

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
STÉPHANIE LAMONTAGNE

ASSOCIATION ENTRE LES PROTÉINES DE FILAMENTS INTERMÉDIAIRES DE
KÉRATINES 8 ET 18 ET DES PROTÉINES DE LA VOIE DE SIGNALISATION
PI3K/AKT/NF-KB DANS DIFFÉRENTES LIGNÉES CELLULAIRES TUMORALES

MAI 2017

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier ma directrice de recherche, Monique Cadrin, pour m'avoir pris sous son aile et ainsi transmis sa passion pour la recherche. Grâce à sa confiance et ses judicieux conseils, j'ai développé une autonomie en recherche. Je tiens également à remercier mon co-directeur, Éric Asselin, pour l'intérêt qu'il a apporté à mon projet. Mon passage dans leur laboratoire m'a permis de garder de merveilleux souvenirs. Je tiens aussi à remercier mes collègues de laboratoire qui m'ont partagé leur expérience et leurs conseils tout au long de ma maîtrise, tout particulièrement, Sophie Parent pour le partage de son expertise technique. Enfin, je tiens à remercier ma famille. Leurs encouragements et leur soutien moral m'ont permis de continuer lors des moments de découragement.

RÉSUMÉ

Les filaments intermédiaires forment avec les microfilaments d'actine et les microtubules, le cytosquelette de la majorité des cellules de mammifères. Les kératines sont les principales protéines de filaments intermédiaires exprimées dans les cellules épithéliales. Dans les hépatocytes plus précisément, seules les kératines 8 et 18 (K8/18) sont exprimées. En plus de participer à l'intégrité structurale des cellules et des tissus, les K8/18 ont plusieurs fonctions, dont la protection des cellules contre les stress mécaniques et toxiques, ainsi que la régulation de processus métaboliques impliqués dans la croissance, la prolifération, la migration cellulaire et l'apoptose. Depuis plusieurs années, notre laboratoire s'intéresse à l'implication des K8/18 dans le développement de cancers. Les kératines ont longtemps été uniquement utilisées comme marqueurs de la progression tumorale. Des études récentes montrent qu'elles auraient un rôle important dans la régulation de ce processus. En effet, lors de la transition épithéliale-mésenchymateuse, une étape importante de la progression tumorale et du développement de métastases, il y a une diminution de l'expression des kératines. Notre laboratoire a montré que l'absence des K8/18 dans les cellules d'hépatocarcinome HepG2 et dans les cellules cancéreuses de l'endomètre KLE favorise la motilité et l'invasion cellulaire par l'activation de la voie de survie cellulaire PI3K/Akt/NF-κB. Ces résultats suggèrent que les K8/18 pourraient interagir physiquement avec des protéines de cette voie afin d'en réguler la fonction. L'objectif de la présente étude est de déterminer si les kératines interagissent avec des protéines de la voie PI3K/Akt/NF-κB. Nos résultats d'immunoprecipitation ont montré que les K8/18 sont associées aux protéines PI3Kp110 α , Akt, IKK β et NF-κB. Nous avons également étudié l'association des kératines avec les différents isoformes d'Akt. Nos résultats montrent que les isoformes Akt1 et Akt2 sont associés aux K8/18 dans les HepG2. Les observations effectuées en immunofluorescence suivie d'une analyse par transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) ont montré que les kératines colocalisent avec Akt dans le cytoplasme des cellules alors qu'elles colocalisent avec NF-κB principalement au niveau de la membrane plasmique. Les résultats de cette étude montrent que les K8/18 ont la capacité de lier des protéines de la voie PI3K/Akt/NF-κB. Ces résultats suggèrent que les kératines pourraient jouer un rôle dans la localisation de ces protéines dans le cytoplasme et par ces associations, jouer un rôle dans leur activation. Le maintien de l'expression des kératines dans les cellules épithéliales cancéreuses pourrait ainsi prévenir la progression tumorale.

Mots-clés : cytosquelette, filaments intermédiaires, kératines, PI3K, isoforme d'Akt, NF-κB, association.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES FIGURES ET TABLEAU.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	vii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Le cytosquelette de filaments intermédiaires	1
1.1.1 Les filaments intermédiaires et les modifications post-traductionnelles.....	5
1.1.1.1 Effet de la phosphorylation sur les différents types de filaments intermédiaires.....	5
1.1.2 Les kératines	8
1.2 Le cancer.....	10
1.2.1 Les filaments intermédiaires, marqueurs de la progression tumorale	12
1.2.2 La transition épithéliale-mésenchymateuse	14
1.2.2.1 Les filaments intermédiaires et la transition épithéliale-mésenchymateuse	16
1.3 Régulation de l'homéostasie cellulaire par Akt.....	17
1.3.1 La voie de signalisation PI3K/Akt/NF-κB et le cancer	21
1.3.2 La relation entre les protéines de filaments intermédiaires de kératines et la voie de signalisation PI3K/Akt/NF-κB	23
1.4 Hypothèse et objectifs.....	24
CHAPITRE II	
KERATINS 8 AND 18 ARE ASSOCIATED WITH PI3K/AKT/NF-KB SIGNALING PROTEINS IN EPITHELIAL CANCER CELLS.....	25
2.1 Contribution des auteurs	25
2.2 Résumé de l'article	25
2.3 Article scientifique.....	27
Summary.....	27
Introduction.....	28

Materials and methods	29
Cell Culture.....	29
Construction of Akt1 and 2 plasmids and Transfection	29
Antibodies and Reagents	30
Western Blot Analysis	30
Immunoprecipitation.....	31
Immunofluorescence Staining and FRET	31
Results	32
Analysis of the expression of K8/18, and proteins associated with PI3K/Akt/NF- κ B pathway in HepG2, Hep3B and Hela cells	32
Association between K8/18 and PI3K/Akt/NF- κ B signaling proteins ...	32
Akt1 and Akt2 associate with K8/18	33
FRET analysis of the colocalization of K8/18/Akt and K8/18/NF- κ B...	34
Discussion.....	34
References.....	37
CHAPITRE III DISCUSSION	45
3.1 Les kératines 8 et 18 s'associent à des protéines impliquées dans la progression tumorale	45
3.2 La protéine Akt se lie aux kératines lorsqu'elle est phosphorylée	47
3.3 La liaison d'Akt avec les kératines n'est pas spécifique à un isoforme	48
3.4 Les modifications post-traductionnelles comme potentiel mécanisme régulant les associations des kératines avec les protéines de la voie PI3K/Akt/NF- κ B ...	48
CHAPITRE IV CONCLUSION.....	53
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	54

LISTE DES FIGURES ET TABLEAU

Figure		Page
1.1	Les trois réseaux de filaments composant le cytosquelette des cellules de mammifères.....	1
1.2	Structure des filaments intermédiaires.....	3
1.3	Certaines fonctions des FIs sont régulées par la phosphorylation	6
1.4	La phosphorylation des kératines permet la réorganisation du réseau de FIs et favorise la migration cellulaire	7
1.5	Les propriétés du cancer	11
1.6	La progression tumorale et la formation de métastases.....	12
1.7	Distribution des kératines couramment utilisées dans le diagnostic de cancers d'origine épithéliale	13
1.8	Les trois différents types d'EMT	14
1.9	Les différents marqueurs de l'EMT	16
1.10	Structure des isoformes d'Akt.....	19
1.11	Localisation intracellulaire des différents isoformes d'Akt.....	19
1.12	La cascade d'activation de la voie PI3K/Akt/NF-κB	21
1.13	Activation des différents isoformes d'Akt lors de la progression tumorale ..	22
3.1	L'utilisation des molécules MK-2206 et AZD5363 permet l'inhibition d'Akt	47
3.2	Le système CRISPR-Cas 9	51
3.3	La substitution de la sérine 73 des K8 par une alanine ou un acide aspartique permet l'étude <i>in vitro</i> du rôle de cette phosphorylation.....	52
3.4	Analyse de l'expression des K8/18 dans les cellules Hela suite à délétion des K8 à l'aide de CRISPR-Cas 9.....	52

Tableau

1.1	Classification des filaments intermédiaires	4
-----	---	---

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide déoxyribonucléique
Akt	Protéine kinase B
ATP	Adénosine triphosphate
CRISPR	Clustered Regularly Interspace Short Palindromic Repeats
EMT	Transition épithéliale-mésenchymateuse
FIs	Filaments intermédiaires
FRET	Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes
GFAP	Protéine acide fibrillaire gliale
GTP	Guanosine triphosphate
K8/18	Hétérodimère de kératines 8 et 18
MFs	Microfilaments d'actine
MMP	Métalloprotéase matricielle
mTORc2	Complexe 2 de la cible mammalienne de la rapamycine
MTs	Microtubules
NF-κB	Facteur nucléaire kappa B
PDK	Kinase dépendante des phosphoinositides
PH	Domaine d'homologie avec la pleckstrine
PKC	Protéine kinase C
PIP3	Phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PTEN	Phosphatase et homologue de la tensine
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TNFR	Récepteur du TNF
TRADD	Protéine associée au domaine de mort du récepteur TNF

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cytosquelette de filaments intermédiaires

Le cytosquelette de la majorité des cellules de mammifères est constitué d'un ensemble de réseaux de filaments qui s'étendent de la membrane plasmique jusqu'à la membrane nucléaire. Les trois principaux réseaux de filaments composant le cytosquelette sont les microfilaments d'actine (MFs), les microtubules (MTs) formés d' α et β tubuline et les filaments intermédiaires (FIs) qui regroupent plus de 70 protéines (Figure 1.1) (Lodish *et al.* 2012).

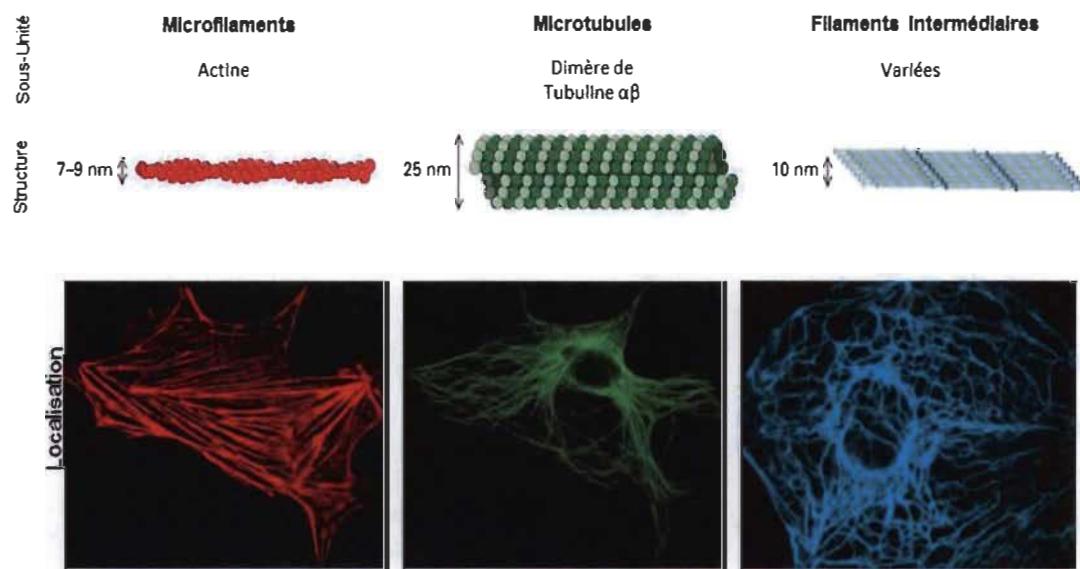


Figure 1.1 Les trois réseaux de filaments composant le cytosquelette des cellules de mammifères (Lodish *et al.* 2012).

Les MFs d'actine sont des polymères de 5 à 9 nm de diamètre présents dans toutes les cellules. Ils sont constitués de sous-unités d'actine. La formation des MFs d'actine est dépendante de la présence d'ATP. Les filaments d'actine ont une polarité qui leur permet,

en association avec d'autres protéines, d'accomplir leurs fonctions. Ils jouent un rôle important dans l'organisation de la membrane plasmique et sont impliqués dans la polarité cellulaire, dans la migration cellulaire, dans la division cellulaire ainsi que dans la contraction musculaire (Lodish *et al.* 2016).

Les MTs forment des filaments de 25 nm de diamètre constitués de sous-unités de tubuline α et β . Les MTs sont des filaments polaires. En effet, l'extrémité composée par la sous-unité β a une polarité positive (+) tandis que l'extrémité composée de la sous-unité α a une polarité négative (-). La polymérisation et la dépolymérisation des MTs sont médiées par la présence de GTP, mais également par la présence de la kinésine, de la dynéine ainsi que de l'ATP. Grâce à leur polarité et leur association avec des protéines de type dynéine et kinésine, les microtubules sont impliqués dans le transport des vésicules et des organites en plus de jouer un rôle important dans l'organisation du matériel cytoplasmique. Les MTs ont également un rôle primordial dans la division cellulaire puisqu'ils participent au positionnement et à la ségrégation des chromosomes lors de la mitose (Lodish *et al.* 2016).

Les FIs forment, comme leur nom l'indique, des structures filamenteuses de taille intermédiaire entre les MTs et les MFs d'actine. La taille des FIs est d'environ 10 nm. Le rôle des FIs, contrairement aux MFs et aux MTs, est encore mal compris. Les protéines de FIs constituent une grande famille de protéines (plus de 70) qui partagent une structure similaire. En effet, les protéines de FIs sont composées d'un domaine hélicoïdal linéaire central encadré par deux régions variables, soit les régions N-terminale et C-terminale (Figure 1.2). Lors de la polymérisation, les domaines hélicoïdaux s'associent afin de former des dimères qui vont ensuite s'associer selon une orientation opposée pour former des tétramères. Ces tétramères s'assemblent afin de former des protofilaments qui vont, par la suite, permettre l'elongation des filaments. Puisque les tétramères formant les protofilaments sont symétriques, les FIs n'ont pas de polarité (Chung *et al.* 2013, Homberg et Magin 2014, Sun *et al.* 2016).

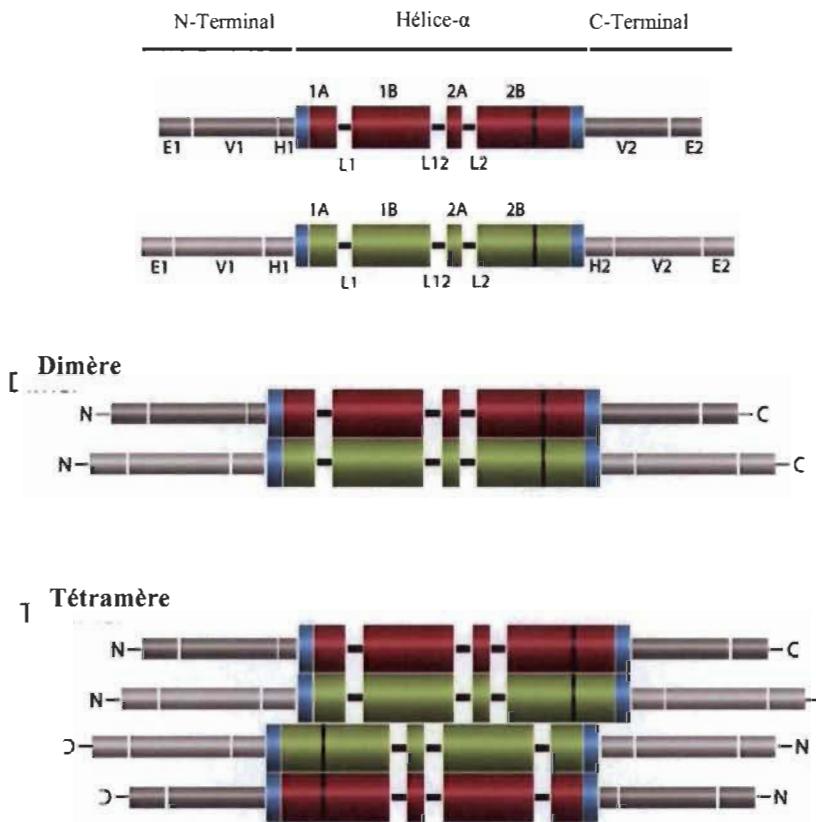


Figure 1.2 Structure des filaments intermédiaires (Homberg et Magin 2014).

Les protéines de FIs sont exprimées de façon spécifique dans les différents tissus et types de cellules. Ces protéines sont classées en six groupes en fonction de l'homologie de leur domaine central (Tableau 1.1) (Leduc et Etienne-Manneville 2015). Les protéines de FIs de type I et de type II sont constituées des kératines qui sont exprimées dans les cellules épithéliales. Elles peuvent représenter de 30 à 40 % de la quantité totale de protéines dans ces cellules (Schwarz *et al.* 2015). Les kératines forment des hétérodimères composés d'une kératine acide de type I (28 isoformes) et d'une kératine neutre-basique de type II (26 isoformes). Les protéines de FIs de type III sont constituées de la vimentine qui est spécifique aux cellules d'origine mésenchymale, de la desmine et de la syncoïline qui sont exprimées dans les cellules musculaires, de la périphérine exprimée dans les neurones et de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) qui est exprimée dans les cellules gliales. Le groupe de type IV est constitué des neurofilaments (NF-L, NF-M et NF-H) et de l' α -internexine, des protéines exprimées dans les cellules neuronales. Contrairement aux kératines, les FIs de type III et de type IV peuvent former des homodimères ou des

hétérodimères (Omary 2009). Le groupe de FIs de type V est constitué par des protéines nucléaires, soit les lamines (type A/C, B1 et B2). Ces protéines, par leur association à d'autres protéines nucléaires, jouent un rôle dans l'organisation de la chromatine (Herrmann *et al.* 2007, Lodish *et al.* 2012). Les FIs de type VI regroupent la synémine exprimée dans les cellules musculaires, les neurones et les astrocytes et la nestine exprimée dans les cellules pluripotentes (Leduc et Etienne-Manneville 2015). Bien que l'expression des protéines de FIs est spécifique au type cellulaire, différentes protéines de FIs peuvent être exprimées dans une même cellule. C'est le cas des cellules épithéliales cancéreuses qui peuvent exprimer les kératines ainsi que la vimentine lors de la progression tumorale (Omary 2009).

Tableau 1.1
Classification des filaments intermédiaires

Type de Filaments	Protéines	Nombre de gènes	Distribution tissulaire principale
I	Kératines acides	> 25	Épithélium
II	Kératines basiques	> 24	Épithélium
III	Vimentine	1	Mésenchyme
	Protéine Acide Fibrillaire Gliale (GFAP)	1	Astrocytes, Cellules gliales
	Périphérine	1	Neurones
	Syncoïline	1	Muscle
	Desmine	1	Muscle
IV	Neurofilaments (NF-L, NF-M, NF-H)	3	Neurones
	α -internexine	1	Neurones
V	Lamines (A/C, B1, B2)	3	Ubiquitaire (nucléaire)
VI	Synémine	1	Neurones, Astrocytes, Muscle
	Nestine	1	Cellules souches neuronales, Muscle, Endothélium

Adapté de Leduc et Etienne-Manneville 2015.

