injection d'UII dans les noyaux paraventriculaire et arqué ainsi que

dans l'aire cérébrale A1 (au niveau du cortex dorsolatéral) respectivement, indiquent que ces structures cérébrales sont, en partie, responsables des effets centraux du système urotensinergique dans le contrôle de l'activité cardiaque (Lu *et al.*, 2002).

Le système urotensinergique serait impliqué dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires. Des patients souffrants d'une insuffisance cardiaque (Ng *et al.*, 2002; Richards *et al.*, 2002; Russell *et al.*, 2003; Gruson *et al.*, 2006; Jani *et al.*, 2012), d'hypertension systémique (Cheung *et al.*, 2004; Krum and Kemp, 2007) et portale (Heller *et al.*, 2002; Kemp *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010a; Pawar *et al.*, 2011) ou d'athérosclérose (Suguro *et al.*, 2007) présentent des taux circulants d'UII et/ou d'URP (*UII-like*) supérieurs à ceux relevés chez des volontaires sains. Une surexpression d'UII, d'URP et de l'UT dans le cœur de rats insuffisants cardiaques a également été mise en évidence (Nakayama *et al.*, 2008). La forte immunoréactivité *UII-like* dans les cellules endothéliales d'artères coronaires issues de patients atteints d'athérosclérose (Maguire *et al.*, 2004; Hassan *et al.*, 2005), associée aux effets de l'UII sur la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (Sauzeau *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2001), ou sur la formation de macrophages spumeux (Watanabe *et al.*, 2005; Shiraishi *et al.*, 2008), suggère que ce peptide pourrait participer aux processus de remodelage tissulaire au cours de la pathologie (Pakala, 2008).

Les effets de l'UII sur la prolifération (Chen *et al.*, 2008), la migration (Zhang *et al.*, 2008b; Zhang *et al.*, 2011) et l'expression de collagène (Tzanidis *et al.*, 2003; Dai *et al.*, 2011) par des fibroblastes cardiaques de Rat ainsi que ses effets sur l'hypertrophie de cardiomyocytes de Rat (Tzanidis *et al.*, 2003; Onan *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2009; Gruson *et al.*, 2010) indiquent que le système urotensinergique jouerait un rôle délétère sur l'hypertrophie et la fibrose cardiaques (Tzanidis *et al.*, 2003).

## 4.2. Sur le système rénal

Plusieurs équipes ont relevé la présence de quantités significatives d'UII (Shenouda *et al.*, 2002; Maguire *et al.*, 2004), de sites de liaison à l'UII et d'ARNm de l'UT (Maguire *et al.*, 2000; Matsushita *et al.*, 2001; Totsune *et al.*, 2001; Hirose *et al.*, 2009; Mori *et al.*, 2009) au niveau rénal. Les reins sont d'ailleurs considérés comme la principale source d'UII circulante (Nothacker *et al.*, 1999). Le peptide est également retrouvé dans les urines chez l'Homme (Matsushita *et al.*, 2001) et le Rat (Song *et al.*, 2006a) à des niveaux excédant ceux retrouvés dans le plasma. Les rôles physiologiques de l'UII sur la fonction rénale restent pour autant controversés puisque son administration chez le Rat augmente (Zhang *et al.*, 2003) ou diminue (Song *et al.*, 2006a) le taux de filtration glomérulaire. Ce dernier effet est confirmé par l'étude d'Abdel-Razik et coll. en 2008 dans laquelle l'UII, administré à fortes doses, entraîne une diminution du taux de filtration glomérulaire résultant de ses effets hémodynamiques (réduction du flux sanguin rénal) alors qu'à faibles doses, le peptide exerce une action tubulaire produisant une diminution de la réabsorption des électrolytes.

Sur un terrain pathologique, il a été observé que des quantités d'*UII-like* présentes dans le plasma et dans les urines sont considérablement augmentées chez des patients souffrant d'une néphropathie consécutive au *diabetes mellitus* (Langham *et al.*, 2004; Totsune *et al.*, 2004). Particulièrement élevés chez les malades en stade terminal, les niveaux circulants d'*UII-like* sont inversement corrélés au débit cardiaque (Mallamaci *et al.*, 2005; Zoccali *et al.*, 2006) et aux complications cardiovasculaires létales, indiquant que l'UII jouerait dans ce cas, un rôle cardioprotecteur (Zoccali *et al.*, 2008). En revanche, dans un modèle d'insuffisance rénale aigüe ischémique, le blocage de l'UT par l'antagoniste palosuran, prévient la diminution du débit sanguin rénal responsable de lésions tubulo-interstitielles (Clozel *et al.*, 2004; 2006) ce qui plaide en faveur d'une implication délétère du système urotensinergique. Une étude plus récente menée sur des patients atteints d'une néphropathie consécutive à un *diabetes mellitus*, montre que le palosuran ne modifie pas les fonctions rénales (Vogt *et al.*, 2010). Ces



exemples apparemment contradictoires, illustrent la complexité de l'action du système urotensinergique dans un contexte pathologique rénal.

#### 4.3. Sur le système endocrinien

La distribution de l'UT et de ses ligands endogènes dans plusieurs organes et tissus endocrines a conduit plusieurs groupes à rechercher d'autres fonctions physiologiques de l'UII et de l'URP. Les premières études réalisées chez les poissons ont démontré que l'UII inhibe la libération de prolactine (PRL) (Grau *et al.*, 1982; Rivas *et al.*, 1986) et augmente la cortisolémie (Arnold-Reed and Balment, 1994; Kelsall and Balment, 1998). En revanche, l'administration icv d'UII entraîne une hausse des concentrations plasmatiques de *thyroid stimulating hormone* (TSH) et de PRL chez le Rat (Gartlon *et al.*, 2001), mais aussi de l'hormone corticotrope et de l'adrénaline chez la Brebis (Watson *et al.*, 2003). Ces données sont à rapprocher de celles d'Albertin et coll. (2006) qui montrent que l'application d'UII sur des cellules corticosurréaliennes de Rat en culture diminue de façon dose-dépendante la sécrétion basale de corticostérone. Par ailleurs, sur des pancréas perfusés de Rat, l'UII inhibe la libération d'insuline induite par le glucose (Silvestre *et al.*, 2001, 2004) tandis que le palosuran et l'urantide ont des propriétés inverses (Marco *et al.*, 2008), suggérant que l'UII endogène inhiberait l'activité sécrétrice des cellules pancréatiques de type  $\beta$  (Silvestre *et al.*, 2009). Cette implication potentielle du système urotensinergique dans le contrôle de la glycémie est confortée par deux études indépendantes qui rapportent la présence de concentrations plasmatiques d'*UII-like* élevées chez des patients souffrant d'un diabète de type II (Totsune *et al.*, 2003; Suguro *et al.*, 2008). Finalement, plusieurs polymorphismes de l'UII et de l'UT ont été décrits chez l'Homme et associés au diabète de type 2 (Suzuki *et al.*, 2004; Okumus *et al.*, 2012) ou à une résistance à l'insuline (Ong *et al.*, 2006; Sáez *et al.*, 2011).

#### 4.4. Sur le système immunitaire

Une étude menée en 2004 par l'équipe de Giaid a révélé la présence de l'UT à la surface de certaines cellules immunitaires, *e.g.* lymphocytes B et macrophages (Bousette *et al.*, 2004), qui infiltrent des zones présentant une immunoréactivité accrue pour l'UII (Maguire *et al.*, 2004). De plus, l'UII se comporte comme un facteur chimioattractant sur des monocytes humains (Segain *et al.*, 2007) et provoque l'extravasation plasmatique chez la Souris (Vergura *et al.*, 2004) et le Rat (Gendron *et al.*, 2004). Des signaux pro-inflammatoires tels que le TNF $\alpha$ , le LPS ou encore l'interféron  $\gamma$  (INF $\gamma$ ) favorisent l'expression de l'UT (Segain *et al.*, 2007) alors que l'UII induit la sécrétion de cytokines telles que l'IL-6 par des cardiomyocytes et des cellules d'adénocarcinome de poumon (Johns *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2012). Ces données montrent que l'UII interviendrait dans la réponse immunitaire en participant notamment à la production de cytokines et en favorisant l'infiltration des cellules immunitaires.

#### 4.5. Sur le comportement animal

En accord avec la distribution de l'UII et de l'UT dans le SNC (Coulouarn *et al.*, 1998, 1999; Ames *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Clark *et al.*, 2001), l'administration icv d'UII a de multiples répercussions comportementales. L'UII induit des effets anxiogènes et un comportement « de résignation » chez la Souris (Do-Rego *et al.*, 2005) et le Rat (Matsumoto *et al.*, 2004) dans les tests de la planche à trou, le labyrinthe en croix surélevé, la nage forcée ou la suspension par la queue. Ce neuropeptide augmente de façon dose-dépendante les phénomènes de toilettage et de redressement, tout en diminuant le temps d'inactivité chez le Rat soumis à un environnement familier (Gartlon *et al.*, 2001). Une élévation de l'activité motrice a également été rapportée chez la Souris (Do-Rego *et al.*, 2005) et la Truite Arc-en-ciel (Lancien *et al.*, 2004).

L'expression du récepteur UT dans l'hypothalamus (aire ventromédiane, noyaux arqué et supraoptique) et le tronc cérébral (noyaux du tractus solitaire et parabrachial) suppose que l'UII participerait, à l'instar de nombreux autres neuropeptides, au contrôle de la prise alimentaire (Gartlon *et al.*, 2001; Jégou *et al.*, 2006). De fait, dans les 30 minutes suivant son injection icv, l'UII exerce chez la Souris des propriétés orexigènes (Do-Rego *et al.*, 2005), laissant entrevoir de nouvelles applications thérapeutiques potentielles pour ce peptide dans le traitement des troubles de la prise alimentaire.

Le sommeil est classiquement divisé en trois phases, *i.e.* sommeil léger, profond et paradoxal. Ce dernier s'accompagne de mouvements rapides des yeux (*rapid eye movements* ou REM) contrôlés par des neurones cholinergiques localisés dans l'aire tegmentale (de Lecea and Bourgin, 2008). De façon intéressante, le tegmentum est particulièrement riche en ARNm codant l'UT (Clark *et al.*, 2001; Jégou *et al.*, 2006) et une microinjection d'UII dans cette zone se traduit chez le Rat par une augmentation du nombre et de la durée des phases de sommeil paradoxal (Huitron-Resendiz *et al.*, 2005; de Lecea and Bourgin, 2008). Le locus cœruleus présente également de forts niveaux d'ARNm codant l'UT (Jégou *et al.*, 2006), suggérant que le système urotensinergique participerait à la régulation des cycles veille-sommeil. A l'appui de cette hypothèse, appliquée sur des tranches cérébrocorticales de Rat, l'UII stimule la libération de noradrénaline, un neurotransmetteur fortement impliqué dans le contrôle de l'attention et de l'éveil (Ono *et al.*, 2008).

#### **4.6. Dans le développement tumoral**

L'expression de l'UII et de l'UT observée dans de nombreuses lignées et échantillons tumoraux (Tableau 13), notamment dans des extraits de tumeurs de la glande surrénale telles que les carcinomes adrénocorticaux ou les phéochromocytomes (Takahashi *et al.*, 2003; Morimoto *et al.*, 2008), de tumeurs du SNC telles que les glioblastomes ou les neuroblastomes (Takahashi *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2012) ou encore dans des tissus

musculaires, les rhabdomyosarcomes (Birker-Robaczewska *et al.*, 2003; Douglas *et al.*, 2004b). A l'heure actuelle, seules quelques travaux isolés s'intéressent au rôle du système urotensinergique dans la tumorigenèse. Ainsi l'UII stimule la prolifération des cellules d'une lignée d'adénocarcinome pulmonaire *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de xénogreffes sur des souris immunodéprimées *Nude* (Wu *et al.*, 2010b). La même équipe a plus récemment démontré que l'UII stimule la libération de cytokines pro-inflammatoires telles l'IL-6 ou le TNF $\alpha$ , de MMP-9, et participe à l'infiltration de macrophages dans la tumeur (Zhou *et al.*, 2012). Enfin, l'utilisation de l'urantide sur les cellules tumorales prostatiques LnCap se traduit par une diminution de leur motilité et de leur invasion (Grieco *et al.*, 2011).

Type de tumeur	Origine tissulaire	Expression d'UII	Expression d'UT
<b>Système endocrinien</b>			
Carcinome adrénocortical	Lignée SW13	Takahashi <i>et al.</i> , 2001	Takahashi <i>et al.</i> , 2001
	Echantillon humain	Takahashi <i>et al.</i> , 2003	Takahashi <i>et al.</i> , 2003
	Echantillon humain	Morimoto <i>et al.</i> , 2008	Morimoto <i>et al.</i> , 2008
Pheochromocytome	Echantillon humain	Takahashi <i>et al.</i> , 2003	Takahashi <i>et al.</i> , 2003
	Echantillon humain	Zeng <i>et al.</i> , 2006	Zeng <i>et al.</i> , 2006
	Echantillon humain	Morimoto <i>et al.</i> , 2008	Morimoto <i>et al.</i> , 2008
Adénome adrénocortical	Lignée PC12	Aita <i>et al.</i> , 2010	Aita <i>et al.</i> , 2010
	Echantillon humain	Takahashi <i>et al.</i> , 2003	Takahashi <i>et al.</i> , 2003
	Echantillon humain	Morimoto <i>et al.</i> , 2008	Morimoto <i>et al.</i> , 2008
<b>Système uro-génital et gastro-intestinal</b>			
Carcinome rénal	Echantillon humain	Shenouda <i>et al.</i> , 2002	
Adénocarcinome prostatique	Lignée LnCap		Grieco <i>et al.</i> , 2011
Choriocarcinome	Lignée BeWo	Takahashi <i>et al.</i> , 2001	Takahashi <i>et al.</i> , 2001
Adénocarcinome colorectal	Lignée DID-1	Takahashi <i>et al.</i> , 2001	Takahashi <i>et al.</i> , 2001
Cancer du col de l'utérus	Lignée Hela	Takahashi <i>et al.</i> , 2001	Takahashi <i>et al.</i> , 2001
<b>Système nerveux central</b>			
Glioblastome	Lignée T98G	Takahashi <i>et al.</i> , 2001	Takahashi <i>et al.</i> , 2001
	Lignée U87-MG		Desrues <i>et al.</i> , 2012; Nguyen <i>et al.</i> , 2012
Neuroblastome	Lignée IMR-32	Takahashi <i>et al.</i> , 2001	Takahashi <i>et al.</i> , 2001
	Lignée NB69		Takahashi <i>et al.</i> , 2001
	Lignée SH-SY5Y		Nguyen <i>et al.</i> , 2012
	Echantillon humain	Takahashi <i>et al.</i> , 2003	Takahashi <i>et al.</i> , 2003
<b>Autres tissus</b>			
Rhabdomyosarcome	Lignée TE-671		Birker-Robaczewska <i>et al.</i> , 2003
	Lignée SJRH30		Douglas <i>et al.</i> , 2004b
	Lignée SJCRH30		Batuwangala <i>et al.</i> , 2009
Adénocarcinome pulmonaire	Lignée A549	Wu <i>et al.</i> , 2010b	Wu <i>et al.</i> , 2010b
		Zhou <i>et al.</i> , 2012	Zhou <i>et al.</i> , 2012

**Tableau 13. Localisation de l'UII et de l'UT dans différents types de tumeurs humaines.**

---

---

## Objectifs

Les récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPGs) répertoriés constituent la plus large famille des protéines transmembranaires du génome humain. Ces récepteurs jouent un rôle majeur dans l'initiation tumorale, la prolifération cellulaire mais aussi dans les fonctions chimioattractantes régulant les mécanismes métastatiques et invasifs ainsi que la néoangiogenèse tumorale. Les RCPGs dont le rôle est le plus caractérisé dans ces mécanismes chimiotactiques, sont les récepteurs de chimiokines et de peptides vasoactifs, qui sont exprimés dans de nombreux types de cancers, dont certains sont particulièrement invasifs et néoangiogéniques, notamment les gliomes de haut grade.

Les tumeurs cérébrales gliales ou gliomes représentent chez l'adulte 2% des cancers. Malgré les améliorations thérapeutiques, le pronostic reste sombre, principalement en raison du potentiel néoangiogénique des glioblastomes, et au caractère extrêmement invasif des cellules tumorales gliales. En effet, plus de 95% des gliomes récidivent en marge de la cavité de résection, qui contient des cellules tumorales invasives agissant ainsi comme un réservoir de tumeur. Cette invasion du tissu sain s'opère en réponse à des facteurs chimioattractants tels que les facteurs de croissance, mais surtout les chimiokines et des peptides vasoactifs capables d'activer des RCPGs.

Dans ce contexte, les peptides vasoactifs et leurs récepteurs, classiquement impliqués dans les processus angiogéniques et invasifs, constituent de nouvelles cibles thérapeutiques. L'U118, considéré comme le plus puissant d'entre eux et son récepteur UT sont exprimés dans le système nerveux central, où leur rôle reste peu connu. Les travaux réalisés dans l'équipe ont précédemment mis en évidence la présence d'ARNm codant l'UT ainsi que la protéine dans les astrocytes corticaux de Rat en culture (Castel *et al.*, 2006) et ont montré que l'U118 interagit avec des sites de très haute affinité et de haute affinité, couplés à la voie  $G_q$ -PLC-IP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup>,  $G_{i/o}$ -PIPs sensibles à la PTX, et aux canaux calciques de type T (Castel *et al.*, 2006; Diallo *et al.*, 2008; Jarry *et al.*, 2010). De plus, nous avons démontré que l'activation du site de très

haute affinité pour l'U11, qui ne reconnaît pas l'URP, relaye la prolifération des astrocytes en culture (Jarry *et al.*, 2010). Enfin, nous avons montré plus récemment que le récepteur UT est exprimé dans des astrocytes humains et dans une lignée de gliome de haut grade, la lignée U87, et régule l'internalisation du récepteur GABA<sub>A</sub> (Desrues *et al.*, 2012). Ces données suggèrent que le système urotensinergique joue un rôle majeur dans l'activité des astrocytes en conditions physiologique et physiopathologique.

Le peptide et son récepteur sont en effet exprimés dans de nombreux types de tumeurs dont des lignées de glioblastome (Takahashi *et al.*, 2001). Des études fragmentaires ont démontré que dans des lignées de tumeurs prostatiques LnCap, l'U11 favorise la motilité et l'invasion des cellules tumorales (Grieco *et al.*, 2011) et qu'elle stimule la croissance des tumeurs et l'infiltration des macrophages dans des adénocarcinomes pulmonaires (Zhou *et al.*, 2012). Ces données suggèrent donc que l'U11 pourrait participer au développement tumoral en stimulant la prolifération et/ou la migration cellulaire. En particulier, nous émettons l'hypothèse que l'UT et/ou l'U11 exprimés dans les glioblastomes, peuvent exercer des rôles multicellulaires sur l'invasion du parenchyme nerveux par les cellules tumorales gliales, la néoangiogenèse et la chimioattraction des macrophages pro-angiogéniques, suggérant que le système urotensinergique constitue ainsi une cible thérapeutique prometteuse.

**L'objectif de mon travail de thèse visait donc à déterminer le rôle du système urotensinergique dans le développement des tumeurs cérébrales d'origine gliale, par une première analyse des mécanismes de signalisation relayés par l'UT *in vitro*.** Pour atteindre cet objectif, mon travail de thèse a consisté à *i*) déterminer les effets de l'U11 sur la prolifération, la migration et l'adhésion des cellules tumorales gliales et caractériser les voies de signalisation impliquées dans ces effets à l'aide d'outils pharmacologiques et moléculaires, *ii*) identifier, par double-hybride, des partenaires protéiques du domaine C-terminal cytosolique de l'UT, potentiellement impliqués dans les voies de signalisation activées par l'U11 et *iii*) rechercher, par une approche « phosphoprotéomique » (Plate-Forme PISSARO),



un ensemble de protéines phosphorylées et déphosphorylées dans une lignée de glioblastome, exposée au peptide U11.





---

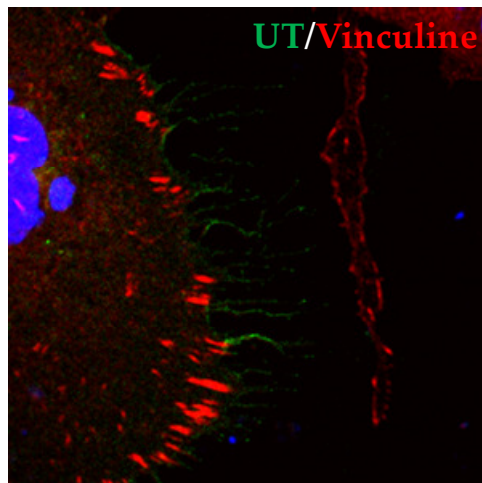
## Partie 1.

### Signaling switch of the vasoactive peptide urotensin II receptor:

#### Chemotaxic control of glioma migration

Les travaux antérieurs de l'équipe concernant le rôle du système urotensinergique sur l'activité astrocytaire, et les études fragmentaires évoquant le caractère « chimiokine » de l'UII, nous ont conduit à poser un certain nombre de questions :

- ◆ L'UII et son récepteur l'UT sont-ils aussi exprimés dans les tumeurs cérébrales gliales d'origine astrocytaire ?
- ◆ Dans les tumeurs gliomales humaines, l'activation de l'UT par l'UII conduit-elle classiquement au recrutement de la voie  $G_q/PLC/Ca^{2+}$  ?
- ◆ D'autres voies de signalisation de l'UT sont-elles mises en jeu dans les gliomes, et notamment dans les glioblastomes ? Participent-elles à la survie/prolifération, migration et/ou adhésion cellulaires ?
- ◆ Ainsi, le récepteur UT peut-il répondre aux effets d'un gradient de faible concentration d'UII et aux effets d'une plus forte concentration homogène de ligand en adaptant ses capacités de couplage ?
- ◆ L'UT peut-il donc jouer un rôle clé dans les mécanismes de migration/invasion des glioblastomes ?



## Signaling switch of the vasoactive peptide urotensin II receptor:

### Chemotaxic control of glioma migration

Céline Lecointre<sup>1</sup>, Laurence Desrues<sup>1</sup>, Jane Eileen Joubert<sup>1</sup>, Vadim Le Joncour<sup>1</sup>, Cédric Brulé<sup>2</sup>, Nicolas Perzo<sup>3</sup>, Richard Leduc<sup>3</sup>, Marie Chabbert<sup>4</sup>, Annie Laquerrière<sup>5</sup>, François Proust<sup>1,6</sup>, Pierrick Gandolfo<sup>1</sup>, Fabrice Morin<sup>1</sup> and Hélène Castel<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Inserm U982, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation, DC2N, Astrocyte and Vascular Niche, Biomedical Research Institute (IRIB), PRES Normandy, TC2N network, University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France.

<sup>2</sup>IGF, Institut of Functional Genomic, CNRS UMR 5203, Inserm U661, University of Montpellier1 and 2, Montpellier, France.

<sup>3</sup>Department of Pharmacology, Institut of Pharmacology, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

<sup>4</sup>UMR, CNRS 6214, Inserm 1083, Faculté de Médecine 3, Angers, France.

<sup>5</sup>Service of anathomocytopatholgy, CHU of Rouen, France.

<sup>6</sup>Service of neurosurgery, CHU of Rouen, France.

**Key Words:** glioma, urotensin II, migration, adhesion, UT signaling pathway

\*Address for correspondence: Hélène Castel, Inserm U982, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation, DC2N, Astrocyte and Vascular Niche, Biomedical Research Institute (IRIB), PRES Normandy, TC2N network, University of Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France  
E-mail: helene.castel@univ-rouen.fr; Tel: (33) 235-14-6630; Fax: (33) 235-14-6946.

Abstract: 299 words

Text manuscript: 9443 words

Figures: 8

References: 96

Supplementary Figures and Table: 4

## **Abbreviations**

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>, calcium cytosolic concentration; AOBS, Acousto-Optical Beam Splitter; ATCC, American Type Culture Collection; bFGF: basic fibroblasy growth factor; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; CBTRUS, Central Brain Tumor Registry of the United States; CCD, charge-coupled device; CXCR4, CXC motif receptor 4; DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole; EGF: epidermal growth factor; FA, focal adhesion; FBS: fetal bovine serum; FRET: fluorescence resonance energy transfer; GBM, glioblastoma multiforme; GPCR, G protein-coupled receptor; HRP, horseradish peroxidase; HTRF: homogeneous time resolved fluorescence; i.p., intraperitoneally; IP-1: inositol phosphate; IL-6, interleukin-6; MMP9, matrix metalloproteinase 9; NDS, normal donkey serum; NEAA, non essential amino acids; NF-κB, nuclear factor-kappa B; NPY, neuropeptide Y; PFA, paraformaldehyde; PI, propidium iodide; PI3K, phosphatidylinositol-3 kinase; PIP, polyphosphoinositide; PTX, pertussis toxine; Rluc: renilla reniformis luciferase; Rb, retinoblastoma protein; RNAi, RNA interference; ROCK, rho kinase; RTK: tyrosine kinase receptor; s.c., subcutaneously; shRNA, small hairpin RNA; TMRM, tetramethylrhodamine, methyl ester; TNF-α, tumor necrosis factor-α; UII, urotensin II; URP, urotensin II-related peptide; UT, urotensin II receptor; WHO, World Health Organization.

## Abstract

Glioblastoma are the most frequent and the most aggressive primary brain tumors in adults. Despite improvements in treatment, the poor prognosis is mainly due to the major neo-angiogenic potential and the highly invasive nature of glioblastoma involving chemotactic mechanisms. In this study, we established that glioblastoma expressed the vasoactive peptide urotensin II (UII) and its receptor UT, and we investigated the UT-mediated selective signaling cascades involved in glioma cell growth, migration and adhesion. The UII and UT components are widely expressed in glioma (grade III and IV) cell lines, fresh biopsy explants and glioblastoma patient-derived tissue sections. Glioma cell lines U87 and SW1088 and fresh glioma explants expressed a UT receptor uncoupled from the  $G_q/IP_3/Ca^{2+}$  pathway and cell cycle/proliferation. Low gradient concentrations of UII ( $10^{-13}$ - $10^{-9}$  M) exhibited chemoattracting migratory/motility effect towards HEK expressing recombinant UT as well as glioma cell lines. This effect was blocked by UT antagonists, entirely mediated by  $G_{13}$  and the ROCK kinase, and partially involved  $G_{i/o}$  and PI3K components. In contrast, we observed that homogenous higher concentrations of UII drastically blocked cell motility and stimulated cell-matrix adhesions mainly through a UT- $G_{i/o}$  signaling cascade. Through the development of a series of signaling assays, we confirmed that in HEK-UT, UII dose-dependently activated  $G_q/IP1$ ,  $G_i$  and  $G_{13}$ , and mediated ERK1/2 phosphorylation. However, UT expressed in glioma would only recruit  $G_i$  and  $G_{13}$  selective couplings and failed to engage the ERK1/2/AKT pathway. Finally, we provide evidence that homogenous high concentration of UII ( $10^{-8}$  M; 1h) increased actin stress fibers and the formation of large vinculin-stained focal adhesions. These findings suggest that the vasoactive peptide receptor UT behaved as a professional chemotactic receptor, relaying a signaling switch between directional migration and cell adhesion under gradient and homogenous concentrations, respectively, redefining sequential mechanisms affecting tumor cells during glioma growth and neo-angiogenesis.



## **Introduction**

Glial brain tumors comprise only 2% of all cancers but contribute to 2.5% of overall cancer mortality and are the third leading cause of cancer death in young adults (1). Highly malignant glioma, multiform glioblastoma (GBM), are the most common group of primary brain tumors with an incidence of 8.9 cases per 100,000 persons/year in the US (CBTRUS 2008; 2). The median survival of patients with glioblastoma is estimated at 14.6 months after surgery and combined treatment (radiotherapy and chemotherapy) (3). Despite improvements in treatment, the prognosis is poor, mainly due to the major neo-angiogenic potential and the highly invasive nature of glioblastoma. Thus, over 95% of glioma recur in the margins of resection cavity, which contain invasive tumor cells acting as a reservoir of tumor (4,5). Indeed, tumoral glial cells invade the parenchyma and follow the myelinated nerve fibers or migrate along blood vessels (6), specific niches providing essential oxygen and nutrients for growth. This invasion of healthy tissue occurs in response to chemoattractant factors such as growth factors, but also chemokines, cytokines and vasoactive peptides activating G protein coupled receptors (GPCRs). Among chemotactic GPCRs, the chemokine receptor CXCR4 (CXC motif receptor 4) is undoubtedly the most recognized in the metastatic processes but also the most invasive in GBM until now. High levels of expression of CXCR4 and its ligand CXCL12 were detected in areas adjacent to glioma necrosis (7); and play a major role in glioma infiltration by leukocytes and macrophages (8).

Vasoactive peptide receptors would also relay migration of various cell types including endothelial, vascular smooth muscle and/or immune cells. For instance, pro-migratory behaviors have been described for angiotensin II on vascular smooth muscle cells (9), for endothelin-1 on endothelial and neural progenitor cells (10,11), for neuropeptide Y (NPY) on a breast cancer cell line (12), and for bradykinin on glioma cells (13). More recently, the vasoactive neuropeptide urotensin II (UII) has been shown to induce chemoattraction of human monocytes and thus could be considered as a new chemokine (14).

U<sup>II</sup> and its paralogue urotensin II-related peptide URP are cyclic neuropeptides of 11 and 8 amino acid sequence and exhibit a fully conserved C-terminal cyclic hexapeptide CFWKYC core that plays a major role in the biological activity of the peptides (15,16). U<sup>II</sup> and URP are considered the most potent endogenous vasoactive molecules known so far that relayed biological actions through a common GPCR called UT (17,18). Its activation leads to an increase of cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentrations [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> following the recruitment of G<sub>q</sub> protein and a phospholipase C (PLC) (18). U<sup>II</sup>, URP and UT are expressed in various organs including the cardiovascular system (heart endothelium and vascular smooth muscle cells), renal tissues and the central nervous system (CNS) (19,20). More recently, few studies highlighted a UT-coupled Rho/ROCK signaling pathway leading to rat fibroblasts (21), rat endothelial progenitor cells (22) or human monocytes migration (14), thus stressing a potential new chemokine status of U<sup>II</sup>. Accordingly, it has been shown that UT receptor antagonism regulates prostatic cancer cells (23) and that U<sup>II</sup> may activate tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), metalloproteinase 9 (MMP9) and nuclear factor-kappa (NF- $\kappa$ B) and promote lung adenocarcinoma growth *in vitro* and *in vivo* (24,25). Finally, U<sup>II</sup> mRNA has been detected in tumor cell lines of neural origin and the U<sup>II</sup> peptide has been shown to favor proliferation of human adenocarcinoma and renal carcinoma cell lines (26,27).

In CNS, UT was found in astroglial processes *in vivo* (28), in cerebellar glial cells from rat brain slices, in human native astrocytes and in a human glioblastoma cell line (29–31). In rat astrocytes, our previous work indicates that U<sup>II</sup> activates a PLC/PIPs/Ca<sup>2+</sup> transduction pathway, *via* both G<sub>q</sub> and G<sub>i/o</sub> proteins and stimulates cell proliferation/survival (29,30). The potential chemoattractant activity of the U<sup>II</sup>-UT system may play multiple roles in invasion of the brain parenchyma by glial tumor cells, and thus constitutes a non-ubiquitous promising therapeutic target.

In this study, we establish that glioblastoma expressed the urotensinergic system and we investigate the effect of the U<sup>II</sup>/UT couple on glioma cell growth, migration and adhesion

through activation of selective signaling cascades. The UII and UT components are widely expressed in glioma (grade III and IV) cell lines, fresh biopsy explants and in glioblastoma patient-derived tissue sections. We show that gradient concentrations of UII exhibited chemoattracting behavior on HEK expressing human UT (HEK-UT) and glioma cells migration. This chemotactic effect mainly involved  $G_{13}$  and ROCK and partly required  $G_{i/o}$  and PI3K. In contrast, we observed that homogenous higher UII concentration drastically blocked cell motility of HEK-UT and glioma cells while stimulated glioma cell-matrix adhesion through a UT- $G_{i/o}$  signaling cascade. We provide evidence that homogenous high concentration of UII promoted the formation of actin stress fibers and the maturation of focal adhesions (FA). These data suggest that glioma cells sense and produce UII through expression of its receptor UT, to mediate migration and adhesion of glioma cells, recapitulating a “chemotactic behavior profil” resembling to those of professional chemotactic receptors.

## Materials and methods

### Chemicals

Human UII (hUII; Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val) was purchased from Polypeptide Laboratories (Strasbourg, France). Urantide<sup>TM</sup> (Asp-Pen-Phe-D-Trp-Orn-Tyr-Cys-Val) was found from Peptide International (Louisville, Kentucky, USA). Palosuran (ACT-058362; 1-[2-(4-benzyl-4-hydroxy-piperidin-1-yl)-ethyl]-3-(2-methyl-quinolin-4-yl)-urea sulfate salt) was generously provided by Actelion Pharmaceutical (Allschwill, Suisse). Antibodies directed against the urotensin II receptor named UT, *i.e.* H90 (Flow cytometry, immunohistochemistry) and M250 (Immunocytochemistry), the anti-ERK, anti-pERK, anti-c-Myc, and secondary antibodies HRP-conjugated anti-rabbit, HRP-conjugated anti-mouse, HRP-conjugated anti-goat, FITC-conjugated goat anti-rabbit were purchased from Santa-Cruz (Tebu Bio, Le Perray-en-Yvelines, France). Anti-AKT1 and anti-pAKT1 were obtained from Upstate (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Anti-UII (flow cytometry) was from Phoenix Pharmaceuticals (Strasbourg, France). Anti-vinculin, anti-UII (immunohistochemistry), G<sub>i/o</sub> inhibitory toxin PTX, ROCK inhibitor Y27632, PI3K inhibitor LY294002, poly-L-ornithine, poly-L-lysine, fibronectine, methyl-cellulose, protease and phosphatase inhibitor cocktails, paraformaldehyde (PFA), normal donkey serum (NDS), Mowiol, saponin, propidium iodide (PI), RNase, probenecid, glucose, ATP were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Control or G<sub>13</sub> siRNA (5'GUUCAUGGUAUCGUGCAUGdTdT3') were from Dharmacon (Fisher Scientific, Illkirch, France). Secondary antibodies Alexa 488-conjugated donkey anti-rabbit and Alexa 594-conjugated donkey anti-mouse, 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) pluronic acid were purchased from Invitrogen (Fisher Scientific). R415 rhodamine phalloidin, Cell Tracker Green<sup>TM</sup>, Fluo-4 AM, Fura-2 AM, were from Molecular Probes (Fisher Scientific). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Ham's F-12, Leibovitz's L15, non essential amino acids (NEAA), sodium pyruvate, antibiotic-antimycotic, PBS, HEPES, EDTA, N2

supplement, Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) were obtained from Gibco (Fisher Scientific, Illkirch, France). Fetal Bovine Serum (FBS) was from Lonza (Bâle, Suisse) and bFGF from Eurobio (ABCYS, Les Ulis, France). Bovine Serum Albumin (BSA) was obtained from Roche (Fisher Scientific, Illkirch, France). NP-40 was from Calbiochem (Fisher Scientific, Illkirch, France) and Triton X-100 was from VWR (Fontenay-sous-Bois, France).

### **Plasmid constructs**

For UT epitope-tagged c-myc (UT<sup>c-myc</sup>), the human UT receptor cDNA inserted into pcDNA3.1 (Ressource Center, MI, USA) was amplified and PCR products were subcloned using the EcoRI and XhoI sites of pCMV-c-myc (Table 1). The ERY mutant UT receptor cDNA was constructed by oligonucleotide-directed mutagenesis (QuickChange Site-directed mutagenesis II; Roche) using the human UT receptor cDNA inserted into pcDNA3.1 as a template and two oligonucleotides to introduce three Ala instead of Glu<sup>147</sup>, Arg<sup>148</sup>, Tyr<sup>149</sup> (Table 1). PCR products were subcloned using the EcoRI and XhoI sites of pCMV-c-myc after digestion by the same restriction enzymes. Mutagenesis was confirmed by automated nucleotide sequencing. For UT fusionned with eGFP and eYFP proteins, human UT receptor cDNA inserted into pcDNA3.1 was amplified and PCR products were subcloned using the EcoRI and BamH1 sites of peGFP-N2 generously provided by Dr O. Wurtz (Inserm U982, Rouen, France) and BamH1 and EcoR1 site of peYFP-N1 (Table 1). G<sub>αi</sub> fusionned to RLuc and G<sub>γ</sub> fusionned with eYFP was constructed as previously described (32) and G<sub>α13</sub>-RLucII and UT-eGFP2 were prepared as described (33).

cDNA	Subcloning	Primers	Enzymes
UT <sup>c-myc</sup>	pCMV-c-myc	Forward: ATGCGAATTCGGATGGCGCTGACCCCGAGT Reverse: AAACCTCGAGTCACGCCGGGGCCCTGGG	EcoR1/XhoI
UT <sup>eGFP</sup>	peGFP-N2	Forward: ATCGGAATTCATGGCGCTGACCCCGAGTC Reverse: ATCGGGATCCCCGCCGGGGCCCTGGGA	EcoR1/BamH1
UT <sup>eYFP</sup>	peYFP-N1	Forward: ACTGGGATCCAACGCCGGGGCCCTGGGACCCTCGGG Reverse: ATGCGAATTCGGATGGCGCTGACCCCGAGT	BamH1/EcoR1
UT <sup>ERY(AAA)<sup>c-myc</sup></sup>	Mutagenesis	Forward: ACCGTCATGAGCAGCGCGGCCCGCTGCGGTGCTGCGG Reverse: CCGCAGCACCGCAGCGCGGCCCGCTGCTCATGACGGT	

## Transfections

Plasmid DNAs transient transfections were performed using Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) or FuGene 6 (Promega) following the manufacturer's protocol. Control or G<sub>13</sub> siRNA were transfected into SW1088 cells using X-tremGENE siRNA transfection reagent (Roche) following the manufacturer's protocol.

## Cell culture

The glioma cell lines SW1088 [astrocytoma, World Health Organization (WHO) grade III], U87 (multiform glioblastoma, WHO grade IV), U118 (glioblastoma, WHO grade IV) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC). The glioma cell lines 8MG, 42MG [multiform glioblastoma, (34)] and GL15 [glioblastoma, (35)] were generously provided by Pr. J. Honnorat (CRNL, Lyon, France). SW1783 cell line (astrocytoma, WHO grade III, ATCC) was generously given by Pr. L'Houcine Ouafick (APHM, Marseille, France) and the HEK-293 cell line (CRL1573™, ATCC) was generously provided by Dr. L. Prézeau, C. Barrère and I. Bidaud (IGF, Montpellier, France). U87, 8MG, 42MG, GL15 and HEK-293 cells were cultured in DMEM, U118 cells were cultured in Ham's F-12, SW1088 and SW1783 cells were maintained in Leibovitz's L15, all containing 2 mM NEAA, 2 mM sodium pyruvate, 1% antibiotic-antimycotic and 10% FBS at 37°C in a humidified incubator (5% CO<sub>2</sub> for all cell lines excepted SW1088 and SW1783).

### **Tumor explant culture**

Tumor tissue specimens were obtained from the biobank of the anatomocytopathology service of the Rouen CHU hospital (Pr A. Laquerrière) and correspond to glioblastoma resected in the Neurosurgery department at Rouen CHU (Pr F. Proust) after informed consent. Selected patients in the center are systematically clinically followed with collection of clinical and biological data. The material was analyzed within the tumor pathology department for diagnosis. Fragments of fresh tissue were sent to the immediate postoperative laboratory to prepare explants or dissociation of glioma cells. All specimens obtained from patients undergoing open surgical resection for a brain tumor were collected in DMEM medium containing 0.5% FBS, 1% antibiotic-antimycotic and 2 mM sodium pyruvate, but only glioblastoma (WHO grade IV) diagnosed resections were used for data analysis. Blood vessels surrounding tumor resections were removed mechanically and tissue fragments were cut into pieces of 0.5-2 mm<sup>3</sup>. Tumor explants were placed on poly-L-lysine-coated glass coverlips (12 mm round, CML, Nemours, France) in 24-well plate (Corning, Fisher Scientific, Illkirch, France), and were incubated 1h in 100 µL DMEM/Ham's F12 (3/1, v/v) medium completed with N2 supplement (1X final concentration), bFGF (10 ng/mL final concentration), 0.4% Methyl-cellulose and 1% antibiotic-antimycotic. Tumor explants were allowed to attach to the substrate, and then 200 µL of additional culture medium was added. Cultures were maintained for 2-4 days before being used in experiments.

### **Immunohistochemistry on patient-derived tissue sections**

Consecutive human tumor tissue sections (5 µm) obtained from the biobank of the anatomocytopathology service of the Rouen University Hospital (Pr A. Laquerrière) were deparaffinized in xylene and rehydrated in descending alcohols. Heat-mediated antigen retrieval was performed in a sodium citrate buffer [10 mM (pH 6), 95°C, 20 min]. Endogenous peroxidase was blocked with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS [10 mM Tris (pH 8), 0.15 M

NaCl] and nonspecific binding sites were blocked with a serum albumin solution (1%, 2h) supplemented with 10% normal goat serum. Primary antibodies were incubated at 1:50 (anti-UT) or at 1:25 (anti-UII) in the buffer [0.1 M Tris (pH 7.5), 0.15 M NaCl, 1% BSA] overnight at 4°C. Immunoreactive complexes were detected using the corresponding secondary HRP-conjugated antibody and visualized by 3,3'-diaminobenzidine supplied by DAKO (Les Ulis, France). Slides were then counterstained with hematoxylin, dehydrated through a series of alcohols and xylene, and coverslipped in Eukitt (Dutcher, Brumath, France). Control sections were incubated in the absence of primary antibodies.

### **Western blotting**

The cells were rinsed in PBS, scraped in ice-cold Lysis Buffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1X protease and/or phosphatase inhibitor cocktails) and homogenized with 3 passages in a thin syringe needle. Cell lysate was supplemented with 10% of detergent NP-40 (Calbiochem) and incubated (1h, 4°C) under rotation. Cell suspension was centrifuged (12,000 g, 30 min, 4°C), and the protein concentration of the supernatant was determined by the Bradford method. Protein samples were mixed in an equal volume of 2x Laemmli buffer (120 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 0.02% Bromophenol Blue, 10%  $\beta$ -mercaptoethanol) and loaded onto the gel. Protein samples were electrophoresed on 10% SDS-PAGE. Proteins were then transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond C; Amersham Biosciences, Fisher Scientific) using the wet transfer Mini-PROTEAN Tetra Cell system (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France). Membranes were blocked in blocking buffer consisting of 2% nonfat milk or 4% BSA in Tris-buffered saline. Membranes were incubated with primary antibodies overnight at 4°C followed by four washes. Membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibodies (Santa-Cruz) for 2h at RT and washed four times. Immunoreactive bands were visualized by using the ECL Western blotting substrate (Promega, Charbonnières-les-bains, France) and their molecular weights



were determined by using Page Ruler Plus prestained protein ladder (10-250 KDa) markers (Fisher Scientific).

### **Rhotekin pull-down assay for RhoA activation.**

SW1088 cells were seeded on fibronectin precoated flask (75 cm<sup>2</sup>). Since they reach 70% confluence, cells were rinsed, serum-starved for 12h and treated (control, UII 10<sup>-8</sup> M, SBF 10%) during 30 min. Cells were then washed and scraped in ice-cold Lysis Buffer. Rhotekin pull-down assay was performed on cell lysate using the Active Rho Pull-Down and Detection Kit from Pierce (Fisher Scientific) according to the supplier instructions. Final samples were analyzed by Western blot as described before.

### **Immunocytochemistry**

SW1088 and U87 cells were seeded on fibronectin pre-coated glass coverslips (12 mm round, CML) and when reaching 70% of confluence, they were fixed in PFA (4%, 10 min). After rinsing, cells were permeabilized with Triton X-100 (0.05%, 5 min) in PBS and then blocked with NDS (2%, 1h). Primary antibodies directed against human UT (0.5 µg/mL, Santa Cruz) or Human vinculin (0.5 µg/mL, Sigma-Aldrich) in PBS with 0.5% NDS and 0.1% BSA was incubated at 4°C overnight. Then, cells were rinsed with PBS and incubated in the presence of secondary antibodies Alexa 488- or 594-conjugated donkey anti-rabbit or donkey anti-mouse (1/200, Invitrogen) in PBS with 0.5% NDS and 0.1% BSA (RT, 2h). For F-actin staining, cells were incubated with R415 rhodamin phalloidin (Molecular Probes, 110 nM, 20 min), then washed with PBS, incubated with DAPI (Invitrogen, 1 µg/mL, 10 min), and washed twice more with PBS. Coverslips were then mounted on glass slides with Mowiol (Sigma-Aldrich) and imaged by confocal microscopy. The preparations were examined on a Leica TCS SP5 confocal laser scanning microscope (DMI 6000) equipped with Acousto-Optical Beam Splitter (AOBS) system and white laser for excitation flexibility. Alexa 488, Alexa 594,

eGFP and rhodamine optimum excitation wavelength values were determined by Lambda scanning and used for confocal images acquisition.

Quantification and analysis of stress fibers were performed using ImageJ (NIH, MA, USA) software from multichannel images obtained using the 63x objective of Leica TCS SP5 confocal. The cell perimeter was marked as the region of interest and the integrated densities per area was calculated from the appropriate channel (red for actin stress fibers or green for UT<sup>eGFP</sup>). For adhesion analysis, the cell perimeter was marked as the region of interest and the integrated densities per area was calculated for UT<sup>eGFP</sup> expression (green) and the number and the size of adhesion points were calculated using particle analysis plug-in after successive image treatment by ImageJ software.

## **Flow Cytometry**

*Immuno-characterization of the wrotensin system.* Glioma cells grown in 75 cm<sup>2</sup> flasks until confluence were washed in PBS, detached and spun down. The cell pellet was washed, re-suspended in PBS containing 1% BSA and incubated with 10 µg/mL non-immune rabbit IgGs for 30 min. For total receptor detection, cells were permeabilized in PBS containing 1% BSA and 0.1% saponin (Sigma-Aldrich) for 30 min. Then, cells were incubated with antibodies directed against rabbit anti-UT (2 µg/mL, Santa Cruz) or anti-UII (10 µg/mL, Phoenix Pharmaceuticals), diluted in PBS containing 1% BSA and 0.1% saponin at RT for 30 min. In negative controls, the primary antibodies were omitted. Cells were incubated with an FITC-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Santa Cruz) diluted 1/200 and measured in the FL1 (530 nm) channel. Cells were analyzed on a FACScalibur flow cytometer (Beckton Dickinson Biosciences, Le Pont-De-Claix, France) operated with the CellQuest software. Samples in which the primary antibodies were omitted were used as control to normalize mean fluorescence levels. Dead cells and debris were excluded from the analysis by gating living glioma cells from size/structure density plots. Data were displayed on a logarithmic

scale in arbitrary units corresponding to the mean fluorescence intensity. Each histogram plot was recorded from at least 10,000 gated events.

*Cell cycle analysis.* U87 and SW1088 plated in 75 cm<sup>2</sup> flasks were serum starved for 24h and then incubated in the absence or the presence of UII for 24h. Cell cycle analysis was done by DNA staining with PI by flow cytometry. Briefly, after treatment, cells were trypsinized, harvested in PBS, and fixed in ice cold 70% ethanol for 15 (SW1088) to 30 min (U87). Staining was done with 0.6 mg/ml RNase (RT, 30 min) and 50 µg/mL PI (RT, 30 min). Cell cycle status was quantified by FACScalibur flow cytometer using CellQuest analysis software.

### **Counting/Proliferation assay**

Cells were grown in the complete culture medium supplemented with 10% FBS. For experiments, they were serum starved for 24h, then incubated in the absence or the presence of UII or 1% FBS for 48h in the same complete medium. Cells were rinsed in PBS (37°C), detached with accutase (Millipore) and cell number was quantified by counting events with an electronic cell counter (Z2, Beckman Coulter, Roissy CDG, France).

### **Calcium measurement**

For Ca<sup>2+</sup> microfluorimetry on dissociated cells, cells were plated into 96-well plates (Costar, Fisher Scientific, clear bottom/black side) in complete medium supplemented with 10% FBS at 10,000, 20,000 and 50,000 cells/well for SW1088, U87 and HEK-293 cells respectively. After 12h in culture, cells were transfected with pCMV-c-myc or UT<sup>c-myc</sup> construct. Two days later, they were rinsed twice with a modified HBSS containing 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 3 mM glucose and 2.5 mM probenidol (pH 7.4), and incubated with 40 µL of 2 µM Fluo-4 AM or Fura-2 AM dyes (Molecular Probes) containing 20% pluronic acid for 1h in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. After rinsing with

modified HBSS, the effects of ATP 0.1  $\mu\text{M}$  or graded concentrations of UII on  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  were measured with a fluorimetric imaging plate reader FlexStation III (Molecular Devices, Wokingham, England) using the SoftMaxPro 5 software.

For  $\text{Ca}^{2+}$  microfluorimetry on fresh glioma explants, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  was measured (fluorescence at 510 nm following excitation at 340/380 nm from a 300 W xenon lamp) from a single visual field using an integrating CCD (charge-coupled device) camera coupled to a Leica DMLFSA microscope. Cell  $\text{Ca}^{2+}$  imaging and fluorescence quantification were carried out using the Metafluor Imaging System (Molecular Devices).

### **G protein coupling and cAMP/IP-1 metabolism**

The ability of receptor to activate  $G_i$  and  $G_{13}$  proteins was controlled by measuring bioluminescence resonance energy transfer (BRET) between G-protein subunits. Thus, we used  $G_\alpha$ -Rluc (Renilla reniformis luciferase) fusion proteins, with Rluc fused to the G protein  $\alpha$  subunit of  $G_i$  or  $G_{13}$  and the Venus-tagged  $G_\gamma$  subunits. 48h after transfection, HEK-293 cells were washed with PBS, and coelenterazine h substrate (Promega) was added at a final concentration of 5  $\mu\text{M}$  in the total volume of 50  $\mu\text{l}$ /well at 37°C. BRET readings were then performed immediately after the addition of UII using the Mithras LB 940 plate reader (Berthold Biotechnologies, Bad Wildbad, Germany) that allows the sequential integration of light signals detected with two filter settings (Rluc filter, 485  $\pm$  20 nm; and YFP filter, 530  $\pm$  25 nm). Data were collected using the MicroWin2000 software (Berthold Biotechnologies) and BRET signal was expressed in milliBRET units of BRET ratio.

The determination of the inositol phosphate 1 (IP1) accumulation in HEK-293 cells was performed in 96-wells microplates using the IP-One HTRF® assay (Cisbio Bioassays, Codolet, France). In brief, cells were stimulated for 30 min at 37°C with UII in the stimulation buffer (10 mM HEPES, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 4.2 mM KCl, 146 mM NaCl, 5.5 mM glucose, and 50 mM LiCl, pH 7.4). The reaction was stopped by 50 mM

phosphate buffer, pH 7, 1 M KF, and 1% Triton X-100 containing homogeneous time resolved fluorescence (HTRF) assay reagents: the Europium Cryptate-labeled anti-IP1 antibody and d2-labeled IP1. The assay was incubated 1h at RT, and time-resolved fluorescence resonance energy transfer (FRET) signals were measured 50  $\mu$ s after excitation at 620 and 665 nm using a RubyStar instrument (BMG labtech, Champigny-sur-Marne, France).

### **Migration assay**

Transwell filters (24 wells, Corning, Fisher Scientific) with 8  $\mu$ m pores were coated with 25  $\mu$ g/mL fibronectin (4°C, 12h). The following day, cells non expressing receptor, or expressing UT or UT<sub>ERY(AAA)</sub> mutant were detached from culture flask using accutase, pelleted, and resuspended in medium without SBF. For G<sub>13</sub> silencing experiments, cells were transfected with control siRNA or G<sub>13</sub> siRNA 48h before experiments. For experiments including inhibitors, cells were preincubated with the specific inhibitors of G<sub>i/o</sub> (PTX, 0.2  $\mu$ g/mL, 6h), ROCK (Y27632, 10<sup>-5</sup>M, 6h) or PI3K (LY294002, 10<sup>-5</sup>M, 6h) prior to the experiment. Cells (50,000/125  $\mu$ L/filter) were added onto the upper chamber of the Transwell in the absence or the presence of compounds. The gradient was generated by the lower chamber filled with 600  $\mu$ L of medium containing UII or tested compounds. The cells were incubated for 24h (37°C), rinsed with PBS and cells on the upper surface of the filter were removed using a cotton-swab. Migrating cells were fixed, stained with eosine/hematoxilin and filters were mounted on glass slides with Mowiol and randomly microphotographed with a Nikon microscope (Champigny-sur-Marne, France, 10 fields/filter). Cells on the microphotography were counted by using “Cell counter” plug-in on ImageJ software.

### **Motility assay**

Glioma Cells (10,000/well) were plated into fibronectin-coated (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 12-well plate in medium supplemented with FBS. After 12h of incubation (37°C), cells were rinsed with fresh medium and incubated in the absence or the presence of UII. Images were collected every 5 min for 12h on a videomicroscope Leica (DM IRE2) with a 10x objective equipped with a CO<sub>2</sub>- and temperature-controlled chamber. Data were analyzed for cell migration with cell tracking plug-in of the Metamorph software.

### **Adhesion assay**

96-well plates (Costar, clear bottom/black side) were coated with 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fibronectin (4°C, 12h). SW1088 cells, HEK-293 expressing UT<sup>c-myc</sup> or UT<sub>ERY(AAA)</sub><sup>c-myc</sup> (preincubated 30 min with Cell Tracker Green<sup>TM</sup>) or HEK-293 expressing UT<sup>eYFP</sup> were detached with EDTA (1 mM), pelleted, and resuspended in medium without FBS in the absence or the presence of UII, signaling pathways inhibitors and/or UT antagonists (37°C, 30 min). Cells were plated at 25,000 cells/well (SW1088) or 50,000 cells/well (HEK-293) and after 15 or 30 min, washed twice with PBS, and the adherent cells were measured with a fluorescence plate reader (FL600, Bio-Tek, Colmar, France) at 535 nm.

### **Cell-based ELISA**

Plasmid construct expression was assessed by cell-based ELISA 48h post-transfection of HEK-293 cells with cDNA encoding UT<sup>c-myc</sup> or UT<sub>ERY(AAA)</sub><sup>c-myc</sup> mutant. Cells were plated at 50,000 cells/well in 96-well plates (white, Corning) coated with 0.1 mg/mL poly-L-ornithine. Cells were fixed with 4% PFA in PBS for 5 min at RT, washed in PBS, and then permeabilized in 0.05% Triton X-100 (only for permeabilized cells) and non specific binding was blocked with PBS containing 1% FBS for 30 min at RT. The first mouse anti-c-myc monoclonal antibody (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Santa-Cruz) was added for 1h at RT. Incubation with goat

anti-mouse (Santa Cruz) conjugated alkaline phosphatase diluted at 1/1,000 in PBS/FBS was carried out for 30 min at RT. The cells were washed four times with PBS, a colorimetric alkaline phosphatase substrate was added (SuperSignal ELISA, Fisher Scientific) and the resulting color reaction was measured using a luminometer (Fisher Scientific). Background absorbance from samples not transfected or transfected with empty vector was systematically measured.

Phosphospecific cell-based ELISA was performed as previously described with minor modifications (36). Briefly, cells were plated at 25,000 (SW1088) or 50,000 cells/well (U87 and HEK-293) in 96 wells fibronectin-coated plates (white, Corning). The cells were serum-starved for 4h and stimulated for 0 to 30 min with UII  $10^{-8}$  M [FBS or epidermal growth factor (EGF) were used as positive control]. After stimulation, cells were fixed with 4% PFA in PBS (5 min at RT), washed (PBS 1X, Triton X-100 0.1%) and endogenous peroxidase was quenched with 0.6 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS/Triton for 20 min. Non specific binding sites were blocked (PBS 1X, FBS 10%, 1h, RT) and primary antibodies (anti-ERK, anti p-ERK, anti-AKT, anti p-AKT, 0,5 µg/mL each) were incubated overnight at 4°C. Incubation with secondary antibodies conjugated alkaline phosphatase diluted at 1/1,000 in PBS/Triton/BSA 5% was carried out for 1h at RT. The cells were washed three times with PBS/Triton and twice with PBS, a colorimetric alkaline phosphatase substrate was added (SuperSignal ELISA, Fisher Scientific) and the resulting color reaction was measured using a luminometer (Fisher Scientific).

### **Cloning ring assay**

50,000 HEK-293 cells were plated in a cloning ring 6 mm diameter (Corning) within a 24-well plate. After 24h seeding, medium was added into the plate and the ring was removed. After 1h, cells were rinsed with fresh medium and compounds were added. Microphotographies of the cell ring were taken at 0h, 24h and 48h by using a Macroscope

Leica (Z6 APO) and the migration was quantified by subtracting the area corresponding to the initial cellular edge at 0h from that of the edge of the migrating cells after 24h or 48h treatment by using ImageJ software.

### **Statistical analysis**

All statistical analyses were conducted using the GraphPad Prism 5.00 software (GraphPad Software). Data were expressed as mean values  $\pm$  SEM of three or more separate experiments. Among the experiments, data were analyzed with different statistical tests, *i.e.* Mann and Whitney test, unpaired t-test for dual comparisons. Multiple comparisons were performed using One way analysis of variance followed by Bonferonni post hoc test or Kruskal-Wallis followed by Dunns post hoc test.  $P < 0.05$  was taken as significance.



## Results

### **Expression of urotensin II and its receptor in glioma cell lines and patient biopsies of glioblastoma**

Previous report raised the possibility that UII might have some regulatory role in tumor development and we have previously characterized the expression of UT in normal rat and human astrocytes (29,31), as well as in glioma cells (26,31). Here, we first confirmed UT expression by flow cytometry, Western blot and immunocytochemistry using a specific anti-UT antibody in various astrocytoma (WHO Grade III, SW1783 and SW1088) and glioblastoma (WHO Grade IV, U87, 8MG, 42MG and GL15) cell lines but also in fresh glioblastoma explants from patient biopsies (Fig. 1). UT expression appeared maintained in human glioma cell lines (Fig. 1A) with different levels of immunoreactivity. In addition, UII was also present in glioblastoma (8MG and GL15) and in astrocytoma (SW1088) (Fig. 1A) suggesting an auto/paracrine mechanism in these cells. We also confirmed UT protein expression by Western blot analysis in glioma cell total protein preparations, showing a characteristic major band around 47 kDa (Fig. 1B). The stained UT receptor in glioma appeared faint at the plasma membrane but more diffuse in the cytoplasm as punctiform green fluorescence (Digitally zoomed image, Fig. 1C) and positive immunostaining for UT was detected in 8 different resected glioblastoma in cytoplasm of many tumor cells and in cells emerging from explants (stack, at 114  $\mu\text{m}$  from the surface). Importantly, we found highest levels of UT immunoreactivity in vascular and perivascular regions as shown in a representative stack corresponding to 47  $\mu\text{m}$  deep from the surface of the explant (Fig. 1D). Finally, to evaluate the potential role of UII and UT in high grade human glioma, human glioblastoma-derived consecutive tissue sections were stained for UII and UT, and strong immunoreactivity was systematically detected in perivascular regions (Fig. 1E). In these areas, UII and UT were colocalized in some cells around vessels (arrowhead) and UT

appeared systematically expressed in the endothelium of neo-vascularization lining the lumen of the vessel (arrow).

### **Deficient UT coupling to proliferation and $\text{Ca}^{2+}/\text{IP}_3$ signaling in glioma**

It has been previously shown that neurovascular ligands may induce glioma proliferation and also increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . Among vasoactive peptides, UII was reported to promote proliferation/cell survival of native cells (20) or cell lines expressing UT (37) and is classically recognized as a key activator of the  $\text{UT}/\text{Ca}^{2+}/\text{IP}_3$  and/or voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel signaling cascade in various cell types including UT recombinant cell lines (17,38) and normal astrocytes (29,30). Thus, to definitely establish whether UII can regulate proliferation, cell counting was performed on HEK transfected with cDNAs encoding human  $\text{UT}^{\text{c-myc}}$  (HEK-UT) or on glioma cells. UII displayed no significant effect on the HEK-UT as well as SW1088 and U87 cells counting after 24h treatment with UII ( $10^{-10}$  and  $10^{-8}$  M) whereas FBS (1%) significantly ( $P < 0.05$ ) stimulated or favored cell survival/proliferation (Fig. 2A). In order to verify the potential UT associated Ras-dependent signaling cascade, UII was tested on ERK1/2 and AKT phosphorylation in HEK-UT and glioma. Early rapid activation of ERK1/2 was observed at 5 min, peaking at 15 min (ratio 2.18,  $p < 0.001$ ) followed by a slow decrease at 30 min in HEK-UT (Fig. 2B, upper) whereas no significant ERK1/2 phosphorylation was detected in SW1088 (Fig. 2C). However, no significant phosphorylation of AKT was detected in both cell systems (Fig. 2B and C), assessing that the Ras/ERK and PI3K/AKT pathways are not recruited by UT in glioma cells. Then, glioma cell cycle distribution was also examined *via* flow cytometry with PI, in the absence or the presence of UII ( $10^{-7}$  M) (Fig. 2D). As illustrated in the example of Figure 2D, G1, S and G2/M phases were not modified in the presence of UII, indicating that UT did not control cell cycle in glioma cells and failed to regulate cell proliferation.

Then, we assessed the classical UT-Ca<sup>2+</sup> coupling (Fluo-4 AM Ca<sup>2+</sup> probe) as well as the polyphosphoinositide metabolism *via* measurement of IP1 produced (as a decrease of the FRET-HTRF signaling of the complex IP1-Ac, see Materials and Methods) in HEK-UT. UII evoked a concentration-dependent increase of the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> reaching 246.1 ± 11.3% of control at 10<sup>-7</sup> M (P<0.01). As positive control, ATP (10<sup>-4</sup> M) induced a large Ca<sup>2+</sup> rise in HEK and HEK-UT (peak 611 ± 41.8%, Fig. 3A, upper). Accordingly, the production of the metabolite IP1 resulting from the production of IP<sub>3</sub> was stimulated in HEK-UT by increasing concentration of UII yielding an EC<sub>50</sub> value of 8.9x10<sup>-10</sup> M (Fig. 3A, bottom). Surprisingly, UII (10<sup>-12</sup> to 10<sup>-7</sup> M) failed to cause a Ca<sup>2+</sup> rise in ATP-responding glioma cells. To test whether this absence of effect is attributed to a low UT expression level or rather a loss of specific coupling to the Ca<sup>2+</sup>/IP<sub>3</sub> pathway, we transfected glioma cells with cDNA encoding human UT<sup>c-myc</sup> (31). Again, we observed that UT overexpression did not recruit a Ca<sup>2+</sup> signaling pathway (Fig. 3B). Thus, we verify this uncoupling in fresh glioblastoma explants loaded with the ratiometric Ca<sup>2+</sup> dye Fura-2 AM, and imaged over 30 min by using a digital imaging system (Metafluor, Leica). Application of UII (10<sup>-8</sup> M) during 2 min 30 sec failed to evoke a Ca<sup>2+</sup> response whereas perfusion of ATP (10<sup>-4</sup> M, 50 sec) resulted in rapid, transient and synchronized increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> in a majority of glioblastoma cells (Fig. 3C). These data strongly suggest that the urotensinergic system expressed in high grade glioma did not recruit Ca<sup>2+</sup> events and remained inefficient on cell cycle and proliferation.

### **Gradient concentration of UII mediated chemotaxis *via* UT/G<sub>13</sub>/Rho/ROCK pathway in glioma**

Thus, as UII may also be considered as a chemoattractant towards human monocytes (14) or rat fibroblasts (21), we investigated motility and migration properties of UT expressing cells, HEK transiently transfected with UT<sup>c-myc</sup> cDNA (Fig. 4A) and glioma cells expressing UT (Fig. 4B). These cells were seeded in the upper chamber of transwells and allowed to migrate

during 24h in the absence or the presence of UII (bottom chamber). Gradient of UII concentration induced a significant migration of HEK-UT ( $P < 0.01$ ) and SW1088 ( $p < 0.001$ ) or U87 ( $P < 0.001$ ) compared with HEK-pCMV<sup>c-myc</sup> and control (untreated) groups (Fig. 4A and B). In SW1088, UII provoked a concentration-dependent increase in migration from  $10^{-13}$  M ( $P < 0.05$ ) to  $10^{-7}$  M, with a maximum response at  $10^{-9}$  M yielding  $209 \pm 17.53\%$  stimulation (Fig. 4B) also observed in U87 (Fig. S1A). In addition, results from the *in vitro* wound healing assay demonstrated that U87 treated with UII ( $10^{-10}$  and  $10^{-8}$  M) migrated into the scratched area more rapidly than control (SBF) and quantification revealed 62.63% (UII,  $10^{-10}$  M) and 69.48% (UII,  $10^{-8}$  M) versus 46.35% (control) of cells invading the lesioned area after 16h following scratch injury (Fig. S1B). The rapid development in recent years of several UT antagonists has led to the synthesis of urantide [Pen5, DTrp7, Orn8]U<sup>II</sup><sub>4-11</sub> which has been previously characterized as a potent UT antagonist in rat isolated aorta (39) and palosuran, with one such high affinity towards human UT (31,40). Thus, the specific rat UT antagonist urantide ( $10^{-5}$  M), and the specific primate UT antagonist palosuran ( $10^{-5}$  M) were incubated in the lower and upper chambers of the transwell (Fig. 4C). In these conditions, they did not modify basal SW1088 migration but totally counteracted glioma cell directional migration induced by a UII gradient concentration (lower chamber), validating the implication of the UT receptor in UII chemotactic behavior.

Although UII primarily stimulates  $G_{\alpha q/11}$ , UT is also known to couple  $G_{\alpha i}$  in native and recombinant systems (30). In various cell types, chemotaxis mediated by GPCRs and tyrosine kinase receptors (RTKs) is dependent on the Rho kinase and/or the PI3K pathways and may also involve  $G_{\alpha 12/13}$  proteins.

Thus, we examined whether inhibition (pre-incubation 6h) of  $G_{i/o}$  with PTX (0.2  $\mu\text{g/ml}$ ), Rho/ROCK by Y27632 ( $10^{-5}$ ) and PI3K by LY294002 ( $10^{-5}$ ) may affect constitutive glioma cell migration and interfere with the effect of UII. As shown in Figure 4D, inhibition of  $G_{i/o}$  and PI3K only reduced SW1088 migration by 24.6% and 38.2%, respectively whereas

Rho/ROCK blockade totally abolished cell migration (Fig. 4D). Thus, we confirmed that the treatment of HEK expressing UT allowed a UII concentration-dependent decrease of BRET signals between  $G_{\alpha i}$ -Rluc and  $G\gamma$ -eYFP, yielding an  $EC_{50}$  value of  $2.57 \times 10^{-9}$  M (Fig. 4E, left). Since PTX treatment had little effect on UII-induced cell migration of SW1088, it raised the possibility that G proteins in addition to, or other than  $G_{\alpha i}$ , may participate in the biological responses mediated by UT. Indeed,  $G_{\alpha 12}$  and  $G_{\alpha 13}$  and the  $G_{\alpha q}$  family of G protein  $\alpha$  subunits can activate RhoA (41). We focused on  $G_{\alpha 13}$  and used BRET to determine whether UT can interact directly with this G protein  $\alpha$  subunit (Fig. 4E, right). Indeed, BRET signal of the interaction between  $G_{\alpha 13}$ -RlucII and UT-eGFP2 showed UT- $G_{\alpha 13}$  interaction. UII ( $10^{-11}$ - $10^{-5}$  M) significantly decreased UT- $G_{\alpha 13}$  BRET, indicating that receptor activation results in a conformational reorganization of the receptor-G protein complex [Fig. 4E, (33)] at least in recombinant cells.

To better understand how a UT/G protein coupling may be involved in cell migration, we concomitantly mutated the residues to alanine (E147<sup>3.49</sup>A, R148<sup>3.50</sup>A and Y149<sup>3.51</sup>A) indexed according to the Ballesteros nomenclature (42). To evaluate the expression of the mutant  $UT_{ERY(AAA)}^{c-myc}$ , HEK cells were transiently transfected with cDNAs encoding pCMV<sup>c-myc</sup>, UT<sup>c-myc</sup> or the  $UT_{ERY(AAA)}^{c-myc}$ , and cell lysates were analyzed by Western blot. A doublet of immunoreactive band was detected at 40 and 56 kDa for both the wild type and mutant receptor (Fig. S2A). ELISA analysis confirmed that the  $UT_{ERY(AAA)}^{c-myc}$  mutant was expressed at similar levels to that of wild type at the plasma membrane (Fig. S2B) but that it failed to stimulate a  $[Ca^{2+}]_c$  response (Fig. S2C). As shown in Figure 4F, UII ( $10^{-8}$  M) caused a significant stimulation of HEK cell migration when expressing wild type UT, but had no impact of those expressing the mutant  $UT_{ERY(AAA)}^{c-myc}$  (Fig. 4F). Finally, we showed that down-regulation of  $G_{\alpha 13}$  through a specific siRNA, totally abolished the UII-induced directional migration of SW1088 (Fig. 4G).

As Rho/ROCK pathway constitutes a well-known downstream effector of  $G_{\alpha 13}$ , we next investigated whether among the Rho family GTPases, Rho was activated by UII in SW1088. Incubation of the peptide ( $10^{-8}$  M) during 30 min stimulated a rapid increase in the fraction of Rho in the active guanosine triphosphate (GTP)-bound state suggesting that in glioma cells, the Rho pathway is one of the preferred UT-associated signaling pathway at the expense of the ERK1/2/AKT proliferative/survival pathways. Together these observation demonstrate for the first time that UII behaves as a chemokine initiating directional cell migration through UT/ $G_{13}$ /Rho/ROCK signaling cascade, and partially involving a  $G_{i/o}$ /PI3K component. This mechanism may rely on brain parenchyma invasion during glioma development, when cells migrated and adhered within specific niches.

### **Homogenous concentration of UII regulates motility and adhesion through a $G_{i/o}$ protein**

In order to understand whether UII exerts a kinetic influence on the rate of glioma movement and controls cell adhesion, we next measured cell motility in wells coated with fibronectin as used in the migration assay in the presence of an homogenous concentration of UII. Time-lapse phase contrast movies made to track the movement of individual SW1088 cell moving with no interaction with neighboring cells, showed that the mean covered distance was significantly higher and not directional in low homogenous concentration (UII  $10^{-10}$  M, 12h,  $P < 0.01$ , Fig. 5A). In contrast, this total distance was reduced in increased homogenous concentration (UII  $10^{-8}$  M, 12h,  $P < 0.05$ ) with a loss of displacement efficiency and a path less straight than in untreated condition (Fig. 5A). The capacity of UII to diminish cell motility in the presence of a homogenous concentration rather than a directional gradient, led us to verify how disruption of the UII gradient affects directional cell migration. Then, addition of UII ( $10^{-9}$  M) to the bottom compartment of the migration chamber, produced a significant increase of the number of SW1088 cells migrated across the membrane relative to control ( $P < 0.01$ , Fig. 5B). In contrast, when UII was added to the top (homogenous concentration) or to both

top and bottom compartments, migration was not significantly different from control (Fig. 5B), suggesting a reduction of cell motility and promotion of adhesion processes.

Since migration requires the formation of transient adhesive contacts with the extracellular matrix, we next investigated adhesion of HEK-UT<sup>eYFP</sup> and SW1088 loaded with Cell Tracker Green<sup>TM</sup>, on fibronectin after 30 min treatment. Homogenous concentration of UII  $10^{-10}$  M (HEK-UT, 159.5%,  $P < 0.05$ ; SW1088, 119.7%,  $P < 0.05$ ) and  $10^{-8}$  M (HEK-UT, 134.2%,  $P < 0.05$ ; SW1088, 116.5%,  $P < 0.01$ ; Fig. 5C) significantly increased cell adhesion. As an additional independent confirmation of adhesion, HEK-UT<sup>c-myc</sup> motility was also analyzed using a spheroid radial migration assay. Cells grew as spheroids on adherent surface (fibronectin) in cloning ring and adhered during 24h. Then, rings were removed and cells were allowed to migrate during 48h. In the presence of an homogenous concentration of UII ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  M), cells migrated distances two-fold less than parental cells away from the initial spheroids in a radial pattern (Fig. S4A). The migration of cells from HEK-UT<sup>eYFP</sup> spheroids was more compact and less efficient as observed on the gallery (Fig. S4B) and video (Video S1), displaying reduced distances from origin (Fig. S4B). These data indicate that homogenous concentration of UII inhibited motility by reinforcing cell-matrix adhesion, and cell-cell contacts.