1.1.1 Les filaments intermédiaires et les modifications post-traductionnelles

Les protéines de FIs sont sujettes à plusieurs types de modifications post-traductionnelles. En effet, les protéines de FIs peuvent être phosphorylées, glycosylées, sumoylées, acétylées ainsi qu'ubiquitinées (Snider et Omary 2014, Loschke *et al.* 2015). Il est proposé que ces modifications jouent un rôle important dans la régulation des fonctions des FIs.

1.1.1.1 *Effet de la phosphorylation sur les différents types de filaments intermédiaires*

Au cours des années 1980, plusieurs études ont montré que les différentes protéines de FIs étaient phosphorylées (Evans et Fink 1982, Julien et Mushynski 1982, Schecket et Lasek 1982). Il a alors été démontré que la phosphorylation des neurofilaments, de la desmine et de la vimentine affectait leur polymérisation (Inagaki *et al.* 1988). Par exemple, la phosphorylation de la vimentine entraîne sa dépolymérisation (Inagaki *et al.* 1988). En effet, au cours de la mitose, la vimentine devient phosphorylée et se désassemble (Evans et Fink 1982). Au cours de la dernière décennie, plusieurs études ont identifié la phosphorylation des FIs comme étant bien plus qu'un simple régulateur de l'assemblage et de la réorganisation du réseau de filaments (Figure 1.3) (Hyder *et al.* 2008, Karantza 2011, Satelli et Li 2011, Homberg et Magin 2014, Snider et Omary 2014).

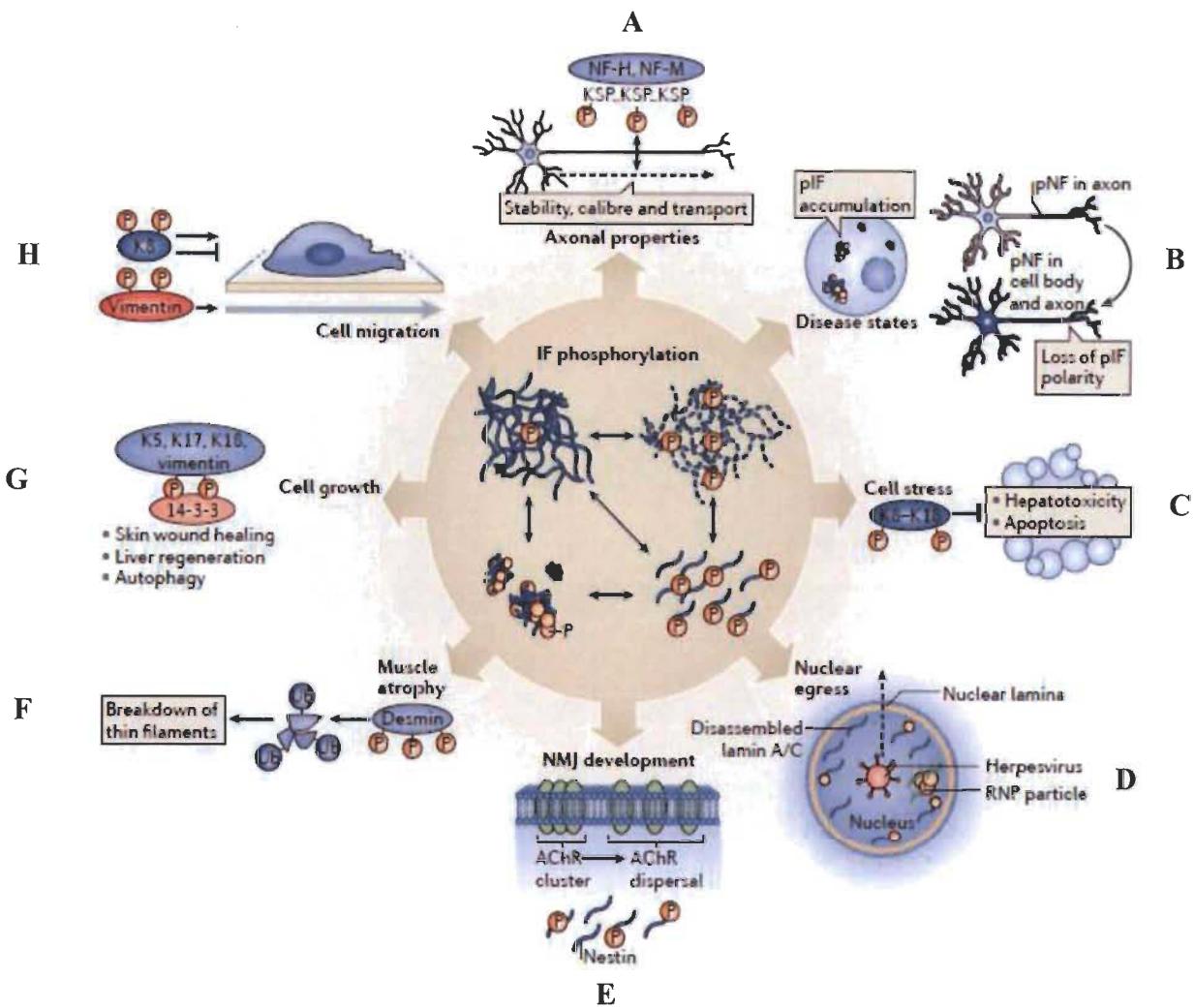


Figure 1.3 Certaines fonctions des FIs sont régulées par la phosphorylation (Snider et Omary 2014).

En effet, la phosphorylation des neurofilaments participe également à la régulation des propriétés axonales (Figure 1.3A). Par exemple, l'augmentation de la phosphorylation des neurofilaments est associée à une vitesse de transmission de l'influx nerveux axonale plus lente (Snider et Omary 2014). Quant à elle, la phosphorylation de la nestine est impliquée dans la formation de jonctions neuromusculaires (Figure 1.3E). Également, la phosphorylation des FIs, tels que la vimentine et les kératines 18, 5, 7, 14 et 17, contrôle la croissance cellulaire en régulant la séquestration de la protéine 14-3-3 (Figure 1.3G) (Hyder *et al.* 2008, Karantza 2011, Satelli et Li 2011, Homberg et Magin 2014, Mikami *et al.* 2015). Par exemple, la séquestration de la protéine 14-3-3 par les kératines permet l'activation de la phosphatase Cdc25 qui favorise l'activation de la kinase mitotique

CDK1 et ainsi l'induction de la progression du cycle cellulaire (Hyder *et al.* 2008, Pan *et al.* 2013, Snider et Omari 2014, Mikami *et al.* 2015). La phosphorylation des kératines et de la vimentine joue également un rôle dans la régulation de la migration cellulaire par la réorganisation du réseau de FIs (Figure 1.3H). Dans les cellules cancéreuses, la phosphorylation des kératines entraîne une réorganisation du réseau de FIs et sa relocalisation en périphérie du noyau. Cette réorganisation rend alors les cellules plus flexibles, ce qui favorise la migration cellulaire (Figure 1.4) (Kim *et al.* 2015).

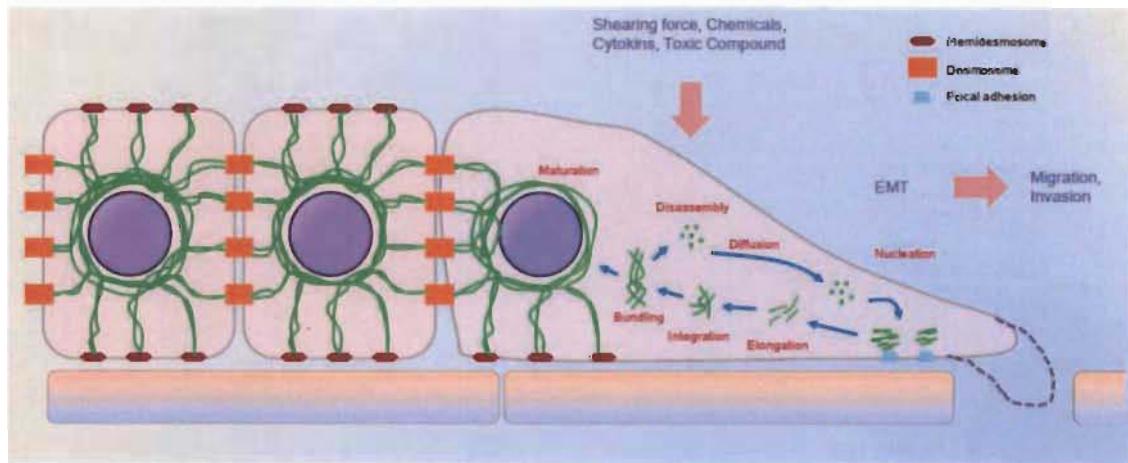


Figure 1.4 La phosphorylation des kératines permet la réorganisation du réseau de FIs et favorise la migration cellulaire (Kim *et al.* 2015).

En fait, la phosphorylation des protéines de FIs a des effets divers dépendant du type de FIs impliqués, du site de phosphorylation et de l'état de la cellule. Par exemple, la phosphorylation des FIs de kératines sur des sites spécifiques, suite à un stress, jouerait un rôle protecteur pour les cellules (Figure 1.3C) (Fortier *et al.* 2010, Helenius *et al.* 2016). Notamment, la phosphorylation des kératines 8 et 18 sur la sérine 73 et la sérine 52 respectivement protège les cellules contre l'apoptose induite par les stress mécaniques et toxiques (Ku *et al.* 1998, Ku et Omari 2006). Le mécanisme moléculaire qui est impliqué dans cette protection cellulaire est encore mal connu.

Au cours du développement de maladies chroniques, la phosphorylation des FIs est associée à la formation d'agrégats. L'agrégation de FIs est observée dans certaines maladies neurodégénératives (Figure 1.3B), dans l'hépatite chronique et dans certaines

maladies dégénératives musculaires (Figure 1.3F). La phosphorylation des protéines de FIs permettrait leur ubiquitination et leur dégradation par le système des protéasomes. Une surcharge du système de dégradation des protéines par les protéasomes entraînerait l'accumulation de protéines dans le cytoplasme sous forme d'agrégats (Snider et Omary 2014). L'agrégation des protéines de FIs est parfois considérée comme une forme de protection de la cellule contre le stress.

1.1.2 Les kératines

Les kératines sont les principaux FIs exprimés dans les cellules épithéliales. La distribution des diverses kératines dépend du type de tissu et de l'état de différenciation cellulaire. Généralement, le dimère de K8/18 est la première paire de kératines exprimée dans les cellules épithéliales. Les hépatocytes expriment les K8/18 comme seules protéines de FIs cytoplasmiques, ce qui en fait un modèle intéressant pour l'étude des kératines. En plus d'être l'un des principaux composants du cytosquelette des cellules épithéliales, les kératines jouent un rôle dans le maintien de la force mécanique des tissus via leurs liaisons aux desmosomes et aux hémidesmosomes. Ce rôle des kératines a été amplement étudié dans les cellules de la peau, de la cornée et du foie suite à l'identification de mutations des kératines fragilisant les tissus. Par exemple, une mutation des K14 ou des K5 favorise le développement de l'épidermolyse bulleuse simple, une maladie de la peau caractérisée par l'apparition de lésions cutanées et de vésicules épidermiques (Coulombe *et al.* 1991, Knobel *et al.* 2015). Les kératines semblent également impliquées dans la régulation de processus métaboliques contrôlant l'apoptose, la croissance, la prolifération et la migration cellulaire (Pan *et al.* 2013, Snider et Omary 2014). Cependant, les mécanismes moléculaires qui régulent ces fonctions sont encore mal connus. Une des hypothèses les plus étudiées est que les différentes fonctions des kératines pourraient être régulées par les modifications post-traductionnelles dont principalement la phosphorylation (Ku *et al.* 2002, Toivola *et al.* 2004, Ku *et al.* 2010, Karantza 2011, Busch *et al.* 2012, Homberg et Magin 2014, Snider et Omary 2014, Loschke *et al.* 2015, Snider et Omary 2016).

De nombreuses études ont montré que les K8 et K18 sont phosphorylées sur des sites spécifiques (Karantza 2011, Homberg et Magin 2014, Honma et Harada 2014, Snider et Omary 2014). En effet, la K8 est, selon le niveau d'activité de la cellule, phosphorylée sur les séries 23, 73 et 431 tandis que la K18 est phosphorylée sur les séries 33 et 52 (Homberg et Magin 2014, Honma et Harada 2014). Plusieurs événements cellulaires ont été associés à la phosphorylation de ces différentes séries (Figure 1.3). Entre autres, l'hyperphosphorylation de ces sites des K8/18 a été observée au cours de la mitose (Homberg et Magin 2014). Il a été démontré que le cycle cellulaire est contrôlé par la phosphorylation de la sérine 33 des K18 qui régule son association avec la protéine 14-3-3 (Hyder *et al.* 2008). D'autre part, la phosphorylation des K8/18 est également associée à la protection des cellules contre le stress. Par exemple, suite au stress oxydatif causé par l'intoxication de souris avec la griséofulvine, il y a une augmentation de la phosphorylation de K8 (S73 et S431) et de K18 (S33) dans les hépatocytes (Fortier *et al.* 2010). De même, la mutation des K8 et K18 sur ces sites de phosphorylation favorise l'apparition de maladie chronique du foie. En effet, l'utilisation de souris transgéniques a permis de montrer que la mutation des K8 et K18 sur ces sites conservés sensibilise les cellules du foie à des agents toxiques et favorise ainsi l'apparition de maladie chronique (Dullaart et Mousquès). La phosphorylation des kératines, entre autres sur la sérine 73 de K8, permet également la réorganisation du réseau de FIs (Honma et Harada 2014). La réorganisation du cytosquelette est non seulement nécessaire à la progression du cycle cellulaire, mais également à la migration cellulaire. Pour l'instant, aucun phénomène cellulaire n'a été associé à la phosphorylation de la sérine 23 de la K8. De nouvelles études seront donc nécessaires afin d'identifier la fonction de ce site de phosphorylation.

La phosphorylation des kératines permettrait donc de réguler plusieurs fonctions cellulaires, dont la progression du cycle cellulaire et la réorganisation du réseau de filaments intermédiaires nécessaire à la migration cellulaire. Les études récentes réalisées dans notre laboratoire montrent qu'il existe un lien entre la présence des kératines et l'activité d'une voie de signalisation cellulaire qui joue un rôle prépondérant dans le développement du cancer et de la formation de métastase, la voie PI3K/Akt/NF-κB

(Fortier *et al.* 2013). Il est donc possible de croire que les kératines et leur phosphorylation jouent un rôle dans le développement du cancer et de la formation de métastases.

1.2 Le cancer

Au Canada, le cancer est la principale cause de décès. Environ 2 Canadiens sur 5 développeront un cancer au cours de leur vie, et 1 Canadien sur 4 en décèdera. Plusieurs facteurs peuvent favoriser l'apparition d'un cancer, dont l'âge, le sexe, les prédispositions génétiques, l'environnement et les habitudes de vie telles que l'usage du tabac et la consommation d'alcool. Une augmentation de nouveaux cas est attendue dans les prochaines années suite, principalement, au vieillissement de la population. (Canadian Cancer Society. 2015). Il est donc primordial de comprendre les mécanismes moléculaires qui sont impliqués dans le développement de cancers.

Le cancer est caractérisé par la prolifération anormale et incontrôlée de cellules ayant subi une série de modifications génétiques. Ces modifications génétiques sont généralement causées par des mutations, des délétions, des amplifications génomiques et des translocations chromosomiques ainsi que par des facteurs épigénétiques comme la méthylation de l'ADN et la modification des histones (Armstrong 2014). Ces changements au niveau du génome affectent l'équilibre entre la mort et la survie cellulaire en modifiant l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes. En effet, au cours du développement du cancer, les gènes suppresseurs de tumeurs, qui sont responsables de freiner la progression tumorale, vont généralement subir une perte de fonction tandis que les oncogènes, qui favorisent la progression tumorale, vont gagner de nouvelles fonctions. Les cellules cancéreuses ont la capacité d'échapper au système immunitaire et d'être résistantes aux facteurs induisant la mort cellulaire. Les cellules cancéreuses ont aussi la capacité d'induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins permettant l'apport d'oxygène à la masse tumorale et ainsi favoriser sa croissance. (Figure 1.5) (Hanahan et Weinberg 2011).

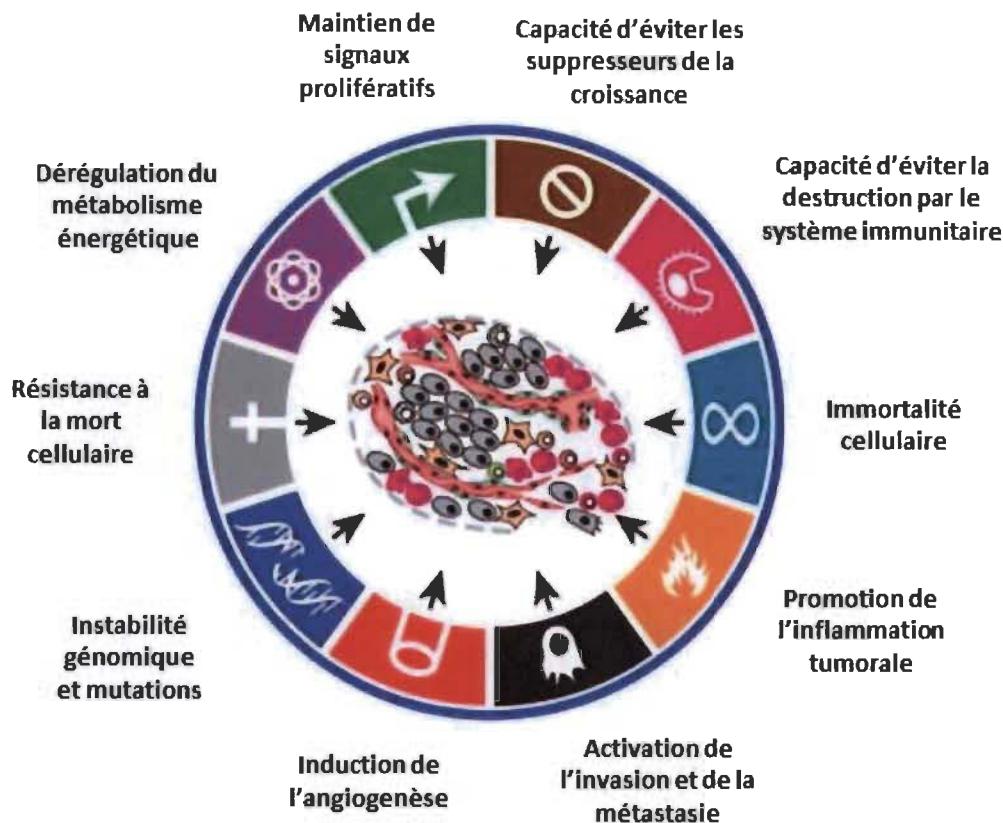


Figure 1.5 Les propriétés du cancer.

La progression tumorale est favorisée par des propriétés distinctes et complémentaires. Ces propriétés sont ciblées lors de l'élaboration de stratégies thérapeutiques. (Adaptée de Hanahan et Weinberg 2011.)

Les principaux traitements du cancer sont l'extraction de la tumeur par chirurgie, à radiothérapie et la chimiothérapie. Certains types de cancers vont aussi nécessiter d'autres types de traitements tels que l'immunothérapie ou l'hormonothérapie. En absence de traitement, les cellules cancéreuses vont d'abord proliférer à l'endroit de la tumeur primaire. L'acquisition de propriétés telles que la motilité et l'invasion cellulaire va, par la suite, favoriser la formation de métastases (Figure 1.6). En effet, les cellules cancéreuses peuvent acquérir de nouvelles propriétés leur permettant de s'échapper de la tumeur primaire et rejoindre les circulations sanguine et lymphatique. Ainsi, les cellules cancéreuses sont transportées vers les organes vitaux distants où elles vont former des tumeurs secondaires, les métastases. La formation de métastases est la principale cause de mortalité des suites du cancer puisque celles-ci vont interférer avec les fonctions des

organes vitaux (Fife *et al.* 2014). L'un des processus menant à la formation de tumeurs secondaires à partir de tissus épithéliaux est la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT). Les cellules épithéliales tumorales acquièrent alors des caractéristiques de cellules mésenchymateuses, ce qui leur donne la capacité de se déplacer dans les tissus et migrer dans les vaisseaux sanguins afin de coloniser d'autres tissus. L'expression de différentes protéines dans les cellules cancéreuses permet de déterminer l'origine de la tumeur et de déterminer le stade de progression tumorale.

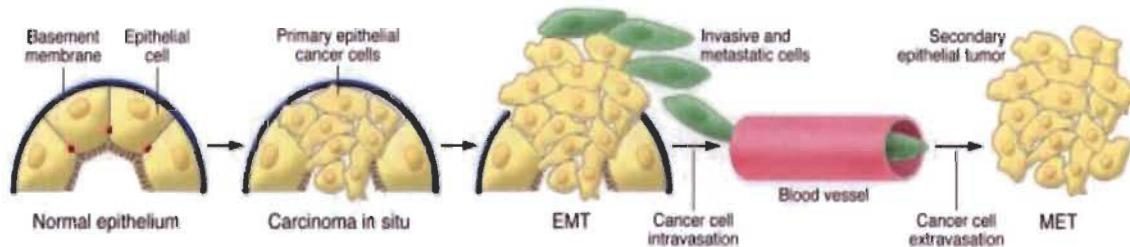


Figure 1.6 La progression tumorale et la formation de métastases (Kalluri et Weinberg 2009).

En raison de la complexité des mécanismes régulant la progression tumorale, il devient nécessaire de mieux comprendre l'implication des différentes protéines dont l'expression est modulée au cours du développement de cancers et de la formation de métastases.

1.2.1 Les filaments intermédiaires, marqueurs de la progression tumorale

Depuis déjà plusieurs années, en oncologie, l'expression des différents types de filaments intermédiaires est utilisée pour déterminer, entre autres, l'origine des métastases (Moll *et al.* 2008, Joosse *et al.* 2012, Dey *et al.* 2014, Knobel *et al.* 2015, Toivola *et al.* 2015). Les marqueurs les plus communs utilisés pour émettre un diagnostic et dans certains cas le pronostic sont les kératines (Figure 1.7) et la vimentine. L'expression des différentes kératines permet de déterminer l'origine de la tumeur puisque ces protéines sont exprimées de manière tissu-spécifique (Kim *et al.* 2015, Toivola *et al.* 2015). Le niveau d'expression des kératines et de la vimentine permet également de déterminer le stade de la progression tumorale. Par exemple, l'expression des K17 dans les cellules

cancéreuses de l'estomac, de l'ovaire ou encore de la thyroïde favorise la formation de métastases ganglionnaires (Kim *et al.* 2015). De même, les cellules d'hépatocarcinome exprimant les K19 sont résistantes aux traitements chimiothérapeutiques (Toivola *et al.* 2015). La présence de ces protéines permet donc d'orienter l'approche thérapeutique. Bien que les kératines soient pour le moment principalement utilisées à des fins diagnostiques, des études récentes montrent qu'elles jouent un rôle dans les mécanismes moléculaires qui contrôlent la progression tumorale (Karantza 2011, Loschke *et al.* 2015).

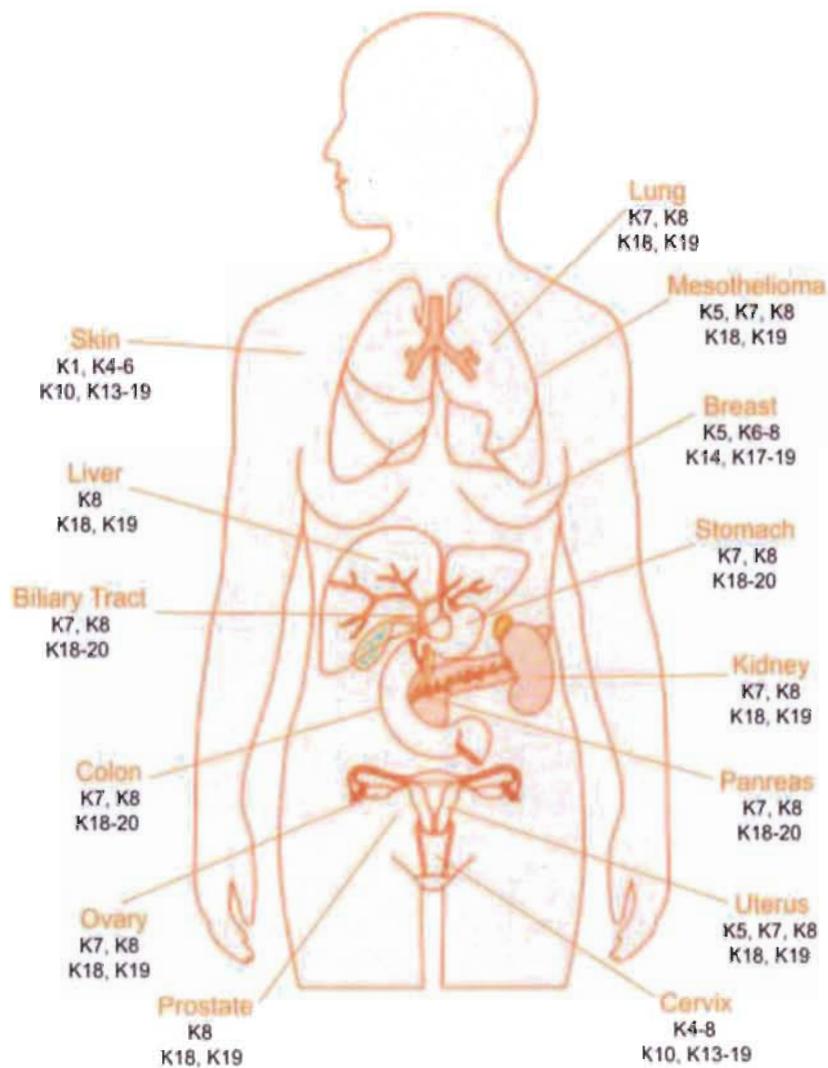


Figure 1.7 Distribution des kératines couramment utilisées dans le diagnostic de cancers d'origine épithéliale (Karantza 2011).

1.2.2 La transition épithéliale-mésenchymateuse

La transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) est un processus important dans le développement embryonnaire et dans la progression tumorale. Cette transition est divisée en trois catégories, l'EMT de type I, de type II et de type III (Figure 1.8). L'EMT de type I est observée lors de l'implantation, de l'embryogenèse et lors du développement des organes. L'EMT de type II est quant à elle associée à la régénération et à la formation de fibrose dans les tissus. Enfin, l'EMT de type III est liée à la progression tumorale et à la formation de métastases (Kalluri et Weinberg 2009).

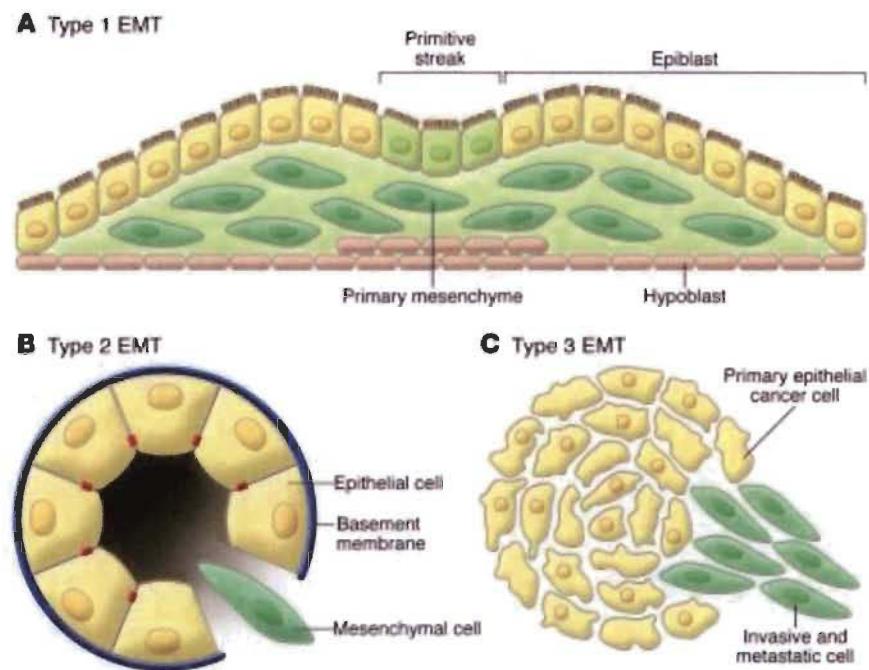


Figure 1.8 Les trois différents types d'EMT.

- A. l'EMT de type I est essentiel au développement embryonnaire puisqu'elle est impliquée dans la formation du mésenchyme primaire.
- B. l'EMT de type II favorise l'apparition de fibrose suite à l'inflammation
- C. l'EMT de type III favorise la motilité et l'invasion des cellules épithéliales cancéreuses (Kalluri et Weinberg 2009).

Lors de la progression des cancers épithéliaux, les cellules épithéliales subissent plusieurs changements biochimiques leur permettant d'acquérir un phénotype mésenchymateux, soit une morphologie allongée (Boyer *et al.* 2000, Savagner 2001, Lee *et al.* 2006). Les cellules épithéliales interagissent normalement avec la membrane basale

où elles y sont ancrées par des jonctions cellulaires. Les cellules sont aussi liées entre elles par des jonctions cellulaires. Les modifications morphologiques des cellules apparaissent lorsque les protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire comme l'E-cadhérine et les protéines des jonctions cellulaires comme les desmosomes ne sont plus exprimées. Il y a alors perte de la polarité cellulaire et allongement des cellules, phénomènes qui favorisent la motilité et l'invasion cellulaire (Yang et Weinberg 2008, Kalluri et Weinberg 2009, Li et Zhou 2011, Cichon et Radisky 2014, Homberg et Magin 2014, Fischer *et al.* 2015, Kwan *et al.* 2015). Les cellules cancéreuses ont ainsi acquis la capacité de rejoindre la circulation sanguine ou lymphatique et se disséminer dans d'autres organes. Une fois le nouveau site tumoral atteint, les cellules cancéreuses retrouvent leur phénotype épithélial d'origine via le processus inverse de l'EMT, soit la transition mésenchymateuse-épithéliale (MET) (Figure 1.6) (Lee *et al.* 2006, Kalluri et Weinberg 2009, Satelli et Li 2011, Fischer *et al.* 2015, Qiu *et al.* 2015).

L'EMT est associée à une modification de l'expression (augmentation ou diminution) de plusieurs protéines (Figure 1.9). Le facteur de croissance transformant bêta (TGF- β) est connu pour entraîner l'EMT. En fait, il induit l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui a pour effet d'augmenter l'expression de protéines extracellulaires telles que les métalloprotéinases matricielles (MMP) (Lee *et al.* 2006, Kalluri et Weinberg 2009, Zeng *et al.* 2014) qui ont la capacité de dégrader la matrice extracellulaire (Cichon et Radisky 2014). L'activité des facteurs de transcription Twist et Snail ainsi que l'activité des répresseurs de l'E-cadherin Slug, Zeb 1 et Zeb 2 est également augmentée lors de l'EMT (Lee *et al.* 2006, Fischer *et al.* 2015).

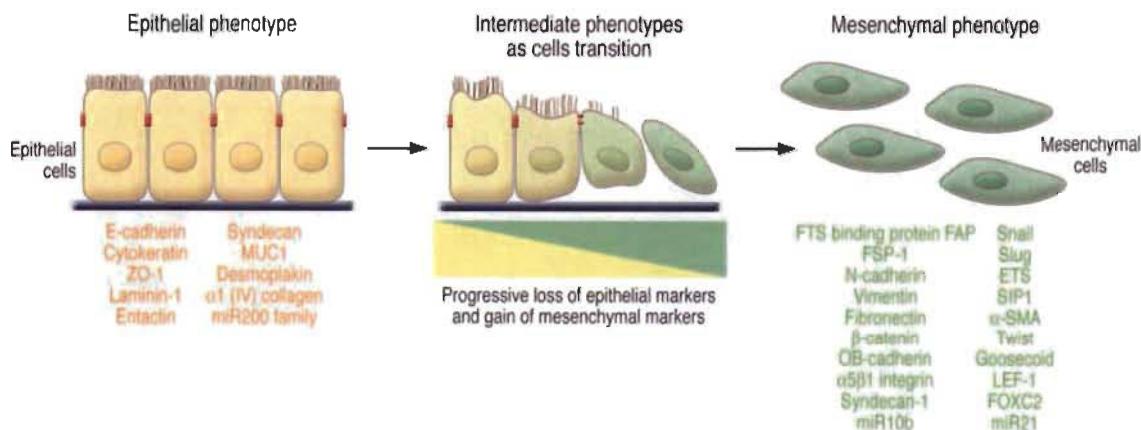


Figure 1.9 Les différents marqueurs de l'EMT.

Lors de l'EMT, les cellules épithéliales vont progressivement perdre leurs marqueurs spécifiques pour acquérir un phénotype mésenchymateux (Kalluri et Weinberg 2009).

1.2.2.1 *Les filaments intermédiaires et la transition épithéliale-mésenchymateuse*

La régulation de l'expression des protéines des FIs de kératines et de vimentine représente un phénomène important dans le processus de l'EMT. Normalement, lors de cette transition, il y a dans les cellules épithéliales une diminution de l'expression des kératines et une augmentation de la vimentine, une protéine d'origine mésenchymale qui n'est pas présente dans les cellules épithéliales. En tentant de mieux comprendre le rôle de ce changement dans l'expression des FIs, des chercheurs ont mis en évidence la relation entre les FIs de kératines et de vimentine et la migration cellulaire (McInroy et Maatta 2007, Li et Zhou 2011, Fortier *et al.* 2013, Kwan *et al.* 2015).

Des études récentes montrent qu'il semble y avoir une forte corrélation entre le niveau d'expression des kératines et la motilité cellulaire. En effet, la surexpression des K8/18 dans les cellules cancéreuses du sein ou des K19 dans les cellules cancéreuses du poumon entraîne la diminution de la migration et de l'invasion cellulaire (Joosse *et al.* 2012, Yi et Ku 2013) alors que la déplétion des K8/18 dans les cellules cancéreuses épithéliales du sein, du colon, du col de l'utérus ainsi que du foie favorise la motilité et l'invasion cellulaire (Joosse *et al.* 2012, Fortier *et al.* 2013, Homberg et Magin 2014, Kwan *et al.* 2015, Loschke *et al.* 2015). Il faut toutefois noter que l'inhibition de l'invasion cellulaire par la modification de l'expression des kératines semble dépendre des

différentes lignées cellulaires étudiées et des kératines qui y sont exprimées (Kwan *et al.* 2015). En effet, contrairement à ce qui est observé lors de la surexpression des K8/18, les kératines 14 exprimées dans les cellules cancéreuses du sein entraînent l'invasion de groupes de cellules, c'est-à-dire, l'invasion collective (Cheung *et al.* 2013, Cheung et Ewald 2014). Pour ce qui est de la vimentine, il existe une corrélation entre l'occurrence des métastases et l'expression de la vimentine (Chernoivanenko *et al.* 2013, Yi et Ku 2013). Il a été démontré qu'*in vitro* la surexpression de la vimentine entraîne une augmentation de la migration cellulaire alors que le knockdown de la vimentine, entre autres par shRNA, entraîne la diminution de la migration cellulaire (Yi et Ku 2013, Leduc et Etienne-Manneville 2015). L'ensemble de ces études suggère donc que les kératines inhibent généralement la migration cellulaire alors que la présence de vimentine favorise celle-ci.

1.3 Régulation de l'homéostasie cellulaire par Akt

La protéine Akt, aussi connue sous le nom de protéine kinase B (PKB), est une kinase de type sérine/thréonine qui joue un rôle central dans l'homéostasie de la cellule. En effet, cette kinase participe à la régulation de la survie, de la croissance, de la prolifération et de la migration cellulaire en plus de participer au métabolisme du glucose (Gonzalez et McGraw 2009, Corum *et al.* 2014).

L'implication d'Akt dans diverses fonctions cellulaires est le résultat des différents rôles des trois isoformes (Akt1/PKB α , Akt2/PKB β et Akt3/PKB γ). La plupart des tissus expriment les trois isoformes d'Akt. Cependant, le niveau d'expression de chacun des isoformes varie selon le type de tissus. Par exemple, les cellules de foie expriment majoritairement Akt1 et Akt2, tandis qu'Akt3 est faiblement exprimée (Grabinski *et al.* 2012). En fait, l'expression d'Akt3 est principalement observée dans le cerveau (Fortier *et al.* 2011). L'étude des différents isoformes d'Akt a révélé que ces protéines ont des fonctions principales distinctes. En effet, l'utilisation de souris déficientes en Akt1, Akt2 ou Akt3 a permis d'observer des anomalies spécifiques à chacun des isoformes et ainsi identifier leur principale fonction. Les souris déficientes en Akt1 ont montré des signes de

retard de croissance ainsi qu'une diminution de la taille de leurs organes. En absence d'Akt1, les cellules sont également plus susceptibles à la mort par apoptose. Akt1 est donc principalement impliquée dans la croissance et la survie cellulaire (Chen *et al.* 2001, Cho *et al.* 2001). Quant à elle, l'absence d'Akt2 chez la souris a entraîné une résistance à l'insuline proposant une fonction d'Akt2 dans le métabolisme du glucose (Cho *et al.* 2001). Chez les souris déficientes en Akt3, la diminution de la taille du cerveau a été observée suggérant le rôle d'Akt3 dans le développement du cerveau (Tschopp *et al.* 2005). L'absence d'un seul isoformes d'Akt n'est pas létale chez les souris. Cela suggère une redondance fonctionnelle de ces protéines. Des études phénotypiques ont donc été effectuées sur des souris déficientes en deux isoformes d'Akt. La délétion d'Akt1 et d'Akt2 dans les souris a causé leur mort peu après leur naissance. Quant à elle, la déficience en Akt1 et Akt3 dans les souris a résulté en une létalité embryonnaire. Au contraire, malgré une taille réduite et une intolérance au glucose et à l'insuline, les souris déficientes en Akt2 et en Akt3 sont viables (Gonzalez et McGraw 2009).