In order to verify the specific role of UT in the UII-evoked adhesion properties, SW1088 were pre-incubated 30 min before the adhesion test with the rat UT antagonist urantide ( $10^{-5}$  M), and the primate UT antagonist palosuran ( $10^{-5}$  M). Neither antagonist altered basal SW1088 adhesive properties whereas they totally inhibited the effect of UII ( $10^{-8}$  M) on glioma cell adhesion (Fig. 5D). To address the role of  $G_{i/o}$ , SW1088 cells were then assayed for their adhesive response to UII ( $10^{-8}$  M) in the presence of the  $G_{i/o}$  blocker PTX, the Rho and the PI3K inhibitors Y27632 and LY294002, respectively (Fig. 5E). The Rho inhibitor showed no significant impairment of adhesion to UII whereas  $G_{i/o}$  blocker PTX completely abolished and the PI3K inhibitor partially reduced of 45.2% the UII-mediated cell adhesion

(Fig. 5E). Furthermore, HEK expressing the mutant UT<sub>ERY(AAA)</sub><sup>c-myc</sup> did not exhibit adherent properties when activated by UII (Fig. 5F). Thus, these data are consistent with a requirement of a main UT-G<sub>i/o</sub> protein coupling to recruit signaling components involved in glioma cell adhesion in the presence of homogenous concentrations of UII.

### **Homogenous concentration of UII regulates actin cytoskeleton and focal adhesion in glioma**

The appearance of actin stress fibers is a hallmark feature attributed to the activation of small GTPase Rho A-C (43) and ROCK1/2 (44) through a PI3K signaling cascade (45). During cell migration, transient adhesive contacts occur at the leading edge of lamellipodia where integrins recruit proteins such as vinculin to form immature adhesive contacts called focal complexes and the transition to FA is marked by consolidation of the contacts and an increase in size (46). Thus, to evaluate the consequence of homogenous exposure of native SW1088 and/or SW1088 transfected with cDNAs encoding UT<sup>eGFP</sup> to UII at low and high concentrations, we initially measured actin cytoskeleton organization. Microscopic evaluation of F-actin staining (rhodamine phalloidin) revealed that non treated cells displayed disorganized cortical F-actin stress fibers whereas UT labeling showed mainly dotted cytoplasmic staining with rare colocalization with phalloidin (Fig. 6A). Low UII concentration ( $10^{-11}$  M, 1h) did not drastically modify the F-actin phenotype whereas higher UII concentrations ( $10^{-10}$  and  $10^{-8}$  M, 1h) produced a switch to structured actin composed of stress fibers traversing the cell, and yielding very intense phalloidin labeling in normal and UT<sup>eGFP</sup> overexpressing cells (Fig. 6A, B). Indeed, a significant positive correlation between phalloidin-rhodamine and UT<sup>eGFP</sup> intensities was obtained after 1h incubation with UII  $10^{-10}$  M ( $r=0.35$ ,  $P<0.0001$ ) and  $10^{-8}$  M ( $r=0.68$ ,  $P<0.0001$ ) (Fig 6C). In addition, enhanced numbers of lamellipodia per cells were found and UT<sup>eGFP</sup> exhibited a plasma membrane localization, at sites of lamellipodia (Fig. S3).



It was previously proposed that Rho-stimulated formation of actin stress fibers is accompanied by a concomitant assembly of FA (43). Thus, to further questioned whether UII-induced actin polymerization is accompanied by changes in the organization of FA components, we determined the subcellular distribution and phenotype of the vinculin staining, a FA marker (Fig. 7A). Thus, the size of FA was markedly and significantly enlarged in SW1088 exposed during 1h with UII  $10^{-8}$  M ( $1.507 \mu\text{m}^2 \pm 0.04$  in control versus  $1.781 \pm 0.02 \mu\text{m}^2$  in UII,  $P < 0.001$ ; Fig. 7D). In SW1088 native and SW1088-UT<sup>eGFP</sup> recombinant cells, we did not observe discernible differences in overall number of FA following UII after only 10 min treatment. However, UII was able to significantly stimulate the number of focal adhesion points/cell area after 1h exposure in SW1088 ( $10^{-10}$  M,  $P < 0.05$ ) and after 10 min in SW1088-overexpressing UT ( $10^{-11}$  M, 172 %,  $P < 0.01$ ;  $10^{-8}$  M 193 %,  $P < 0.001$ ) and 1h ( $10^{-10}$  M, 201 %,  $P < 0.01$ ;  $10^{-8}$  M, 213 %,  $P < 0.001$ ) treatments (Fig. 7B). A positive correlation was observed between the number of FA and the level of UT<sup>eGFP</sup> expression (Fig. 7C) when glioma cells were incubated during 1h with UII ( $10^{-10}$ ,  $r = 0.52$ ,  $P < 0.001$ ;  $10^{-8}$  M,  $r = 0.69$ ,  $P < 0.0001$ ). At higher magnification, it is observed that UT was not colocalized with vinculin but located at the distal tip of FA at the membrane of lamellipodia/filopodia-like structures (Fig. 7D). Then, the high homogenous concentration of UII initiating maturation of FA, would correlate with the restrained HEK-UT and glioma cell motility observed in the presence of the same concentrations of UII.

Together, the present data demonstrate that UII and UT highly expressed in glioma, behave as a chemokine system, initiating chemotaxic migration in the presence of agonist gradient concentrations or strong adhesion in homogenous ligand concentration. These mechanisms involve a UT signaling switch from high affinity  $G_{13}$ /Rho/ROCK and  $G_{i/o}$ /PI3K pathways, to exclusive  $G_{i/o}$ -mediating cascades leading to cell adhesion maturation.

## Discussion

In the CNS, UII mRNA is particularly abundant in motoneurons of the medulla oblongata and spinal cord (15,47) while UT mRNA is widely expressed in various areas including the olfactory system, hippocampus, amygdala, hypothalamus or cerebellum (16). Studies have demonstrated that UT expression may be mainly restricted in astroglial cells *in vivo* (28) and in Rat (29–31,48) and Human cultured astrocytes (31). In the present study, we demonstrated that UII and UT are expressed in several human astrocytoma and glioblastoma cell lines as well as in tumoral glioblastoma explants and glioblastoma tissue sections. The expression of the urotensinergic system has been previously suggested in various cancer cell lines such as pheochromocytoma (49), lung adenocarcinoma (24,25), or rhabdomyosarcoma (50,51), as well as glioma (26) but only sparse studies investigated functioning mechanisms. Here, UT appeared mainly localized in the cytosolic compartment but also in cell nuclei of the astrocytoma SW1088 and glioblastoma U87, as previously suggested (31,52). In patient glioblastoma biopsies, UT is expressed in cell cytoplasm and also at the plasma membrane in various tumor areas including the endothelial compartment, and UII appeared expressed in different or same UT-expressing tumor cells, suggesting autocrine/paracrine loop regulation in glioblastoma.

Until now, the urotensinergic system is widely described in the cardiovascular system and has been reported to exhibit neo-angiogenic properties towards brain microvessels (53) and HUVEC cells (54–56). Such a distribution in both glioma and endothelial cell compartment was previously described for other vasoactive peptide receptors including endothelin-1 (57,58), angiotensin II or adrenomedullin receptors (59), leading to propose that vasoactive peptides in general, and UII in particular show a gliovascular profile critical in glioblastoma development. Interestingly, a similar distribution has also been reported for the professional chemotactic receptor CXCR4 in pseudopalisading glioma cells around areas of necrosis as well as in angiogenic tumor vessels (60). Since we observed that UII is widely found in cells

surrounding neovascularized specific area as well as around necrotic compartments, the secreted neuropeptide may act as an autocrine or paracrine chemokine towards astrotumoral and endothelial cells expressing UT.

To investigate the different signaling cascades associated to the activation of the urotensinergic system, and tested how some of them may control glial tumor brain development, the effects of UII were investigated in astrocytoma SW1088 and glioblastoma U87 as well as in HEK expressing the human recombinant UT. We first demonstrated that UII did not alter proliferation rate and cell cycle of glioma cells. These observations in tumor cells are in agreement with previous data obtained in prostate cancer cell lines showing no effect of UII or the peptide UT antagonist urantide (23), but differ from the effects of other vasoactive peptides such as adrenomedullin stimulating G1/S transit (61) and glioma cell proliferation *in vitro* (62) or endothelin-1 stimulating cell proliferation through activation of MAPK-, PKC-, and PI3K pathways in U373MG cells (63). Even if UII has been shown to induce stimulation of human adrenocortical and renal carcinoma cell number (27), or rat cortical astrocyte counting (30), these last effects could be attributed to survival rather than mitogenic activity. To clarify this question, we thus evaluated the effect of UII on the ERK1/2 component of the Ras-Raf prosurvival/proliferation pathway, and on the AKT component of the PI3K-survival pathway, with the same time course as in other cell lines (64). Preceding reports clearly show that UII activates phosphorylation of ERK1/2 and/or AKT in several cell types (65) and we also confirm here that activation of UT expressed in HEK results in ERK recruitment. However, as already described in a cancer prostate cell line (23), UII failed to activate ERK and AKT transduction cascades in glioma. Then, in regards to the previously described protective role of SDF-1 against apoptosis (66), without affecting proliferation concomitantly to chemoattraction of glioma cells, it is thus considered that UII may present chemokine properties rather than vasoactive peptide properties in glioma cells.

In order to assess whether UT indeed maintains its ability to evoke  $\text{Ca}^{2+}$  events, a coupling previously reported as required element (67,68) in the UII-induced proliferation of rat (69) or human (56) smooth muscle cells,  $\text{Ca}^{2+}$  transients were recorded in glioma. Our study shows that UII failed to evoke  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  increase in glioma explants and in native or UT-transfected glioma cell lines, strongly indicating that UT exhibits a specific preferred signaling cascade independent of the  $\text{Ca}^{2+}/\text{IP}_3$  pathway. This data drastically differs from UT coupling observed in HEK-UT (17,38,70) as well as other cell types endogenously expressing UT including astrocytes (29,30). Similarly, the CXCR4 coupling to calcium described in non tumoral cells (71), could not be detected in human hepatoma (72). The reason underlying the loss of calcium coupling in cancer cells is unclear at present, but it seems that UT, the unique characterized receptor for UII (and URP) until now, exhibit a propensity to loose mitogenic and  $\text{Ca}^{2+}$  signaling G protein-dependent couplings, and thus may behave more likely as a professional chemokine system.

According to this hypothesis, chemoattractant effects of UII on rat fibroblasts (21,73), rat endothelial progenitor cells (22,74) and human monocytes (14) may suggest a potential chemotactic behavior of the urotensinergeic system in glioma. We show that a gradient of low concentrations ( $10^{-13}$ - $10^{-9}$  M) of UII stimulated the chemotactic migration of HEK-UT cells and glioma, and that UT antagonists urantide and palosuran completely blocked this mechanism. Accordingly, it has been recently found in prostate cancer LnCap cells that sh-RNA-mediated UT knock-down or urantide by its own, are able to inhibit chemotactic migration and motility/invasion (23), indicating “constitutive” activation of UT in this particular cancer cells. This *in vitro* autocrine/paracrine mechanism has not been detected in glioma cells, thus suggesting that UT remains in an activated conformation at steady state.

Previous studies established that UT exhibit classical couplings to  $\text{G}_{q/11}$  and  $\text{G}_{i/o}$  proteins (29,30,37,75). In order to investigate the UT-associated signaling pathways involved in chemotactic migration, we tested the effects of the  $\text{UT}_{\text{ERY}(\text{AAA})}$  mutant with ERY motif

mutation abolishing the coupling to the  $[Ca^{2+}]_c$  pathway, pharmacological inhibition of  $G_{i/o}$  proteins and down-regulation of human  $G_{\alpha 13}$  expression. Here, the complete loss of chemotactic effect of UII when HEK cells express the  $UT_{ERY(AAA)}$  mutant exhibiting the non-conservative mutation of E3.49, R2.50 and Y3.51, indicate that UT evoked chemotactic migration in a G protein-dependent process. This is supported by the absence of  $G_q/Ca^{2+}$  coupling in our present study and the previous work of Proulx *et al.* showing a loss of  $G_q$ -protein dependent  $UT_{Arg3.50Ala}$  signaling (76). In addition, we show here that UT may be directly coupled to  $G_{\alpha 13}$  by BRET and that UII-mediated SW1088 migration is completely blocked by an anti- $G_{\alpha 13}$  siRNA and also by a Rho/ROCK kinase inhibitor. As previously suggested in normal or tumorigenic cell types (14,21–23), we propose for the first time that the obligatory ROCK signaling is mediated by a  $UT/G_{13}$  coupling to relay chemotactic glioma migration. Nevertheless, we confirmed the direct  $UT-G_{i/o}$  coupling in HEK, and demonstrated that PTX and PI3K inhibition also decreased UII-stimulating glioma cell migration by  $\approx 25$  and 40 %, respectively suggesting that  $G_{i/o}$  protein and its PI3K effector could participate in glioma migration. Together, in addition to the main  $G_{13}/Rho/ROCK$  route, the contribution of  $G_{i/o}$  and PI3K would here reside in the ability of the  $G_{i/o}\beta\gamma$  protein complex to activate PI3K, leading specifically to the recruitment of the  $PIP_3/RhoGEF/Rac$  and/or  $Cdc42$  downstream effectors, independently of the  $PI3K/AKT-ERK$  pathway, as we detected no effect on p-AKT or p-ERK1/2 from 2 to 30 min treatment of glioma with UII. In a good agreement, the double coupling to both  $G_{13}/ROCK$  and  $G_{i/o}/PI3K$  pathways has been already described for the professional chemotactic CXCR4 (77), LPA or S1P receptors (78,79). Collectively, we propose that a principal  $UT/G_{13}/RhoGEF/Rho/ROCK$  pathway and a secondary  $UT/G_{\beta\gamma i/o}/PI3K/RacGEF/Rac-Cdc42$  cascade control the chemotactic migration of glioma, likely leading to a Rho/ROCK-dependent actomyosine contraction-deadhesion at the back edge and to a PI3K/Rac-dependent actin polymerization-adhesion at the leading edge of cells (Fig. 8A).

Glioma cells are attracted to endothelial capillaries *in vitro* (80) and they can migrate in close association with capillary wall supporting dissemination within the brain (81). Because we demonstrate here that the peptide ligand UII and UT are expressed in glioblastoma of patient biopsies, and may be localized in the endothelial compartment of some arteries, glioma invasion of brain parenchyma and neoangiogenesis would be promoted *via* gradient exposure to UII. Then, higher and homogenous concentration of the peptide in close proximity of blood vessels or within tumor parenchyma would also play a role in tissue organization and adhesion. In our *in vitro* conditions, low homogenous concentration of UII stimulates motility and enhances the distance covered by glioma cells whereas higher concentration markedly reduced the cell motile behavior. Moreover, we have shown that rupture of the gradient by application of the peptide at both sides of the chamber, totally blocked migration/motility compared to UII gradient condition, highlighting UII-induced chemotaxis rather than chemokinesis. A similar mechanism was previously described in prostate cancer cells after CXCR4 activation by SDF-1 (82). To explain this absence of migration, we provide evidence that HEK-UT and glioma exhibit important adhesion following incubation in the presence of uniform UII concentrations. A similar propensity to adhere on substratum has already been demonstrated for endothelial cells expressing UT (23,74,83,84), and for CXCR4 in melanoma cells (85), thus suggesting that UII as a chemokine markedly favors adhesion. This UII-mediated glioma adhesion is not mediated by the UT<sub>ERY(AAA)</sub> mutant, is totally abolished by PTX and partially inhibited by the PI3K inhibitor. Thus, as already demonstrated in human bone marrow for SDF-1 (86), this adhesion process would partially involve the G<sub>i/o</sub>/PI3K cascade already described, in addition to a specific G<sub>i/o</sub>-pathway only recruited in the presence of an homogenous concentration of ligand. Among the potential UT-associated mechanisms leading to adhesion, it can be suggested that UII recruits integrins in glioma. Accordingly, it has been shown that chemokine receptors are able to activate integrins *via* the  $\beta\gamma$  complex of G<sub>i/o</sub> protein (87),

relayed either by PI3K or PLC/RAP1 (87). Yet, the coupling of UT to PLC has already been demonstrated in the central nervous system in neurons (37) and astrocytes (29,30) suggesting that, in glioma, this coupling may be directed towards UII-induced adhesion and not calcium increase.

During processes of cell migration and adhesion, Rho GTPases play crucial role in regulating the actin polymerization. In the present study, a homogenous concentration of UII induced actin polymerization is accompanied by multiple lamellipodia formation around the cell. In a good agreement, actin stress fiber formation mediated by the Rho/ROCK pathway has been previously described in smooth muscle cells after UII treatment (69,88). In the same way, the vasoactive peptide endothelin-1 and the chemotaxic LPA induce NIH3T3 stress fibers formation *via*  $G_{12}$  and  $G_{13}$  protein, respectively (89). We thus propose here that homogenous activation of UT coupled to  $G_{i/o}$ /PI3K/Rac would favor protrusion formation concomitantly to  $G_{13}$ /Rho/ROCK allowing actin stress fiber formation (Fig. 8B).

New protrusion formation and actin polymerization are known to promote integrin engagement and formation of attachment structures (90) called focal complex and focal adhesion requiring the aggregation of many adhesion proteins such as vinculin. In the present study, homogenous UII treatment induced focal complex comprising vinculin, and the maturation of these adhesions was highlighted by the enlargement of the vinculin staining for the higher UII concentrations after 1h treatment. It is considered that focal complex formation is dependent on Rac (91) whereas maturation of FA requires Rho activation (43). Then, the priming signaling pathway *i.e.*,  $G_{i/o}$ /PI3K/Rac would initiate adhesion, and that maturation of FA would result from the classically described  $G_{13}$ /Rho/ROCK/MLCK cascade and integrin-triggered activation of vinculin, bridging integrin receptors to the actin cytoskeleton (90).

Then the remaining question resides in how UT may be coupled to  $G_{i/o}$  and  $G_{13}$ , and relayed spatially migration and adhesion. Recent reports suggest that CXCR4 and CCR5 apparently asymmetrically redistribute *via* an active mechanism to the leading lymphocyte

edge (92,93) *via* partition within lipid rafts (94,95), concentrating the gradient sensing machinery (including the receptor and  $G_{i/o}$ ) at the leading edge after SDF1-induced actin cytoskeleton remodeling (96). Thus, we hypothesize that in glioma, a specific high affinity UT at resting state, activated by low gradient UII concentrations would couple to  $G_{i/o}$  and/or  $G_{13}$  proteins (Fig. 8A and B). In this early phase, UT may signal to favor “clustering” in lipid raft containing  $G_{i/o}$  protein at the leading edge whereas non lipid rafts receptor may kept  $G_{13}$  coupling and remain randomly distributed trough out the cell (Fig. 8B). During chemotaxis,  $G_{i/o}$  coupled UT at the leading edge may promote protrusions through PI3K/PIP<sub>3</sub>/Rac and/or Cdc42 (Fig. 8A) whereas  $G_{13}$ -coupled receptors at the rearing stage of cells may recruit Rho/ROCK/MLCK proteins and provoke contraction of actomyosine (Fig. 8A). In the absence of chemotaxis, when cells are exposed to homogenous higher concentrations of UII, lipid rafts may be randomly distributed and the UT/ $G_{i/o}$ /integrin pathway should force adhesion (Fig. 8B).

In conclusion, we report that the vasoactive peptide UII and its receptor are expressed in high grade glioma and play a major role in glioma cell physiology, promoting migration and adhesion. The expression pattern and functional activity of this urotensin system highlight a professional chemokine behavior, leveraging a single receptor endowed of signaling switch to control migration and/or adhesion, two processes highly relevant in glioma invasion and neo-angiogenesis.



## **Acknowledgements**

We gratefully acknowledge Mr Arnaud Arabo, Mr David Thomas, Mrs Huguette Lemonnier for skillful technical assistance.

## **Grant sponsors**

This work was supported by Inserm, Géfluc, TC2N network, LARC Neuroscience, Institute on Innovative and Biomedical Research (IRIB), ANR chemot\_X ProG, The University of Rouen, C.L, V.L. and M. J were recipients of a fellowship from the Haute-Normandie or French ministry.

## **Authors' contributions**

Céline Lecointre, performed main experiments on glioma cells (cell growth assays, cell cycle analysis, calcium measurement, transwell migration, adhesion, motility, immunocytochemistry, Western blot, ELISA, RhoA pull-down assay, flow cytometry experiments). Laurence Desrues participated to Western blot, RhoA pull-down assay, ELISA experiments and plasmid construction, Jane-Eileen Joubert participated in adhesion and migration assay and tested the UT<sup>ERY(AAA)</sup> mutant on cell migration and adhesion, Vadim Le Joncour helped for the validation of the migration assay. Omar Bennani and Vadim Le Joncour performed immunohistochemical experiments on glioblastoma tissue biopsies. Cédric Brulé and Nicolas Perzo, Richard Leduc provided background and experiments in HEK-UT with BRET and FRET-HTRF biotechnologies, Annie Laquerrière and François Proust provided glioblastoma from the Haute-Normandie library, Pierrick Gandolfo and Fabrice Morin contributed to the supervision of the work. Hélène Castel supervised the study. HC and CL wrote the paper.

**References**

1. Wen PY, Kesari S. Malignant Gliomas in Adults. *N. Engl. J. Med.* 2008;359:492–507.
2. Rigau V, Zouaoui S, Mathieu-Daudé H, Darlix A, Maran A, Trétarre B, et al. French brain tumor database: 5-year histological results on 25 756 cases. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 2011;21:633–44.
3. Stupp R, Pavlidis N, Jelic S. ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of malignant glioma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. Esmo.* 2005;16 Suppl 1:i64–65.
4. Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2003;21:1624–36.
5. Johnston ALM, Lun X, Rahn JJ, Liacini A, Wang L, Hamilton MG, et al. The p75 neurotrophin receptor is a central regulator of glioma invasion. *Plos Biol.* 2007;5:e212.
6. Zagzag D, Esencay M, Mendez O, Yee H, Smirnova I, Huang Y, et al. Hypoxia- and Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Stromal Cell-Derived Factor-1 $\alpha$ /CXCR4 Expression in Glioblastomas: One Plausible Explanation of Scherer's Structures. *Am. J. Pathol.* 2008;173:545–60.
7. Rempel SA, Dudas S, Ge S, Gutiérrez JA. Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2000;6:102–11.
8. Wang S-C, Hong J-H, Hsueh C, Chiang C-S. Tumor-secreted SDF-1 promotes glioma invasiveness and TAM tropism toward hypoxia in a murine astrocytoma model. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 2012;92:151–62.
9. Mugabe BE, Yaghini FA, Song CY, Buharalioglu CK, Waters CM, Malik KU. Angiotensin II-induced migration of vascular smooth muscle cells is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase-activated c-Src through spleen tyrosine kinase and epidermal growth factor receptor transactivation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2010;332:116–24.
10. Daher Z, Noël J, Claing A. Endothelin-1 promotes migration of endothelial cells through the activation of ARF6 and the regulation of FAK activity. *Cell. Signal.* 2008;20:2256–65.
11. Nishikawa K, Ayukawa K, Hara Y, Wada K, Aoki S. Endothelin/endothelin-B receptor signals regulate ventricle-directed interkinetic nuclear migration of cerebral cortical neural progenitors. *Neurochem. Int.* 2011;58:261–72.
12. Medeiros PJ, Al-Khazraji BK, Novielli NM, Postovit LM, Chambers AF, Jackson DN. Neuropeptide Y stimulates proliferation and migration in the 4T1 breast cancer cell line. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer.* 2012;131:276–86.
13. Lu D-Y, Leung Y-M, Huang S-M, Wong K-L. Bradykinin-induced cell migration and COX-2 production mediated by the bradykinin B1 receptor in glioma cells. *J. Cell. Biochem.* 2010;110:141–50.
14. Segain J-P, Rolli-Derkinderen M, Gervois N, Raingeard de la Blétière D, Loirand G, Pacaud P. Urotensin II is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 2007;179:901–9.
15. Coulouarn Y, Lihmann I, Jegou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, et al. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998;95:15803–8.

16. Sugo T, Murakami Y, Shimomura Y, Harada M, Abe M, Ishibashi Y, et al. Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;310:860–8.
17. Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, et al. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature.* 1999;401:282–6.
18. Proulx CD, Holleran BJ, Lavigne P, Escher E, Guillemette G, Leduc R. Biological properties and functional determinants of the urotensin II receptor. *Peptides.* 2008;29:691–9.
19. Douglas SA, Dhanak D, Johns DG. From “gills to pills”: urotensin-II as a regulator of mammalian cardiorenal function. *Trends Pharmacol. Sci.* 2004;25:76–85.
20. Ross B, McKendy K, Giaid A. Role of urotensin II in health and disease. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2010;298:R1156–R1172.
21. Zhang Y-G, Li J, Li Y-G, Wei R-H. Urotensin II induces phenotypic differentiation, migration, and collagen synthesis of adventitial fibroblasts from rat aorta. *J. Hypertens.* 2008;26:1119–26.
22. Xu S, Jiang H, Wu B, Yang J, Chen S. Urotensin II induces migration of endothelial progenitor cells via activation of the RhoA/Rho kinase pathway. *Tohoku J. Exp. Med.* 2009;219:283–8.
23. Grieco P, Franco R, Bozzuto G, Toccaceli L, Sgambato A, Marra M, et al. Urotensin II receptor predicts the clinical outcome of prostate cancer patients and is involved in the regulation of motility of prostate adenocarcinoma cells. *J. Cell. Biochem.* 2011;112:341–53.
24. Wu Y-Q, Song Z, Zhou C-H, Xing S-H, Pei D-S, Zheng J-N. Expression of urotensin II and its receptor in human lung adenocarcinoma A549 cells and the effect of urotensin II on lung adenocarcinoma growth in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.* 2010;24:1179–84.
25. Zhou C-H, Wan Y-Y, Chu X-H, Song Z, Xing S-H, Wu Y-Q, et al. Urotensin II contributes to the formation of lung adenocarcinoma inflammatory microenvironment through the NF- $\kappa$ B pathway in tumor-bearing nude mice. *Oncol. Lett.* 2012;4:1259–63.
26. Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Shibahara S. Expression of urotensin II and urotensin II receptor mRNAs in various human tumor cell lines and secretion of urotensin II-like immunoreactivity by SW-13 adrenocortical carcinoma cells. *Peptides.* 2001;22:1175–9.
27. Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Arihara Z, Noshiro T, Hayashi Y, et al. Expression of urotensin II and its receptor in adrenal tumors and stimulation of proliferation of cultured tumor cells by urotensin II. *Peptides.* 2003;24:301–6.
28. Lin Y, Tsuchihashi T, Matsumura K, Fukuhara M, Ohya Y, Fujii K, et al. Central cardiovascular action of urotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* 2003;26:839–45.
29. Castel H, Diallo M, Chatenet D, Leprince J, Desrues L, Schouft M-T, et al. Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes. *J. Neurochem.* 2006;99:582–95.
30. Jarry M, Diallo M, Lecointre C, Desrues L, Tokay T, Chatenet D, et al. The vasoactive peptides urotensin II and urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation. *Biochem. J.* 2010;428:113–24.
31. Desrues L, Lefebvre T, Lecointre C, Schouft M-T, Leprince J, Compère V, et al. Down-regulation of GABA(A) receptor via promiscuity with the vasoactive peptide

- urotensin II receptor. Potential involvement in astrocyte plasticity. *Plos One*. 2012;7:e36319.
32. Ayoub MA, Couturier C, Lucas-Meunier E, Angers S, Fossier P, Bouvier M, et al. Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* 2002;277:21522–8.
  33. Yagi H, Tan W, Dillenburg-Pilla P, Armando S, Amornphimoltham P, Simaan M, et al. A synthetic biology approach reveals a CXCR4-G13-Rho signaling axis driving transendothelial migration of metastatic breast cancer cells. *Sci. Signal*. 2011;4:ra60.
  34. Perzelová A, Máciková I, Mráz P, Bízik I, Steno J. Characterization of two new permanent glioma cell lines 8-MG-BA and 42-MG-BA. *Neoplasma*. 1998;45:25–9.
  35. Bocchini V, Casalone R, Collini P, Rebel G, Lo Curto F. Changes in glial fibrillary acidic protein and karyotype during culturing of two cell lines established from human glioblastoma multiforme. *Cell Tissue Res*. 1991;265:73–81.
  36. Versteeg HH, Nijhuis E, van den Brink GR, Evertzen M, Pynaert GN, van Deventer SJ, et al. A new phosphospecific cell-based ELISA for p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK), p38 MAPK, protein kinase B and cAMP-response-element-binding protein. *Biochem. J.* 2000;350 Pt 3:717–22.
  37. Ziltener P, Mueller C, Haenig B, Scherz MW, Nayler O. Urotensin II mediates ERK1/2 phosphorylation and proliferation in GPR14-transfected cell lines. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 2002;22:155–68.
  38. Elshourbagy NA, Douglas SA, Shabon U, Harrison S, Duddy G, Sechler JL, et al. Molecular and pharmacological characterization of genes encoding urotensin-II peptides and their cognate G-protein-coupled receptors from the mouse and monkey. *Br. J. Pharmacol.* 2002;136:9–22.
  39. Patacchini R, Santicioli P, Giuliani S, Grieco P, Novellino E, Rovero P, et al. Urantide: an ultrapotent urotensin II antagonist peptide in the rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* 2003;140:1155–8.
  40. Clozel M, Binkert C, Birker-Robaczewska M, Boukhadra C, Ding S-S, Fischli W, et al. Pharmacology of the urotensin-II receptor antagonist palosuran (ACT-058362; 1-[2-(4-benzyl-4-hydroxy-piperidin-1-yl)-ethyl]-3-(2-methyl-quinolin-4-yl)-urea sulfate salt): first demonstration of a pathophysiological role of the urotensin System. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004;311:204–12.
  41. Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2007;7:79–94.
  42. Ballesteros JA, Weinstein H. [19] Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. In: Stuart C. Sealfon, editor. *Methods Neurosci*. [Internet]. Academic Press; 1995 [cited 2013 Apr 23]. page 366–428. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043947105800497>
  43. Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*. 1992;70:389–99.
  44. Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, et al. Formation of Actin Stress Fibers and Focal Adhesions Enhanced by Rho-Kinase. *Science*. 1997;275:1308–11.
  45. Cain RJ, Ridley AJ. Phosphoinositide 3-kinases in cell migration. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* 2009;101:13–29.
  46. Jarjour AA, Durko M, Luk TL, Marçal N, Shekarabi M, Kennedy TE. Autocrine Netrin Function Inhibits Glioma Cell Motility and Promotes Focal Adhesion Formation. *Plos One*. 2011;6:e25408.

47. Coulouarn Y, Jégou S, Tostivint H, Vaudry H, Lihrmann I. Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors. *Febs Lett.* 1999;457:28–32.
48. Diallo M, Jarry M, Desrues L, Castel H, Chatenet D, Leprince J, et al. [Orn5]URP acts as a pure antagonist of urotensinergic receptors in rat cortical astrocytes. *Peptides.* 2008;29:813–9.
49. Aita Y, Kasahara T, Isobe K, Kawakami Y, Takekoshi K. Effect of urotensin II on PC12 rat pheochromocytoma cells. *J. Neuroendocrinol.* 2010;22:83–91.
50. Douglas SA, Naselsky D, Ao Z, Disa J, Herold CL, Lynch F, et al. Identification and pharmacological characterization of native, functional human urotensin-II receptors in rhabdomyosarcoma cell lines. *Br. J. Pharmacol.* 2004;142:921–32.
51. Batuwangala MS, Calo G, Guerrini R, Ng LL, McDonald J, Lambert DG. Desensitisation of native and recombinant human urotensin-II receptors. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2009;380:451–7.
52. Nguyen T-TM, Létourneau M, Chatenet D, Fournier A. Presence of urotensin-II receptors at the cell nucleus: Specific tissue distribution and hypoxia-induced modulation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2012;44:639–47.
53. Spinazzi R, Albertin G, Nico B, Guidolin D, Di Liddo R, Rossi GP, et al. Urotensin-II and its receptor (UT-R) are expressed in rat brain endothelial cells, and urotensin-II via UT-R stimulates angiogenesis in vivo and in vitro. *Int. J. Mol. Med.* 2006;18:1107–12.
54. Albertin G, Guidolin D, Sorato E, Spinazzi R, Mascarin A, Oselladore B, et al. Pro-angiogenic activity of Urotensin-II on different human vascular endothelial cell populations. *Regul. Pept.* 2009;157:64–71.
55. Guidolin D, Albertin G, Oselladore B, Sorato E, Rebuffat P, Mascarin A, et al. The pro-angiogenic activity of urotensin-II on human vascular endothelial cells involves ERK1/2 and PI3K signaling pathways. *Regul. Pept.* 2010;162:26–32.
56. Diebold I, Petry A, Sabrane K, Djordjevic T, Hess J, Görlach A. The HIF1 target gene NOX2 promotes angiogenesis through urotensin-II. *J. Cell Sci.* 2012;125:956–64.
57. Egidy G, Eberl LP, Valdenaire O, Irmeler M, Majdi R, Diserens A-C, et al. The Endothelin System in Human Glioblastoma. *Lab. Invest.* print;80:1681–9.
58. Naidoo V, Naidoo S, Mahabeer R, Raidoo DM. Localization of the endothelin system in human diffuse astrocytomas. *Cancer.* 2005;104:1049–57.
59. Benes L, Kappus C, McGregor GP, Bertalanffy H, Mennel HD, Hagner S. The immunohistochemical expression of calcitonin receptor-like receptor (CRLR) in human gliomas. *J. Clin. Pathol.* 2004;57:172–6.
60. Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, Ali MA, Esencay M, Mendez O, et al. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 2006;86:1221–32.
61. Ouafik L, Berenguer-Daize C, Berthois Y. Adrenomedullin promotes cell cycle transit and up-regulates cyclin D1 protein level in human glioblastoma cells through the activation of c-Jun/JNK/AP-1 signal transduction pathway. *Cell. Signal.* 2009;21:597–608.
62. Ouafik L, Sauze S, Boudouresque F, Chinot O, Delfino C, Fina F, et al. Neutralization of adrenomedullin inhibits the growth of human glioblastoma cell lines in vitro and suppresses tumor xenograft growth in vivo. *Am. J. Pathol.* 2002;160:1279–92.
63. He S, Dibas A, Yorito T, Prasanna G. Parallel signaling pathways in endothelin-1-induced proliferation of U373MG astrocytoma cells. *Exp. Biol. Med.* Maywood Nj. 2007;232:370–84.

64. Tamura K, Okazaki M, Tamura M, Isozumi K, Tasaki H, Nakashima Y. Urotensin II-induced activation of extracellular signal-regulated kinase in cultured vascular smooth muscle cells: involvement of cell adhesion-mediated integrin signaling. *Life Sci.* 2003;72:1049–60.
65. Djordjevic T, BelAiba RS, Bonello S, Pfeilschifter J, Hess J, Görlach A. Human urotensin II is a novel activator of NADPH oxidase in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005;25:519–25.
66. Zhou Y, Larsen PH, Hao C, Yong VW. CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. *J. Biol. Chem.* 2002;277:49481–7.
67. Chen Y, Zhao M, Liu X, Yao W, Yang J, Zhang Z, et al. Urotensin II receptor in the rat airway smooth muscle and its effect on the rat airway smooth muscle cells proliferation. *Chin. Med. Sci. J. Chung-Kuo Hsüeh Ko Hsüeh Tsa Chih Chin. Acad. Med. Sci.* 2001;16:231–5.
68. Matsushita M, Shichiri M, Fukai N, Ozawa N, Yoshimoto T, Takasu N, et al. Urotensin II is an autocrine/paracrine growth factor for the porcine renal epithelial cell line, LLCPK1. *Endocrinology.* 2003;144:1825–31.
69. Sauzeau V, Le Mellionec E, Bertoglio J, Scalbert E, Pacaud P, Loirand G. Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circ. Res.* 2001;88:1102–4.
70. Liu Q, Pong SS, Zeng Z, Zhang Q, Howard AD, Williams DL Jr, et al. Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999;266:174–8.
71. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2010;16:2927–31.
72. Mitra P, De A, Ethier MF, Mimori K, Kodys K, Shibuta K, et al. Loss of chemokine SDF-1 $\alpha$ -mediated CXCR4 signalling and receptor internalization in human hepatoma cell line HepG2. *Cell. Signal.* 2001;13:311–9.
73. Zhang Y-G, Kuang Z-J, Mao Y-Y, Wei R-H, Bao S-L, Wu L-B, et al. Osteopontin is involved in urotensin II-induced migration of rat aortic adventitial fibroblasts. *Peptides.* 2011;32:2452–8.
74. Yi K, Yu M, Wu L, Tan X. Effects of urotensin II on functional activity of late endothelial progenitor cells. *Peptides.* 2012;33:87–91.
75. Song W, McDonald J, Camarda V, Calo G, Guerrini R, Marzola E, et al. Cell and tissue responses of a range of Urotensin II analogs at cloned and native urotensin II receptors. Evidence for coupling promiscuity. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2006;373:148–57.
76. Proulx CD, Holleran BJ, Boucard AA, Escher E, Guillemette G, Leduc R. Mutational analysis of the conserved Asp2.50 and ERY motif reveals signaling bias of the urotensin II receptor. *Mol. Pharmacol.* 2008;74:552–61.
77. Tan W, Martin D, Gutkind JS. The G $\alpha$ 13-Rho signaling axis is required for SDF-1-induced migration through CXCR4. *J. Biol. Chem.* 2006;281:39542–9.
78. Panetti TS, Nowlen J, Mosher DF. Sphingosine-1-Phosphate and Lysophosphatidic Acid Stimulate Endothelial Cell Migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;20:1013–9.
79. Bian D, Mahanivong C, Yu J, Frisch SM, Pan ZK, Ye RD, et al. The G12/13-RhoA signaling pathway contributes to efficient lysophosphatidic acid-stimulated cell migration. *Oncogene.* 2006;25:2234–44.
80. Von Bülow C, Hayen W, Hartmann A, Mueller-Klieser W, Allolio B, Nehls V. Endothelial capillaries chemotactically attract tumour cells. *J. Pathol.* 2001;193:367–76.

81. Farin A, Suzuki SO, Weiker M, Goldman JE, Bruce JN, Canoll P. Transplanted glioma cells migrate and proliferate on host brain vasculature: a dynamic analysis. *Glia*. 2006;53:799–808.
82. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res*. 2002;62:1832–7.
83. Cirillo P, De Rosa S, Pacileo M, Gargiulo A, Angri V, Fiorentino I, et al. Human urotensin II induces tissue factor and cellular adhesion molecules expression in human coronary endothelial cells: an emerging role for urotensin II in cardiovascular disease. *J. Thromb. Haemost. Jth*. 2008;6:726–36.
84. Watson AMD, Olukman M, Koulis C, Tu Y, Samijono D, Yuen D, et al. Urotensin II receptor antagonism confers vasoprotective effects in diabetes associated atherosclerosis: studies in humans and in a mouse model of diabetes. *Diabetologia*. 2013;
85. Monterrubio M, Mellado M, Carrera AC, Rodríguez-Frade JM. PI3Kgamma activation by CXCL12 regulates tumor cell adhesion and invasion. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2009;388:199–204.
86. Glodek AM, Honczarenko M, Le Y, Campbell JJ, Silberstein LE. Sustained Activation of Cell Adhesion Is a Differentially Regulated Process in B Lymphopoiesis. *J. Exp. Med*. 2003;197:461–73.
87. Kinashi T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol*. 2005;5:546–59.
88. Matsusaka S, Wakabayashi I. Enhancement of vascular smooth muscle cell migration by urotensin II. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. 2006;373:381–6.
89. Sugimoto N, Takuwa N, Okamoto H, Sakurada S, Takuwa Y. Inhibitory and Stimulatory Regulation of Rac and Cell Motility by the G12/13-Rho and Gi Pathways Integrated Downstream of a Single G Protein-Coupled Sphingosine-1-Phosphate Receptor Isoform. *Mol. Cell. Biol*. 2003;23:1534–45.
90. Hotchin NA, Hall A. The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J. Cell Biol*. 1995;131:1857–65.
91. Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 1995;81:53–62.
92. Nieto M, Frade JMR, Sancho D, Mellado M, Martínez-A C, Sánchez-Madrid F. Polarization of Chemokine Receptors to the Leading Edge during Lymphocyte Chemotaxis. *J. Exp. Med*. 1997;186:153–8.
93. Buul JD van, Voermans C, Gelderen J van, Anthony EC, Schoot CE van der, Hordijk PL. Leukocyte-Endothelium Interaction Promotes SDF-1-dependent Polarization of CXCR4. *J. Biol. Chem*. 2003;278:30302–10.
94. Mañes S, Lacalle RA, Gómez-Moutón C, Real G del, Mira E, Martínez-A C. Membrane raft microdomains in chemokine receptor function. *Semin. Immunol*. 2001;13:147–57.
95. Mañes S, Mira E, Gómez-Moutón C, Ana Lacalle R, Keller P, Pablo Labrador J, et al. Membrane raft microdomains mediate front–rear polarity in migrating cells. *Embo J*. 1999;18:6211–20.
96. Gomez-Mouton C. Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis. *J. Cell Biol*. 2004;164:759–68.

**Legends to figures**

**Figure 1. UT expression in glioma cell lines and in glioblastoma explants from patient biopsies.** A, Upper, Flow cytometry analysis of the urotensin II receptor UT expression in human astrocytoma grade III (SW1783 and SW1088) and glioblastoma grade IV (U87, 8MG, 42MG and GL15) cell lines. Cells were stained with the anti-human UT in permeabilized conditions and gray lines depict results from control staining with only secondary antibodies in representative experiments. The UT labeling was illustrated in the table for each glioma cell line as the percentage of increased fluorescence intensity compared to control (shift to the right). Lower, Flow cytometry analysis of the urotensin II expression in human astrocytoma grade III (SW1088) and glioblastoma grade IV (U87, 8MG and GL15) cell lines. Cells were stained with the anti-human UII in permeabilized conditions and gray lines depict results from control staining with only secondary antibodies in representative experiments. B, Western blot analysis of UT expression in different glioma cell lines. The approximate molecular weight of the protein is indicated on the left panel. Black arrow indicates a major band and white arrows would suggest dimeric forms of UT. C, Immunocytochemistry of UT (green) in two glioma cell lines. In SW1088, the UT labeling was revealed in both plasma membrane and cytosolic compartments, as visible on digitally zoomed region corresponding to the white box. Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Scale bars, 50  $\mu\text{m}$ . D, Example of immunoreactivity of UT in a fresh glioblastoma tumoral explant, showing strong green labeling associated to a number of tumoral cells (a,  $z = 0 \mu\text{m}$ ), vascular components (b,  $z = 47 \mu\text{m}$ ) and invading cells emerging from the explants (c,  $z = 114 \mu\text{m}$ ). E, UII and UT expression in paraffin-embedded glioblastoma patient tissues. Left, Human UII immunohistochemistry revealed intense staining in tumor cells (black arrowhead) around areas of intense hyperplastic neovascularization (V, black arrow). Right, UT immunohistochemistry showed



marked staining in vascular cells (white arrow) as well as tumor cells also immunoreactive for UII (white arrowhead). Left and Right represent adjacent sections. Scale Bars, 50  $\mu\text{m}$ .

**Figure 2. Urotensin II fails to modify proliferation rate, ERK1/2 and AKT phosphorylation and cell cycle in glioma.** A, SW1088, U87 and HEK-293 expressing UT were incubated for 48h in the absence or the presence of UII ( $10^{-8}$  and  $10^{-10}$  M) or FBS (1%) and counted using a Coulter counter. UII did not modify cell growth whereas FBS exhibited drastic stimulation of cell proliferation/survival. Data are mean  $\pm$  SEM from one representative experiment in quadruplicate of 4 independent experiments. Man and Whitney test, \*,  $P < 0.05$ ; compared with the corresponding control (in the absence of treatment and FBS). B, Determination of both total and phosphorylated (activated) forms of ERK1/2 and AKT on HEK-293 expressing UT (HEK-UT) in the absence (0) or the presence of UII ( $10^{-8}$  M) from 30 sec to 30 min. Here FBS was used as positive control. ELISA assay was performed with specific antibodies directed against total and phosphoforms of ERK1/2 and AKT, respectively as described in Materials and Methods. C, as described in B, determination of both total and phosphorylated (activated) forms of ERK1/2 and AKT on SW1088 in the absence (0) or the presence of UII ( $10^{-8}$  M) from 30 sec to 30 min. ELISA and Western blot assay were performed as described in Materials and Methods to ensure the absence of effect of UII. D, Representative example of the effect UII ( $10^{-7}$  M) on SW1088 and U87 cell cycles after 24h treatment. Cell cycle analysis following propidium iodide intercalation into the cellular chromatin was performed by flow cytometry. Data are represented as relative fluorescence intensity of G1, S and G2/M-phase population in a 2-dimensional cytometry profile in control or after UII treatment. Percentage cells in each phase are indicated.

**Figure 3. Glioma cells do not exhibit the classical UT- $\text{Ca}^{2+}$  coupling.** A, Concentration-response curve for UII ( $10^{-12}$ - $10^{-7}$  M)-mediated  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  mobilization in HEK-293 transfected

with cDNA encoding c-myc (HEK) or UT<sup>c-myc</sup> (HEK-UT). Ca<sup>2+</sup> response was recorded from cells previously loaded with Fura2-AM and ATP (10<sup>-4</sup> M) was used here as a positive control. Right panel shows the quantification of the maximum Ca<sup>2+</sup> response detected at 10<sup>-7</sup> M (UII) and 10<sup>-4</sup> M (ATP) normalized to control (buffer injection). Bottom panel, concentration-response curve for UII-mediated IP1 production (normalized to the maximum effect of UII (10<sup>-5</sup> M)). B, Concentration-response curve for UII (10<sup>-12</sup>-10<sup>-7</sup> M)-mediated [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> mobilization in glioma SW1088 and U87 cells with cDNA encoding c-myc (pCMV) or UT<sup>c-myc</sup> (UT). Bottom panel, Quantification of the maximum effect of UII (10<sup>-7</sup> M) and ATP (10<sup>-4</sup> M) on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> mobilization in glioma cells. A, B, Data are mean ± SEM from 3 experiments in triplicates. Statistical significance was determined by a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's Multiple Comparison Test. \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001 compared with control. C, Left panel, pseudocolor images illustrating time-dependent increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> in a representative experiment on a human glioblastoma explants (72h culture) following exposure to UII (10<sup>-7</sup> M). (a): glioma cells under resting conditions in a single visual field (bar correlates pseudocolor with relative [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> levels). (b): a subset of glioma cells non responding upon addition of UII (10<sup>-8</sup> M, 150 s). (c): ATP (10<sup>-4</sup> M, 40 s)-inducing a rapid and reversible (d) [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> increase in the same glioblastoma explant. Right panel, composite of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> mobilization responses in 16 individual cells from the microscopic field in c. All cells failed to respond to UII and exhibited a marked Ca<sup>2+</sup> rise after addition of ATP. Scale bar, 50 μm.

**Figure 4. Chemotaxic effect of UII on HEK-UT and glioma migration.** A, HEK-293 transiently transfected with cDNA encoding c-myc (HEK) or UT<sup>c-myc</sup> (HEK-UT) were plated in the top chamber of a fibronectin-coated polycarbonate transwell membranes (8 μm pore size) and UII (10<sup>-9</sup> M) was added in the bottom well for 24h. Cell motility was evaluated by counting cells in 10 random fields after eosin (0.2%)/hematoxylin (0.7%) counterstaining. B,

SW1088 and U87 migrate in the absence or the presence of UII ( $10^{-9}$  M, 24h) added in the bottom well. A, B, histograms show the quantification of the migrating cells expressed as the percentage as compared to untreated cells (control). Each bar corresponds to mean  $\pm$  SEM obtained from 3 to 12 independent experiments in triplicates. Mann and Whitney test, ns, no significant; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . B, Bottom panel, SW1088 were exposed in the Boyden chamber to increasing concentrations of UII ( $10^{-13}$ - $10^{-7}$  M) for 24h and cells were counted as described above. Bar graph represent mean  $\pm$  SEM obtained from 3 independent experiments in triplicates. One way analysis of variance followed by a Bonferroni post-test, \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\* $< 0.001$ . C, SW1088 were exposed in the Boyden chamber to the antagonists palosuran and urantide, respectively ( $10^{-5}$  M each) added both in the upper and bottom chambers in the absence or the presence of UII ( $10^{-9}$  M) in the bottom chamber. Bar graph represent mean  $\pm$  SEM obtained from 3 independent experiments in triplicates. One way analysis of variance followed by a Dunnett's Multiple Comparison Test, \*\*\*,  $P < 0.001$ . D, SW1088 were exposed in the Boyden chamber to the  $G_{i/o}$  toxin inhibitor PTX (0.2  $\mu$ g/ml), the ROCK inhibitor Y27632 and the PI3K inhibitor LY294002, respectively ( $10^{-5}$  M each) pre-incubated (6h) and added both in the upper and bottom chambers in the absence or the presence of UII ( $10^{-9}$  M) in the bottom chamber. Bar graph represent mean  $\pm$  SEM obtained from 3 independent experiments in triplicates. Mann and Whitney test, ns, no significant; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ . E, Assessment of BRET between  $G_{\alpha i}$  and  $G_{\beta \gamma i}$  (left) or UT and  $G_{\alpha 13}$  (right) in HEK co-expressing  $\alpha i$ -Rluc and  $\beta \gamma$ -eYFP (left) or UT-RlucII and  $\alpha 13$ -eGFP2 in the presence of increasing concentration of UII ( $10^{-11}$  to  $10^{-6}$  M). F, HEK transiently transfected with cDNA encoding c-myc (HEK), UT<sup>c-myc</sup> (HEK-UT) or the UT mutated in the ERY site (HEK-UT<sub>ERY(AAA)</sub>) were plated in the top chamber and UII ( $10^{-9}$  M) was added in the bottom well for 24h. Bar graph represent mean  $\pm$  SEM obtained from 1 representative experiment in quadruplicates. Mann and Whitney test, ns, no significant; \*,  $P < 0.05$ . G, HEK-293 transiently transfected with cDNA encoding UT<sup>c-myc</sup> (HEK-UT), and cotransfected with a control siRNA

(si-Ctrl) or a siRNA directed against the human  $G_{\alpha 13}$  (si- $G_{\alpha 13}$ ), were plated in the top chamber and UII ( $10^{-9}$  M) was added in the bottom well for 24h. Bar graph represent mean  $\pm$  SEM obtained from 3 independent experiments in quadruplicates. Mann and Whitney test, ns, no significant; \*\*,  $P < 0.05$ . H, Regulation of Rho small GTPase by UII in SW1088. SW1088 were treated in the absence (control, FBS<sup>-</sup>), the presence of UII (UII,  $10^{-8}$  M; 10 min) or FBS (FBS<sup>+</sup>). Western blot assay shows the expression of total Rho A, B and C obtained by Western blot assay and activated Rho were isolated by affinity purification with the Rhotekin Rho binding domain as described in Materials and Methods. Under-activated Rho (GDP), Over-activated Rho (GTP- $\gamma$ -S). Bar graph represent ratio between the intensity of activated Rho band and total Rho bands compared to the untreated cells. Two independent experiments gave similar results.

**Figure 5. Homogenous concentration of the urotensinergetic system on glioma cell motility and adhesion.** A, Time-lapse assessment of UII-induced SW1088 cell motility in 2D fibronectin substrate. SW1088 were seeded on 2D plastic dishes coated with fibronectin (25  $\mu$ g/ml) and their motility was imaged by video time-lapse microscopy. Images were obtained using Metamorph software at 10 min intervals for 16h. The 16h movements of motile cells in each group (Control, UII  $10^{-10}$  M and UII  $10^{-8}$  M) were tracked and analyzed with Metamorph. Tracings generated by Metamorph of the continuous movement of these cells are shown by color lines on images and aggregated trajectories of individual cells redrawn illustrate distances. Cumulative length of each track displaced over cells present in more than 5 fields in a representative experiment in the absence (control) or presence of UII ( $10^{-10}$  and  $10^{-8}$  M). Values represent tracking of 42 to 69 individual cells from different experiments. Mann and Whitney test, \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ . B, SW1088 were exposed in the Boyden chamber in the absence or the presence of UII ( $10^{-9}$  M) in the bottom chamber, the upper chamber or both and cells were counted 24h after treatment. Bar graph represent mean  $\pm$  SEM

obtained from 3 independent experiments in quadruplicates. Statistical significance was determined by a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's Multiple Comparison test, ns, non significant, \*\*,  $P < 0.01$  compared with control. C, Left, Adhesion assay on fibronectin of HEK-293 transfected with the cDNA encoding peYFP (HEK) or UT<sup>eYFP</sup> (HEK-UT) in the absence (control) or the presence of UII ( $10^{-10}$  and  $10^{-8}$  M). Cells were preincubated for 30 min with treatment, allowed to adhere during 30 min and the relative number of adhered cells was estimated by fluorescence reading. Bar graph represent mean  $\pm$  SEM obtained from 1 representative experiment from 5 independent experiments in quadruplicates. Mann and Whitney test, ns, non significant, \*,  $P < 0.05$ . Right, Adhesion assay on fibronectin of SW1088 (loaded with cell tracker green) in the absence (control) or the presence of UII ( $10^{-10}$  and  $10^{-8}$  M). Cells were preincubated for 30 min with treatment, allowed to adhere during 30 min and the relative number of adhered cells was estimated by fluorescence reading. Bar graph represent mean  $\pm$  SEM obtained from 1 representative experiment from 5 independent experiments in quintuplets. Mann and Whitney test, \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ . D, Adhesion assay of SW1088 preincubated (30 min) with palosuran or urantide ( $10^{-5}$  M, each) in the absence or the presence of UII ( $10^{-8}$  M). Bar graph represent mean  $\pm$  SEM obtained from 3 experiments in quintuplets. Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's Multiple Comparison Test. \*\*,  $P < 0.01$ . E, Adhesion assay of SW1088 preincubated (6h) with PTX ( $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), Y27632 ( $10^{-5}$  M) or LY294002 ( $10^{-5}$  M) and exposed to UII ( $10^{-8}$  M). Bar graph represent mean  $\pm$  SEM obtained from 2 independent experiments in quintuplets. Mann and Whitney test, ns, non significant; \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ . F, Adhesion assay on fibronectin of HEK-293 transfected with the cDNA encoding pCMV-c-myc (HEK), UT<sup>c-myc</sup> (HEK-UT) or UT<sub>ERY(AAA)</sub><sup>c-myc</sup> (HEK-UT<sub>ERY(AAA)</sub>) (loaded with cell tracker green) in the absence (control) or the presence of UII ( $10^{-8}$  M). Cells were preincubated for 30 min with treatment, allowed to adhere during 30 min and the relative number of adhered cells was estimated by fluorescence reading. Bar graph represent mean  $\pm$  SEM obtained from 1 representative experiment from 3

independent experiments in quintuplets. Mann and Whitney test, ns, non significant, \*\*,  $P < 0.01$ .

**Figure 6. Effect of homogenous UII concentrations on subcellular (co)localization of UT and actin polymerization.** SW1088 were non-transfected (SW1088) or transfected with cDNAs encoding UT<sup>eGFP</sup> (SW1088-UT<sup>eGFP</sup>) and incubated in the absence (control) or the presence of UII ( $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$  and  $10^{-8}$  M) for 10 min or 1h. A, Immunofluorescence analysis of SW1088 UT<sup>eGFP</sup> (green) labeled with a rhodamin phalloidin staining (red) after 1h of UII treatment. Overlay images indicate colocalization of UT and phalloidin, including in subcellular compartments (yellow). Scale bars indicates 50  $\mu$ m. B, Quantification of phalloïdin intensities per cell area after incubation (10 min or 1h) of native SW1088 or recombinant SW1088-UT<sup>eGFP</sup>. Mann and Whitney test, \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . C, Plot of the correlation ( $r$ ) of phalloidin labeling intensities per cell area as function of UT<sup>eGFP</sup> intensity per cell area, in the different treatment conditions described in A. Significant positive correlations were detected after treatment with UII ( $10^{-10}$  and  $10^{-8}$  M).

**Figure 7. Effect of homogenous UII concentrations on subcellular (co)localization of UT and vinculin staining.** SW1088 were non-transfected (SW1088) or transfected with cDNAs encoding UT<sup>eGFP</sup> (SW1088-UT<sup>eGFP</sup>) and incubated in the absence (control) or the presence of UII ( $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$  and  $10^{-8}$  M) for 10 min or 1h. A, Immunofluorescence analysis of SW1088 UT<sup>eGFP</sup> (green) labeled with an antibody directed against vinculin (red) after 1h of UII treatment. Overlay images indicate colocalization of UT and vinculin, including in subcellular compartments (yellow). Scale bars indicates 50  $\mu$ m. B, Quantification of vinculin intensities per cell area after incubation (10 min or 1h) of native SW1088 or recombinant SW1088 UT<sup>eGFP</sup>. Mann and Whitney test, ns, non significant, \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ . C, Plot of the correlation ( $r$ ) of vinculin labeling intensities per cell area as function of UT<sup>eGFP</sup>

intensity per cell area, in the different treatment conditions described in A. Significant positive correlations were detected after treatment with UII ( $10^{-10}$  and  $10^{-8}$  M). D, Immunofluorescence analysis of SW1088-UT<sup>eGFP</sup> (green) labeled with an antibody directed against vinculin (red) after 10 min of UII treatment. Overlay images indicate no subcellular colocalization of UT and vinculin, and UT distribution at the plasma membrane in control and UII  $10^{-11}$  M conditions, and in filopodia after UII ( $10^{-10}$  and  $10^{-8}$  M treatment). In red, vinculin enlarged stained FA are distributed adjacent to UT<sup>eGFP</sup> present in filopodia. Scale bars, 25  $\mu$ m. Lower, quantification of FA area in the absence or the presence of UII  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$  and  $10^{-8}$  M (10 min or 1h) of recombinant SW1088 UT<sup>eGFP</sup>. Mann and Whitney test, ns, non significant, \*\*,  $P < 0.01$ .

**Figure 8.** General proposed schema illustrating the chemotactic behavior of the urotensinergic system on glioma migration and the impact of higher homogenous concentration of UII on glioma adhesion. In astroglial tumoral cells, a specific high affinity UT at resting state, activated by low gradient concentrations would couple to  $G_{i/o}$  engaged in lipid raft and/or  $G_{13}$  proteins more motile (A). During this early phase, UT may signal to favor “clustering” in lipid raft containing  $G_{i/o}$  protein at the leading edge whereas non lipid rafts receptor may kept  $G_{13}$  coupling and remain randomly distributed trough out the cell (B). During chemotaxis,  $G_{i/o}$  coupled UT at the leading edge may promote protrusions through PI3K/PIP<sub>3</sub>/Rac and/or Cdc42 (A and B) whereas  $G_{13}$ -coupled receptors at the rearing stage of cells may recruit Rho/ROCK/MLCK proteins and provoke contraction of actomyosine (A and B). In the absence of chemotaxis, when cells are exposed to homogenous higher concentrations of UII, lipid rafts are likely randomly distributed and the UT/ $G_{i/o}$ /integrin pathway may force adhesion in lamellipodia (A and B).

**Supplementary legends to Figures**

**Figure S1. Chemotactic effect of UII on U87 cell migration.** A, U87 glioblastoma cells were plated in the top chamber of fibronectin-coated polycarbonate transwell membranes (8  $\mu\text{m}$  pore size) and increasing concentrations of UII ( $10^{-13}$  to  $10^{-7}$  M) were added in the bottom well for 24h. Cell motility was evaluated by counting cells in 10 random fields after eosin (0.2%)/hematoxylin (0.7%) counterstaining and data are expressed as the percentage as compared to non treated cells (control). A gradient of UII at  $10^{-9}$  and  $10^{-8}$  M stimulated U87 directional migration. Data correspond to the mean of a representative experiment from 2 independent ones in triplicates. B, Wound healing assay showing *in vitro* directional migration of U87 after a scratch of a confluent cell layer in the absence (FBS<sup>-</sup>) or the presence of FBS (FBS<sup>+</sup>) and UII ( $10^{-10}$  and  $10^{-8}$  M). Photographs were taken at T0h and T16h after scratch injury and showed that UII ( $10^{-10}$  and  $10^{-8}$  M) enhanced the covered surface compared to control (FBS<sup>-</sup>).

**Figure S2. Control experiments on UT<sub>ERY(AAA)</sub> mutant expressed in HEK and on G <sub>$\alpha$ 13</sub> expression in SW1088.** A, Western blot analysis showing expression of UT<sup>c-myc</sup> (HEK-UT) and the UT<sub>ERY(AAA)</sub><sup>c-myc</sup> mutant (HEK- UT<sub>ERY(AAA)</sub>) revealed with an anti-c-myc after 48h transient transfection. Two major bands were detected for UT and UT<sub>ERY(AAA)</sub> at ~40 and 46 KDa compared to HEK-pCMV<sup>c-myc</sup>. B, Expression of UT<sup>c-myc</sup> and UT<sub>ERY(AAA)</sub><sup>c-myc</sup> mutant expressed as receptors in whole cells (permeabilized) or only at the cell plasma membrane (non-permeabilized) using anti-c-myc antibody and revealed by ELISA assay. The UT<sub>ERY(AAA)</sub> mutant was significantly expressed at the plasma membrane and showed similar expression than UT. C, HEK-293 were transiently transfected with cDNA encoded pCMV<sup>c-myc</sup>, UT<sup>c-myc</sup> or UT<sub>ERY(AAA)</sub><sup>c-myc</sup> and incubated with the Ca<sup>2+</sup> fluorescent probe Fluo 3. Application of UII ( $10^{-7}$  M)-induced a maximum amplitude of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transients expressed as



percentages of the corresponding control values in the absence of UII. Data are mean  $\pm$  SEM from a representative experiment in triplicate. D, Western blot analysis showing expression of  $G_{\alpha 13}$  after 48h transfection of SW1088 with control siRNA (Si-Ctrl) or siRNA directed against human  $G_{\alpha 13}$ . The detection of a major band around 43 kDa was reduced after the Si- $G_{\alpha 13}$  whereas expression of actin remained unaltered.

**Figure S3. Inhibition of HEK-UT cell motility in the cloning ring assay.** A, spheroids of HEK-293 transfected with cDNA encoding UT were formed in cloning ring during 24h in fibronectin, and then were incubated in the absence (control) or the presence of UII ( $10^{-13}$  to  $10^{-7}$  M) during 48h. Top panel indicates a representative phase contrast photography of spheroid morphology at T0 (small dotted white line) and T48h (large dotted white line). The bottom panel represents the quantification of spheroid outgrown corresponding to the spheroid surface area measured at 48h normalized to its area at T0. UII tested from  $10^{-12}$  to  $10^{-6}$  M drastically blocked cell expansion. B, Top panel, Photographs of spheroids of HEK-293 expression  $UT^{eYFP}$  (green cells) acquired from time lapse microscopy over a 14h-imaging period. Bottom panel, Motility of border cells expressing non expressing (UT<sup>-</sup>) or expressing (UT<sup>+</sup>) UT, in the absence (control) or the presence of UII ( $10^{-8}$  M) during 14h. It can be noticed that UT-positive cells covered less distance even in the absence of UII than UT negative cells.

**Figure S4. Effect of homogenous UII concentrations on subcellularlocalization of UT and lamellipodia formation.** SW1088 were transfected with cDNAs encoding  $UT^{eGFP}$  (SW1088- $UT^{eGFP}$ ) and incubated in the absence (control) or the presence of UII ( $10^{-11}$ ) for 10 min and ( $10^{-8}$  M) for 1h. Immunofluorescence analysis of SW1088  $UT^{eGFP}$  (green) indicating subcellular localization of UT. Arrows indicate the formation of lamellipodia. Scale bars, 50  $\mu$ m.





























## Partie 2.

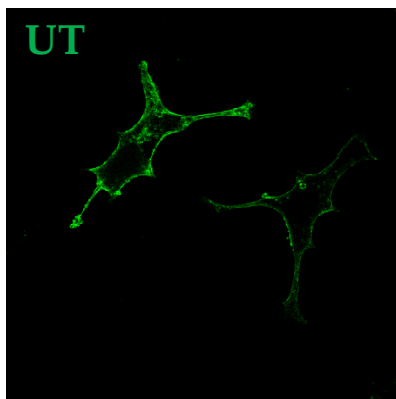
### Recherche des partenaires protéiques de l'UT:

#### Étude de l'interaction fonctionnelle entre l'UT et la filamine A

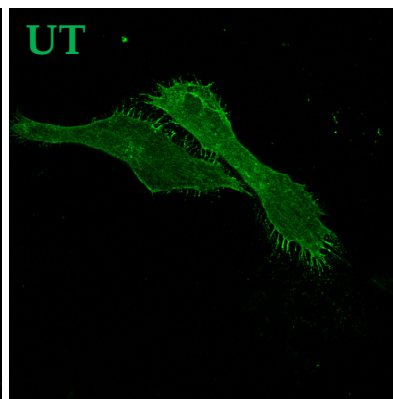
Nos données ont permis de mettre en évidence le potentiel changement et/ou adaptation de couplage de l'UT en réponse à un gradient chimiotactique d'UIII ou à une concentration homogène de ligand. Nos données préliminaires suggèrent que le domaine C-terminal de l'UT joue un rôle majeur dans les mécanismes de migration de la lignée HEK293 exprimant l'UT humain recombinant. Ainsi, dans la suite de l'étude 1, nous avons abordé les questions suivantes :

- ◆ Quels sont les partenaires protéiques capables de s'associer physiquement avec le fragment cytosolique C-terminal de l'UT humain?
- ◆ Quels sont les domaines de la filamine A, une des protéines identifiées, qui participent à l'interaction réciproque avec l'UT ?
- ◆ La filamine A peut-elle jouer un rôle sur la dimérisation de l'UT, sa localisation subcellulaire et/ou son internalisation/recyclage à la membrane plasmique ?
- ◆ La filamine A est-elle co-exprimée avec l'UT dans les gliomes, et participe-t-elle aux changements de couplage du récepteur conduisant aux effets chimiokines du peptide UII ?

Cellules M2



Cellules A7



## 1. Introduction

Les données de la littérature présentées dans l'introduction générale de cette thèse, indiquent que l'activation du récepteur UT entraîne classiquement une augmentation de la concentration cytosolique de calcium ( $[Ca^{2+}]_c$ ) consécutive au recrutement d'une protéine  $G_q$  et à l'activation de la PLC (Douglas *et al.*, 2004a), mais le couplage de l'UT avec une protéine G de type *i/o* a aussi été décrit sur des cellules exprimant l'UT humain recombinant (Ziltener *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2006b; Jarry *et al.*, 2010), sur des astrocytes corticaux de Rat en culture (Desrues *et al.*, 2008; Jarry *et al.*, 2010) et sur une lignée de rhabdomyosarcome (Douglas *et al.*, 2004b). Dans ce dernier exemple, les auteurs ont démontré qu'en présence de PTX, le signal calcique était diminué de 40% suggérant un couplage simultané de l'UT à la fois à la protéine  $G_q$  et  $G_{i/o}$ . De plus, il apparaît, comme pour de nombreux RCPGs, que la stimulation prolongée de l'UT recombinant conduit à l'internalisation lente du récepteur et/ou au recrutement de  $\beta$ -arrestines (Giebing *et al.*, 2005; Proulx *et al.*, 2005), et suggère que certaines voies de signalisation de l'UT impliquent son domaine C-terminal et ne sont pas relayées par des protéines G (Proulx *et al.*, 2005; Desrues *et al.*, 2012).

### 1.1. Transactivation UT-EGFR et prolifération, survie et/ou hypertrophie

Dans ce contexte, l'existence d'interactions fonctionnelles bidirectionnelles a été clairement démontrée entre certains RCPGs et RTKs. Au niveau du SNC, ces mécanismes participent à la prolifération, la différenciation, la croissance ou la survie cellulaires (Shah and Catt, 2004). Ainsi, de nombreux effets mitogènes relayés par des RCPGs s'exerceraient *via* la transactivation spécifique de l'EGFR et la phosphorylation intrinsèque de ses résidus tyrosine (Shah and Catt, 2004), et pourraient impliquer l'activation de métalloprotéases membranaires de la famille des ADAMs. Ces mécanismes sont possibles grâce à des protéines « chaperonnes » présentant dans leur structure des domaines de type SH3, qui peuvent



interagir avec des séquences consensus riches en prolines (motifs poly-prolines). De tels motifs sont retrouvés dans le fragment C-terminal de certains RCPGs, dont le récepteur du kisspeptine (Kiss1R) et notamment de l'UT humain, ainsi que dans les ADAMs.

Le système urotensinergique présente des effets mitogènes sur de nombreux types cellulaires natifs ou recombinants et hypertrophiques sur des cardiomyocytes (voir Tableau 10, page 120). L'activation de ERK joue un rôle central dans ces effets, à la fois sur des lignées transfectées avec le cDNA codant l'UT humain (Ziltener *et al.*, 2002) ou sur des cellules natives exprimant le récepteur, *i.e.* cellules épithéliales rénales de Porc (Matsushita *et al.*, 2003), ou cellules musculaires lisses de Rat (Zhang *et al.*, 2012) (Voir Figure 21B). La phosphorylation de ERK induite par l'UII dans des cardiomyocytes requiert en partie la phosphorylation de l'EGFR, responsable de l'induction d'une hypertrophie cellulaire (Onan *et al.*, 2004). La transactivation de l'EGFR par l'UT serait aussi relayée par l'activation d'une ADAM et le clivage consécutif d'un précurseur de l'EGF, l'HB-EGF, libérant ainsi le ligand de l'EGFR (Onan *et al.*, 2004; Sue *et al.*, 2009). De plus, Proulx et coll. (2008) ont démontré que l'UT est capable de transactiver l'EGFR et d'activer ERK dans la lignée COS-7 indépendamment du couplage aux protéines G (Proulx *et al.*, 2008b). Les données obtenues dans les cellules HEK293 exprimant un UT recombinant, suggèrent enfin que la transactivation de l'EGFR fait intervenir les  $\beta$ -arrestines et favorise la survie cellulaire (Esposito *et al.*, 2011). Ainsi, certaines voies impliquant la  $\beta$ -arrestine et les RTKs tels que l'EGFR pourraient directement impliquer le domaine C-terminal de l'UT.

## 1.2. Implication du domaine C-terminal cytosolique de l'UT dans la signalisation

L'analyse structurelle ([www.scansite.mit.edu/motifscan](http://www.scansite.mit.edu/motifscan)) du fragment cytosolique C-terminal de l'UT (UT<sub>Cterm</sub>) cloné chez les mammifères (Figure 20) montre la présence de séquences consensus de phosphorylation par des sérine/thréonine kinases (Chimpanzé, Bonobo, Homme, Gibbon, Souris, Rat). En particulier, les résidus sérine associés en cluster

(S350-353) et situés dans l'UT<sub>Cterm</sub> de Rat (Proulx *et al.*, 2005) sont relativement conservés et joueraient un rôle clef dans les processus d'internalisation/désensibilisation du récepteur. En revanche, deux motifs polyprolines de type I (K/RXXPXXP) et II (PXXPXR/K), connus pour interagir avec des protéines à domaines SH3 sont exclusivement retrouvés dans l'UT<sub>Cterm</sub> hominoïde (Figure 20).