Les isoformes d'Akt sont constitués de trois domaines (Figure 1.10), c'est-à-dire le domaine N-terminal *pleckstrin homology* (domaine PH), le domaine catalytique et le domaine C-terminal hydrophobe (Wang et Brattain 2006, Fabi et Asselin 2014). Le domaine PH est responsable du recrutement d'Akt à la membrane de par son affinité avec PIP₃. Quant à eux, les domaines catalytique et C-terminal contiennent chacun un résidu régulant l'activation d'Akt, soit la thréonine 308 pour le domaine catalytique et la sérine 473 pour le domaine c-terminal.

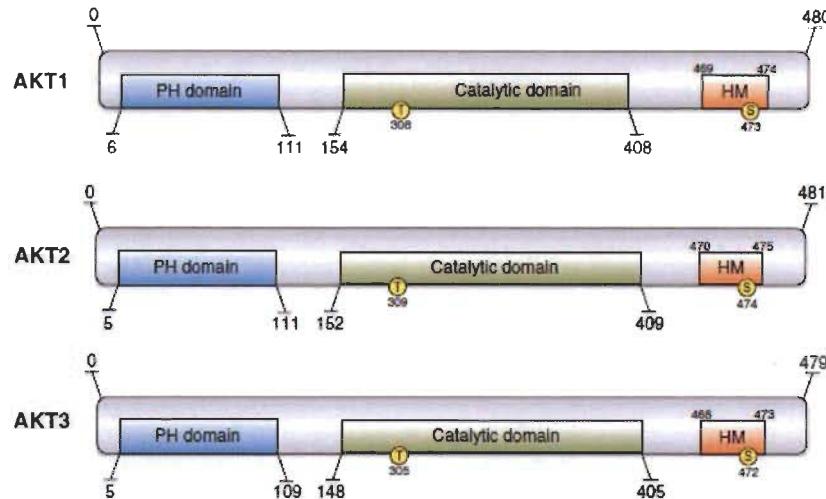


Figure 1.10 Stucture des isoformes d'Akt.

Les isoformes d'Akt ont une structure similaire composée d'un domaine N-terminal pleckstrin homology (domaine PH), d'un domaine catalytique et d'un domaine C-terminal hydrophobe (Fabi et Asselin 2014).

Akt1 et Akt2 sont généralement localisées dans le cytoplasme (Wang et Brattain 2006) tandis qu'Akt3 est majoritairement localisée au niveau du noyau (Fortier *et al.* 2011, Fabi et Asselin 2014) (Figure 1.11).

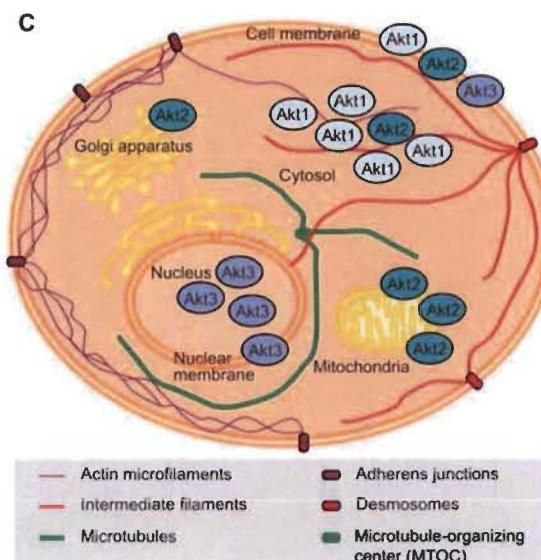


Figure 1.11 Localisation intracellulaire des différents isoformes d'Akt (Fortier *et al.* 2011).

Dans les cellules épithéliales, l'activation d'Akt est le résultat d'une cascade d'activation impliquant de nombreuses protéines (Figure 1.12). Les récepteurs tyrosine kinase (RTK) doivent d'abord être activés suite à la liaison de leur ligand (ex : *Insulin Growth Factor*, *Epithelial Growth Factor* et insuline). Une fois les récepteurs activés, la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) acquiert la capacité de phosphoryler les phosphoinositides jusqu'à l'obtention de PIP₃. PIP₃ a une forte affinité avec les protéines possédant un domaine spécifique tel que le domaine PH, ce qui favorise le recrutement membranaire de certaines protéines. Ainsi, l'augmentation de PIP₃ à la membrane permet le recrutement d'Akt. Akt sera par la suite phosphorylée par la 3-phosphoinositide-dependant kinase 1 (PDK1) sur un résidu thréonine de son domaine catalytique (T308, T309 et T305 pour Akt1, Akt2 et Akt3 respectivement). Afin d'être pleinement actif, Akt va également être phosphorylée sur une sérine du domaine c-terminal (S473, S474 et S472 pour Akt1, Akt2 et Akt3 respectivement), soit par autophosphorylation ou par l'action d'autres kinases telles que PDK2, la protéine kinase C (PKC) ou encore la *mammalian target of the rapamycin complex 2* (mTORc2). L'activité d'Akt est également contrôlée par la phosphatase PTEN qui permet la déphosphorylation de PIP₃.

L'activation d'Akt entraîne l'activation du complexe IKK. Ce complexe est formé de trois sous-unités, soit IKK α et IKK β qui sont les sous-unités catalytiques et IKK γ , aussi connue sous le nom de NEMO (NF- κ B essential modulator), qui est le domaine régulateur du complexe. Dans les cellules cancéreuses, la sous-unité IKK β favorise la progression tumorale puisqu'elle est requise à l'activation de NF- κ B (Liu *et al.* 2012). Au contraire, lorsque surexprimée dans les cellules de la peau, la protéine IKK α empêche la progression tumorale puisqu'elle devient, entre autres, un répresseur du récepteur de l'*Epithelial Growth Factor* et de la kinase ERK (Liu *et al.* 2011, Liu *et al.* 2012). Lorsqu'il est activé, le complexe IKK a pour principal rôle de phosphoryler I κ B.

La phosphorylation d'I κ B entraîne son ubiquitination et sa dégradation dans le protéasome ainsi que la libération de NF- κ B. I κ B séquestre normalement NF- κ B dans le cytoplasme afin d'empêcher son activité en tant que facteur de transcription (Moser *et al.* 2011). Donc, en absence de I κ B, NF- κ B peut transloquer au noyau et procéder à la

transcription de gènes impliqués dans croissance et dans la migration cellulaire. En effet, nous avons montré en 2013 que lorsque la protéine NF-κB est activée, elle se transloque au noyau afin de procéder à la transcription, entre autres, de MMP2 et MMP9, des métalloprotéinases sécrétées par les cellules afin de dégrader la matrice extracellulaire et favoriser la migration cellulaire (Fortier *et al.* 2013).

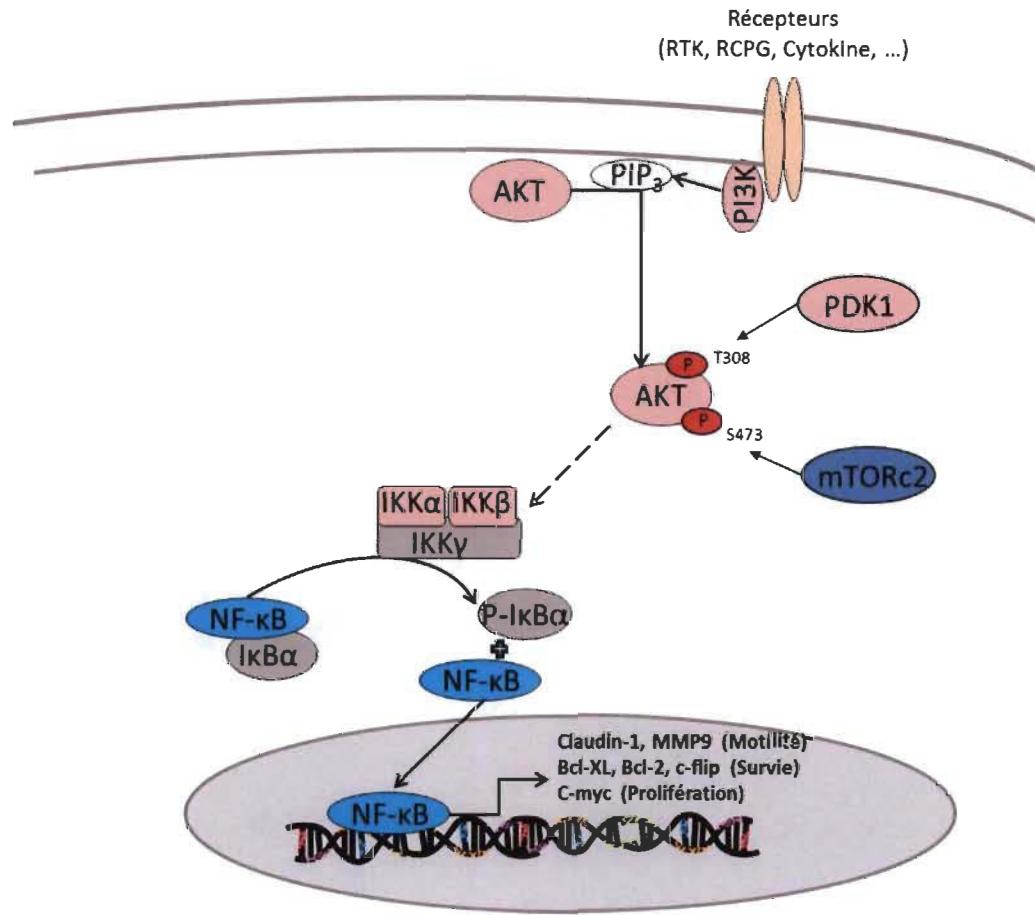


Figure 1.12 La cascade d'activation de la voie PI3K/Akt/NF-κB.

1.3.1 La voie de signalisation PI3K/Akt/NF-κB et le cancer

La voie de signalisation PI3K/Akt/NF-κB est un important régulateur de la croissance tumorale, de la motilité cellulaire, de l'angiogenèse ainsi que de la réponse potentielle aux traitements anti-cancéreux (Jiao *et al.* 2013). Cette voie de signalisation cellulaire est connue pour être dérégulée dans une variété de tumeurs (Badura *et al.* 2013). En effet, différents travaux de recherche ont démontré qu'Akt est l'une des kinases

les plus fréquemment hyperactivée et/ou surexprimée dans les cas de cancers (Figure 1.13) (Wang et Brattain 2006, Gonzalez et McGraw 2009, Fortier *et al.* 2011). Une augmentation de l'expression et de l'activité d'Akt1 a été observé dans environ 40 % des cancers du sein et de l'ovaire et dans plus de 50 % des cancers de type carcinome de la prostate (Fortier *et al.* 2011). Dans les cas de cancer colorectal et de carcinome hépatocellulaire, c'est plutôt l'activité et l'expression d'Akt2 qui est augmentée (Gonzalez et McGraw 2009). L'isoforme Akt3 est quant à lui surexprimé et activé principalement lors de cancer du cerveau et de cancer de la peau (Fortier *et al.* 2011).

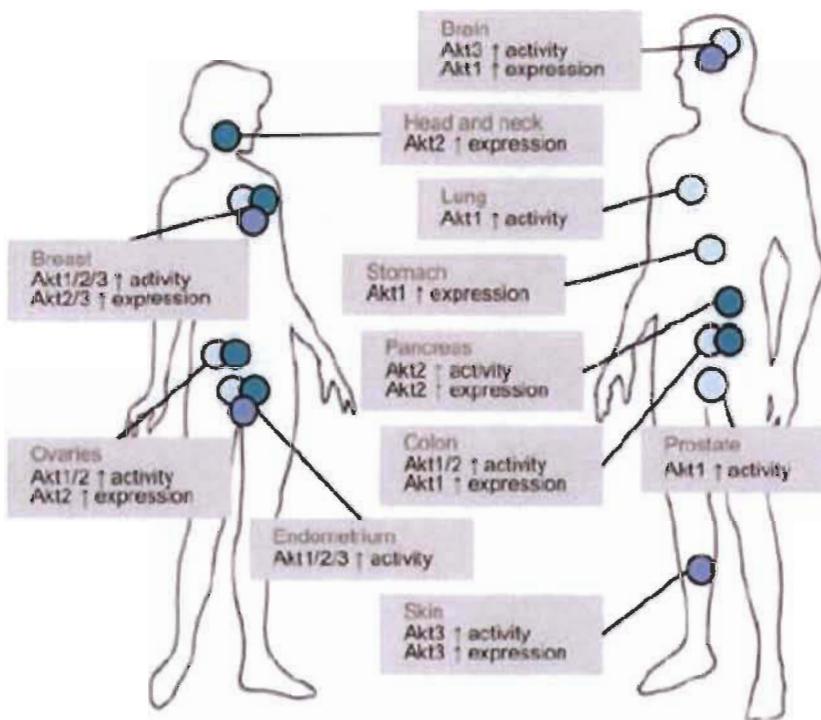


Figure 1.13 Activation des différents isoformes d'Akt lors de la progression tumorale (Fortier *et al.* 2011).

La protéine Akt est en effet un proto-oncogène redoutable puisqu'elle est l'une des protéines centrales de la prolifération cellulaire (Fortier *et al.* 2011). Dans les cancers de type hépatocarcinome, l'activation d'Akt (phosphorylation sur la sérine 473) a été détectée dans plus de 71 % des cas. Son activité a été associée à l'invasion cellulaire, la métastasie et la vascularisation de ce type de tumeurs (Grabinski *et al.* 2012). La motilité et l'invasion cellulaire résultant de l'activation d'Akt est généralement le résultat de l'activation du

facteur de transcription NF-κB qui entraîne la production de MMP-9 et ainsi la dégradation de la matrice extracellulaire (Fortier *et al.* 2011). En général, chacun des isoformes a un rôle prépondérant dans la progression tumorale. L'isoforme Akt1 est particulièrement impliqué dans la croissance tumorale. En effet, les chercheurs ont montré que l'absence d'Akt1 retarde la formation de tumeurs dans un modèle de cancer du sein chez les souris (Maroulakou *et al.* 2007). De son côté, Akt2 favorise la formation de métastases puisque l'inhibition d'Akt2 par un siARN dans un modèle de cancer colorectal chez la souris a permis d'observer une diminution du nombre de métastases (Rychahou *et al.* 2008). Pour ce qui est d'Akt3, cet isoforme participe principalement à la prolifération des cellules qui l'exprime comme les cellules de mélanomes (Gonzalez et McGraw 2009, Fortier *et al.* 2011, Grabinski *et al.* 2012).

1.3.2 La relation entre les protéines de filaments intermédiaires de kératines et la voie de signalisation PI3K/Akt/NF-κB

Depuis plusieurs années, notre laboratoire s'intéresse à la relation entre Akt et les FIs de kératines. Des études suggèrent que le rôle d'Akt dans les tumeurs épithéliales pourrait être médié ou dépendre en partie des kératines (Karantza 2011, Pan *et al.* 2013). En 2010, nous avons démontré que l'activation d'Akt1 et d'Akt2 via la stimulation par TGF-β1 et l'insuline dans les cellules HepG2 et Hela affecte l'expression des K8/18, et ce, d'une manière isoforme dépendante (Fortier *et al.* 2010). En effet, lorsque l'isoforme Akt1 est actif, il y a augmentation de la quantité de K8/18 dans les cellules. Quant à l'isoforme Akt2, son activation entraîne une augmentation de la quantité de K18 uniquement. Le déséquilibre du niveau d'expression des K8/18 peut s'expliquer par le fait que les K18 ont la capacité d'interagir avec la vimentine pour former des hétérodimères. Cette étude a également démontré qu'Akt2 a la capacité de réorganiser le cytosquelette de FIs de kératines et de vimentine dans les cellules épithéliales cancéreuses. En effet, la surexpression d'Akt2 entraîne la localisation juxtanucléaire du réseau de kératines et de vimentine (Fortier *et al.* 2010).

Plus récemment, nous avons démontré que l'activation de la voie PI3K/Akt/NF-κB dépend, entre autres, de la présence ou de l'absence des kératines. La diminution

d'expression des K8/18 dans les cellules d'hépatocarcinome HepG2 et dans les cellules cancéreuses de l'endomètre KLE favorise la migration et l'invasion cellulaire. L'acquisition de ces nouvelles caractéristiques est le résultat de l'activation de la voie PI3K/Akt/NF-κB (Fortier *et al.* 2013).

1.4 Hypothèse et objectifs

Depuis plusieurs années, les études tendent à montrer que les kératines jouent un rôle important dans la progression tumorale. En effet, la perte d'expression des kératines au cours de l'EMT favorise la motilité et l'invasion cellulaire. La voie de signalisation PI3K/Akt/NF-κB, qui est généralement hyperactivée dans les cancers, favorise également la progression tumorale. La relation entre les kératines et la voie de signalisation PI3K/Akt/NF-κB a cependant été peu étudiée. La découverte faite récemment par notre laboratoire à savoir que l'absence des K8/18 favorise l'activation de la voie PI3K/Akt/NF-κB suggère que les K8/18 pourraient interagir directement avec des protéines de cette voie de signalisation en les séquestrant dans le cytoplasme, ce qui jouerait un rôle dans leur activation.

Ce projet de recherche a donc pour objectif de déterminer le mécanisme par lequel les kératines jouent un rôle dans la régulation de la voie de signalisation PI3K/Akt/NF-κB. Plus spécifiquement, l'objectif de ma recherche était de déterminer si des protéines de la voie de signalisation PI3K/Akt/NF-κB sont directement liées aux protéines de filaments intermédiaires K8/18 dans les cellules épithéliales cancéreuses. De façon plus générale, nous croyons que les protéines de filaments intermédiaires pourraient séquestrer les protéines de cette voie de signalisation. Suite à une modification post-traductionnelle des kératines, les protéines pourraient être soit libérées afin d'être activées ou séquestrées afin d'inhiber leur activation.

CHAPITRE II

KERATINS 8 AND 18 ARE ASSOCIATED WITH PI3K/Akt/NF-κB SIGNALING PROTEINS IN EPITHELIAL CANCER CELLS

Le contenu de ce chapitre fait l'objet d'une publication en anglais qui sera soumis prochainement à la revue FEBS Letter.

2.1 Contribution des auteurs

Les auteurs de cet article sont Stéphanie Lamontagne (conception de l'étude, réalisation des expérimentations et rédaction du manuscrit), Éric Asselin (codirecteur de recherche) et Monique Cadrin (directrice de recherche, conception de l'étude et rédaction du manuscrit).

2.2 Résumé de l'article

Les filaments intermédiaires (FIs) forment une grande famille de protéines composant le cytosquelette des cellules. Dans les cellules épithéliales, les FIs exprimés sont les kératines. Les kératines 8 et 18 (K8/18) forment un dimère exprimé dans la majorité des cellules de l'épithélium simple. Les K8/18 ont plusieurs fonctions. En effet, elles participent à la protection des cellules contre les stress mécaniques et toxiques, ainsi qu'à la régulation de processus métaboliques impliqués dans la croissance, la prolifération, la migration cellulaire et l'apoptose. Il y a quelques années, notre laboratoire a montré que l'absence de K8/18 dans les cellules d'hépatocarcinome HepG2 et dans les cellules cancéreuses de l'endomètre KLE favorise la motilité et l'invasion cellulaire via l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt/NF-κB. Cette étude suggère l'existence d'interactions entre les kératines et les protéines de cette voie de signalisation.

Dans la présente étude, nous avons montré l'existence d'une interaction physique entre les protéines de la voie PI3K/Akt/NF-κB et les K8/18. Nos résultats d'immunoprecipitation suggèrent que les kératines peuvent s'associer aux protéines de la voie PI3K/Akt/NF-κB. En effet, les K8/18 ont la capacité d'associer les protéines PI3Kp110 α , Akt, IKK β et NF-κB. L'étude de la colocalisation indique également que les kératines associent Akt dans le cytoplasme et près de la membrane plasmique tandis qu'elles s'associent à NF-κB principalement près de la membrane plasmique. Afin de mieux comprendre la relation entre Akt et les K8/18, nous avons également étudié les différents isoformes d'Akt. Ainsi, nous avons montré que les kératines se lient à Akt1 et Akt2. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que les kératines et des protéines de la voie PI3K/Akt/NF-κB peuvent s'associer et possiblement participer à leur localisation cellulaire et à la régulation de leur fonction.

2.3 Article scientifique

Keratins 8 and 18 are associated with PI3K/Akt/NF-κB signaling proteins in epithelial cancer cells

Stéphanie Lamontagne, Eric Asselin and Monique Cadrin*

Research Group in Cellular Signaling, Department of Medical Biology, Université du Québec à Trois-Rivières, CP 500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7.

*Corresponding author: Université du Québec à Trois-Rivières, 3351, Boul. des Forges, CP 500, Trois-Rivières, PQ G9A 5H7, Canada. Tel.: 819-376-5011, Ext. 3325; Fax: 819-376-5057; E-mail: monique.cadrin@uqtr.ca.

Keywords: keratins, intermediate filaments, Akt isoforms, NF-κB

Summary

Intermediate filaments (IFs) are a family of proteins which form with actin microfilaments and microtubules the cytoskeleton of most mammalian cells. In epithelial cells, keratins are the expressed IFs. Keratin 8 and 18 (K8/18) are usually co-expressed as the primary keratin pair in simple epithelial tissue. K8/18 have several known functions. For example, K8/18 protect cells against mechanical and toxic stress. K8/18 are also involved in metabolic process that regulate cell migration, cell growth and cell death. In a previous study, we have shown in hepatocellular HepG2 and in endometrium cancer cells KLE that K8/18 loss affect positively the activation of the PI3K/Akt/NF-κB pathway. That study suggested that keratins could interact with proteins of the PI3K/Akt/NF-κB pathway. Thus, in the present study we investigated by immunoprecipitation and immunofluorescence if there is a physical interaction between K8/18 and those proteins in different epithelial cancer cell lines. Our results show that K8/18 co-immunoprecipitate with PI3Kp110 α , Akt, IKK β and NF-κB. Moreover, keratins colocalize with Akt in the cytoplasm with a prominent localization at the cell membrane while it colocalize with NF-κB mainly at the cell membrane. As Akt isoforms plays different roles in tumor

progression, we investigated K8/18 association with the different Akt isoforms. Thus, we show that Akt1 and Akt2 can bind K8/18. All together, these results suggest that keratins can associate PI3K/Akt/NF- κ B signaling proteins and could regulate their localization and functions.

Introduction

Intermediate filaments (IFs) constitute with actin microfilaments and microtubules the principal cytoskeletal elements of most mammalian cells. They represent a large family of proteins that are expressed in a tissue- and differentiation state-specific manner. Keratins (K) are the major IF proteins expressed in epithelial cells. They form obligatory heterodimers composed of at least one acidic K (K9-K25, K31-K40) and one neutral basic K (K1-K8, K71-K86) subunits. K8 and K18 (K8/18) are co-expressed as the primary keratin pair in simple epithelia [1, 2].

In tumour pathology, keratins have been used for a long time as diagnostic markers in determining the origin of epithelial cancer cells. Keratins have also been recognized as indicators of prognostic in a variety of epithelial cancer tissues. For instance, a modulation in the level of keratin expression or, the expression of an additional keratin is a sign of poor prognostic. For example, depletion of K8/18 and expression of K14 in breast cancer cells lead to a metastatic progression [3-5]. Interestingly, in the last few years, different studies have provided evidence that keratins are playing an active role in tumor progression [4-10]. In fact, to become metastatic, epithelial cancer cells must undergo a “dedifferentiation” process called epithelial-mesenchymal transition (EMT). This process is associated with an epithelial cell lost of polarity, a reorganisation of cell-cell junctions and a change in the cytoskeleton. The change in keratin expression is one of the important change in the cytoskeleton that is observed in the process of EMT. For instance, the reduction or loss of keratin proteins is often considered as an histological and biochemical feature for tumor cells that are going through an EMT [3, 6, 9, 11]. By acquiring a mesenchymal phenotype, cells express vimentin as IF proteins and become more motile and invasive [1, 8, 9, 12-14]. These cells also express the transcription factors SNAILs and TWIST that repress the expression of the cell junction proteins E-cadherin [15].

We have recently shown that K8/18 knockdown in the hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and in endometrial adenocarcinoma cell line KLE induced cell motility and invasion [6]. It was demonstrated that these changes resulted from the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/NF- κ B signaling pathway which is an important regulator of cell proliferation, survival and migration [6]. The hyperactivation of PI3K/Akt/NF- κ B pathway have been observed in many type of cancer including melanoma and hepatocellular carcinoma [16, 17]. However, the mechanism that link the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway and keratins is not fully understood.

Since depletion of keratin activates the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway, we wanted to better understand the relationship between K8/18 and that pathway. For instance, by using HepG2 and Hep3B which are hepatocellular carcinoma cells and Hela cells which are cervical cancer cells, we wanted to determine if there was a direct association between K8/18 and proteins of the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway.

Materials and methods

Cell Culture

Human cervical carcinoma Hela (ATCC® CCL-2™) and human hepatocellular carcinoma HepG2 (ATCC® HB8065™) and Hep3B (ATCC® HB-8064™) human cell lines were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA). Cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS (HepG2 and Hep3B) or 2% bovine growth serum (Hela) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and 50 μ g/ml gentamycin (Sigma, St-Louis, MO).

Construction of Akt1 and 2 plasmids and Transfection

DDK-tag was introduced to replace the myristylation sequence (Myr) in pcDNA3-Myr-hAkt1 (a gift from William Sellers (Addgene plasmid # 9008)) [18]) and in Akt2 (generously provided by Dr. Zhenguo Wu (Hong Kong University of Science and

Technology)) plasmid by PCR using specific primers and Gibson Assembly Cloning kit (New England BioLabs inc, MA). Plasmids were delivered in HepG2 cells using FuGENE 6 transfection reagent as per manufacturer's protocol (Promega, Madison, WI). G418 was applied for isolating resistant clones (Invitrogen, San Diego, CA).

Antibodies and Reagents

The antibodies against PI3K p85, PI3K p110, Akt, Akt1, Akt2, Akt3, pAkts473, NF- κ B, I κ B α , pI κ B α and IKK β were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). The antibody against DDK (Flag M2) were purchased from Sigma. Anti-K8 (Troma 1) was provided by the Developmental Studies Hybridoma Bank, (University of Iowa). Anti-K18 (L2A1) was a generous gift from Dr. Bishr Omary (University of Michigan) [19]. The antibody against GAPDH was purchased from Abcam. HRP-conjugated secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Normal mouse and normal rabbit IgG used as negative control were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX).

Western Blot Analysis

Cells were trypsinized with TripLE express enzyme 1X (Thermo Fisher Scientific), washed in PBS (pH 7.4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM NA₂HPO₄ 7H₂O, 1.4 mM KH₂PO₄) and lysed in RIPA lysis buffer (pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40 in PBS) containing phosphatase (PhosSTOP from Roche Applied Science, Laval, QC, Canada) and protease inhibitors (Complete from Roche Applied Science). Cells were then frozen and thawed three times and centrifuged (13 200 RPM, 20 min at 4°C) to remove insoluble material. Equal amounts of proteins measured with Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad, Mississauga, ON), were separated on polyacrylamide gels electrophoresis (8 - 12%) and then transferred (15V, 30 min) on nitrocellulose membranes using semidry transfer apparatus (BioRad). The membranes were blocked (1 h, RT) with 5% skim milk in PBS-Tween 0.06%, probed with primary antibody overnight, washed in PBS-Tween 0.06%, then probed (1 h, RT) with horseradish

peroxidase-conjugated secondary antibody. Detection of the peroxidase activity was performed using SuperSignal West Femto Substrate (Thermo Fisher Scientific) as describe by the manufacturer using UVP bioimaging systems (Upland, CA).

Immunoprecipitation

Cells were trypsinized and lysed in wash buffer I (pH 7.5, 50mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate) supplemented with phosphatase (Roche Applied Science) and protease (Roche Applied Science) inhibitors. Cells were then homogenized 10 times on ice with a pre-chilled syringe (23G). Then, the homogenized suspensions were centrifuged (12 000g, 10 min, 4°C) to remove debris. Protein G-agarose beads (Roche Applied Science) were added to the supernatant and incubated for 1 hour at 4°C on a rocking platform. The pre-cleared lysates were incubated with specific antibodies overnight at 4°C with agitation. 50 µl of protein G-agarose beads were added to the mixture and incubated 5 hours on a rocking platform at 4°C. G-agarose-antibody-protein complexes were collected by centrifugation, washed twice with buffer II (50 mM Tris pH 7.5, 500 mM NaCl, .1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate) and once with buffer III (10 mM Tris pH 7.5, .1% Nonidet P-40, 0.05% sodium deoxycholate). SDS sample buffer was added to the complexes. Samples were heated (10 min, 95°C), centrifuged and the supernatant was collected for western blot analysis.

Immunofluorescence Staining and FRET

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde (10 min, RT) and permeabilized with a sodium citrate solution (0.1% Sodium citrate, 0.1% Triton-X-100 in PBS) (5 min, RT), blocked with 10% normal goat serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories) in PBS, and probed overnight at 4°C with primary antibodies. Primary antibodies were detected with Alexa488-conjugated donkey anti-rabbit antibody (Thermo Fisher Scientific) or Rhodamine (TRITC) AffiniPure goat anti-mouse (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Nucleus were stained with Hoechst 1.5 µg/ml (5 min, RT). Cells were

mounted with Immu-MountTM (Thermo Fisher Scientific) and visualized using a confocal microscope (Leica TCS SP8, Wetzlar, Germany). FRET analysis was performed using LAS X microscope software (Leica).

Results

Analysis of the expression of K8/18, and proteins associated with PI3K/Akt/NF-κB pathway in HepG2, Hep3B and Hela cells

As a first step in understanding the relationship between K8/18 and PI3K/Akt/NF-κB pathway, we analysed the presence of K8/18, Akt and NF-κB and its known associated regulatory proteins in simple-type epithelial cell lines, HepG2, Hep3B and Hela. Our results show that the three cell lines express K8/18, IκBα, IKKβ, NF-κB, Akt1 and Akt2 (Figure 1). Akt3 expression and the active form of Akt are present only in HepG2 and Hep3B cells. The amount of Akt3 is lower to undetectable level in Hela cells (Figure 1). These three cell lines were thus considered as suitable for the present study. Since HepG2 cells express only K8/18 as demonstrated in a previous study [20], these cells were selected as our major model for this study.

Association between K8/18 and PI3K/Akt/NF-κB signaling proteins

We have shown in a previous study that K8/18 loss affect positively the activation of the PI3K/Akt/NF-κB pathway [6]. This suggested that an interaction could exist between K8/18 and the proteins involved in this pathway. To address this possibility, we proceeded to the immunoprecipitation of K18 in HepG2 cells and determined if proteins of the PI3K/Akt/NF-κB pathway co-immunoprecipitated with it (Figure 2A). Since K8 and K18 are always in the form of heteropolymers, K8 co-immunoprecipitated with K18. Then, we looked at the protein PI3K which is an activator of Akt pathway. The p85 regulatory subunit did not bind to keratin while the catalytic subunit p110α co-immunoprecipitated with keratins in HepG2. Our results also demonstrated that the kinase Akt associated with keratins. The activated form of Akt, pAkt^{s473} also associated with keratins. The transcription factor NF-κBp65 and the NF-κB activating kinase IKKβ co-

immunoprecipitated with K8/18. However, IKB α , which is part of the NF- κ B inactive complex did not co-immunoprecipitate with K8/18.

In order to confirm the association between NF- κ B and K8/18, we proceeded to the immunoprecipitation of NF- κ B in HepG2 (Figure 2B). Our results show that NF- κ B co-immunoprecipitated K8/18. Taken together, these results support the hypothesis that NF- κ B is directly binding to keratins. These results are the first indication that NF- κ B protein could be physically linked to keratins.

Immunoprecipitation in HepG2 cells suggest that many proteins of the PI3K/Akt/NF- κ B can be associated with keratins. In attempt to identified if these associations are observed only in HepG2 cells, we immunoprecipitation K8/18 in hepatocellular carcinoma Hep3B and cervical carcinoma Hela cells. Thus, we demonstrate that K8/18 are associated with Akt and NF- κ B while no association with I κ B is observed in Hep3B and Hela (Figure 3). These results suggest that association between K8/18 and Akt and NF- κ B proteins might not be related to a specific tissue and could be a general phenomena.

Akt1 and Akt2 associate with K8/18

Akt represents a family of proteins composed of three isoforms, Akt1, Akt2 and Akt3 which play isoform-specific functions in cells. To further characterize Akt association with keratins we wanted to determined which Akt isoforms associated with keratins. DDK tagged Akt1 and Akt2 were overexpressed in HepG2 cells (Figure 4A). Akt3 expression was at a very low to undetectable level in these cells and was not analysed [16]. Immunoprecipitation of Akt isoforms showed that Akt1 and Akt2 co-immunoprecipate with K8/18 (Figure 4). These results confirm the association of Akt with keratins and show that Akt1 and Akt2 can bind to keratins.

FRET analysis of the colocalization of K8/18/Akt and K8/18/NF-κB

The K8/18 filaments form a network that extended from the periphery of the nucleus to the plasma membrane. As IFs are known to be involved in the positioning of the organelle [21], we hypothesized that keratins could associate with Akt and NF-κB and its associated proteins at a specific cellular localization. In order to address this question, immunofluorescence was performed followed by microscopic FRET (Förster Resonance Energy Transfer) analysis in HepG2 cells. FRET analysis of Keratins and Akt showed that the association between the two proteins is present in the cytoplasm with a prominent localization at the cell membrane (Figure 5A). FRET analysis also demonstrated that K8/18 and NF-κB associated. This analysis shows that the association between K8/18 and NF-κB is mainly localized at the cell membrane (Figure 5B). Overall, these results suggest that K8/18 could play a role in the cellular localization of Akt and NF-κB.

Discussion

Recent studies have shown that IFs, such as keratins, might play an important role in the regulation of several signalisation pathways involved in tumor development. For example, K18 expression in metastatic breast cancer cells prevent cell migration [22]. Otherwise, loss of K8/18 expression in colon, liver and endometrium cancer cells can increase cell motility and cell invasion [3, 6, 9]. We have previously shown that K8/18 can regulate Akt and NF-κB expression [6]. In the present study, we investigated whether proteins of the PI3K/Akt/NF-κB pathway are physically associated with K8/18 in hepatocellular carcinoma and in cervical carcinoma cells by performing immunoprecipitation followed by western blotting analysis.

Our immunoprecipitation results in HepG2 show that K8/18 are associated with PI3Kp110 α , NF-κB, IKK β , Akt and its phosphorylated form pAkt $s473$. In this regard, keratins have been shown to be associated with kinases such as protein kinase C (PKC) [23] to prevent cellular stress [24, 25]. Different studies also suggested that keratins could mediate PI3K/Akt pathway [1, 6] suggesting that keratin could be associated to protein of

the PI3K/Akt/NF- κ B pathway to modulate their function by their sequestration in the cytoplasm.

We investigated which Akt isoforms was associated with K8/18. There are three Akt isoforms (Akt1, Akt2, Akt3) and they are known to play different roles in cell growth and cell motility in carcinoma cells [26-28]. In cancer, Akt1 is principally involve in tumor growth while Akt2 is related to cancer cell invasion and metastasis and Akt3 is implicated in tumor growth and in resistance to drug [16, 26]. In HepG2 cells, Akt1 and Akt2 are expressed while Akt3 is faintly expressed [16]. We found that Akt1 and Akt2 isoforms were associated with K8/18 in HepG2 cells. These results suggest that K8/18 can link different Akt isoform.

Keratins are subjected to different post-translational modifications such as phosphorylation and glycosylation, ubiquitination and SUMOylation on specific residues, that are believe to regulate their functions [25, 29, 30]. For instance, K8 phosphorylation on S73 and K18 O-linked N-acetylglucosamine glycosylation at Ser 30, 31 and 49 are specific posttranslational modifications in human cells that play a role in protecting cells against stress and apoptosis [31]. Keratins phosphorylation and glycosylation are also involved in the regulation of their association with other proteins and their activation [31]. For example, K8 S33 phosphorylation regulates its binding to the protein 14-3-3 and is thus involved into the regulation of the cell cycle [30, 32, 33]. Studies also show that keratin glycosylation can regulate Akt1 activation [25, 30, 31]. Our results are in agreement with the studies who suggest that keratins could serve as a platform to organize in the cytoplasm of the cell the localization of regulatory proteins. This organisation could be regulated by K8/K18 post-translational modifications.

In attempt to better understand the role of those associations, we visualize Akt and NF- κ B interaction with keratin by microscopy. Our result show that Akt was mainly associated with K8/18 in the cytoplasm. Furthermore, associations between K8/18 and NF- κ Bp65 was mainly observed at the plasma membrane. These associations could

prevent NF- κ B activation and its translocation to the nucleus to be active as a transcription factor [34, 35].

In summary, our current findings are the first demonstration that K8/18 are associated with PI3Kp110 α , NF- κ B and IKK β signaling proteins. These interactions were observed in hepatocellular carcinoma and in cervical carcinoma which suggest that the association are not tissue-specific. Our results also show that K8/18 associate Akt in a non-isoform specific manner. This work suggests that association with K8/18 can sequester proteins in the cytoplasm, and most likely regulate their activation and then control signaling pathways.