Ainsi, la présence de motifs polyprolines de type I et II dans l'UT<sub>Cterm</sub> humain nous a conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle les effets mitogènes connus de l'UII (survie), et/ou les effets chimiokines que nous avons mis en évidence dans le présent travail, seraient en partie dus à l'interaction de l'UT<sub>Cterm</sub> avec des partenaires intracellulaires à domaines SH3 capables de transactiver l'EGFR ou un autre RTK. De plus, l'activation de l'UT et le recrutement de partenaires protéiques pourraient participer au développement et au contrôle de la tumorigenèse en activant aussi directement la migration cellulaire et la néoangiogenèse. L'objectif de cette deuxième partie de résultats consiste à identifier, par la technique du double-hybride, les partenaires protéiques cytoplasmiques de l'UT<sub>Cterm</sub> humain par criblage d'une banque d'ADNc de cerveau humain adulte et à rechercher l'implication de l'un de ces partenaires, la filamine A, dans les mécanismes de migration/invasion tumoraux relayés par l'UII.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Produits chimiques

L'UII humaine (hUII; Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val) a été achetée chez Polypeptide laboratories (Strasbourg, France). Les anticorps primaires dirigés contre l'UT (M250), la filamine A, la phospho-filamine A, c-myc et les anticorps secondaires *HRP-conjugated anti-rabbit*, *HRP-conjugated anti-mouse*, *FITC-conjugated goat anti-rabbit* et *FITC-conjugated goat anti-mouse* proviennent de chez Santa-Cruz (Tebu Bio, Le Perray-en-Yvelines, France). La poly-L-ornithine, la fibronectine, les cocktails d'inhibiteurs de

proteases, le paraformaldéhyde (PFA), le *normal donkey serum* (NDS), le Mowiol, la saponine ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Les anticorps secondaires *Alexa 488-conjugated donkey anti-rabbit* et *Alexa 594-conjugated donkey anti-mouse*, le 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI), la Lipofectamine™ 2000 ont été obtenus chez Invitrogen (Fisher Scientific, Illkirch, France). La R415 rhodamine phalloïdine provient de Molecular Probes (Fisher Scientific, Illkirch, France). La coelentérazine h a été achetée chez Promega (Charbonnières-les-bains, France). Le *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), le milieu de Leibovitz L-15, les acides aminés non essentiels (NEAA), le sodium pyruvate, la solution d'antibiotiques-antimycotique, le PBS ont été achetés chez Gibco (Fisher Scientific, Illkirch, France). Le sérum de veau fœtal (SVF) et le sérum de veau nouveau né (SVN) sont commercialisés par Lonza (Bâle, Suisse) et la *Bovin Serum Albumin* (BSA) a été achetée chez Roche (Fisher Scientific, Illkirch, France). Le NP-40 provient de Calbiochem (Fisher Scientific, Illkirch, France) et le Triton X-100 de VWR (Fontenay-sous-Bois, France). La glutathione sépharose a été achetée chez GE Healthcare (Velizy-Villacoublay, France).

## 2.2. Constructions plasmidiques

Pour le clonage de la partie C-terminale de l'UT (UT<sub>Cterm</sub>, aa319-aa389), la partie correspondante de l'ADNc de l'UT humain dans pcDNA3.1 (UMR cDNA Resource Center, MI, USA) a été amplifiée (*Platinum Pfx DNA polymerase*, Fisher Scientific, Illkirch, France) et les produits PCR ont été sous-clonés en utilisant les sites de restriction EcoRI et SalI de pGBKT-7 ou les sites EcoRI et BamHI de pGEX-2T (Tableau 14). Les mutants tronqués de l'UT<sub>Cterm</sub> ont été générés en utilisant des oligonucléotides dessinés pour obtenir l'UT<sub>319-351</sub>, l'UT<sub>319-370</sub>, l'UT<sub>332-389</sub>, l'UT<sub>351-389</sub> et l'UT<sub>351-389</sub>. Les mutants UT-(P<sup>374-377</sup>A) et UT-(P<sup>382-385</sup>A) ont été construits par mutagenèse dirigée (*QuickChange Site-directed mutagenesis II*; Roche) en utilisant l'UT<sub>Cterm</sub> inséré dans pGBKT-7 comme matrice et des oligonucléotides pour introduire des Alanines à la place des Pro<sup>374</sup>, Pro<sup>377</sup>, Pro<sup>382</sup> et Pro<sup>385</sup> (Tableau 14). Les

produits PCR ont été sous-clonés avec les sites de restrictions EcoRI et Sali de pGBKT-7 après digestion avec les mêmes enzymes de restriction. La mutagenèse a été confirmée par séquençage automatique de nucléotides. Pour la fusion de l'UT avec eYFP et RLuc, l'ADNc de l'UT humain dans pcDNA3.1 a été amplifié par PCR et sous-cloné en utilisant les sites EcoRI et BamHI de peYFP-N1, et les sites HindIII et KpnI de RLuc (pCDNA3-RLuc; fourni par le Dr L. Prézeau, IGF, Montpellier, France). Les mutants tronqués de l'UT dans peYFP-N1 ont été générés en utilisant des oligonucléotides dessinés pour obtenir l'UT<sub>319</sub>, l'UT<sub>332</sub>, l'UT<sub>351</sub> et l'UT<sub>370</sub>.

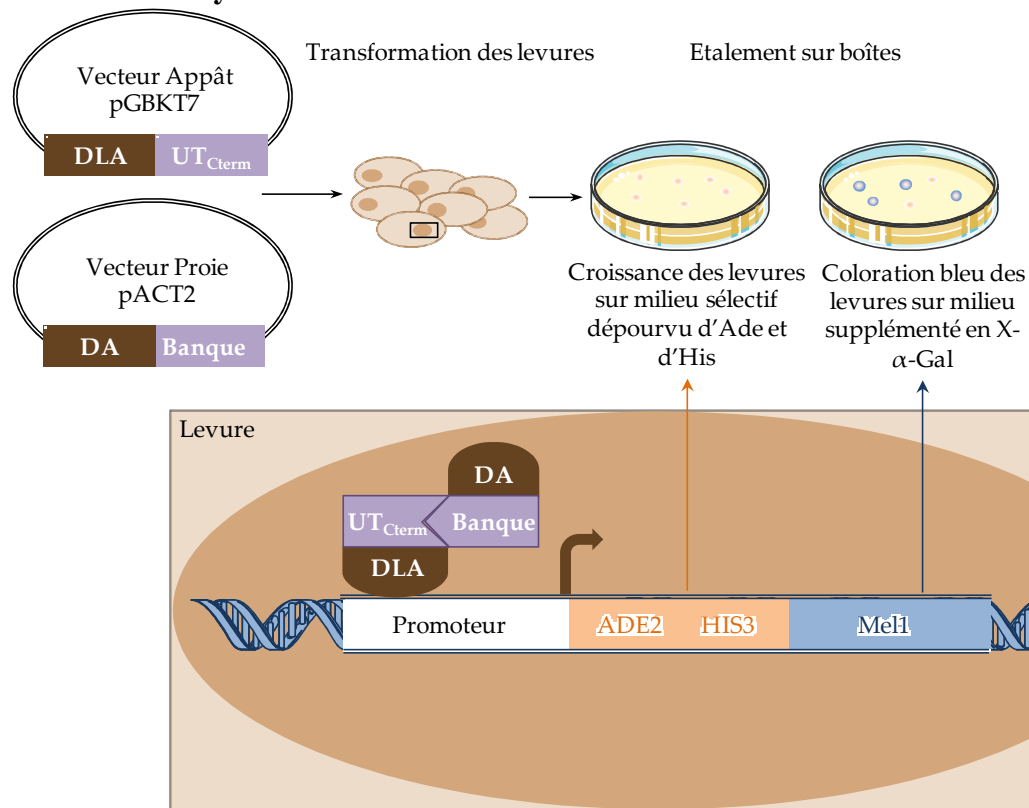
<b>Double-hybride</b>		
Construction appât pGBKT7-UT <sub>Cterm</sub>	UT <sub>319-389</sub> Eco-s	5'-GATCGAATTCACCAGGAACCTACCGCGACCAC-3'
	UT <sub>319-389</sub> Sal-as	5'-AAGTCGACTCACGCCGGGGCCCTGGGA-3'
Construction appâts tronqués pGBKT7-UT <sub>Cterm</sub>	UT <sub>351</sub> Sal-as	5'-GATCGTCTGACTCAGAGGCTGTCAGTGGGCTGTGG-3'
	UT <sub>370</sub> Sal-as	5'-GATCGTCTGACTCAGAAGCGGGCGGGGCTGC-3'
	UT <sub>332</sub> Eco-s	5'-GATCGAATTCGGCCCCGGGCAGCGGGGA-3'
	UT <sub>351</sub> Eco-s	5'-GATCGAATTCCTCCAGCGCTGTTCGGGCCG-3'
Mutagenèse dirigée pGBKT7-UT <sub>Cterm</sub>	UT <sub>370</sub> Eco-s	5'-GATCGAATTCCTCGTGCTGGCCCCAGCGG-3'
	UT-(P <sup>374-377</sup> A)-s	5'-AGCCTCGTGCTGGCCGCAGCGCCGCGGCCGACCTGCGC-3'
	UT-(P <sup>374-377</sup> A)-as	5'-GCGCAGGTCGGGCCGCGCCGCTGCGGCCAGCAGGAGGCT-3'
	UT-(P <sup>382-385</sup> A)-s	5'-CCGGCCCCGACCTGCGGCCGAGGGTGCCAGGGCCCCGGCGT-3'
	UT-(P <sup>382-385</sup> A)-as	5'-ACGCCGGGGCCCTGGCACCCCTCGGCCGAGGTCGGGCCG-3'
<b>GST-pull down</b>		
Construction appât pGEX2T-UT <sub>Cterm</sub>	UT <sub>319-389</sub> Bam-s	5'-GATCGGATCCACCAGGAACCTACCGCGACCA-3'
	UT <sub>319-389</sub> Eco-as	5'-GATCGAATTCACGCCGGGGCCCTGGGA-3'
<b>BRET</b>		
Construction UT <sup>RLuc</sup>	UTRLucHind3-s	5'-ACTGAAGCTTAATGGCGCTGACCCCCGAGTCCCCGAGC-3'
	UTRLucKpn1-as	5'-ACTGCGAGCTAACGCCGGGGCCCTGGGACCCTCGGG-3'
Construction UT <sup>eYFP</sup>	UTeYFPBamH1-as	5'-ACTGGGATCCAACGCCGGGGCCCTGGGACCCTCGGG-3'
	UTEco-s	5'-ATGCGAATTCGGATGGCGCTGACCCCCGAGT-3'
Construction UT <sup>eYFP</sup> tronqués	UTEco-s	5'-ATGCGAATTCGGATGGCGCTGACCCCCGAGT-3'
	UT <sub>319</sub> eYFPBam-as	5'-ACTGGGATCCTTGGTGAGCAGCGTGTAGAGGAA-3'
	UT <sub>332</sub> BamYFP-as	5'-GATCGGATCCCCGGCCCCGCACGCGGCCGCGC-3'
	UT <sub>351</sub> BamYFP-as	5'-GATCGGATCCCCGAAGCGGGCGGGGCTGC-3'
	UT <sub>370</sub> BamYFP-as	5'-GATCGGATCCCCGAGGCTGTCAGTGGGCTGTGG-3'
Construction filamine A <sup>eYFP</sup>	FilaNheI-s	5'-ACTGGCTAGCGATGAGTAGCTCCACTCTCGGG-3'
	FilaHindIII-as	5'-ACTGAAGCTTGGGCACCACAACGCGGTAGG-3'
Construction Filamine A <sub>16-24</sub> <sup>eYFP</sup>	Fila1793NheI-s	5'-ACTGGCTAGCGATGAAGGGCGAGATCACAGGGGAG-3'
	FilaHindIII-as	5'-ACTGAAGCTTGGGCACCACAACGCGGTAGG-3'
<b>Co-immunoprécipitation</b>		
Construction UT <sup>c-myc</sup> et UT <sup>HA</sup>	UTEco-s	5'-ATGCGAATTCGGATGGCGCTGACCCCCGAGT-3'
	UTXho-as	5'-AAACTCGAGTCACGCCGGGGCCCTGGG-3'

**Tableau 14. Amorces sens (s) et anti-sens (as) utilisées pour réaliser les différents construits.**

Pour la fusion de la filamine A avec eYFP, l'ADNc de la filamine A humaine dans pcDNA3-c-myc (Addgene, Cambridge, USA) a été amplifié par PCR et sous-cloné en

utilisant les sites *NheI* et *HindIII* de *peYFP-N1*. Le mutant tronqué de la filamine A a été généré en utilisant des oligonucléotides dessinés pour obtenir les domaines 16 à 24 de la filamine A. Enfin, pour l'étiquetage de l'UT avec les épitopes HA (UT<sup>HA</sup>) ou c-myc (UT<sup>c-myc</sup>), l'ADNc de l'UT humain inséré dans *pcDNA3.1* a été amplifié et les produits PCR ont été sous-clonés en utilisant les sites de restriction *EcoRI* et *XhoI* de *pCMV-c-myc* et *pCMV-HA* (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France).

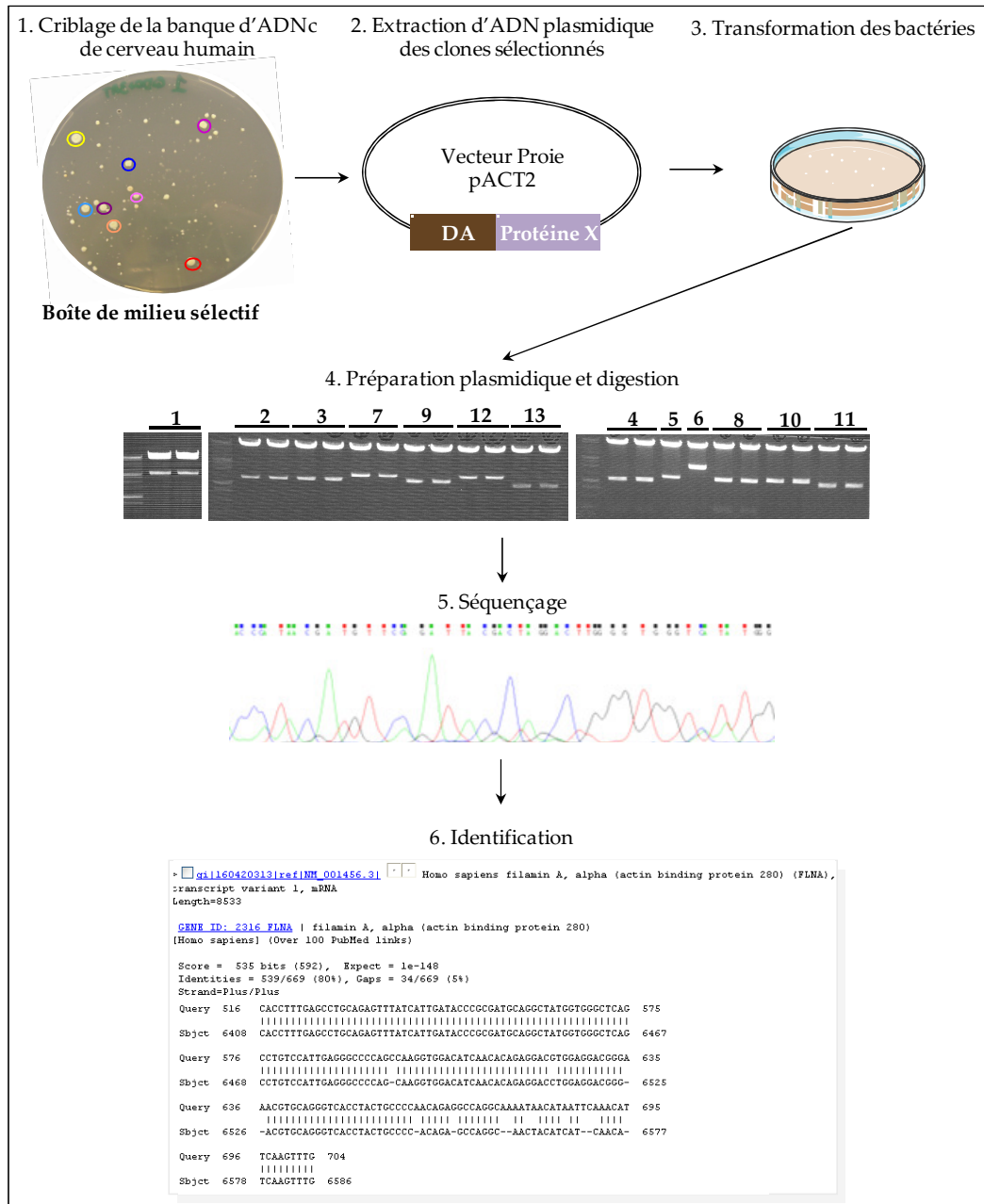
### 2.3. Le double-hybride



**Figure 22. Représentation schématique du principe du double-hybride appliqué à la recherche de partenaires protéiques de l'UT humain.** Un vecteur appât codant l'UT<sub>Cterm</sub> fusionné au domaine de liaison à l'ADN (DLA) d'un facteur de transcription, et un vecteur proie codant une protéine de banque fusionnée au domaine d'activation (DA) du même facteur de transcription, sont introduits dans une même levure. L'interaction physique de l'UT<sub>Cterm</sub> avec une protéine de banque conduit à la reconstitution d'un facteur de transcription fonctionnel permettant l'activation des gènes rapporteurs nutritionnels *ADE2* et *HIS3*, et du gène rapporteur enzymatique *Me11*, codant l' $\alpha$ -galactosidase capable de convertir le substrat chromogène X- $\alpha$ -Gal en produit bleuté.

Un criblage par double-hybride d'une banque d'ADNc de cerveau humain adulte (fournie par le Dr J. M. Flaman, U614 Inserm) a été réalisé à l'aide du kit Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) dans la souche de levure *S.*

*Cerevisiae* AH109 contenant les gènes rapporteurs *ADE2*, *HIS3* et *LacZ* sous le contrôle de la séquence d'activation du facteur de transcription Gal4 située en amont de ces gènes (Figure 22).



**Figure 23. Identification des clones positifs issus du criblage de la banque d'ADNc de cerveau humain adulte.** 1. Un criblage de banque d'ADNc de cerveau humain adulte permet d'isoler sur milieu sélectif 75 clones positifs d'une première génération. 2. L'ADN plasmidique des clones positifs est extrait. 3. L'ADN plasmidique est ensuite transformé dans la bactérie. L'utilisation d'un milieu additionné en kanamycine permet uniquement la sélection de clones bactériens contenant le vecteur proie pACT2 ayant un gène de résistance à la kanamycine. Pour chaque clone de levure positif, le plus souvent, deux clones bactériens sont choisis. 4. Une préparation plasmidique de ces clones bactériens est réalisée, puis une digestion est effectuée afin de vérifier la présence de l'insert. 5. L'ADN plasmidique est ensuite séquençé à l'aide des amorces sens pACT2s et/ou anti-sens T7. 6. Les résultats de séquençage permettent l'identification de la protéine partenaire à l'aide du site *nucleotide blast*.

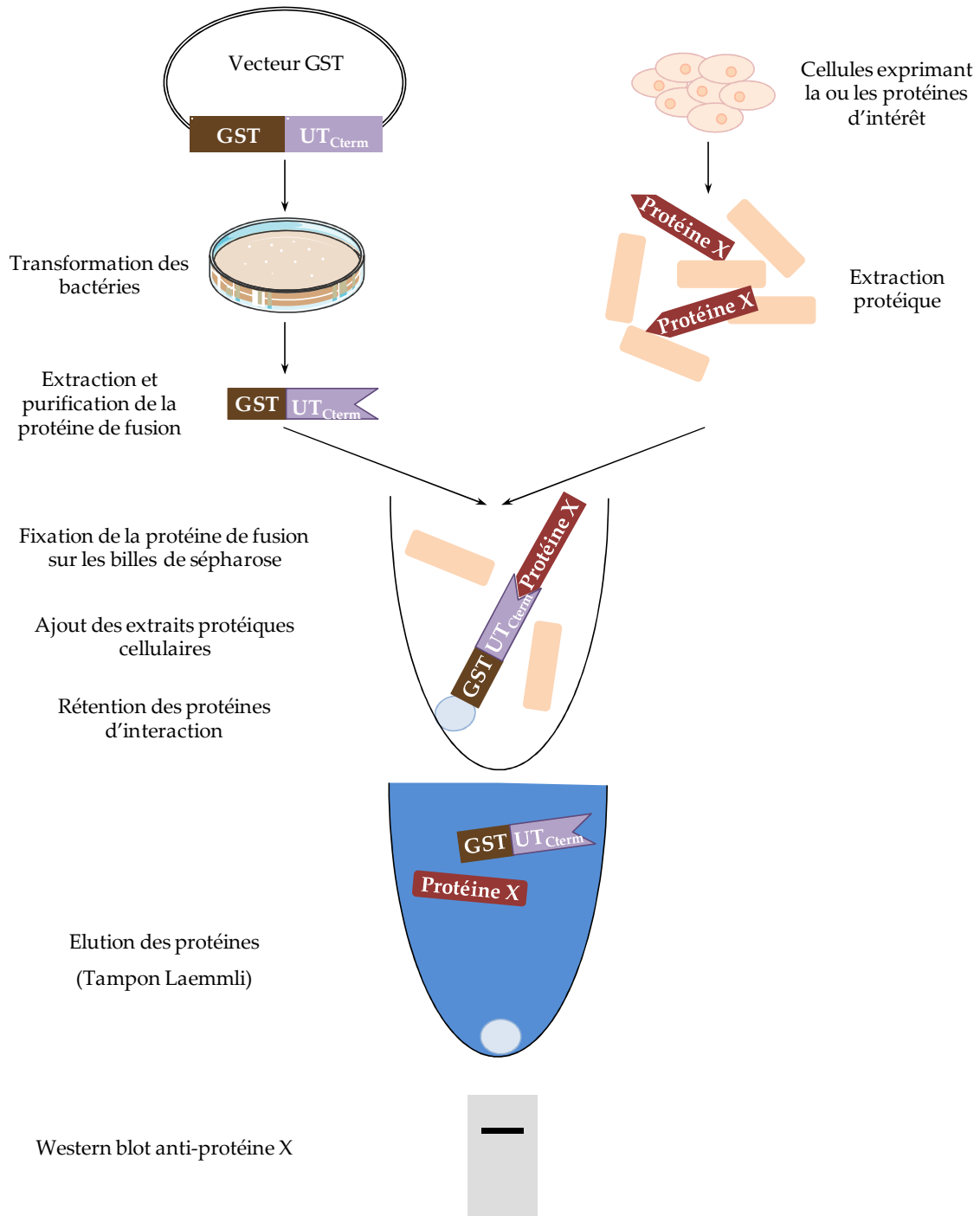
Brièvement, l'ADNc codant l'UT<sub>Cterm</sub> a été sous-cloné en phase avec le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 dans le vecteur pGBKT7. Ce dernier a été utilisé en tant qu'« appât » pour cribler la banque d'ADNc de cerveau humain adulte construite dans le vecteur pACT2, contenant le domaine d'activation de Gal4 en phase avec les ADNc « proies ». Les levures co-transformées par ces vecteurs ont été étalées sur milieu synthétique minimum sélectif (déprivé de leucine, de tryptophane, d'adénine et d'histidine) additionné en 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT). L'ADN plasmidique des colonies a ensuite été extrait, retransformé dans des bactéries, puis séquencé (Figure 23). Les séquences nucléotidiques des « proies » ont été identifiées à l'aide du logiciel *nucleotide blast* (blastn, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) par comparaison avec les banques de données nucléotidiques humaines (Figure 23). Les ADN plasmidiques des clones positifs ont finalement été testés individuellement avec l'appât UT<sub>Cterm</sub> ou un appât irrelevant sur milieu sélectif ou supplémenté en X- $\alpha$ -Gal afin de vérifier la spécificité de l'interaction.

#### 2.4. Transfection

Afin d'étudier les interactions entre l'UT et la protéine partenaire filamine A, dans des modèles de cellules eucaryotes, les transfections transitoires d'ADN plasmidiques ont été réalisées avec de la Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) ou du FuGene 6 (Promega) suivant les instructions du fournisseur.

#### 2.5. GST-pull down

Pour les expériences de GST-pull down (glutathione S transférase-pull down, Figure 24), le fragment C-terminal de l'UT (UT<sub>Cterm</sub>), fusionné à la séquence codante GST du plasmide pGEX-2T, a été exprimé et produit dans la bactérie *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS (Lucigen) ou Rosetta-2 (Novagen).



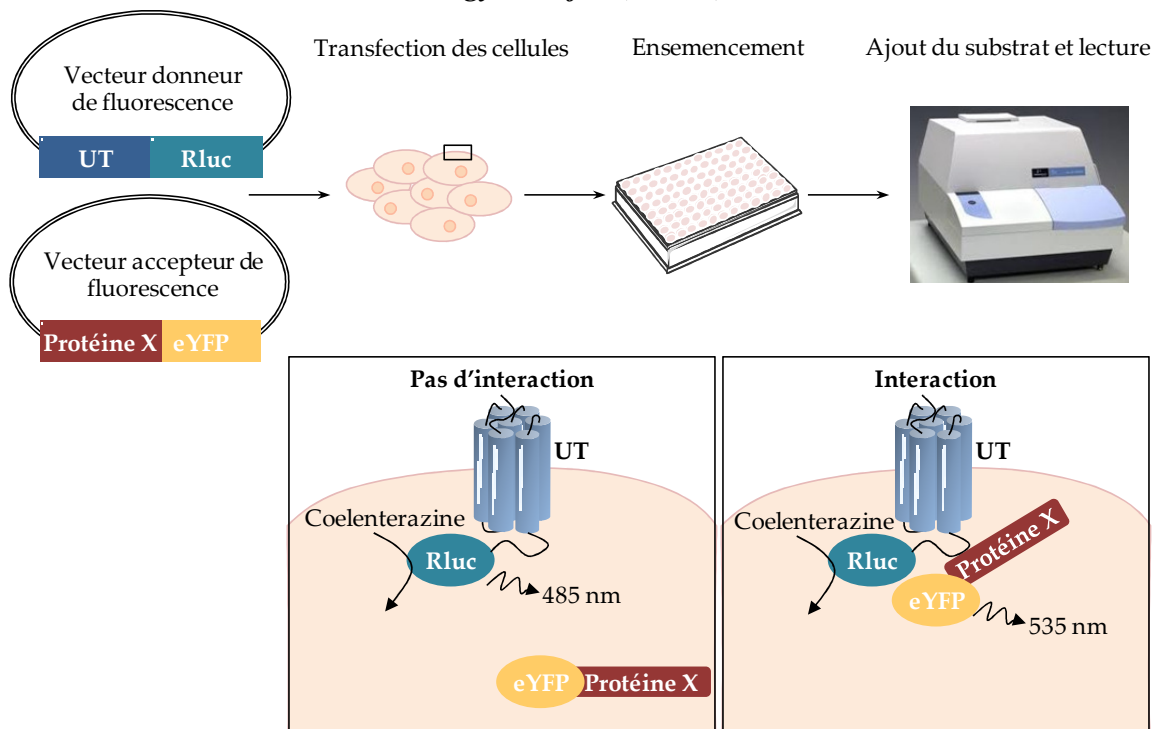
**Figure 24. Représentation schématique du principe du GST-pull down appliqué à la recherche de partenaires protéiques de l'UT humain.** Un vecteur codant le fragment C-terminal de l'UT ( $UT_{Cterm}$ ) fusionné à la GST est transformé dans des bactéries à partir desquelles la protéine de fusion GST- $UT_{Cterm}$  est produite et purifiée. Parallèlement, des extraits protéiques cellulaires issus de lignées sur-exprimant la protéine X sont préparés. Pour les expériences de *pull down*, la protéine GST- $UT_{Cterm}$  est immobilisée sur des billes de glutathione sépharose, puis mélangée aux extraits cellulaires et le mélange est incubé une nuit à 4°C sous rotation. Après 4 lavages, les protéines interactantes sont éluées dans du tampon Laemmli (Tris-HCl, glycerol, SDS,  $\beta$ -mercaptoethanol, Bleu de commassie) et analysées par Western blot.

Les protéines GST ou GST- $UT_{Cterm}$ , préalablement purifiées, sont immobilisées sur glutathione sépharose. Des extraits protéiques de cellules HEK293 surexprimant la protéine



filamine A<sup>c-myc</sup>, de cellules M2 ou de cellules A7 (M2: cellules de mélanome filamine A<sup>-</sup>, A7: cellules de mélanome filamine A<sup>+</sup>, Collaboration F. Nakamura, Brigham and Women's Hospital, Translational Medicine, Boston, USA) sont préparés dans du tampon de liaison (50 mM Tris, DTT 2 mM, NaF 50 mM, inhibiteur de protéase 1X). Pour les expériences de *pull down*, les extraits protéiques (200 µg) sont incubés en présence de la protéine de fusion GST-UT<sub>Cterm</sub> ou de la protéine GST immobilisée sur glutathione sépharose (4°C, 1 nuit, sous agitation). Après 4 lavages avec du tampon de liaison, les protéines interagissantes sont éluées par ébullition dans du tampon Laemmli durant 5 min.

## 2.6. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET)



**Figure 25. Représentation schématique du principe du BRET appliqué à la recherche de partenaires protéiques de l'UT humain.** Un vecteur donneur de fluorescence codant l'UT fusionné à la Rénilla luciférase (Rluc), et un vecteur accepteur de fluorescence codant une protéine X fusionnée à l'eYFP, sont transfectés dans les cellules HEK293. Les cellules co-transfectées sont ensemencées dans des microplaques de 96 puits et maintenues à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Après 48h, les cellules sont rincées, le substrat coelentérazine h est ajouté et le signal BRET est lu par un lecteur de microplaques. En absence d'interaction, l'énergie de luminescence émise par Rluc en présence de coelentérazine n'est pas transférée à l'eYFP qui n'est donc pas excitée. Lors d'une interaction de l'UT avec la protéine X, l'énergie de luminescence émise par Rluc après catalyse du substrat coelentérazine (485 nm), est transférée à l'eYFP qui émet alors une fluorescence à 535 nm.

Pour les expériences de BRET (Figure 25), 48 h après la transfection, les cellules sont rincées avec du PBS et le substrat de la RLuc, la coelentérazine h (Promega), est ajouté à une concentration finale de 5  $\mu$ M dans un volume total de 50  $\mu$ L/puits à 37°C. Le signal BRET est ensuite enregistré à l'aide du lecteur de plaque Victor V (Perkin Elmer, PRIMACEN) et exprimé en unités milliBRET correspondant au ratio BRET (émission à 535nm/émission à 486 nm) comme décrit précédemment (Ayoub *et al.*, 2002).

## 2.7. Culture cellulaire

Les lignées de gliome humain SW1088 [Astrocytome, *World Health Organization* (WHO) grade III] et U87 (Glioblastome multiforme, WHO grade IV) proviennent de l'*American Type Culture Collection* (ATCC, LGC Standards, Molsheim, France). Les lignées de mélanome humain déficientes en filamine A (lignée M2 Fila<sup>-</sup>) ou exprimant stablement la filamine A (lignée A7 Fila<sup>+</sup>) ont été généreusement données par le Dr F. Nakamura (Brigham and Women's Hospital, Translational Medicine, Boston, USA). La lignée HEK293 (CRL1573<sup>TM</sup>, ATCC) a été généreusement donnée par le Dr. L. Prézeau (IGF, Montpellier, France). Les lignées U87 et HEK293 sont maintenues dans un milieu DMEM contenant 2 mM de NEAA, 2 mM de sodium pyruvate, 1% d'antibiotiques-antimycotique et 10% de SVF à 37°C dans une atmosphère humide avec du CO<sub>2</sub> à 5%. La lignée SW1088 est entretenue dans un milieu contenant 2 mM de NEAA, 1% d'antibiotiques-antimycotique et 10% de SVF à 37°C dans une atmosphère humide. La lignée CHO (ECACC, Salisbury, Royaume-Uni) est maintenue dans un milieu de culture Ham's F12 contenant 10% de SVF, 2 mM de glutamine et 1% d'antibiotiques-antimycotique et incubée à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub>. Les lignées M2 et A7 sont maintenues dans un milieu MEM contenant 1% d'antibiotiques-antimycotique et 8% de SVN (sérum de veau nouveau né) et 2% de SVF à 37°C dans une atmosphère humide avec du CO<sub>2</sub> à 5%. La sélection est maintenue sur la lignée A7 par ajout de 200  $\mu$ g/mL de généticine.

## 2.8. Culture d'explants tumoraux

Les échantillons de tissus tumoraux correspondent à des glioblastomes opérés dans le département de neurochirurgie du CHU de Rouen par le Pr F. Proust après obtention du consentement des patients. Les fragments de tissus frais sont envoyés au laboratoire immédiatement après l'opération pour préparer des explants. Les échantillons sont collectés dans un milieu DMEM contenant 0,5% de SVF, 1% d'antibiotiques-antimycotique et 2 mM de sodium pyruvate. Les vaisseaux sanguins sont retirés mécaniquement de la résection tumorale et les fragments de tissu sont découpés en petits morceaux de 0,5 à 2 mm<sup>3</sup>. Les explants tumoraux sont placés sur des lamelles de verre (12 mm de diamètre, CML, Nemours, France) coatées à la poly-L-lysine placées dans des plaques 24 puits (Corning, Fisher Scientific, Illkirch, France), et sont incubés 1h dans 100 µL de milieu DMEM/Ham F12 (3/1, v/v) supplémenté en N2 (concentration finale 1X), en bFGF (10 ng/mL concentration finale), 0,4% de methyl-cellulose et 1% d'antibiotiques-antimycotique. Quand les explants tumoraux adhèrent au substrat, 200 µL de milieu sont ajoutés. Les cultures sont maintenues 2 à 4 jours avant d'être utilisées pour les expériences.

## 2.9. Co-immunoprécipitation

Après 48 h de transfection, les cellules HEK293 exprimant les construits UT<sup>c-myc</sup> et/ou UT<sup>HA</sup> sont rincées au PBS, culotées puis lysées par passages successifs dans une aiguille dans du tampon de solubilisation (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, EDTA 1 mM) supplémenté en inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich). Après ajout de NP-40 (1%, Calbiochem), les lysats cellulaires sont incubés 1 h à 4°C sous agitation. Les lysats cellulaires sont ensuite centrifugés (12000 g, 4°C, 15 min) et les surnageants clarifiés sont collectés pour réaliser l'immunoprécipitation. Des quantités égales de protéines solubilisées sont incubées avec un anticorps anti-c-myc (2 µg, 4°C, 1h) sous agitation. Des billes de protéine G sépharose (Sigma-Aldrich) sont ensuite ajoutées et le mélange est incubé toute une nuit à 4°C. Les billes

sont culotées par centrifugation et lavées 4 fois avec le tampon de solubilisation avant d'être finalement préparées dans du tampon Laemmli.

### 2.10. Migration

Les chambres de Boyden (*Transwell*, 24 puits, Corning, Fisher Scientific) présentant des membranes poreuses (pore, 8  $\mu\text{m}$ ) sont coatées avec de la fibronectine à 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (4°C, 12h). Le jour suivant, les cellules sont détachées des flasques avec de l'acutase (Millipore), centrifugées et re-suspendues dans du milieu sans sérum. Les cellules (50000/125  $\mu\text{L}/\text{membrane}$ ) sont ajoutées dans la chambre supérieure du transwell. Le gradient est généré par les molécules de la chambre contenant 600  $\mu\text{L}$  de milieu en l'absence et en présence d'UII. Les cellules sont incubées 24h (37°C), rincées avec du PBS et les cellules présentes à la surface de la chambre supérieure sont enlevées avec un coton-tige. Les cellules ayant migré, situées sur la face inférieure de la membrane sont fixées dans 4 bains successifs de méthanol (50, 70, 90 et 100%) marquées avec de l'éosine/hématoxyline et les membranes sont montées sur des lamelles de verre à l'aide de Mowiol (Sigma-Aldrich) puis microphotographiées de façon aléatoire avec un microscope Nikon (Champigny-sur-Marne, France) à raison de 10 champs par membrane. Les cellules sur les microphotographies sont comptées à l'aide du *plug-in* "Cell counter" sur le logiciel ImageJ.

### 2.11. Western blot

Les cellules sont rincées dans du PBS puis grattées dans du tampon de lyse froid (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1X d'inhibiteurs de protéases et/ou phosphatases) et homogénéisées avec 3 passages dans une aiguille. Les lysats cellulaires sont supplémentés avec 1% de détergent NP-40 (Calbiochem) et incubés (1h, 4°C) sous rotation. Les suspensions cellulaires sont centrifugées (12000 g, 30 min, 4°C), et la concentration protéique des surnageants est déterminée par la méthode de Bradford. Les échantillons protéiques sont

mélangés avec un volume égal de tampon Laemmli 2x (120 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% glycerol, 4% SDS, 0,02% Bromophenol Blue, 10%  $\beta$ -mercaptoethanol) et chargés sur le gel. Les extraits protéiques sont soumis à une électrophorèse sur gel SDS-PAGE 10%. Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond C; Amersham Biosciences, Fisher Scientific) à l'aide du Mini-PROTEAN Tetra Cell system (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette). Les membranes sont bloquées avec du lait écrémé 2% dans du TBS [10 mM Tris (pH 8,0), 0,15 M NaCl] (température ambiante, 1 h) puis incubées avec les anticorps primaires toute la nuit à 4°C sous agitation. Après 4 lavages, les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires *HRP-conjugated* (Santa Cruz, température ambiante, 2 h) et à nouveau rincées 4 fois. Les bandes immunoréactives sont visualisées à l'aide du kit ECL Western blotting substrate (Promega) et les poids moléculaires sont déterminés en utilisant le marqueur de poids moléculaires Page Ruler Plus prestained protein ladder (10-250 KDa; Fisher Scientific).

## 2.12. Immunocytochimie

Les cellules SW1088 et U87 sontensemencées sur des lamelles de verre (12 mm de diamètre, CML) pré-coatées à la fibronectine (Sigma-Aldrich) et maintenues en culture jusqu'à ce qu'elles atteignent 70% de confluence. Après fixation au PFA (4%, 10 min), les cellules sont rincées et perméabilisées avec du Triton X-100 (0,05%, 5 min) dans du PBS et les sites non spécifiques sont bloqués (NDS 2%, BSA 1%, 1 h). Les anticorps primaires dirigés contre l'UT humain (0,5  $\mu$ g/mL, Santa Cruz) la filamine A humaine (0,5  $\mu$ g/mL, Santa Cruz) ou la phospho-filamine A humaine (0,5  $\mu$ g/mL, Santa Cruz) sont incubés à 4°C toute la nuit dans du PBS supplémenté avec 0,2% de NDS et 0,1% BSA. Après rinçage, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire *Alexa 488-* ou *594-conjugated donkey anti-rabbit* ou *donkey anti-mouse* (1/200, Invitrogen) dans du PBS supplémenté avec 0,2% de NDS et 0,1% BSA (température ambiante, 2 h). Pour le marquage de la F-actine, les cellules sont incubées

avec la R415 rhodamine phalloïdine (Molecular Probes, 1,7%, 20 min), puis après rinçages au PBS, les noyaux sont marqués avec du DAPI (Invitrogen, 1 µg/mL, 10 min). Après 3 lavages supplémentaires, les lamelles sont montées sur des lames de verre avec du Mowiol (Sigma-Aldrich). Les préparations sont examinées sur un microscope confocal à balayage laser Leica TCS SP5 (DMI 6000) équipé d'un système Acousto-Optical Beam Splitter (AOBS) et d'un laser blanc permettant la flexibilité de l'excitation. Les longueurs d'onde d'excitation optimum de l'Alexa 488, l'Alexa 594, l'eGFP, et de la rhodamine ont été déterminées par balayage Lambda et utilisées pour les acquisitions.

### 2.13. Cytométrie en flux

Les cellules U87 à 80% de confluence dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup> ont été rincées et privées de SVF pendant 2 h. Après un traitement de 10 min avec l'UII 10<sup>-10</sup> M, les cellules sont rincées, détachées et centrifugées. Le culot cellulaire est lavé puis resuspendu dans du PBS contenant 1% de BSA et incubé 30 min avec 10 µg/mL d'IgGs de lapin non immun. Les cellules sont perméabilisées (BSA 1%, saponine 0,1%) et incubées avec les anticorps primaires dirigés contre la filamine A et la phospho-filamine A (2 µg/mL chaque, 30 min, RT) dans du PBS contenant 1% de BSA et 0,1% de saponine. Dans le contrôle négatif, les anticorps primaires n'ont pas été ajoutés. Les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires *FITC-conjugated goat anti-rabbit* ou *FITC-conjugated goat anti-mouse*, dilués au 1/200 et mesurés dans le canal FL1 (530 nm). Les cellules ont été analysées sur le cytomètre en flux FACScalibur (Beckton Dickinson Biosciences, Le Pont-De-Claix, France) à l'aide du logiciel CellQuest. Les cellules mortes et les débris cellulaires sont exclus de l'analyse par sélection des cellules vivantes à partir du diagramme de densité taille/structure. Les données sont représentées sur une échelle logarithmique en unité arbitraire correspondant à l'intensité de fluorescence moyenne. Chaque histogramme a été enregistré à partir d'au moins 10 000 évènements sélectionnés.

### 3. Résultats

#### 3.1. Identification par double-hybride des protéines interagissant avec l'UT

L'existence d'interactions physiques entre l'UT<sub>Cterm</sub> (appât) et des partenaires cytoplasmiques (proies) exprimés dans le SNC a été recherchée par criblage d'une banque d'ADNc de cerveau humain adulte. Le criblage d'approximativement 16 millions de co-transformants de levure sur milieu sélectif (-Leu/-Trp/-Ade/-His+3AT ou QDO+3AT) a révélé l'apparition de 74 clones positifs après 3 jours de culture (1<sup>ère</sup> génération) et de nombreux autres clones positifs après 5 jours de culture (2<sup>ème</sup> génération). Les ADN plasmidiques des 74 clones de 1<sup>ère</sup> génération et de 70 clones de 2<sup>ème</sup> génération ont été extraits, amplifiés dans des bactéries et séquencés (Figure 23). Du fait de la qualité du séquençage, seulement 85 de ces clones ont conduit à l'identification de protéines et, du fait de redondances, finalement 16 protéines différentes ont été identifiées. Afin de vérifier la spécificité d'interaction, des contrôles consistant à co-transformer et cultiver sur un milieu hautement sélectif (QDO+3AT) la levure avec les vecteurs codant la protéine proie et un appât irrelevant sont réalisés. Un test en goutte est effectué pour chaque type de clone positif à partir de levures co-transformées avec la protéine proie fusionnée au domaine d'activation du facteur de transcription Gal4 (DA-proie) et le DLA-UT<sub>Cterm</sub> ou bien un appât irrelevant (DLA-lamine). Les résultats d'interactions sont comparés avec les contrôles positif (p53+TA<sub>g</sub>) et négatifs (lamine+TA<sub>g</sub> et UT<sub>Cterm</sub>+TA<sub>g</sub>). Les résultats obtenus révèlent que 8 des 16 clones positifs identifiés, correspondant aux protéines RanBP9, NRC<sub>o</sub>A, ABCD4, BPGM, CA11, Kif2A, FRS3 et NDRG2, activent le système double-hybride en présence de l'UT<sub>Cterm</sub>, mais aussi en présence de la lamine et sont donc considérés comme des « faux positifs ».

Protéine proie	Protéine appât	Milieu non sélectif	Milieu sélectif	Milieu non sélectif +X- $\alpha$ -Gal
TAg	P53			
	Lamine			
	UT <sub>Cterm</sub>			
Filamine A	Lamine			
	UT <sub>Cterm</sub>			
CENP-V	Lamine			
	UT <sub>Cterm</sub>			
ZNF668	Lamine			
	UT <sub>Cterm</sub>			
Fibuline 5	Lamine			
	UT <sub>Cterm</sub>			
ZMYND19	Lamine			
	UT <sub>Cterm</sub>			
KDM6A	Lamine			
	UT <sub>Cterm</sub>			
LIMK	Lamine			
	UT <sub>Cterm</sub>			
KAT-5	Lamine			
	UT <sub>Cterm</sub>			

**Tableau 15. Validation de la spécificité de l'interaction de l'UT<sub>Cterm</sub> aux différentes protéines identifiées par double-hybride.**

En revanche, les tests similaires réalisés pour les proies filamine A, fibuline 5, ZMYND19 (*Zinc finger MYND domain-containing protein 19*), KDM6A (*lysine (K)-specific demethylase 6A*), LIMK (*LIM domain kinase*) et KAT-5 (*K(lysine) acetyltransferase 5*), ainsi que CENP-V (*centromere protein 5*) et ZNF668 (*zing finger protein 668*), montrent une activation spécifique des gènes rapporteurs nutritionnels en présence de l'UT<sub>Cterm</sub>. Afin de confirmer qu'une telle interaction active bien l'ensemble des gènes rapporteurs, un test en goutte a été réalisé sur des boîtes -Leu/-Trp additionnées de substrat X- $\alpha$ -Gal. L'activation du gène



rapporteur *MEL1- $\alpha$*  permet la formation d'une coloration bleue en présence de X- $\alpha$ -Gal dans les clones co-transformés par le vecteur codant l'UT<sub>Cterm</sub> et le vecteur codant les protéines filamine A, CENP-V, ZNF668, fibuline 5, ZMYND19, KDM6A, LIMK et KAT-5, confirmant ainsi l'interaction spécifique (Tableau 15).

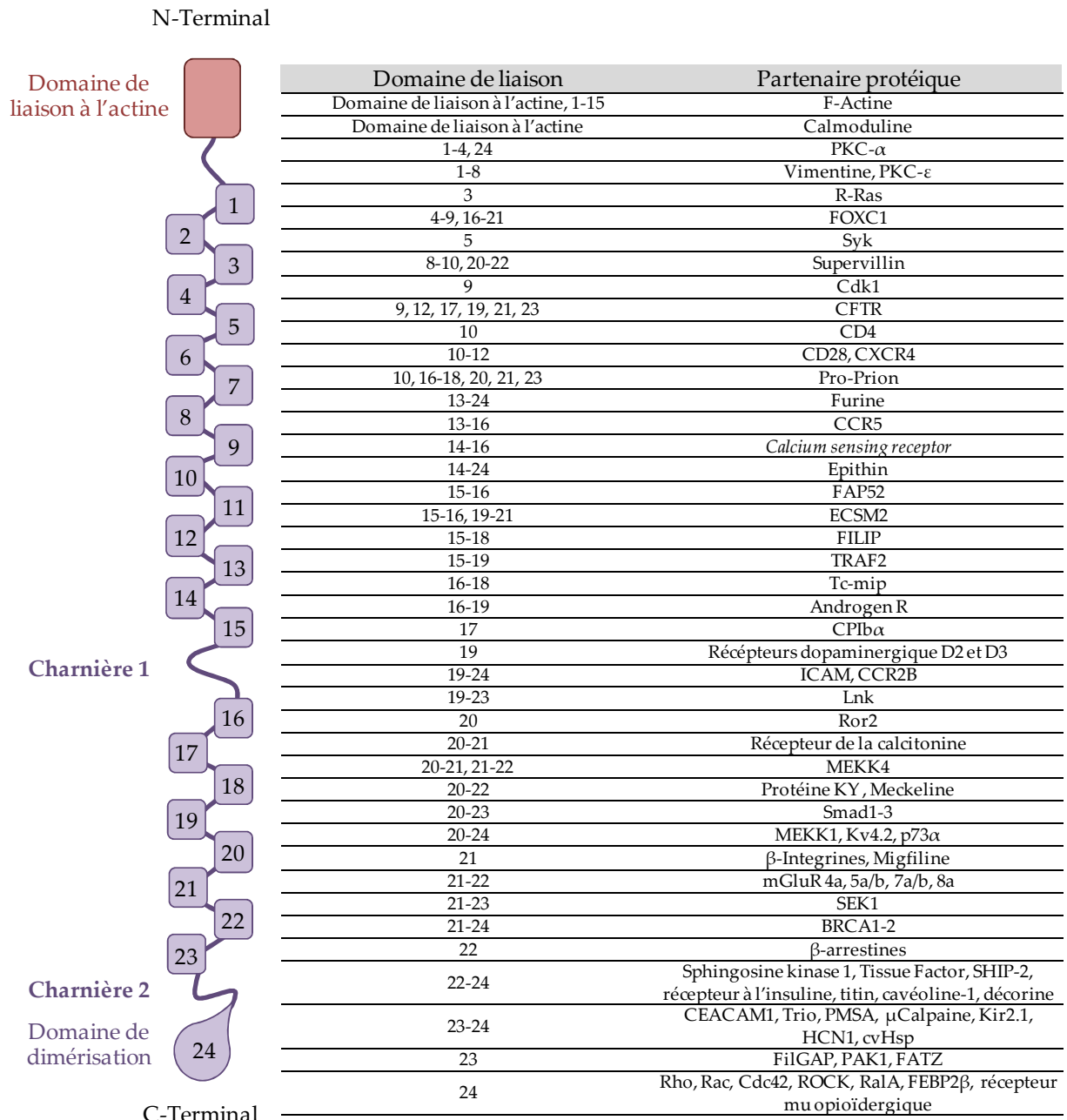
Parmi les clones positifs identifiés (Tableau 16), trois protéines semblent particulièrement intéressantes dans le contexte de la migration cellulaire. En effet, la filamine A, la CENP-V et la LIMK ont toutes trois un rôle avéré dans la migration, interagissent avec des protéines du cytosquelette telles que l'actine, les microtubules ou des protéines de signalisation telles que Cdc42 ou ROCK (Honda *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2011; Manetti, 2012) en accord avec leur localisation principalement cytoplasmique. Néanmoins, seule la filamine A est connue pour avoir des interactions avec les RCPGs notamment avec les récepteurs D2 et D3 dopaminergiques (Lin *et al.*, 2001), le *calcium sensing receptor* (Awata *et al.*, 2001), le récepteur au glutamate mGluR7 (Enz, 2002), le récepteur opioïdérique Mu (Onoprishvili *et al.*, 2003) ou encore les récepteurs chimiotactiques CCR5 et CXCR4 (Jiménez-Baranda *et al.*, 2007).

Protéines	Localisation cellulaire	Fonctions principales	Interactions connues	Références
<b>Filamine A</b>	Cytoplasme Noyau	Migration, adhésion, localisation cellulaire, facteur de transcription	Actine, calmoduline, $\beta$ -arrestines, Récepteurs dopaminergiques et somatostatinergique, Rho, ROCK, Cdc42, etc.	Yue <i>et al.</i> , 2013
<b>CENP-V</b>	Cytoplasme Noyau	Migration directionnelle Mitose, cytokinèse Organisation du centrosome Alignement du centrosome	Microtubules	Tadeu <i>et al.</i> , 2008 Honda <i>et al.</i> , 2009
<b>ZNF668</b>	Noyau	Suppresseur de tumeur	P53, MDM2	Hu <i>et al.</i> , 2011
<b>Fibuline 5</b>	Extracellulaire	Adhésion Angiogenèse	Intégrines	Yanagisawa and Davis, 2010
<b>ZMYND19</b>	Cytoplasme	Inconnue	MCHR1, tubulines	Francke <i>et al.</i> , 2005
<b>KDM6A</b>	Noyau	Démethylation des histones Migration	Histones	Mansour <i>et al.</i> , 2012; Thieme <i>et al.</i> , 2013
<b>LIMK</b>	Cytoplasme	Polymérisation d'actine, déphosphorylation de la cofiline	Cofiline, Cdc42, ROCK, PAK, etc.	Manetti, 2012
<b>KAT-5</b>	Noyau	Acétylation des histones, réparation de l'ADN, migration, autophagie	Histones, facteurs de transcription	Sapountzi <i>et al.</i> , 2006

**Tableau 16. Description des localisations et fonctions générales des protéines identifiées par double-hybride et interagissant avec l'UT<sub>Cterm</sub>.**

### 3.2. Caractérisation du (ou des) domaine(s) d'interaction de l'UT<sub>Cterm</sub> à la filamine A

La filamine A appartient à une famille de protéines composées d'un domaine de liaison à l'actine à l'extrémité N-terminale suivie de 24 domaines répétés d'une centaine d'aa dont l'extrémité C-terminale qui participe à la dimérisation des filamines (Figure 26).

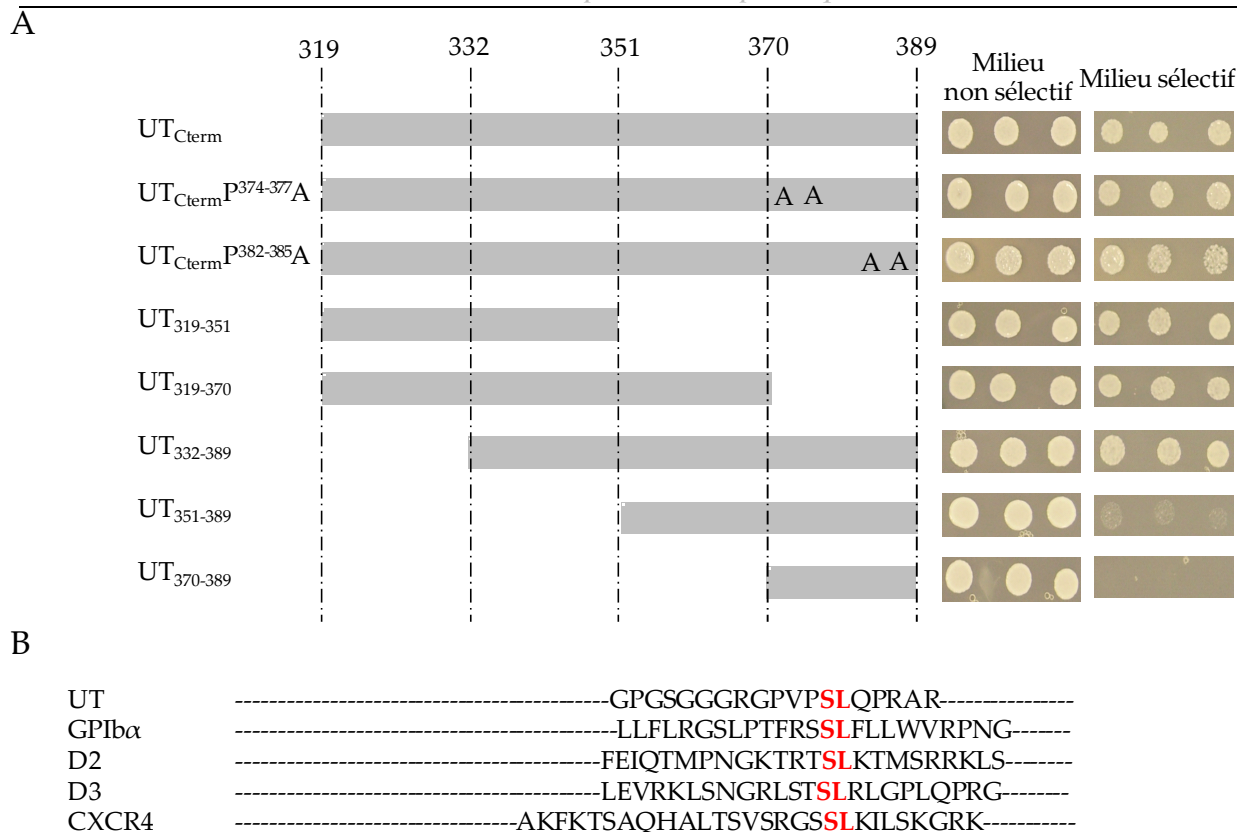


**Figure 26. Structure et domaines d'interaction de la filamine A.** Complétée et modifiée d'après Nakamura *et al.*, 2011.

Les domaines répétés interagissent avec de nombreuses protéines incluant des récepteurs à 7 domaines transmembranaires mais aussi des protéines de signalisation. Le séquençage du

clone de banque correspondant à la filamine A dans notre étude révèle que la portion protéique exprimée correspond aux domaines 16 à 19 des domaines également impliqués dans l'interaction aux récepteurs dopaminergiques.

Nous avons recherché la nature des séquences de l'UT<sub>Cterm</sub> responsables de l'interaction avec la filamine A. Pour ce faire, différentes constructions illustrées dans la Figure 27A ont été réalisées à partir de l'UT<sub>Cterm</sub>, afin de générer deux UT<sub>Cterm</sub> dont les paires de résidus proline du motif polyprolines (UT<sub>Cterm</sub>P<sup>374-377</sup>A, UT<sub>Cterm</sub>P<sup>382-385</sup>A) ont été mutées en alanine, ainsi que cinq UT<sub>Cterm</sub> tronqués séquentiellement (UT<sub>319-351</sub>, UT<sub>319-370</sub>, UT<sub>332-389</sub>, UT<sub>351-389</sub>, UT<sub>370-389</sub>). Ainsi, les levures sont co-transformées par l'un des UT<sub>Cterm</sub> mutants et le clone de banque correspondant à la filamine A, puis leur capacité d'interaction est contrôlée par un test en goutte sur le milieu sélectif, la co-expression effective des vecteurs appâts et proies étant toujours vérifiée grâce aux tests en goutte réalisés sur milieu non discriminant. Les résultats de croissance des clones sur milieu sélectif montrent que les mutations des résidus proline ne bloquent pas l'interaction de l'UT<sub>Cterm</sub> avec la filamine A. De plus, il est clairement observé que la filamine A interagit avec les fragments UT présentant systématiquement la séquence 332-351. La séquence de cette portion (Figure 27B) contient un motif sérine-leucine (SL) également présent dans la séquence de la sous-unité  $\alpha$  de la glycoprotéine Ib (GPIb $\alpha$ ) (Andrews and Fox, 1992) et dans les séquences d'autres récepteurs interagissant avec la filamine A, tels que le CXCR4 (Jiménez-Baranda *et al.*, 2007) ou les récepteurs dopaminergiques D2 et D3 (Li *et al.*, 2002). Chez ces derniers, la mutation de la sérine du motif provoque une diminution de signalisation intracellulaire (inhibition de la production d'AMPC) en réponse au ligand, liée à une perte d'interaction avec la filamine A (Li *et al.*, 2000).



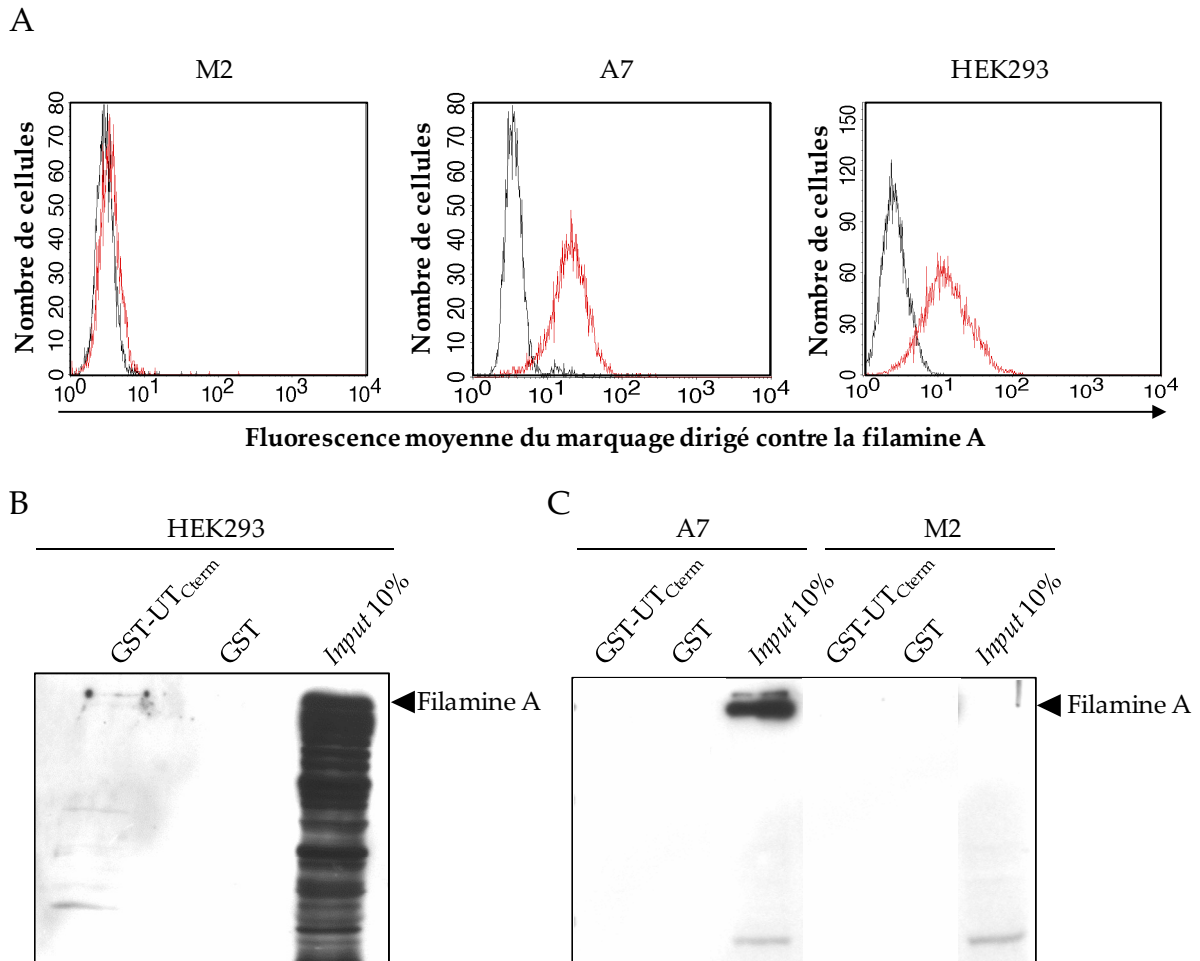
**Figure 27. Identification des séquences d'interaction de l'UT<sub>Cterm</sub> avec la filamine A.** **A.** Des levures AH109 sont co-transformées avec pGBKT7-UT<sub>Cterm</sub> entier ou l'un des construits dérivé de l'UT<sub>Cterm</sub>, et le plasmide proie pACT2-filamine A. Un test en goutte des co-transformants obtenus est réalisé sur les milieux non sélectif et sélectif, ce dernier mettant en évidence une interaction spécifique. **B.** La séquence de l'UT interagissant avec la filamine A correspond à la portion 332-351 de l'UT<sub>Cterm</sub>. Cette séquence contient un motif sérine-leucine (SL) aussi présent dans la séquence d'autres récepteurs interagissant avec la filamine A.

### 3.3. Résultats préliminaires de validation de l'interaction entre UT<sub>Cterm</sub> et filamine A

#### 3.3.1. GST-pull down

Afin de vérifier l'interaction entre l'UT<sub>Cterm</sub> et la filamine A, nous avons testé la capacité de la filamine A entière à s'associer avec la protéine de fusion GST-UT<sub>Cterm</sub> *in vitro*. Nous avons dans un premier temps validé l'expression ou non de la filamine A humaine dans les cellules M2, A7 et HEK293 par cytométrie en flux (Figure 28A). Puis, des préparations protéiques provenant de HEK293 transfectées avec le cDNA codant la filamine A<sup>c-myc</sup> d'une part (Figure 28B) et de cellules M2 Fila<sup>-</sup> ou A7 Fila<sup>+</sup> d'autre part (Figure 28C) ont été incubées avec la protéine de fusion GST-UT<sub>Cterm</sub> associée à des billes de sépharose. Les études d'interaction *in vitro* réalisées avec le GST-UT<sub>Cterm</sub> et les extraits protéiques de HEK293 surexprimant la filamine A révèlent la présence d'une faible bande protéique à la masse

moléculaire apparente de 280 KDa correspondant à la masse théorique de la filamine A (Figure 28B). Cette bande correspond à celle retrouvée dans l'*input* (représentant 10% de la quantité totale de protéines utilisés pour le GST-pull down) et n'apparaît pas lorsque les échantillons protéiques sont incubés en présence de la GST seule.



**Figure 28. Expérience préliminaire de validation de l'interaction entre l'UT<sub>Cterm</sub> et la filamine A par GST-pull down.** **A.** Vérification de l'expression de la filamine A (courbe rouge) par cytométrie en flux dans les lignées M2, A7 et HEK293 qui expriment la filamine A à l'état basal. Le contrôle négatif (absence du premier anticorps anti-filamine A) est représenté par la courbe noire. **B.** GST-pull down à partir d'extraits de HEK293 transfectées par les cDNA codant la filamine A<sup>c-myc</sup>. Une bande immunodétectée avec un anticorps dirigé contre la filamine A apparaît en présence de la protéine de fusion GST-UT<sub>Cterm</sub>. **C.** GST-pull down à partir d'extraits de cellules M2 (Fila<sup>-</sup>) et A7 (Fila<sup>+</sup>). Aucune bande n'est détectée par l'anti-filamine A en présence de la protéine de fusion GST-UT<sub>Cterm</sub>.

A l'inverse, lorsque la protéine GST-UT<sub>Cterm</sub> est incubée en présence d'un extrait protéique de cellules M2 négatives pour la filamine A et A7 exprimant stablement la filamine A, aucune bande correspondant à la filamine A n'est détectée (Figure 28B). Ce dernier résultat dans les A7 peut s'expliquer par la différence de niveau d'expression de la filamine A observable sur

les Western blot des *inputs*, entre les cellules HEK293 surexprimant la filamine A et les cellules A7 stablement transfectées (Figure 28B et C). Ainsi, ces données *in vitro* suggèrent que le domaine C-terminal de l'UT pourrait interagir physiquement avec la filamine A.

### 3.3.2. Interaction UT-filamine A

#### 3.3.2.1. Interaction UT-UT dépendante de la filamine A ?

Il est maintenant admis que de nombreux récepteurs peuvent exister en tant que dimères ou oligomères. Afin de vérifier la capacité du récepteur UT à s'homodimériser, nous avons réalisé des études de *bioluminescence resonance energy transfer* ou BRET (Figure 29A) et de co-immunoprécipitation (Figure 29B). Nos premières études de BRET ont consisté à évaluer le possible transfert d'énergie de luminescence entre l'UT<sup>Rluc</sup> (donneur) et l'UT<sup>eYFP</sup> (accepteur) cotransfectés dans les cellules HEK293. Des concentrations croissantes d'ADNc codant le donneur et l'accepteur sont transfectées systématiquement, et le signal BRET est représenté en fonction du ratio d'expression (Accepteur-YFP/Donneur-Rluc). Nos données de la figure 29A montrent que l'UT s'homodimérise comme illustré par l'augmentation du signal BRET en fonction de la quantité d'accepteur. L'interaction de l'UT sous forme d'homooligomère est confirmée par des études de co-immunoprécipitation de l'UT<sup>c-myc</sup> co-exprimé avec l'UT<sup>HA</sup> (Figure 29B) dans les cellules CHO. Le domaine C-terminal de l'UT pourrait jouer un rôle important dans cette interaction récepteur-récepteur (Figure 29C) car le signal BRET semble décroître lorsque les mutants tronqués du récepteur UT<sub>370</sub><sup>eYFP</sup> mais surtout UT<sub>351</sub><sup>eYFP</sup>, UT<sub>332</sub><sup>eYFP</sup> et UT<sub>319</sub><sup>eYFP</sup>, sont coexprimés avec la forme sauvage de l'UT<sup>Rluc</sup>. Ces données suggèrent donc que le domaine 319-351 est impliqué dans l'homodimérisation de l'UT. Enfin, lorsque les études de BRET sont réalisées dans les cellules M2 (Fila<sup>-</sup>) et A7 (Fila<sup>+</sup>), les courbes montrent un signal BRET (UT<sup>Rluc</sup>-UT<sup>eYFP</sup>) important dans la lignée A7 et très faible dans la lignée M2 (Figure 29D), soulignant le rôle potentiel joué par la filamine A dans la dimérisation de l'UT.

**Figure 29. Rôle potentiel de la filamine A dans la dimérisation de l'UT.** **A.** Analyse par BRET de l'homodimérisation de l'UT. **B.** Analyse par co-immunoprécipitation de l'homodimérisation de l'UT. **C.** Effet de la délétion de l'extrémité C-terminale de l'UT dans l'homodimérisation de l'UT détectée par BRET. **D.** Analyse par BRET de l'homodimérisation de l'UT dans les cellules M2 (Fila<sup>-</sup>) ou A7 (Fila<sup>+</sup>). Les courbes de saturation de BRET ont été établies à partir de cellules transfectées avec une quantité constante de donneur de fluorescence UT<sup>Rluc</sup> et des quantités croissantes de construits accepteurs de fluorescence UT<sup>eYFP</sup> (contrôle positif), PAR1<sup>eYFP</sup> (contrôle négatif), et de différents mutants tronqués de l'UT. NT: non transfecté.

### 3.3.2.2. Difficultés de la mise en évidence *in situ* d'une interaction UT-filamine A

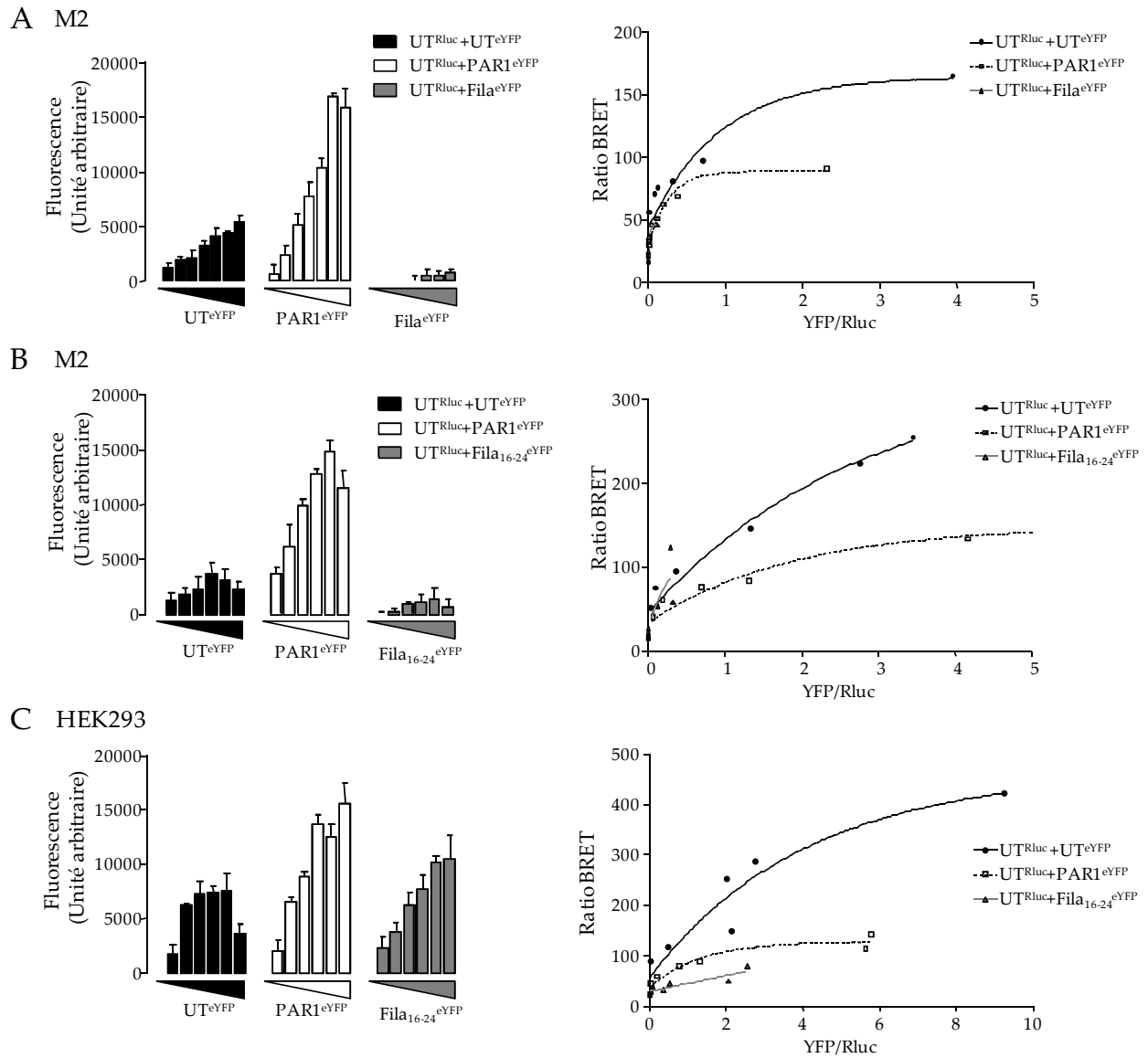
Afin d'éviter que la filamine A, exprimée de façon endogène dans les HEK293, nuise à l'interaction entre l'UT<sup>Rluc</sup> et la filamine A<sup>eYFP</sup>, les études de BRET ont été réalisées dans les cellules de mélanome M2. Les couples UT<sup>Rluc</sup>+UT<sup>eYFP</sup> et UT<sup>Rluc</sup>+PAR1<sup>eYFP</sup> ont été utilisés

comme contrôles de BRET positif et négatif respectivement. Ainsi, dans les cellules M2, il apparaît que la transfection du vecteur codant la filamine A<sup>eYFP</sup> (Fila<sup>eYFP</sup>) ne permet pas une expression efficace de la protéine (Figure 30A, gauche). Au vu de cette faible expression, les courbes de BRET (Figure 30A, droite) ne permettent pas de conclure quant à l'interaction de la filamine A avec l'UT dans les cellules M2 transfectées transitoirement. Plusieurs facteurs peuvent être responsables du faible taux de transfection de la filamine<sup>eYFP</sup> : *i*) la capacité des cellules M2 à exprimer une protéine recombinante, *ii*) la taille trop importante du plasmide peYFP-N1-filamine A, *iii*) la toxicité cellulaire liée à l'expression d'une grosse protéine. Dans nos conditions, nous montrons que les cellules M2 expriment correctement les récepteurs UT<sup>eYFP</sup> et PAR1<sup>eYFP</sup>. En revanche, le plasmide peYFP-N1-filamine A est deux fois plus grand que le plasmide peYFP-N1-UT (12,7 Kb contre 5,9 Kb). Ainsi pour une même quantité d'ADN, deux fois plus de plasmides codent pour l'UT<sup>eYFP</sup> que pour la filamine A<sup>eYFP</sup>, permettant d'expliquer, en partie, la différence d'efficacité de transfection. Ainsi, afin de palier le problème de taille du cDNA filamine A et donc de transfection des cellules M2, nous avons réalisé un construit codant pour les domaines 16 à 24 de la filamine A dans le plasmide peYFP-N1. Ce plasmide plus petit (7,2 Kb) code une portion de filamine A de 89 KDa contenant la séquence d'interaction avec l'UT (domaines 16-19). L'efficacité de transfection du vecteur codant la Fila<sub>16-24</sub><sup>eYFP</sup> est améliorée mais reste faible (Figure 30B, gauche) et ne permet pas de détecter une interaction nette entre l'UT et la Fila<sub>16-24</sub> (Figure 30B, droite). Finalement, la même expérience réalisée dans les HEK293 révèle une forte expression du construit Fila<sub>16-24</sub><sup>eYFP</sup> (Figure 30C, gauche) et démontre clairement l'absence d'émission de signaux BRET entre l'UT et la Fila<sub>16-24</sub> dans ces cellules (Figure 30C, droite).

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées au vu de l'ensemble de ces résultats : *i*) l'expression de filamine A endogène inhibe l'interaction dans les cellules HEK293, *ii*) les dipôles des donneur et accepteur de fluorescence sont mal orientés ou trop éloignés en dépit de l'interaction, *iii*) l'interaction est phosphorylation-dépendante et nécessite l'activation du



récepteur UT, *iii*) dans la cellule vivante, la forme tronquée de la filamine A utilisée (16-24) n'est pas ancrée au cytosquelette en raison de l'absence de ses domaines de liaison à l'actine et par conséquent ne peut interagir avec le récepteur UT.



**Figure 30. Tentative de confirmation de l'interaction entre l'UT et la filamine A par la technique de BRET. A.** Analyse par BRET de l'interaction entre l'UT et la filamine A dans les cellules M2. **B.** Analyse par BRET de l'interaction entre l'UT et les domaines 16 à 24 de la filamine A dans les cellules M2. **C.** Analyse par BRET de l'interaction entre l'UT et les domaines 16 à 24 de la filamine A dans les cellules HEK293. Les courbes de saturation de BRET (à droite) ont été établies à partir de cellules transfectées avec une quantité constante de donneur de fluorescence UT<sup>Rluc</sup> et des quantités croissantes de construits accepteurs de fluorescence UT<sup>eYFP</sup> (contôle positif), PAR1<sup>eYFP</sup> (contrôle négatif), Fila<sup>eYFP</sup> ou Fila<sub>16-24</sub><sup>eYFP</sup> dont les expressions sont représentées à gauche.

### 3.4. Rôle potentiel de la filamine A dans les effets de l'UII

#### 3.4.1. Rôle de la filamine A dans la localisation subcellulaire de l'UT

La potentielle interaction de l'UT avec la filamine A et le rôle possible de cette dernière dans la dimérisation du récepteur, nous ont conduit à rechercher la colocalisation subcellulaire de l'UT et de la filamine A dans les cellules M2 et A7. Ainsi, la localisation de l'UT en fusion avec l'eGFP (UT<sup>eGFP</sup>) a été étudiée par immunocytochimie dans les cellules M2 Fila<sup>-</sup> et leur isotype exprimant stablement la filamine A (A7, Fila<sup>+</sup>).



**Figure 31. Rôle potentiel de la filamine A dans la localisation subcellulaire de l'UT.** **A.** La distribution cellulaire de l'UT et de la filamine A a été analysée par microscopie confocale dans les cellules M2 et A7 transfectées avec le plasmide codant l'UT<sup>eGFP</sup>. **B.** Le profil de distribution de la fluorescence liée à la présence d'UT<sup>eGFP</sup> et de filamine A (uniquement dans les cellules A7) au travers des cellules a pu être établi grâce au logiciel ImageJ.

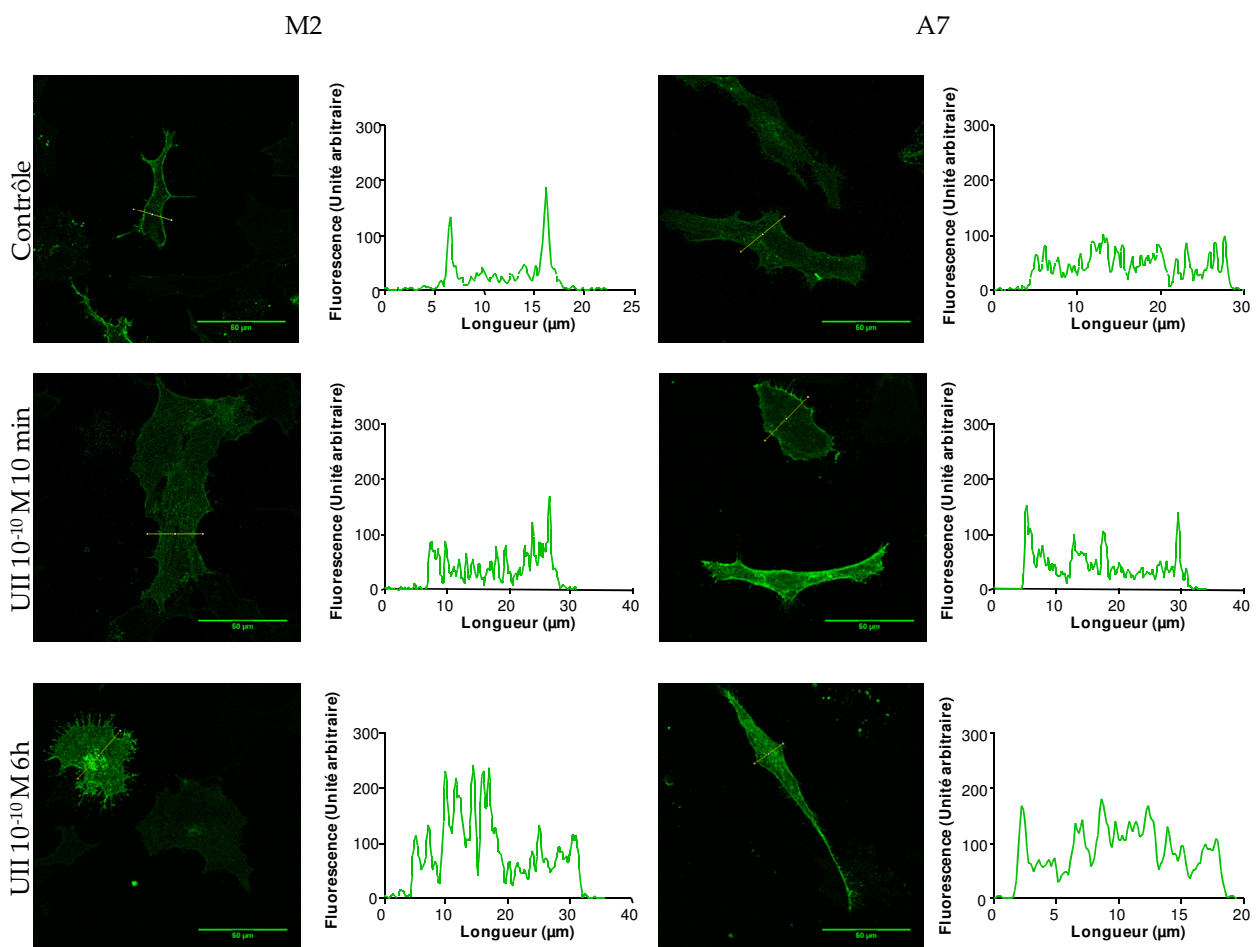
La Figure 31A (haut) montre que dans les cellules M2, comme attendu, la filamine A (anticorps anti-filamine A, rouge) n'est pas exprimée, et que le récepteur UT (vert) dans ces cellules est principalement localisé au niveau membranaire. Les cellules A7 (Figure 31A, bas)

expriment la filamine A au niveau membranaire mais aussi au niveau des fibres d'actine, alors que l'UT<sup>eGFP</sup> est distribué de façon diffuse et ponctiforme dans le cytoplasme et dans la région du réticulum endoplasmique. Le profil de distribution de la fluorescence liée à la présence d'UT<sup>eGFP</sup> dans les cellules M2 et A7 a pu être établi grâce au logiciel ImageJ (Figure 31B). Les profils obtenus (intensité de fluorescence sur le passage d'un segment tracé à travers la cellule d'intérêt) indiquent clairement une différence de distribution de l'UT entre les deux types cellulaires. En effet, en l'absence de filamine A (M2), l'UT est principalement présent à la membrane plasmique tandis qu'en présence de filamine A (A7), l'UT est autant exprimé à la membrane qu'au sein du cytoplasme. Dans les A7, l'UT et la filamine A sont co-localisés à la membrane plasmique et particulièrement au niveau des lamellipodes et des filopodes. Ainsi, la filamine A pourrait jouer un rôle déterminant dans la localisation du récepteur UT à la membrane plasmique.

#### **3.4.2. Rôle de la filamine A dans l'internalisation de l'UT**

De nombreuses études ont précédemment montré que la filamine A régule la signalisation et les fonctions de ses partenaires récepteurs en stabilisant leur niveau d'expression à la membrane plasmique ou en contrôlant leur trafic intracellulaire. Ainsi, la translocation de l'UT a été évaluée par microscopie confocale dans les cellules M2 et A7 après 10 min ou 6 h d'incubation en présence d'UII ( $10^{-10}$  M) (Figure 32). Les profils de distribution du récepteur montrent qu'en condition contrôle, comme vu précédemment, l'UT est principalement à la membrane dans les cellules M2 alors qu'il est à la fois présent dans le cytoplasme et à la membrane dans les cellules A7. Après un traitement à l'UII  $10^{-10}$ M (10 min), les profils de distribution de l'UT suggèrent une internalisation importante du récepteur uniquement dans les cellules dépourvues de filamine A. En revanche, dans les cellules A7, un court traitement semble favoriser la translocation du récepteur à la membrane et surtout dans les filopodes émis en réponse au peptide. Après 6 h de traitement, l'UT est majoritairement présent dans le

compartiment intracellulaire des cellules M2 alors que dans les cellules A7, une proportion de récepteur reste présente à la membrane plasmique et dans les filipodes (Figure 32). Ces résultats peuvent être expliqués par différents mécanismes, *i)* la filamine A permet la stabilisation du récepteur à la membrane plasmique comme cela a déjà été observé pour d'autres protéines membranaires (Thelin *et al.*, 2007; Najib *et al.*, 2012), *ii)* la filamine A stimule le recyclage des récepteurs à la membrane comme précédemment décrit pour le récepteur de la calcitonine (Seck *et al.*, 2003) et/ou, *iii)* les récepteurs déjà en interaction avec la filamine A (A7) sont déjà internalisés au moment du traitement par l'UII.

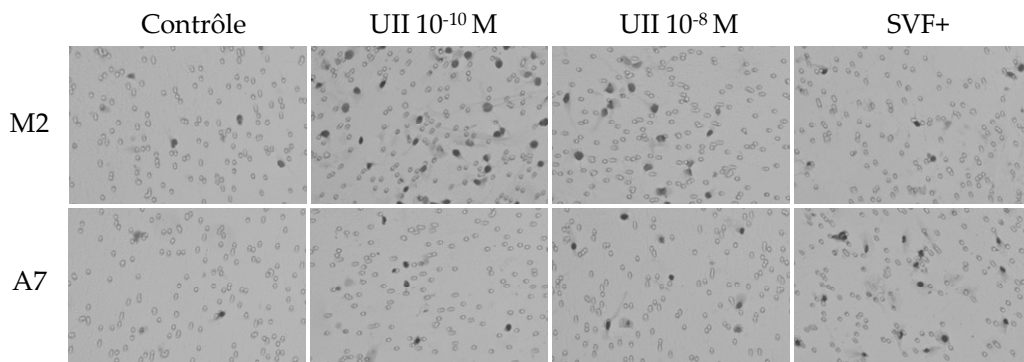


**Figure 32. Rôle potentiel de la filamine A dans l'internalisation/trafic de l'UT.** Les cellules M2 et A7 transfectées avec le plasmide codant l'UT<sup>eGFP</sup> ont été directement fixées (contrôle, haut) ou préalablement traitées (UII 10<sup>-10</sup>M, 10 min ou 6 h) avant d'être analysées par microscopie confocale. Le profil de distribution de la fluorescence liée à la présence d'UT<sup>eGFP</sup> au travers des cellules M2 et A7 a pu être établi grâce au logiciel ImageJ.

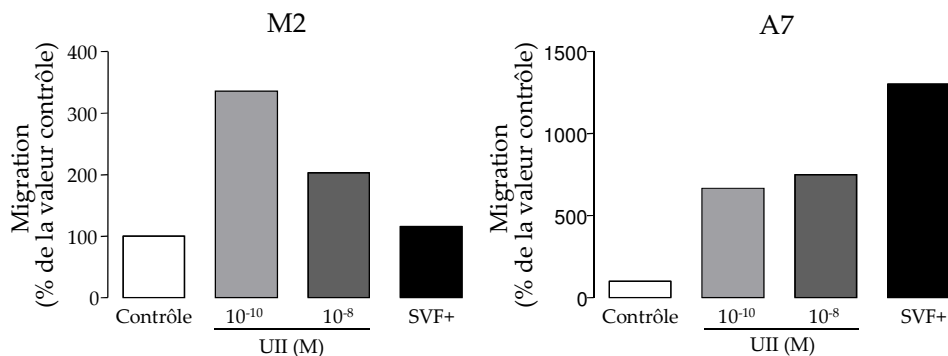
### 3.4.3. Rôle de la filamine A dans la migration cellulaire

Le rôle de la filamine A dans la migration cellulaire étant largement établi, nous avons recherché l'implication de cette protéine dans les effets de l'UII sur la migration cellulaire. Nos études préliminaires réalisées à l'aide de la chambre de Boyden montrent que l'UII exerce des effets chémoattractants aussi bien dans les lignées dépourvues de filamine A (M2) que dans celles exprimant stablement la protéine (A7) (Figure 33A). L'analyse par normalisation semble révéler un effet majeur de l'UII dans les cellules A7, dont la motilité directionnelle est quasi nulle en condition basale. Cependant, l'efficacité de l'UII semble réellement plus importante dans la lignée M2, suggérant que le récepteur UT libre, non associé à la filamine A, relaye les voies de signalisation associées à la migration chimiotactique stimulée par l'UII.

A



B



**Figure 33. Rôle potentiel de la filamine A dans la migration cellulaire.** Les cellules M2 et A7 transfectées avec le plasmide codant l'UT<sup>eYFP</sup> ont étéensemencées dans la chambre supérieure d'un transwell alors que la chambre inférieure contient du milieu seul, de l'UII 10<sup>-10</sup> M, 10<sup>-8</sup> M ou du SVF. Après 24 h, les cellules qui ont migré au travers de la membrane sont colorées et comptées.

**Figure 34. Rôle potentiel de la filamine A dans la polymérisation de l'actine et la formation des protrusions.** Les cellules M2 et A7 transfectées avec le plasmide codant l'UT<sup>eGFP</sup> ont été ensemencées sur une lamelle de verre coatée avec de la fibronectine et traitées à l'UII  $10^{-10}$  M pendant 10 min ou 6 h. **A.** La distribution de l'UT<sup>eGFP</sup> (vert) et de l'actine (rouge) a été analysée par microscopie confocale. **B.** La longueur des filopodes présents sur les cellules a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ après 6 h de traitement.

Nous avons précédemment montré que les effets de l'UII sur la migration cellulaire sont pour une grande partie relayés par la voie Rho/ROCK classiquement impliquée dans la contraction de l'actomyosine et la formation de fibres de stress d'actine. Ici, nous avons recherché l'implication de la filamine A dans les effets de l'UII sur la formation des fibres de stress potentiellement relayée par la voie Rho.

Nos études d'immunocytochimie révèlent qu'en condition contrôle, les cellules M2 présentent un cortex d'actine bien défini à la membrane plasmique alors que les cellules A7 montrent de nombreuses fibres de stress d'actine soulignant la capacité de la filamine A à organiser les filaments d'actine en l'absence de stimulation. En présence d'un traitement à l'UII ( $10^{-10}$  M) pendant 10 min ou 6 h, les cellules dépourvues de filamine A mais exprimant l'UT (vert) présentent de nombreuses fibres de stress ainsi qu'une émission de protrusions membranaires (Figure 34A). Dans les cellules A7 exprimant la filamine A, le niveau basal de polymérisation d'actine déjà important, ne semble pas modifié (Figure 34A).

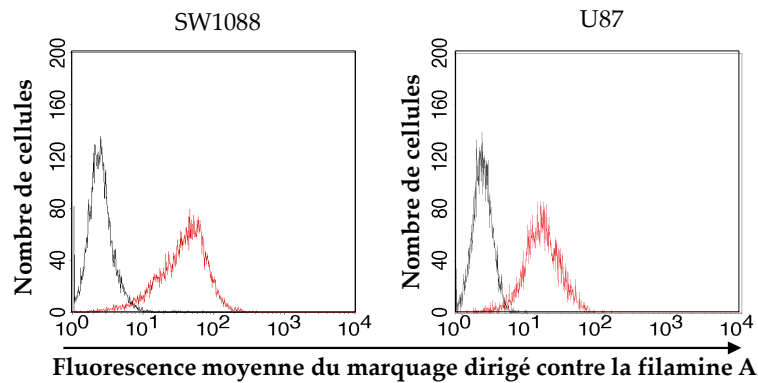
Nous nous sommes donc intéressés à la longueur des protrusions, ici vraisemblablement des filopodes, émises par les cellules. Alors que l'UII entraîne une élongation des filopodes dans les deux types cellulaires au bout de 6 h, l'effet semble plus marqué et plus rapide (dès 10 min) dans les cellules A7 exprimant la filamine A. Une analyse quantitative statistique pourra confirmer cette observation.

### **3.5. Expression de la filamine A dans les gliomes**

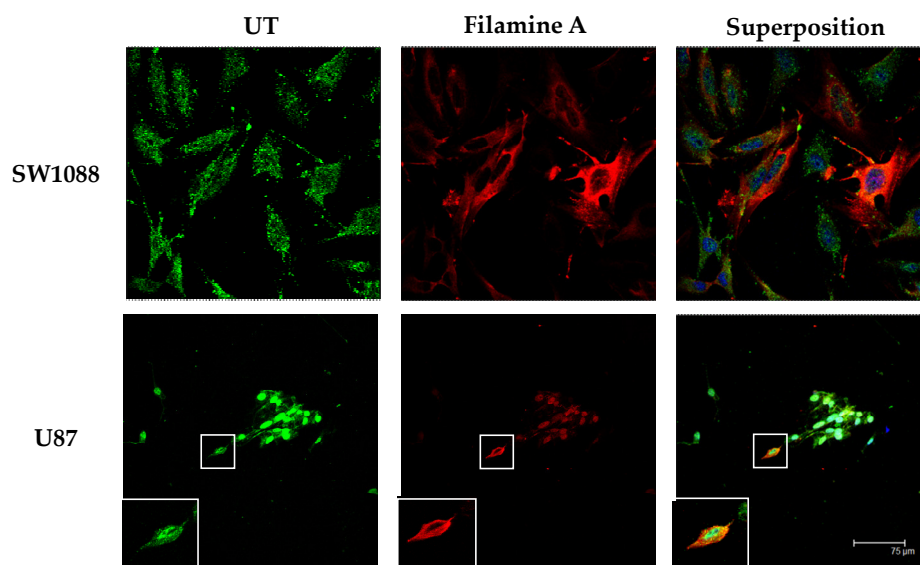
Afin de déterminer l'implication de la filamine A dans les effets de l'UII sur la migration des cellules tumorales, nous avons recherché l'expression de cette protéine dans les deux lignées U87 et SW1088 et des explants tumoraux issus de patient. Nos études de cytométrie en flux montrent que la filamine A est fortement exprimée dans les deux lignées de gliome testées (Figure 35A) et que l'UT et la filamine A sont co-localisés aux niveaux cellulaire et subcellulaire (Figure 35B). De plus, dans l'explant de glioblastome humain, la filamine A et

sa forme phosphorylée sont co-localisées dans les cellules bordant ou émergeant de l'explant (Figure 35C).

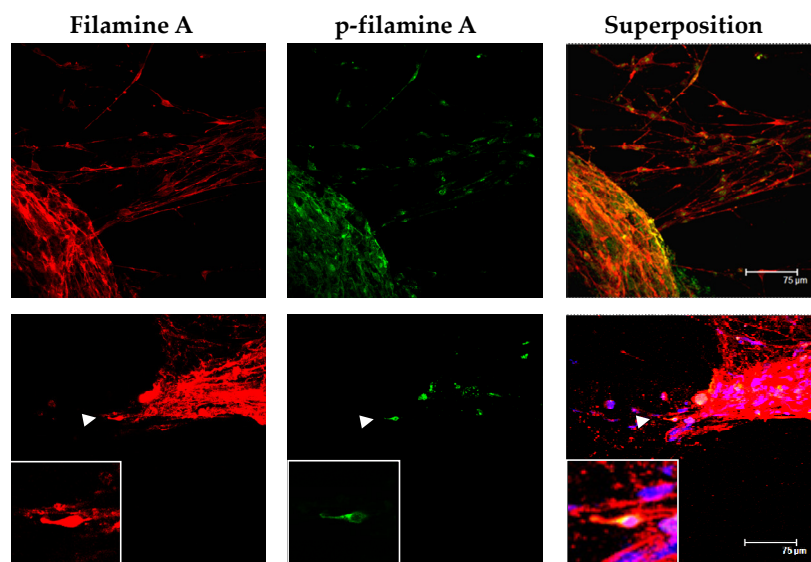
A



B



C

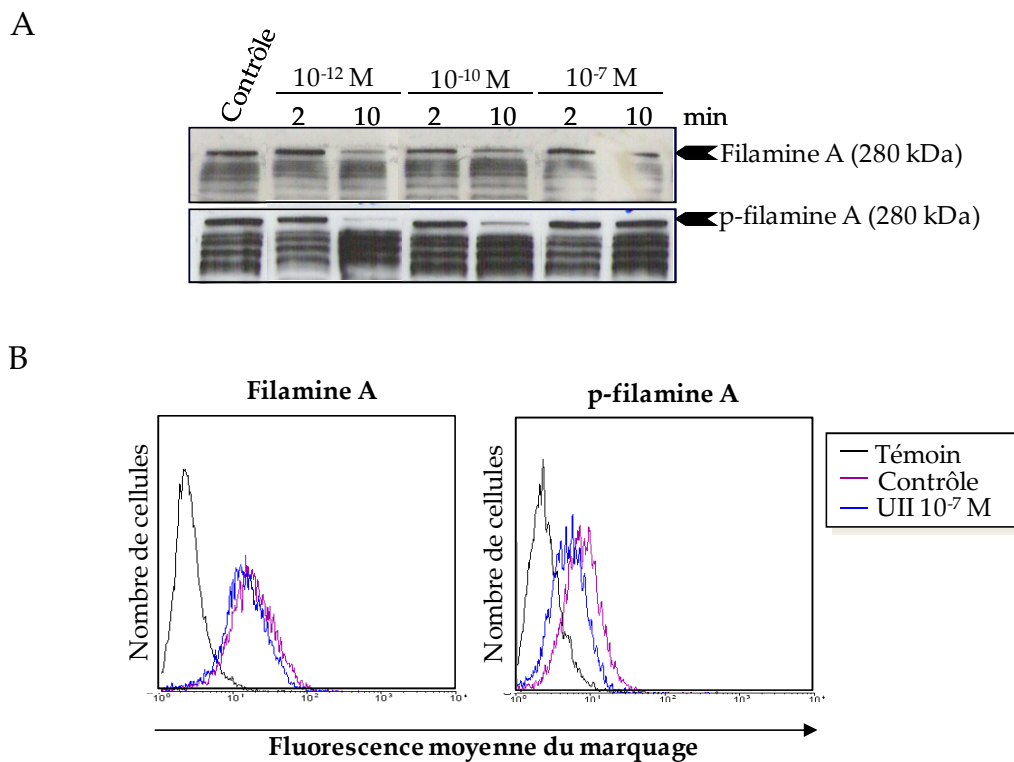


**Figure 35. Expression de la filamine A dans les gliomes.** **A.** Analyse par cytométrie en flux de l'expression de la filamine A dans les cellules SW1088 et U87. **B.** Analyse par immunocytochimie de l'expression de la filamine A et de l'UT dans les lignées de gliome U87 et SW1088. **C.** Analyse par immunocytochimie de l'expression de la filamine A et de sa forme phosphorylée dans des explants tumoraux de glioblastome humain.



### 3.6. Effet de l'UII sur la filamine A exprimée dans les gliomes

Les effets de l'UII sur l'activation de la filamine A ont été recherchés sur la lignée U87 qui co-exprime la filamine A et l'UT. L'application d'UII ( $10^{-12}$ M et  $10^{-10}$ M) entraîne une déphosphorylation de la forme entière de la filamine A (Figure 36A), un effet confirmé par les expériences de cytométrie en flux (Figure 36B). L'analyse par Western blot montre aussi une faible diminution de la forme entière de la filamine A, associée à une augmentation de bandes protéiques de plus bas poids moléculaires, pouvant être considérées comme des produits de dégradation (Figure 36A). Ce type de résultat est en accord avec ce qui a déjà été observé après activation du récepteur ROR2 par le Wnt5 (O'Connell *et al.*, 2009).



**Figure 36. Effets de l'UII sur la phosphorylation de la filamine A dans les gliomes. A.** Les cellules U87 ont été traitées avec de l'UII ( $10^{-12}$  M,  $10^{-10}$  M et  $10^{-7}$ M) pendant 2 ou 10 min et la filamine A et sa forme phosphorylée ont été révélées par Western blot. **B.** Les cellules U87 ont été traitées à l'UII  $10^{-10}$  M pendant 10 min, et la filamine A et sa forme phosphorylée ont été analysées par cytométrie en flux.

#### 4. Discussion-conclusion

Il est maintenant admis que de nombreux RCPGs interagissent *via* leur domaines cytoplasmiques avec des partenaires protéiques qui modulent leur signalisation, leur localisation cellulaire ou encore leur pharmacologie (Ritter and Hall, 2009). Ainsi, l'interaction du récepteur de l'urotensine II avec les  $\beta$ -arrestines participerait à son internalisation (Proulx *et al.*, 2005) et à la transactivation de l'EGFR (Esposito *et al.*, 2011). Dans cette étude, nous démontrons pour la première fois par double-hybride, l'interaction directe de l'UT avec plusieurs partenaires protéiques. Parmi les 8 protéines identifiées, quatre présenteraient une localisation principalement cytoplasmique, trois une expression nucléaire ou péri-nucléaire et une serait sécrétée dans le milieu extracellulaire. A l'exception de la ZMYND19 dont la fonction est inconnue, les protéines exprimées dans le cytoplasme sont impliquées directement ou indirectement dans les processus de migration cellulaire.

##### 4.1. Rôle des protéines partenaires cytosoliques

La CENP-V, une protéine constitutive du kinétochore, participe à la progression de la mitose en régulant la condensation de la chromatine, la position des centromères et l'attachement des microtubules aux kinétochores (Tadeu *et al.*, 2008). Néanmoins, son expression très importante dans le cerveau adulte, une zone relativement pauvre en division cellulaire, a conduit un groupe de recherche à s'intéresser aux autres fonctions de cette protéine (Honda *et al.*, 2009). Cette équipe a mis en évidence que la CENP-V est localisée dans les protrusions cellulaires, et semble directement liée aux microtubules favorisant ainsi la migration cellulaire directionnelle (Honda *et al.*, 2009).

La LIM kinase est une protéine largement impliquée dans la migration cellulaire (Chapitre I §2.2.3.). Le principal substrat de la LIMK est la cofiline, une protéine qui sectionne les filaments d'actine augmentant ainsi le nombre d'extrémités libres d'actine. En phosphorylant la cofiline, la LIMK l'inactive et entraîne une augmentation des fibres de stress cellulaires et

des adhésions focales (Scott and Olson, 2007). Aucune donnée de la littérature ne permet de suggérer une interaction directe des RCPGs avec la LIMK, mais elle peut être inhibée (Foletta *et al.*, 2003) ou activée (Lee-Hoeflich *et al.*, 2004) en interagissant avec l'extrémité C-terminale d'un récepteur tyrosine kinase de la famille des *bone morphogenetic protein receptor* (BMPR). Plus classiquement, la LIMK est une cible effectrice des voies de signalisation dépendantes des RCPGs, impliquant entre autres les Rho GTPases (Scott and Olson, 2007).

La fibuline 5 est une protéine principalement sécrétée dans le milieu extracellulaire. Elle possède un motif RGD d'interaction aux intégrines et exerce des effets sur la migration, l'invasion et l'angiogenèse qui varient en fonction du type cellulaire utilisé (Yanagisawa *et al.*, 2009). A ce jour, le rôle de cette protéine dans le compartiment intracellulaire n'est pas décrit.

#### **4.2. Rôle des protéines partenaires nucléaires ou périnucléaires**

La localisation exclusivement nucléaire de certaines protéines d'interaction, *i.e.* la ZNF668, la KDM6A et la KAT-5, soulève l'hypothèse de nouveaux mécanismes d'action de l'UT, en particulier, transcriptionnels. En effet, deux études récentes ont démontré une localisation nucléaire de l'UT dans les cellules cardiaques de Rat (Doan *et al.*, 2012), le cerveau de Singe et les cellules gliomales humaines U87 (Nguyen *et al.*, 2012), dans lesquelles l'expression de l'UT nucléaire serait réprimée en condition hypoxique. Dans ce contexte, l'identification des protéines nucléaires interagissant avec l'UT ouvre de nouvelles perspectives dans la compréhension du rôle des RCPGs et en particulier de l'UT, au niveau nucléaire. De manière intéressante, ces protéines partenaires semblent impliquées dans la croissance tumorale. En effet, la ZNF668 agit comme un suppresseur de tumeur en interagissant avec MDM2 et en stabilisant p53 (Hu *et al.*, 2011). La KDM6A quant à elle, est une histone déméthylase dont la mutation est liée à l'apparition d'une maladie congénitale

appelée syndrome de Kabuki (Miyake *et al.*, 2013). Une étude très récente a mis en évidence un rôle de cette protéine dans la migration des cellules souches induites par le SDF-1 (Thieme *et al.*, 2013). La KAT-5 est une histone acétyl transférase régulant certains facteurs de transcription tels que c-Myb (Zhao *et al.*, 2012), MyoD (Kim *et al.*, 2011) ou encore c-Myc (Patel *et al.*, 2004). Cette protéine, plus communément appelée TIP60, interagit avec le récepteur ETA après activation par l'ET-1, et entraîne la translocation du récepteur de la membrane plasmique au compartiment périnucléaire (Lee *et al.*, 2001). Il est possible de souligner que l'inhibition de l'expression de la KAT-5 augmente la migration des cellules de mélanome (Chen *et al.*, 2012a), montrant là encore une des voies potentielles activées par l'UII favorisant la migration cellulaire.

Parmi l'ensemble des protéines identifiées, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la filamine A, une protéine de liaison à l'actine jouant un rôle important dans les processus de migration et d'adhésion et dont l'interaction avec des RCPGs est largement connue. Ce partenaire, qui est une véritable plate-forme protéique (Figure 25), interagit avec la partie cytosolique C-terminale 332-351 de l'UT contenant un doublet SL récurrent parmi les autres partenaires de la filamine A. La mutation dirigée de ce motif pourrait nous permettre de conclure quant au domaine d'interaction de l'UT à la filamine A et d'établir une séquence consensus d'interaction.

### **4.3. Caractérisation de l'interaction fonctionnelle entre UT et filamine A**

La suite de l'étude a naturellement consisté à chercher à confirmer par d'autres techniques l'interaction entre l'UT et la filamine A. Les études *in vitro* de GST-pull down réalisées à partir des cellules HEK293 surexprimant la filamine A semblent confirmer l'interaction mais ce résultat n'a pas pu être reproduit dans les cellules A7, dans lesquelles le niveau d'expression de la filamine A pourrait être trop faible au regard des études de GST-pull down impliquant la filamine A (Lin *et al.*, 2001; Jiménez-Baranda *et al.*, 2007).

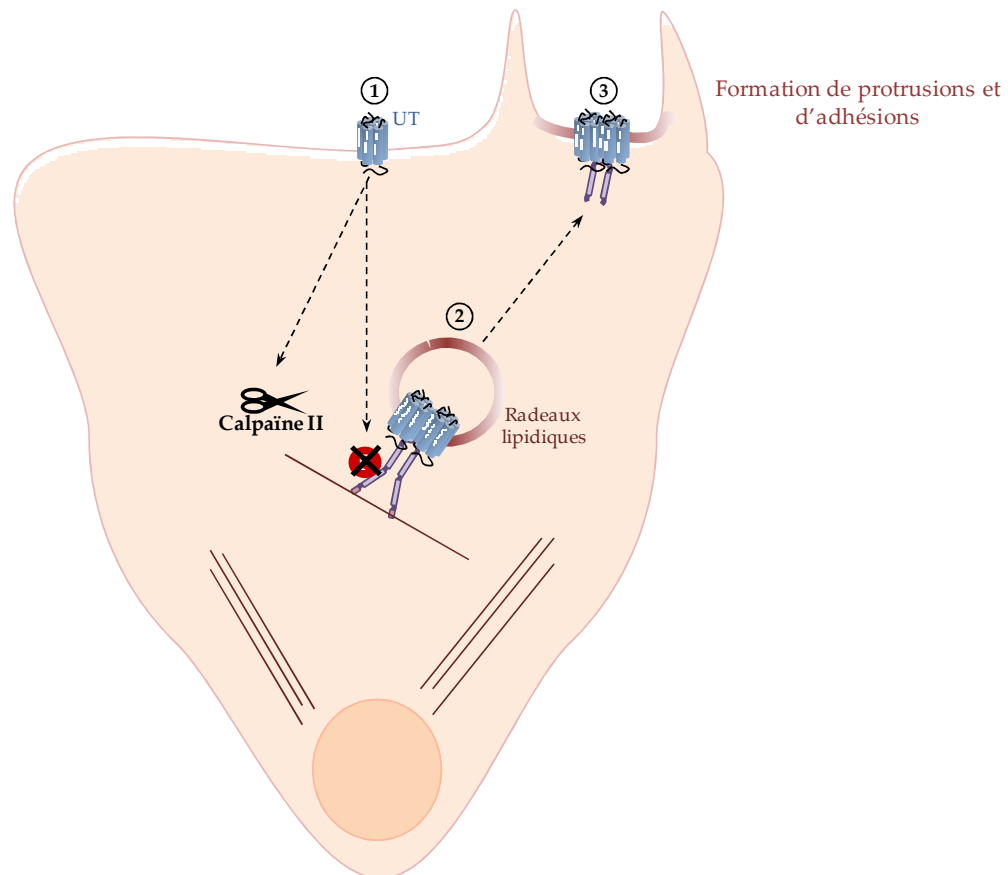
La filamine A est une protéine qui se trouve constitutivement sous sa forme homodimérique *via* son domaine 24 et qui de ce fait, pourrait participer à la dimérisation des récepteurs avec lesquels elle interagit (Lin *et al.*, 2001; Minsaas *et al.*, 2010). Nous avons d'abord démontré, par les techniques de BRET et de co-immunoprécipitation, que l'UT s'homodimérise et que la troncation du domaine C-terminal du récepteur semble diminuer cette interaction. Parmi les nombreux travaux portant sur la dimérisation des RCPGs, seul le récepteur delta opioïdérique, appartenant à la même famille que l'UT, pourrait s'homodimériser *via* son domaine C-terminal (Cvejic and Devi, 1997). Nos expériences montrent une augmentation du ratio BRET uniquement dans les cellules A7 suggérant que la filamine A, et donc le domaine C-terminal de l'UT, participerait à l'homodimérisation du récepteur. Cette forme associée à la filamine A permettrait la translocation du récepteur au niveau cytosolique ou empêcherait l'insertion de ce dernier dans la membrane plasmique. A l'appui de cette hypothèse, la filamine A interagit avec des structures membranaires telles que les cavéoles pour réguler leur trafic (Stahlhut and van Deurs, 2000; Sverdlov *et al.*, 2009).

Nous avons tenté d'adapter la méthodologie BRET pour la mise en évidence de l'interaction UT-filamine A *in cellulo*. Un défaut d'expression de la filamine A fusionnée avec l'eYFP dans les cellules M2 n'a pas permis de détecter une interaction entre les deux partenaires. Bien qu'un fragment codant les domaines 16 à 24 de la filamine A<sup>eYFP</sup> ait été validé, aucune interaction n'a été détectée dans les HEK. Il est possible que l'expression endogène de la filamine A dans ces cellules antagonise par compétition l'interaction entre la filamine A<sub>16-24</sub><sup>eYFP</sup> et le récepteur. Comme suspecté, une étude récente suggère que la fusion d'une protéine fluorescente aux extrémités N- (domaine de liaison à l'actine) ou C-terminales (site de dimérisation) de la filamine A altérerait la fonctionnalité de la protéine (Planagumà *et al.*, 2012) pouvant de ce fait empêcher son interaction avec ses partenaires. Il n'est donc pas exclu que nos construits Fila<sup>eYFP</sup> et Fila<sub>16-24</sub><sup>eYFP</sup> perdent leur capacité d'ancrage au cytosquelette et/ou de dimérisation, et par conséquent de liaison à l'UT. Afin de contourner

ces difficultés, nous adaptons actuellement l'expérience de co-immunoprécipitation à la recherche d'une interaction entre l'UT<sup>c-myc</sup> et la filamine A endogène dans la cellule HEK-UT<sup>c-myc</sup>.

Nous avons démontré dans la présente étude que l'expression de la filamine A est corrélée à une diminution importante de la localisation de l'UT à la membrane plasmique. Une telle observation a été précédemment décrite pour le *calcium sensing receptor* (Zhang and Breitwieser, 2005). L'UT comme de nombreux RCPGs, peut s'internaliser après la liaison de son ligand UII (Giebing *et al.*, 2005; Proulx *et al.*, 2005). Il apparaît que dans les cellules M2 comme dans les cellules A7, l'UT semble principalement cytosolique après 10 min ou 6 h de traitement. Cependant, alors qu'en absence de filamine A, l'UT n'est quasiment plus présent à la membrane après 6 h d'activation, la présence de filamine A semble favoriser l'expression de l'UT à la membrane après activation. Ces données, bien que parcellaires, suggèrent que la filamine A participerait au recyclage de l'UT à la membrane plasmique. A l'appui de cette hypothèse, il a été démontré que la filamine A permet le recyclage du récepteur de la calcitonine à la membrane plasmique (Seck *et al.*, 2003) et bloque la dégradation des récepteurs calcitoninergique et opioïdurgique (Onoprishvili *et al.*, 2003; Seck *et al.*, 2003).

La filamine A est une protéine largement impliquée dans la migration cellulaire, dont l'expression est corrélée aux grades des gliomes (Rickman *et al.*, 2001). Dans les cellules U87, l'UII entraîne une déphosphorylation de la filamine A, et consécutivement son clivage. Il a été démontré que la protéolyse de la filamine A par la calpaïne II augmente l'invasion des cellules cancéreuses mammaires (Xu *et al.*, 2010) et que la présence de la calpaïne II est nécessaire à l'invasion des glioblastomes (Jang *et al.*, 2010; Lal *et al.*, 2012). Ainsi, dans les gliomes, la filamine A pourrait exercer un rôle inhibiteur sur la migration cellulaire qui serait levé *via* l'activation d'une phosphatase par l'UII, une réaction de déphosphorylation favorisant le clivage de la filamine A par la calpaïne II.



**Figure 37. Rôles hypothétiques de la filamine A dans les effets induits par l'UII.** (1) L'activation des récepteurs UT membranaires entraîne l'activation de la calpaïne II, la déphosphorylation de la filamine A et le clivage de celle-ci par la calpaïne II. (2) La filamine A permet la formation de dimères d'UT au niveau cytoplasmique et les ancre au cytosquelette d'actine ainsi qu'aux radeaux lipidiques. Le clivage de la filamine A libère les radeaux lipidiques qui sont acheminés jusqu'à la membrane plasmique. (3) Les dimères de récepteurs ainsi amenés à la surface cellulaire favorisent la formation des adhésions et des protrusions cellulaires.

Nos études préliminaires de migration en chambre de Boyden révèlent qu'une délétion de la filamine A ne bloque pas les effets stimulateurs de l'UII sur la migration cellulaire. De plus, la polymérisation d'actine induite par l'UII, déjà démontrée pour les cellules SW1088 est retrouvée dans les cellules M2 qui ne présentent aucune fibre de stress d'actine en condition basale. Ainsi, dans les deux types cellulaires, la voie de signalisation Rho/ROCK, responsable des effets pro-migratoires de l'UII, serait conservée. Les travaux relatant un rôle de la filamine A dans les effets des RCPGs sur la migration cellulaire sont peu nombreux et contradictoires. La filamine A joue en effet un rôle positif sur la migration induite par l'activation des récepteurs P2Y2 (Yu *et al.*, 2008) et CCR2B (Minsaas *et al.*, 2010). En revanche, son expression inhibe la migration et l'invasion de cellules cancéreuses mammaires

(Xu *et al.*, 2010), en activant le désassemblage des adhésions focales à l'avant des cellules en migration. Dans les cellules A7, les observations immunocytochimiques montrent que la quantité de filopodes est plus importante en condition traitée (environ 51,6 filopodes par cellule) qu'en condition contrôle (environ 41,6 filopodes par cellule). Les cellules M2 émettent peu de filopodes en condition basale (environ 16 filopodes par cellule) et légèrement plus après 6 h de traitement (environ 19,8 filopodes par cellule). Ces résultats indiquent que la filamine A, bien qu'importante dans la formation des protrusions (Ohta *et al.*, 1999), n'est pas essentielle aux effets de l'UII sur ces dernières. En revanche, les effets de l'UII sur les adhésions focales, démontrés dans l'étude 1, pourraient être associés à la présence de la filamine A dans les lignées de gliomes. Cette dernière, en permettant la dimérisation de l'UT et l'ancrage au cytosquelette, jouerait un rôle majeur dans la formation des radeaux lipidiques et dans l'adhésion cellulaire (Figure 37).



### **Partie 3.**

## **Etude des niveaux de protéines phosphorylées en réponse à l'activation de l'UT par une concentration homogène d'UII dans une lignée de glioblastome**

Les données obtenues grâce aux études 1 et 2 suggèrent des changements de couplage de l'UT relayant la migration cellulaire et des phénomènes d'adhésion *via* notamment la maturation des points focaux d'adhésion. Ce changement de couplage, pourrait s'accompagner de regroupements de récepteurs tels que des oligomérisations au sein de radeaux lipidiques. La filamine A, capable d'interagir avec le domaine C-terminal de l'UT pourrait intervenir dans ces mécanismes, en particulier *via* la déphosphorylation d'un de ses nombreux résidus serine après activation du récepteur de l'UII. Ainsi :

- ◆ Est-il possible de déterminer de manière qualitative et quantitative la nature des protéines dont certains sites consensus sont phosphorylés ou déphosphorylés en présence d'UII ?
- ◆ Ces protéines phosphorylées sont-elles, pour certaines, impliquées dans les processus de migration, d'adhésion ou de développement des gliomes en particulier ?
- ◆ Les protéines cibles du système urotensinergique, peuvent-elles constituer de nouvelles cibles thérapeutiques ?

## 1. Introduction

Les récepteurs à 7 domaines transmembranaires ou RCPGs signalisent principalement *via* l'activation des protéines G hétérotrimériques mais peuvent également activer des cascades de transduction indépendantes de ces dernières. Ainsi, un même RCPG pourrait initier plusieurs voies comprenant des phosphatases et des kinases capables de contrôler de nombreux effecteurs impliqués dans le métabolisme, la prolifération, la migration et/ou l'adhésion cellulaire. Le récepteur de l'UII, l'UT, est un RCPG classiquement couplé à la protéine G<sub>q</sub> (Ames *et al.*, 1999; Nothacker *et al.*, 1999; Elshourbagy *et al.*, 2002), mais qui est également couplé à la protéine G<sub>i/o</sub> dans certains types cellulaires (Ziltener *et al.*, 2002; Castel *et al.*, 2006; Jarry *et al.*, 2010). Dans le présent travail, les données de BRET obtenues en collaboration avec le Dr Leduc (Université de Sherbrook, Québec) montre que l'UT peut aussi présenter un couplage à la protéine G<sub>13</sub>. De plus, le domaine C-terminal de l'UT pourrait interagir directement avec les β-arrestines (Proulx *et al.*, 2005, 2008; Esposito *et al.*, 2011; Brulé *et al.*, article en préparation) ou encore, comme nous l'avons montré, avec la filamine A. L'ensemble de ces voies de signalisation seraient responsables de l'activation de nombreuses kinases *i.e.*, la PKC, la PI3K ou la ROCK. Ainsi, sur des lignées HEK293 et des gliomes de haut grade exprimant l'UT, nous avons montré que l'UII exerce une action chimiokine et stimule la migration cellulaire à faible gradient de concentration, permettant une maturation des adhésions focales à forte concentration homogène. L'ensemble de ces mécanismes requiert des couplages aux protéines G<sub>i/o</sub> et G<sub>13</sub>. Nous avons aussi isolé par double-hybride des protéines interagantes du domaine C-terminal de l'UT humain. Parmi celles-ci, la filamine A participerait à la dimérisation du récepteur et à la migration cellulaire. La compréhension des mécanismes relayés par l'UII et les protéines effectrices de l'UT, est indispensable pour proposer des traitements thérapeutiques ciblant les mécanismes d'invasion du tissu sain et de néoangiogenèse associés au développement des glioblastomes.

De nouveaux développements en spectrométrie de masse et protéomique permettent des approches globales des voies de signalisation recrutées par les RCPGs par exemple. De plus, l'optimisation du fractionnement des phosphopeptides et des protocoles d'enrichissement (Dunn *et al.*, 2010), la haute résolution MS sur des instruments hybrides *ion trap/orbitrap* et les avancées sur l'analyse bioinformatique des données (Allmer, 2012) peuvent être intégrées dans une étude telle que la notre afin de quantifier des milliers d'évènements de phosphorylation dans un système cellulaire, de façon globale et non biaisée.

Ici, nous avons utilisé la méthode de phosphoprotéomique quantitative dite *label free* sur une lignée de glioblastome U87 répondant aux signaux chimiotactiques, mais aussi aux concentrations homogènes du peptide UII ( $10^{-8}$  M), pendant 5 ou 30 min. Notre objectif est d'identifier les voies de signalisation associées aux différents couplages de l'UT, et à long terme de discriminer les voies de couplage engagées par certains ligands du récepteur UT. Notre étude a montré l'identification et la quantification de plus de 2000 sites phosphorylés, mais surtout de nouveaux évènements de phosphorylation associés à des réponses physiologiques connues, ou non encore identifiées dans le cas du récepteur UT. En plus d'évènement de phosphorylation, nous avons obtenu la preuve de réactions de déphosphorylations importantes et contrôlant les processus de migration et/ou adhésion.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Culture cellulaire, traitement et préparation des extraits peptidiques

La lignée U87 (glioblastome multiforme, WHO grade IV), provenant de l'ATCC est cultivée dans un milieu DMEM (Gibco) contenant 2 mM de NEAA, 2 mM de sodium pyruvate, 1% d'antibiotiques-antimycotique et 10% de SVF à 37°C dans une atmosphère humide gazée en CO<sub>2</sub> 5%.

Pour les études de phosphoprotéomique, les cellules sontensemencées dans des flasques de 300 cm<sup>2</sup> (Corning) et maintenues en condition de culture standard jusqu'à confluence. Les

cellules sont ensuite privées de SVF pendant 2 h, puis sont incubées en absence (contrôle, condition SVF) ou en présence d'UII ( $10^{-8}$  M, Polypeptide laboratories) pendant 0, 5 ou 30 min. Après rinçage (HEPES 10 mM), le tapis cellulaire est gratté dans du tampon de lyse (urée 8 M, NaCl 40 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM,  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  10 mM, NaF 50 mM,  $\beta$ -glycerophosphate 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, Tris HCl 50 mM, pH 7,7) supplémenté en inhibiteurs de protéases (cocktail d'inhibiteurs, Roche) et de phosphatases (cocktail d'inhibiteurs, Roche) et le lysat cellulaire est collecté, soniqué sur glace et incubé 1 h à température ambiante. Après centrifugation, les protéines solubles sont réduites dans du dithiotreitol (DTT 2,5 mM, 30 min,  $50^\circ\text{C}$ ) puis alkylées par ajout de iodacétamide 7 mM (30 min, température ambiante). La solution protéique est diluée dans l'eau pour atteindre une concentration finale d'urée de 1 M. Finalement, après ajout de Tris-HCl (50 mM final, pH 7,7) et de  $\text{CaCl}_2$  (1 mM final), la trypsine est ajoutée au 1/50 (w/w) et les protéines sont digérées toute la nuit à  $37^\circ\text{C}$ . La suspension peptidique est ensuite supplémentée avec 10% d'acide trifluoroacétique (TFA) pour atteindre un pH inférieur à 2, clarifiée à l'aide de colonnes C18 SPE (Thermo Scientific) puis lyophilisée.

## 2.2. Enrichissement en phosphopeptides

L'enrichissement en phosphopeptide a été effectué à l'aide du *phosphoCatch<sup>TM</sup> phosphopeptide enrichment system* (Promega). Brièvement, après équilibration de la colonne, le mélange peptidique reconstitué dans du tampon de liaison (acide glycolique 1 M, acétonitrile 50%, TFA 0,1%) est appliqué sur la résine. Après plusieurs rinçages, les phosphopeptides retenus sont élués avec 100  $\mu\text{L}$  de tampon (acétonitrile 50%/ hydroxide d'ammonium 50%, v/v). Afin d'éviter la dissociation des groupements phosphate, 70  $\mu\text{L}$  d'acide formique 4% sont immédiatement ajoutés à l'éluat. Finalement, les phosphopeptides purifiés sont lyophilisés.

### 2.3. Analyse par spectrométrie de masse

Les phosphopeptides sont acidifiés avec 25% d'acide formique jusqu'à un volume final de 40  $\mu$ L et 3  $\mu$ g de phosphopeptides sont analysés par nanoflow LC-MS/MS. Brièvement, toutes les expériences nano-LC-MS/MS ont été réalisées sur un EASY-nLCII<sup>TM</sup> system (Thermo Scientific) connecté au LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) via une source d'ions en nano-électrospray. Les mélanges phosphopeptidiques ont été séparés sur une colonne analytique de 15 cm (75  $\mu$ m de diamètre intérieur) avec un gradient allant de 5 à 30% d'acétonitrile dans 0,5% d'acide acétique durant 90 min. L'effluent provenant de l'HPLC a été directement envoyé par électrospray dans le spectromètre de masse.

L'instrument MS a été réglé en mode *data-dependent* pour passer automatiquement du balayage complet MS à l'acquisition MS/MS. Le spectre MS du balayage complet (de  $m/z$  300 à 2000) a été acquis par l'orbitrap avec une résolution  $R = 60,000$  au  $m/z$  400. Tous les spectres de fragment d'ion ont été enregistrés avec les détecteurs LTQ. Les conditions typiques de spectrométrie de masse étaient les suivantes : tension de pulvérisation, 2,4 kV; température de chauffage des capillaires, 150°C; énergie de collision normalisée, 35%.

### 2.4. Interprétation des données de spectrométrie de masse

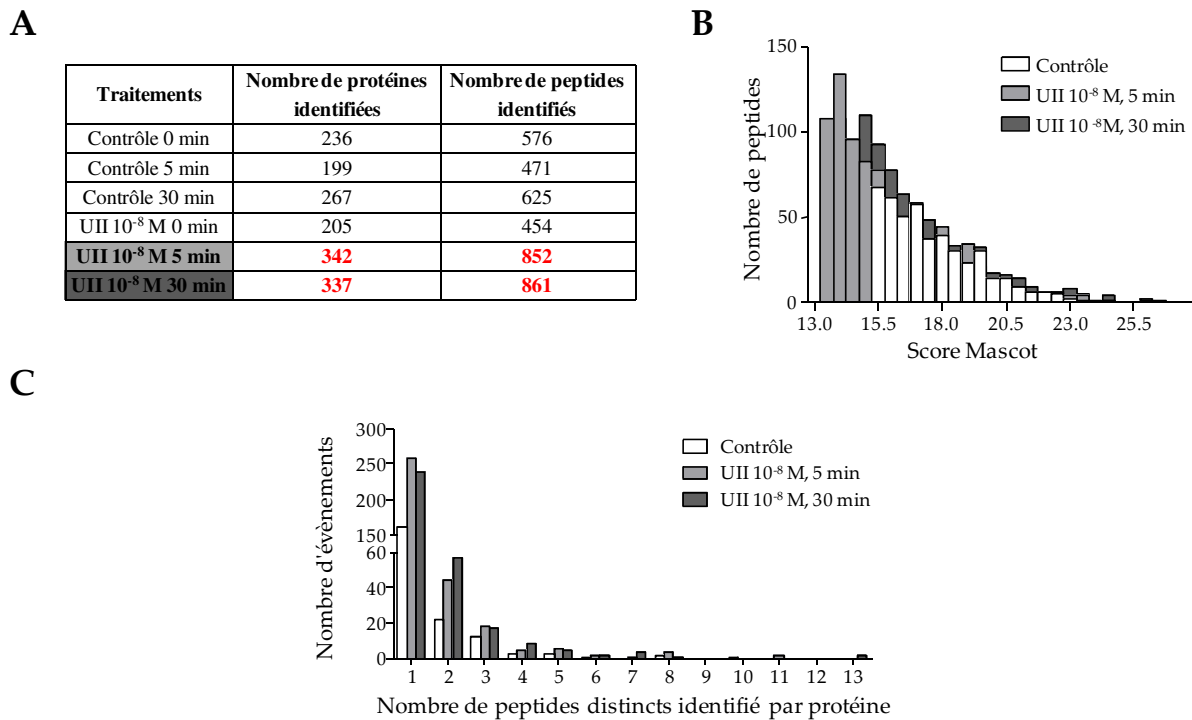
Une première analyse globale et l'identification des phosphopeptides ont été réalisées à l'aide du logiciel Spectrum Mill (Agilent Technologies, Massy, France) avec les réglages appropriés (*Optimize score and R1-R2 score thresholds for each run with max FDR 1.2%*). La quantification relative adaptée aux échantillons non marqués a été réalisée à partir des chromatogrammes d'ions grâce au logiciel commercial Progenesis (Nonlinear Dynamics Limited, Newcastle) selon les instructions du fournisseur. Brièvement, les images des gels 2 dimensions correspondant aux différents échantillons testés sont superposées et l'intensité de chaque point (correspondant à un peptide) est comparée entre toutes les images. Les filtres utilisés sont les suivants: *qvalue* inférieure à 0,05%; *pvalue* inférieure à 0,05%; *charges* de 2 à

4; au moins 2 peptides pour l'identification, *Rank* supérieur à 10. La liste des peptides conservés à l'issue de ce traitement est entrée dans le logiciel Mascot afin d'obtenir le nom des protéines correspondant aux peptides régulés.

### 3. Résultats

#### 3.1. Analyse globale des phosphopeptides

Afin d'identifier de nouvelles protéines appartenant à la voie de signalisation du récepteur UT dans les gliomes, nous avons utilisé une technique sans marquage associant un enrichissement en phosphopeptide à une spectrométrie de masse en haute résolution. Cette approche en haut débit permet une analyse quantitative des changements de phosphorylation sur de multiples sites peptidiques (Dr Philippe Chan, PISSARO, Rouen). Dans cette étude, nous avons cherché à comparer le phosphopeptidome des cellules gliomales U87 non exposées à l'UII et en absence de sérum, à celui des cellules U87 incubées en présence d'UII pendant 5 ou 30 min. Une première analyse réalisée à l'aide du logiciel Spectrum Mill a permis d'identifier de nombreux peptides correspondant à des protéines connues (Figure 38A). Nous avons observé que l'activation de l'UT par une concentration homogène de ligand jusqu'à 30 min, accroît le nombre de peptides, et par conséquent, de protéines identifiées. L'histogramme de distribution des peptides en fonction de leur score Mascot (Figure 38B) montre que ces nouveaux peptides phosphorylés présentent un faible score, en partie expliqué par l'existence d'une seule séquence peptidique phosphorylée permettant l'identification protéique (Figure 38C). Ces données suggèrent que l'activation du récepteur UT a en effet initié la phosphorylation de protéines au niveau de séquences consensus non phosphorylées en l'absence d'UII. A ce niveau, il n'est pas possible de discriminer les sites déphosphorylés en présence d'UII.



**Figure 38. Analyse globale des peptides et protéines identifiés par Mascot.** **A.** Récapitulatif du nombre de protéines et de peptides identifiés après analyse du phosphoprotéome dans les différentes conditions. En rouge apparaissent les valeurs obtenues lorsque les cellules sont exposées à une concentration homogène d'UII ( $10^{-8}$  M). **B.** Histogramme représentant la distribution des peptides en fonction de leur score Mascot dans les différentes conditions. **C.** Histogrammes représentant la distribution du nombre de peptide distinct par protéine.

### 3.2. Analyse quantitative des phosphopeptides

L'étude bioinformatique de l'ensemble des données du phosphoprotéome réalisée de manière quantitative à l'aide du logiciel Progenesis (Pr Pascal Cosette, Mr Antoine Obry, PISSARO, Rouen) nous a permis d'identifier 17 peptides dont la quantité est augmentée en présence d'UII et 49 peptides dont l'abondance est diminuée en présence d'UII. Parmi ces peptides, seuls ceux possédant au moins un acide aminé localisé dans un site consensus de phosphorylation (serine, thréonine ou tyrosine) ont été conservés. L'augmentation de la masse d'un peptide résultant de l'association d'un groupement phosphate à un acide aminé permet au logiciel Mascot d'identifier les résidus phosphorylés sur les peptides. En revanche, certains des peptides identifiés ne présentent pas d'attribution de résidus phosphorylés, ce que nous expliquons par la liaison fragile des groupements phosphate et la perte de certains d'entre eux au cours des manipulations. Nous pouvons mentionner la mise en évidence d'oxydations de méthionine sur plusieurs peptides, correspondant probablement à des modifications normales

des peptides au cours de la purification (traitements, exposition à l'air des échantillons). Nous n'avons donc pas pris en compte ces modifications dans notre analyse. Ainsi, après élimination des peptides ne correspondant pas aux critères fixés, nous nous sommes focalisés sur 13 et 32 phosphopeptides dont la quantité est augmentée et diminuée en présence d'UII, respectivement.

### 3.2.1. Effets de l'UII sur la phosphorylation de peptides

Dans la présente étude, nous nous sommes en premier lieu intéressés aux effets de l'UII initiés dès 5 min, et qui se maintiennent sur une durée de 30 min. Les données obtenues après traitement à l'UII de 5 et 30 min ont été comparées aux données correspondant au traitement par l'UII (au temps 0) ou sans traitement (absence de sérum, SVF<sup>-</sup>) à 0, 5, 30 min, et analysées grâce au logiciel Progenesis (Nonlinear Dynamics Limited). Sur l'ensemble des peptides dont la quantité est augmentée en présence d'UII à 5 et 30 min (Tableau 17), 10 peptides ont un site de phosphorylation clairement identifié (sérine 81%, thréonine 19% et tyrosine 0%). Les proportions des résidus phosphorylés sont comparables avec celles retrouvées dans d'autres études de phosphoprotéome (Olsen *et al.*, 2006; Christensen *et al.*, 2010). Parmi les protéines identifiées, 6/13 sont décrites dans la littérature comme ayant une implication dans les processus de migration et d'adhésion cellulaire (Tableau 17).

Gene	Protéine	Site de modification	Facteur de variation maximum	p-Value	Fonctions principale	Localisation cellulaire
<b>EF1G</b>	<i>Elongation factor 1-gamma</i>	ND	10,59	0,028	Facteur d'élongation de la traduction	Cytoplasme
<b>FRIH</b>	<i>Ferritin heavy chain</i>	S179, S183	4,97	0,002	Stockage du fer	Cytoplasme, mitochondrie
<b>S100A10</b>	<i>S100 calcium binding protein A10</i>	ND	4,38	0,026	Progression du cycle cellulaire, différenciation, traficking, remodelage du cytosquelette	Cytoplasme
<b>MAP1A</b>	<i>Microtubule-associated protein 1A</i>	S526, S527	2,38	0,041	Organisation du cytosquelette et des microtubules	Cytoplasme
		S2022	1,63	0,019		
<b>PAXI</b>	Paxilline	T284, S287, S288	2,12	0,040	Régulation des adhésions	Sous membranaire, protrusions
<b>RLA0</b>	<i>60S acidic ribosomal protein P0</i>	S304, S307	1,96	0,041	Traduction	Cytoplasme, noyau



<b>AAKB1</b>	<i>5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-1</i>	S108	1,80	0,038	Sous-unité régulatrice de l'AMPK	Cytoplasme
<b>ANXA1</b>	Annexine A1	ND	1,80	0,032	Anti-inflammatoire, prolifération, apoptose, migration...	Cytoplasme, sous-membranaire
<b>HNRPU</b>	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U</i>	S271	1,71	0,033	Liaison aux préARNm et maturation	Noyau
		T286	1,47	0,001		
<b>TRI18</b>	Midline-1	T247	1,56	0,014	Ubiquitine ligase	Cytoplasme
<b>MYH9</b>	Myosine 9	ND	1,55	0,031	Organisation du cytosquelette, motilité, migration	Cytoplasme
<b>G3P</b>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	ND	1,52	0,049	Métabolisme énergétique	Cytoplasme
<b>SMRC1</b>	<i>SWI/SNF complex subunit SMARCC1</i>	S328, S330	1,28	0,004	Remodelage de la chromatine	Noyau

**Tableau 17. Description des protéines dont la quantité de peptide est augmentée après un traitement à l'UII de 5 à 30 min.** Les protéines surlignées en violet correspondent à des protéines impliquées dans les processus de migration et d'adhésion.

L'alignement des séquences peptidiques comprenant un résidu phosphorylé après traitement en présence d'UII, ne permet pas d'obtenir un motif consensus précis (Figure 39). En effet, de part et d'autre du résidu phosphorylé (en position 5), aucun acide aminé ne semble être plus représenté que les autres. Ces données pourraient indiquer que les effets de l'UII sur les protéines pourraient être relayés par plusieurs types de kinases.



**Figure 39. Représentation de la fréquence de distribution des acides aminés dans les peptides phosphorylés après un traitement à l'UII.** Un alignement de séquence a été réalisé en prenant l'acide aminé phosphorylé comme repère (en position 5). La représentation « en logo » a été réalisée à partir du logiciel libre WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu>).

Pour la protéine S100A10, le peptide identifié n'a pas de site de phosphorylation clairement caractérisé dans une séquence consensus (bien que le peptide contienne un Trp et une Tyr) mais il est 4,38 fois plus abondant dans les échantillons traités à l'UII. De plus, il apparaît que ce peptide est 2,23 fois plus abondant dans les cellules traitées à l'UII pendant 30

min que dans celles exposées à l'UII pendant seulement 5 min. La protéine S100A10 appartient à la famille des protéines de liaison au calcium S100 et est souvent liée à l'annexine A2 formant un complexe hétérotrétamérique (Kassam *et al.*, 1998). Cette dernière semble jouer un rôle important dans la polarisation cellulaire, l'activation des protéines Rho GTPases et contribue, *via* le recrutement de Cdc42 aux adhésions cellule-cellule (Grieve *et al.*, 2012). De plus, la sous-unité S100A10 possède un résidu lysine capable de lier le uPA et le plasminogène favorisant la conversion du plasminogène en plasmine (MacLeod *et al.*, 2003). Cette protéine potentiellement sécrétée, favorise donc la protéolyse péri-cellulaire et augmente l'invasion tumorale (Madureira *et al.*, 2012). Par ailleurs, une étude a démontré par l'utilisation d'ARN interférant que la S100A10 participe à la migration cellulaire en régulant le réseau de filaments d'actine (Jung *et al.*, 2010b). Etant donné qu'aucun site de phosphorylation n'a été décrit dans la littérature pour cette protéine, et qu'aucun mode d'activation par phosphorylation n'a été mentionné, ce résultat ouvre de nouvelles possibilités de régulation de la polarisation cellulaire notamment *via* l'activation de RCPGs capables de relayer des voies de signalisation dépendantes des protéines G et/ou des boucles intracellulaires.

Deux peptides ont été identifiés pour la protéine MAP1A présentant des facteurs d'amplification de 2,38 et 1,63, respectivement, et pour l'un d'entre eux, deux sites de phosphorylation ont été attribués. Il apparaît qu'entre 5 et 30 min, la quantité du premier peptide est restée stable, alors que celle du second a diminué (rapport de 0,77) suggérant que l'effet maximum de l'UII sur cette protéine est rapide. La phosphorylation de la protéine MAP1A augmente sa liaison aux microtubules et leur stabilisation (Faller and Brown, 2009; Noiges *et al.*, 2002) alors que l'inhibition de MAP1A par un siRNA bloquerait la croissance gliomale chez des rats en inhibant la mitose cellulaire (Matsuno *et al.*, 2004). Ici, l'UII entraîne la phosphorylation et l'activation de cette protéine confirmant un rôle du peptide dans la stabilisation des microtubules et la croissance gliomale.

La paxilline est une protéine importante pour la formation et surtout la maturation des adhésions au sein de complexes impliquant la vinculine et la taline (cf. Chapitre I, §1.1.3, cf. Résultats partie 1). Notre étude révèle la présence d'un peptide correspondant à cette protéine dont la quantité est 2,12 fois plus importante en présence d'UII qu'en condition contrôle. Il apparaît que le peptide est plus abondant après 5 min (220%) qu'après 30 min de stimulation (203%) suggérant que la phosphorylation de la paxilline est un phénomène rapide. Le logiciel a détecté 3 sites potentiels de phosphorylation sur ce peptide correspondant à deux serines et une thréonine. Bien que l'activation de la paxilline soit principalement caractérisée par la phosphorylation de résidus tyrosine, il apparaît que des résidus Ser/Thr mis en évidence dans notre étude sont également phosphorylés (Brown and Turner, 2004). En effet, l'activation des intégrines (De Nichilo and Yamada, 1996; Bellis *et al.*, 1997), l'EGF (Terfera *et al.*, 2002), l'IL-3 (Salgia *et al.*, 1995) ou encore l'ANG-II (Brown and Turner, 1999) conduisent à la phosphorylation de certains résidus sérine de la paxilline, *via* certaines kinases de types PKC, MAPKs ou PAK (Brown and Turner, 2004). Bien que les sites de phosphorylation (T284, S287, S288) que nous avons mis en évidence n'aient pas été décrits chez l'Homme, notre étude suggère que l'UII est capable de phosphoryler la paxilline au niveau de sites spécifiques, contribuant de façon majeure aux effets de l'UII sur l'adhésion cellulaire.

Notre analyse phosphoprotéomique révèle la présence en quantité plus importante (facteur 1,80) d'un peptide issu de l'annexine I dans les conditions traitées UII, et ce de manière plus importante après 5 min de traitement, suggérant là encore, une action rapide de l'UII sur cette protéine. L'annexine I est une protéine capable de lier la membrane plasmique en présence de calcium. Cette protéine peut être phosphorylée par de nombreuses kinases de types PKC, PKA ou encore *transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7* (TRPM7) (Lim and Pervaiz, 2007) et de façon intéressante par la LIMK (Côté *et al.*, 2010), une des protéines partenaires de l'UT identifiée en double-hybride (voir Résultat partie 2). Bien qu'elle ait été étudiée principalement pour son rôle dans l'inflammation, l'annexine I exerce

également des effets sur la prolifération ou la migration cellulaire. Les effets de l'annexine I sur la migration pourraient résulter de l'activation de récepteurs des peptides formylés (Bizzarro *et al.*, 2012) ou de l'expression de métalloprotéases matricielles (Kang *et al.*, 2012). De manière intéressante, cette protéine peut être sécrétée par la zone perinécrotique des glioblastomes et agit, en tant qu'agoniste des récepteurs aux peptides formylés sur la croissance tumorale (Yang *et al.*, 2011). Sur le peptide identifié ici, aucun site de phosphorylation n'a été attribué.

La myosine 9 est une protéine de la famille des *non-muscle myosin* et forme la chaîne lourde de la myosine 2A. De ce fait, elle est largement impliquée dans la migration cellulaire. Dans notre étude, nous montrons que la myosine 9 se trouve en quantité plus importante dans les échantillons traités à l'UII (facteur de variation de 1,55) avec un effet plus important à 30 min (185%) qu'à 5 min (124%). Bien qu'aucun site de phosphorylation n'ait été attribué dans notre analyse pour ce peptide, il contient néanmoins 2 sérines (S1713 et S1714). La myosine 2A est impliquée dans de nombreux processus *i.e.*, la migration, l'adhésion et la polarisation cellulaire (Vicente-Manzanares *et al.*, 2009) et est régulée par de nombreuses kinases qui phosphorylent ses chaînes lourdes et légères. Alors que les chaînes légères sont phosphorylées par des kinases telles que ROCK ou MLCK, les chaînes lourdes dont fait partie la myosine 9 sont principalement phosphorylées par les PKC et TRPM7 (Vicente-Manzanares *et al.*, 2009).

### 3.2.2. Effets de l'UII sur la déphosphorylation de peptides

Notre analyse phosphoprotéomique nous a permis d'isoler des peptides dont la quantité est diminuée par un traitement à l'UII (Tableau 18). Sur l'ensemble des peptides listés ci-dessous, seulement 9 ont un site de phosphorylation clairement identifié (serine 78%, thréonine 11% et tyrosine 11%). Sept de ces 32 protéines identifiées jouent un rôle dans les processus de migration et d'adhésion cellulaires.

Gene	Protéine	Site de modification	Facteur de variation maximum	p-Value	Fonctions principale	Localisation cellulaire
<b>PCNP</b>	<i>PEST proteolytic signal containing nuclear protein</i>	S120	≈0	0,0002	N.D.	Noyau
<b>FLNB</b>	Filamine B	N.D.	≈0	0,0001	Migration, adhésion, signalisation	Cytoplasme
<b>TEBP</b>	<i>Prostaglandin E synthase 3</i>	S115	0,10	0,0444	Synthèse de prostaglandine, activité télomérase	Cytoplasme, Noyau
<b>ALDOA</b>	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	N.D.	0,26	0,0303	Métabolisme énergétique	Cytoplasme
<b>SFPQ</b>	<i>Splicing factor, proline- and glutamine-rich</i>	N.D.	0,28	0,0478	Maturation des ARNm	Cytoplasme
<b>KHDR1</b>	<i>KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1</i>	S20	0,28	0,0122	Maturation des ARNm, facteur de transcription	Cytoplasme, noyau
<b>TLN1</b>	Taline 1	S425	0,31	0,0070	Migration, réarrangement du cytosquelette, liaison aux intégrines	Cytoplasme
		Y2530	0,60	0,0444		
<b>RL35A</b>	<i>60S ribosomal protein L35a</i>	N.D.	0,40	0,0144	Participe à la traduction	Cytoplasme
		N.D.	0,65	0,0415		
<b>HINT1</b>	<i>Histidine triad nucleotide-binding protein 1</i>	N.D.	0,41	0,0416	Hydrolyse des nucléotides	Mitochondrie
		N.D.	0,44	0,0494		
<b>KPYM</b>	<i>Pyruvate kinase isozymes M1/M2</i>	N.D.	0,42	0,0124	Métabolisme énergétique	Cytoplasme
<b>PAIRB</b>	<i>Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein</i>	N.D.	0,44	0,0316	Régule la stabilité des ARNm de PAI-1	Cytoplasme
<b>TCPE</b>	<i>T-complex protein 1 subunit epsilon</i>	N.D.	0,45	0,0196	Protéine chaperonne qui participe au repliement de l'actine et de la tubuline	Cytoplasme
<b>FLNA</b>	Filamine A	N.D.	0,49	0,0469	Migration, adhésion, signalisation	Cytoplasme
		N.D.	0,67	0,0459		
<b>TGM2</b>	<i>Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2</i>	N.D.	0,50	0,0397	Transglutaminase	Cytoplasme
<b>TENA</b>	<i>Tenascin precursor</i>		0,54	0,0485	Adhésion, migration	Matrice extracellulaire
<b>ADPPT</b>	<i>L-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase</i>	N.D.	0,55	0,0468	Métabolisme	Cytoplasme
<b>XRCC1</b>	<i>DNA-repair protein XRCC1</i>	S236, S241	0,56	0,0283	Réparation de l'ADN	Noyau
<b>CALU</b>	<i>Calumenin precursor</i>	N.D.	0,56	0,0109	Fonctionnement du réticulum	Cytoplasme, réticulum endoplasmique
			0,68	0,0147		
<b>TRA2B</b>	<i>Splicing factor, arginine/serine-rich 10</i>	T201	0,55	0,0388	Maturation des ARNm	Noyau
<b>HS90A</b>	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	N.D.	0,56	0,0189	Protéine chaperonne, maturation et repliement des protéines	Cytoplasme
<b>CHD4</b>	<i>Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4</i>	N.D.	0,59	0,0031	Repression de la transcription	Noyau
<b>CS043</b>	<i>Uncharacterized protein</i>	N.D.	0,59	0,0264	N.D.	N.D.