References

- [1] V. Karantza, Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers, *Oncogene* 30(2) (2011) 127-38.
- [2] R. Moll, M. Divo, L. Langbein, The human keratins: biology and pathology, *Histochem Cell Biol* 129(6) (2008) 705-33.
- [3] F. Loschke, K. Seltmann, J.E. Bouameur, T.M. Magin, Regulation of keratin network organization, *Current opinion in cell biology* 32 (2015) 56-64.
- [4] K.J. Cheung, E. Gabrielson, Z. Werb, A.J. Ewald, Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program, *Cell* 155(7) (2013) 1639-51.
- [5] K.J. Cheung, A.J. Ewald, Invasive leader cells: metastatic oncotarget, *Oncotarget* 5(6) (2014) 1390-1.
- [6] A.M. Fortier, E. Asselin, M. Cadrin, Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation, *The Journal of biological chemistry* 288(16) (2013) 11555-71.
- [7] S.A. Joosse, J. Hannemann, J. Spotter, A. Bauche, A. Andreas, V. Muller, K. Pantel, Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: impact on the detection of circulating tumor cells, *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 18(4) (2012) 993-1003.
- [8] C. Leduc, S. Etienne-Manneville, Intermediate filaments in cell migration and invasion: the unusual suspects, *Curr Opin Cell Biol* 32C (2015) 102-112.
- [9] R. Kwan, K. Looi, M.B. Omary, Absence of keratins 8 and 18 in rodent epithelial cell lines associates with keratin gene mutation and DNA methylation: Cell line selective effects on cell invasion, *Experimental cell research* 335(1) (2015) 12-22.
- [10] H.S. Kim, J.J. Lee, S.I. Do, K. Kim, I.G. Do, D.H. Kim, S.W. Chae, J.H. Sohn, Overexpression of cytokeratin 17 is associated with the development of papillary thyroid carcinoma and the presence of lymph node metastasis, *International journal of clinical and experimental pathology* 8(5) (2015) 5695-701.
- [11] J.P. Thiery, Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression, *Nature reviews. Cancer* 2(6) (2002) 442-54.

- [12] C.M. Fife, J.A. McCarroll, M. Kavallaris, Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis, *British journal of pharmacology* 171(24) (2014) 5507-23.
- [13] M.E. Kidd, D.K. Shumaker, K.M. Ridge, The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer, *American journal of respiratory cell and molecular biology* 50(1) (2014) 1-6.
- [14] A. Satelli, S. Li, Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy, *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 68(18) (2011) 3033-46.
- [15] M.A. Cichon, D.C. Radisky, ROS-induced epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells is mediated by NF- κ B-dependent activation of Snail, *Oncotarget* 5(9) (2014) 2827-38.
- [16] N. Grabinski, F. Ewald, B.T. Hofmann, K. Staufer, U. Schumacher, B. Nashan, M. Jucker, Combined targeting of AKT and mTOR synergistically inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells, *Mol Cancer* 11 (2012) 85.
- [17] H.C. Pal, S. Sharma, L.R. Strickland, S.K. Katiyar, M.E. Ballestas, M. Athar, C.A. Elmets, F. Afaq, Fisetin Inhibits Human Melanoma Cell Invasion through Promotion of Mesenchymal to Epithelial Transition and by Targeting MAPK and NF κ B Signaling Pathways, *PloS one* 9(1) (2014) e86338.
- [18] S. Ramaswamy, N. Nakamura, F. Vazquez, D.B. Batt, S. Perera, T.M. Roberts, W.R. Sellers, Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(5) (1999) 2110-5.
- [19] C.F. Chou, C.L. Riopel, L.S. Rott, M.B. Omary, A significant soluble keratin fraction in 'simple' epithelial cells. Lack of an apparent phosphorylation and glycosylation role in keratin solubility, *Journal of cell science* 105 (Pt 2) (1993) 433-44.
- [20] J. Liao, M.B. Omary, 14-3-3 proteins associate with phosphorylated simple epithelial keratins during cell cycle progression and act as a solubility cofactor, *The Journal of cell biology* 133(2) (1996) 345-57.
- [21] D.M. Toivola, G.Z. Tao, A. Habtezion, J. Liao, M.B. Omary, Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments, *Trends in cell biology* 15(11) (2005) 608-17.

- [22] A.J. Ewald, R.J. Huebner, H. Palsdottir, J.K. Lee, M.J. Perez, D.M. Jorgens, A.N. Tauscher, K.J. Cheung, Z. Werb, M. Auer, Mammary collective cell migration involves transient loss of epithelial features and individual cell migration within the epithelium, *Journal of cell science* 125(Pt 11) (2012) 2638-54.
- [23] M.B. Omary, G.T. Baxter, C.F. Chou, C.L. Riopel, W.Y. Lin, B. Strulovici, PKC epsilon-related kinase associates with and phosphorylates cytokeratin 8 and 18, *The Journal of cell biology* 117(3) (1992) 583-93.
- [24] T.M. Magin, P. Vijayaraj, R.E. Leube, Structural and regulatory functions of keratins, *Experimental cell research* 313(10) (2007) 2021-32.
- [25] M. Homberg, T.M. Magin, Beyond expectations: novel insights into epidermal keratin function and regulation, *International review of cell and molecular biology* 311 (2014) 265-306.
- [26] A.M. Fortier, E. Asselin, M. Cadrian, Functional specificity of Akt isoforms in cancer progression, *Biomolecular concepts* 2(1-2) (2011) 1-11.
- [27] E. Gonzalez, T.E. McGraw, The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer, *Cell Cycle* 8(16) (2009) 2502-8.
- [28] J. Girouard, M.J. Lafleur, S. Parent, V. Leblanc, E. Asselin, Involvement of Akt isoforms in chemoresistance of endometrial carcinoma cells, *Gynecologic oncology* 128(2) (2013) 335-43.
- [29] Y. Honma, M. Harada, A new therapeutic strategy for hepatocellular carcinoma by molecular targeting agents via inhibition of cellular stress defense mechanisms, *Journal of UOEH* 36(4) (2014) 229-35.
- [30] N.T. Snider, M.B. Omary, Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions, *Nature reviews. Molecular cell biology* 15(3) (2014) 163-77.
- [31] N.O. Ku, D.M. Toivola, P. Strnad, M.B. Omary, Cytoskeletal keratin glycosylation protects epithelial tissue from injury, *Nat Cell Biol* 12(9) (2010) 876-85.
- [32] C.L. Hyder, K.O. Isoniemi, E.S. Torvaldson, J.E. Eriksson, Insights into intermediate filament regulation from development to ageing, *Journal of cell science* 124(Pt 9) (2011) 1363-72.

- [33] C.L. Hyder, H.M. Pallari, V. Kochin, J.E. Eriksson, Providing cellular signposts--post-translational modifications of intermediate filaments, FEBS letters 582(14) (2008) 2140-8.
- [34] C.V. Moser, K. Kynast, K. Baatz, O.Q. Russe, N. Ferreiros, H. Costiuk, R. Lu, A. Schmidtko, I. Tegeder, G. Geisslinger, E. Niederberger, The protein kinase IKKepsilon is a potential target for the treatment of inflammatory hyperalgesia, J Immunol 187(5) (2011) 2617-25.
- [35] J. Suzuki, M. Ogawa, S. Muto, A. Itai, M. Isobe, Y. Hirata, R. Nagai, Novel IkB kinase inhibitors for treatment of nuclear factor-kB-related diseases, Expert Opin Investig Drugs 20(3) (2011) 395-405.

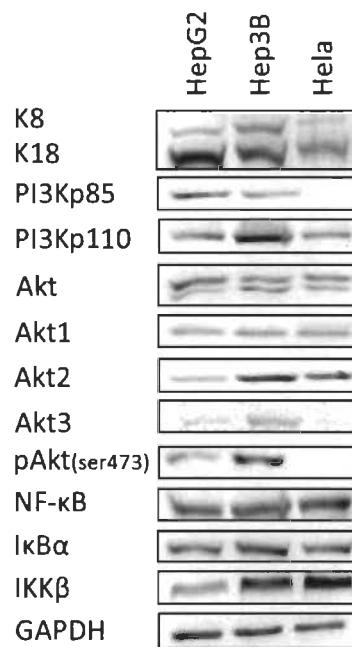


Figure 1 Analysis of the expression of K8, K18 and PI3K/Akt/NF-κB pathway proteins in HepG2, Hep3B and Hela cells.
K8 and K18 are expressed in the three cell lines. There is a variation in the expression of the protein involved in the PI3K/Akt/NF-κB in the different cell types. GAPDH levels are included as a loading control.

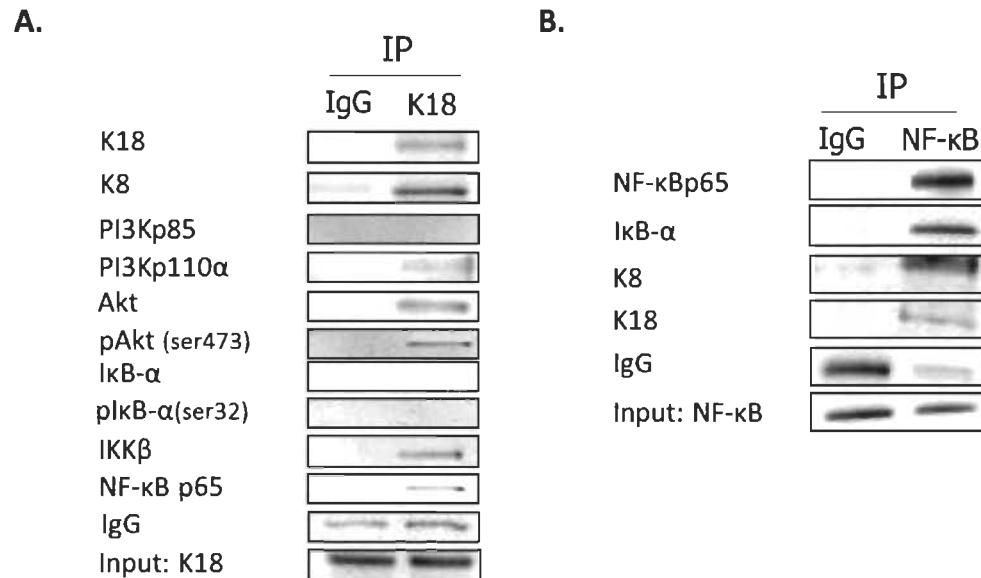


Figure 2 K8/18 are associated with PI3K/Akt/NF-κB signaling proteins in HepG2 cells.

The association between K8/18 and PI3K/Akt/NF-κB signaling proteins were analyzed by immunoprecipitation using anti-K18 (L2A1) (A) or anti-NF-κB (B) antibodies follow by western blot analysis. IgG were used as IP control.

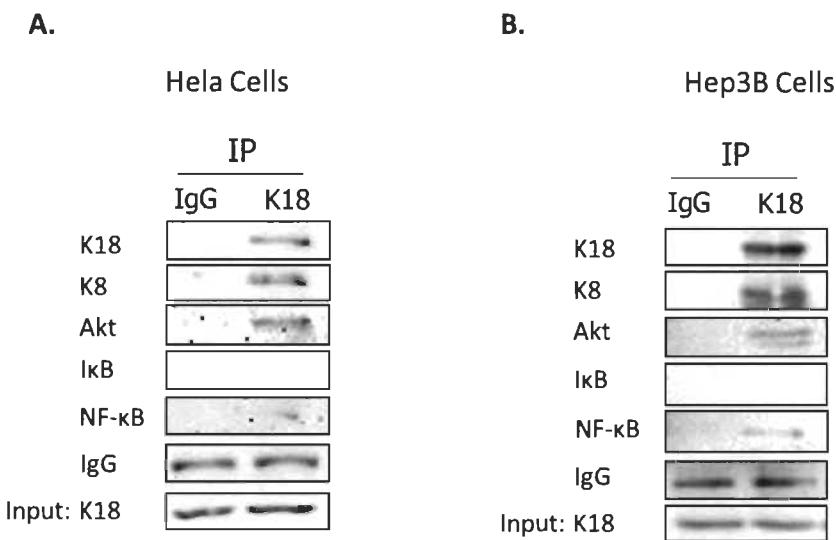


Figure 3 K8/18 are associated with Akt/NF-κB signaling proteins in Hela and Hep3B cells.

The association between K8/18 and Akt/NF-κB signaling proteins were analyzed by immunoprecipitation using the anti-K18 antibody L2A1 in Hela (A) and Hep3B (B) cells followed by western blot analysis. IgG were used as IP control.

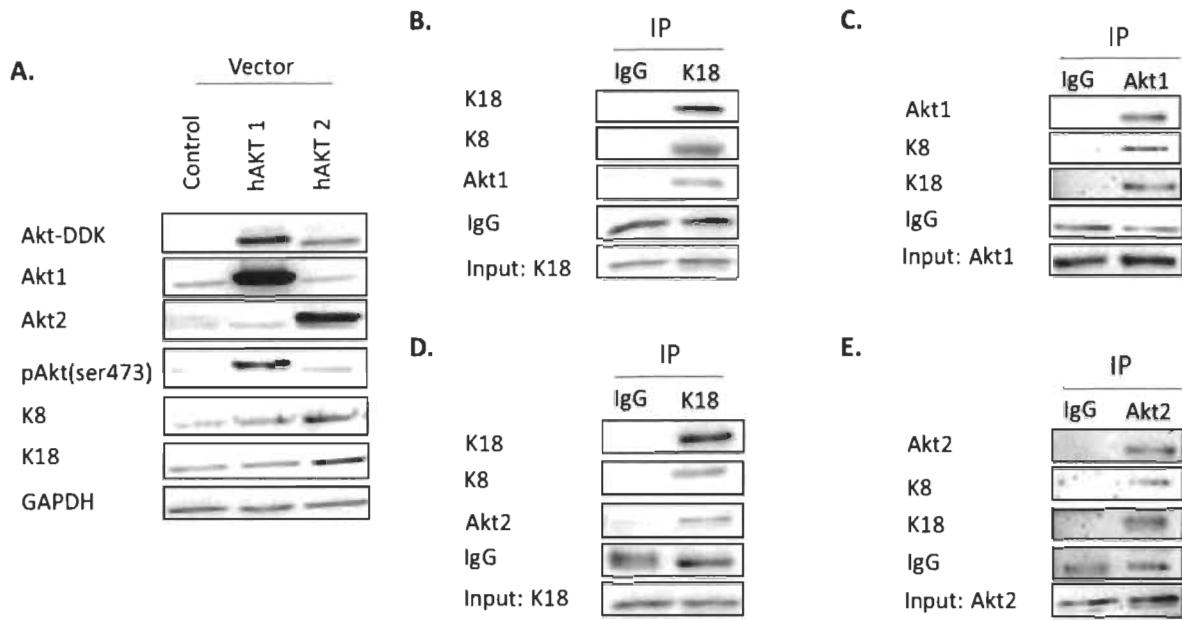


Figure 4 Akt1 and Akt2 are associated with K8/18 in HepG2 cells.

(A) HepG2 cells were transfected with control (empty), Akt1 or Akt2 vector. Protein levels of Akt-DDK, Akt1, Akt2, pAkt_s473, K8 and K18 were analyzed by western blot. GAPDH was used as loading control. The association between K8/18 and Akt isoforms were analyzed by immunoprecipitation using the anti-K18 antibody L2A1 (B, D), Anti-Akt1 (C) and Anti-Akt2 (E) follow by western blot analysis. IgG were used as IP control.

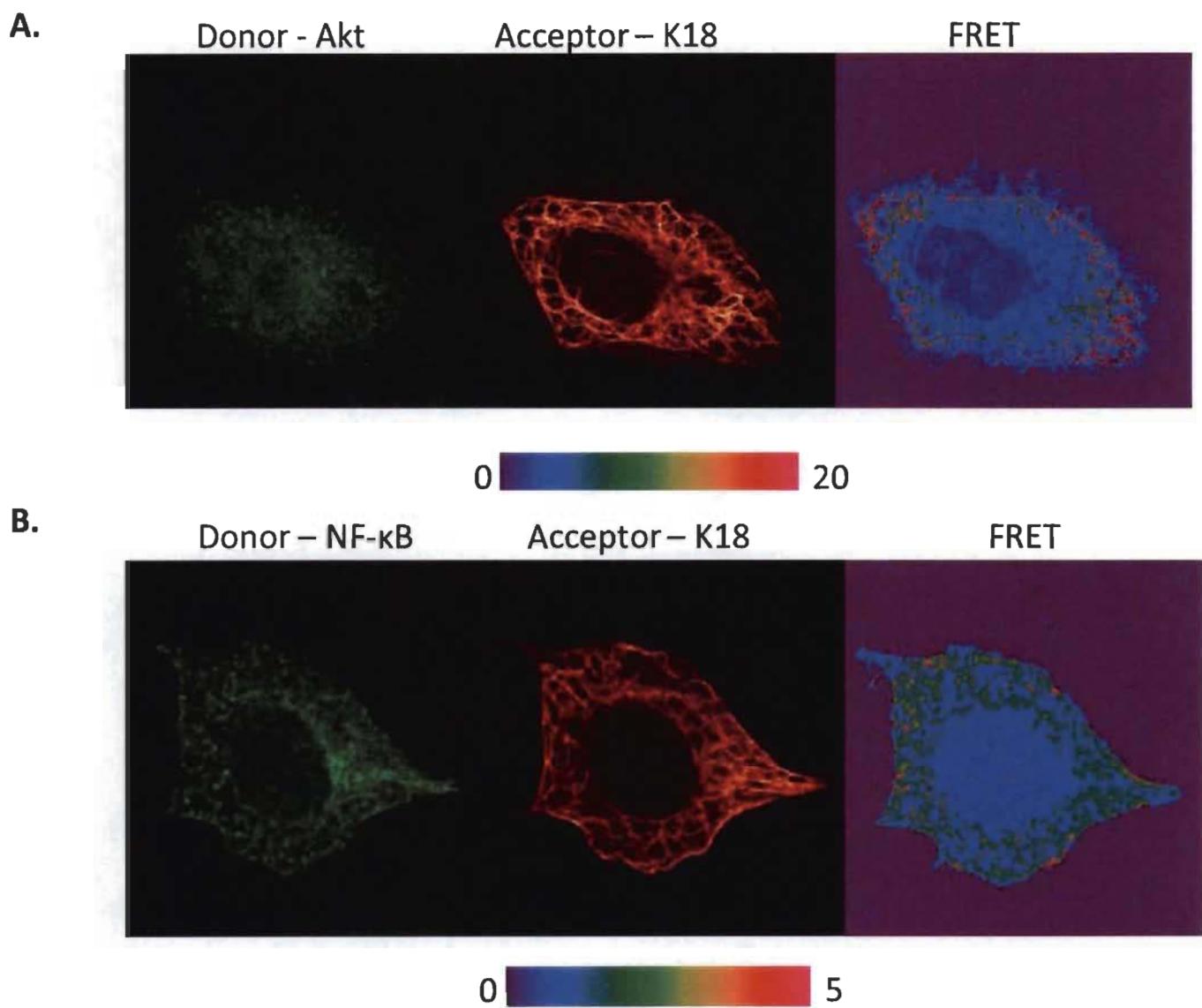


Figure 5 FRET analysis of the colocalization of K8/18/Akt and K8/18/NF-κB in HepG2 cells.