C19orf43						
<b>UBA6</b>	<i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6</i>	N.D.	0,59	0,0190	Activation de l'ubiquitine	Cytoplasme
<b>HS90B</b>	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	S255	0,61	0,0037	Protéine chaperone, maturation et repliement des protéines	Cytoplasme
		N.D.	0,63	0,0403		
<b>LMNA</b>	Lamine A/C	N.D.	0,63	0,0280	Stabilité nucléaire, expression des gènes	Noyau
<b>CAN2</b>	<i>Calpain-2 catalytic subunit precursor</i>	N.D.	0,64	0,0017	Protéase impliquée dans l'adhésion	Cytoplasme
<b>VIME</b>	Vimentine	N.D.	0,64	0,0176	Forme cellulaire, motilité, migration adhésion, transport cellulaire	Cytoplasme, cytosquelette
<b>RAN</b>	<i>GTP-binding nuclear protein Ran</i>	N.D.	0,64	0,0313	Transport des protéines et ARNm, organisation des microtubules, signalisation	Cytoplasme, noyau
<b>PGK1</b>	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	N.D.	0,69	0,0126	Métabolisme énergétique	Cytoplasme
<b>ACLY</b>	<i>ATP-citrate synthase</i>	S455	0,70	0,0005	Métabolisme énergétique	Cytoplasme
<b>ACTN4</b>	Alpha-actinine 4	N.D.	0,73	0,0158	Liaison des filaments d'actines, adhésion, migration	Cytoplasme
<b>ZNF254</b>	<i>zinc finger protein 254</i>	N.D.	0,81	0,0292	N.D.	Noyau

**Tableau 18. Descriptif des protéines dont la quantité de peptides est diminuée après un traitement à l'UII.** Les protéines surlignées en violet correspondent à des protéines impliquées dans les processus de migration et d'adhésion. N.D.: non déterminé.

La filamine B est une protéine appartenant à la famille des filamines composée de 3 membres, les filamines A, B et C. La filamine B, comme les autres membres de la famille, est une protéine de liaison à l'actine qui participe à la migration et à l'adhésion cellulaire. Cette protéine qui est préférentiellement exprimée dans le tissu vasculaire (Del Valle-Pérez *et al.*, 2010) est retrouvée au niveau de la zone pseudopalisadique des gliomes, et son expression est stimulée par un environnement hypoxique (Nissou *et al.*, 2013). Notre étude de phosphoprotéomique révèle qu'un peptide issu de cette protéine est identifié uniquement en condition contrôle, suggérant qu'en présence d'UII ( $10^{-8}$  M, 5 ou 30 min = facteur de variation infini), une déphosphorylation majeure du peptide et/ou une dégradation est consécutive à l'activation de l'UT. Aucun site de phosphorylation n'a été attribué à ce peptide alors qu'il contient une sérine (S1433). Une autre étude de phosphoprotéomique réalisée à grande échelle (Olsen *et al.*, 2010) a mis en évidence l'existence d'une phosphorylation de ce site S1433, mais n'y a pas associé de fonction. Il a été démontré qu'une déphosphorylation de la filamine

A et de la filamine C initie un clivage par la calpaïne (Guyon *et al.*, 2003; O'Connell *et al.*, 2009), conduisant à leurs inactivations. La filamine A, décrite dans la partie 2 des résultats, participe à de nombreux processus cellulaires tels que la signalisation, le trafic subcellulaire, l'adhésion et la migration. Notre analyse montre que l'UII entraîne aussi une diminution de la quantité de peptides phosphorylés issus de la filamine A. On en dénombre deux, qui présentent 3 (S1367, T1369 et T1370) et 5 (T1603, Y1604, T1605, Y1608 et T1613) résidus phosphorylables respectivement avec une diminution de 45% et 25% à 5 min et 57% et 40% à 30 min. Ces sites, n'ont pas, à notre connaissance été décrits dans la littérature. Néanmoins, il est possible de noter que comme pour la filamine B, une déphosphorylation de certains résidus de la filamine A déclenche son clivage par la calpaïne. Ainsi, nous pouvons suggérer que l'UII contrôle la déphosphorylation des filamines A et B, entraînant leurs clivages et l'inhibition de l'activité de ces dernières. Les travaux de Del Valle-Pérez et coll., qui montrent qu'une déplétion en filamine B réduit la motilité des cellules endothéliales et favorise la formation des adhésions focales (Del Valle-Pérez *et al.*, 2010), laissent supposer qu'une concentration homogène d'UII catalyse la déphosphorylation des filamines A et B et renforce les adhésions focales.

La taline est une protéine largement impliquée dans l'adhésion cellulaire comme décrit dans le chapitre I, §1.3. C'est l'une des premières protéines recrutées à l'extrémité cytoplasmique des intégrines lors de leur activation. Dans notre étude, un traitement à l'UII provoque une déphosphorylation de la protéine au niveau de la sérine 425 (S425, facteur 0,31) et de la tyrosine 2530 (Y2530, facteur 0,60), plus marquée à 5 (70 et 51%) qu'à 30 min (68 et 28%). Ces deux sites de phosphorylation ont été retrouvés lors d'une cartographie des sites de phosphorylation de la taline par spectrométrie de masse (Ratnikov *et al.*, 2005). A l'heure actuelle, on ne connaît pas le type de kinase capable de phosphoryler la Y2530, alors que la CDK5 ou la PKC phosphoryleraient la S425 (Ratnikov *et al.*, 2005; Critchley, 2009). Il a été démontré que la déphosphorylation de cette dernière entraîne l'ubiquitinylation et la

dégradation par le protéasome de la tête de la taline, favorisant le turnover des adhésions focales (Critchley, 2009). Ainsi, l'UII en induisant la déphosphorylation de la taline permettrait le turnover des adhésions focales, favorisant ainsi la migration cellulaire.

La tenascine est une protéine de la matrice extracellulaire dont l'expression est élevée dans les gliomes et corrélée à l'angiogenèse tumorale (Zagzag *et al.*, 1995). Un anticorps dirigé contre cette protéine en cours de test en phase clinique II, prolonge la médiane de survie des patients atteints d'un gliome (Reardon *et al.*, 2002). La tenascine agit sur la migration et l'invasion des cellules tumorales gliales et aussi sur la formation des microvaisseaux (Deryugina and Bourdon, 1996; Zagzag *et al.*, 2002; Hirata *et al.*, 2009). Notre étude de phosphoprotéomique révèle une diminution de la quantité de peptides issus de la ténascine (rapport 0,54) de 30% après 5 min et 63,5% après 30 min de traitement. Ce peptide contient une sérine en position 2178 (S2178) dont l'état de phosphorylation n'a pas été répertorié dans la littérature. Il est donc envisageable qu'une diminution de la quantité de tenascine phosphorylée dans les cellules U87 soit associée à un signal de sécrétion libérant cette dernière dans le milieu extracellulaire en réponse à l'UII.

Notre analyse a mis en évidence la diminution d'un peptide issu de la sous-unité catalytique de la calpaïne II, une enzyme qui catalyse la protéolyse spécifique de protéines du cytosquelette et des voies de signalisation dont les protéines ont été décrites précédemment (filamines). Le traitement pendant 5 et 30 min conduit à une diminution de l'abondance de ce peptide de 25 et 40%, respectivement qui possède une sérine en position 20 (S20) dont l'état de phosphorylation n'est pas répertorié dans la littérature. La calpaïne II est classiquement activée par le calcium (Croall and DeMartino, 1991), néanmoins, elle peut être directement phosphorylée par la PKA (Shiraha *et al.*, 2002) ou par ERK (Glading *et al.*, 2004). La phosphorylation de la calpaïne peut entraîner à la fois son inhibition ou son activation selon l'acide aminé modifié (Shiraha *et al.*, 2002; Glading *et al.*, 2004). Enfin, la calpaïne II est exprimée dans les gliomes et son inhibition par des ARN interférents provoque une



diminution importante de l'invasion des cellules tumorales *in vivo* (Jang *et al.*, 2010; Lal *et al.*, 2012). Nous proposons que l'UII, en permettant la déphosphorylation d'un résidu de la calpaïne II, stimule son activité catalytique, vis-à-vis de certaines protéines, dont celles décrites ici.

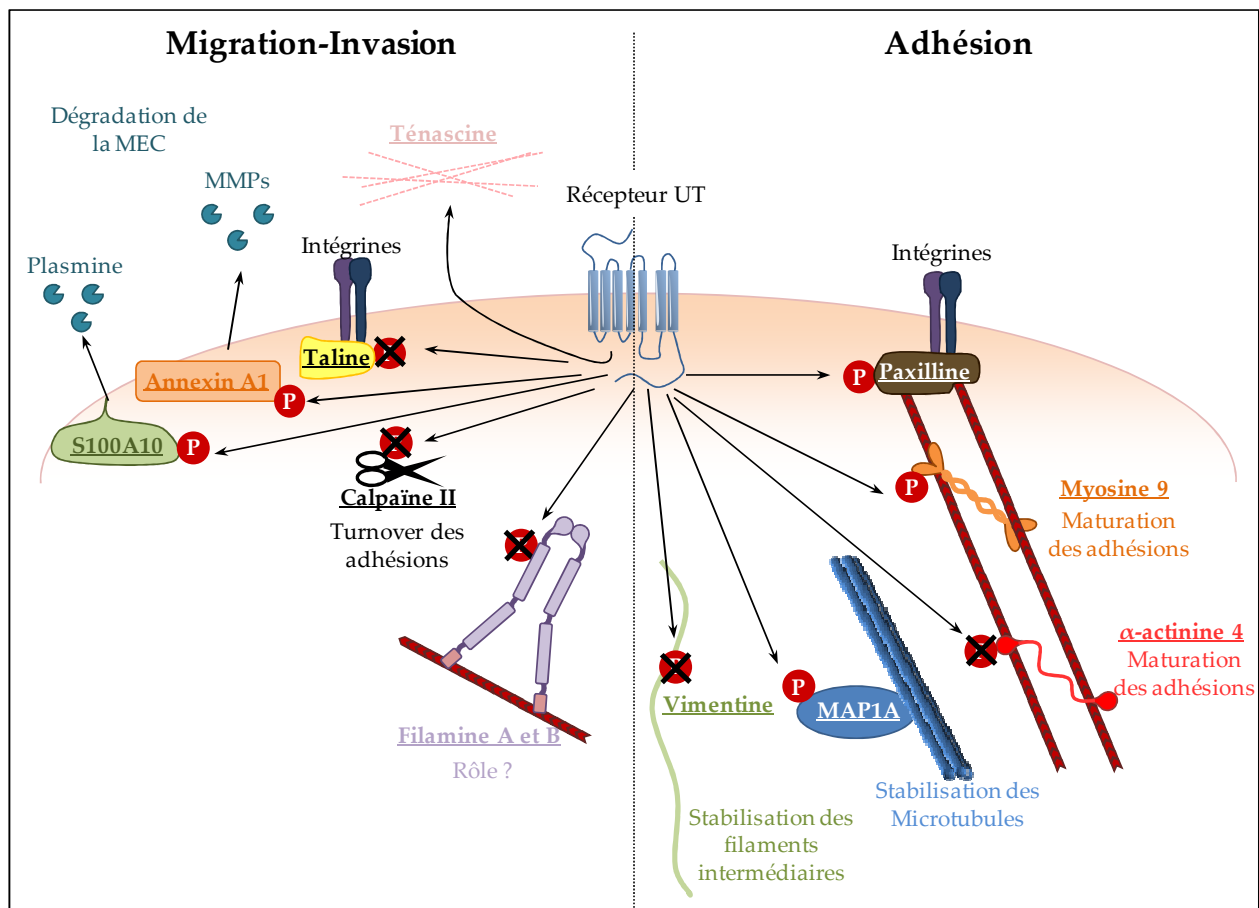
La vimentine est une protéine appartenant aux « filaments intermédiaires », qui est particulièrement exprimée dans les cellules mésenchymateuses. Cette protéine exerce un rôle important dans le positionnement des organelles dans la cellule en se liant au noyau, au réticulum endoplasmique et aux mitochondries. Durant le processus de migration, la vimentine participe au remodelage des filaments intermédiaires (Ridley, 2001). Par ailleurs, il a récemment été démontré que la liaison des filaments intermédiaires de vimentine aux adhésions cellulaires est nécessaire à l'étalement des cellules (Lynch *et al.*, 2012). En accord avec ces données, cette protéine est hautement exprimée dans les cellules infiltrantes issues d'astrocytomes (Rutka *et al.*, 1999). Dans notre étude, un phosphopeptide issu de la vimentine est diminué dans les échantillons incubés en présence d'UII (facteur 0,64). Le peptide n'a pas été isolé avec un groupement phosphate mais possède néanmoins une thréonine (T165) qui n'est pas répertoriée dans la littérature comme site de phosphorylation. Pour ce peptide, nous observons une diminution de la quantité de 31,6 et 39,6% à 5 et 30 min de traitement respectivement. La déphosphorylation de la vimentine par la PP2A permet la stabilisation des filaments intermédiaires (Turowski *et al.*, 1999). Ainsi, l'UII pourrait initier un premier signal d'activation d'une phosphatase telle que la PP2A, et entraîner la déphosphorylation de la vimentine, pour stabiliser les adhésions cellulaires.

Les  $\alpha$ -actinines sont des protéines du cytosquelette qui lient les filaments d'actine. De ce fait, elles exercent des effets sur le réarrangement du cytosquelette, sur la migration et l'adhésion cellulaire. Le rôle de l' $\alpha$ -actinine dans la maturation des adhésions cellulaires a été abordé dans le Chapitre I, §1.3.3. L' $\alpha$ -actinine 4 joue un rôle important dans l'invasion des cellules cancéreuses et son expression est corrélée positivement au grade des gliomes dans

lesquels elle est fortement exprimée, en particulier dans les cellules de la zone pseudopalisadique (cellules en hypoxie) (Fukushima *et al.*, 2013). L'inhibition de l' $\alpha$ -actinine 4 dans des lignées de gliome (dont la lignée U87) réduit la motilité et l'adhésion de ces cellules (Quick and Skalli, 2010). Nos résultats révèlent qu'un peptide issu de l' $\alpha$ -actinine 4 est significativement plus abondant dans les conditions contrôles que dans les conditions traitées (facteur 0,73). Bien qu'aucun groupement phosphate n'ait été détecté sur ce résidu au cours des étapes d'identification, le peptide présente une sérine en position 642 (S642), un site de phosphorylation non décrit dans la littérature. L' $\alpha$ -actinine dans son état déphosphorylée est capable de lier les filaments d'actine ensemble et favoriser la maturation des adhésions (von Wichert *et al.* 2003). Ainsi l'UII, en stimulant la déphosphorylation de l' $\alpha$ -actinine 4 pourrait entraîner la maturation des adhésions cellulaires.

#### 4. Conclusion

L'ensemble des données obtenues par l'analyse du phosphoprotéome des cellules de glioblastome U87 traitées par le peptide UII nous a permis d'approfondir nos connaissances sur les voies de signalisation et les protéines effectrices relatives aux effets **d'une concentration homogène** de ligand sur les mécanismes de migration et d'adhésion cellulaires. En effet, 29% des peptides identifiés sont issus de protéines impliquées dans les processus de réarrangement du cytosquelette et d'adhésion. La phosphorylation de certaines de ces protéines en présence d'UII pourrait être relayée par des kinases potentiellement activées par l'UT telles que la PKC, la PI3K, la ROCK ou encore la LIMK. A l'inverse, aucune phosphatase n'est identifiée dans les voies de signalisation activées par l'UT. Nous pouvons établir un schéma hypothétique montrant le rôle de l'UT sur les mécanismes de phosphorylation et déphosphorylation des protéines impliquées dans la migration et l'adhésion cellulaires (Figure 40).



**Figure 40. Représentation schématique des différentes voies de phosphorylation et déphosphorylation associées à l'activation de l'UT dans une lignée de glioblastome.** Des cellules de glioblastomes de la lignée U87 sont incubées en absence de sérum et en présence d'une concentration homogène d'UII ( $10^{-8}$  M) pendant 5 ou 30 min. L'analyse du phosphoprotéome suggère que l'UII déphosphoryle un certain nombre de protéines impliquées dans la migration et l'invasion cellulaire, et phosphoryle des protéines du cytosquelette importantes dans la maturation des adhésions focales.

Les données obtenues sont le résultat d'une seule expérience et 2 expériences identiques déjà menées sont en cours d'analyse. Il est intéressant de noter qu'un certain nombre de protéines candidates dans les résultats décrits en première (vinculine) et deuxième partie (filamine A), sont retrouvées dans l'analyse du phosphoprotéome. L'apport de nouvelles données nous permettra de conforter celles déjà obtenues et d'affiner les voies de signalisation de l'UT par des analyses de Western blot et des co-immunoprécipitations. Le rôle potentiel de certaines d'entre elles sera recherché dans le développement des gliomes de haut grade avec néoangiogenèse. Enfin, nous ne nous sommes pas focalisés sur des protéines associées au métabolisme cellulaire, mais les travaux menés actuellement dans l'équipe par le

Dr Fabrice Morin et son étudiant Pierre Mickael Coly, montrent que l'UII inhibe l'activité autophagique des cellules HEK293 exprimant l'UT.

---



## Discussion-Conclusion

La migration chimiotactique est un processus cellulaire majeur, impliqué en particulier au cours du développement, dans les processus inflammatoires ainsi que dans la progression tumorale, participant aux processus métastatiques, à l'invasion du parenchyme sain, à la colonisation cellulaire tumorale et/ou à la néoangiogenèse. Les patients atteints de tumeurs cérébrales gliales de haut grade telles que le glioblastome présentent actuellement une médiane de survie de seulement 15 mois, en raison principalement d'un taux de récurrence extrêmement élevé. En effet, le haut niveau d'agressivité des glioblastomes est caractérisé par l'invasion des cellules tumorales dans le parenchyme cérébral sain et la néovascularisation associée au statut tumoral très hypoxique.

Dans ce contexte, les peptides vasoactifs et leurs récepteurs, classiquement impliqués dans les processus angiogéniques et invasifs, constituent de nouvelles cibles thérapeutiques. Les travaux précédemment réalisés dans l'équipe avaient mis en évidence la présence d'ARNm codant le récepteur UT ainsi que la protéine dans les astrocytes corticaux de Rat en culture (Castel *et al.*, 2006), et montré que l'UII interagit avec des sites de très haute affinité et de haute affinité, couplé à la voie  $G_q$ -PLC-IP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup>,  $G_{i/o}$ -PIPs sensibles à la PTX, et aux canaux calciques de type T (Castel *et al.*, 2006; Diallo *et al.*, 2008; Jarry *et al.*, 2010). De plus, nous avons démontré que l'activation du site de très haute affinité pour l'UII, qui ne reconnaît pas l'URP, relaye la prolifération des astrocytes en culture (Jarry *et al.*, 2010), suggérant que le système urotensinergique joue un rôle majeur dans l'activité des astrocytes en condition physiopathologique.

Le peptide et son récepteur sont en effet exprimés dans de nombreux types de tumeurs dont des lignées de glioblastome (Takahashi *et al.*, 2001). Des études fragmentaires ont démontré que dans des lignées de tumeurs prostatiques LnCap, l'UII favorise la motilité et l'invasion des cellules tumorales (Grieco *et al.*, 2011) et qu'elle stimule la croissance des tumeurs et l'infiltration des macrophages dans des adénocarcinomes pulmonaires (Zhou *et al.*, 2012).

Ainsi, l'UT et/ou l'UII, exprimés dans les glioblastomes, pourraient exercer des rôles multicellulaires sur l'invasion du parenchyme nerveux par les cellules tumorales gliales, la néoangiogenèse et la chimioattraction des macrophages pro-angiogéniques, et constituer des cibles thérapeutiques prometteuses.

Dans la présente étude, nous avons démontré que le peptide UII et son récepteur UT sont exprimés dans plusieurs lignées d'astrocytomes et de glioblastomes, dans des explants frais en culture issus de glioblastome de patients, ainsi que dans des coupes en paraffine de glioblastomes. L'expression de l'UII et de son récepteur avait déjà pu être mise en évidence dans des lignées tumorales de phéochromocytomes (Aita *et al.*, 2010), d'adénocarcinomes pulmonaires (Wu *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2012), de rhabdomyosarcomes (Douglas *et al.*, 2004b; Batuwangala *et al.*, 2009), ou encore de gliomes (Takahashi *et al.*, 2001). Nos travaux montrent que l'UT est principalement localisé dans le compartiment cytosolique et dans le noyau des cellules de la lignée d'astrocytome SW1088 et de glioblastome U87, comme précédemment décrit par notre équipe et d'anciens collaborateurs du laboratoire (Desrues *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2012). Les données de Nguyen et coll. suggèrent que l'UT présente dans sa troisième boucle cytosolique intracellulaire une séquence de rétention nucléaire K-R-A-R-R, qui favoriserait l'inclusion du récepteur à la membrane nucléaire ou dans le noyau, lui permettant d'exercer une activité transcriptionnelle (Nguyen *et al.*, 2012). Ce concept original est actuellement très controversé dans la littérature, mais certaines données montrent que des RCPGs de la classe Rhodopsine dont fait partie l'UT, *i.e.* AT1R, ETB, LPA1 ou CXCR4 peuvent être retrouvés dans le compartiment nucléaire et signaler à ce niveau (Gobeil *et al.*, 2006). En accord avec un rôle potentiel de l'UT dans le noyau, nous avons isolé huit protéines partenaires potentielles du domaine C-terminal de l'UT dont cinq semblent présenter une localisation péri- et/ou intra-nucléaire, et dont au moins une peut être transloquée jusqu'au noyau.



En effet, parmi les protéines capables éventuellement de réguler le trafic de l'UT, nous avons caractérisé la filamine A par double-hybride. Dans les cellules A7 exprimant la filamine A ainsi que dans les lignées de gliomes, l'UT est principalement cytosolique. De plus, l'UII entraîne la déphosphorylation de la filamine A dans les SW1088 (qui expriment la filamine A), accompagnée d'un clivage de cette dernière. Des travaux antérieurs avaient montré que la forme déphosphorylée et clivée de la filamine A pouvait se trouver relocalisée au niveau nucléaire dans une lignée de cellule Hela (Loy *et al.*, 2003). De manière intéressante, une analyse *in silico* nous a conduit à identifier au niveau de l'UT une séquence de rétention nucléaire dans la séquence comprise entre les aa 243 et 252 ([http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS\\_Mapper\\_form.cgi](http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi); Kosugi *et al.*, 2009), mais aussi un site de clivage potentiel de type thrombine au niveau de l'aa 206 ([http://web.expasy.org/cgi-bin/peptide\\_cutter/peptidecutter.pl](http://web.expasy.org/cgi-bin/peptide_cutter/peptidecutter.pl)). Ces informations permettent de suggérer que l'UT sous sa forme entière ou bien son dernier domaine 206-389 clivé pourrait être co-transporté jusqu'au noyau par le fragment 16-24 de la filamine A, et interagir avec des protéines nucléaires. En effet, nous avons montré la possible interaction du domaine Cterm de l'UT avec des facteurs de transcription tels que ZNF668, une protéine récemment considérée comme « suppresseur de tumeur » puisqu'elle stabilise p53 en interagissant avec MDM2 (Hu *et al.*, 2011), KDM6A, une déméthylase nécessaire à la migration des cellules germinale en réponse au SDF-1 (Thieme *et al.*, 2013), ou encore KAT-5, une histone acétyl-transférase inhibant le processus métastatique des mélanomes (Chen *et al.*, 2012a) et favorisant l'autophagie (Lin *et al.*, 2012b). Il est important de noter que cette potentielle activité régulatrice de l'UT au niveau nucléaire est aussi corroborée par notre étude phosphoprotéomique. Cette étude révèle qu'une incubation courte des cellules de glioblastome U87 en présence d'UII, entraîne la phosphorylation ou la déphosphorylation des protéines HNRPU, SMRC1, PCNP, CHD4 et ZNF264. Ainsi, la localisation nucléaire de l'UT n'est vraisemblablement pas à relayer au rang de conséquence physiopathologique de la

tumorigenèse, mais peut constituer, comme démontré pour d'autres RCPGs, une voie de « signalisation » originale dont la caractérisation suggèrera de nouvelles pistes thérapeutiques.

Dans les biopsies de glioblastome issues de patients, nous observons pour la première fois que l'UT est exprimé dans le cytoplasme et à la membrane plasmique, mais aussi dans le noyau de certaines cellules tumorales gliales, et dans le cytoplasme de cellules endothéliales de néo-vaisseaux. Or le système urotensinergique est hautement exprimé dans le système cardiovasculaire et exerce des effets néoangiogéniques sur les microvaisseaux cérébraux (Spinazzi *et al.*, 2006) et les cellules HUVEC (Albertin *et al.*, 2009; Guidolin *et al.*, 2010; Diebold *et al.*, 2012). Ainsi, l'expression de l'UII dans les mêmes cellules tumorales, ainsi que dans le compartiment vasculaire apporte des éléments de preuve **quant au rôle autocrine-paracrine du système urotensinergique dans le développement des tumeurs cérébrales**. Nous avons donc recherché les mécanismes d'action du couple UII/UT dans le développement des tumeurs cérébrales d'origine gliale. Nous avons démontré que l'UII ne modifie pas la progression du cycle cellulaire et la prolifération des cellules d'astrocytome et de glioblastome ou bien de cellules HEK293 exprimant l'UT humain recombinant. Ces observations sont en accord avec les données de Grieco et coll., montrant l'absence d'effet mitogénique de l'UII ou d'un antagoniste de l'UT, l'urantide, sur des cellules tumorales prostatiques (Grieco *et al.*, 2011). Cependant, certaines données de la littérature dont les nôtres, avaient suggéré une augmentation de la densité de cellules de carcinomes adrénocortical ou rénal (Takahashi *et al.*, 2003), ou d'astrocytes corticaux de Rat en présence d'UII (Jarry *et al.*, 2010), évoquant davantage une augmentation de la survie cellulaire. Des capacités anti-apoptotiques sans régulation du niveau de prolifération ont été démontrées sur les gliomes dans le cas de la chimiokine « professionnelle » SDF-1 (Zhou *et al.*, 2002). Les voies ERK1/2 et Akt, classiquement activées par l'UII dans d'autres types cellulaires y compris les HEK-UT, ne semblent là encore pas modifiées par l'UII dans la lignée d'astrocytome SW1088, comme précédemment observé sur des cellules tumorales

prostatiques (Grieco *et al.*, 2011). Enfin, nous montrons que l'UII est incapable d'induire une augmentation de  $[Ca^{2+}]_c$  dans les explants de gliome, dans les cellules SW1088 et U87 natives, et surexprimant l'UT, indiquant que dans ce contexte, le récepteur engage des voies de signalisation préférentielles indépendantes de la voie  $Ca^{2+}/IP_3$  et ERK1/2/Akt. Ainsi, le système urotensinergique, classiquement couplé aux voies  $G_q/IP_3/Ca^{2+}$ , Ras/ERK et PI3K/Akt dans de nombreux types cellulaires dits « normaux », pourrait dans des cellules tumorales gliales, *via* le recrutement de protéines G et la sélection de voies de couplages spécifiques, se comporter comme un système chimiotactique professionnel.

En effet, les propriétés chimioattractantes de l'UII ont précédemment été décrites sur des fibroblastes de Rat (Zhang *et al.*, 2008b, 2011), des cellules progénitrices endothéliales de Rat (Xu *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2012) ainsi que sur des monocytes humains (Segain *et al.*, 2007). Dans nos lignées de gliome et les cellules HEK-UT, nous montrons qu'un gradient de faibles concentrations d'UII stimule la migration chimiotactique cellulaire, un effet totalement bloqué par un antagoniste peptidique de l'UT, l'urantide, et un antagoniste non peptidique, le palosuran. Le potentiel chimiotactique pro-migratoire du récepteur UT est corroboré dans nos études par les données de double-hybride et de phosphoprotéomique, puisque cinq sur huit des protéines interagantes et 29% des protéines régulées, respectivement, présentent des fonctions majeures dans la migration/adhésion cellulaire.

Des études antérieures, dont certaines menées dans notre équipe, ont établi que l'UT est couplé à la fois à la protéine  $G_{q/11}$  et à la protéine  $G_{i/o}$  (Ziltener *et al.*, 2002; Castel *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2006; Jarry *et al.*, 2010). Afin de rechercher les voies de signalisation associées à l'UT impliquées dans la migration chimiotactique, nous avons testé les effets *i)* de l' $UT_{ERY(AAA)}$ , un récepteur portant une mutation du motif ERY d'interaction aux protéines G, *ii)* de la PTX, un inhibiteur de protéines  $G_{i/o}$  ainsi que *iii)* des agents pharmacologiques LY29002 et Y27632, inhibiteurs de PI3K et ROCK, respectivement. La perte complète de l'effet chimiotactique de l'UII vis-à-vis des cellules HEK293 exprimant l' $UT_{ERY(AAA)}$ , ou

cotransfectées avec le siRNA dirigé contre  $G_{\alpha 13}$  suggère fortement l'implication du couplage aux protéines  $G_{13}$  dans le mécanisme de migration induit par l'UII. De plus, ces effets de l'UII sur la migration des SW1088 sont totalement bloqués par un inhibiteur de ROCK, et partiellement bloqués par la PTX, soulignant l'implication majeure de la voie de signalisation ROCK, et secondaire de la voie  $G_{i/o}$  dans les effets chimioattractants de l'UII. Nous avons en effet confirmé, en collaboration avec les chercheurs de Sherbrook (Québec) et de l'IGF de Montpellier, les capacités de couplage direct de l'UT aux protéines  $G_{i/o}$  par la technique BRET. Nous avons aussi mis en évidence l'existence d'un couplage direct entre l'UT et la protéine  $G_{13}$  dans les HEK-UT, suggérant que la voie Rho/ROCK activée par un gradient de faibles concentrations pourrait être sous contrôle d'une  $G_{13}$ , dans les gliomes. Simultanément, la contribution de  $G_{i/o}$  et de PI3K dans la migration induite par l'UII résiderait dans le recrutement des effecteurs  $PIP_3$ /RhoGEF/Rac et/ou Cdc42, indépendamment de la voie PI3K/Akt dans les gliomes. En accord avec ces hypothèses, les deux voies de couplage possibles  $G_{13}$ /Rho et  $G_{\beta\gamma i/o}$ /PI3K ont été précédemment décrites pour le récepteur chimiotactique professionnel CXCR4 (Tan *et al.*, 2006), et les récepteurs chimioattractants du LPA et du S1P (Panetti *et al.*, 2000; Bian *et al.*, 2006). Finalement, nous proposons que la cascade de signalisation principale UT/ $G_{13}$ /RhoGEF/ROCK et la voie secondaire UT/ $G_{\beta\gamma i/o}$ /PI3K/RacGEF/Rac-Cdc42 contrôlent la migration chimiotactique des astrocytomes, conduisant *via* Rho/ROCK à la contraction de l'actomyosine et à la dé-adhésion à l'arrière de la cellule, et *via* PI3K/Rac, à la polymérisation de l'actine et à l'adhésion à l'avant de la cellule.

Les cellules de gliomes sont attirées par les capillaires endothéliaux *in vitro* (von Bülow *et al.*, 2001) et migrent le long des parois capillaires pour envahir le parenchyme cérébral (Farin *et al.*, 2006). Ainsi, considérant que l'UT est exprimé dans des biopsies de glioblastome de patients et que l'UII est retrouvée dans le compartiment endothélial de certaines artères, l'UT pourrait faciliter l'invasion des gliomes *via* l'exposition à un gradient d'UII, entraînant la

dissémination dans d'autres régions cérébrales. Une concentration forte et homogène du peptide au voisinage des vaisseaux sanguins ou au cœur de la tumeur pourrait également jouer un rôle dans l'organisation du tissu et l'adhésion. Afin de tester cette hypothèse, les cellules SW1088 ont été exposées à des concentrations homogènes, basses et plus élevées, d'UII et la distance parcourue par les cellules a été évaluée *in vitro*. Une faible concentration homogène d'UII stimule la motilité cellulaire et augmente la distance parcourue par les cellules gliomales. Cependant, nous avons observé que la plus forte concentration d'UII réduit fortement la motilité des cellules et que la rupture d'un gradient de concentration par application du peptide des deux côtés d'une chambre de Boyden bloque totalement la migration/motilité. Ces données soulignent le caractère chimiotactique plutôt que chimiokinétique de l'UII, un mécanisme déjà démontré sur les cellules de cancer de la prostate après l'activation de CXCR4 par le SDF-1 (Taichman *et al.*, 2002). Nous avons également montré que les cellules HEK-UT et les gliomes présentent des propriétés d'adhésion importantes après exposition aux concentrations uniformes d'UII. La même capacité à adhérer sur un substrat a été préalablement démontrée pour les cellules endothéliales exprimant l'UT (Cirillo *et al.*, 2008; Grieco *et al.*, 2011; Yi *et al.*, 2012; Watson *et al.*, 2013) et pour des mélanomes exprimant le CXCR4 (Monterrubio *et al.*, 2009), suggérant que l'UII, en tant que chimiokine atypique, favorise fortement l'adhésion. Cet effet est totalement aboli par la PTX et partiellement inhibé par l'inhibiteur de PI3K. Ainsi, comme il a déjà été démontré pour le SDF-1 dans la moelle épinière humaine (Glodek *et al.*, 2003), ce processus d'adhésion impliquerait partiellement la cascade de signalisation  $G_{i/o}/PI3K$ , en plus d'une voie spécifique  $G_{i/o}$ -dépendante, recrutée uniquement en présence d'une concentration homogène de ligand. Des travaux montrant que les récepteurs des chimiokines sont capables d'activer les intégrines *via* le complexe  $\beta\gamma$  de la protéine  $G_{i/o}$  et l'activation de la PI3K ou du complexe PLC/RAP1 (Kinashi, 2005), permettent de suggérer le recrutement similaire des intégrines par l'UII dans les gliomes.

Durant les processus de migration et d'adhésion cellulaire, les RhoGTPases jouent un rôle crucial dans la régulation de la polymérisation de l'actine. En effet, l'activation de Rac favorise la polymérisation de l'actine à l'avant de la cellule au cours du chimiotactisme et dans les protrusions telles que les lamellipodes, alors que Rho induit la formation de filaments contractiles d'actomyosine et de fibres de stress. Dans notre étude, une concentration homogène d'UII induit la polymérisation d'actine accompagnée par la formation de multiples lamellipodes autour de la cellule. A l'appui de ce résultat, la formation de fibres de stress d'actine relayée par la voie Rho/ROCK a été préalablement décrite après traitement de cellules musculaires lisses par l'UII (Sauzeau *et al.*, 2001; Matsusaka and Wakabayashi, 2006). Nous supposons que l'UT, lorsqu'il est activé par une concentration homogène d'UII, est à la fois couplé à la voie  $G_{i/o}$ /PI3K/Rac pour favoriser la formation des protrusions et à la voie  $G_{13}$ /Rho/ROCK permettant la formation de fibres de stress d'actine. Dans ce contexte, les kinases activées par l'UT comme ROCK ou PI3K pourraient entraîner la phosphorylation des protéines régulatrices de la formation des fibres de stress et de protrusions. En accord, notre analyse phosphoprotéomique a révélé qu'en présence d'une concentration homogène d'UII, la myosine 9 et la MAP1A sont phosphorylées, leur permettant de contribuer à la contraction d'actine et à l'organisation des microtubules, respectivement. Par ailleurs, une des cibles connues de ROCK, la LIMK dont l'activation entraîne une augmentation des fibres de stress dans la cellule, est aussi une des protéines interagissant du domaine C-terminal de l'UT. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'UT en recrutant la LIMK au voisinage de ROCK activée, favoriserait la formation de fibres de stress.

L'élaboration de nouvelles protrusions et la polymérisation d'actine sont connues pour induire l'engagement des intégrines et la formation de structures d'adhésions (Hotchin and Hall, 1995) appelées complexes focaux et adhésions focales. Leurs formations requièrent l'agrégation de plusieurs protéines d'adhésions comme la taline, la vinculine et la paxilline. Dans notre étude, une concentration homogène d'UII induit la formation de complexes focaux

et d'adhésions focales révélée par la localisation et l'expression de la vinculine. La maturation de ces adhésions est soulignée par l'élargissement du marquage correspondant à la vinculine pour la plus haute concentration d'UII après 1 h de traitement. Par ailleurs, dans les cellules U87, une concentration homogène d'UII induit la déphosphorylation de la taline et de l' $\alpha$ -actinine 4 ainsi que la phosphorylation de la paxilline. Ces résultats soulignent bien le rôle de l'UII sur les adhésions puisque la déphosphorylation de la taline favorise le *turnover* des adhésions alors que la phosphorylation de la paxilline et la déphosphorylation de l' $\alpha$ -actinine permettent le maintien et la maturation des adhésions.

Les données de la littérature rapportent que la formation de complexes focaux est dépendante de Rac (Nobes and Hall, 1995) alors que la maturation des adhésions focales nécessite l'activation de Rho (Ridley and Hall, 1992). Nous proposons donc qu'en présence d'une concentration uniforme d'UII, la première voie de signalisation *i.e.*  $G_{i/o}$ /PI3K/Rac pourrait initier l'adhésion, et que l'activation par les intégrines de la taline et de la vinculine, liant les récepteurs des intégrines au cytosquelette d'actine associée à la cascade de signalisation  $G_{13}$ /Rho/ROCK/MLCK, provoquerait la maturation des adhésions focales (Figure 40).

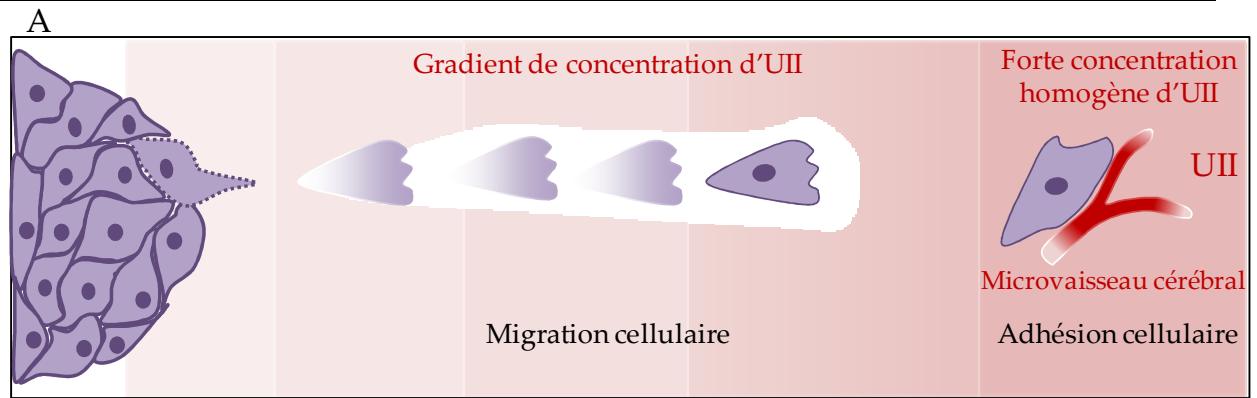
Les différents couplages et signalisations des récepteurs chimiotactiques et du récepteur UT en particulier, en fonction d'un gradient ou de concentrations homogènes de ligands, ne sont donc pas clairement compris ici mais aussi dans la littérature. Notamment, comment s'organise de manière temporelle et polarisée, la formation des lamellipodes dépendante de  $G_{i/o}$  et Rac à l'avant de la cellule, et la formation des fibres de stress dépendante de  $G_{12/13}$  et Rho à l'arrière de la cellule, en condition chimiotactique ? Récemment, des travaux ont montré que le CXCR4 et le CCR5 se redistribuent apparemment à l'avant des lymphocytes *via* un mécanisme actif (Nieto *et al.*, 1997; Buul *et al.*, 2003), suggérant que la distribution asymétrique des récepteurs résulte du regroupement de récepteurs au sein de radeaux lipidiques (Mañes *et al.*, 1999, 2001). En effet, les radeaux lipidiques organisent la

signalisation du CXCR4 au niveau spatial dans les cellules en mouvement, en concentrant la machinerie de détection de gradient de concentration (incluant le récepteur) à l'avant de la cellule. Cette relocalisation des radeaux lipidiques induite par le SDF-1 est dépendante du remodelage du cytosquelette d'actine et de la protéine  $G_{i/o}$  (Gomez-Mouton, 2004). En accord avec ces données, la répartition hétérogène des protéines G hétérotrimériques dans les microdomaines membranaires a été rapportée (Oh and Schnitzer, 2001) et la protéine  $G_i$  en particulier est localisée de façon préférentielle dans les radeaux lipidiques. A l'appui de cette hypothèse, une étude récente a montré que la localisation du CXCR4 dans les radeaux lipidiques associe ce récepteur à la voie de signalisation PI3K/Rac1 et favorise l'invasion cellulaire (Lin *et al.*, 2012a). De plus, la perturbation des radeaux lipidiques inhibe la dimérisation du récepteur CXCR4 ce qui bloque les effets du SDF-1 sur la migration cellulaire (Wang *et al.*, 2006). La filamine A pourrait ici participer à la localisation de l'UT dans les radeaux lipidiques puisqu'elle interagit avec la cavéoline-1, l'une des protéines constituant les microdomaines lipidiques et régule la dynamique des cavéoles en les liant au cytosquelette d'actine (Muriel *et al.*, 2011). De plus, comme cela a déjà été observé pour le CXCR4 (Jiménez-Baranda *et al.*, 2007), la filamine A favorise la présence de dimères d'UT, qui pourraient principalement se localiser au sein de radeaux lipidiques. La déphosphorylation de la filamine A observée en présence d'UII, suivie de son clivage (probablement par la calpaïne II elle-même régulée par l'UII), pourrait favoriser la relocalisation des récepteurs UT dans des radeaux lipidiques à l'avant de la cellule au cours de la migration directionnelle. En accord avec cette hypothèse, l'inhibition de l'expression de la filamine A prévient la relocalisation des radeaux lipidiques dans la synapse immunologique après l'activation du CD28 (Tavano *et al.*, 2006).

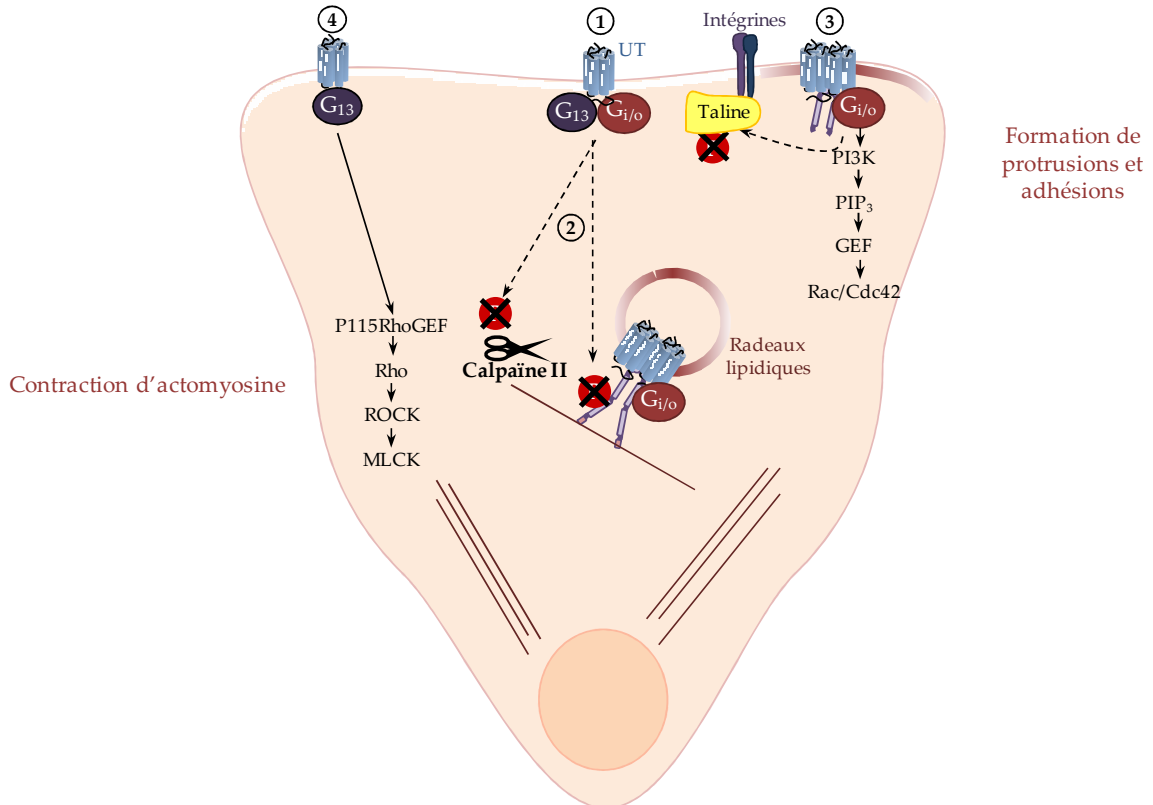
Ainsi, nous proposons que l'UT se comporte comme un récepteur de chimiokine atypique, initiant la migration directionnelle des cellules tumorales gliales au cours de l'invasion du parenchyme cérébral (Figure 40A). Ainsi, dans des gliomes de haut grade, des récepteurs UT



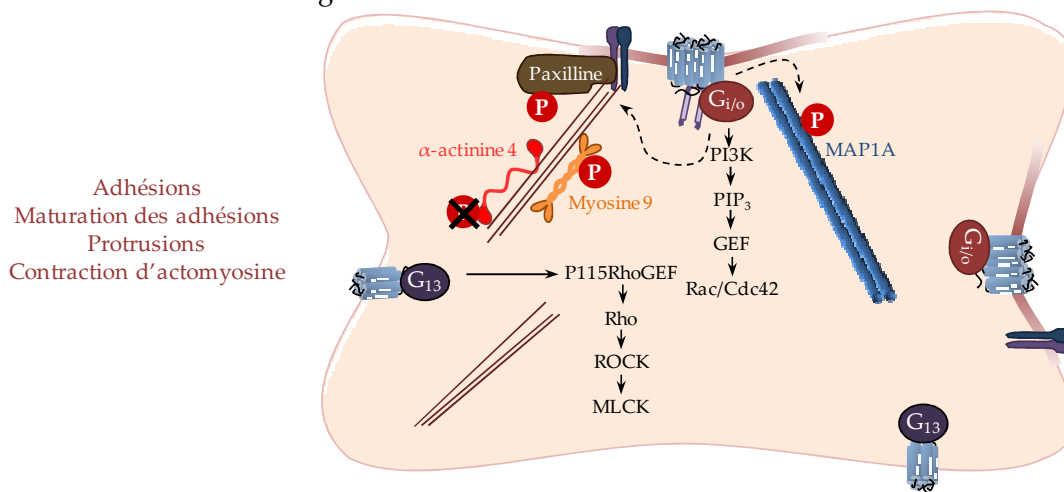
de haute affinité, mobiles dans les membranes, seraient capables de lier de très basses concentrations de ligands, et de coupler les protéines  $G_{i/o}$  et  $G_{13}$ . Dans cette première phase d'activation, l'UT stimulerait l'activation d'effecteurs tels que la calpaïne II et le clivage consécutif de la filamine A, aboutissant à la relocalisation de radeaux lipidiques contenant des récepteurs UT (dimérisés?) couplés à  $G_{i/o}$  à l'avant de la cellule, alors que des récepteurs non enchâssés dans les radeaux lipidiques couplés à  $G_{13}$  resteraient préférentiellement uniformément répartis sur la surface membranaire (Figure 40B). Ainsi, au cours du chimiotactisme, le couplage UT/ $G_{i/o}$  pourrait favoriser les protusions *via* PI3K/PIP<sub>3</sub>/Rac et/ou Cdc42 à l'avant de la cellule, et UT/ $G_{13}$  entraînerait le recrutement de la voie Rho/ROCK/MLCK et la contraction de l'actomyosine à l'arrière de la cellule (Figure 40B). En absence de chimiotactisme (Figure 40C) et en présence d'une concentration élevée homogène de ligand, les radeaux lipidiques seraient répartis de façon aléatoire et la voie de signalisation UT/ $G_{i/o}$ /intégrine spécifique de l'activation soutenue de l'UT, provoquerait la maturation et la stabilisation des adhésions cellulaires. Au sein de ces complexes macromoléculaires, l'UT semble contrôler les protéines d'interaction aux intégrines, telles que la paxilline et l'alpha-actinine, la LIMK, la myosine 9 ou la MAP1A (Figure 40C).



**B** Gradient de concentration d'UII



**C** Concentration homogène d'UII



**Figure 40. Schéma final hypothétique du mode d'action du système urotensinergique dans le mécanisme de migration des cellules tumorales gliales. A.** Situation physiopathologique impliquant l'invasion du parenchyme sain par les cellules tumorales gliales en réponse à un gradient d'UII. **B.** Action cellulaire et moléculaire d'un gradient de concentration d'UII. (1) Le récepteur UT, mobile, de

haute affinité couplé à la fois à  $G_{i_0}$  et  $G_{13}$  est activé par une faible concentration d'U11, catalysant la déphosphorylation de la filamine A et de la calpaïne II, conduisant au clivage de la filamine A. (2) Ce premier mécanisme pourrait libérer des cavéoles contenant, entre autre, des dimères d'UT retenus sur le cortex d'actine par la filamine A. Ces cavéoles, en fusionnant à la membrane, joueraient un rôle majeur dans la formation des radeaux lipidiques (3). Ces derniers, activés par l'U11, vont favoriser la formation des protrusions et des adhésions à l'avant de la cellule. (4) A l'arrière de la cellule, l'activation concomitante de  $G_{13}$ , permettrait *via* la voie Rho/ROCK/MLCK, la contraction d'actomyosine. C. Action cellulaire et moléculaire d'une concentration homogène d'U11. La progression cellulaire vers la source d'émission d'U11 (endothélium vasculaire par exemple, A), conduit à exposer la cellule à de plus fortes concentrations homogènes de ligand. Ainsi, les récepteurs mobiles ou engagés dans des radeaux lipidiques et des complexes macromoléculaires, seraient distribués de façon aléatoire à la surface cellulaire. Dans ce contexte, l'UT activerait des protéines responsables de la stabilisation du cortex d'actomyosine et des adhésions cellulaires, permettant éventuellement l'installation des cellules tumorales au sein de niches vasculaires. Cdc42: *cell division control protein 42*; GEF: *guanine nucleotide exchange factor*; MAP1A: *microtubule-associated protein 1A*; MLCK: *myosin light-chain kinase*; PI3K: *phosphatidylinositol-3 kinase*; PIP<sub>3</sub>: *phosphatidylinositol 4,5-trisphosphate*; ROCK: *rho-associated protein kinase*.

---

---

---

## Perspectives

Au terme de cette étude, nous avons montré pour la première fois le caractère chimioattractant de l'UUI dans la migration et/ou l'invasion de cellules astrocytaires tumorales. Les résultats obtenus sur le récepteur UT en présence d'un gradient de concentration d'UUI ou d'une concentration homogène de ligand ont soulevé un certain nombre de questions quant au mécanisme par lequel un récepteur de classe I chimiotactique est capable d'adapter ses voies de signalisation en réponse à différents types de stimuli. Cependant, plusieurs questions restent encore non clarifiées à la suite de nos travaux, notamment :

- 1- Quel est le niveau d'expression du système urotensinergique, *e.g.* UT, UUI et URP dans des tumeurs cérébrales d'origine astrocytaire et/ou oligodendrogliomale de différents grades et de différents pronostiques ?
- 2- Quelles sont les protéines G et les voies de couplage associées au récepteur UT relayant d'une part la migration directionnelle chimiotactique et d'autre part les signaux d'arrêt de cette progression cellulaire, en particulier dans quel compartiment subcellulaire et sous quelle conformation (oligomérique, au sein de radeaux lipidiques, etc.) se présente le récepteur en l'absence et en présence de ces différentes sources de signaux moléculaires ? Quels rôles précis joue la filamine A dans ces derniers mécanismes et représente-elle une protéine clef du chimiotactisme en général ?
- 3- Peut-on replacer l'ensemble des protéines interagantes du domaine C-terminal de l'UT et/ou les protéines phosphorylées ou déphosphorylées, effectrices du couple UUI/UT dans des voies de signalisation impliquées dans les mécanismes chimiotactiques de migration et d'adhésion, mais aussi dans d'autres processus physiopathologiques tels que l'apoptose et/ou la survie cellulaire ?

4- Enfin le récepteur UT, l'UII et/ou l'URP et les protéines cibles effectrices de ce système constituent-ils une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des gliomes, particulièrement invasifs et néoangiogéniques ?

### **1. Caractérisation du système urotensinergique dans le système nerveux central sain et pathologique tumoral**

Nos données et quelques études récentes fragmentaires suggèrent que l'UII et l'URP pourraient exercer des fonctions communes, mais aussi distinctes (Chatenet *et al.*, 2004; Jarry *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2012), *via* l'activation de l'UT, et pourquoi pas d'un autre type de récepteur. Grâce aux collaborations mises en place avec le Pr Annie Laquerrière du service d'Anathomo-physiopathologie du CHU de Rouen, et le Pr François Proust, Neurochirurgien, membre de l'équipe, nous allons bénéficier de sections (coupes de paraffine) de tumeurs cérébrales humaines de différents grades et de différents lignages cellulaires, afin d'évaluer par immunohistochimie l'expression du système urotensinergique à l'aide d'anticorps dirigés contre l'UII (déjà validé dans l'équipe) et l'UT (déjà validé cf. Résultats partie 1) et d'anticorps dirigés contre les formes précurseurs de l'UII et de l'URP (anti-prépro-UII et -URP) disponibles commercialement. La technique de PCR quantitative sera aussi utilisée pour rechercher, sur des cellules tumorales gliales ou endothéliales préalablement dissociées par la technique de microdissection laser (Plate-forme PRIMACEN), les niveaux d'expression de l'UII, de l'UT et de l'URP, ainsi que d'autres acteurs clefs, notamment SDF-1/CXCR4 et VEGF/VEGFR. En collaboration avec Omar Bennani, Neurologue dans l'équipe, nous tenterons aussi de vérifier des corrélations entre les niveaux d'expressions des acteurs urotensinergique et *i*) le grade des tumeurs, *ii*) le devenir des patients, *iii*) les différentes mutations retrouvées dans ces tumeurs (amplification de l'EGFR, mutation de P53, délétion de 1p19q, mutation de PTEN) et les régulations transcriptionnelles selon la classification de Verhaak (cf. Introduction, Chapitre I, § 3.1.3).



## 2. Conformation du récepteur UT, localisation subcellulaire et chimiotactisme

Afin de déterminer précisément le rôle des différentes protéines G dans les effets de l'UII sur la migration et l'adhésion cellulaire, et les possibles « switch » de couplage en fonction du mode d'activation de l'UT, des siRNA ciblant spécifiquement les acteurs de chaque voie de signalisation ( $G_{i\alpha 1,2,3}$  ou  $\beta$  ou  $\gamma$ ,  $G_q$ ,  $G_{13}$ , Rac, Cdc42, intégrines de types  $\alpha v\beta 3$ , paxilline, vinculine...) seront transfectés, et/ou des agents pharmacologiques inhibiteurs de Rac1, PLC, PKC, intégrines, etc. seront testés sur les lignées de gliomes, puis les réponses à l'UII et l'URP seront évaluées en migration et adhésion, des tests réalisés en routine dans notre équipe.

La localisation des couples récepteur/protéine G pourra être visualisée par microscopie confocale en « *time-lapse* » (Plate-forme PRIMACEN) dans des cellules vivantes co-transfectées avec le cDNA codant l'UT fusionné en C-terminal à eCFP et la sous-unité  $\alpha$  des protéines G d'intérêt fusionnée à eYFP (collaboration souhaitée avec le Dr Laurent Prézeau de Montpellier). Pour ce faire, les cellules seront incubées en présence d'une concentration homogène de ligand ou soumises à un gradient de concentration réalisé à l'aide d'une pipette diffusant le ligand au voisinage des cellules, et l'aspect dynamique de la distribution du récepteur et des protéines G sera recherché. Nous tenterons aussi de visualiser la localisation subcellulaire des messagers secondaires de  $G_{i/o}$  et de  $G_{12/13}$ , à l'aide de biosensors FRET de Rac (Kraynov *et al.*, 2000) et de Rho (Pertz *et al.*, 2006), respectivement. En effet, un signal FRET d'activation est produit lorsque le couple Rac-1/PAK-1 s'associe, ou lorsque que la protéine Rho change de conformation en liant le GTP. La contraction d'actine pourra quant à elle être suivie dans la cellule vivante à l'aide d'actine fusionnée à la GFP (CellLight® Actin-GFP, Molecular probes) en présence ou non d'agonistes de l'UII, et d'inhibiteurs des voies de signalisation. A l'aide de ces biosensors et outils, nous espérons mettre en évidence la distribution subcellulaire (avant-arrière de la cellule) du récepteur UT et de ses effecteurs au

moment de la détection du gradient d'UII, au cours de la migration et en concentration homogène de ligand.

Afin de comprendre si le changement de couplage « exclusif » vers les protéines  $G_{i/o}$  en concentration homogène de ligand implique effectivement les radeaux lipidiques, les tests de migration, d'adhésion et de localisation subcellulaire de l'UT seront réalisés en présence de méthyl- $\beta$ -cyclodextrine qui perturbe les radeaux lipidiques en diminuant le cholestérol dans les cellules. De plus, l'utilisation de la protéine cavéoline-1, constitutive des cavéoles/radeaux lipidiques, en fusion avec l'eGFP, nous permettra de visualiser de façon dynamique la relocalisation des cavéoles à la membrane de la cellule (marquée au FM4-64) après activation de l'UT par l'UII, et nous pourrons aussi évaluer la relocalisation de l'UT<sup>eGFP</sup> au sein des membranes-FM4-64 dans une même série expérimentale.

Nous n'avons pas encore étudié les mécanismes de formation des oligomères d'UT et leurs rôles dans la migration chimiotactique des gliomes. Par étude de BRET, nous vérifierons si l'absence de radeaux lipidiques est corrélée à l'existence de formes oligomériques d'UT. La dimérisation du CXCR4 est bloquée par l'introduction dans la cellule d'un peptide synthétique correspondant au TM4 du récepteur (Wang *et al.*, 2006), et une collaboration étroite avec le Dr Marie Chabbert nous a permis d'obtenir la modélisation du récepteur UT sous-forme tétramérique. Ce dernier modèle suggère, comme pour le CXCR4, l'implication des TM4 et 5, puis 1 et 2, dans les couples de dimères d'UT au sein d'un tétramère. A l'aide de la technique de BRET, nous testerons la capacité de peptidomimétiques correspondant en partie aux TM d'intérêts à inhiber l'homodimérisation du récepteur et nous utiliserons cette stratégie pour tester l'importance de la dimérisation dans les processus de migration et d'adhésion cellulaires.

### 3. Rôle de certains partenaires/protéines cibles de l'UT

Dans ce contexte, la protéine d'interaction à l'actine, la filamine A, constitue une piste majeure pour la compréhension des mécanismes de dimérisation de l'UT et leurs rôles dans la migration chimiotactique. Dans un premier temps, nous souhaitons démontrer définitivement l'interaction directe physique entre l'UT et la filamine A. Nous utiliserons la technique de co-immunoprécipitation dans les cellules HEK293 exprimant fortement la filamine A de façon endogène, en condition traitée ou non, et dans différents compartiments cellulaires, *i.e.* les membranes ou le cytoplasme. La technique de BRET pourra éventuellement être adaptée en utilisant cette fois-ci, une filamine A entière, en fusion avec la eGFP au niveau de la 1<sup>ère</sup> charnière (entre les domaines 15 et 16, Planagumà *et al.*, 2012), permettant le maintien de la liaison à l'actine ou de la dimérisation de la filamine A, et le rapprochement probable des dipôles des fluorophores de la filamine A et du domaine C-terminal de l'UT. En collaboration avec les Docteurs Isabelle Milazzo et Laure Guilhaudis du Laboratoire de Chimie Organique Bioorganique Réactivité Analyse (COBRA, UMR 6014 CNRS, Université de Rouen), nous espérons valider la structuration du domaine C-terminal de l'UT en présence de filamine A par RMN. D'un point de vue fonctionnel, nos résultats préliminaires indiquent que la filamine A intervient dans la localisation subcellulaire du récepteur, la migration et la formation des protrusions membranaires. Par ailleurs, d'autres résultats (non évoqués dans la présente thèse) suggèrent que les mutants de l'UT, tronqués au niveau C-terminal, ne relayent plus les effets de l'UII sur la migration cellulaire, mais conservent leur caractère pro-adhérent. Dans les lignées tumorales gliales, l'utilisation d'un siRNA dirigé contre la filamine A, et de mini-peptides interactants correspondant à différents fragments du domaine C-terminal de l'UT, nous permettra d'évaluer l'importance de cette protéine dans la localisation subcellulaire de l'UT, dans les effets de l'UII sur la migration et l'adhésion cellulaire, par imagerie confocale sur cellule vivante ou fixée, migration en chambre de Boyden, et adhésion. La localisation membranaire ou intracellulaire de l'UT en présence ou en absence de filamine A sera aussi

validée par ELISA, en condition perméabilisée et non perméabilisée. Afin de confirmer le rôle crucial de la filamine A dans la formation des dimères d'UT, nous tenterons de réaliser des co-immunoprécipitations UT<sup>c-myc</sup>-UT<sup>HA</sup> dans les cellules M2 et A7, ainsi que dans les gliomes transfectés avec le siRNA dirigé contre la filamine A, en l'absence et en présence d'UII, et un fractionnement subcellulaire sera réalisé pour évaluer la localisation subcellulaire de ces dimères. En collaboration avec le Dr Laurent Prézeau, nous évaluerons l'impact de la filamine A sur les différentes capacités de couplage de l'UT aux protéines G par la technique de BRET dans les cellules M2 et A7. Aussi, la construction de nanodisques contenant l'UT purifié (en cours de réalisation dans notre équipe par le Docteur Orso Subrini) en collaboration avec le Dr Bernard Mouillac (IGF, Montpellier), nous permettra de relier la conformation monomérique ou oligomérique du récepteur à un couplage particulier à certaines protéines G. Enfin, nous étudierons comment l'UII entraîne la déphosphorylation de la filamine A et son clivage consécutif par l'utilisation d'un inhibiteur de calpaïne II, et suivrons, par co-marquage du fragment clivé et de l'UT fusionné en C-terminal à mcherry, le devenir et la localisation subcellulaire de ces deux partenaires.

Lors de l'analyse phosphoprotéomique, un certain nombre de protéines cibles de l'UT a été identifié. Pour les protéines les plus régulées, notamment phosphorylées ou déphosphorylées *de novo* après activation de l'UT, le niveau de phosphorylation en réponse à l'UII dans les cellules U87 sera vérifié par Western blot à l'aide d'anticorps commerciaux disponibles, ou par co-immunoprécipitation, suivie de révélation par des anti-phosphosérines et/ou thréonines. Nous testerons, à l'aide de siRNA dirigés contre ces protéines leur rôle dans les effets de l'UII sur la migration, l'adhésion ou la sécrétion dans les lignées gliomales. Enfin, des recherches sont menées actuellement dans l'équipe par le Docteur Fabrice Morin et son étudiant Pierre-Mickael Coly, sur les mécanismes de l'UII associés à l'autophagie, et par le Dr Hélène Castel et son étudiante en thèse Jane-Eileen Joubert (en collaboration avec les Drs L. Prézeau et R. Leduc) sur le rôle des différents ligands de l'UT sur l'apoptose des cellules

HEK-UT. Ainsi, une étude spécifique des protéines cibles classiquement impliquées dans les processus métaboliques, et identifiées en réponse à l'UII dans les U87, sera réalisée au sein de l'équipe dans le cadre de ces deux programmes.

#### 4. Rôle physiopathologique du système urotensinergique dans le développement des gliomes de haut grade

Les travaux actuellement menés dans l'équipe par le Pr Pierrick Gandolfo, le Dr Hélène Castel et Vadim Le Joncour étudiant en thèse, montrent que la croissance de greffes hétérotopiques de cellules U87 dans les souris *Nude* est stimulée par des injections intratumorales quotidiennes de peptide UII et inhibée par des injections d'un antagoniste non peptidique (palosuran) et d'un antagoniste peptidique (urantide). Afin de pouvoir évaluer l'invasion tumorale dans l'environnement cérébral, Vadim Le Joncour a mis au point l'injection orthotopique de cellules U87 exprimant la GFP dans les souris *Nude*. Une telle approche nous permettra d'évaluer les effets du système urotensinergique sur l'invasion tumorale *in vivo* en injectant des cellules surexprimant ou délétées du gène de l'UT (ShRNA), et/ou du gène de la filamine A. Il s'agira de mesurer le niveau de vascularisation tumorale, la distance d'invasion des cellules et d'analyser la nature des zones d'infiltration, *i.e.* vaisseaux sanguins, niches vasculaires, glie radiaire, etc. Nous pourrions, à plus long terme, envisager de développer un peptide interagissant à activité thérapeutique correspondant au domaine d'interaction de la filamine A aux récepteurs chimiotactiques **en général** qui, administré par des nanoparticules de silicate décorées par un anti-EGFRvIII spécifiquement exprimé dans les glioblastomes (Collaboration avec le Dr Vladimir Gubala, Université de Kent, UK), serait directement libéré au site tumoral gliale et inhiberait ainsi l'invasion tumorale. De plus, les travaux réalisés dans l'équipe par Jane Eileen Joubert en collaboration avec le Dr Laurent Prézeau et le Dr Richard Leduc sur des ligands synthétiques de l'UT capables d'activer des voies de signalisation distinctes de celles du ligand naturel et appelés, de ce fait, ligands

biaisés, nous ouvre de nouvelles perspectives quant au développement d'un ligand urotensinergique qui activerait uniquement la voie d'adhésion des cellules tumorales. Un tel ligand, en favorisant les adhésions cellule-matrice et cellule-cellule, confinerait la masse tumorale en inhibant l'invasion, la néoangiogenèse et la chimioattraction de macrophages pro-angiogéniques.

---

---



## Références bibliographiques

### -A-

- Abdelrahman, A.M. and Pang, C.C.Y. (2002) Involvement of the nitric oxide/L-arginine and sympathetic nervous systems on the vasodepressor action of human urotensin II in anesthetized rats. *Life Sci.*, **71**, 819–825.
- Abdel-Razik, A.E.S., Forty, E.J., Balment, R.J., and Ashton, N. (2008) Renal haemodynamic and tubular actions of urotensin II in the rat. *J. Endocrinol.*, **198**, 617–624.
- Abercrombie, M. and Dunn, G.A. (1975) Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. *Exp. Cell Res.*, **92**, 57–62.
- Abercrombie, M., Heaysman, J.E., and Pegrum, S.M. (1970) The locomotion of fibroblasts in culture. I. Movements of the leading edge. *Exp. Cell Res.*, **59**, 393–398.
- Abercrombie, M., Heaysman, J.E., and Pegrum, S.M. (1971) The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp. Cell Res.*, **67**, 359–367.
- Abounader, R. and Laterra, J. (2005) Scatter factor/hepatocyte growth factor in brain tumor growth and angiogenesis. *Neuro-Oncol.*, **7**, 436–451.
- Adams, J.C. (2004) Roles of fascin in cell adhesion and motility. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **16**, 590–596.
- Adini, A., Kornaga, T., Firoozbakht, F., and Benjamin, L.E. (2002) Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. *Cancer Res.*, **62**, 2749–2752.
- Aghi, M., Cohen, K.S., Klein, R.J., Scadden, D.T., and Chiocca, E.A. (2006) Tumor stromal-derived factor-1 recruits vascular progenitors to mitotic neovasculature, where microenvironment influences their differentiated phenotypes. *Cancer Res.*, **66**, 9054–9064.
- Ahlbom, A., Feychting, M., Green, A., Kheifets, L., Savitz, D.A., and Swerdlow, A.J. (2009) Epidemiologic evidence on mobile phones and tumor risk: a review. *Epidemiol. Camb. Mass*, **20**, 639–652.
- Ahmed, S., Goh, W.I., and Bu, W. (2010) I-BAR domains, IRSp53 and filopodium formation. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **21**, 350–356.
- Ahn, S.J. and Kim, I.-O. (2012) Spinal cord glioblastoma induced by radiation therapy of nasopharyngeal rhabdomyosarcoma with MRI findings: case report. *Korean J. Radiol. Off. J. Korean Radiol. Soc.*, **13**, 652–657.
- Aita, Y., Kasahara, T., Isobe, K., Kawakami, Y., and Takekoshi, K. (2010) Effect of urotensin II on PC12 rat pheochromocytoma cells. *J. Neuroendocrinol.*, **22**, 83–91.
- Albertin, G., Casale, V., Ziolkowska, A., Spinazzi, R., Malendowicz, L.K., Rossi, G.P., and Nussdorfer, G.G. (2006) Urotensin-II and UII-receptor expression and function in the rat adrenal cortex. *Int. J. Mol. Med.*, **17**, 1111–1115.
- Albertin, G., Guidolin, D., Sorato, E., Oselladore, B., Tortorella, C., and Ribatti, D. (2011) Urotensin-II-stimulated expression of pro-angiogenic factors in human vascular endothelial cells. *Regul. Pept.*, **172**, 16–22.
- Albertin, G., Guidolin, D., Sorato, E., Spinazzi, R., Mascarini, A., Oselladore, B., Montopoli, M., Antonello, M., and Ribatti, D. (2009) Pro-angiogenic activity of Urotensin-II on different human vascular endothelial cell populations. *Regul. Pept.*, **157**, 64–71.
- Alexandrova, A.Y., Arnold, K., Schaub, S., Vasiliev, J.M., Meister, J.-J., Bershadsky, A.D., and Verkhovsky, A.B. (2008) Comparative Dynamics of Retrograde Actin Flow and Focal Adhesions: Formation of Nascent Adhesions Triggers Transition from Fast to Slow Flow. *Plos One*, **3**, e3234.
- Allmer, J. (2012) Existing bioinformatics tools for the quantitation of post-translational modifications. *Amino Acids*, **42**, 129–138.

- Alterman, R.L. and Stanley, E.R. (1994) Colony stimulating factor-1 expression in human glioma. *Mol. Chem. Neuropathol. Spons. Int. Soc. Neurochem. World Fed. Neurol. Res. Groups Neurochem. Cerebrospinal Fluid*, **21**, 177–188.
- Ames, R.S., Sarau, H.M., Chambers, J.K., Willette, R.N., Aiyar, N.V., Romanic, A.M., Loudon, C.S., Foley, J.J., Sauermelch, C.F., Coatney, R.W., Ao, Z., Disa, J., Holmes, S.D., Stadel, J.M., Martin, J.D., Liu, W.S., Glover, G.I., Wilson, S., McNulty, D.E., Ellis, C.E., Elshourbagy, N.A., Shabon, U., Trill, J.J., Hay, D.W., Ohlstein, E.H., Bergsma, D.J., and Douglas, S.A. (1999a) Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature*, **401**, 282–286.
- Ames, R.S., Sarau, H.M., Chambers, J.K., Willette, R.N., Aiyar, N.V., Romanic, A.M., Loudon, C.S., Foley, J.J., Sauermelch, C.F., Coatney, R.W., Ao, Z., Disa, J., Holmes, S.D., Stadel, J.M., Martin, J.D., Liu, W.S., Glover, G.I., Wilson, S., McNulty, D.E., Ellis, C.E., Elshourbagy, N.A., Shabon, U., Trill, J.J., Hay, D.W., Ohlstein, E.H., Bergsma, D.J., and Douglas, S.A. (1999b) Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature*, **401**, 282–286.
- Ando, K., Obara, Y., Sugama, J., Kotani, A., Koike, N., Ohkubo, S., and Nakahata, N. (2010) P2Y2 receptor-Gq/11 signaling at lipid rafts is required for UTP-induced cell migration in NG 108-15 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **334**, 809–819.
- Andreev, J., Galisteo, M.L., Kranenburg, O., Logan, S.K., Chiu, E.S., Okigaki, M., Cary, L.A., Moolenaar, W.H., and Schlessinger, J. (2001) Src and Pyk2 mediate G-protein-coupled receptor activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) but are not required for coupling to the mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling cascade. *J. Biol. Chem.*, **276**, 20130–20135.
- Andrews, R.K. and Fox, J.E. (1992) Identification of a region in the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex that binds to purified actin-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **267**, 18605–18611.
- Anselmi, E., Vallisa, D., Bertè, R., Vanzo, C., and Cavanna, L. (2006) Post-traumatic glioma: report of two cases. *Tumori*, **92**, 175–177.
- Arai, Y., Kubota, T., Nakagawa, T., Kabuto, M., Sato, K., and Kobayashi, H. (1998) Production of urokinase-type plasminogen activator (u-PA) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in human brain tumours. *Acta Neurochir. (Wien)*, **140**, 377–385; discussion 385–386.
- Arnold-Reed, D.E. and Balment, R.J. (1994) Peptide hormones influence in vitro interrenal secretion of cortisol in the trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **96**, 85–91.
- Arthur, W.T., Petch, L.A., and Burrige, K. (2000) Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr. Biol. Cb*, **10**, 719–722.
- Attwood, T.K. and Findlay, J.B. (1994) Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng.*, **7**, 195–203.
- Audero, E., Cascone, I., Zanon, I., Previtali, S.C., Piva, R., Schiffer, D., and Bussolino, F. (2001) Expression of Angiopoietin-1 in Human Glioblastomas Regulates Tumor-Induced Angiogenesis In Vivo and In Vitro Studies. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **21**, 536–541.
- Auguste, P., Gürsel, D.B., Lemièrè, S., Reimers, D., Cuevas, P., Carceller, F., Di Santo, J.P., and Bikfalvi, A. (2001) Inhibition of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor activity in glioma cells impedes tumor growth by both angiogenesis-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Res.*, **61**, 1717–1726.
- Augustin, H.G., Koh, G.Y., Thurston, G., and Alitalo, K. (2009) Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin–Tie system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 165–177.
- Awata, H., Huang, C., Handlogten, M.E., and Miller, R.T. (2001) Interaction of the calcium-sensing receptor and filamin, a potential scaffolding protein. *J. Biol. Chem.*, **276**, 34871–34879.
- Ayoub, M.A., Couturier, C., Lucas-Meunier, E., Angers, S., Fossier, P., Bouvier, M., and Jockers, R. (2002) Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes

of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.*, **277**, 21522–21528.

## -B-

- Babcock, G.J., Farzan, M., and Sodroski, J. (2003) Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor. *J. Biol. Chem.*, **278**, 3378–3385.
- Badie, B. and Schartner, J. (2001) Role of microglia in glioma biology. *Microsc. Res. Tech.*, **54**, 106–113.
- Badie, B., Schartner, J., Klaver, J., and Vorpahl, J. (1999) In vitro modulation of microglia motility by glioma cells is mediated by hepatocyte growth factor/scatter factor. *Neurosurgery*, **44**, 1077–1082; discussion 1082–1083.
- Baggiolini, M., Walz, A., and Kunkel, S.L. (1989) Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clin. Invest.*, **84**, 1045–1049.
- Bailey, P. and Cushing, H. (1926) A classification of the tumors of the glioma group on a histogenic basis with a correlated study of prognosis. *J B Lippincott Co. Philadelphia*.
- Bajetto, A., Barbieri, F., Dorcaratto, A., Barbero, S., Daga, A., Porcile, C., Ravetti, J.L., Zona, G., Spaziante, R., Corte, G., Schettini, G., and Florio, T. (2006) Expression of CXC chemokine receptors 1-5 and their ligands in human glioma tissues: role of CXCR4 and SDF1 in glioma cell proliferation and migration. *Neurochem. Int.*, **49**, 423–432.
- Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Rivelino, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L., and Geiger, B. (2001) Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat. Cell Biol.*, **3**, 466–472.
- Balat, A., Karakök, M., Yilmaz, K., and Kibar, Y. (2007) Urotensin-II immunoreactivity in children with chronic glomerulonephritis. *Ren. Fail.*, **29**, 573–578.
- Baldwin, R.T. and Preston-Martin, S. (2004) Epidemiology of brain tumors in childhood--a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **199**, 118–131.
- Ban, Y., Watanabe, T., Suguro, T., Matsuyama, T., Iso, Y., Sakai, T., Sato, R., Idei, T., Nakano, Y., Ota, H., Miyazaki, A., Kato, N., Hirano, T., Ban, Y., and Kobayashi, Y. (2009) Increased plasma urotensin-II and carotid atherosclerosis are associated with vascular dementia. *J. Atheroscler. Thromb.*, **16**, 179–187.
- Barbieri, F., Pattarozzi, A., Gatti, M., Aiello, C., Quintero, A., Lunardi, G., Bajetto, A., Ferrari, A., Culler, M.D., and Florio, T. (2009) Differential efficacy of SSTR1, -2, and -5 agonists in the inhibition of C6 glioma growth in nude mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **297**, E1078–1088.
- Barnes, W.G., Reiter, E., Violin, J.D., Ren, X.-R., Milligan, G., and Lefkowitz, R.J. (2005) beta-Arrestin 1 and Galphaq/11 coordinately activate RhoA and stress fiber formation following receptor stimulation. *J. Biol. Chem.*, **280**, 8041–8050.
- Barros, L.F., Kanaseki, T., Sabirov, R., Morishima, S., Castro, J., Bittner, C.X., Maeno, E., Ando-Akatsuka, Y., and Okada, Y. (2003) Apoptotic and necrotic blebs in epithelial cells display similar neck diameters but different kinase dependency. *Cell Death Differ.*, **10**, 687–697.
- Batuwangala, M.S., Calo, G., Guerrini, R., Ng, L.L., McDonald, J., and Lambert, D.G. (2009) Desensitisation of native and recombinant human urotensin-II receptors. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **380**, 451–457.
- Bayburt, T.H., Vishnivetskiy, S.A., McLean, M.A., Morizumi, T., Huang, C.-C., Tesmer, J.J.G., Ernst, O.P., Sliagar, S.G., and Gurevich, V.V. (2011) Monomeric rhodopsin is sufficient for normal rhodopsin kinase (GRK1) phosphorylation and arrestin-1 binding. *J. Biol. Chem.*, **286**, 1420–1428.

- Becciolini, L., Meacci, E., Donati, C., Cencetti, F., Rapizzi, E., and Bruni, P. (2006) Sphingosine 1-phosphate inhibits cell migration in C2C12 myoblasts. *Biochim. Biophys. Acta Bba - Mol. Cell Biol. Lipids*, **1761**, 43–51.
- Behm, D.J., Aiyar, N.V., Olzinski, A.R., McAtee, J.J., Hilfiker, M.A., Dodson, J.W., Dowdell, S.E., Wang, G.Z., Goodman, K.B., Sehon, C.A., Harpel, M.R., Willette, R.N., Neeb, M.J., Leach, C.A., and Douglas, S.A. (2010) GSK1562590, a slowly dissociating urotensin-II receptor antagonist, exhibits prolonged pharmacodynamic activity *ex vivo*. *Br. J. Pharmacol.*, **161**, 207–228.
- Behm, D.J., Doe, C.P.A., Johns, D.G., Maniscalco, K., Stankus, G.P., Wibberley, A., Willette, R.N., and Douglas, S.A. (2004a) Urotensin-II: a novel systemic hypertensive factor in the cat. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **369**, 274–280.
- Behm, D.J., Herold, C.L., Camarda, V., Aiyar, N.V., and Douglas, S.A. (2004b) Differential agonistic and antagonistic effects of the urotensin-II ligand SB-710411 at rodent and primate UT receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, **492**, 113–116.
- Behm, D.J., Herold, C.L., Ohlstein, E.H., Knight, S.D., Dhanak, D., and Douglas, S.A. (2002) Pharmacological characterization of SB-710411 (Cpa-c[D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Cpa-amide), a novel peptidic urotensin-II receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.*, **137**, 449–458.
- Behm, D.J., McAtee, J.J., Dodson, J.W., Neeb, M.J., Fries, H.E., Evans, C.A., Hernandez, R.R., Hoffman, K.D., Harrison, S.M., Lai, J.M., Wu, C., Aiyar, N.V., Ohlstein, E.H., and Douglas, S.A. (2008) Palosuran inhibits binding to primate UT receptors in cell membranes but demonstrates differential activity in intact cells and vascular tissues. *Br. J. Pharmacol.*, **155**, 374–386.
- Behm, D.J., Stankus, G., Doe, C.P.A., Willette, R.N., Sarau, H.M., Foley, J.J., Schmidt, D.B., Nuthulaganti, P., Fornwald, J.A., Ames, R.S., Lambert, D.G., Calo', G., Camarda, V., Aiyar, N.V., and Douglas, S.A. (2006) The peptidic urotensin-II receptor ligand GSK248451 possesses less intrinsic activity than the low-efficacy partial agonists SB-710411 and urantide in native mammalian tissues and recombinant cell systems. *Br. J. Pharmacol.*, **148**, 173–190.
- Behrem, S., Zarković, K., Eskinja, N., and Jonjić, N. (2005) Distribution pattern of tenascin-C in glioblastoma: correlation with angiogenesis and tumor cell proliferation. *Pathol. Oncol. Res. Por*, **11**, 229–235.
- Bellis, S.L., Perrotta, J.A., Curtis, M.S., and Turner, C.E. (1997) Adhesion of fibroblasts to fibronectin stimulates both serine and tyrosine phosphorylation of paxillin. *Biochem. J.*, **325 ( Pt 2)**, 375–381.
- Bello, L., Francolini, M., Marthyn, P., Zhang, J., Carroll, R.S., Nikas, D.C., Strasser, J.F., Villani, R., Cheresch, D.A., and Black, P.M. (2001) Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin expression in glioma periphery. *Neurosurgery*, **49**, 380–389; discussion 390.
- Bello, L., Giussani, C., Carrabba, G., Pluderi, M., Costa, F., and Bikfalvi, A. (2004) Angiogenesis and invasion in gliomas. *Cancer Treat. Res.*, **117**, 263–284.
- Bengtson, N.W. and Linzer, D.I. (2000) Inhibition of tumor growth by the antiangiogenic placental hormone, proliferin-related protein. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md*, **14**, 1934–1943.
- Beningo, K.A., Dembo, M., Kaverina, I., Small, J.V., and Wang, Y. (2001) Nascent Focal Adhesions Are Responsible for the Generation of Strong Propulsive Forces in Migrating Fibroblasts. *J. Cell Biol.*, **153**, 881–888.
- Bergers, G. and Benjamin, L.E. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 401–410.
- Bern, H.A. and Lederis, K. (1969) A reference preparation for the study of active substances in the caudal neurosecretory system of teleosts. *J. Endocrinol.*, **45**, Suppl:xi–xii.
- Bernfield, M. and Sanderson, R.D. (1990) Syndecan, a developmentally regulated cell surface proteoglycan that binds extracellular matrix and growth factors. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **327**, 171–186.
- Bettinger, I., Thanos, S., and Paulus, W. (2002) Microglia promote glioma migration. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **103**, 351–355.

- Bian, D., Mahanivong, C., Yu, J., Frisch, S.M., Pan, Z.K., Ye, R.D., and Huang, S. (2006) The G12/13-RhoA signaling pathway contributes to efficient lysophosphatidic acid-stimulated cell migration. *Oncogene*, **25**, 2234–2244.
- Bianca, R. d’Emmanuele di V., Mitidieri, E., Fusco, F., D’Aiuto, E., Grieco, P., Novellino, E., Imbimbo, C., Mirone, V., Cirino, G., and Sorrentino, R. (2012) Endogenous urotensin II selectively modulates erectile function through eNOS. *Plos One*, **7**, e31019.
- Birker-Robaczewska, M., Boukhadra, C., Studer, R., Mueller, C., Binkert, C., and Nayler, O. (2003) The expression of urotensin II receptor (U2R) is up-regulated by interferon-gamma. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, **23**, 289–305.
- Birlik, B., Canda, S., and Ozer, E. (2006) Tumour vascularity is of prognostic significance in adult, but not paediatric astrocytomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **32**, 532–538.
- BISSET, G.W. and LEWIS, G.P. (1962) A spectrum of pharmacological activity in some biologically active peptides. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, **19**, 168–182.
- Bizzarro, V., Belvedere, R., Dal Piaz, F., Parente, L., and Petrella, A. (2012) Annexin A1 induces skeletal muscle cell migration acting through formyl peptide receptors. *Plos One*, **7**, e48246.
- Bjorge, J.D., Chan, T.O., Antczak, M., Kung, H.J., and Fujita, D.J. (1990) Activated type I phosphatidylinositol kinase is associated with the epidermal growth factor (EGF) receptor following EGF stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 3816–3820.
- Bockaert, J., Marin, P., Dumuis, A., and Fagni, L. (2003) The “magic tail” of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *Febs Lett.*, **546**, 65–72.
- Böhm, F. and Pernow, J. (2002) Urotensin II evokes potent vasoconstriction in humans in vivo. *Br. J. Pharmacol.*, **135**, 25–27.
- Boivin, S., Guilhaudis, L., Milazzo, I., Oulyadi, H., Davoust, D., and Fournier, A. (2006) Characterization of urotensin-II receptor structural domains involved in the recognition of U-II, URP, and urantide. *Biochemistry (Mosc.)*, **45**, 5993–6002.
- Boivin, S., Ségalas-Milazzo, I., Guilhaudis, L., Oulyadi, H., Fournier, A., and Davoust, D. (2008) Solution structure of urotensin-II receptor extracellular loop III and characterization of its interaction with urotensin-II. *Peptides*, **29**, 700–710.
- Bokoch, G.M., Vlahos, C.J., Wang, Y., Knaus, U.G., and Traynor-Kaplan, A.E. (1996) Rac GTPase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem. J.*, **315 ( Pt 3)**, 775–779.
- Bondesson, L., Norolind, K., Lidén, S., Gafvelin, G., Theodorsson, E., and Mutt, V. (1991) Dual effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) on leucocyte migration. *Acta Physiol. Scand.*, **141**, 477–481.
- Bottrill, F.E., Douglas, S.A., Hiley, C.R., and White, R. (2000) Human urotensin-II is an endothelium-dependent vasodilator in rat small arteries. *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 1865–1870.
- Boucard, A.A., Sauvé, S.S., Guillemette, G., Escher, E., and Leduc, R. (2003) Photolabelling the rat urotensin II/GPR14 receptor identifies a ligand-binding site in the fourth transmembrane domain. *Biochem. J.*, **370**, 829–838.
- Bousette, N., Hu, F., Ohlstein, E.H., Dhanak, D., Douglas, S.A., and Giaid, A. (2006a) Urotensin-II blockade with SB-611812 attenuates cardiac dysfunction in a rat model of coronary artery ligation. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **41**, 285–295.
- Bousette, N., Patel, L., Douglas, S.A., Ohlstein, E.H., and Giaid, A. (2004) Increased expression of urotensin II and its cognate receptor GPR14 in atherosclerotic lesions of the human aorta. *Atherosclerosis*, **176**, 117–123.
- Bousette, N., Pottinger, J., Ramli, W., Ohlstein, E.H., Dhanak, D., Douglas, S.A., and Giaid, A. (2006b) Urotensin-II receptor blockade with SB-611812 attenuates cardiac remodeling in experimental ischemic heart disease. *Peptides*, **27**, 2919–2926.

- Bowman, E.P., Campbell, J.J., Druey, K.M., Scheschonka, A., Kehrl, J.H., and Butcher, E.C. (1998) Regulation of chemotactic and proadhesive responses to chemoattractant receptors by RGS (regulator of G-protein signaling) family members. *J. Biol. Chem.*, **273**, 28040–28048.
- Brailoiu, E., Jiang, X., Brailoiu, G.C., Yang, J., Chang, J.K., Wang, H., and Dun, N.J. (2008) State-dependent calcium mobilization by urotensin-II in cultured human endothelial cells. *Peptides*, **29**, 721–726.
- Brain, S.D., Williams, T.J., Tippins, J.R., Morris, H.R., and MacIntyre, I. (1985) Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*, **313**, 54–56.
- Brat, D.J., Bellail, A.C., and Van Meir, E.G. (2005a) The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-Oncol.*, **7**, 122–133.
- Brat, D.J., Bellail, A.C., and Van Meir, E.G. (2005b) The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-Oncol.*, **7**, 122–133.
- Breitsprecher, D., Kiesewetter, A.K., Linkner, J., Vinzenz, M., Stradal, T.E.B., Small, J.V., Curth, U., Dickinson, R.B., and Faix, J. (2011) Molecular mechanism of Ena/VASP-mediated actin-filament elongation. *Embo J.*, **30**, 456–467.
- Brem, S. (1976) The role of vascular proliferation in the growth of brain tumors. *Clin. Neurosurg.*, **23**, 440–453.
- Brkovic, A., Hattenberger, A., Kostenis, E., Klabunde, T., Flohr, S., Kurz, M., Bourgault, S., and Fournier, A. (2003) Functional and binding characterizations of urotensin II-related peptides in human and rat urotensin II-receptor assay. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **306**, 1200–1209.
- Brockmann, M.-A., Ulbricht, U., Grüner, K., Fillbrandt, R., Westphal, M., and Lamszus, K. (2003) Glioblastoma and cerebral microvascular endothelial cell migration in response to tumor-associated growth factors. *Neurosurgery*, **52**, 1391–1399; discussion 1399.
- Brown, M.C. and Turner, C.E. (1999) Characterization of paxillin LIM domain-associated serine threonine kinases: activation by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Biochem.*, **76**, 99–108.
- Brown, M.C. and Turner, C.E. (2004) Paxillin: Adapting to Change. *Physiol. Rev.*, **84**, 1315–1339.
- Brown, S.L., Jala, V.R., Raghuvanshi, S.K., Nasser, M.W., Haribabu, B., and Richardson, R.M. (2006) Activation and regulation of platelet-activating factor receptor: role of G(i) and G(q) in receptor-mediated chemotactic, cytotoxic, and cross-regulatory signals. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, **177**, 3242–3249.
- Brunckhorst, M.K., Wang, H., Lu, R., and Yu, Q. (2010) Angiopoietin-4 promotes glioblastoma progression by enhancing tumor cell viability and angiogenesis. *Cancer Res.*, **70**, 7283–7293.
- Büchler, P., Reber, H.A., Tomlinson, J.S., Hankinson, O., Kallifatidis, G., Friess, H., Herr, I., and Hines, O.J. (2009) Transcriptional regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor by hypoxia-inducible factor 1 is crucial for invasion of pancreatic and liver cancer. *Neoplasia New York N*, **11**, 196–206.
- Buhl, A.M., Johnson, N.L., Dhanasekaran, N., and Johnson, G.L. (1995) Gα12 and Gα13 Stimulate Rho-dependent Stress Fiber Formation and Focal Adhesion Assembly. *J. Biol. Chem.*, **270**, 24631–24634.
- Burbelo, P.D., Drechsel, D., and Hall, A. (1995) A Conserved Binding Motif Defines Numerous Candidate Target Proteins for Both Cdc42 and Rac GTPases. *J. Biol. Chem.*, **270**, 29071–29074.
- Burden-Gulley, S.M., Qutaish, M.Q., Sullivant, K.E., Lu, H., Wang, J., Craig, S.E.L., Babilion, J.P., Wilson, D.L., and Brady-Kalnay, S.M. (2011) Novel cryo-imaging of the glioma tumor microenvironment reveals migration and dispersal pathways in vivid three-dimensional detail. *Cancer Res.*, **71**, 5932–5940.
- Bussolati, B., Biancone, L., Cassoni, P., Russo, S., Rola-Pleszczynski, M., Montrucchio, G., and Camussi, G. (2000) PAF produced by human breast cancer cells promotes migration and proliferation of tumor cells and neo-angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, **157**, 1713–1725.

Buul, J.D. van, Voermans, C., Gelderen, J. van, Anthony, E.C., Schoot, C.E. van der, and Hordijk, P.L. (2003) Leukocyte-Endothelium Interaction Promotes SDF-1-dependent Polarization of CXCR4. *J. Biol. Chem.*, **278**, 30302–30310.

### -C-

Camarda, V., Guerrini, R., Kostenis, E., Rizzi, A., Calò, G., Hattenberger, A., Zucchini, M., Salvadori, S., and Regoli, D. (2002) A new ligand for the urotensin II receptor. *Br. J. Pharmacol.*, **137**, 311–314.

Camarda, V., Song, W., Marzola, E., Spagnol, M., Guerrini, R., Salvadori, S., Regoli, D., Thompson, J.P., Rowbotham, D.J., Behm, D.J., Douglas, S.A., Calò, G., and Lambert, D.G. (2004) Urotensin mimics urotensin-II induced calcium release in cells expressing recombinant UT receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, **498**, 83–86.

Camarda, V., Spagnol, M., Song, W., Vergura, R., Roth, A.L., Thompson, J.P., Rowbotham, D.J., Guerrini, R., Marzola, E., Salvadori, S., Cavanni, P., Regoli, D., Douglas, S.A., Lambert, D.G., and Calò, G. (2006) In vitro and in vivo pharmacological characterization of the novel UT receptor ligand [Pen<sup>5</sup>,DTrp<sup>7</sup>,Dab<sup>8</sup>]urotensin II(4–11) (UFP-803). *Br. J. Pharmacol.*, **147**, 92–100.

Campellone, K.G. and Welch, M.D. (2010) A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 237–251.

Carotenuto, A., Grieco, P., Campiglia, P., Novellino, E., and Rovero, P. (2004) Unraveling the active conformation of urotensin II. *J. Med. Chem.*, **47**, 1652–1661.

Castel, H., Diallo, M., Chatenet, D., Leprince, J., Desrues, L., Schouft, M.-T., Fontaine, M., Dubessy, C., Lihmann, I., Scalbert, E., Malagon, M., Vaudry, H., Tonon, M.-C., and Gandolfo, P. (2006) Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes. *J. Neurochem.*, **99**, 582–595.

Castellani, P., Viale, G., Dorcaratto, A., Nicolo, G., Kaczmarek, J., Querze, G., and Zardi, L. (1994) The fibronectin isoform containing the ed-b oncofetal domain: A marker of angiogenesis. *Int. J. Cancer*, **59**, 612–618.

Cattaneo, M.G., Chini, B., and Vicentini, L.M. (2008) Oxytocin stimulates migration and invasion in human endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.*, **153**, 728–736.

Chabbert, M., Castel, H., Pele, J., Deville, J., Legendre, R., and Rodien, P. (2012) Evolution of class A G-protein-coupled receptors: implications for molecular modeling. *Curr. Med. Chem.*, **19**, 1110–1118.

Chakraborty, C., Barbin, Y.P., Chakrabarti, S., Chidiac, P., Dixon, S.J., and Lala, P.K. (2003) Endothelin-1 promotes migration and induces elevation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and phosphorylation of MAP kinase of a human extravillous trophoblast cell line. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **201**, 63–73.

Chan, K.T., Bennin, D.A., and Huttenlocher, A. (2010) Regulation of adhesion dynamics by calpain-mediated proteolysis of focal adhesion kinase (FAK). *J. Biol. Chem.*, **285**, 11418–11426.

Chant, J. and Pringle, J.R. (1991) Budding and cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **1**, 342–350.

Chao, W.-T. and Kunz, J. (2009) Focal adhesion disassembly requires clathrin-dependent endocytosis of integrins. *Febs Lett.*, **583**, 1337–1343.

Charo, I.F. and Taubman, M.B. (2004) Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ. Res.*, **95**, 858–866.

Charras, G.T., Coughlin, M., Mitchison, T.J., and Mahadevan, L. (2008) Life and Times of a Cellular Bleb. *Biophys. J.*, **94**, 1836–1853.

Chartrel, N., Conlon, J.M., Collin, F., Braun, B., Waugh, D., Vallarino, M., Lahrichi, S.L., Rivier, J.E., and Vaudry, H. (1996) Urotensin II in the central nervous system of the frog *Rana ridibunda*:

- immunohistochemical localization and biochemical characterization. *J. Comp. Neurol.*, **364**, 324–339.
- Chatenet, D., Dubessy, C., Leprince, J., Boularan, C., Carlier, L., Ségalas-Milazzo, I., Guilhaudis, L., Oulyadi, H., Davoust, D., Scalbert, E., Pfeiffer, B., Renard, P., Tonon, M.-C., Lihmann, I., Pacaud, P., and Vaudry, H. (2004) Structure-activity relationships and structural conformation of a novel urotensin II-related peptide. *Peptides*, **25**, 1819–1830.
- Chatenet, D., Nguyen, Q.-T., Létourneau, M., Dupuis, J., and Fournier, A. (2012a) Urocontrin, a novel UT receptor ligand with a unique pharmacological profile. *Biochem. Pharmacol.*, **83**, 608–615.
- Chatenet, D., Nguyen, T.-T.M., Létourneau, M., and Fournier, A. (2012b) Update on the urotensineric system: new trends in receptor localization, activation, and drug design. *Front. Endocrinol.*, **3**, 174.
- Chen, G., Cheng, Y., Tang, Y., Martinka, M., and Li, G. (2012a) Role of Tip60 in human melanoma cell migration, metastasis, and patient survival. *J. Invest. Dermatol.*, **132**, 2632–2641.
- 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., Hasegawa, E., Hasegawa, T., Weinstock, C., and Yamada, K.M. (1985) Development of cell surface linkage complexes in cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.*, **100**, 1103–1114.
- Chen, Y., Zhao, M., Liu, X., Yao, W., Yang, J., Zhang, Z., and Tang, C. (2001) Urotensin II receptor in the rat airway smooth muscle and its effect on the rat airway smooth muscle cells proliferation. *Chin. Med. Sci. J. Chung-Kuo Hsüeh Ko Hsüeh Tsa Chih Chin. Acad. Med. Sci.*, **16**, 231–235.
- Chen, Y.-L., Liu, J.-C., Loh, S.-H., Chen, C.-H., Hong, C.-Y., Chen, J.-J., and Cheng, T.-H. (2008) Involvement of reactive oxygen species in urotensin II-induced proliferation of cardiac fibroblasts. *Eur. J. Pharmacol.*, **593**, 24–29.
- Chen, Y.-L., Loh, S.-H., Chen, J.-J., and Tsai, C.-S. (2012b) Urotensin II prevents cardiomyocyte apoptosis induced by doxorubicin via Akt and ERK. *Eur. J. Pharmacol.*, **680**, 88–94.
- Chen, Z.-W., Yang, Q., Huang, Y., Fan, L., Li, X.-W., and He, G.-W. (2010) Human urotensin II in internal mammary and radial arteries of patients undergoing coronary surgery. *Vascul. Pharmacol.*, **52**, 70–76.
- Cheriyian, J., Burton, T.J., Bradley, T.J., Wallace, S.M.L., Mäki-Petäjä, K.M., Mackenzie, I.S., McEniery, C.M., Brown, J., and Wilkinson, I.B. (2009) The effects of urotensin II and urantide on forearm blood flow and systemic haemodynamics in humans. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **68**, 518–523.
- Chetty, C., Vanamala, S.K., Gondi, C.S., Dinh, D.H., Gujrati, M., and Rao, J.S. (2012) MMP-9 induces CD44 cleavage and CD44 mediated cell migration in glioblastoma xenograft cells. *Cell. Signal.*, **24**, 549–559.
- Cheung, B.M.Y., Leung, R., Man, Y.B., and Wong, L.Y.F. (2004) Plasma concentration of urotensin II is raised in hypertension. *J. Hypertens.*, **22**, 1341–1344.
- Chhabra, E.S. and Higgs, H.N. (2007) The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat. Cell Biol.*, **9**, 1110–1121.
- Chicoine, M.R. and Silbergeld, D.L. (1997) Mitogens as motogens. *J. Neurooncol.*, **35**, 249–257.
- Chlenski, A., Guerrero, L.J., Peddinti, R., Spitz, J.A., Leonhardt, P.T., Yang, Q., Tian, Y., Salwen, H.R., and Cohn, S.L. (2010) Anti-angiogenic SPARC peptides inhibit progression of neuroblastoma tumors. *Mol. Cancer*, **9**, 138.
- Choi, C.K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L.A., Mogilner, A., and Horwitz, A.R. (2008) Actin and  $\alpha$ -actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat. Cell Biol.*, **10**, 1039.
- Choi, C.K., Zareno, J., Digman, M.A., Gratton, E., and Horwitz, A.R. (2011) Cross-Correlated Fluctuation Analysis Reveals Phosphorylation-Regulated Paxillin-FAK Complexes in Nascent Adhesions. *Biophys. J.*, **100**, 583–592.



- Christensen, G.L., Kelstrup, C.D., Lyngsø, C., Sarwar, U., Bøgebo, R., Sheikh, S.P., Gammeltoft, S., Olsen, J.V., and Hansen, J.L. (2010) Quantitative Phosphoproteomics Dissection of Seven-transmembrane Receptor Signaling Using Full and Biased Agonists. *Mol. Cell. Proteomics*, **9**, 1540–1553.
- Chrzanowska-Wodnicka, M. and Burridge, K. (1996) Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell Biol.*, **133**, 1403–1415.
- Chung, C.Y., Funamoto, S., and Firtel, R.A. (2001) Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 557–566.
- Cirillo, P., De Rosa, S., Pacileo, M., Gargiulo, A., Angri, V., Fiorentino, I., Prevete, N., Petrillo, G., De Palma, R., Leonardi, A., De Paulis, A., and Chiariello, M. (2008) Human urotensin II induces tissue factor and cellular adhesion molecules expression in human coronary endothelial cells: an emerging role for urotensin II in cardiovascular disease. *J. Thromb. Haemost. Jth*, **6**, 726–736.
- Claing, A., Laporte, S.A., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (2002) Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and  $\beta$ -arrestin proteins. *Prog. Neurobiol.*, **66**, 61–79.
- Clark, S., Nothacker, H.-P., Wang, Z., Saito, Y., Leslie, F., and Civelli, O. (2001) The urotensin II receptor is expressed in the cholinergic mesopontine tegmentum of the rat. *Brain Res.*, **923**, 120–127.
- Cloughesy, T.F., Yoshimoto, K., Nghiemphu, P., Brown, K., Dang, J., Zhu, S., Hsueh, T., Chen, Y., Wang, W., Youngkin, D., Liau, L., Martin, N., Becker, D., Bergsneider, M., Lai, A., Green, R., Oglesby, T., Koletto, M., Trent, J., Horvath, S., Mischel, P.S., Mellinghoff, I.K., and Sawyers, C.L. (2008) Antitumor activity of rapamycin in a Phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma. *Plos Med.*, **5**, e8.
- Clozel, M., Binkert, C., Birker-Robaczewska, M., Boukhadra, C., Ding, S.-S., Fischli, W., Hess, P., Mathys, B., Morrison, K., Müller, C., Müller, C., Nayler, O., Qiu, C., Rey, M., Scherz, M.W., Velker, J., Weller, T., Xi, J.-F., and Ziltener, P. (2004) Pharmacology of the urotensin-II receptor antagonist palosuran (ACT-058362; 1-[2-(4-benzyl-4-hydroxy-piperidin-1-yl)-ethyl]-3-(2-methyl-quinolin-4-yl)-urea sulfate salt): first demonstration of a pathophysiological role of the urotensin System. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **311**, 204–212.
- Clozel, M., Hess, P., Qiu, C., Ding, S.-S., and Rey, M. (2006) The urotensin-II receptor antagonist palosuran improves pancreatic and renal function in diabetic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **316**, 1115–1121.
- Condeelis, J.S., Wyckoff, J.B., Bailly, M., Pestell, R., Lawrence, D., Backer, J., and Segall, J.E. (2001) Lamellipodia in invasion. *Semin. Cancer Biol.*, **11**, 119–128.
- Coniglio, S.J., Eugenin, E., Dobrenis, K., Stanley, E.R., West, B.L., Symons, M.H., and Segall, J.E. (2012) Microglial stimulation of glioblastoma invasion involves epidermal growth factor receptor (EGFR) and colony stimulating factor 1 receptor (CSF-1R) signaling. *Mol. Med. Camb. Mass*, **18**, 519–527.
- Conlon, J.M., Arnold-Reed, D., and Balment, R.J. (1990) Post-translational processing of prepro-urotensin II. *Febs Lett.*, **266**, 37–40.
- Conlon, J.M., O'Harte, F., Smith, D.D., Balment, R.J., and Hazon, N. (1992a) Purification and characterization of urotensin II and parvalbumin from an elasmobranch fish, *Scyliorhinus canicula* (common dogfish). *Neuroendocrinology*, **55**, 230–235.
- Conlon, J.M., O'Harte, F., Smith, D.D., Tonon, M.C., and Vaudry, H. (1992b) Isolation and primary structure of urotensin II from the brain of a tetrapod, the frog *Rana ridibunda*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **188**, 578–583.
- Conlon, J.M., Tostivint, H., and Vaudry, H. (1997) Somatostatin- and urotensin II-related peptides: molecular diversity and evolutionary perspectives. *Regul. Pept.*, **69**, 95–103.

- Coopman, P.J., Do, M.T., Thompson, E.W., and Mueller, S.C. (1998) Phagocytosis of Cross-Linked Gelatin Matrix by Human Breast Carcinoma Cells Correlates with Their Invasive Capacity. *Clin. Cancer Res.*, **4**, 507–515.
- Cortesio, C.L., Boateng, L.R., Piazza, T.M., Bennin, D.A., and Huttenlocher, A. (2011) Calpain-mediated proteolysis of paxillin negatively regulates focal adhesion dynamics and cell migration. *J. Biol. Chem.*, **286**, 9998–10006.
- Côté, M.C., Lavoie, J.R., Houle, F., Poirier, A., Rousseau, S., and Huot, J. (2010) Regulation of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by LIM kinase 1-mediated phosphorylation of annexin 1. *J. Biol. Chem.*, **285**, 8013–8021.
- Cotton, M. and Claing, A. (2009) G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration. *Cell. Signal.*, **21**, 1045–1053.
- Couchman, J.R. and Rees, D.A. (1979) Actomyosin organisation for adhesion, spreading, growth and movement in chick fibroblasts. *Cell Biol. Int. Rep.*, **3**, 431–439.
- Coulouarn, Y., Fernex, C., Jégou, S., Henderson, C.E., Vaudry, H., and Lihrmann, I. (2001) Specific expression of the urotensin II gene in sacral motoneurons of developing rat spinal cord. *Mech. Dev.*, **101**, 187–190.
- Coulouarn, Y., Jégou, S., Tostivint, H., Vaudry, H., and Lihrmann, I. (1999) Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors. *Febs Lett.*, **457**, 28–32.
- Coulouarn, Y., Lihrmann, I., Jégou, S., Anouar, Y., Tostivint, H., Beauvillain, J.C., Conlon, J.M., Bern, H.A., and Vaudry, H. (1998) Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 15803–15808.
- Cowley, E., Thompson, J.P., Sharpe, P., Waugh, J., Ali, N., and Lambert, D.G. (2005) Effects of pre-eclampsia on maternal plasma, cerebrospinal fluid, and umbilical cord urotensin II concentrations: a pilot study. *Br. J. Anaesth.*, **95**, 495–499.
- Critchley, D.R. (2009) Smurf1 zaps the talin head. *Nat. Cell Biol.*, **11**, 538–540.
- Croall, D.E. and DeMartino, G.N. (1991) Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.*, **71**, 813–847.
- Croston, G.E., Olsson, R., Currier, E.A., Burstein, E.S., Weiner, D., Nash, N., Severance, D., Allenmark, S.G., Thunberg, L., Ma, J.-N., Mohell, N., O'Dowd, B., Brann, M.R., and Hacksell, U. (2002) Discovery of the first nonpeptide agonist of the GPR14/urotensin-II receptor: 3-(4-chlorophenyl)-3-(2-(dimethylamino)ethyl)isochroman-1-one (AC-7954). *J. Med. Chem.*, **45**, 4950–4953.
- Crowley, E. and Horwitz, A.F. (1995) Tyrosine phosphorylation and cytoskeletal tension regulate the release of fibroblast adhesions. *J. Cell Biol.*, **131**, 525–537.
- Cuevas, P., Carceller, F., Reimers, D., Cuevas, B., Lozano, R.M., and Giménez-Gallego, G. (1999) Inhibition of intra-tumoral angiogenesis and glioma growth by the fibroblast growth factor inhibitor 1,3,6-naphthalenetrisulfonate. *Neurol. Res.*, **21**, 481–487.
- Cunningham, C.C. (1995) Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing. *J. Cell Biol.*, **129**, 1589–1599.
- Currie, M.G., Geller, D.M., Cole, B.R., Boylan, J.G., YuSheng, W., Holmberg, S.W., and Needleman, P. (1983) Bioactive cardiac substances: potent vasorelaxant activity in mammalian atria. *Science*, **221**, 71–73.
- Curtis, A.S. (1964) The mechanism of adhesion of cells to glass. a study by interference reflection microscopy. *J. Cell Biol.*, **20**, 199–215.
- Cvejic, S. and Devi, L.A. (1997) Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J. Biol. Chem.*, **272**, 26959–26964.

**-D-**

- Daher, Z., Noël, J., and Claing, A. (2008) Endothelin-1 promotes migration of endothelial cells through the activation of ARF6 and the regulation of FAK activity. *Cell. Signal.*, **20**, 2256–2265.
- Dai, H.-Y., Guo, X.-G., Ge, Z.-M., Li, Z.-H., Yu, X.-J., Tang, M.-X., and Zhang, Y. (2008) Elevated expression of urotensin II and its receptor in diabetic cardiomyopathy. *J. Diabetes Complications*, **22**, 137–143.
- Dai, H.-Y., He, T., Li, X.-L., Xu, W.-L., and Ge, Z.-M. (2011) Urotensin-2 promotes collagen synthesis via ERK1/2-dependent and ERK1/2-independent TGF- $\beta$ 1 in neonatal cardiac fibroblasts. *Cell Biol. Int.*, **35**, 93–98.
- Dai, H.-Y., Kang, W.-Q., Wang, X., Yu, X.-J., Li, Z.-H., Tang, M.-X., Xu, D.-L., Li, C.-W., Zhang, Y., and Ge, Z.-M. (2007) The involvement of transforming growth factor-beta1 secretion in urotensin II-induced collagen synthesis in neonatal cardiac fibroblasts. *Regul. Pept.*, **140**, 88–93.
- Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1996) Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, **379**, 557–560.
- Davenport, R.W., Dou, P., Rehder, V., and Kater, S.B. (1993) A sensory role for neuronal growth cone filopodia. *Nature*, **361**, 721–724.
- David-Pfeuty, T. and Singer, S.J. (1980) Altered distributions of the cytoskeletal proteins vinculin and alpha-actinin in cultured fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 6687.
- Davies, W.A. and Stossel, T.P. (1977) Peripheral hyaline blebs (podosomes) of macrophages. *J. Cell Biol.*, **75**, 941–955.
- De Boüard, S., Guillamo, J.-S., Christov, C., Lefèvre, N., Brugières, P., Gola, E., Devanz, P., Indraccolo, S., and Peschanski, M. (2003) Antiangiogenic Therapy Against Experimental Glioblastoma Using Genetically Engineered Cells Producing Interferon- $\alpha$ , Angiostatin, or Endostatin. *Hum. Gene Ther.*, **14**, 883–895.
- De Lecea, L. and Bourgin, P. (2008) Neuropeptide interactions and REM sleep: a role for Urotensin II? *Peptides*, **29**, 845–851.
- De Nichilo, M.O. and Yamada, K.M. (1996) Integrin alpha v beta 5-dependent serine phosphorylation of paxillin in cultured human macrophages adherent to vitronectin. *J. Biol. Chem.*, **271**, 11016–11022.
- De Oliveira, M.V., Marin, T.M., Clemente, C.F., Costa, A.P.D., Judice, C.C., and Franchini, K.G. (2009) SHP-2 regulates myogenesis by coupling to FAK signaling pathway. *Febs Lett.*, **583**, 2975–2981.
- De Vries, L., Zheng, B., Fischer, T., Elenko, E., and Farquhar, M.G. (2000) The regulator of G protein signaling family. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **40**, 235–271.
- De Wever, O., Demetter, P., Mareel, M., and Bracke, M. (2008) Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer*, **123**, 2229–2238.
- Décaillot, F.M., Kazmi, M.A., Lin, Y., Ray-Saha, S., Sakmar, T.P., and Sachdev, P. (2011) CXCR7/CXCR4 Heterodimer Constitutively Recruits  $\beta$ -Arrestin to Enhance Cell Migration. *J. Biol. Chem.*, **286**, 32188–32197.
- Del Valle-Pérez, B., Martínez, V.G., Lacasa-Salavert, C., Figueras, A., Shapiro, S.S., Takafuta, T., Casanovas, O., Capellà, G., Ventura, F., and Viñals, F. (2010) Filamin B plays a key role in vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility through its interaction with Rac-1 and Vav-2. *J. Biol. Chem.*, **285**, 10748–10760.
- DePasquale, J.A. and Izzard, C.S. (1987) Evidence for an actin-containing cytoplasmic precursor of the focal contact and the timing of incorporation of vinculin at the focal contact. *J. Cell Biol.*, **105**, 2803–2809.
- Deryugina, E.I. and Bourdon, M.A. (1996) Tenascin mediates human glioma cell migration and modulates cell migration on fibronectin. *J. Cell Sci.*, **109** ( Pt 3), 643–652.

- Desrues, L., Lefebvre, T., Diallo, M., Gandolfo, P., Leprince, J., Chatenet, D., Vaudry, H., Tonon, M.-C., and Castel, H. (2008) Effect of GABA A receptor activation on UT-coupled signaling pathways in rat cortical astrocytes. *Peptides*, **29**, 727–734.
- Desrues, L., Lefebvre, T., Lecoindre, C., Schouft, M.-T., Leprince, J., Compère, V., Morin, F., Proust, F., Gandolfo, P., Tonon, M.-C., and Castel, H. (2012) Down-regulation of GABA(A) receptor via promiscuity with the vasoactive peptide urotensin II receptor. Potential involvement in astrocyte plasticity. *Plos One*, **7**, e36319.
- Devillé, J., Rey, J., and Chabbert, M. (2009) An indel in transmembrane helix 2 helps to trace the molecular evolution of class A G-protein-coupled receptors. *J. Mol. Evol.*, **68**, 475–489.
- Dheen, S.T., Kaur, C., and Ling, E.-A. (2007) Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr. Med. Chem.*, **14**, 1189–1197.
- Dhodapkar, M., Rubin, J., Reid, J.M., Burch, P.A., Pitot, H.C., Buckner, J.C., Ames, M.M., and Suman, V.J. (1997) Phase I trial of temozolomide (NSC 362856) in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, **3**, 1093–1100.
- Diallo, M., Jarry, M., Desrues, L., Castel, H., Chatenet, D., Leprince, J., Vaudry, H., Tonon, M.-C., and Gandolfo, P. (2008) [Orn5]URP acts as a pure antagonist of urotensinergic receptors in rat cortical astrocytes. *Peptides*, **29**, 813–819.
- Diebold, I., Petry, A., Burger, M., Hess, J., and Görlach, A. (2011) NOX4 mediates activation of FoxO3a and matrix metalloproteinase-2 expression by urotensin-II. *Mol. Biol. Cell*, **22**, 4424–4434.
- Diebold, I., Petry, A., Sabrane, K., Djordjevic, T., Hess, J., and Görlach, A. (2012) The HIF1 target gene NOX2 promotes angiogenesis through urotensin-II. *J. Cell Sci.*, **125**, 956–964.
- Djordjevic, T., BelAiba, R.S., Bonello, S., Pfeilschifter, J., Hess, J., and Görlach, A. (2005) Human urotensin II is a novel activator of NADPH oxidase in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 519–525.
- Do-Rego, J.-C., Chatenet, D., Orta, M.-H., Naudin, B., Le Cudennec, C., Leprince, J., Scalbert, E., Vaudry, H., and Costentin, J. (2005) Behavioral effects of urotensin-II centrally administered in mice. *Psychopharmacology (Berl.)*, **183**, 103–117.
- Doan, N.D., Nguyen, T.T.M., Létourneau, M., Turcotte, K., Fournier, A., and Chatenet, D. (2012) Biochemical and pharmacological characterization of nuclear urotensin-II binding sites in rat heart. *Br. J. Pharmacol.*, **166**, 243–257.
- Domogatskaya, A., Rodin, S., and Tryggvason, K. (2012) Functional Diversity of Laminins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **28**, 523–553.
- Douglas, S.A., Ashton, D.J., Sauermelch, C.F., Coatney, R.W., Ohlstein, D.H., Ruffolo, M.R., Ohlstein, E.H., Aiyar, N.V., and Willette, R.N. (2000a) Human urotensin-II is a potent vasoactive peptide: pharmacological characterization in the rat, mouse, dog and primate. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **36**, S163–166.
- Douglas, S.A., Behm, D.J., Aiyar, N.V., Naselsky, D., Disa, J., Brooks, D.P., Ohlstein, E.H., Gleason, J.G., Sarau, H.M., Foley, J.J., Buckley, P.T., Schmidt, D.B., Wixted, W.E., Widdowson, K., Riley, G., Jin, J., Gallagher, T.F., Schmidt, S.J., Ridgers, L., Christmann, L.T., Keenan, R.M., Knight, S.D., and Dhanak, D. (2005) Nonpeptidic urotensin-II receptor antagonists I: in vitro pharmacological characterization of SB-706375. *Br. J. Pharmacol.*, **145**, 620–635.
- Douglas, S.A., Dhanak, D., and Johns, D.G. (2004a) From “gills to pills”: urotensin-II as a regulator of mammalian cardiorenal function. *Trends Pharmacol. Sci.*, **25**, 76–85.
- Douglas, S.A., Naselsky, D., Ao, Z., Disa, J., Herold, C.L., Lynch, F., and Aiyar, N.V. (2004b) Identification and pharmacological characterization of native, functional human urotensin-II receptors in rhabdomyosarcoma cell lines. *Br. J. Pharmacol.*, **142**, 921–932.
- Douglas, S.A. and Ohlstein, E.H. (2000) Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc. Med.*, **10**, 229–237.

- Douglas, S.A., Sulpizio, A.C., Piercy, V., Sarau, H.M., Ames, R.S., Aiyar, N.V., Ohlstein, E.H., and Willette, R.N. (2000b) Differential vasoconstrictor activity of human urotensin-II in vascular tissue isolated from the rat, mouse, dog, pig, marmoset and cynomolgus monkey. *Br. J. Pharmacol.*, **131**, 1262–1274.
- Douglas, S.A., Tayara, L., Ohlstein, E.H., Halawa, N., and Giaid, A. (2002) Congestive heart failure and expression of myocardial urotensin II. *Lancet*, **359**, 1990–1997.
- Dowell, J.A., Johnson, J.A., and Li, L. (2009) Identification of Astrocyte Secreted Proteins with a Combination of Shotgun Proteomics and Bioinformatics. *J. Proteome Res.*, **8**, 4135–4143.
- Downward, J., Riehl, R., Wu, L., and Weinberg, R.A. (1990) Identification of a nucleotide exchange-promoting activity for p21ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 5998–6002.
- Drubin, D.G. and Nelson, W.J. (1996) Origins of cell polarity. *Cell*, **84**, 335–344.
- Dschietzig, T., Bartsch, C., Pregla, R., Zurbrügg, H.R., Armbruster, F.P., Richter, C., Laule, M., Romeyke, E., Neubert, C., Voelter, W., Baumann, G., and Stangl, K. (2002) Plasma levels and cardiovascular gene expression of urotensin-II in human heart failure. *Regul. Pept.*, **110**, 33–38.
- Dubessy, C., Cartier, D., Lectez, B., Bucharles, C., Chartrel, N., Montero-Hadjadje, M., Bizet, P., Chatenet, D., Tostivint, H., Scalbert, E., Leprince, J., Vaudry, H., Jégou, S., and Lihmann, I. (2008) Characterization of urotensin II, distribution of urotensin II, urotensin II-related peptide and UT receptor mRNAs in mouse: evidence of urotensin II at the neuromuscular junction. *J. Neurochem.*, **107**, 361–374.
- Dun, S.L., Brailoiu, G.C., Yang, J., Chang, J.K., and Dun, N.J. (2001) Urotensin II-immunoreactivity in the brainstem and spinal cord of the rat. *Neurosci. Lett.*, **305**, 9–12.
- Dunn, J.D., Reid, G.E., and Bruening, M.L. (2010) Techniques for phosphopeptide enrichment prior to analysis by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, **29**, 29–54.

## -E-

- Eckerich, C., Zapf, S., Fillbrandt, R., Loges, S., Westphal, M., and Lamszus, K. (2007) Hypoxia can induce c-Met expression in glioma cells and enhance SF/HGF-induced cell migration. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer*, **121**, 276–283.
- Edvardsen, K., Pedersen, P.-H., Bjerkvig, R., Hermann, G.G., Zeuthen, J., Laerum, O.D., Waish, F.S., and Bock, E. (1994) Transfection of glioma cells with the neural-cell adhesion molecule NCAM: Effect on glioma-cell invasion and growth in vivo. *Int. J. Cancer*, **58**, 116–122.
- Egginger, J.-G. and Calas, A. (2005) A novel hypothalamic neuroendocrine peptide: URP (urotensin-II-related peptide)? *C. R. Biol.*, **328**, 724–731.
- Egginger, J.-G., Camus, A., and Calas, A. (2006) Urotensin-II expression in the mouse spinal cord. *J. Chem. Neuroanat.*, **31**, 146–154.
- Egginger, J.-G., Parmentier, C., Garrel, G., Cohen-Tannoudji, J., Camus, A., Calas, A., Hardin-Pouzet, H., and Grange-Messent, V. (2011) Direct evidence for the co-expression of URP and GnRH in a sub-population of rat hypothalamic neurones: anatomical and functional correlation. *Plos One*, **6**, e26611.
- Eguchi, S., Numaguchi, K., Iwasaki, H., Matsumoto, T., Yamakawa, T., Utsunomiya, H., Motley, E.D., Kawakatsu, H., Owada, K.M., Hirata, Y., Marumo, F., and Inagami, T. (1998) Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **273**, 8890–8896.
- Ehtesham, M., Winston, J.A., Kabos, P., and Thompson, R.C. (2006) CXCR4 expression mediates glioma cell invasiveness. *Oncogene*, **25**, 2801–2806.

- El-Obeid, A., Bongcam-Rudloff, E., Sörby, M., Ostman, A., Nistér, M., and Westermarck, B. (1997) Cell scattering and migration induced by autocrine transforming growth factor alpha in human glioma cells in vitro. *Cancer Res.*, **57**, 5598–5604.
- Elshourbagy, N.A., Douglas, S.A., Shabon, U., Harrison, S., Duddy, G., Sechler, J.L., Ao, Z., Maleeff, B.E., Naselsky, D., Disa, J., and Aiyar, N.V. (2002) Molecular and pharmacological characterization of genes encoding urotensin-II peptides and their cognate G-protein-coupled receptors from the mouse and monkey. *Br. J. Pharmacol.*, **136**, 9–22.
- Enz, R. (2002) The actin-binding protein Filamin-A interacts with the metabotropic glutamate receptor type 7. *Febs Lett.*, **514**, 184–188.
- Erickson, C.A. and Trinkaus, J.P. (1976) Microvilli and blebs as sources of reserve surface membrane during cell spreading. *Exp. Cell Res.*, **99**, 375–384.
- Ernst, O.P., Gramse, V., Kolbe, M., Hofmann, K.P., and Heck, M. (2007) Monomeric G protein-coupled receptor rhodopsin in solution activates its G protein transducin at the diffusion limit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 10859–10864.
- Esposito, G., Perrino, C., Cannavo, A., Schiattarella, G.G., Borgia, F., Sannino, A., Pironti, G., Gargiulo, G., Di Serafino, L., Franzone, A., Scudiero, L., Grieco, P., Indolfi, C., and Chiariello, M. (2011) EGFR trans-activation by urotensin II receptor is mediated by  $\beta$ -arrestin recruitment and confers cardioprotection in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Basic Res. Cardiol.*, **106**, 577–589.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2001) Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell*, **106**, 489–498.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2003) Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature*, **421**, 753–756.
- Etienne-Manneville, S., Manneville, J.-B., Nicholls, S., Ferenczi, M.A., and Hall, A. (2005) Cdc42 and Par6-PKCzeta regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization. *J. Cell Biol.*, **170**, 895–901.
- Ezratty, E.J., Partridge, M.A., and Gundersen, G.G. (2005) Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat. Cell Biol.*, **7**, 581–590.

## -F-

- Fackler, O.T. and Grosse, R. (2008) Cell motility through plasma membrane blebbing. *J. Cell Biol.*, **181**, 879–884.
- Faller, E.M. and Brown, D.L. (2009) Modulation of microtubule dynamics by the microtubule-associated protein 1a. *J. Neurosci. Res.*, **87**, 1080–1089.
- Farin, A., Suzuki, S.O., Weiker, M., Goldman, J.E., Bruce, J.N., and Canoll, P. (2006) Transplanted glioma cells migrate and proliferate on host brain vasculature: a dynamic analysis. *Glia*, **53**, 799–808.
- Farrell, C.J. and Plotkin, S.R. (2007) Genetic causes of brain tumors: neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Lindau, and other syndromes. *Neurol. Clin.*, **25**, 925–946, viii.
- Fears, C.Y., Grammer, J.R., Stewart, J.E., Annis, D.S., Mosher, D.F., Bornstein, P., and Gladson, C.L. (2005) Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Contributes to the Antiangiogenic Activity of Thrombospondin-2 in a Murine Glioma Model. *Cancer Res.*, **65**, 9338–9346.
- Fegley, A.J., Tanski, W.J., Roztocil, E., and Davies, M.G. (2003) Sphingosine-1-phosphate stimulates smooth muscle cell migration through  $\text{g}\alpha$ - and  $\text{p}i3$ -kinase-dependent p38mapk activation. *J. Surg. Res.*, **113**, 32–41.
- Feng, H., Liu, K.W., Guo, P., Zhang, P., Cheng, T., McNiven, M.A., Johnson, G.R., Hu, B., and Cheng, S.Y. (2012) Dynamin 2 mediates PDGFR $\alpha$ -SHP-2-promoted glioblastoma growth and invasion. *Oncogene*, **31**, 2691–2702.

- Feoktistov, I., Goldstein, A.E., and Biaggioni, I. (2000) Cyclic AMP and protein kinase A stimulate Cdc42: role of A(2) adenosine receptors in human mast cells. *Mol. Pharmacol.*, **58**, 903–910.
- Fernandez-Sauze, S., Delfino, C., Mabrouk, K., Dussert, C., Chinot, O., Martin, P.-M., Grisoli, F., Ouafik, L., and Boudouresque, F. (2004) Effects of adrenomedullin on endothelial cells in the multistep process of angiogenesis: Involvement of CRLR/RAMP2 and CRLR/RAMP3 receptors. *Int. J. Cancer*, **108**, 797–804.
- Fischer, I., Gagner, J.-P., Law, M., Newcomb, E.W., and Zagzag, D. (2005) Angiogenesis in Gliomas: Biology and Molecular Pathophysiology. *Brain Pathol.*, **15**, 297–310.
- Fisher, J.L., Schwartzbaum, J.A., Wrensch, M., and Wiemels, J.L. (2007) Epidemiology of brain tumors. *Neurol. Clin.*, **25**, 867–890, vii.
- Floden, A.M., Li, S., and Combs, C.K. (2005) Beta-amyloid-stimulated microglia induce neuron death via synergistic stimulation of tumor necrosis factor alpha and NMDA receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, **25**, 2566–2575.
- Flohr, S., Kurz, M., Kostenis, E., Brkovich, A., Fournier, A., and Klabunde, T. (2002) Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II. *J. Med. Chem.*, **45**, 1799–1805.
- Foister, S., Taylor, L.L., Feng, J.-J., Chen, W.-L., Lin, A., Cheng, F.-C., Smith, A.B., 3rd, and Hirschmann, R. (2006) Design and synthesis of potent cystine-free cyclic hexapeptide agonists at the human urotensin receptor. *Org. Lett.*, **8**, 1799–1802.
- Foletta, V.C., Lim, M.A., Soosairajah, J., Kelly, A.P., Stanley, E.G., Shannon, M., He, W., Das, S., Massague, J., and Bernard, O. (2003) Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *J. Cell Biol.*, **162**, 1089–1098.
- Fong, A.M., Premont, R.T., Richardson, R.M., Yu, Y.-R.A., Lefkowitz, R.J., and Patel, D.D. (2002) Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 7478–7483.
- Fontes-Sousa, A.P., Brás-Silva, C., Pires, A.L., Monteiro-Sousa, D., and Leite-Moreira, A.F. (2007) Urotensin II acutely increases myocardial length and distensibility: potential implications for diastolic function and ventricular remodeling. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **376**, 107–115.
- Francke, F., Buck, F., and Bächner, D. (2005) MYND domain specific interaction of the melanin-concentrating hormone receptor 1 interacting zinc-finger protein with alpha- and beta-tubulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **334**, 1292–1298.
- Franco, S.J., Rodgers, M.A., Perrin, B.J., Han, J., Bennin, D.A., Critchley, D.R., and Huttenlocher, A. (2004) Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat. Cell Biol.*, **6**, 977–983.
- Franke, T.F., Yang, S.I., Chan, T.O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D.K., Kaplan, D.R., and Tsichlis, P.N. (1995) The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*, **81**, 727–736.
- Frantz, C., Stewart, K.M., and Weaver, V.M. (2010) The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.*, **123**, 4195–4200.
- Fredriksson, R., Lagerström, M.C., Lundin, L.-G., and Schiöth, H.B. (2003) The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol. Pharmacol.*, **63**, 1256–1272.
- Friedl, P. and Gilmour, D. (2009) Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 445–457.
- Friedman, H.S., Kerby, T., and Calvert, H. (2000) Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, **6**, 2585–2597.

- Fujita, M., Khazenzon, N.M., Ljubimov, A.V., Lee, B.-S., Virtanen, I., Holler, E., Black, K.L., and Ljubimova, J.Y. (2006) Inhibition of laminin-8 in vivo using a novel poly(malic acid)-based carrier reduces glioma angiogenesis. *Angiogenesis*, **9**, 183–191.
- Fujiwara, S., Nakagawa, K., Harada, H., Nagato, S., Furukawa, K., Teraoka, M., Seno, T., Oka, K., Iwata, S., and Ohnishi, T. (2007) Silencing hypoxia-inducible factor-1alpha inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas. *Int. J. Oncol.*, **30**, 793–802.
- Fukushima, S., Yoshida, A., Honda, K., Maeshima, A.M., Narita, Y., Yamada, T., Shibui, S., and Tsuda, H. (2013) Immunohistochemical actinin-4 expression in infiltrating gliomas: association with WHO grade and differentiation. *Brain Tumor Pathol.*,
- Funamoto, S., Meili, R., Lee, S., Parry, L., and Firtel, R.A. (2002) Spatial and Temporal Regulation of 3-Phosphoinositides by PI 3-Kinase and PTEN Mediates Chemotaxis. *Cell*, **109**, 611–623.
- Furnari, F.B., Fenton, T., Bachoo, R.M., Mukasa, A., Stommel, J.M., Stegh, A., Hahn, W.C., Ligon, K.L., Louis, D.N., Brennan, C., Chin, L., DePinho, R.A., and Cavenee, W.K. (2007) Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.*, **21**, 2683–2710.

## -G-

- Gaidano, G., Bergui, L., Schena, M., Gaboli, M., Cremona, O., Marchisio, P.C., and Caligaris-Cappio, F. (1990) Integrin distribution and cytoskeleton organization in normal and malignant monocytes. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund Uk*, **4**, 682–687.
- Galanis, E., Buckner, J.C., Maurer, M.J., Kreisberg, J.I., Ballman, K., Boni, J., Peralba, J.M., Jenkins, R.B., Dakhil, S.R., Morton, R.F., Jaeckle, K.A., Scheithauer, B.W., Dancey, J., Hidalgo, M., and Walsh, D.J. (2005) Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **23**, 5294–5304.
- Gao, S., Oh, Y.B., Park, B.M., Park, W.H., and Kim, S.H. (2012) Urotensin II protects ischemic reperfusion injury of hearts through ROS and antioxidant pathway. *Peptides*, **36**, 199–205.
- Gao, S., Oh, Y.-B., Shah, A., Park, W.H., Chung, M.J., Lee, Y.-H., and Kim, S.H. (2010) Urotensin II receptor antagonist attenuates monocrotaline-induced cardiac hypertrophy in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **299**, H1782–1789.
- Gardel, M.L., Schneider, I.C., Aratyn-Schaus, Y., and Waterman, C.M. (2010) Mechanical Integration of Actin and Adhesion Dynamics in Cell Migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **26**, 315–333.
- Gardiner, S.M., March, J.E., Kemp, P.A., Davenport, A.P., and Bennett, T. (2001) Depressor and regionally-selective vasodilator effects of human and rat urotensin II in conscious rats. *Br. J. Pharmacol.*, **132**, 1625–1629.
- Gartlon, J., Parker, F., Harrison, D.C., Douglas, S.A., Ashmeade, T.E., Riley, G.J., Hughes, Z.A., Taylor, S.G., Munton, R.P., Hagan, J.J., Hunter, J.A., and Jones, D.N. (2001) Central effects of urotensin-II following ICV administration in rats. *Psychopharmacology (Berl.)*, **155**, 426–433.
- Ge, L., Shenoy, S.K., Lefkowitz, R.J., and DeFea, K. (2004) Constitutive protease-activated receptor-2-mediated migration of MDA MB-231 breast cancer cells requires both beta-arrestin-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, **279**, 55419–55424.
- Gendron, G., Simard, B., Gobeil, F., Jr, Sirois, P., D'Orléans-Juste, P., and Regoli, D. (2004) Human urotensin-II enhances plasma extravasation in specific vascular districts in Wistar rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **82**, 16–21.
- Geoerger, B., Kieran, M.W., Grupp, S., Perek, D., Clancy, J., Krygowski, M., Ananthakrishnan, R., Boni, J.P., Berkenblit, A., and Spunt, S.L. (2012) Phase II trial of temsirolimus in children with high-grade glioma, neuroblastoma and rhabdomyosarcoma. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990*, **48**, 253–262.



- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., and Betsholtz, C. (2003) VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.*, **161**, 1163–1177.
- Gerisch, G., Schroth-Diez, B., Müller-Taubenberger, A., and Ecke, M. (2012) PIP3 Waves and PTEN Dynamics in the Emergence of Cell Polarity. *Biophys. J.*, **103**, 1170–1178.
- Gibson, A. (1987) Complex effects of Gillichthys urotensin II on rat aortic strips. *Br. J. Pharmacol.*, **91**, 205–212.
- Gibson, A., Conyers, S., and Bern, H.A. (1988) The influence of urotensin II on calcium flux in rat aorta. *J. Pharm. Pharmacol.*, **40**, 893–895.
- Giebing, G., Tölle, M., Jürgensen, J., Eichhorst, J., Furkert, J., Beyermann, M., Neuschäfer-Rube, F., Rosenthal, W., Zidek, W., Giet, M. van der, and Oksche, A. (2005) Arrestin-Independent Internalization and Recycling of the Urotensin Receptor Contribute to Long-Lasting Urotensin II-Mediated Vasoconstriction. *Circ. Res.*, **97**, 707–715.
- Giese, A., Bjerkvig, R., Berens, M.E., and Westphal, M. (2003) Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **21**, 1624–1636.
- Giuliani, L., Lenzini, L., Antonello, M., Aldighieri, E., Belloni, A.S., Fassina, A., Gomez-Sanchez, C., and Rossi, G.P. (2009) Expression and Functional Role of Urotensin-II and Its Receptor in the Adrenal Cortex and Medulla: Novel Insights for the Pathophysiology of Primary Aldosteronism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **94**, 684–690.
- Glading, A., Bodnar, R.J., Reynolds, I.J., Shiraha, H., Satish, L., Potter, D.A., Blair, H.C., and Wells, A. (2004) Epidermal Growth Factor Activates m-Calpain (Calpain II), at Least in Part, by Extracellular Signal-Regulated Kinase-Mediated Phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 2499–2512.
- Gladson, C.L. and Cheresch, D.A. (1991) Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *J. Clin. Invest.*, **88**, 1924–1932.
- Glodek, A.M., Honczarenko, M., Le, Y., Campbell, J.J., and Silberstein, L.E. (2003) Sustained Activation of Cell Adhesion Is a Differentially Regulated Process in B Lymphopoiesis. *J. Exp. Med.*, **197**, 461–473.
- Gobeil, F., Fortier, A., Zhu, T., Bossolasco, M., Leduc, M., Grandbois, M., Heveker, N., Bkaily, G., Chemtob, S., and Barbaz, D. (2006) G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **84**, 287–297.
- Gober, J.W., Alley, M.R., and Shapiro, L. (1991) Positional information during Caulobacter cell differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **1**, 324–329.
- Godessart, N. and Kunkel, S.L. (2001) Chemokines in autoimmune disease. *Curr. Opin. Immunol.*, **13**, 670–675.
- Goichberg, P., Bai, Y., D'Amario, D., Ferreira-Martins, J., Fiorini, C., Zheng, H., Signore, S., del Monte, F., Ottolenghi, S., D'Alessandro, D.A., Michler, R.E., Hosoda, T., Anversa, P., Kajstura, J., Rota, M., and Leri, A. (2011) The ephrin A1-EphA2 system promotes cardiac stem cell migration after infarction. *Circ. Res.*, **108**, 1071–1083.
- Goldman, C.K., Kim, J., Wong, W.L., King, V., Brock, T., and Gillespie, G.Y. (1993) Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol. Biol. Cell*, **4**, 121–133.
- Gomez-Mouton, C. (2004) Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis. *J. Cell Biol.*, **164**, 759–768.
- Gondi, C.S., Lakka, S.S., Dinh, D.H., Olivero, W.C., Gujrati, M., and Rao, J.S. (2004) Downregulation of uPA, uPAR and MMP-9 using small, interfering, hairpin RNA (siRNA) inhibits glioma cell invasion, angiogenesis and tumor growth. *Neuron Glia Biol.*, **1**, 165–176.

- Gondi, C.S., Lakka, S.S., Yanamandra, N., Siddique, K., Dinh, D.H., Olivero, W.C., Gujrati, M., and Rao, J.S. (2003) Expression of antisense uPAR and antisense uPA from a bicistronic adenoviral construct inhibits glioma cell invasion, tumor growth, and angiogenesis. *Oncogene*, **22**, 5967–5975.
- Gong, H., Wang, Y.-X., Zhu, Y.-Z., Wang, W.-W., Wang, M.-J., Yao, T., and Zhu, Y.-C. (2004) Cellular distribution of GPR14 and the positive inotropic role of urotensin II in the myocardium in adult rat. *J. Appl. Physiol.*, **97**, 2228–2235.
- González, G.C., Martínez-Padrón, M., Lederis, K., and Lukowiak, K. (1992) Distribution and coexistence of urotensin I and urotensin II peptides in the cerebral ganglia of *Aplysia californica*. *Peptides*, **13**, 695–703.
- Grau, E.G., Nishioka, R.S., and Bern, H.A. (1982) Effects of somatostatin and urotensin II on tilapia pituitary prolactin release and interactions between somatostatin, osmotic pressure  $Ca^{++}$ , and adenosine 3',5'-monophosphate in prolactin release in vitro. *Endocrinology*, **110**, 910–915.
- Grieco, P., Carotenuto, A., Campiglia, P., Zampelli, E., Patacchini, R., Maggi, C.A., Novellino, E., and Rovero, P. (2002) A new, potent urotensin II receptor peptide agonist containing a Pen residue at the disulfide bridge. *J. Med. Chem.*, **45**, 4391–4394.
- Grieco, P., Franco, R., Bozzuto, G., Toccaceli, L., Sgambato, A., Marra, M., Zappavigna, S., Migaldi, M., Rossi, G., Striano, S., Marra, L., Gallo, L., Cittadini, A., Botti, G., Novellino, E., Molinari, A., Budillon, A., and Caraglia, M. (2011) Urotensin II receptor predicts the clinical outcome of prostate cancer patients and is involved in the regulation of motility of prostate adenocarcinoma cells. *J. Cell. Biochem.*, **112**, 341–353.
- Grieshaber, N.A., Boitano, S., Ji, I., Mather, J.P., and Ji, T.H. (2000) Differentiation of Granulosa Cell Line: Follicle-Stimulating Hormone Induces Formation of Lamellipodia and Filopodia via the Adenylyl Cyclase/Cyclic Adenosine Monophosphate Signal. *Endocrinology*, **141**, 3461–3470.
- Grieve, A.G., Moss, S.E., and Hayes, M.J. (2012) Annexin A2 at the interface of actin and membrane dynamics: a focus on its roles in endocytosis and cell polarization. *Int. J. Cell Biol.*, **2012**, 852430.
- Gritsenko, P.G., Ilina, O., and Friedl, P. (2012) Interstitial guidance of cancer invasion. *J. Pathol.*, **226**, 185–199.
- Groves, M.D., Puduvalli, V.K., Conrad, C.A., Gilbert, M.R., Yung, W.K.A., Jaeckle, K., Liu, V., Hess, K.R., Aldape, K.D., and Levin, V.A. (2006) Phase II trial of temozolomide plus marimastat for recurrent anaplastic gliomas: a relationship among efficacy, joint toxicity and anticonvulsant status. *J. Neurooncol.*, **80**, 83–90.
- Groves, M.D., Puduvalli, V.K., Hess, K.R., Jaeckle, K.A., Peterson, P., Yung, W.K.A., and Levin, V.A. (2002) Phase II trial of temozolomide plus the matrix metalloproteinase inhibitor, marimastat, in recurrent and progressive glioblastoma multiforme. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **20**, 1383–1388.
- Grüning, W., Arnould, T., Jochimsen, F., Sellin, L., Ananth, S., Kim, E., and Walz, G. (1999) Modulation of renal tubular cell function by RGS3. *Am. J. Physiol.*, **276**, F535–543.
- Gruson, D., Ginion, A., Decroly, N., Lause, P., Vanoverschelde, J.L., Ketelslegers, J.M., Bertrand, L., and Thissen, J.P. (2010) Urotensin II induction of adult cardiomyocytes hypertrophy involves the Akt/GSK-3beta signaling pathway. *Peptides*, **31**, 1326–1333.
- Gruson, D., Rousseau, M.F., Ahn, S.A., van Linden, F., and Ketelslegers, J.M. (2006) Circulating urotensin II levels in moderate to severe congestive heart failure: its relations with myocardial function and well established neurohormonal markers. *Peptides*, **27**, 1527–1531.
- Gschwind, A., Prenzel, N., and Ullrich, A. (2002) Lysophosphatidic acid-induced squamous cell carcinoma cell proliferation and motility involves epidermal growth factor receptor signal transactivation. *Cancer Res.*, **62**, 6329–6336.
- Guerrini, R., Camarda, V., Marzola, E., Arduin, M., Calo, G., Spagnol, M., Rizzi, A., Salvadori, S., and Regoli, D. (2005) Structure-activity relationship study on human urotensin II. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.*, **11**, 85–90.

- Guidolin, D., Albertin, G., Oselladore, B., Sorato, E., Rebuffat, P., Mascarin, A., and Ribatti, D. (2010) The pro-angiogenic activity of urotensin-II on human vascular endothelial cells involves ERK1/2 and PI3K signaling pathways. *Regul. Pept.*, **162**, 26–32.
- Guo, P., Hu, B., Gu, W., Xu, L., Wang, D., Huang, H.-J.S., Cavenee, W.K., and Cheng, S.-Y. (2003) Platelet-Derived Growth Factor-B Enhances Glioma Angiogenesis by Stimulating Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Tumor Endothelia and by Promoting Pericyte Recruitment. *Am. J. Pathol.*, **162**, 1083–1093.
- Gupton, S.L. and Waterman-Storer, C.M. (2006) Spatiotemporal Feedback between Actomyosin and Focal-Adhesion Systems Optimizes Rapid Cell Migration. *Cell*, **125**, 1361–1374.
- Guyon, J.R., Kudryashova, E., Potts, A., Dalkilic, I., Brosius, M.A., Thompson, T.G., Beckmann, J.S., Kunkel, L.M., and Spencer, M.J. (2003) Calpain 3 cleaves filamin C and regulates its ability to interact with gamma- and delta-sarcoglycans. *Muscle Nerve*, **28**, 472–483.