Localization of the association between K8/18 and Akt (A) or NF-κB (B).

CHAPITRE III

DISCUSSION

Les kératines sont les protéines de FIs présentes dans les cellules épithéliales. Les cellules de l'épithélium simple comme les hépatocytes expriment principalement les kératines 8 et 18. Les premières études réalisées pour déterminer les fonctions des kératines ont montré que ces protéines avaient pour principales fonctions le maintien et l'intégrité structurale des cellules et des tissus (Fuchs et Coulombe 1992, Ku *et al.* 1997). Des études plus récentes ont montré que les kératines étaient aussi impliquées dans la régulation d'importantes voies de signalisation reliées à la survie cellulaire, la migration cellulaire et l'apoptose (Ku *et al.* 2010, Busch *et al.* 2012, Fortier *et al.* 2013, Kim *et al.* 2015, Kwan *et al.* 2015, Mikami *et al.* 2015). Depuis plusieurs années, notre laboratoire s'intéresse au rôle des kératines dans la voie de signalisation PI3K/Akt/NF-κB. Cette voie de signalisation joue un rôle important dans les mécanismes de régulation de la survie cellulaire et de la motilité cellulaire. Les protéines Akt (Akt1, Akt2 et Akt3) sont presque toujours suractivées dans les cellules cancéreuses. Les différents travaux réalisés dans le laboratoire ont montré qu'il existe un lien entre les protéines Akt et les kératines. En effet, la perte d'expression des K8/18 entraîne l'activation de la voie PI3K/Akt/NF-κB, ce qui entraîne une augmentation de la capacité de migration et d'invasion des cellules.

3.1 Les kératines 8 et 18 s'associent à des protéines impliquées dans la progression tumorale

Le but de la présente étude était de déterminer si une relation physique pouvait exister entre les protéines impliquées dans la voie de signalisation PI3K/Akt/NF-κB et les K8/18. Nos résultats ont montré que les protéines PI3Kp110α, Akt, IKKβ et NF-κB sont associées aux K8/18 dans les cellules HepG2, Hep3B et Hela. Notre étude a également permis de montrer que NF-κB colocalise avec les filaments de kératines principalement

au niveau de la membrane plasmique alors qu'Akt colocalise avec les filaments de kératines dans le cytoplasme des cellules. L'ensemble de ces résultats suggère que PI3Kp110 α , Akt, IKK β et NF- κ B sont associées aux kératines, ce qui pourrait jouer un rôle dans leur localisation dans le cytoplasme et/ou leur séquestration pour réguler leur fonction. Ces résultats sont en accord avec nos études précédentes qui ont montré que l'absence des K8/18 dans les cellules d'hépatocarcinome HepG2 et dans les cellules cancéreuses de l'endomètre KLE favorise l'activation de la voie PI3K/Akt/NF- κ B. En effet, la modulation de l'association entre K8/18 et les protéines de la voie de signalisation PI3K/Akt/NF- κ B pourrait jouer un rôle dans la régulation de leur fonction (Fortier *et al.* 2013).

L'interprétation de nos résultats est en accord avec des études réalisées par différents chercheurs qui ont montré que les kératines peuvent s'associer à des protéines afin de réguler leur activité (Liao et Omary 1996, Ku *et al.* 1998, Mikami *et al.* 2015). Par exemple, la protéine 14-3-3 qui a la capacité de se lier à de multiples kinases peut être liée à la K18. L'association et la dissociation de 14-3-3 et des kératines modulent le cycle cellulaire. En effet, il a été montré que la liaison de 14-3-3 aux K18 induit l'activation de Cdc25, une protéine impliquée dans l'induction de la progression du cycle cellulaire (Hyder *et al.* 2008). Les kératines jouent aussi un rôle dans la régulation de l'apoptose par leur association avec le récepteur du facteur de nécrose tumorale 2 (TNFR2) ainsi que la protéine adaptatrice TRADD (Caulin *et al.* 2000, Inada *et al.* 2001, Tong et Coulombe 2006, Pan *et al.* 2013). En effet, les chercheurs ont montré que TRADD s'associe avec les kératines de type I comme K18 et K14 (Inada *et al.* 2001) tandis que TNFR2 s'associe avec le dimère de K8/18 (Caulin *et al.* 2000). Les résultats de ces études suggèrent que la séquestration de TRADD par les K18 empêche l'activation des caspases et jouent donc un rôle dans la protection des cellules contre l'apoptose (Inada *et al.* 2001). En ce qui concerne TNFR2, son activation entraîne généralement la survie cellulaire. L'association des K8/18 au domaine cytosolique de TNFR2 entraîne l'inhibition de la transcription de NF- κ B, ce qui favorise la mort par apoptose (Caulin *et al.* 2000). K10 est aussi connu pour séquestrer Akt et PKC à son domaine N-terminal et ainsi prévenir leur activation (Hyder *et al.* 2008).

3.2 La protéine Akt se lie aux kératines lorsqu'elle est phosphorylée

La protéine Akt joue un rôle central dans la survie, la croissance, la prolifération et la migration cellulaire. Cette kinase est généralement active lorsqu'elle est phosphorylée. En 2010, l'équipe du Dr Omary a montré qu'Akt peut s'associer aux K8/18 (Ku *et al.* 2010). Notre étude a, quant à elle, permis de déterminer la capacité des K8/18 à s'associer à Akt lorsque celle-ci est phosphorylée. Cependant, elle n'a pas permis de déterminer si la forme non-phosphorylée peut également s'associer aux kératines. L'utilisation d'inhibiteurs d'Akt pourrait permettre de répondre à ce questionnement. Afin de déterminer si l'activité d'Akt est nécessaire à sa liaison avec les kératines notre laboratoire a entrepris une étude à l'aide de deux inhibiteurs d'Akt, soit MK-2206 et AZD5363. L'inhibiteur MK-2206 a la capacité de réduire la phosphorylation d'Akt sur la sérine 473 et sur la thréonine 308 (Grabinski *et al.* 2012). Pour ce qui est de l'inhibiteur AZD5363, sa liaison à Akt empêche la phosphorylation des substrats d'Akt comme la protéine ribosomale S6 (pS6 Ribo) (Davies *et al.* 2012, Badura *et al.* 2013). Nos résultats préliminaires ont effectivement montré que le MK-2206 inhibe la phosphorylation d'Akt tandis que l'AZD5363 empêche la phosphorylation de la protéine ribosomale S6, une cible d'Akt (Figure 3.1). L'utilisation de ces inhibiteurs suivie de l'immuoprécipitation des K8/18 et d'Akt pourrait donc nous permettre de déterminer si la phosphorylation d'Akt est nécessaire à son association avec les kératines.

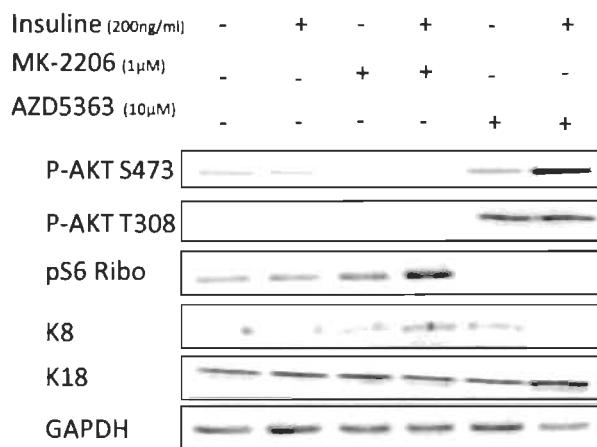


Figure 3.1 L'utilisation des molécules MK-2206 et AZD5363 permet l'inhibition d'Akt (Résultats non publiés).

3.3 La liaison d'Akt avec les kératines n'est pas spécifique à un isoforme

La spécificité fonctionnelle des isoformes d'Akt est de grande importance dans la progression tumorale. En effet, non seulement les trois isoformes ont des niveaux d'expression variable selon le type de cancer, ils ont également des fonctions différentes. Effectivement, la protéine Akt1 est principalement impliquée dans la croissance cellulaire tandis qu'Akt2 participe généralement à la migration cellulaire et qu'Akt3 favorise la prolifération cellulaire. Lors d'un cancer, il devient alors important de mieux comprendre le rôle de chacun des isoformes afin d'élaborer la meilleure approche thérapeutique. C'est pourquoi, au cours de nos travaux de recherche, nous avons voulu identifier les isoformes d'Akt qui s'associaient au réseau de K8/18. Notre étude a montré qu'Akt1 et Akt2 co-immunoprécipitent avec les kératines dans les HepG2, ce qui indique que ces deux isoformes d'Akt peuvent se lier aux kératines. Puisque le niveau d'expression d'Akt3 est faible dans les HepG2, notre étude n'a pas permis de déterminer si cet isoforme peut s'associer aux kératines. Cependant, puisque les différents isoformes d'Akt partagent une structure homologue, nous croyons qu'Akt3 peut également être associée aux K8/18. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de surexprimer l'isoforme Akt3 dans les HepG2 et déterminer si cette protéine peut aussi s'associer aux K8/18. Également, il serait intéressant d'étudier la liaison des kératines avec Akt3 dans des lignées cellulaires exprimant cet isoforme telles que les cellules d'hépatocarcinome Hep3B ou les cellules cancéreuses du sein MCF-7. Puisque les kératines ne semblent pas s'associer à un isoforme spécifique d'Akt, il serait également intéressant d'étudier si le mécanisme de liaison et de libération des isoformes d'Akt est spécifique à chacun des isoformes.

3.4 Les modifications post-traductionnelles comme potentiel mécanisme régulant les associations des kératines avec les protéines de la voie PI3K/Akt/NF-κB

Puisque la liaison entre les kératines et des protéines de la voie PI3K/Akt/NF-κB est maintenant connue, il serait intéressant de comprendre le mécanisme régulant ces interactions. Les modifications post-traductionnelles des kératines sont connues pour réguler leurs fonctions et leurs interactions avec différentes protéines. Les modifications

post-traductionnelles les plus étudiées jusqu'à maintenant sont la phosphorylation et la glycosylation. La phosphorylation est la première modification post-traductionnelle qui a été observée sur les kératines. Les principaux sites de phosphorylation de la K8 se situent sur les séries 23, 73 et 431 et sur les séries 33 et 52 pour K18. L'étude de la phosphorylation des K8 sur les séries 73 et 431 à l'aide de phosphomutant a permis de déterminer l'implication de ces sites de phosphorylation dans la migration cellulaire (Pan *et al.* 2013). Toutefois, la phosphorylation des kératines est principalement connue pour protéger les cellules contre les stress mécanique et toxique. En effet, une augmentation de la phosphorylation des kératines est observée en réponse à un stress (Snider et Omari 2016). Notre laboratoire a montré en 2010 que le stress oxydatif causé par l'intoxication de souris avec la griséofulvine conduit à une augmentation de la phosphorylation de K8 (S73 et S431) et de K18 (S33) dans les hépatocytes (Fortier *et al.* 2010). Le mécanisme régulant la protection des cellules contre le stress demeure toutefois inconnu. Des études ont cependant montré que la liaison des kératines 18 avec la protéine 14-3-3 est régulée par la phosphorylation de la K18 sur la série 33 (Liao et Omari 1996, Ku *et al.* 1998). La phosphorylation des kératines joue donc un rôle dans l'association et la dissociation de la protéine 14-3-3. Nous suspectons qu'il en est de même pour les protéines de la voie PI3K/Akt/NF-κB qui sont associées aux kératines.

Quant à elle, la glycosylation consiste à l'ajout d'un O-linked β-D-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) par l'enzyme O-GlcNAc transferase (OGT). Les K18 ont trois sites de glycosylation, soit sur les séries 30, 31 et 49 (Ku et Omari 1995, Knobel *et al.* 2015). Bien que la glycosylation des K8/18 ait été identifiée au début des années 90 (Chou *et al.* 1992), ses fonctions sont encore peu connues. À l'aide de souris exprimant la protéine K18 ne pouvant pas être glycosylée, il a été montré que la glycosylation est nécessaire à la protection contre les lésions du tissu épithélial. En effet, la glycosylation des K18 favorise la phosphorylation d'Akt sur la thréonine 308 conduisant ainsi à la survie, la prolifération et la croissance cellulaire (Ku *et al.* 2010). Il est intéressant de noter que cette même étude a mis en évidence que la liaison des kératines à Akt est indépendante de la glycosylation des kératines (Ku *et al.* 2010).

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui régulent l'association des diverses protéines de la voie de signalisation PI3K/Akt/NF-κB avec les kératines, il serait intéressant d'investiguer l'effet de la modulation des modifications post-traductionnelles sur l'interaction des kératines avec les protéines de cette voie de signalisation.

L'une des stratégies envisagées pour étudier l'impact des modifications post-traductionnelles des kératines sur les liaisons avec les protéines de la voie PI3K/Akt/NF-κB est de créer des lignées cellulaires exprimant des kératines mutées aux principaux sites de phosphorylation à l'aide de l'édition génomique. À l'aide de ces cellules, il serait possible d'étudier non seulement l'activité de la voie PI3K/Akt/NF-κB mais également la liaison des différentes protéines avec les kératines.

La technologie CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)-Cas 9 est un outil d'édition génomique qui permet la délétion ou la mutation d'un gène spécifique. Le complexe CRISPR-Cas 9 consiste en deux éléments, soit un ARN guide et une endonucléase, la Cas 9 (Figure 3.2). L'ARN guide est une séquence de 20 nucléotides qui permet de cibler une séquence d'ADN spécifique. Quant à elle, l'endonucléase Cas 9, originalement exprimée dans les bactéries *Streptococcus pyogenes*, a la capacité de cliver l'ADN (Cong et Zhang 2015). Lors de l'édition génomique dans les cellules de mammifères, l'ARN guide se lie à sa séquence homologue sur l'ADN permettant le recrutement de la Cas 9. Lorsque la séquence cible est suivie d'une séquence PAM (*Protospacer adjacent motif*), la Cas 9 va procéder au clivage du double brin d'ADN. Suite au clivage de l'ADN, des erreurs peuvent survenir lors de la jonction des extrémités non-homologue (NHEJ), un processus de réparation de l'ADN. Ces erreurs conduisent au knockout du gène ciblé. Lorsque des modifications génétiques sont désirées plutôt qu'une simple inactivation du gène, il est possible d'introduire ces modifications par la réparation homologue dirigée (HDR) (Reis *et al.* 2014).

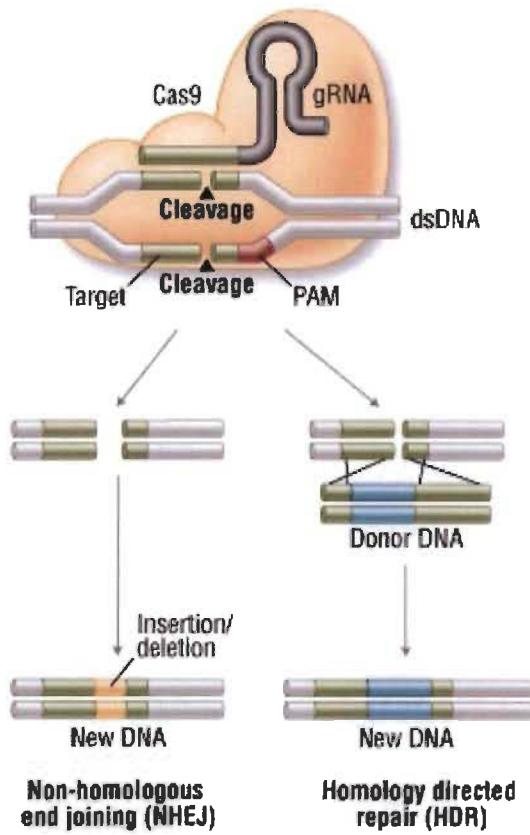


Figure 3.2 Le système CRISPR-Cas 9.

Le système CRISPR-Cas 9 est un outil d'édition génomique qui permet la délétion ou la mutation d'un gène cible (Reis *et al.* 2014).

Dans le cadre de nos recherches, il serait intéressant d'utiliser la technologie CRISPR-Cas 9 afin de muter les principaux sites de phosphorylation des K8 (S23, S73 et S431) et K18 (S33 et S52). La substitution des séries à ces différentes positions par de l'acide aspartique ou lalanine permettrait de comprendre le rôle de la phosphorylation sur les associations des K8/18 avec les protéines de la voie PI3K/Akt/NF- κ B. Une étude menée par Ku et Omary a montré que la substitution de la sérine 73 des K8 par une alanine reproduit une kératine non-phosphorylé à cette position (Figure 3.3) (Ku *et al.* 2002). En effet, lalanine est un acide aminé dont le groupement méthyl ne peut être phosphorylé, ce qui en fait un outil intéressant dans l'étude de la phosphorylation. Afin de reproduire la phosphorylation des K8, l'équipe du Dr Omary a utilisé l'acide aspartique pour substituer la sérine 73 puisque l'acide aspartique a une structure chimique similaire à la phospho-sépine (Figure 3.3) (Ku *et al.* 2002).

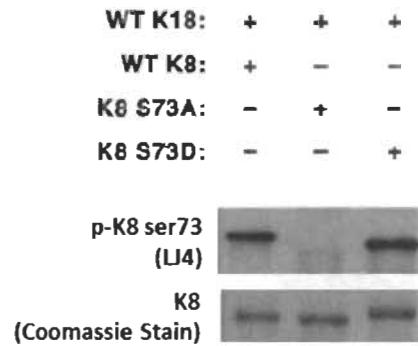


Figure 3.3 La substitution de la sérine 73 des K8 par une alanine ou un acide aspartique permet l'étude *in vitro* du rôle de cette phosphorylation (Ku *et al.* 2002).

Dans le cadre de ma maîtrise, j'ai utilisé la technologie CRISPR-Cas 9 afin d'obtenir des lignées cellulaires knockout en K8. L'analyse préliminaire a montré qu'en absence de K8 suite à l'utilisation de CRISPR, il y a une diminution marquée de l'expression de K18 dans les cellules Hela (Figure 3.4). Des résultats similaires ont été observés chez les souris déficientes en K8 (Tao *et al.* 2003). Cette diminution d'expression de K18 s'explique par le fait que les kératines doivent obligatoirement former des hétérodimères afin d'éviter leur dégradation par le protéasome (Coulombe et Omary 2002, Kwan *et al.* 2015).

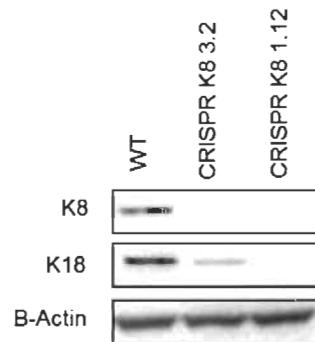


Figure 3.4 Analyse de l'expression des K8/18 dans les cellules Hela suite à délétion des K8 à l'aide de CRISPR-Cas 9 (Résultats non publiés).