### -H-

- Hagel, M., George, E.L., Kim, A., Tamimi, R., Opitz, S.L., Turner, C.E., Imamoto, A., and Thomas, S.M. (2002) The adaptor protein paxillin is essential for normal development in the mouse and is a critical transducer of fibronectin signaling. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 901–915.
- Hagemann, C., Anacker, J., Ernestus, R.-I., and Vince, G.H. (2012) A complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas. *World J. Clin. Oncol.*, **3**, 67–79.
- Hallberg, B., Rayter, S.I., and Downward, J. (1994) Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J. Biol. Chem.*, **269**, 3913–3916.
- Hao, F., Tan, M., Xu, X., Han, J., Miller, D.D., Tigyi, G., and Cui, M.-Z. (2007) Lysophosphatidic acid induces prostate cancer PC3 cell migration via activation of LPA1, p42 and p38 $\alpha$ . *Biochim. Biophys. Acta Bba - Mol. Cell Biol. Lipids*, **1771**, 883–892.
- Hardell, L., Carlberg, M., Söderqvist, F., Mild, K.H., and Morgan, L.L. (2007) Long-term use of cellular phones and brain tumours: increased risk associated with use for > or =10 years. *Occup. Environ. Med.*, **64**, 626–632.
- Hart, M.J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W.D., Gilman, A.G., Sternweis, P.C., and Bollag, G. (1998) Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by G $\alpha$ 13. *Science*, **280**, 2112–2114.
- Hartlage-Rübsamen, M., Lemke, R., and Schliebs, R. (1999) Interleukin-1 $\beta$ , inducible nitric oxide synthase, and nuclear factor-kappaB are induced in morphologically distinct microglia after rat hippocampal lipopolysaccharide/interferon-gamma injection. *J. Neurosci. Res.*, **57**, 388–398.
- Hassan, G.S., Chouiali, F., Saito, T., Hu, F., Douglas, S.A., Ao, Z., Willette, R.N., Ohlstein, E.H., and Giaid, A. (2003) Effect of human urotensin-II infusion on hemodynamics and cardiac function. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **81**, 125–128.
- Hassan, G.S., Douglas, S.A., Ohlstein, E.H., and Giaid, A. (2005) Expression of urotensin-II in human coronary atherosclerosis. *Peptides*, **26**, 2464–2472.
- Haug, J.M., Codazzi, F., Teruel, M., and Meyer, T. (2000) Spatial sensing in fibroblasts mediated by 3' phosphoinositides. *J. Cell Biol.*, **151**, 1269–1280.
- He, L., Pappan, L.K., Grenache, D.G., Li, Z., Tollefsen, D.M., Santoro, S.A., and Zutter, M.M. (2003) The contributions of the alpha 2 beta 1 integrin to vascular thrombosis in vivo. *Blood*, **102**, 3652–3657.
- Heath, J.P. and Dunn, G.A. (1978) Cell to substratum contacts of chick fibroblasts and their relation to the microfilament system. A correlated interference-reflexion and high-voltage electron-microscope study. *J. Cell Sci.*, **29**, 197–212.
- Heider, M.R. and Munson, M. (2012) Exorcising the Exocyst Complex. *Traffic*, **13**, 898–907.

- Heller, J., Schepke, M., Neef, M., Woitas, R., Rabe, C., and Sauerbruch, T. (2002) Increased urotensin II plasma levels in patients with cirrhosis and portal hypertension. *J. Hepatol.*, **37**, 767–772.
- Hepler, P.K., Vidali, L., and Cheung, A.Y. (2001) Polarized Cell Growth in Higher Plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **17**, 159–187.
- Heringlake, M., Kox, T., Uzun, O., Will, B., Bahlmann, L., Klaus, S., Eleftheriadis, S., Armbruster, F.P., Franz, N., and Kraatz, E. (2004) The relationship between urotensin II plasma immunoreactivity and left ventricular filling pressures in coronary artery disease. *Regul. Pept.*, **121**, 129–136.
- Hernandez-Barrantes, S., Toth, M., Bernardo, M.M., Yurkova, M., Gervasi, D.C., Raz, Y., Sang, Q.A., and Fridman, R. (2000) Binding of Active (57 kDa) Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) to Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP)-2 Regulates MT1-MMP Processing and Pro-MMP-2 Activation. *J. Biol. Chem.*, **275**, 12080–12089.
- Herold-Mende, C., Mueller, M.M., Bonsanto, M.M., Schmitt, H.P., Kunze, S., and Steiner, H.-H. (2002) Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer*, **98**, 362–369.
- Hirata, E., Arakawa, Y., Shirahata, M., Yamaguchi, M., Kishi, Y., Okada, T., Takahashi, J.A., Matsuda, M., and Hashimoto, N. (2009) Endogenous tenascin-C enhances glioblastoma invasion with reactive change of surrounding brain tissue. *Cancer Sci.*, **100**, 1451–1459.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., and Niwa, S. (2009) Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 682–696.
- Hirose, T., Takahashi, K., Mori, N., Nakayama, T., Kikuya, M., Ohkubo, T., Kohzuki, M., Totsune, K., and Imai, Y. (2009) Increased expression of urotensin II, urotensin II-related peptide and urotensin II receptor mRNAs in the cardiovascular organs of hypertensive rats: comparison with endothelin-1. *Peptides*, **30**, 1124–1129.
- Hoelzinger, D.B., Nakada, M., Demuth, T., Rosensteel, T., Reavie, L.B., and Berens, M.E. (2008) Autotaxin: a secreted autocrine/paracrine factor that promotes glioma invasion. *J. Neurooncol.*, **86**, 297–309.
- Hogue, M.J. (1919) The effect of hypotonic and hypertonic solutions on fibroblasts of the embryonic chick heart in vitro. *J. Exp. Med.*, **30**, 617–648.
- Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D., and Wiegand, S.J. (1999) Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*, **284**, 1994–1998.
- Holleran, B.J., Domazet, I., Beaulieu, M.-E., Yan, L.P., Guillemette, G., Lavigne, P., Escher, E., and Leduc, R. (2009) Identification of transmembrane domain 6 and 7 residues that contribute to the binding pocket of the urotensin II receptor. *Biochem. Pharmacol.*, **77**, 1374–1382.
- Holmin, S., Mathiesen, T., Shetye, J., and Biberfeld, P. (1995) Intracerebral inflammatory response to experimental brain contusion. *Acta Neurochir. (Wien)*, **132**, 110–119.
- Holtfreter, J. (1943) A study of the mechanics of gastrulation. Part I. *J. Exp. Zool.*, **94**, 261–318.
- Honda, Z., Nakamura, M., Miki, I., Minami, M., Watanabe, T., Seyama, Y., Okado, H., Toh, H., Ito, K., and Miyamoto, T. (1991) Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature*, **349**, 342–346.
- Honda, Z.-I., Suzuki, T., and Honda, H. (2009) Identification of CENP-V as a novel microtubule-associating molecule that activates Src family kinases through SH3 domain interaction. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.*, **14**, 1383–1394.
- Hong, X., Jiang, F., Kalkanis, S.N., Zhang, Z.G., Zhang, X.-P., deCarvalho, A.C., Katakowski, M., Bobbitt, K., Mikkelsen, T., and Chopp, M. (2006) SDF-1 and CXCR4 are up-regulated by VEGF and contribute to glioma cell invasion. *Cancer Lett.*, **236**, 39–45.
- Hong, Y.K., Chung, D.S., Joe, Y.A., Yang, Y.J., Kim, K.M., Park, Y.S., Yung, W.K., and Kang, J.K. (2000) Efficient inhibition of in vivo human malignant glioma growth and angiogenesis by

- interferon-beta treatment at early stage of tumor development. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, **6**, 3354–3360.
- Hotchin, N.A. and Hall, A. (1995) The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J. Cell Biol.*, **131**, 1857–1865.
- Hsieh, C.-Y., Tsai, P.-C., Tseng, C.-H., Chen, Y., Chang, L.-S., and Lin, S.-R. (2013) Inhibition of EGF/EGFR activation with naphtho[1,2-b]furan-4,5-dione blocks migration and invasion of MDA-MB-231 cells. *Toxicol. In Vitro*, **27**, 1–10.
- Hsu, S.C., Volpert, O.V., Steck, P.A., Mikkelsen, T., Polverini, P.J., Rao, S., Chou, P., and Bouck, N.P. (1996) Inhibition of Angiogenesis in Human Glioblastomas by Chromosome 10 Induction of Thrombospondin-1. *Cancer Res.*, **56**, 5684–5691.
- Hu, R., Peng, G., Dai, H., Breuer, E.-K., Stemke-Hale, K., Li, K., Gonzalez-Angulo, A.M., Mills, G.B., and Lin, S.-Y. (2011) ZNF668 functions as a tumor suppressor by regulating p53 stability and function in breast cancer. *Cancer Res.*, **71**, 6524–6534.
- Hubbard, S.R. and Till, J.H. (2000) Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 373–398.
- Huitron-Resendiz, S., Kristensen, M.P., Sánchez-Alavez, M., Clark, S.D., Grupke, S.L., Tyler, C., Suzuki, C., Nothacker, H.-P., Civelli, O., Criado, J.R., Henriksen, S.J., Leonard, C.S., and de Lecea, L. (2005) Urotensin II modulates rapid eye movement sleep through activation of brainstem cholinergic neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, **25**, 5465–5474.
- Hulmes, D.J.S. (2002) Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *J. Struct. Biol.*, **137**, 2–10.
- Humphries, J.D., Wang, P., Streuli, C., Geiger, B., Humphries, M.J., and Ballestrem, C. (2007) Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J. Cell Biol.*, **179**, 1043–1057.
- Hunton, D.L., Barnes, W.G., Kim, J., Ren, X.-R., Violin, J.D., Reiter, E., Milligan, G., Patel, D.D., and Lefkowitz, R.J. (2005) Beta-arrestin 2-dependent angiotensin II type 1A receptor-mediated pathway of chemotaxis. *Mol. Pharmacol.*, **67**, 1229–1236.

## -I-

- Ichikawa, T., Lederis, K., and Kobayashi, H. (1984) Primary structures of multiple forms of urotensin II in the urophysis of the carp, *Cyprinus carpio*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **55**, 133–141.
- Iglewski, M. and Grant, S.R. (2010) Urotensin II-induced signaling involved in proliferation of vascular smooth muscle cells. *Vasc. Heal. Risk Manag.*, **6**, 723–734.
- Iguchi, T., Sakata, K., Yoshizaki, K., Tago, K., Mizuno, N., and Itoh, H. (2008) Orphan G protein-coupled receptor GPR56 regulates neural progenitor cell migration via a G alpha 12/13 and Rho pathway. *J. Biol. Chem.*, **283**, 14469–14478.
- Iijima, M. and Devreotes, P. (2002) Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients. *Cell*, **109**, 599–610.
- Ishihata, A., Ogaki, T., Aita, T., and Katano, Y. (2005) Role of prostaglandins in urotensin II-induced vasodilatation in the coronary arteries of aged rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **523**, 119–126.
- Issafras, H., Angers, S., Bulenger, S., Blanpain, C., Parmentier, M., Labbé-Jullié, C., Bouvier, M., and Marullo, S. (2002) Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. *J. Biol. Chem.*, **277**, 34666–34673.
- Itoh, H., Itoh, Y., Rivier, J., and Lederis, K. (1987) Contraction of major artery segments of rat by fish neuropeptide urotensin II. *Am. J. Physiol.*, **252**, R361–366.
- Izzard, C.S. (1988) A precursor of the focal contact in cultured fibroblasts. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **10**, 137–142.

Izzard, C.S. and Lochner, L.R. (1976) Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J. Cell Sci.*, **21**, 129–159.

## -J-

- Jang, H.S., Lal, S., and Greenwood, J.A. (2010) Calpain 2 is required for glioblastoma cell invasion: regulation of matrix metalloproteinase 2. *Neurochem. Res.*, **35**, 1796–1804.
- Jani, P.P., Narayan, H., and Ng, L.L. (2012) The differential extraction and immunoluminometric assay of Urotensin II and Urotensin-related peptide in heart failure. *Peptides*, **40C**, 72–76.
- Jarry, M., Diallo, M., Lecointre, C., Desrues, L., Tokay, T., Chatenet, D., Leprince, J., Rossi, O., Vaudry, H., Tonon, M.-C., Prézeau, L., Castel, H., and Gandolfo, P. (2010) The vasoactive peptides urotensin II and urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation. *Biochem. J.*, **428**, 113–124.
- Järveläinen, H., Sainio, A., Koulu, M., Wight, T.N., and Penttinen, R. (2009) Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.*, **61**, 198–223.
- Jégou, S., Cartier, D., Dubessy, C., Gonzalez, B.J., Chatenet, D., Tostivint, H., Scalbert, E., Leprince, J., Vaudry, H., and Lihrmann, I. (2006) Localization of the urotensin II receptor in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, **495**, 21–36.
- Jeong, K.J., Park, S.Y., Seo, J.H., Lee, K.B., Choi, W.S., Han, J.W., Kang, J.K., Park, C.G., Kim, Y.K., and Lee, H.Y. (2008) Lysophosphatidic acid receptor 2 and Gi/Src pathway mediate cell motility through cyclooxygenase 2 expression in CAO-3 ovarian cancer cells. *Exp. Mol. Med.*, **40**, 607–616.
- Ji, X.-D., Li, G., Feng, Y.-X., Zhao, J.-S., Li, J.-J., Sun, Z.-J., Shi, S., Deng, Y.-Z., Xu, J.-F., Zhu, Y.-Q., Koeffler, H.P., Tong, X.-J., and Xie, D. (2011) EphB3 is overexpressed in non-small-cell lung cancer and promotes tumor metastasis by enhancing cell survival and migration. *Cancer Res.*, **71**, 1156–1166.
- Jia, G., Cheng, G., Gangahar, D.M., and Agrawal, D.K. (2008) Involvement of connexin 43 in angiotensin II-induced migration and proliferation of saphenous vein smooth muscle cells via the MAPK-AP-1 signaling pathway. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **44**, 882–890.
- Jiang, G., Giannone, G., Critchley, D.R., Fukumoto, E., and Sheetz, M.P. (2003) Two-piconewton slip bond between fibronectin and the cytoskeleton depends on talin. *Nature*, **424**, 334–337.
- Jiménez-Baranda, S., Gómez-Moutón, C., Rojas, A., Martínez-Prats, L., Mira, E., Ana Lacalle, R., Valencia, A., Dimitrov, D.S., Viola, A., Delgado, R., Martínez-A, C., and Mañes, S. (2007) Filamin-A regulates actin-dependent clustering of HIV receptors. *Nat. Cell Biol.*, **9**, 838–846.
- Jiménez-Sainz, M.C., Murga, C., Kavelaars, A., Jurado-Pueyo, M., Krakstad, B.F., Heijnen, C.J., Mayor, F., Jr, and Aragay, A.M. (2006) G protein-coupled receptor kinase 2 negatively regulates chemokine signaling at a level downstream from G protein subunits. *Mol. Biol. Cell*, **17**, 25–31.
- Jin, T., Zhang, N., Long, Y., Parent, C.A., and Devreotes, P.N. (2000) Localization of the G protein betagamma complex in living cells during chemotaxis. *Science*, **287**, 1034–1036.
- Joh, D., Park, B.J., and Lim, Y.J. (2011) Radiation-induced glioblastoma multiforme in a remitted acute lymphocytic leukemia patient. *J. Korean Neurosurg. Soc.*, **50**, 235–239.
- Johns, D.G., Ao, Z., Naselsky, D., Herold, C.L., Maniscalco, K., Sarov-Blat, L., Steplewski, K., Aiyar, N., and Douglas, S.A. (2004) Urotensin-II-mediated cardiomyocyte hypertrophy: effect of receptor antagonism and role of inflammatory mediators. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **370**, 238–250.
- Joyal, D., Huynh, T., Aiyar, N., Guida, B., Douglas, S., and Giaid, A. (2006) Urotensin-II levels in acute coronary syndromes. *Int. J. Cardiol.*, **108**, 31–35.
- Jung, H.O., Uhm, J.S., Seo, S.M., Kim, J.H., Youn, H.-J., Baek, S.H., Chung, W.S., and Seung, K.B. (2010a) Angiotensin II-induced smooth muscle cell migration is mediated by LDL receptor-related

protein 1 via regulation of matrix metalloproteinase 2 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **402**, 577–582.

Jung, M.J., Murzik, U., Wehder, L., Hemmerich, P., and Melle, C. (2010b) Regulation of cellular actin architecture by S100A10. *Exp. Cell Res.*, **316**, 1234–1240.

## -K-

Kaal, E.C.A. and Vecht, C.J. (2004) The management of brain edema in brain tumors. *Curr. Opin. Oncol.*, **16**, 593–600.

Kalmes, A., Vesti, B.R., Daum, G., Abraham, J.A., and Clowes, A.W. (2000) Heparin blockade of thrombin-induced smooth muscle cell migration involves inhibition of epidermal growth factor (EGF) receptor transactivation by heparin-binding EGF-like growth factor. *Circ. Res.*, **87**, 92–98.

Kamiyama, M., Pozzi, A., Yang, L., DeBusk, L.M., Breyer, R.M., and Lin, P.C. (2006) EP2, a receptor for PGE<sub>2</sub>, regulates tumor angiogenesis through direct effects on endothelial cell motility and survival. *Oncogene*, **25**, 7019–7028.

Kang, H., Ko, J., and Jang, S.-W. (2012) The role of annexin A1 in expression of matrix metalloproteinase-9 and invasion of breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **423**, 188–194.

Kaslow, H.R. and Burns, D.L. (1992) Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **6**, 2684–2690.

Kassam, G., Choi, K.S., Ghuman, J., Kang, H.M., Fitzpatrick, S.L., Zackson, T., Zackson, S., Toba, M., Shinomiya, A., and Waisman, D.M. (1998) The role of annexin II tetramer in the activation of plasminogen. *J. Biol. Chem.*, **273**, 4790–4799.

Katanaev, V.L. (2001) Signal transduction in neutrophil chemotaxis. *Biochem. Biokhimiia*, **66**, 351–368.

Katano, Y., Ishihata, A., Aita, T., Ogaki, T., and Horie, T. (2000) Vasodilator effect of urotensin II, one of the most potent vasoconstricting factors, on rat coronary arteries. *Eur. J. Pharmacol.*, **402**, R5–7.

Kaur, B., Brat, D.J., Calkins, C.C., and Van Meir, E.G. (2003) Brain angiogenesis inhibitor 1 is differentially expressed in normal brain and glioblastoma independently of p53 expression. *Am. J. Pathol.*, **162**, 19–27.

Kaur, B., Cork, S.M., Sandberg, E.M., Devi, N.S., Zhang, Z., Klenotic, P.A., Febbraio, M., Shim, H., Mao, H., Tucker-Burden, C., Silverstein, R.L., Brat, D.J., Olson, J.J., and Meir, E.G.V. (2009) Vasculostatin Inhibits Intracranial Glioma Growth and Negatively Regulates In vivo Angiogenesis through a CD36-Dependent Mechanism. *Cancer Res.*, **69**, 1212–1220.

Kavelaars, A., Vroon, A., Raatgever, R.P., Fong, A.M., Premont, R.T., Patel, D.D., Lefkowitz, R.J., and Heijnen, C.J. (2003) Increased acute inflammation, leukotriene B<sub>4</sub>-induced chemotaxis, and signaling in mice deficient for G protein-coupled receptor kinase 6. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, **171**, 6128–6134.

Kaverina, I., Krylyshkina, O., and Small, J.V. (1999) Microtubule Targeting of Substrate Contacts Promotes Their Relaxation and Dissociation. *J. Cell Biol.*, **146**, 1033–1044.

Kawa, S., Kimura, S., Hakomori, S., and Igarashi, Y. (1997) Inhibition of chemotactic motility and trans-endothelial migration of human neutrophils by sphingosine 1-phosphate. *Febs Lett.*, **420**, 196–200.

Kawata, T., Ishizuka, T., Tomura, H., Hisada, T., Dobashi, K., Tsukagoshi, H., Ishiwara, M., Kurose, H., Mori, M., and Okajima, F. (2005) Sphingosine 1-phosphate inhibits migration and RANTES production in human bronchial smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **331**, 640–647.

- Keller, H. and Eggl, P. (1998) Protrusive activity, cytoplasmic compartmentalization, and restriction rings in locomoting blebbing Walker carcinosarcoma cells are related to detachment of cortical actin from the plasma membrane. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **41**, 181–193.
- Keller, H.U. and Bebie, H. (1996) Protrusive activity quantitatively determines the rate and direction of cell locomotion. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **33**, 241–251.
- Kelly, P., Moeller, B.J., Juneja, J., Booden, M.A., Der, C.J., Daaka, Y., Dewhirst, M.W., Fields, T.A., and Casey, P.J. (2006a) The G12 family of heterotrimeric G proteins promotes breast cancer invasion and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 8173–8178.
- Kelly, P., Stemmler, L.N., Madden, J.F., Fields, T.A., Daaka, Y., and Casey, P.J. (2006b) A role for the G12 family of heterotrimeric G proteins in prostate cancer invasion. *J. Biol. Chem.*, **281**, 26483–26490.
- Kelsall, C.J. and Balment, R.J. (1998) Native urotensins influence cortisol secretion and plasma cortisol concentration in the euryhaline flounder, *platichthys flesus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **112**, 210–219.
- Kemp, W., Krum, H., Colman, J., Bailey, M., Yandle, T., Richards, M., and Roberts, S. (2007) Urotensin II: a novel vasoactive mediator linked to chronic liver disease and portal hypertension. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver*, **27**, 1232–1239.
- Kenig, S., Alonso, M.B.D., Mueller, M.M., and Lah, T.T. (2010) Glioblastoma and endothelial cells cross-talk, mediated by SDF-1, enhances tumour invasion and endothelial proliferation by increasing expression of cathepsins B, S, and MMP-9. *Cancer Lett.*, **289**, 53–61.
- Keymeulen, A.V., Wong, K., Knight, Z.A., Govaerts, C., Hahn, K.M., Shokat, K.M., and Bourne, H.R. (2006) To stabilize neutrophil polarity, PIP3 and Cdc42 augment RhoA activity at the back as well as signals at the front. *J. Cell Biol.*, **174**, 437–445.
- Kielty, C.M., Sherratt, M.J., and Shuttleworth, C.A. (2002) Elastic fibres. *J. Cell Sci.*, **115**, 2817–2828.
- Kijowski, J., Baj-Krzyworzeka, M., Majka, M., Reza, R., Marquez, L.A., Christofidou-Solomidou, M., Janowska-Wieczorek, A., and Ratajczak, M.Z. (2001) The SDF-1-CXCR4 Axis Stimulates VEGF Secretion and Activates Integrins but does not Affect Proliferation and Survival in Lymphohematopoietic Cells. *Stem Cells*, **19**, 453–466.
- Kim, J., Keys, J.R., and Eckhart, A.D. (2006) Vascular smooth muscle migration and proliferation in response to lysophosphatidic acid (LPA) is mediated by LPA receptors coupling to Gq. *Cell. Signal.*, **18**, 1695–1701.
- Kim, J.-W., Jang, S.-M., Kim, C.-H., An, J.-H., Kang, E.-J., and Choi, K.-H. (2011) Tip60 regulates myoblast differentiation by enhancing the transcriptional activity of MyoD via their physical interactions. *Febs J.*, **278**, 4394–4404.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, **273**, 245–248.
- Kinashi, T. (2005) Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.*, **5**, 546–559.
- Kinney, W.A., Almond, Jr., H.R., Qi, J., Smith, C.E., Santulli, R.J., de Garavilla, L., Andrade-Gordon, P., Cho, D.S., Everson, A.M., Feinstein, M.A., Leung, P.A., and Maryanoff, B.E. (2002) Structure–Function Analysis of Urotensin II and Its Use in the Construction of a Ligand–Receptor Working Model. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 2940–2944.
- Kiosses, W.B., Shattil, S.J., Pampori, N., and Schwartz, M.A. (2001) Rac recruits high-affinity integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 to lamellipodia in endothelial cell migration. *Nat. Cell Biol.*, **3**, 316–320.
- Kishi, Y., Okudaira, S., Tanaka, M., Hama, K., Shida, D., Kitayama, J., Yamori, T., Aoki, J., Fujimaki, T., and Arai, H. (2006) Autotaxin is overexpressed in glioblastoma multiforme and contributes to cell motility of glioblastoma by converting lysophosphatidylcholine to lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.*, **281**, 17492–17500.



- Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kobayashi, S., Sugimura, H., Kurata, T., and Matsuda, M. (1998) Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev.*, **12**, 3331–3336.
- Klein, R. (2012) Eph/ephrin signalling during development. *Dev. Camb. Engl.*, **139**, 4105–4109.
- Kleinschnitz, C., Bendszus, M., Frank, M., Solymosi, L., Toyka, K.V., and Stoll, G. (2003) In Vivo Monitoring of Macrophage Infiltration in Experimental Ischemic Brain Lesions by Magnetic Resonance Imaging. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **23**, 1356–1361.
- Klemke, R.L., Cai, S., Giannini, A.L., Gallagher, P.J., de Lanerolle, P., and Cheresch, D.A. (1997) Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J. Cell Biol.*, **137**, 481–492.
- Kolch, W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.*, **351 Pt 2**, 289–305.
- Komatani, H., Sugita, Y., Arakawa, F., Ohshima, K., and Shigemori, M. (2009) Expression of CXCL12 on pseudopalisading cells and proliferating microvessels in glioblastomas: an accelerated growth factor in glioblastomas. *Int. J. Oncol.*, **34**, 665–672.
- Kompa, A.R., Thomas, W.G., See, F., Tzanidis, A., Hannan, R.D., and Krum, H. (2004) Cardiovascular role of urotensin II: effect of chronic infusion in the rat. *Peptides*, **25**, 1783–1788.
- Koochekpour, S., Jeffers, M., Rulong, S., Taylor, G., Klineberg, E., Hudson, E.A., Resau, J.H., and Vande Woude, G.F. (1997) Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res.*, **57**, 5391–5398.
- Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., and Yanagawa, H. (2009) Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 10171–10176.
- Kozasa, T., Jiang, X., Hart, M.J., Sternweis, P.M., Singer, W.D., Gilman, A.G., Bollag, G., and Sternweis, P.C. (1998) p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13. *Science*, **280**, 2109–2111.
- Kraynov, V.S., Chamberlain, C., Bokoch, G.M., Schwartz, M.A., Slabaugh, S., and Hahn, K.M. (2000) Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science*, **290**, 333–337.
- Kristof, A.S., You, Z., Han, Y.-S., and Giaid, A. (2010) Protein expression of urotensin II, urotensin-related peptide and their receptor in the lungs of patients with lymphangioliomyomatosis. *Peptides*, **31**, 1511–1516.
- Krum, H. and Kemp, W. (2007) Therapeutic potential of blockade of the urotensin II system in systemic hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.*, **9**, 53–58.
- Krylyshkina, O., Kaverina, I., Kranewitter, W., Steffen, W., Alonso, M.C., Cross, R.A., and Small, J.V. (2002) Modulation of substrate adhesion dynamics via microtubule targeting requires kinesin-1. *J. Cell Biol.*, **156**, 349–360.
- Kurosaka, S. and Kashina, A. (2008) Cell Biology of Embryonic Migration. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.*, **84**, 102–122.
- Kuszak, A.J., Pitchiaya, S., Anand, J.P., Mosberg, H.I., Walter, N.G., and Sunahara, R.K. (2009) Purification and functional reconstitution of monomeric mu-opioid receptors: allosteric modulation of agonist binding by Gi2. *J. Biol. Chem.*, **284**, 26732–26741.
- Kwiatkowska, A., Kijewska, M., Lipko, M., Hibner, U., and Kaminska, B. (2011) Downregulation of Akt and FAK phosphorylation reduces invasion of glioblastoma cells by impairment of MT1-MMP shuttling to lamellipodia and downregulates MMPs expression. *Biochim. Biophys. Acta*, **1813**, 655–667.

-L-

Labarrère, P., Chatenet, D., Leprince, J., Marionneau, C., Loirand, G., Tonon, M.-C., Dubessy, C., Scalbert, E., Pfeiffer, B., Renard, P., Calas, B., Pacaud, P., and Vaudry, H. (2003) Structure-

- activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **18**, 77–88.
- Lacza, Z. and W Busija, D. (2006) Urotensin-II is a nitric oxide-dependent vasodilator in the pial arteries of the newborn pig. *Life Sci.*, **78**, 2763–2766.
- Lai, F.P.L., Szczodrak, M., Block, J., Faix, J., Breitsprecher, D., Mannherz, H.G., Stradal, T.E.B., Dunn, G.A., Small, J.V., and Rottner, K. (2008) Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia. *Embo J.*, **27**, 982–992.
- Lai, F.P.L., Szczodrak, M., Oelkers, J.M., Ladwein, M., Acconcia, F., Benesch, S., Auinger, S., Faix, J., Small, J.V., Polo, S., and others (2009) Cortactin promotes migration and platelet-derived growth factor-induced actin reorganization by signaling to Rho-GTPases. *Mol. Biol. Cell*, **20**, 3209–3223.
- Lal, S., La Du, J., Tanguay, R.L., and Greenwood, J.A. (2012) Calpain 2 is required for the invasion of glioblastoma cells in the zebrafish brain microenvironment. *J. Neurosci. Res.*, **90**, 769–781.
- Lamszus, K., Ulbricht, U., Matschke, J., Brockmann, M.A., Fillbrandt, R., and Westphal, M. (2003) Levels of Soluble Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor 1 in Astrocytic Tumors and Its Relation to Malignancy, Vascularity, and VEGF-A. *Clin. Cancer Res.*, **9**, 1399–1405.
- Lancien, F., Leprince, J., Mimassi, N., Mabin, D., Vaudry, H., and Le Mével, J.-C. (2004) Central effects of native urotensin II on motor activity, ventilatory movements, and heart rate in the trout *Oncorhynchus mykiss*. *Brain Res.*, **1023**, 167–174.
- Langham, R.G., Kelly, D.J., Gow, R.M., Zhang, Y., Dowling, J.K., Thomson, N.M., and Gilbert, R.E. (2004) Increased expression of urotensin II and urotensin II receptor in human diabetic nephropathy. *Am. J. Kidney Dis.*, **44**, 826–831.
- Lapp, H., Boerrigter, G., Costello-Boerrigter, L.C., Jaekel, K., Scheffold, T., Krakau, I., Schramm, M., Guelker, H., and Stasch, J.-P. (2004) Elevated plasma human urotensin-II-like immunoreactivity in ischemic cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.*, **94**, 93–97.
- Larsson, L.I., Fahrenkrug, J., Muckadell, O.S.D., Sundler, F., Håkanson, R., and Rehfeld, J.R. (1976) Localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) to central and peripheral neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**, 3197.
- Lau, L.T. and Yu, A.C. (2001) Astrocytes produce and release interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma following traumatic and metabolic injury. *J. Neurotrauma*, **18**, 351–359.
- Lauffenburger, D.A. and Horwitz, A.F. (1996) Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. *Cell*, **84**, 359–369.
- Laukaitis, C.M., Webb, D.J., Donais, K., and Horwitz, A.F. (2001) Differential Dynamics of  $\alpha 5$  Integrin, Paxillin, and  $\alpha$ -Actinin during Formation and Disassembly of Adhesions in Migrating Cells. *J. Cell Biol.*, **153**, 1427–1440.
- Lawson, C., Lim, S.-T., Uryu, S., Chen, X.L., Calderwood, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2012) FAK Promotes Recruitment of Talin to Nascent Adhesions to Control Cell Motility. *J. Cell Biol.*, **196**, 223–232.
- Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., and Gordon, S. (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, **39**, 151–170.
- Le, D.M., Besson, A., Fogg, D.K., Choi, K.-S., Waisman, D.M., Goodyer, C.G., Rewcastle, B., and Yong, V.W. (2003) Exploitation of Astrocytes by Glioma Cells to Facilitate Invasiveness: A Mechanism Involving Matrix Metalloproteinase-2 and the Urokinase-Type Plasminogen Activator–Plasmin Cascade. *J. Neurosci.*, **23**, 4034–4043.
- Le Mevel, J.C., Olson, K.R., Conklin, D., Waugh, D., Smith, D.D., Vaudry, H., and Conlon, J.M. (1996) Cardiovascular actions of trout urotensin II in the conscious trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Am. J. Physiol.*, **271**, R1335–1343.

- Le, Y., Honczarenko, M., Glodek, A.M., Ho, D.K., and Silberstein, L.E. (2005) CXC chemokine ligand 12-induced focal adhesion kinase activation and segregation into membrane domains is modulated by regulator of G protein signaling 1 in pro-B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, **174**, 2582–2590.
- Lee, D.K., Lança, A.J., Cheng, R., Nguyen, T., Ji, X.D., Gobeil, F., Jr, Chemtob, S., George, S.R., and O'Dowd, B.F. (2004) Agonist-independent nuclear localization of the Apelin, angiotensin AT1, and bradykinin B2 receptors. *J. Biol. Chem.*, **279**, 7901–7908.
- Lee, H.J., Chun, M., and Kandror, K.V. (2001) Tip60 and HDAC7 interact with the endothelin receptor a and may be involved in downstream signaling. *J. Biol. Chem.*, **276**, 16597–16600.
- Lee-Hoeflich, S.T., Causing, C.G., Podkova, M., Zhao, X., Wrana, J.L., and Attisano, L. (2004) Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *Embo J.*, **23**, 4792–4801.
- Lee, J., Ishihara, A., Oxford, G., Johnson, B., and Jacobson, K. (1999) Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature*, **400**, 382–386.
- Lee, S.-H., Kunz, J., Lin, S.-H., and Yu-Lee, L. (2007) 16-kDa Prolactin Inhibits Endothelial Cell Migration by Down-Regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 Signaling Pathway. *Cancer Res.*, **67**, 11045–11053.
- Lee, W.J., Colt, J.S., Heineman, E.F., McComb, R., Weisenburger, D.D., Lijinsky, W., and Ward, M.H. (2005) Agricultural pesticide use and risk of glioma in Nebraska, United States. *Occup. Environ. Med.*, **62**, 786–792.
- Leenders, W.P.J., Küsters, B., and de Waal, R.M.W. (2002) Vessel co-option: how tumors obtain blood supply in the absence of sprouting angiogenesis. *Endothel. J. Endothel. Cell Res.*, **9**, 83–87.
- Legate, K.R., Wickström, S.A., and Fässler, R. (2009) Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev.*, **23**, 397–418.
- Lehmann, F., Currier, E.A., Clemons, B., Hansen, L.K., Olsson, R., Hacksell, U., and Luthman, K. (2009) Novel and potent small-molecule urotensin II receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 4657–4665.
- Lehmann, F., Currier, E.A., Olsson, R., Hacksell, U., and Luthman, K. (2005) Isochromanone-based urotensin-II receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 3057–3068.
- Lehmann, F., Currier, E.A., Olsson, R., Ma, J.-N., Burstein, E.S., Hacksell, U., and Luthman, K. (2010) Optimization of isochromanone based urotensin II receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 4844–4854.
- Lehmann, F., Lake, L., Currier, E.A., Olsson, R., Hacksell, U., and Luthman, K. (2007) Design, parallel synthesis and SAR of novel urotensin II receptor agonists. *Eur. J. Med. Chem.*, **42**, 276–285.
- Lehmann, F., Pettersen, A., Currier, E.A., Sherbukhin, V., Olsson, R., Hacksell, U., and Luthman, K. (2006) Novel potent and efficacious nonpeptidic urotensin II receptor agonists. *J. Med. Chem.*, **49**, 2232–2240.
- Lehner, U., Velić, A., Schroter, R., Schlatter, E., and Sindić, A. (2007) Ligands and signaling of the G-protein-coupled receptor GPR14, expressed in human kidney cells. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **20**, 181–192.
- Leonard, A.D., Thompson, J.P., Hutchinson, E.L., Young, S.P., McDonald, J., Swanevelder, J., and Lambert, D.G. (2009) Urotensin II receptor expression in human right atrium and aorta: effects of ischaemic heart disease. *Br. J. Anaesth.*, **102**, 477–484.
- Lescot, E., Sopkova-de Oliveira Santos, J., Colloc'h, N., Rodrigo, J., Milazzo-Segalas, I., Bureau, R., and Rault, S. (2008) Three-dimensional model of the human urotensin-II receptor: docking of human urotensin-II and nonpeptide antagonists in the binding site and comparison with an antagonist pharmacophore model. *Proteins*, **73**, 173–184.

- Lescot, E., Sopkova-de Oliveira Santos, J., Dubessy, C., Oulyadi, H., Lesnard, A., Vaudry, H., Bureau, R., and Rault, S. (2007) Definition of new pharmacophores for nonpeptide antagonists of human urotensin-II. Comparison with the 3D-structure of human urotensin-II and URP. *J. Chem. Inf. Model.*, **47**, 602–612.
- Letunic, I. and Bork, P. (2007) Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinforma. Oxf. Engl.*, **23**, 127–128.
- Letunic, I. and Bork, P. (2011) Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res.*, **39**, W475–478.
- Levicar, N., Strojnik, T., Kos, J., Dewey, R.A., Pilkington, G.J., and Lah, T.T. (2002) Lysosomal enzymes, cathepsins in brain tumour invasion. *J. Neurooncol.*, **58**, 21–32.
- Li, A., Dubey, S., Varney, M.L., Dave, B.J., and Singh, R.K. (2003a) IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, **170**, 3369–3376.
- Li, M., Bermak, J.C., Wang, Z.W., and Zhou, Q.Y. (2000) Modulation of Dopamine D2 Receptor Signaling by Actin-Binding Protein (ABP-280). *Mol. Pharmacol.*, **57**, 446–452.
- Li, M., Li, C., Weingarten, P., Bunzow, J.R., Grandy, D.K., and Zhou, Q.Y. (2002) Association of dopamine D(3) receptors with actin-binding protein 280 (ABP-280). *Biochem. Pharmacol.*, **63**, 859–863.
- Li, Z., Hannigan, M., Mo, Z., Liu, B., Lu, W., Wu, Y., Smrcka, A.V., Wu, G., Li, L., Liu, M., Huang, C.-K., and Wu, D. (2003b) Directional Sensing Requires G $\beta$  $\gamma$ -Mediated PAK1 and PIX $\alpha$ -Dependent Activation of Cdc42. *Cell*, **114**, 215–227.
- Liang, F., Lee, S.-Y., Liang, J., Lawrence, D.S., and Zhang, Z.-Y. (2005) The role of protein-tyrosine phosphatase 1B in integrin signaling. *J. Biol. Chem.*, **280**, 24857–24863.
- Liao, H., Hyman, M.C., Lawrence, D.A., and Pinsky, D.J. (2007) Molecular regulation of the PAI-1 gene by hypoxia: contributions of Egr-1, HIF-1 $\alpha$ , and C/EBP $\alpha$ . *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **21**, 935–949.
- Lidke, D.S., Lidke, K.A., Rieger, B., Jovin, T.M., and Arndt-Jovin, D.J. (2005) Reaching out for signals filopodia sense EGF and respond by directed retrograde transport of activated receptors. *J. Cell Biol.*, **170**, 619–626.
- Liliental, J., Moon, S.Y., Lesche, R., Mamillapalli, R., Li, D., Zheng, Y., Sun, H., and Wu, H. (2000) Genetic deletion of the Pten tumor suppressor gene promotes cell motility by activation of Rac1 and Cdc42 GTPases. *Curr. Biol. Cb*, **10**, 401–404.
- Lim, L.H.K. and Pervaiz, S. (2007) Annexin 1: the new face of an old molecule. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **21**, 968–975.
- Lin, M.-L., Lu, Y.-C., Chen, H.-Y., Lee, C.-C., Chung, J.-G., and Chen, S.-S. (2012a) Suppressing the formation of lipid raft-associated Rac1/PI3K/Akt signaling complexes by Curcumin inhibits SDF-1 $\alpha$ -induced invasion of human esophageal carcinoma cells. *Mol. Carcinog.*,
- Lin, R., Karpa, K., Kabbani, N., Goldman-Rakic, P., and Levenson, R. (2001) Dopamine D2 and D3 receptors are linked to the actin cytoskeleton via interaction with filamin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 5258–5263.
- Lin, S.-Y., Li, T.Y., Liu, Q., Zhang, C., Li, X., Chen, Y., Zhang, S.-M., Lian, G., Liu, Q., Ruan, K., Wang, Z., Zhang, C.-S., Chien, K.-Y., Wu, J., Li, Q., Han, J., and Lin, S.-C. (2012b) GSK3-TIP60-ULK1 signaling pathway links growth factor deprivation to autophagy. *Science*, **336**, 477–481.
- Lin, Y., Tsuchihashi, T., Matsumura, K., Abe, I., and Iida, M. (2003a) Central cardiovascular action of urotensin II in conscious rats. *J. Hypertens.*, **21**, 159–165.
- Lin, Y., Tsuchihashi, T., Matsumura, K., Fukuhara, M., Ohya, Y., Fujii, K., and Iida, M. (2003b) Central cardiovascular action of urotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.*, **26**, 839–845.

- Linder, S. (2007) The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol.*, **17**, 107–117.
- Linder, S., Nelson, D., Weiss, M., and Aepfelbacher, M. (1999) Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 9648–9653.
- Little, M.P., Rajaraman, P., Curtis, R.E., Devesa, S.S., Inskip, P.D., Check, D.P., and Linet, M.S. (2012) Mobile phone use and glioma risk: comparison of epidemiological study results with incidence trends in the United States. *BMJ*, **344**, e1147.
- Liu, D., Chen, J., Wang, J., Zhang, Z., Ma, X., Jia, J., and Wang, Y. (2010a) Increased expression of urotensin II and GPR14 in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Int. J. Mol. Med.*, **25**, 845–851.
- Liu, J.-C., Chen, C.-H., Chen, J.-J., and Cheng, T.-H. (2009) Urotensin II induces rat cardiomyocyte hypertrophy via the transient oxidization of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase and transactivation of epidermal growth factor receptor. *Mol. Pharmacol.*, **76**, 1186–1195.
- Liu, Q., Li, G., Li, R., Shen, J., He, Q., Deng, L., Zhang, C., and Zhang, J. (2010b) IL-6 promotion of glioblastoma cell invasion and angiogenesis in U251 and T98G cell lines. *J. Neurooncol.*, **100**, 165–176.
- Liu, Q., Pong, S.S., Zeng, Z., Zhang, Q., Howard, A.D., Williams, D.L., Jr, Davidoff, M., Wang, R., Austin, C.P., McDonald, T.P., Bai, C., George, S.R., Evans, J.F., and Caskey, C.T. (1999) Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **266**, 174–178.
- Liu, S., Li, Q., Na, Q., and Liu, C. (2012) Endothelin-1 stimulates human trophoblast cell migration through Cdc42 activation. *Placenta*, **33**, 712–716.
- Liwnicz, B.H., Wu, S.Z., and Tew, J.M., Jr (1987) The relationship between the capillary structure and hemorrhage in gliomas. *J. Neurosurg.*, **66**, 536–541.
- Lizárraga, F., Poincloux, R., Romao, M., Montagnac, G., Le Dez, G., Bonne, I., Rigaille, G., Raposo, G., and Chavrier, P. (2009) Diaphanous-related formins are required for invadopodia formation and invasion of breast tumor cells. *Cancer Res.*, **69**, 2792–2800.
- Llić, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., Yamamoto, T., and Aizawa, S. (1995) Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Publ. Online 12 Oct. 1995 Doi101038377539a0*, **377**, 539–544.
- Lo, S.H., Janmey, P.A., Hartwig, J.H., and Chen, L.B. (1994) Interactions of tensin with actin and identification of its three distinct actin-binding domains. *J. Cell Biol.*, **125**, 1067–1075.
- Lokensgard, J.R., Hu, S., Sheng, W., vanOijen, M., Cox, D., Cheeran, M.C., and Peterson, P.K. (2001) Robust expression of TNF-alpha, IL-1beta, RANTES, and IP-10 by human microglial cells during nonproductive infection with herpes simplex virus. *J. Neurovirol.*, **7**, 208–219.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007) The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **114**, 97–109.
- Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D., and Schlessinger, J. (1992) The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*, **70**, 431–442.
- Loy, C.J., Sim, K.S., and Yong, E.L. (2003) Filamin-A fragment localizes to the nucleus to regulate androgen receptor and coactivator functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 4562–4567.
- Lu, D.-Y., Leung, Y.-M., Huang, S.-M., and Wong, K.-L. (2010) Bradykinin-induced cell migration and COX-2 production mediated by the bradykinin B1 receptor in glioma cells. *J. Cell. Biochem.*, **110**, 141–150.

- Lu, J., Moochhala, S., Kaur, C., and Ling, E.A. (2001a) Cellular inflammatory response associated with breakdown of the blood-brain barrier after closed head injury in rats. *J. Neurotrauma*, **18**, 399–408.
- Lu, Y., Zou, C.-J., Huang, D.-W., and Tang, C.-S. (2002) Cardiovascular effects of urotensin II in different brain areas. *Peptides*, **23**, 1631–1635.
- Lu, Z., Jiang, G., Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001b) Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 4016–4031.
- Lundberg, J.M. and Tatemoto, K. (1982) Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to alpha-adrenoceptor blockade. *Acta Physiol. Scand.*, **116**, 393–402.
- Luster, A.D., Alon, R., and von Andrian, U.H. (2005) Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat. Immunol.*, **6**, 1182–1190.
- Luttrell, L.M., Della Rocca, G.J., van Biesen, T., Luttrell, D.K., and Lefkowitz, R.J. (1997) Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J. Biol. Chem.*, **272**, 4637–4644.
- Luxenburg, C., Geblinger, D., Klein, E., Anderson, K., Hanein, D., Geiger, B., and Addadi, L. (2007) The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. *Plos One*, **2**, e179.
- Lynch, C.D., Lazar, A.M., Iskratsch, T., Zhang, X., and Sheetz, M.P. (2012) Endoplasmic spreading requires coalescence of vimentin intermediate filaments at force-bearing adhesions. *Mol. Biol. Cell*, **24**, 21–30.

## -M-

- MacLean, M.R., Alexander, D., Stirrat, A., Gallagher, M., Douglas, S.A., Ohlstein, E.H., Morecroft, I., and Pollard, K. (2000) Contractile responses to human urotensin-II in rat and human pulmonary arteries: effect of endothelial factors and chronic hypoxia in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 201–204.
- MacLeod, T.J., Kwon, M., Filipenko, N.R., and Waisman, D.M. (2003) Phospholipid-associated annexin A2-S100A10 heterotetramer and its subunits: characterization of the interaction with tissue plasminogen activator, plasminogen, and plasmin. *J. Biol. Chem.*, **278**, 25577–25584.
- Madden, J.R., Addo-Yobo, S.O., Donson, A.M., Liu, A.K., McNatt, S.A., Kleinschmidt-Demasters, B.K., Fenton, L.Z., Foreman, N.K., and Smith, A.A. (2010) Radiation-induced glioblastoma multiforme in children treated for medulloblastoma with characteristics of both medulloblastoma and glioblastoma multiforme. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, **32**, e272–278.
- Madureira, P.A., O’Connell, P.A., Surette, A.P., Miller, V.A., and Waisman, D.M. (2012) The biochemistry and regulation of S100A10: a multifunctional plasminogen receptor involved in oncogenesis. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2012**, 353687.
- Maestro, R.D., Shivers, R., McDonald, W., and Maestro, A.D. (2001) Dynamics of C6 astrocytoma invasion into three-dimensional collagen gels. *J. Neurooncol.*, **53**, 87–98.
- Magnavita, N., Placentino, R.A., Mei, D., Ferraro, D., and Di Trapani, G. (2003) Occupational head injury and subsequent glioma. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.*, **24**, 31–33.
- Maguire, J.J., Kuc, R.E., and Davenport, A.P. (2000) Orphan-receptor ligand human urotensin II: receptor localization in human tissues and comparison of vasoconstrictor responses with endothelin-1. *Br. J. Pharmacol.*, **131**, 441–446.

- Maguire, J.J., Kuc, R.E., Klein, M.J., and Davenport, A.P. (2008) Immunocytochemical localization of the urotensin-II receptor, UT, to rat and human tissues: relevance to function. *Peptides*, **29**, 735–742.
- Maguire, J.J., Kuc, R.E., Wiley, K.E., Klein, M.J., and Davenport, A.P. (2004) Cellular distribution of immunoreactive urotensin-II in human tissues with evidence of increased expression in atherosclerosis and a greater constrictor response of small compared to large coronary arteries. *Peptides*, **25**, 1767–1774.
- Maher, E.A., Brennan, C., Wen, P.Y., Durso, L., Ligon, K.L., Richardson, A., Khatry, D., Feng, B., Sinha, R., Louis, D.N., Quackenbush, J., Black, P.M., Chin, L., and DePinho, R.A. (2006) Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities. *Cancer Res.*, **66**, 11502–11513.
- Mallamaci, F., Cutrupi, S., Pizzini, P., Tripepi, G., and Zoccali, C. (2005) Urotensin II in end-stage renal disease: an inverse correlate of sympathetic function and cardiac natriuretic peptides. *J. Nephrol.*, **18**, 727–732.
- Mañes, S., Lacalle, R.A., Gómez-Moutón, C., Real, G. del, Mira, E., and Martínez-A, C. (2001) Membrane raft microdomains in chemokine receptor function. *Semin. Immunol.*, **13**, 147–157.
- Mañes, S., Mira, E., Gómez-Moutón, C., Ana Lacalle, R., Keller, P., Pablo Labrador, J., and Martínez-A, C. (1999) Membrane raft microdomains mediate front–rear polarity in migrating cells. *Embo J.*, **18**, 6211–6220.
- Manetti, F. (2012) LIM kinases are attractive targets with many macromolecular partners and only a few small molecule regulators. *Med. Res. Rev.*, **32**, 968–998.
- Mansour, A.A., Gafni, O., Weinberger, L., Zviran, A., Ayyash, M., Rais, Y., Krupalnik, V., Zerbib, M., Amann-Zalcenstein, D., Maza, I., Geula, S., Viukov, S., Holtzman, L., Pribluda, A., Canaani, E., Horn-Saban, S., Amit, I., Novershtern, N., and Hanna, J.H. (2012) The H3K27 demethylase Utx regulates somatic and germ cell epigenetic reprogramming. *Nature*, **488**, 409–413.
- Marchese, A., Heiber, M., Nguyen, T., Heng, H.H., Saldivia, V.R., Cheng, R., Murphy, P.M., Tsui, L.C., Shi, X., and Gregor, P. (1995) Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. *Genomics*, **29**, 335–344.
- Marco, J., Egido, E.M., Hernández, R., and Silvestre, R.A. (2008) Evidence for endogenous urotensin-II as an inhibitor of insulin secretion. Study in the perfused rat pancreas. *Peptides*, **29**, 852–858.
- Maret, D., Gruzglin, E., Sadr, M.S., Siu, V., Shan, W., Koch, A.W., Seidah, N.G., Del Maestro, R.F., and Colman, D.R. (2010) Surface Expression of Precursor N-cadherin Promotes Tumor Cell Invasion. *Neoplasia New York N*, **12**, 1066–1080.
- Margadant, C., Monsuur, H.N., Norman, J.C., and Sonnenberg, A. (2011) Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **23**, 607–614.
- Marion, S., Oakley, R.H., Kim, K.-M., Caron, M.G., and Barak, L.S. (2006) A beta-arrestin binding determinant common to the second intracellular loops of rhodopsin family G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.*, **281**, 2932–2938.
- Markovic, D.S., Glass, R., Synowitz, M., Rooijen, N. van, and Kettenmann, H. (2005) Microglia stimulate the invasiveness of glioma cells by increasing the activity of metalloprotease-2. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **64**, 754–762.
- Markovic, D.S., Vinnakota, K., Chirasani, S., Synowitz, M., Raguette, H., Stock, K., Sliwa, M., Lehmann, S., Kälin, R., van Rooijen, N., Holmbeck, K., Heppner, F.L., Kiwit, J., Matyash, V., Lehnardt, S., Kaminska, B., Glass, R., and Kettenmann, H. (2009) Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 12530–12535.
- Matsumoto, Y., Abe, M., Watanabe, T., Adachi, Y., Yano, T., Takahashi, H., Sugo, T., Mori, M., Kitada, C., Kurokawa, T., and Fujino, M. (2004) Intracerebroventricular administration of urotensin II promotes anxiogenic-like behaviors in rodents. *Neurosci. Lett.*, **358**, 99–102.

- Matsuno, A., Katayama, H., Murakami, M., and Nagashima, T. (2004) In vivo growth suppression of rat C6 glioma transplanted in rat brain using antisense oligonucleotide for microtubule-associated protein 1A messenger ribonucleic acid. *Br. J. Neurosurg.*, **18**, 343–346.
- Matsusaka, S. and Wakabayashi, I. (2006) Enhancement of vascular smooth muscle cell migration by urotensin II. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **373**, 381–386.
- Matsushita, M., Shichiri, M., Fukai, N., Ozawa, N., Yoshimoto, T., Takasu, N., and Hirata, Y. (2003) Urotensin II is an autocrine/paracrine growth factor for the porcine renal epithelial cell line, LLCPK1. *Endocrinology*, **144**, 1825–1831.
- Matsushita, M., Shichiri, M., Imai, T., Iwashina, M., Tanaka, H., Takasu, N., and Hirata, Y. (2001) Co-expression of urotensin II and its receptor (GPR14) in human cardiovascular and renal tissues. *J. Hypertens.*, **19**, 2185–2190.
- McCormick, F. (1993) Signal transduction. How receptors turn Ras on. *Nature*, **363**, 15–16.
- McFadden, R.G. and Vickers, K.E. (1989) Bradykinin augments the in vitro migration of nonsensitized lymphocytes. *Clin. Investig. Med. Médecine Clin. Exp.*, **12**, 247–253.
- McKinley, B.P., Michalek, A.M., Fenstermaker, R.A., and Plunkett, R.J. (2000) The impact of age and sex on the incidence of glial tumors in New York state from 1976 to 1995. *J. Neurosurg.*, **93**, 932–939.
- McMaster, D., Belenky, M.A., Polenov, A.L., and Lederis, K. (1992) Isolation and amino acid sequence of urotensin II from the sturgeon *Acipenser ruthenus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **87**, 275–285.
- McMaster, D. and Lederis, K. (1983) Isolation and amino acid sequence of two urotensin II peptides from *Catostomus commersoni* urophyses. *Peptides*, **4**, 367–373.
- Medeiros, P.J., Al-Khazraji, B.K., Novielli, N.M., Postovit, L.M., Chambers, A.F., and Jackson, D.N. (2012) Neuropeptide Y stimulates proliferation and migration in the 4T1 breast cancer cell line. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer*, **131**, 276–286.
- Meili, R., Ellsworth, C., Lee, S., Reddy, T.B., Ma, H., and Firtel, R.A. (1999) Chemoattractant-mediated transient activation and membrane localization of Akt/PKB is required for efficient chemotaxis to cAMP in *Dictyostelium*. *Embo J.*, **18**, 2092–2105.
- Meili, R. and Firtel, R.A. (2003) Two Poles and a Compass. *Cell*, **114**, 153–156.
- Meisenhelder, J., Suh, P.G., Rhee, S.G., and Hunter, T. (1989) Phospholipase C-gamma is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein-tyrosine kinases in vivo and in vitro. *Cell*, **57**, 1109–1122.
- Mentlein, R. and Held-Feindt, J. (2002) Pleiotrophin, an angiogenic and mitogenic growth factor, is expressed in human gliomas. *J. Neurochem.*, **83**, 747–753.
- Metchnikoff, E.M. (1905) *Immunity in Infective Diseases*. University Press.
- Midwood, K.S., Williams, L.V., and Schwarzbauer, J.E. (2004) Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**, 1031–1037.
- Mifune, M., Ohtsu, H., Suzuki, H., Nakashima, H., Brailoiu, E., Dun, N.J., Frank, G.D., Inagami, T., Higashiyama, S., Thomas, W.G., Eckhart, A.D., Dempsey, P.J., and Eguchi, S. (2005) G protein coupling and second messenger generation are indispensable for metalloprotease-dependent, heparin-binding epidermal growth factor shedding through angiotensin II type-1 receptor. *J. Biol. Chem.*, **280**, 26592–26599.
- Miki, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (1998) WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *Embo J.*, **17**, 6932–6941.
- Minagar, A. and Alexander, J.S. (2003) Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.*, **9**, 540–549.
- Minsaas, L., Planagumà, J., Madziva, M., Krakstad, B.F., Masià-Balagué, M., Katz, A.A., and Aragay, A.M. (2010) Filamin A Binds to CCR2B and Regulates Its Internalization. *Plos One*, **5**, e12212.



- Mitra, S.K., Hanson, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2005) Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 56–68.
- Miyake, N., Mizuno, S., Okamoto, N., Ohashi, H., Shiina, M., Ogata, K., Tsurusaki, Y., Nakashima, M., Saitsu, H., Niikawa, N., and Matsumoto, N. (2013) KDM6A point mutations cause Kabuki syndrome. *Hum. Mutat.*, **34**, 108–110.
- Mizuno, N., Kokubu, H., Sato, M., Nishimura, A., Yamauchi, J., Kurose, H., and Itoh, H. (2005) G protein-coupled receptor signaling through Gq and JNK negatively regulates neural progenitor cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 12365–12370.
- Monkley, S.J., Zhou, X.H., Kinston, S.J., Giblett, S.M., Hemmings, L., Priddle, H., Brown, J.E., Pritchard, C.A., Critchley, D.R., and Fässler, R. (2000) Disruption of the talin gene arrests mouse development at the gastrulation stage. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.*, **219**, 560–574.
- Monsky, W.L., Lin, C.-Y., Aoyama, A., Kelly, T., Akiyama, S.K., Mueller, S.C., and Chen, W.-T. (1994) A Potential Marker Protease of Invasiveness, Separase, Is Localized on Invadopodia of Human Malignant Melanoma Cells. *Cancer Res.*, **54**, 5702–5710.
- Montana, V. and Sontheimer, H. (2011) Bradykinin promotes the chemotactic invasion of primary brain tumors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, **31**, 4858–4867.
- Monterrubio, M., Mellado, M., Carrera, A.C., and Rodríguez-Frade, J.M. (2009) PI3K $\gamma$  activation by CXCL12 regulates tumor cell adhesion and invasion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **388**, 199–204.
- Moreau, V., Tatin, F., Varon, C., and Génot, E. (2003) Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 6809–6822.
- Morgan, M.R., Humphries, M.J., and Bass, M.D. (2007) Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 957–969.
- Mori, M., Sugo, T., Abe, M., Shimomura, Y., Kurihara, M., Kitada, C., Kikuchi, K., Shintani, Y., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., and Fujino, M. (1999) Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **265**, 123–129.
- Mori, N., Hirose, T., Nakayama, T., Ito, O., Kanazawa, M., Imai, Y., Kohzuki, M., Takahashi, K., and Totsune, K. (2009) Increased expression of urotensin II-related peptide and its receptor in kidney with hypertension or renal failure. *Peptides*, **30**, 400–408.
- Morimoto, R., Satoh, F., Murakami, O., Totsune, K., Arai, Y., Suzuki, T., Sasano, H., Ito, S., and Takahashi, K. (2008) Immunolocalization of urotensin II and its receptor in human adrenal tumors and attached non-neoplastic adrenal tissues. *Peptides*, **29**, 873–880.
- Mosch, B., Reissenweber, B., Neuber, C., and Pietzsch, J. (2010) Eph Receptors and Ephrin Ligands: Important Players in Angiogenesis and Tumor Angiogenesis. *J. Oncol.*, **2010**, 1–12.
- Mugabe, B.E., Yaghini, F.A., Song, C.Y., Buharalioglu, C.K., Waters, C.M., and Malik, K.U. (2010) Angiotensin II-induced migration of vascular smooth muscle cells is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase-activated c-Src through spleen tyrosine kinase and epidermal growth factor receptor transactivation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **332**, 116–124.
- Muriel, O., Echarri, A., Hellriegel, C., Pavón, D.M., Beccari, L., and Del Pozo, M.A. (2011) Phosphorylated filamin A regulates actin-linked caveolae dynamics. *J. Cell Sci.*, **124**, 2763–2776.
- Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hébert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., and Power, C.A. (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.*, **52**, 145–176.

## -N-

- Naga Prasad, S.V., Barak, L.S., Rapacciuolo, A., Caron, M.G., and Rockman, H.A. (2001) Agonist-dependent recruitment of phosphoinositide 3-kinase to the membrane by beta-adrenergic receptor kinase 1. A role in receptor sequestration. *J. Biol. Chem.*, **276**, 18953–18959.
- Naga Prasad, S.V., Jayatilleke, A., Madamanchi, A., and Rockman, H.A. (2005) Protein kinase activity of phosphoinositide 3-kinase regulates beta-adrenergic receptor endocytosis. *Nat. Cell Biol.*, **7**, 785–796.
- Nagano, M., Hoshino, D., Koshikawa, N., Akizawa, T., and Seiki, M. (2012) Turnover of Focal Adhesions and Cancer Cell Migration. *Int. J. Cell Biol.*, **2012**, 1–10.
- Nagano, N., Sasaki, H., Aoyagi, M., and Hirakawa, K. (1993) Invasion of experimental rat brain tumor: early morphological changes following microinjection of C6 glioma cells. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **86**, 117–125.
- Najib, S., Saint-Laurent, N., Esteve, J.-P., Schulz, S., Boutet-Robinet, E., Fourmy, D., Lattig, J., Mollereau, C., Pyronnet, S., Susini, C., and Bousquet, C. (2012) A Switch of G Protein-Coupled Receptor Binding Preference from Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)-p85 to Filamin A Negatively Controls the PI3K Pathway. *Mol. Cell Biol.*, **32**, 1004–1016.
- Nakada, M., Nakada, S., Demuth, T., Tran, N.L., Hoelzinger, D.B., and Berens, M.E. (2007) Molecular targets of glioma invasion. *Cell. Mol. Life Sci. Cmls*, **64**, 458–478.
- Nakamura, F., Stossel, T.P., and Hartwig, J.H. (2011) The filamins: organizers of cell structure and function. *Cell Adhes. Migr.*, **5**, 160–169.
- Nakayama, T., Hirose, T., Totsune, K., Mori, N., Maruyama, Y., Maejima, T., Minagawa, K., Morimoto, R., Asayama, K., Kikuya, M., Ohkubo, T., Hashimoto, J., Kohzuki, M., Takahashi, K., and Imai, Y. (2008) Increased gene expression of urotensin II-related peptide in the hearts of rats with congestive heart failure. *Peptides*, **29**, 801–808.
- Nayal, A., Webb, D.J., Brown, C.M., Schaefer, E.M., Vicente-Manzanares, M., and Horwitz, A.R. (2006) Paxillin phosphorylation at Ser273 localizes a GIT1-PIX-PAK complex and regulates adhesion and protrusion dynamics. *J. Cell Biol.*, **173**, 587–589.
- Neer, E.J. and Clapham, D.E. (1988) Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature*, **333**, 129–134.
- Neufeld, G., Sabag, A.D., Rabinovicz, N., and Kessler, O. (2012) Semaphorins in Angiogenesis and Tumor Progression. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **2**.
- Neves, S.R., Ram, P.T., and Iyengar, R. (2002) G Protein Pathways. *Science*, **296**, 1636–1639.
- Ng, L.L., Loke, I., O'Brien, R.J., Squire, I.B., and Davies, J.E. (2002) Plasma urotensin in human systolic heart failure. *Circulation*, **106**, 2877–2880.
- Nguyen, T.-T.M., Létourneau, M., Chatenet, D., and Fournier, A. (2012) Presence of urotensin-II receptors at the cell nucleus: Specific tissue distribution and hypoxia-induced modulation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **44**, 639–647.
- Nieto, M., Frade, J.M.R., Sancho, D., Mellado, M., Martinez-A, C., and Sánchez-Madrid, F. (1997) Polarization of Chemokine Receptors to the Leading Edge during Lymphocyte Chemotaxis. *J. Exp. Med.*, **186**, 153–158.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, **308**, 1314–1318.
- Nishikawa, K., Ayukawa, K., Hara, Y., Wada, K., and Aoki, S. (2011) Endothelin/endothelin-B receptor signals regulate ventricle-directed interkinetic nuclear migration of cerebral cortical neural progenitors. *Neurochem. Int.*, **58**, 261–272.
- Nissou, M.-F., El Atifi, M., Guttin, A., Godfraind, C., Salon, C., Garcion, E., van der Sanden, B., Issartel, J.-P., Berger, F., and Wion, D. (2013) Hypoxia-induced expression of VE-cadherin and filamin B in glioma cell cultures and pseudopalisade structures. *J. Neurooncol.*,

- Niu, G. (2011) Why Integrin as a Primary Target for Imaging and Therapy. *Theranostics*, 30.
- Nobata, S., Donald, J.A., Balment, R.J., and Takei, Y. (2011) Potent cardiovascular effects of homologous urotensin II (UII)-related peptide and UII in unanesthetized eels after peripheral and central injections. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **300**, R437–446.
- Nobes, C.D. and Hall, A. (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, **81**, 53–62.
- Noiges, R., Eichinger, R., Kutschera, W., Fischer, I., Nemeth, Z., Wiche, G., and Propst, F. (2002) Microtubule-associated protein 1A (MAP1A) and MAP1B: light chains determine distinct functional properties. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, **22**, 2106–2114.
- Nomura, S., Yoshitomi, H., Takano, S., Shida, T., Kobayashi, S., Ohtsuka, M., Kimura, F., Shimizu, H., Yoshidome, H., Kato, A., and Miyazaki, M. (2008) FGF10/FGFR2 signal induces cell migration and invasion in pancreatic cancer. *Br. J. Cancer*, **99**, 305–313.
- Norden, A.D., Young, G.S., Setayesh, K., Muzikansky, A., Klufas, R., Ross, G.L., Ciampa, A.S., Ebbeling, L.G., Levy, B., Drappatz, J., Kesari, S., and Wen, P.Y. (2008) Bevacizumab for recurrent malignant gliomas: efficacy, toxicity, and patterns of recurrence. *Neurology*, **70**, 779–787.
- Nothacker, H.P., Wang, Z., McNeill, A.M., Saito, Y., Merten, S., O’Dowd, B., Duckles, S.P., and Civelli, O. (1999a) Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction. *Nat. Cell Biol.*, **1**, 383–385.
- Nothacker, H.P., Wang, Z., McNeill, A.M., Saito, Y., Merten, S., O’Dowd, B., Duckles, S.P., and Civelli, O. (1999b) Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction. *Nat. Cell Biol.*, **1**, 383–385.
- O-**
- O’Connell, M.P., Fiori, J.L., Baugher, K.M., Indig, F.E., French, A.D., Camilli, T.C., Frank, B.P., Earley, R., Hoek, K.S., Hasskamp, J.H., Elias, E.G., Taub, D.D., Bernier, M., and Weeraratna, A.T. (2009) Wnt5A activates the calpain-mediated cleavage of filamin A. *J. Invest. Dermatol.*, **129**, 1782–1789.
- Oh, P. and Schnitzer, J.E. (2001) Segregation of Heterotrimeric G Proteins in Cell Surface Microdomains Gq Binds Caveolin to Concentrate in Caveolae, whereas Gi and Gs Target Lipid Rafts by Default. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 685–698.
- Ohta, Y., Suzuki, N., Nakamura, S., Hartwig, J.H., and Stossel, T.P. (1999) The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 2122–2128.
- Okada, M., Saio, M., Kito, Y., Ohe, N., Yano, H., Yoshimura, S., Iwama, T., and Takami, T. (2009) Tumor-associated macrophage/microglia infiltration in human gliomas is correlated with MCP-3, but not MCP-1. *Int. J. Oncol.*, **34**, 1621–1627.
- Okamoto, H., Yatomi, Y., Ohmori, T., Satoh, K., Matsumoto, Y., and Ozaki, Y. (2000) Sphingosine 1-Phosphate Stimulates Gi- and Rho-Mediated Vascular Endothelial Cell Spreading and Migration. *Thromb. Res.*, **99**, 259–265.
- Okamoto, I., Kawano, Y., Tsuiki, H., Sasaki, J., Nakao, M., Matsumoto, M., Suga, M., Ando, M., Nakajima, M., and Saya, H. (1999) CD44 cleavage induced by a membrane-associated metalloprotease plays a critical role in tumor cell migration. *Oncogene*, **18**, 1435–1446.
- Okumus, S., Igci, Y.Z., Taskin, T., Oztuzcu, S., Gurler, B., Eslik, Z., Gogebakan, B., Coskun, E., Erbagci, I., Demiryurek, S., Cengiz, B., and Demiryurek, A.T. (2012) Association between Thr21Met and Ser89Asn polymorphisms of the urotensin-II (UTS2) gene, diabetes mellitus, and diabetic retinopathy. *Curr. Eye Res.*, **37**, 921–929.

- Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006) Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell*, **127**, 635–648.
- Olsen, J.V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M.L., Jensen, L.J., Gnad, F., Cox, J., Jensen, T.S., Nigg, E.A., Brunak, S., and Mann, M. (2010) Quantitative Phosphoproteomics Reveals Widespread Full Phosphorylation Site Occupancy During Mitosis. *Sci. Signal.*, **3**, ra3.
- Onan, D., Pipolo, L., Yang, E., Hannan, R.D., and Thomas, W.G. (2004) Urotensin II Promotes Hypertrophy of Cardiac Myocytes via Mitogen-Activated Protein Kinases. *Mol. Endocrinol.*, **18**, 2344–2354.
- Onat, A.M., Pehlivan, Y., Turkbeyler, I.H., Demir, T., Kaplan, D.S., Ceribasi, A.O., Orkmez, M., Tutar, E., Taysi, S., Sayarlioglu, M., and Kisacik, B. (2012a) Urotensin Inhibition with Palosuran Could Be a Promising Alternative in Pulmonary Arterial Hypertension. *Inflammation*.
- Onat, A.M., Turkbeyler, I.H., Pehlivan, Y., Demir, T., Kaplan, D.S., Taysi, S., Ceribasi, A.O., Tutar, E., and Kisacik, B. (2012b) The efficiency of a urotensin II antagonist in an experimental lung fibrosis model. *Inflammation*, **35**, 1138–1143.
- Ong, K.L., Wong, L.Y.F., Man, Y.B., Leung, R.Y.H., Song, Y.-Q., Lam, K.S.L., and Cheung, B.M.Y. (2006) Haplotypes in the urotensin II gene and urotensin II receptor gene are associated with insulin resistance and impaired glucose tolerance. *Peptides*, **27**, 1659–1667.
- Ono, T., Kawaguchi, Y., Kudo, M., Kushikata, T., Hashiba, E., Yoshida, H., Kudo, T., Furukawa, K., Douglas, S.A., Guerrini, R., Calo', G., and Hirota, K. (2008) Urotensin II evokes neurotransmitter release from rat cerebrocortical slices. *Neurosci. Lett.*, **440**, 275–279.
- Onoprishvili, I., Andria, M.L., Kramer, H.K., Ancevska-Taneva, N., Hiller, J.M., and Simon, E.J. (2003) Interaction between the mu opioid receptor and filamin A is involved in receptor regulation and trafficking. *Mol. Pharmacol.*, **64**, 1092–1100.
- Opgaard, O.S., Nothacker, H.-P., Ehlert, F.J., and Krause, D.N. (2000) Human urotensin II mediates vasoconstriction via an increase in inositol phosphates. *Eur. J. Pharmacol.*, **406**, 265–271.
- Otey, C.A., Pavalko, F.M., and Burridge, K. (1990) An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *J. Cell Biol.*, **111**, 721–729.
- Owens, G.C., Orr, E.A., DeMasters, B.K., Muschel, R.J., Berens, M.E., and Kruse, C.A. (1998) Overexpression of a transmembrane isoform of neural cell adhesion molecule alters the invasiveness of rat CNS-1 glioma. *Cancer Res.*, **58**, 2020–2028.

## -P-

- Padera, T.P., Stoll, B.R., Tooredman, J.B., Capen, D., di Tomaso, E., and Jain, R.K. (2004) Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature*, **427**, 695.
- Paegelow, I. and Lange, P. (1982) Pharmacological studies on lymphocytes. 1. Effects of 5-hydroxytryptamine, bradykinin, and lymphokines on the migration of lymphocytes in vitro. *Agents Actions. Suppl.*, **10**, 255–265.
- Pakala, R. (2008) Role of urotensin II in atherosclerotic cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Revascularization Med. Mol. Interv.*, **9**, 166–178.
- Palecek, S.P., Schmidt, C.E., Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1996) Integrin dynamics on the tail region of migrating fibroblasts. *J. Cell Sci.*, **109** ( Pt 5), 941–952.
- Pan, J., Mestas, J., Burdick, M.D., Phillips, R.J., Thomas, G.V., Reckamp, K., Belperio, J.A., and Strieter, R.M. (2006) Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. *Mol. Cancer*, **5**, 56.
- Panetti, T.S., Nowlen, J., and Mosher, D.F. (2000) Sphingosine-1-Phosphate and Lysophosphatidic Acid Stimulate Endothelial Cell Migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**, 1013–1019.

- Pankov, R., Cukierman, E., Katz, B.-Z., Matsumoto, K., Lin, D.C., Lin, S., Hahn, C., and Yamada, K.M. (2000) Integrin Dynamics and Matrix Assembly Tensin-Dependent Translocation of  $\alpha 5 \beta 1$  Integrins Promotes Early Fibronectin Fibrillogenesis. *J. Cell Biol.*, **148**, 1075–1090.
- Papapetropoulos, A., García-Cardena, G., Dengler, T.J., Maisonpierre, P.C., Yancopoulos, G.D., and Sessa, W.C. (1999) Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.*, **79**, 213–223.
- Parent, C.A. and Devreotes, P.N. (1999) A cell's sense of direction. *Science*, **284**, 765–770.
- Parmentier, C., Hameury, E., Dubessy, C., Quan, F.B., Habert, D., Calas, A., Vaudry, H., Lihmann, I., and Tostivint, H. (2011) Occurrence of two distinct urotensin II-related peptides in zebrafish provides new insight into the evolutionary history of the urotensin II gene family. *Endocrinology*, **152**, 2330–2341.
- Parmentier, C., Hameury, E., Lihmann, I., Taxi, J., Hardin-Pouzet, H., Vaudry, H., Calas, A., and Tostivint, H. (2008) Comparative distribution of the mRNAs encoding urotensin I and urotensin II in zebrafish. *Peptides*, **29**, 820–829.
- Parsons, J.T., Horwitz, A.R., and Schwartz, M.A. (2010) Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 633–643.
- Parsons, M., Monypenny, J., Ameer-Beg, S.M., Millard, T.H., Machesky, L.M., Peter, M., Keppler, M.D., Schiavo, G., Watson, R., Chernoff, J., Zicha, D., Vojnovic, B., and Ng, T. (2005) Spatially distinct binding of Cdc42 to PAK1 and N-WASP in breast carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 1680–1695.
- Patacchini, R., Santicioli, P., Giuliani, S., Grieco, P., Novellino, E., Rovero, P., and Maggi, C.A. (2003) Urantide: an ultrapotent urotensin II antagonist peptide in the rat aorta. *Br. J. Pharmacol.*, **140**, 1155–1158.
- Patel, J.H., Du, Y., Ard, P.G., Phillips, C., Carella, B., Chen, C.-J., Rakowski, C., Chatterjee, C., Lieberman, P.M., Lane, W.S., Blobel, G.A., and McMahon, S.B. (2004) The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 10826–10834.
- Paulus, W., Baur, I., Beutler, A.S., and Reeves, S.A. (1996) Diffuse brain invasion of glioma cells requires beta 1 integrins. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.*, **75**, 819–826.
- Pawar, R., Kemp, W., Roberts, S., Krum, H., Yandle, T., and Hardikar, W. (2011) Urotensin II levels are an important marker for the severity of portal hypertension in children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **53**, 88–92.
- Pažanin, L., Vučić, M., Čupić, H., Plavec, D., and Krušlin, B. (2011) IGFBP-2 expression, angiogenesis and pseudopalisades in glioblastoma. *Transl. Neurosci.*, **2**, 219–224.
- Pearson, D., Shively, J.E., Clark, B.R., Geschwind, I.I., Barkley, M., Nishioka, R.S., and Bern, H.A. (1980) Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**, 5021–5024.
- Pelletier, G., Lihmann, I., Dubessy, C., Luu-The, V., Vaudry, H., and Labrie, F. (2005) Androgenic down-regulation of urotensin II precursor, urotensin II-related peptide precursor and androgen receptor mRNA in the mouse spinal cord. *Neuroscience*, **132**, 689–696.
- Pelletier, G., Lihmann, I., and Vaudry, H. (2002) Role of androgens in the regulation of urotensin II precursor mRNA expression in the rat brainstem and spinal cord. *Neuroscience*, **115**, 525–532.
- Penfield, W. (1925) Microglia and the Process of Phagocytosis in Gliomas. *Am. J. Pathol.*, **1**, 77–90.15.
- Percherancier, Y., Berchiche, Y.A., Slight, I., Volkmer-Engert, R., Tamamura, H., Fujii, N., Bouvier, M., and Heveker, N. (2005) Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J. Biol. Chem.*, **280**, 9895–9903.

- Perego, C., Vanoni, C., Massari, S., Raimondi, A., Pola, S., Cattaneo, M.G., Francolini, M., Vicentini, L.M., and Pietrini, G. (2002) Invasive behaviour of glioblastoma cell lines is associated with altered organisation of the cadherin-catenin adhesion system. *J. Cell Sci.*, **115**, 3331–3340.
- Perkins, T.D., Bansal, S., and Barlow, D.J. (1990) Molecular modelling and design of analogues of the peptide hormone urotensin II. *Biochem. Soc. Trans.*, **18**, 918–919.
- Perret, M., Broussard, H., LeGros, T., Burns, A., Chang, J.K., Summer, W., Hyman, A., and Lipton, H. (1993) The effect of adrenomedullin on the isolated heart. *Life Sci.*, **53**, PL377–379.
- Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R.L., and Hahn, K.M. (2006) Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature*, **440**, 1069–1072.
- Phillips, R.J., Burdick, M.D., Lutz, M., Belperio, J.A., Keane, M.P., and Strieter, R.M. (2003) The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **167**, 1676–1686.
- Pichot, C.S., Arvanitis, C., Hartig, S.M., Jensen, S.A., Bechill, J., Marzouk, S., Yu, J., Frost, J.A., and Corey, S.J. (2010) Cdc42-Interacting Protein 4 Promotes Breast Cancer Cell Invasion and Formation of Invadopodia Through Activation of N-WASp. *Cancer Res.*, **70**, 8347–8356.
- Pierce, K.L., Tohgo, A., Ahn, S., Field, M.E., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (2001) Epidermal growth factor (EGF) receptor-dependent ERK activation by G protein-coupled receptors: a co-culture system for identifying intermediates upstream and downstream of heparin-binding EGF shedding. *J. Biol. Chem.*, **276**, 23155–23160.
- Planagumà, J., Minsaas, L., Pons, M., Myhren, L., Garrido, G., and Aragay, A.M. (2012) Filamin A-Hinge Region 1-EGFP: A Novel Tool for Tracking the Cellular Functions of Filamin A in Real-Time. *Plos One*, **7**, e40864.
- Plate, K.H., Breier, G., Weich, H.A., Mennel, H.D., and Risau, W. (1994) Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: Coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible In vivo regulatory mechanisms. *Int. J. Cancer*, **59**, 520–529.
- Plate, K.H., Breier, G., Weich, H.A., and Risau, W. (1992) Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature*, **359**, 845–848.
- Platten, M., Kretz, A., Naumann, U., Aulwurm, S., Egashira, K., Isenmann, S., and Weller, M. (2003) Monocyte chemoattractant protein-1 increases microglial infiltration and aggressiveness of gliomas. *Ann. Neurol.*, **54**, 388–392.
- Platten, M., Wick, W., and Weller, M. (2001) Malignant glioma biology: Role for TGF- $\beta$  in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. *Microsc. Res. Tech.*, **52**, 401–410.
- Pluderi, M., Lucini, V., Caronzolo, D., Pannacci, M., Costa, F., Carrabba, G., Giussani, C., Grosso, S., Colleoni, F., Scaglione, F., Villani, R., Bikfalvi, A., and Bello, L. (2003) Long-term inhibition of glioma growth by systemic administration of human PEX. *J. Neurosurg. Sci.*, **47**, 69–78.
- Plunkett, R.J., Lis, A., Barone, T.A., Fronckowiak, M.D., and Greenberg, S.J. (1999) Hormonal effects on glioblastoma multiforme in the nude rat model. *J. Neurosurg.*, **90**, 1072–1077.
- Prados, M.D. (2000) Future directions in the treatment of malignant gliomas with temozolomide. *Semin. Oncol.*, **27**, 41–46.
- Prat, E., Baron, P., Meda, L., Scarpini, E., Galimberti, D., Ardolino, G., Catania, A., and Scarlato, G. (2000) The human astrocytoma cell line U373MG produces monocyte chemotactic protein (MCP)-1 upon stimulation with beta-amyloid protein. *Neurosci. Lett.*, **283**, 177–180.
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1999) EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*, **402**, 884–888.
- Prosser, H.C.G., Leprince, J., Vaudry, H., Richards, A.M., Forster, M.E., and Pemberton, C.J. (2006) Cardiovascular effects of native and non-native urotensin II and urotensin II-related peptide on rat and salmon hearts. *Peptides*, **27**, 3261–3268.

- Proulx, C.D., Holleran, B.J., Boucard, A.A., Escher, E., Guillemette, G., and Leduc, R. (2008a) Mutational analysis of the conserved Asp2.50 and ERY motif reveals signaling bias of the urotensin II receptor. *Mol. Pharmacol.*, **74**, 552–561.
- Proulx, C.D., Holleran, B.J., Lavigne, P., Escher, E., Guillemette, G., and Leduc, R. (2008b) Biological properties and functional determinants of the urotensin II receptor. *Peptides*, **29**, 691–699.
- Proulx, C.D., Simaan, M., Escher, E., Laporte, S.A., Guillemette, G., and Leduc, R. (2005) Involvement of a cytoplasmic-tail serine cluster in urotensin II receptor internalization. *Biochem. J.*, **385**, 115.
- Provost, D., Cantagrel, A., Lebailly, P., Jaffré, A., Loyant, V., Loiseau, H., Vital, A., Brochard, P., and Baldi, I. (2007) Brain tumours and exposure to pesticides: a case-control study in southwestern France. *Occup. Environ. Med.*, **64**, 509–514.
- Pu, P., Kang, C., Li, J., and Jiang, H. (2004) Antisense and dominant-negative AKT2 cDNA inhibits glioma cell invasion. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.*, **25**, 172–178.

### -Q-

- Qi, J., Du, J., Tang, X., Li, J., Wei, B., and Tang, C. (2004) The upregulation of endothelial nitric oxide synthase and urotensin-II is associated with pulmonary hypertension and vascular diseases in rats produced by aortocaval shunting. *Heart Vessels*, **19**, 81–88.
- Qi, J., Minor, L.K., Smith, C., Hu, B., Yang, J., Andrade-Gordon, P., and Damiano, B. (2005) Characterization of functional urotensin II receptors in human skeletal muscle myoblasts: comparison with angiotensin II receptors. *Peptides*, **26**, 683–690.
- Qi, J., Schulingkamp, R., Parry, T.J., Colburn, R., Stone, D., Haertlein, B., Minor, L.K., Andrade-Gordon, P., and Damiano, B.P. (2007) Urotensin-II induces ear flushing in rats. *Br. J. Pharmacol.*, **150**, 415–423.
- Quan, F.B., Bougerol, M., Rigour, F., Kenigfest, N.B., and Tostivint, H. (2012) Characterization of the true ortholog of the urotensin II-related peptide (URP) gene in teleosts. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **177**, 205–212.
- Quick, Q. and Skalli, O. (2010) Alpha-actinin 1 and alpha-actinin 4: contrasting roles in the survival, motility, and RhoA signaling of astrocytoma cells. *Exp. Cell Res.*, **316**, 1137–1147.

### -R-

- Radhakrishnan, K., Mokri, B., Parisi, J.E., O'Fallon, W.M., Sunku, J., and Kurland, L.T. (1995) The trends in incidence of primary brain tumors in the population of Rochester, Minnesota. *Ann. Neurol.*, **37**, 67–73.
- Rakowski, E., Hassan, G.S., Dhanak, D., Ohlstein, E.H., Douglas, S.A., and Giaid, A. (2005) A role for urotensin II in restenosis following balloon angioplasty: use of a selective UT receptor blocker. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **39**, 785–791.
- Ranuncolo, S.M., Ladeda, V., Specterman, S., Varela, M., Lastiri, J., Morandi, A., Matos, E., Bal de Kier Joffé, E., Puricelli, L., and Pallotta, M.G. (2002) CD44 expression in human gliomas. *J. Surg. Oncol.*, **79**, 30–35; discussion 35–36.
- Ratnikov, B., Ptak, C., Han, J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Ginsberg, M.H. (2005) Talin phosphorylation sites mapped by mass spectrometry. *J. Cell Sci.*, **118**, 4921–4923.
- Reardon, D.A., Akabani, G., Coleman, R.E., Friedman, A.H., Friedman, H.S., Herndon, J.E., 2nd, Cokgor, I., McLendon, R.E., Pegram, C.N., Provenzale, J.M., Quinn, J.A., Rich, J.N., Regalado, L.V., Sampson, J.H., Shafman, T.D., Wikstrand, C.J., Wong, T.Z., Zhao, X.-G., Zalutsky, M.R.,

- and Bigner, D.D. (2002) Phase II trial of murine (131)I-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 administered into surgically created resection cavities of patients with newly diagnosed malignant gliomas. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **20**, 1389–1397.
- Reardon, D.A., Vredenburgh, J.J., Desjardins, A., Peters, K.B., Sathornsumetee, S., Threatt, S., Sampson, J.H., Herndon, J.E., 2nd, Coan, A., McSherry, F., Rich, J.N., McLendon, R.E., Zhang, S., and Friedman, H.S. (2012) Phase 1 trial of dasatinib plus erlotinib in adults with recurrent malignant glioma. *J. Neurooncol.*, **108**, 499–506.
- Rees, J.H. (2012) Diagnosis and treatment in neuro-oncology: an oncological perspective. *Br. J. Radiol.*, **84**, S82–S89.
- Reif, K. and Cyster, J.G. (2000) RGS molecule expression in murine B lymphocytes and ability to down-regulate chemotaxis to lymphoid chemokines. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, **164**, 4720–4729.
- Ren, G., Crampton, M.S., and others (2009) Cortactin: Coordinating adhesion and the actin cytoskeleton at cellular protrusions. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **66**, 865–873.
- Repacholi, M.H. (2001) Health risks from the use of mobile phones. *Toxicol. Lett.*, **120**, 323–331.
- Rey, M., Vicente-Manzanares, M., Viedma, F., Yáñez-Mó, M., Urzainqui, A., Barreiro, O., Vázquez, J., and Sánchez-Madrid, F. (2002) Cutting edge: association of the motor protein nonmuscle myosin heavy chain-IIA with the C terminus of the chemokine receptor CXCR4 in T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, **169**, 5410–5414.
- Richards, A.M., Nicholls, M.G., Lainchbury, J.G., Fisher, S., and Yandle, T.G. (2002) Plasma urotensin II in heart failure. *Lancet*, **360**, 545–546.
- Rickman, D.S., Bobek, M.P., Misek, D.E., Kuick, R., Blaivas, M., Kurnit, D.M., Taylor, J., and Hanash, S.M. (2001) Distinctive Molecular Profiles of High-Grade and Low-Grade Gliomas Based on Oligonucleotide Microarray Analysis. *Cancer Res.*, **61**, 6885–6891.
- Ridet, J.L., Privat, A., Malhotra, S.K., and Gage, F.H. (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.*, **20**, 570–577.
- Ridley, A.J. (2001) Rho GTPases and cell migration. *J. Cell Sci.*, **114**, 2713–2722.
- Ridley, A.J. (2003) Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science*, **302**, 1704–1709.
- Ridley, A.J. (2011) Life at the Leading Edge. *Cell*, **145**, 1012–1022.
- Ridley, A.J. and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, **70**, 389–399.
- Ritter, S.L. and Hall, R.A. (2009) Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 819–830.
- Rivas, R.J., Nishioka, R.S., and Bern, H.A. (1986) In vitro effects of somatostatin and urotensin II on prolactin and growth hormone secretion in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **63**, 245–251.
- Robertson, A.M., Bird, C.C., Waddell, A.W., and Currie, A.R. (1978) Morphological aspects of glucocorticoid-induced cell death in human lymphoblastoid cells. *J. Pathol.*, **126**, 181–187.
- Rodríguez-Frade, J.M., Vila-Coro, A.J., de Ana, A.M., Albar, J.P., Martínez-A, C., and Mellado, M. (1999) The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 3628–3633.
- Romanova, E.V., Sasaki, K., Alexeeva, V., Vilim, F.S., Jing, J., Richmond, T.A., Weiss, K.R., and Sweedler, J.V. (2012) Urotensin II in Invertebrates: From Structure to Function in *Aplysia californica*. *Plos One*, **7**.
- Rosell, S., Burcher, E., Chang, D., and Folkers, K. (1976) Cardiovascular and metabolic actions of neurotensin and (Gln4)-Neurotensin. *Acta Physiol. Scand.*, **98**, 484–491.
- Ross, B., McKendy, K., and Giaid, A. (2010) Role of urotensin II in health and disease. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **298**, R1156–R1172.



- Rossman, K.L., Der, C.J., and Sondek, J. (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 167–180.
- Rossowski, W.J., Cheng, B.-L., Taylor, J.E., Datta, R., and Coy, D.H. (2002) Human urotensin II-induced aorta ring contractions are mediated by protein kinase C, tyrosine kinases and Rho-kinase: inhibition by somatostatin receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.*, **438**, 159–170.
- Rovati, G.E., Capra, V., and Neubig, R.R. (2007) The Highly Conserved DRY Motif of Class A G Protein-Coupled Receptors: Beyond the Ground State. *Mol. Pharmacol.*, **71**, 959–964.
- Roy, R., Zhang, B., and Moses, M.A. (2006) Making the cut: Protease-mediated regulation of angiogenesis. *Exp. Cell Res.*, **312**, 608–622.
- Rozario, T. and DeSimone, D.W. (2010) The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev. Biol.*, **341**, 126–140.
- Ruder, A.M., Waters, M.A., Butler, M.A., Carreón, T., Calvert, G.M., Davis-King, K.E., Schulte, P.A., Sanderson, W.T., Ward, E.M., Connally, L.B., Heineman, E.F., Mandel, J.S., Morton, R.F., Reding, D.J., Rosenman, K.D., and Talaska, G. (2004) Gliomas and farm pesticide exposure in men: the upper midwest health study. *Arch. Environ. Health*, **59**, 650–657.
- Ruoslahti, E. and Engvall, E. (1980) Complexing of fibronectin glycosaminoglycans and collagen. *Biochim. Biophys. Acta*, **631**, 350–358.
- Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M.D. (1987) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, **238**, 491–497.
- Russell, F.D., Kearns, P., Toth, I., and Molenaar, P. (2004) Urotensin-II-converting enzyme activity of furin and trypsin in human cells in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **310**, 209–214.
- Russell, F.D., Meyers, D., Galbraith, A.J., Bett, N., Toth, I., Kearns, P., and Molenaar, P. (2003) Elevated plasma levels of human urotensin-II immunoreactivity in congestive heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **285**, H1576–1581.
- Russell, F.D. and Molenaar, P. (2004) Investigation of signaling pathways that mediate the inotropic effect of urotensin-II in human heart. *Cardiovasc. Res.*, **63**, 673–681.
- Russell, F.D., Molenaar, P., and O'Brien, D.M. (2001) Cardiostimulant effects of urotensin-II in human heart in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, **132**, 5–9.
- Rutka, J.T., Ivanchuk, S., Mondal, S., Taylor, M., Sakai, K., Dirks, P., Jun, P., Jung, S., Becker, L.E., and Ackerley, C. (1999) Co-expression of nestin and vimentin intermediate filaments in invasive human astrocytoma cells. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.*, **17**, 503–515.

-S-

- Sáez, M.E., Smani, T., Ramírez-Lorca, R., Díaz, I., Serrano-Ríos, M., Ruiz, A., and Ordoñez, A. (2011) Association analysis of urotensin II gene (UTS2) and flanking regions with biochemical parameters related to insulin resistance. *Plos One*, **6**, e19327.
- Sahai, E. and Marshall, C.J. (2003) Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat. Cell Biol.*, **5**, 711–719.
- Saitoh, Y., Kuratsu, J., Takeshima, H., Yamamoto, S., and Ushio, Y. (1995) Expression of osteopontin in human glioma. Its correlation with the malignancy. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, **72**, 55–63.
- Sakurai-Yageta, M., Recchi, C., Dez, G.L., Sibarita, J.-B., Daviet, L., Camonis, J., D'Souza-Schorey, C., and Chavrier, P. (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.
- Salgia, R., Brunkhorst, B., Pisick, E., Li, J.L., Lo, S.H., Chen, L.B., and Griffin, J.D. (1995) Increased tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins in myeloid cell lines expressing p210BCR/ABL. *Oncogene*, **11**, 1149–1155.

- Salvati, M., Caroli, E., Rocchi, G., Frati, A., Brogna, C., and Orlando, E.R. (2004) Post-traumatic glioma. Report of four cases and review of the literature. *Tumori*, **90**, 416–419.
- Sanai, N. and Berger, M.S. (2008) Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. *Neurosurgery*, **62**, 753–764; discussion 264–266.
- Sandström, M., Johansson, M., Sandström, J., Bergenheim, A.T., and Henriksson, R. (1999) Expression of the proteolytic factors, tPA and uPA, PAI-1 and VEGF during malignant glioma progression. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.*, **17**, 473–481.
- Sansal, I. and Sellers, W.R. (2004) The Biology and Clinical Relevance of the PTEN Tumor Suppressor Pathway. *J. Clin. Oncol.*, **22**, 2954–2963.
- Sapountzi, V., Logan, I.R., and Robson, C.N. (2006) Cellular functions of TIP60. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **38**, 1496–1509.
- Sasaki, H., Yoshida, K., Ikeda, E., Asou, H., Inaba, M., Otani, M., and Kawase, T. (1998) Expression of the neural cell adhesion molecule in astrocytic tumors: an inverse correlation with malignancy. *Cancer*, **82**, 1921–1931.
- Saunders, R.M., Holt, M.R., Jennings, L., Sutton, D.H., Barsukov, I.L., Bobkov, A., Liddington, R.C., Adamson, E.A., Dunn, G.A., and Critchley, D.R. (2006) Role of vinculin in regulating focal adhesion turnover. *Eur. J. Cell Biol.*, **85**, 487–500.
- Sauzeau, V., Le Mellionec, E., Bertoglio, J., Scalbert, E., Pacaud, P., and Loirand, G. (2001) Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circ. Res.*, **88**, 1102–1104.
- Schilling, M., Besselmann, M., Leonhard, C., Mueller, M., Ringelstein, E.B., and Kiefer, R. (2003) Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp. Neurol.*, **183**, 25–33.
- Schioppa, T., Uranchimeg, B., Saccani, A., Biswas, S.K., Doni, A., Rapisarda, A., Bernasconi, S., Saccani, S., Nebuloni, M., Vago, L., Mantovani, A., Melillo, G., and Sica, A. (2003) Regulation of the Chemokine Receptor CXCR4 by Hypoxia. *J. Exp. Med.*, **198**, 1391–1402.
- Schirenbeck, A., Bretschneider, T., Arasada, R., Schleicher, M., and Faix, J. (2005) The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nat. Cell Biol.*, **7**, 619–625.
- Schlessinger, J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, **103**, 211–225.
- Schlüter, H., Jankowski, J., Rykl, J., Thiemann, J., Belgardt, S., Zidek, W., Wittmann, B., and Pohl, T. (2003) Detection of protease activities with the mass-spectrometry-assisted enzyme-screening (MES) system. *Anal. Bioanal. Chem.*, **377**, 1102–1107.
- Schnell, O., Krebs, B., Wagner, E., Romagna, A., Beer, A.J., Grau, S.J., Thon, N., Goetz, C., Kretzschmar, H.A., Tonn, J.-C., and Goldbrunner, R.H. (2008) Expression of Integrin  $\alpha\beta 3$  in Gliomas Correlates with Tumor Grade and Is not Restricted to Tumor Vasculature. *Brain Pathol. Zurich Switz.*, **18**, 378–386.
- Schoumacher, M., Goldman, R.D., Louvard, D., and Vignjevic, D.M. (2010) Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. *J. Cell Biol.*, **189**, 541–556.
- Scott, M.G.H., Pierotti, V., Storez, H., Lindberg, E., Thuret, A., Muntaner, O., Labbé-Jullié, C., Pitcher, J.A., and Marullo, S. (2006) Cooperative regulation of extracellular signal-regulated kinase activation and cell shape change by filamin A and beta-arrestins. *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 3432–3445.
- Scott, R.W. and Olson, M.F. (2007) LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J. Mol. Med. Berl. Ger.*, **85**, 555–568.
- Seck, T., Baron, R., and Horne, W.C. (2003) Binding of Filamin to the C-terminal Tail of the Calcitonin Receptor Controls Recycling. *J. Biol. Chem.*, **278**, 10408–10416.

- Segain, J.-P., Rolli-Derkinderen, M., Gervois, N., Raingeard de la Blétière, D., Loirand, G., and Pacaud, P. (2007) Urotensin II is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, **179**, 901–909.
- Sehgal, A., Keener, C., Boynton, A.L., Warrick, J., and Murphy, G.P. (1998) CXCR-4, a chemokine receptor, is overexpressed in and required for proliferation of glioblastoma tumor cells. *J. Surg. Oncol.*, **69**, 99–104.
- Sells, M.A., Boyd, J.T., and Chernoff, J. (1999) p21-activated kinase 1 (Pak1) regulates cell motility in mammalian fibroblasts. *J. Cell Biol.*, **145**, 837–849.
- Semenza, G.L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 721–732.
- Servant, G., Weiner, O.D., Herzmark, P., Balla, T., Sedat, J.W., and Bourne, H.R. (2000) Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science*, **287**, 1037–1040.
- Shah, B.H. and Catt, K.J. (2004) GPCR-mediated transactivation of RTKs in the CNS: mechanisms and consequences. *Trends Neurosci.*, **27**, 48–53.
- Sheng, H., Shao, J., Washington, M.K., and DuBois, R.N. (2001) Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, **276**, 18075–18081.
- Shenouda, A., Douglas, S.A., Ohlstein, E.H., and Giaid, A. (2002) Localization of Urotensin-II Immunoreactivity in Normal Human Kidneys and Renal Carcinoma. *J. Histochem. Cytochem.*, **50**, 885–889.
- Shinojima, N., Tada, K., Shiraishi, S., Kamiryo, T., Kochi, M., Nakamura, H., Makino, K., Saya, H., Hirano, H., Kuratsu, J., Oka, K., Ishimaru, Y., and Ushio, Y. (2003) Prognostic Value of Epidermal Growth Factor Receptor in Patients with Glioblastoma Multiforme. *Cancer Res.*, **63**, 6962–6970.
- Shiraha, H., Glading, A., Chou, J., Jia, Z., and Wells, A. (2002) Activation of m-Calpain (Calpain II) by Epidermal Growth Factor Is Limited by Protein Kinase A Phosphorylation of m-Calpain. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 2716–2727.
- Shiraishi, Y., Watanabe, T., Suguro, T., Nagashima, M., Kato, R., Hongo, S., Itabe, H., Miyazaki, A., Hirano, T., and Adachi, M. (2008) Chronic urotensin II infusion enhances macrophage foam cell formation and atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *J. Hypertens.*, **26**, 1955–1965.
- Shpetner, H.S. and Vallee, R.B. (1989) Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell*, **59**, 421–432.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, **359**, 843–845.
- Sibony-Benyamini, H. and Gil-Henn, H. (2012) Invadopodia: The leading force. *Eur. J. Cell Biol.*,
- Sidharta, P.N., Rave, K., Heinemann, L., Chiossi, E., Krähenbühl, S., and Dingemans, J. (2009) Effect of the urotensin-II receptor antagonist palosuran on secretion of and sensitivity to insulin in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **68**, 502–510.
- Sidharta, P.N., Wagner, F.D., Bohnemeier, H., Jungnik, A., Halabi, A., Krähenbühl, S., Chadha-Boreham, H., and Dingemans, J. (2006a) Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the urotensin II receptor antagonist palosuran in macroalbuminuric, diabetic patients. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **80**, 246–256.
- Sidharta, P.N., Wagner, F.D., Bohnemeier, H., Jungnik, A., Halabi, A., Krähenbühl, S., Chadha-Boreham, H., and Dingemans, J. (2006b) Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the urotensin II receptor antagonist palosuran in macroalbuminuric, diabetic patients. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **80**, 246–256.
- Silvestre, R.A., Egido, E.M., Hernández, R., Leprince, J., Chatenet, D., Tollemer, H., Chartrel, N., Vaudry, H., and Marco, J. (2004) Urotensin-II is present in pancreatic extracts and inhibits insulin release in the perfused rat pancreas. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.*, **151**, 803–809.
- Silvestre, R.A., Egido, E.M., Hernández, R., and Marco, J. (2009) Characterization of the insulinostatic effect of urotensin II: a study in the perfused rat pancreas. *Regul. Pept.*, **153**, 37–42.

- Silvestre, R.A., Rodríguez-Gallardo, J., Egido, E.M., and Marco, J. (2001) Inhibition of insulin release by urotensin II—a study on the perfused rat pancreas. *Horm. Metab. Res. Horm.-Stoffwechselforschung Horm. Métabolisme*, **33**, 379–381.
- Simon, M.I., Strathmann, M.P., and Gautam, N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science*, **252**, 802–808.
- Smith, J.S., Tachibana, I., Passe, S.M., Huntley, B.K., Borell, T.J., Iturria, N., O’Fallon, J.R., Schaefer, P.L., Scheithauer, B.W., James, C.D., Buckner, J.C., and Jenkins, R.B. (2001) PTEN Mutation, EGFR Amplification, and Outcome in Patients With Anaplastic Astrocytoma and Glioblastoma Multiforme. *J. Natl. Cancer Inst.*, **93**, 1246–1256.
- Smith, M.C.P., Luker, K.E., Garbow, J.R., Prior, J.L., Jackson, E., Piwnica-Worms, D., and Luker, G.D. (2004) CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res.*, **64**, 8604–8612.
- Sohy, D., Yano, H., Nadai, P. de, Urizar, E., Guillabert, A., Javitch, J.A., Parmentier, M., and Springael, J.-Y. (2009) Hetero-oligomerization of CCR2, CCR5, and CXCR4 and the Protean Effects of “Selective” Antagonists. *J. Biol. Chem.*, **284**, 31270–31279.
- Song, H.Y., Lee, M.J., Kim, M.Y., Kim, K.H., Lee, I.H., Shin, S.H., Lee, J.S., and Kim, J.H. (2010) Lysophosphatidic acid mediates migration of human mesenchymal stem cells stimulated by synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Biochim. Biophys. Acta Bba - Mol. Cell Biol. Lipids*, **1801**, 23–30.
- Song, N., Ding, W., Chu, S., Zhao, J., Dong, X., Di, B., and Tang, C. (2012) Urotensin II stimulates vascular endothelial growth factor secretion from adventitial fibroblasts in synergy with angiotensin II. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.*, **76**, 1267–1273.
- Song, W., Abdel-Razik, A.E.S., Lu, W., Ao, Z., Johns, D.G., Douglas, S.A., Balment, R.J., and Ashton, N. (2006a) Urotensin II and renal function in the rat. *Kidney Int.*, **69**, 1360–1368.
- Song, W., McDonald, J., Camarda, V., Calo, G., Guerrini, R., Marzola, E., Thompson, J.P., Rowbotham, D.J., and Lambert, D.G. (2006b) Cell and tissue responses of a range of Urotensin II analogs at cloned and native urotensin II receptors. Evidence for coupling promiscuity. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **373**, 148–157.
- Sotsios, Y., Whittaker, G.C., Westwick, J., and Ward, S.G. (1999) The CXC chemokine stromal cell-derived factor activates a Gi-coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, **163**, 5954–5963.
- Spiegel, S. and Milstien, S. (2003) Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 397–407.
- Spinazzi, R., Albertin, G., Nico, B., Guidolin, D., Di Liddo, R., Rossi, G.P., Ribatti, D., and Nussdorfer, G.G. (2006a) Urotensin-II and its receptor (UT-R) are expressed in rat brain endothelial cells, and urotensin-II via UT-R stimulates angiogenesis in vivo and in vitro. *Int. J. Mol. Med.*, **18**, 1107–1112.
- Spinazzi, R., Albertin, G., Nico, B., Guidolin, D., Di Liddo, R., Rossi, G.P., Ribatti, D., and Nussdorfer, G.G. (2006b) Urotensin-II and its receptor (UT-R) are expressed in rat brain endothelial cells, and urotensin-II via UT-R stimulates angiogenesis in vivo and in vitro. *Int. J. Mol. Med.*, **18**, 1107–1112.
- Srinivasan, S., Wang, F., Glavas, S., Ott, A., Hofmann, F., Aktories, K., Kalman, D., and Bourne, H.R. (2003) Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J. Cell Biol.*, **160**, 375–385.
- Stahlhut, M. and van Deurs, B. (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.
- Stiles, J.D., Ostrow, P.T., Balos, L.L., Greenberg, S.J., Plunkett, R., Grand, W., and Heffner, R.R., Jr (1997) Correlation of endothelin-1 and transforming growth factor beta 1 with malignancy and vascularity in human gliomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **56**, 435–439.

- Stirrat, A., Gallagher, M., Douglas, S.A., Ohlstein, E.H., Berry, C., Kirk, A., Richardson, M., and MacLean, M.R. (2001) Potent vasodilator responses to human urotensin-II in human pulmonary and abdominal resistance arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **280**, H925–928.
- Stratmann, A., Risau, W., and Plate, K.H. (1998) Cell Type-Specific Expression of Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2 Suggests a Role in Glioblastoma Angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, **153**, 1459–1466.
- Stupp, R., Hegi, M.E., Neyns, B., Goldbrunner, R., Schlegel, U., Clement, P.M.J., Grabenbauer, G.G., Ochsenschein, A.F., Simon, M., Dietrich, P.-Y., Pietsch, T., Hicking, C., Tonn, J.-C., Diserens, A.-C., Pica, A., Hermisson, M., Krueger, S., Picard, M., and Weller, M. (2010) Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **28**, 2712–2718.
- Stupp, R., Pavlidis, N., and Jelic, S. (2005) ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of malignant glioma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. Esmo*, **16 Suppl 1**, i64–65.
- Sue, Y.-M., Chen, C.-H., Hsu, Y.-H., Hou, C.-C., Cheng, C.-Y., Chen, Y.-C., Lin, S.-L., Chen, T.-W., and Chen, T.-H. (2009) Urotensin II induces transactivation of the epidermal growth factor receptor via transient oxidation of SHP-2 in the rat renal tubular cell line NRK-52E. *Growth Factors Chur Switz.*, **27**, 155–162.
- Sugo, T. and Mori, M. (2008) Another ligand fishing for G protein-coupled receptor 14. Discovery of urotensin II-related peptide in the rat brain. *Peptides*, **29**, 809–812.
- Sugo, T., Murakami, Y., Shimomura, Y., Harada, M., Abe, M., Ishibashi, Y., Kitada, C., Miyajima, N., Suzuki, N., Mori, M., and Fujino, M. (2003) Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **310**, 860–868.
- Suguro, T., Watanabe, T., Ban, Y., Kodate, S., Misaki, A., Hirano, T., Miyazaki, A., and Adachi, M. (2007) Increased human urotensin II levels are correlated with carotid atherosclerosis in essential hypertension. *Am. J. Hypertens.*, **20**, 211–217.
- Suguro, T., Watanabe, T., Kodate, S., Xu, G., Hirano, T., Adachi, M., and Miyazaki, A. (2008) Increased plasma urotensin-II levels are associated with diabetic retinopathy and carotid atherosclerosis in Type 2 diabetes. *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979*, **115**, 327–334.
- Sun, Y., Cheng, Z., Ma, L., and Pei, G. (2002) Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J. Biol. Chem.*, **277**, 49212–49219.
- Suzuki, A., Kaisho, T., Ohishi, M., Tsukio-Yamaguchi, M., Tsubata, T., Koni, P.A., Sasaki, T., Mak, T.W., and Nakano, T. (2003) Critical roles of Pten in B cell homeostasis and immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.*, **197**, 657–667.
- Suzuki, M., Suzuki, M., Nakayama, J., Suzuki, A., Angata, K., Chen, S., Sakai, K., Hagihara, K., Yamaguchi, Y., and Fukuda, M. (2005) Polysialic acid facilitates tumor invasion by glioma cells. *Glycobiology*, **15**, 887–894.
- Suzuki, S., Wenyi, Z., Hirai, M., Hinokio, Y., Suzuki, C., Yamada, T., Yoshizumi, S., Suzuki, M., Tanizawa, Y., Matsutani, A., and Oka, Y. (2004) Genetic variations at urotensin II and urotensin II receptor genes and risk of type 2 diabetes mellitus in Japanese. *Peptides*, **25**, 1803–1808.
- Suzumura, A., Sawada, M., and Marunouchi, T. (1996) Selective induction of interleukin-6 in mouse microglia by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Brain Res.*, **713**, 192–198.
- Sverdlov, M., Shinin, V., Place, A.T., Castellon, M., and Minshall, R.D. (2009) Filamin A regulates caveolae internalization and trafficking in endothelial cells. *Mol. Biol. Cell*, **20**, 4531–4540.
- Svitkina, T.M., Bulanova, E.A., Chaga, O.Y., Vignjevic, D.M., Kojima, S., Vasiliev, J.M., and Borisy, G.G. (2003) Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J. Cell Biol.*, **160**, 409–421.

Svitkina, T.M., Verkhovsky, A.B., McQuade, K.M., and Borisy, G.G. (1997) Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation. *J. Cell Biol.*, **139**, 397–415.

### -T-

Tadeu, A.M.B., Ribeiro, S., Johnston, J., Goldberg, I., Gerloff, D., and Earnshaw, W.C. (2008) CENP-V is required for centromere organization, chromosome alignment and cytokinesis. *Embo J.*, **27**, 2510–2522.

Tadokoro, S., Shattil, S.J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R.C., Pereda, J.M. de, Ginsberg, M.H., and Calderwood, D.A. (2003) Talin Binding to Integrin  $\beta$  Tails: A Final Common Step in Integrin Activation. *Science*, **302**, 103–106.

Taichman, R.S., Cooper, C., Keller, E.T., Pienta, K.J., Taichman, N.S., and McCauley, L.K. (2002) Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res.*, **62**, 1832–1837.

Takahashi, J.A., Mori, H., Fukumoto, M., Igarashi, K., Jaye, M., Oda, Y., Kikuchi, H., and Hatanaka, M. (1990) Gene expression of fibroblast growth factors in human gliomas and meningiomas: demonstration of cellular source of basic fibroblast growth factor mRNA and peptide in tumor tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 5710–5714.

Takahashi, K., Totsune, K., Murakami, O., Arihara, Z., Noshiro, T., Hayashi, Y., and Shibahara, S. (2003) Expression of urotensin II and its receptor in adrenal tumors and stimulation of proliferation of cultured tumor cells by urotensin II. *Peptides*, **24**, 301–306.

Takahashi, K., Totsune, K., Murakami, O., and Shibahara, S. (2001) Expression of urotensin II and urotensin II receptor mRNAs in various human tumor cell lines and secretion of urotensin II-like immunoreactivity by SW-13 adrenocortical carcinoma cells. *Peptides*, **22**, 1175–1179.

Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001) Small GTP-Binding Proteins. *Physiol. Rev.*, **81**, 153–208.

Takashima, S.-I., Sugimoto, N., Takuwa, N., Okamoto, Y., Yoshioka, K., Takamura, M., Takata, S., Kaneko, S., and Takuwa, Y. (2008) G12/13 and Gq mediate S1P2-induced inhibition of Rac and migration in vascular smooth muscle in a manner dependent on Rho but not Rho kinase. *Cardiovasc. Res.*, **79**, 689–697.

Tal, M., Ammar, D.A., Karpuj, M., Krizhanovsky, V., Naim, M., and Thompson, D.A. (1995) A novel putative neuropeptide receptor expressed in neural tissue, including sensory epithelia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **209**, 752–759.

Tambuyzer, B.R., Ponsaerts, P., and Nouwen, E.J. (2009) Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *J. Leukoc. Biol.*, **85**, 352–370.

Tan, W., Martin, D., and Gutkind, J.S. (2006) The G $\alpha$ 13-Rho signaling axis is required for SDF-1-induced migration through CXCR4. *J. Biol. Chem.*, **281**, 39542–39549.

Tanaka, T., Manome, Y., Wen, P., Kufe, D.W., and Fine, H.A. (1997) Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth. *Nat. Med.*, **3**, 437–442.

Tarone, G., Cirillo, D., Giancotti, F.G., Comoglio, P.M., and Marchisio, P.C. (1985) Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp. Cell Res.*, **159**, 141–157.

Tarrant, T.K., Rampersad, R.R., Esserman, D., Rothlein, L.R., Liu, P., Premont, R.T., Lefkowitz, R.J., Lee, D.M., and Patel, D.D. (2008) Granulocyte chemotaxis and disease expression are differentially regulated by GRK subtype in an acute inflammatory arthritis model (K/BxN). *Clin. Immunol. Orlando Fla*, **129**, 115–122.

- Tasaki, K., Hori, M., Ozaki, H., Karaki, H., and Wakabayashi, I. (2004) Mechanism of human urotensin II-induced contraction in rat aorta. *J. Pharmacol. Sci.*, **94**, 376–383.
- Tate, M.C. and Aghi, M.K. (2009) Biology of angiogenesis and invasion in glioma. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.*, **6**, 447–457.
- Tavano, R., Contento, R.L., Baranda, S.J., Soligo, M., Tuosto, L., Manes, S., and Viola, A. (2006) CD28 interaction with filamin-A controls lipid raft accumulation at the T-cell immunological synapse. *Nat. Cell Biol.*, **8**, 1270–1276.
- Terfera, D.R., Brown, M.C., and Turner, C.E. (2002) Epidermal growth factor stimulates serine/threonine phosphorylation of the focal adhesion protein paxillin in a MEK-dependent manner in normal rat kidney cells. *J. Cell. Physiol.*, **191**, 82–94.
- Thelin, W.R., Chen, Y., Gentzsch, M., Kreda, S.M., Sallee, J.L., Scarlett, C.O., Borchers, C.H., Jacobson, K., Stutts, M.J., and Milgram, S.L. (2007) Direct interaction with filamins modulates the stability and plasma membrane expression of CFTR. *J. Clin. Invest.*, **117**, 364–374.
- Thieme, S., Gyárfás, T., Richter, C., Ozhan, G., Fu, J., Alexopoulou, D., Muders, M.H., Michalk, I., Jakob, C., Dahl, A., Klink, B., Bandola, J., Bachmann, M., Schröck, E., Buchholz, F., Stewart, A.F., Weidinger, G., Anastassiadis, K., and Brenner, S. (2013) The histone demethylase UTX regulates stem cell migration and hematopoiesis. *Blood*, **121**, 2462–2473.
- Thompson, J.P., Watt, P., Sanghavi, S., Strupish, J.W., and Lambert, D.G. (2003) A comparison of cerebrospinal fluid and plasma urotensin II concentrations in normotensive and hypertensive patients undergoing urological surgery during spinal anesthesia: a pilot study. *Anesth. Analg.*, **97**, 1501–1503.
- Tian, L., Li, C., Qi, J., Fu, P., Yu, X., Li, X., and Cai, L. (2008) Diabetes-induced upregulation of urotensin II and its receptor plays an important role in TGF- $\beta$ 1-mediated renal fibrosis and dysfunction. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, **295**, E1234–E1242.
- Timoshenko, A.V., Xu, G., Chakrabarti, S., Lala, P.K., and Chakraborty, C. (2003) Role of prostaglandin E2 receptors in migration of murine and human breast cancer cells. *Exp. Cell Res.*, **289**, 265–274.
- Tokumitsu, T. and Maramorosch, K. (1967) Cytoplasmic protrusions in insect cells during mitosis in vitro. *J. Cell Biol.*, **34**, 677–683.
- Tolias, K.F., Cantley, L.C., and Carpenter, C.L. (1995) Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J. Biol. Chem.*, **270**, 17656–17659.
- Tostivint, H., Joly, L., Lihmann, I., Parmentier, C., Lebon, A., Morisson, M., Calas, A., Ekker, M., and Vaudry, H. (2006) Comparative genomics provides evidence for close evolutionary relationships between the urotensin II and somatostatin gene families. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 2237–2242.
- Tostivint, H., Quan, F.B., Bougerol, M., Kenigfest, N.B., and Lihmann, I. (2013) Impact of gene/genome duplications on the evolution of the urotensin II and somatostatin families. *Gen. Comp. Endocrinol.*,.
- Totsune, K., Takahashi, K., Arihara, Z., Sone, M., Ito, S., and Murakami, O. (2003) Increased plasma urotensin II levels in patients with diabetes mellitus. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979, **104**, 1–5.
- Totsune, K., Takahashi, K., Arihara, Z., Sone, M., Murakami, O., Ito, S., Kikuya, M., Ohkubo, T., Hashimoto, J., and Imai, Y. (2004) Elevated plasma levels of immunoreactive urotensin II and its increased urinary excretion in patients with Type 2 diabetes mellitus: association with progress of diabetic nephropathy. *Peptides*, **25**, 1809–1814.
- Totsune, K., Takahashi, K., Arihara, Z., Sone, M., Satoh, F., Ito, S., Kimura, Y., Sasano, H., and Murakami, O. (2001) Role of urotensin II in patients on dialysis. *Lancet*, **358**, 810–811.
- Trebicka, J., Leifeld, L., Hennenberg, M., Biecker, E., Eckhardt, A., Fischer, N., Pröbsting, A.S., Clemens, C., Lammert, F., Sauerbruch, T., and Heller, J. (2008) Hemodynamic effects of urotensin II and its specific receptor antagonist palosuran in cirrhotic rats. *Hepatol. Baltim. Md.*, **47**, 1264–1276.

- Trettel, F., Di Bartolomeo, S., Lauro, C., Catalano, M., Ciotti, M.T., and Limatola, C. (2003) Ligand-independent CXCR2 dimerization. *J. Biol. Chem.*, **278**, 40980–40988.
- Tsai, C.-S., Loh, S.-H., Liu, J.-C., Lin, J.-W., Chen, Y.-L., Chen, C.-H., and Cheng, T.-H. (2009) Urotensin II-induced endothelin-1 expression and cell proliferation via epidermal growth factor receptor transactivation in rat aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, **206**, 86–94.
- Tsai, W., Morielli, A.D., and Peralta, E.G. (1997) The m1 muscarinic acetylcholine receptor transactivates the EGF receptor to modulate ion channel activity. *Embo J.*, **16**, 4597–4605.
- Turner, C.E. (2000) Paxillin interactions. *J. Cell Sci.*, **113**, 4139–4140.
- Turowski, P., Myles, T., Hemmings, B.A., Fernandez, A., and Lamb, N.J. (1999) Vimentin dephosphorylation by protein phosphatase 2A is modulated by the targeting subunit B55. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 1997–2015.
- Tzanidis, A., Hannan, R.D., Thomas, W.G., Onan, D., Autelitano, D.J., See, F., Kelly, D.J., Gilbert, R.E., and Krum, H. (2003) Direct actions of urotensin II on the heart: implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circ. Res.*, **93**, 246–253.

## -U-

- Ullrich, A. and Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, **61**, 203–212.
- Unoki, N., Murakami, T., Nishijima, K., Ogino, K., Rooijen, N. van, and Yoshimura, N. (2010) SDF-1/CXCR4 Contributes to the Activation of Tip Cells and Microglia in Retinal Angiogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **51**, 3362–3371.

## -V-

- Van Rheenen, J., Condeelis, J., and Glogauer, M. (2009) A common cofilin activity cycle in invasive tumor cells and inflammatory cells. *J. Cell Sci.*, **122**, 305–311.
- Vaughan, R.B. and Trinkaus, J.P. (1966) Movements of epithelial cell sheets in vitro. *J. Cell Sci.*, **1**, 407–413.
- Ventimiglia, J.B., Wikstrand, C.J., Ostrowski, L.E., Bourdon, M.A., Lightner, V.A., and Bigner, D.D. (1992) Tenascin expression in human glioma cell lines and normal tissues. *J. Neuroimmunol.*, **36**, 41–55.
- Verbeek, B.S., Adriaansen-Slot, S.S., Vroom, T.M., Beckers, T., and Rijksen, G. (1998) Overexpression of EGFR and c-erbB2 causes enhanced cell migration in human breast cancer cells and NIH3T3 fibroblasts. *Febs Lett.*, **425**, 145–150.
- Vergura, R., Camarda, V., Rizzi, A., Spagnol, M., Guerrini, R., Calo', G., Salvadori, S., and Regoli, D. (2004) Urotensin II stimulates plasma extravasation in mice via UT receptor activation. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **370**, 347–352.
- Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., Alexe, G., Lawrence, M., O'Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B.A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., Feiler, H.S., Hodgson, J.G., James, C.D., Sarkaria, J.N., Brennan, C., Kahn, A., Spellman, P.T., Wilson, R.K., Speed, T.P., Gray, J.W., Meyerson, M., Getz, G., Perou, C.M., and Hayes, D.N. (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, **17**, 98–110.
- Verkhusha, V.V., Tsukita, S., and Oda, H. (1999) Actin dynamics in lamellipodia of migrating border cells in the Drosophila ovary revealed by a GFP-actin fusion protein. *Febs Lett.*, **445**, 395–401.
- Vicari, A.P. and Caux, C. (2002) Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **13**, 143–154.



- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., and Horwitz, A.R. (2009) Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 778–790.
- Vitorino, P. and Meyer, T. (2008) Modular control of endothelial sheet migration. *Genes Dev.*, **22**, 3268–3281.
- Vogt, L., Chiurchiu, C., Chadha-Boreham, H., Danaïetash, P., Dingemanse, J., Hadjadj, S., Krum, H., Navis, G., Neuhart, E., Parvanova, A.I., Ruggenenti, P., Woittiez, A.J., Zimlichman, R., Remuzzi, G., and de Zeeuw, D. (2010) Effect of the urotensin receptor antagonist palosuran in hypertensive patients with type 2 diabetic nephropathy. *Hypertension*, **55**, 1206–1209.
- Volpert, O.V., Fong, T., Koch, A.E., Peterson, J.D., Waltenbaugh, C., Tepper, R.I., and Bouck, N.P. (1998) Inhibition of Angiogenesis by Interleukin 4. *J. Exp. Med.*, **188**, 1039–1046.
- Von Bülow, C., Hayen, W., Hartmann, A., Mueller-Klieser, W., Allolio, B., and Nehls, V. (2001) Endothelial capillaries chemotactically attract tumour cells. *J. Pathol.*, **193**, 367–376.
- Von Wichert, G., Haimovich, B., Feng, G.-S., and Sheetz, M.P. (2003) Force-dependent integrin-cytoskeleton linkage formation requires downregulation of focal complex dynamics by Shp2. *Embo J.*, **22**, 5023–5035.
- Vroon, A., Heijnen, C.J., Lombardi, M.S., Cobelens, P.M., Mayor, F., Jr, Caron, M.G., and Kavelaars, A. (2004a) Reduced GRK2 level in T cells potentiates chemotaxis and signaling in response to CCL4. *J. Leukoc. Biol.*, **75**, 901–909.
- Vroon, A., Heijnen, C.J., Raatgever, R., Touw, I.P., Ploemacher, R.E., Premont, R.T., and Kavelaars, A. (2004b) GRK6 deficiency is associated with enhanced CXCR4-mediated neutrophil chemotaxis in vitro and impaired responsiveness to G-CSF in vivo. *J. Leukoc. Biol.*, **75**, 698–704.

## -W-

- Wang, H., Dong, K., Xue, X., Feng, P., and Wang, X. (2011a) Elevated expression of urotensin II and its receptor in diethylnitrosamine-mediated precancerous lesions in rat liver. *Peptides*, **32**, 382–387.
- Wang, H.X., Zeng, X.J., Liu, Y., Wang, J., Lu, L.Q., Hao, G., Zhang, L.K., and Tang, C.S. (2009) Elevated expression of urotensin II and its receptor in skeletal muscle of diabetic mouse. *Regul. Pept.*, **154**, 85–90.
- Wang, J., He, L., Combs, C.A., Roderiquez, G., and Norcross, M.A. (2006) Dimerization of CXCR4 in living malignant cells: control of cell migration by a synthetic peptide that reduces homologous CXCR4 interactions. *Mol. Cancer Ther.*, **5**, 2474–2483.
- Wang, S.-C., Hong, J.-H., Hsueh, C., and Chiang, C.-S. (2012) Tumor-secreted SDF-1 promotes glioma invasiveness and TAM tropism toward hypoxia in a murine astrocytoma model. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, **92**, 151–162.
- Wang, Y., Cao, H., Chen, J., and McNiven, M.A. (2011b) A direct interaction between the large GTPase dynamin-2 and FAK regulates focal adhesion dynamics in response to active Src. *Mol. Biol. Cell*, **22**, 1529–1538.
- Ward, C.W., Lawrence, M.C., Streltsov, V.A., Adams, T.E., and McKern, N.M. (2007) The insulin and EGF receptor structures: new insights into ligand-induced receptor activation. *Trends Biochem. Sci.*, **32**, 129–137.
- Watanabe, T., Pakala, R., Katagiri, T., and Benedict, C.R. (2001) Synergistic effect of urotensin II with serotonin on vascular smooth muscle cell proliferation. *J. Hypertens.*, **19**, 2191–2196.
- Watanabe, T., Suguro, T., Kanome, T., Sakamoto, Y.-I., Kodate, S., Hagiwara, T., Hongo, S., Hirano, T., Adachi, M., and Miyazaki, A. (2005) Human urotensin II accelerates foam cell formation in human monocyte-derived macrophages. *Hypertension*, **46**, 738–744.
- Watanabe, T., Wang, S., Noritake, J., Sato, K., Fukata, M., Takefuji, M., Nakagawa, M., Izumi, N., Akiyama, T., and Kaibuchi, K. (2004) Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration. *Dev. Cell*, **7**, 871–883.

- Watson, A.M.D., Lambert, G.W., Smith, K.J., and May, C.N. (2003) Urotensin II acts centrally to increase epinephrine and ACTH release and cause potent inotropic and chronotropic actions. *Hypertension*, **42**, 373–379.
- Watson, A.M.D., Olukman, M., Koulis, C., Tu, Y., Samijono, D., Yuen, D., Lee, C., Behm, D.J., Cooper, M.E., Jandeleit-Dahm, K.A.M., Calkin, A.C., and Allen, T.J. (2013) Urotensin II receptor antagonism confers vasoprotective effects in diabetes associated atherosclerosis: studies in humans and in a mouse model of diabetes. *Diabetologia*,.
- Waugh, D. and Conlon, J.M. (1993) Purification and characterization of urotensin II from the brain of a teleost (trout, *Oncorhynchus mykiss*) and an elasmobranch (skate, *Raja rhina*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **92**, 419–427.
- Waugh, D., Youson, J., Mims, S.D., Sower, S., and Conlon, J.M. (1995) Urotensin II from the river lamprey (*Lampetra fluviatilis*), the sea lamprey (*Petromyzon marinus*), and the paddlefish (*Polyodon spathula*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **99**, 323–332.
- Webb, D.J., Parsons, J.T., and Horwitz, A.F. (2002) Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells – over and over and over again. *Nat. Cell Biol.*, **4**, E97–E100.
- Wei, K.-C., Huang, C.-Y., Chen, P.-Y., Feng, L.-Y., Wu, T.-W.E., Chen, S.-M., Tsai, H.-C., Lu, Y.-J., Tsang, N.-M., Tseng, C.-K., Pai, P.-C., and Shin, J.-W. (2010) Evaluation of the Prognostic Value of CD44 in Glioblastoma Multiforme. *Anticancer Res.*, **30**, 253–259.
- Weiger, M.C., Ahmed, S., Welf, E.S., and Haugh, J.M. (2010) Directional Persistence of Cell Migration Coincides with Stability of Asymmetric Intracellular Signaling. *Biophys. J.*, **98**, 67–75.
- Weiner, O.D. (2002) Regulation of cell polarity during eukaryotic chemotaxis: the chemotactic compass. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **14**, 196–202.
- Welch, M.D., Iwamatsu, A., and Mitchison, T.J. (1997) Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature*, **385**, 265–269.
- Welch, M.D. and Mullins, R.D. (2002) Cellular control of actin nucleation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **18**, 247–288.
- Wilkinson, I.B., Affolter, J.T., de Haas, S.L., Pellegrini, M.P., Boyd, J., Winter, M.J., Balment, R.J., and Webb, D.J. (2002) High plasma concentrations of human urotensin II do not alter local or systemic hemodynamics in man. *Cardiovasc. Res.*, **53**, 341–347.
- Wilson, S., Wilkinson, G., and Milligan, G. (2005) The CXCR1 and CXCR2 receptors form constitutive homo- and heterodimers selectively and with equal apparent affinities. *J. Biol. Chem.*, **280**, 28663–28674.
- Winkler, F., Kienast, Y., Fuhrmann, M., Von Baumgarten, L., Burgold, S., Mitteregger, G., Kretzschmar, H., and Herms, J. (2009) Imaging glioma cell invasion in vivo reveals mechanisms of dissemination and peritumoral angiogenesis. *Glia*, **57**, 1306–1315.
- Wolfe, B.L. and Trejo, J. (2007) Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic Cph. Den.*, **8**, 462–470.
- Wolfman, A. and Macara, I.G. (1990) A cytosolic protein catalyzes the release of GDP from p21ras. *Science*, **248**, 67–69.
- Wu, B., Chien, E.Y.T., Mol, C.D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F.C., Hamel, D.J., Kuhn, P., Handel, T.M., Cherezov, V., and Stevens, R.C. (2010a) Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*, **330**, 1066–1071.
- Wu, Y.I., Frey, D., Lungu, O.I., Jaehrig, A., Schlichting, I., Kuhlman, B., and Hahn, K.M. (2009) A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature*, **461**, 104–108.
- Wu, Y.-Q., Song, Z., Zhou, C.-H., Xing, S.-H., Pei, D.-S., and Zheng, J.-N. (2010b) Expression of urotensin II and its receptor in human lung adenocarcinoma A549 cells and the effect of urotensin II on lung adenocarcinoma growth in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.*, **24**, 1179–1184.

**-X-**

- Xiao, K., McClatchy, D.B., Shukla, A.K., Zhao, Y., Chen, M., Shenoy, S.K., Yates, J.R., and Lefkowitz, R.J. (2007) Functional specialization of  $\beta$ -arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **104**, 12011–12016.
- Xiao, Z., Zhang, N., Murphy, D.B., and Devreotes, P.N. (1997) Dynamic distribution of chemoattractant receptors in living cells during chemotaxis and persistent stimulation. *J. Cell Biol.*, **139**, 365–374.
- Xu, J., Wang, F., Van Keymeulen, A., Herzmark, P., Straight, A., Kelly, K., Takuwa, Y., Sugimoto, N., Mitchison, T., and Bourne, H.R. (2003) Divergent Signals and Cytoskeletal Assemblies Regulate Self-Organizing Polarity in Neutrophils. *Cell*, **114**, 201–214.
- Xu, S., Jiang, H., Wu, B., Yang, J., and Chen, S. (2009) Urotensin II induces migration of endothelial progenitor cells via activation of the RhoA/Rho kinase pathway. *Tohoku J. Exp. Med.*, **219**, 283–288.
- Xu, S., Wen, H., and Jiang, H. (2012) Urotensin II promotes the proliferation of endothelial progenitor cells through p38 and p44/42 MAPK activation. *Mol. Med. Reports*, **6**, 197–200.
- Xu, Y., Bismar, T.A., Su, J., Xu, B., Kristiansen, G., Varga, Z., Teng, L., Ingber, D.E., Mammoto, A., Kumar, R., and Alaoui-Jamali, M.A. (2010) Filamin A regulates focal adhesion disassembly and suppresses breast cancer cell migration and invasion. *J. Exp. Med.*, **207**, 2421–2437.

**-Y-**

- Yahata, Y., Shirakata, Y., Tokumaru, S., Yang, L., Dai, X., Tohyama, M., Tsuda, T., Sayama, K., Iwai, M., Horiuchi, M., and Hashimoto, K. (2006) A novel function of angiotensin II in skin wound healing. Induction of fibroblast and keratinocyte migration by angiotensin II via heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor-mediated EGF receptor transactivation. *J. Biol. Chem.*, **281**, 13209–13216.
- Yamauchi, J., Miyamoto, Y., Kokubu, H., Nishii, H., Okamoto, M., Sugawara, Y., Hirasawa, A., Tsujimoto, G., and Itoh, H. (2002) Endothelin suppresses cell migration via the JNK signaling pathway in a manner dependent upon Src kinase, Rac1, and Cdc42. *Febs Lett.*, **527**, 284–288.
- Yanagisawa, H. and Davis, E.C. (2010) Unraveling the mechanism of elastic fiber assembly: The roles of short fibulins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **42**, 1084–1093.
- Yanagisawa, H., Schluterman, M.K., and Brekken, R.A. (2009) Fibulin-5, an integrin-binding matricellular protein: its function in development and disease. *J. Cell Commun. Signal.*, **3**, 337–347.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **332**, 411–415.
- Yang, C., Czech, L., Gerboth, S., Kojima, S., Scita, G., and Svitkina, T. (2007) Novel roles of formin mDia2 in lamellipodia and filopodia formation in motile cells. *Plos Biol.*, **5**, e317.
- Yang, X.-H., Man, X.-Y., Cai, S.-Q., Yao, Y.-G., Bu, Z.-Y., and Zheng, M. (2006) Expression of VEGFR-2 on HaCaT cells is regulated by VEGF and plays an active role in mediating VEGF induced effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **349**, 31–38.
- Yang, Y., Liu, Y., Yao, X., Ping, Y., Jiang, T., Liu, Q., Xu, S., Huang, J., Mou, H., Gong, W., Chen, K., Bian, X., Wang, J.M., and Ming Wang, J. (2011) Annexin 1 released by necrotic human glioblastoma cells stimulates tumor cell growth through the formyl peptide receptor 1. *Am. J. Pathol.*, **179**, 1504–1512.
- Yano, K., Hicks, J.W., Vaudry, H., and Conlon, J.M. (1995) Cardiovascular actions of frog urotensin II in the frog, *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **97**, 103–110.

- Yi, K., Yu, M., Wu, L., and Tan, X. (2012) Effects of urotensin II on functional activity of late endothelial progenitor cells. *Peptides*, **33**, 87–91.
- Yoon, C.M., Hong, B.S., Moon, H.G., Lim, S., Suh, P.-G., Kim, Y.-K., Chae, C.-B., and Gho, Y.S. (2008) Sphingosine-1-phosphate promotes lymphangiogenesis by stimulating S1P1/Gi/PLC/Ca2+ signaling pathways. *Blood*, **112**, 1129–1138.
- Yu, H.-S., Lin, T.-H., and Tang, C.-H. (2012) Bradykinin enhances cell migration in human prostate cancer cells through B2 receptor/PKC $\delta$ /c-Src dependent signaling pathway. *The Prostate*, n/a–n/a.
- Yu, J., Moon, A., and Kim, H.-R.C. (2001) Both Platelet-Derived Growth Factor Receptor (PDGFR)- $\alpha$  and PDGFR- $\beta$  Promote Murine Fibroblast Cell Migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 697–700.
- Yu, N., Erb, L., Shivaji, R., Weisman, G.A., and Seye, C.I. (2008) Binding of the P2Y2 nucleotide receptor to filamin A regulates migration of vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.*, **102**, 581–588.
- Yue, J., Huhn, S., and Shen, Z. (2013) Complex roles of filamin-A mediated cytoskeleton network in cancer progression. *Cell Biosci.*, **3**, 7.
- Yulis, C.R. and Lederis, K. (1986) Extraurophyseal distribution of urotensin II immunoreactive neuronal perikarya and their processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 7079–7083.

## -Z-

- Zadeh, G., Koushan, K., Baoping, Q., Shannon, P., and Guha, A. (2010) Role of Angiopoietin-2 in Regulating Growth and Vascularity of Astrocytomas. *J. Oncol.*, **2010**, 1–7.
- Zagzag, D., Amirnovin, R., Greco, M.A., Yee, H., Holash, J., Wiegand, S.J., Zabski, S., Yancopoulos, G.D., and Grumet, M. (2000a) Vascular apoptosis and involution in gliomas precede neovascularization: a novel concept for glioma growth and angiogenesis. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, **80**, 837–849.
- Zagzag, D., Friedlander, D.R., Miller, D.C., Dosik, J., Cangiarella, J., Kostianovsky, M., Cohen, H., Grumet, M., and Greco, M.A. (1995) Tenascin expression in astrocytomas correlates with angiogenesis. *Cancer Res.*, **55**, 907–914.
- Zagzag, D., Shiff, B., Jallo, G.I., Greco, M.A., Blanco, C., Cohen, H., Hukin, J., Allen, J.C., and Friedlander, D.R. (2002) Tenascin-C promotes microvascular cell migration and phosphorylation of focal adhesion kinase. *Cancer Res.*, **62**, 2660–2668.
- Zagzag, D., Zhong, H., Scalzitti, J.M., Laughner, E., Simons, J.W., and Semenza, G.L. (2000b) Expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer*, **88**, 2606–2618.
- Zambonin-Zallone, A., Teti, A., Carano, A., and Marchisio, P.C. (1988) The distribution of podosomes in osteoclasts cultured on bone laminae: effect of retinol. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, **3**, 517–523.
- Zamir, E., Katz, B.Z., Aota, S., Yamada, K.M., Geiger, B., and Kam, Z. (1999) Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.*, **112**, 1655–1669.
- Zeng, Z.-P., Liu, G.-Q., Li, H.-Z., Fan, X.-R., Liu, D.-M., Tong, A.-L., Zheng, X., and Liu, C. (2006) The Effects of Urotensin-II on Proliferation of Pheochromocytoma Cells and mRNA Expression of Urotensin-II and Its Receptor in Pheochromocytoma Tissues. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1073**, 284–289.
- Zerrouqi, A., Pyrzynska, B., Febbraio, M., Brat, D.J., and Van Meir, E.G. (2012) P14ARF inhibits human glioblastoma-induced angiogenesis by upregulating the expression of TIMP3. *J. Clin. Invest.*, **122**, 1283–1295.
- Zetter, PhD, B.R. (1998) Angiogenesis and Tumor Metastasis. *Annu. Rev. Med.*, **49**, 407–424.

- Zhai, H., Heppner, F.L., and Tsirka, S.E. (2011) Microglia/Macrophages Promote Glioma Progression. *Glia*, **59**, 472–485.
- Zhang, A.Y., Chen, Y.-F., Zhang, D.X., Yi, F.-X., Qi, J., Andrade-Gordon, P., de Garavilla, L., Li, P.-L., and Zou, A.-P. (2003) Urotensin II is a nitric oxide-dependent vasodilator and natriuretic peptide in the rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **285**, F792–798.
- Zhang, M. and Breitwieser, G.E. (2005) High affinity interaction with filamin A protects against calcium-sensing receptor degradation. *J. Biol. Chem.*, **280**, 11140–11146.
- Zhang, T. and Lu, Y. (2005) The inhibitory effect of PEDF in glioma tumors. *Aacr Meet. Abstr.*, **2005**, 709–a.
- Zhang, W.-X., Liang, Y.-F., Wang, X.-M., Nie, Y., Chong, L., Lin, L., Chen, C., and Li, C.-C. (2012) Urotensin upregulates transforming growth factor- $\beta$ 1 expression of asthma airway through ERK-dependent pathway. *Mol. Cell. Biochem.*, **364**, 291–298.
- Zhang, X., Fei, Z., Bu, X., Zhen, H., Zhang, Z., Gu, J., and Chen, Y. (2000) Expression and significance of urokinase type plasminogen activator gene in human brain gliomas. *J. Surg. Oncol.*, **74**, 90–94.
- Zhang, Y., Li, Y., Wei, R., Wang, Z., Bu, D., Zhao, J., Pang, Y., and Tang, C. (2008a) Urotensin II is an autocrine/paracrine growth factor for aortic adventitia of rat. *Regul. Pept.*, **151**, 88–94.
- Zhang, Y.-G., Kuang, Z.-J., Mao, Y.-Y., Wei, R.-H., Bao, S.-L., Wu, L.-B., Li, Y.-G., and Tang, C.-S. (2011) Osteopontin is involved in urotensin II-induced migration of rat aortic adventitial fibroblasts. *Peptides*, **32**, 2452–2458.
- Zhang, Y.-G., Li, J., Li, Y.-G., and Wei, R.-H. (2008b) Urotensin II induces phenotypic differentiation, migration, and collagen synthesis of adventitial fibroblasts from rat aorta. *J. Hypertens.*, **26**, 1119–1126.
- Zhang, Y.-G., Li, Y.-G., Liu, B.-G., Wei, R.-H., Wang, D.-M., Tan, X.-R., Bu, D.-F., Pang, Y.-Z., and Tang, C.-S. (2007) Urotensin II accelerates cardiac fibrosis and hypertrophy of rats induced by isoproterenol. *Acta Pharmacol. Sin.*, **28**, 36–43.
- Zhang, Z. and Li, L.-Y. (2012) TNFSF15 Modulates Neovascularization and Inflammation. *Cancer Microenviron.*, **5**, 237–247.
- Zhao, H., Jin, S., and Gewirtz, A.M. (2012) The histone acetyltransferase TIP60 interacts with c-Myb and inactivates its transcriptional activity in human leukemia. *J. Biol. Chem.*, **287**, 925–934.
- Zhao, Y., Lyons, C.E., Jr, Xiao, A., Templeton, D.J., Sang, Q.A., Brew, K., and Hussaini, I.M. (2008) Urokinase directly activates matrix metalloproteinases-9: a potential role in glioblastoma invasion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **369**, 1215–1220.
- Zheng, X., Jiang, F., Katakowski, M., Lu, Y., and Chopp, M. (2012) ADAM17 promotes glioma cell malignant phenotype. *Mol. Carcinog.*, **51**, 150–164.
- Zheng, Y., Xia, Y., Hawke, D., Halle, M., Tremblay, M.L., Gao, X., Zhou, X.Z., Aldape, K., Cobb, M.H., Xie, K., He, J., and Lu, Z. (2009) FAK phosphorylation by ERK primes ras-induced tyrosine dephosphorylation of FAK mediated by PIN1 and PTP-PEST. *Mol. Cell*, **35**, 11–25.
- Zhou, C.-H., Wan, Y.-Y., Chu, X.-H., Song, Z., Xing, S.-H., Wu, Y.-Q., and Yin, X.-X. (2012) Urotensin II contributes to the formation of lung adenocarcinoma inflammatory microenvironment through the NF- $\kappa$ B pathway in tumor-bearing nude mice. *Oncol. Lett.*, **4**, 1259–1263.
- Zhou, Y., Larsen, P.H., Hao, C., and Yong, V.W. (2002) CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. *J. Biol. Chem.*, **277**, 49481–49487.
- Zhu, Y.Z., Wang, Z.J., Zhu, Y.C., Zhang, L., Oakley, R.M.E., Chung, C.W., Lim, K.W., Lee, H.S., Ozoux, M.L., Linz, W., Böhm, M., and Kostenis, E. (2004) Urotensin II causes fatal circulatory collapse in anesthetized monkeys in vivo: a “vasoconstrictor” with a unique hemodynamic profile. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **286**, H830–836.

- Ziltener, P., Mueller, C., Haenig, B., Scherz, M.W., and Nayler, O. (2002) Urotensin II mediates ERK1/2 phosphorylation and proliferation in GPR14-transfected cell lines. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, **22**, 155–168.
- Zoccali, C., Mallamaci, F., Benedetto, F.A., Tripepi, G., Pizzini, P., Cutrupi, S., and Malatino, L. (2008) Urotensin II and cardiomyopathy in end-stage renal disease. *Hypertension*, **51**, 326–333.
- Zoccali, C., Mallamaci, F., Tripepi, G., Cutrupi, S., Pizzini, P., and Malatino, L. (2006) Urotensin II is an inverse predictor of incident cardiovascular events in end-stage renal disease. *Kidney Int.*, **69**, 1253–1258.
- Zoudilova, M., Kumar, P., Ge, L., Wang, P., Bokoch, G.M., and DeFea, K.A. (2007)  $\beta$ -Arrestin-dependent Regulation of the Cofilin Pathway Downstream of Protease-activated Receptor-2. *J. Biol. Chem.*, **282**, 20634–20646.
- Zoudilova, M., Min, J., Richards, H.L., Carter, D., Huang, T., and DeFea, K.A. (2010)  $\beta$ -Arrestins Scaffold Cofilin with Chronophin to Direct Localized Actin Filament Severing and Membrane Protrusions Downstream of Protease-activated Receptor-2. *J. Biol. Chem.*, **285**, 14318–14329.
- Zwick, E., Daub, H., Aoki, N., Yamaguchi-Aoki, Y., Tinhofer, I., Maly, K., and Ullrich, A. (1997) Critical role of calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation in PC12 cell membrane depolarization and bradykinin signaling. *J. Biol. Chem.*, **272**, 24767–24770.