CHAPITRE IV

CONCLUSION

En conclusion, notre étude supporte l'idée que les kératines sont bien plus qu'un simple constituant du cytosquelette ayant pour rôle le maintien de la structure de la cellule. En effet, leur capacité à associer des protéines de la voie PI3K/Akt/NF-κB ainsi qu'à probablement participer à la localisation cellulaire de ces dernières est une nouvelle démonstration de l'implication des kératines dans la régulation des voies de signalisation cellulaire. Les études présentement en cours dans notre laboratoire ont pour but d'identifier le rôle ainsi que la nature de ces différentes associations. Plus spécifiquement, l'étude de la relation entre les modifications post-traductionnelles des kératines et leur interaction avec les protéines de la voie PI3K/Akt/NF-κB pourrait permettre d'élucider le mécanisme régulant les associations des différentes protéines avec les kératines.

Ces nouvelles données sur la relation entre les kératines 8 et 18 et les protéines de la voie PI3K/Akt/NF-κB pourraient conduire à la découverte d'une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement du cancer. En effet, le maintien de l'expression des kératines 8 et 18 dans les cellules épithéliales cancéreuses empêcherait non seulement la dissémination des cellules tumorales, mais contrôlerait également l'activité de voies de signalisation importantes impliquées dans la progression tumorale.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Armstrong, L. (2014). Epigenetics. New York, NY, Garland Science.
- Badura, S., T. Tesanovic, H. Pfeifer, S. Wystub, B. A. Nijmeijer, M. Liebermann, J. H. Falkenburg, M. Ruthardt and O. G. Ottmann (2013). "Differential effects of selective inhibitors targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in acute lymphoblastic leukemia." PLoS One **8**(11): e80070.
- Boyer, B., A. M. Valles and N. Edme (2000). "Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions." Biochem Pharmacol **60**(8): 1091-1099.
- Busch, T., M. Armacki, T. Eiseler, G. Joodi, C. Temme, J. Jansen, G. von Wichert, M. B. Omary, J. Spatz and T. Seufferlein (2012). "Keratin 8 phosphorylation regulates keratin reorganization and migration of epithelial tumor cells." J Cell Sci **125**(Pt 9): 2148-2159.
- Canadian Cancer Society. (2015). Canadian cancer statistics. Toronto, Canadian Cancer Society: volumes.
- Caulin, C., C. F. Ware, T. M. Magin and R. G. Oshima (2000). "Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis." J Cell Biol **149**(1): 17-22.
- Chen, W. S., P. Z. Xu, K. Gottlob, M. L. Chen, K. Sokol, T. Shiyanova, I. Roninson, W. Weng, R. Suzuki, K. Tobe, T. Kadokawa and N. Hay (2001). "Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene." Genes Dev **15**(17): 2203-2208.
- Chernoivanenko, I. S., A. A. Minin and A. A. Minin (2013). "[Role of vimentin in cell migration]." Ontogenez **44**(3): 186-202.
- Cheung, K. J. and A. J. Ewald (2014). "Invasive leader cells: metastatic oncogene." Oncotarget **5**(6): 1390-1391.
- Cheung, K. J., E. Gabrielson, Z. Werb and A. J. Ewald (2013). "Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program." Cell **155**(7): 1639-1651.

- Cho, H., J. L. Thorvaldsen, Q. Chu, F. Feng and M. J. Birnbaum (2001). "Akt1/PKB α is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice." J Biol Chem **276**(42): 38349-38352.
- Chou, C. F., A. J. Smith and M. B. Omary (1992). "Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18." J Biol Chem **267**(6): 3901-3906.
- Chung, B. M., J. D. Rotty and P. A. Coulombe (2013). "Networking galore: intermediate filaments and cell migration." Curr Opin Cell Biol **25**(5): 600-612.
- Cichon, M. A. and D. C. Radisky (2014). "ROS-induced epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells is mediated by NF- κ B-dependent activation of Snail." Oncotarget **5**(9): 2827-2838.
- Cong, L. and F. Zhang (2015). "Genome engineering using CRISPR-Cas9 system." Methods Mol Biol **1239**: 197-217.
- Corum, D. G., P. N. Tsichlis and R. C. Muise-Helmericks (2014). "AKT3 controls mitochondrial biogenesis and autophagy via regulation of the major nuclear export protein CRM-1." FASEB J **28**(1): 395-407.
- Coulombe, P. A., M. E. Hutton, A. Letai, A. Hebert, A. S. Paller and E. Fuchs (1991). "Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses." Cell **66**(6): 1301-1311.
- Coulombe, P. A. and M. B. Omary (2002). "'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments." Curr Opin Cell Biol **14**(1): 110-122.
- Davies, B. R., H. Greenwood, P. Dudley, C. Crafter, D. H. Yu, J. Zhang, J. Li, B. Gao, Q. Ji, J. Maynard, S. A. Ricketts, D. Cross, S. Cosulich, C. C. Chresta, K. Page, J. Yates, C. Lane, R. Watson, R. Luke, D. Ogilvie and M. Pass (2012). "Preclinical pharmacology of AZD5363, an inhibitor of AKT: pharmacodynamics, antitumor activity, and correlation of monotherapy activity with genetic background." Mol Cancer Ther **11**(4): 873-887.
- Dey, P., J. Togra and S. Mitra (2014). "Intermediate filament: structure, function, and applications in cytology." Diagn Cytopathol **42**(7): 628-635.
- Dullaart, R. and J. Mousquès Keratin : structure, properties, and applications.

- Evans, R. M. and L. M. Fink (1982). "An alteration in the phosphorylation of vimentin-type intermediate filaments is associated with mitosis in cultured mammalian cells." *Cell* **29**(1): 43-52.
- Fabi, F. and E. Asselin (2014). "Expression, activation, and role of AKT isoforms in the uterus." *Reproduction* **148**(5): R85-95.
- Fife, C. M., J. A. McCarroll and M. Kavallaris (2014). "Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis." *Br J Pharmacol* **171**(24): 5507-5523.
- Fischer, K. R., A. Durrans, S. Lee, J. Sheng, F. Li, S. T. Wong, H. Choi, T. El Rayes, S. Ryu, J. Troeger, R. F. Schwabe, L. T. Vahdat, N. K. Altorki, V. Mittal and D. Gao (2015). "Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance." *Nature* **527**(7579): 472-476.
- Fortier, A. M., E. Asselin and M. Cadrin (2011). "Functional specificity of Akt isoforms in cancer progression." *Biomol Concepts* **2**(1-2): 1-11.
- Fortier, A. M., E. Asselin and M. Cadrin (2013). "Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation." *J Biol Chem* **288**(16): 11555-11571.
- Fortier, A. M., K. Riopel, M. Desaulniers and M. Cadrin (2010). "Novel insights into changes in biochemical properties of keratins 8 and 18 in griseofulvin-induced toxic liver injury." *Exp Mol Pathol* **89**(2): 117-125.
- Fortier, A. M., C. Van Themsche, E. Asselin and M. Cadrin (2010). "Akt isoforms regulate intermediate filament protein levels in epithelial carcinoma cells." *FEBS Lett* **584**(5): 984-988.
- Fuchs, E. and P. A. Coulombe (1992). "Of mice and men: genetic skin diseases of keratin." *Cell* **69**(6): 899-902.
- Gonzalez, E. and T. E. McGraw (2009). "The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer." *Cell Cycle* **8**(16): 2502-2508.
- Grabinski, N., F. Ewald, B. T. Hofmann, K. Staufer, U. Schumacher, B. Nashan and M. Jucker (2012). "Combined targeting of AKT and mTOR synergistically inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells." *Mol Cancer* **11**: 85.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.

- Helenius, T. O., C. A. Antman, M. N. Asghar, J. H. Nystrom and D. M. Toivola (2016). "Keratins Are Altered in Intestinal Disease-Related Stress Responses." Cells **5**(3).
- Herrmann, H., H. Bar, L. Kreplak, S. V. Strelkov and U. Aebi (2007). "Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 562-573.
- Homberg, M. and T. M. Magin (2014). "Beyond expectations: novel insights into epidermal keratin function and regulation." Int Rev Cell Mol Biol **311**: 265-306.
- Honma, Y. and M. Harada (2014). "New therapeutic strategy for hepatocellular carcinoma by molecular targeting agents via inhibition of cellular stress defense mechanisms." J UOEH **36**(4): 229-235.
- Hyder, C. L., H. M. Pallari, V. Kochin and J. E. Eriksson (2008). "Providing cellular signposts--post-translational modifications of intermediate filaments." FEBS Lett **582**(14): 2140-2148.
- Inada, H., I. Izawa, M. Nishizawa, E. Fujita, T. Kiyono, T. Takahashi, T. Momoi and M. Inagaki (2001). "Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD." J Cell Biol **155**(3): 415-426.
- Inagaki, M., Y. Gonda, M. Matsuyama, K. Nishizawa, Y. Nishi and C. Sato (1988). "Intermediate filament reconstitution in vitro. The role of phosphorylation on the assembly-disassembly of desmin." J Biol Chem **263**(12): 5970-5978.
- Jiao, P., Y. S. Zhou, J. X. Yang, Y. L. Zhao, Q. Q. Liu, C. Yuan and F. Z. Wang (2013). "MK-2206 induces cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells and sensitizes TRAIL-mediated cell death." Mol Cell Biochem **382**(1-2): 217-224.
- Joosse, S. A., J. Hannemann, J. Spotter, A. Bauche, A. Andreas, V. Muller and K. Pantel (2012). "Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: impact on the detection of circulating tumor cells." Clin Cancer Res **18**(4): 993-1003.
- Julien, J. P. and W. E. Mushynski (1982). "Multiple phosphorylation sites in mammalian neurofilament polypeptides." J Biol Chem **257**(17): 10467-10470.
- Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." J Clin Invest **119**(6): 1420-1428.
- Karantza, V. (2011). "Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers." Oncogene **30**(2): 127-138.

- Kim, H. J., W. J. Choi and C. H. Lee (2015). "Phosphorylation and Reorganization of Keratin Networks: Implications for Carcinogenesis and Epithelial Mesenchymal Transition." Biomol Ther (Seoul) **23**(4): 301-312.
- Kim, H. S., J. J. Lee, S. I. Do, K. Kim, I. G. Do, D. H. Kim, S. W. Chae and J. H. Sohn (2015). "Overexpression of cytokeratin 17 is associated with the development of papillary thyroid carcinoma and the presence of lymph node metastasis." Int J Clin Exp Pathol **8**(5): 5695-5701.
- Knobel, M., E. A. O'Toole and F. J. Smith (2015). "Keratins and skin disease." Cell Tissue Res **360**(3): 583-589.
- Ku, N. O., S. Azhar and M. B. Omary (2002). "Keratin 8 phosphorylation by p38 kinase regulates cellular keratin filament reorganization: modulation by a keratin 1-like disease causing mutation." J Biol Chem **277**(13): 10775-10782.
- Ku, N. O., J. Liao and M. B. Omary (1997). "Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins." J Biol Chem **272**(52): 33197-33203.
- Ku, N. O., J. Liao and M. B. Omary (1998). "Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins." EMBO J **17**(7): 1892-1906.
- Ku, N. O., S. A. Michie, R. M. Soetikno, E. Z. Resurreccion, R. L. Broome and M. B. Omary (1998). "Mutation of a major keratin phosphorylation site predisposes to hepatotoxic injury in transgenic mice." J Cell Biol **143**(7): 2023-2032.
- Ku, N. O. and M. B. Omary (1995). "Identification and mutational analysis of the glycosylation sites of human keratin 18." J Biol Chem **270**(20): 11820-11827.
- Ku, N. O. and M. B. Omary (2006). "A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8." J Cell Biol **174**(1): 115-125.
- Ku, N. O., D. M. Toivola, P. Strnad and M. B. Omary (2010). "Cytoskeletal keratin glycosylation protects epithelial tissue from injury." Nat Cell Biol **12**(9): 876-885.
- Kwan, R., K. Looi and M. B. Omary (2015). "Absence of keratins 8 and 18 in rodent epithelial cell lines associates with keratin gene mutation and DNA methylation: Cell line selective effects on cell invasion." Exp Cell Res **335**(1): 12-22.
- Leduc, C. and S. Etienne-Manneville (2015). "Intermediate filaments in cell migration and invasion: the unusual suspects." Curr Opin Cell Biol **32C**: 102-112.

- Lee, J. M., S. Dedhar, R. Kalluri and E. W. Thompson (2006). "The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease." J Cell Biol **172**(7): 973-981.
- Li, J. and B. P. Zhou (2011). "Activation of beta-catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters." BMC Cancer **11**: 49.
- Liao, J. and M. B. Omary (1996). "14-3-3 proteins associate with phosphorylated simple epithelial keratins during cell cycle progression and act as a solubility cofactor." J Cell Biol **133**(2): 345-357.
- Liu, B., J. Willette-Brown, S. Liu, X. Chen, S. M. Fischer and Y. Hu (2011). "IKKalpha represses a network of inflammation and proliferation pathways and elevates c-Myc antagonists and differentiation in a dose-dependent manner in the skin." Cell Death Differ **18**(12): 1854-1864.
- Liu, F., Y. Xia, A. S. Parker and I. M. Verma (2012). "IKK biology." Immunol Rev **246**(1): 239-253.
- Liu, S., Z. Chen, F. Zhu and Y. Hu (2012). "IkappaB kinase alpha and cancer." J Interferon Cytokine Res **32**(4): 152-158.
- Lodish, H., A. Berk, C. A. Kaiser, M. Krieger, A. Bretscher, H. Ploegh, A. Amon and K. Martin (2016). Molecular Cell Biology, W. H. Freeman.
- Lodish, H., A. Berk, C. A. Keiser, M. Krieger, A. Bretscher, H. Ploegh and A. Amon (2012). Molecular Cell Biology.
- Loschke, F., K. Seltmann, J. E. Bouameur and T. M. Magin (2015). "Regulation of keratin network organization." Curr Opin Cell Biol **32**: 56-64.
- Maroulakou, I. G., W. Oemler, S. P. Naber and P. N. Tsichlis (2007). "Akt1 ablation inhibits, whereas Akt2 ablation accelerates, the development of mammary adenocarcinomas in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2/neu and MMTV-polyoma middle T transgenic mice." Cancer Res **67**(1): 167-177.
- McInroy, L. and A. Maatta (2007). "Down-regulation of vimentin expression inhibits carcinoma cell migration and adhesion." Biochem Biophys Res Commun **360**(1): 109-114.

- Mikami, T., S. Maruyama, T. Abe, T. Kobayashi, M. Yamazaki, A. Funayama, S. Shingaki, T. Kobayashi, C. Jun and T. Saku (2015). "Keratin 17 is co-expressed with 14-3-3 sigma in oral carcinoma in situ and squamous cell carcinoma and modulates cell proliferation and size but not cell migration." *Virchows Arch* **466**(5): 559-569.
- Moll, R., M. Divo and L. Langbein (2008). "The human keratins: biology and pathology." *Histochem Cell Biol* **129**(6): 705-733.
- Moser, C. V., K. Kynast, K. Baatz, O. Q. Russe, N. Ferreiros, H. Costiuk, R. Lu, A. Schmidtko, I. Tegeder, G. Geisslinger and E. Niederberger (2011). "The protein kinase IKKepsilon is a potential target for the treatment of inflammatory hyperalgesia." *J Immunol* **187**(5): 2617-2625.
- Omary, M. B. (2009). ""IF-pathies": a broad spectrum of intermediate filament-associated diseases." *J Clin Invest* **119**(7): 1756-1762.
- Pan, X., R. P. Hobbs and P. A. Coulombe (2013). "The expanding significance of keratin intermediate filaments in normal and diseased epithelia." *Curr Opin Cell Biol* **25**(1): 47-56.
- Qiu, G. H., X. Xie, F. Xu, X. Shi, Y. Wang and L. Deng (2015). "Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B." *Cytotechnology* **67**(1): 1-12.
- Reis, A., B. Hornblower, B. Robb and G. Tzertzinis (2014). "CRISPR/Cas9 and Targeted Genome Editing: A New Era in Molecular Biology." *NEB Expressions*(1).
- Rychahou, P. G., J. Kang, P. Gulhati, H. Q. Doan, L. A. Chen, S. Y. Xiao, D. H. Chung and B. M. Evers (2008). "Akt2 overexpression plays a critical role in the establishment of colorectal cancer metastasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(51): 20315-20320.
- Satelli, A. and S. Li (2011). "Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy." *Cell Mol Life Sci* **68**(18): 3033-3046.
- Savagner, P. (2001). "Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition." *Bioessays* **23**(10): 912-923.
- Schwarz, N., R. Windoffer, T. M. Magin and R. E. Leube (2015). "Dissection of keratin network formation, turnover and reorganization in living murine embryos." *Sci Rep* **5**: 9007.
- Sheket, G. and R. J. Lasek (1982). "Neurofilament protein phosphorylation. Species generality and reaction characteristics." *J Biol Chem* **257**(9): 4788-4795.

- Snider, N. T. and M. B. Omary (2014). "Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(3): 163-177.
- Snider, N. T. and M. B. Omary (2016). "Assays for Posttranslational Modifications of Intermediate Filament Proteins." Methods Enzymol **568**: 113-138.
- Sun, J., V. E. Groppi, H. Gui, L. Chen, Q. Xie, L. Liu and M. B. Omary (2016). "High-Throughput Screening for Drugs that Modulate Intermediate Filament Proteins." Methods Enzymol **568**: 163-185.
- Tao, G. Z., D. M. Toivola, B. Zhong, S. A. Michie, E. Z. Resurreccion, Y. Tamai, M. M. Taketo and M. B. Omary (2003). "Keratin-8 null mice have different gallbladder and liver susceptibility to lithogenic diet-induced injury." J Cell Sci **116**(Pt 22): 4629-4638.
- Toivola, D. M., P. Boor, C. Alam and P. Strnad (2015). "Keratins in health and disease." Curr Opin Cell Biol **32**: 73-81.
- Toivola, D. M., N. O. Ku, E. Z. Resurreccion, D. R. Nelson, T. L. Wright and M. B. Omary (2004). "Keratin 8 and 18 hyperphosphorylation is a marker of progression of human liver disease." Hepatology **40**(2): 459-466.
- Tong, X. and P. A. Coulombe (2006). "Keratin 17 modulates hair follicle cycling in a TNFalpha-dependent fashion." Genes Dev **20**(10): 1353-1364.
- Tschopp, O., Z. Z. Yang, D. Brodbeck, B. A. Dummler, M. Hemmings-Miesczak, T. Watanabe, T. Michaelis, J. Frahm and B. A. Hemmings (2005). "Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis." Development **132**(13): 2943-2954.
- Wang, R. and M. G. Brattain (2006). "AKT can be activated in the nucleus." Cell Signal **18**(10): 1722-1731.
- Yang, J. and R. A. Weinberg (2008). "Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis." Dev Cell **14**(6): 818-829.
- Yi, H. and N. O. Ku (2013). "Intermediate filaments of the lung." Histochem Cell Biol **140**(1): 65-69.
- Zeng, W., H. Chang, M. Ma and Y. Li (2014). "CCL20/CCR6 promotes the invasion and migration of thyroid cancer cells via NF-kappa B signaling-induced MMP-3 production." Exp Mol Pathol **97**(1): 184-190.