

2m11, 3109.7

Université de Montréal

**Le rôle de la PI3-kinase dans le phénotype invasif et
motile des cellules MSV-MDCK-INV.**

Par
Yolaine Dodier

Département de physiologie, Université de Montréal
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en physiologie
option physiologie et biophysique moléculaires

Août 2003

©, Yolaine Dodier, 2003



W
4
U58
2004
v.029

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
**Le rôle de la PI3-kinase dans le phénotype invasif et
motile des cellules MSV-MDCK-INV.**

Présenté par :
Yolaine Dodier

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Pierre Haddad
Président-rapporteur

Dr Josette Noël
Directeur de recherche

Dr Daniel Lajeunesse
Membre du jury

RÉSUMÉ

Plusieurs cellules tumorales dont celles du cancer de la thyroïde, de la prostate et du pancréas possèdent un récepteur HGF surexprimé et parfois, constitutivement activé. Le modèle cellulaire utilisé, les cellules MDCK transformées et invasives (MSV-MDCK-INV), expriment un récepteur HGF (c-Met) hautement phosphorylé sur tyrosine, et une boucle autocrine HGF/c-Met module la motilité et le phénotype de ces cellules. L'objectif du présent projet de recherche est de déterminer l'implication de la PI3-kinase dans l'activation de c-Met et l'acquisition du phénotype motile des cellules MSV-MDCK-INV. Le rôle et le degré d'implication de la PI3-kinase dans la modulation de l'activité de c-Met, dans l'établissement de la morphologie cellulaire, dans l'acquisition des propriétés motiles (aléatoire et directionnelle) et invasives des cellules MSV-MDCK-INV ont été explorés par l'utilisation des inhibiteurs de PI3-Kinase LY294002 et wortmannine.

Le LY294002 inhibe complètement et la wortmannine inhibe partiellement le degré de phosphorylation de la protéine Akt. Ces inhibiteurs induisent un allongement des pseudopodes et l'apparition de contacts intercellulaires. Le LY294002 inhibe partiellement et de façon significative la motilité aléatoire et la motilité directionnelle des cellules MSV-MDCK-INV. Le LY294002 et la wortmannine inhibent la capacité d'invasion des cellules MSV-MDCK-INV de 52% et 23% respectivement. Ces résultats indiquent que la PI3-kinase joue un rôle important dans la motilité et l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV mais que d'autres voies de signalisation sont aussi impliquées. Le rôle respectif de la PI3-kinase dans la motilité et l'invasion, indépendantes et dépendantes de c-Met constitutivement actif, demeure à être précisé. Il est toutefois évident que la PI3-kinase n'est pas constitutivement active dans les cellules MSV-MDCK-INV exprimant un récepteur c-Met constitutivement activé. Enfin, des effets inattendus concernant l'utilisation du DMSO comme solvant du LY294002 ont été observés et sont discutés.

Mots clés: *Hepatocyte growth factor (HGF), c-Met, PI3-kinase, Akt/PKB, LY294002, Wortmannine, Motilité, Invasion.*

SUMMARY

Various tumor cells, for example those found in thyroid, prostate or pancreatic cancer possess an over-expressed HGF receptor which at times is constitutively active. The cellular model used, transformed variants of MDCK cells (MSV-MDCK-INV), express a HGF receptor (c-Met) highly phosphorylated on tyrosine residues, and a HGF/c-Met autocrine activation loop that result in the motility and phenotype that is characteristic of these cells. The objective of the project at hand is to determine the involvement of PI3-kinase in the activation of c-Met and its role in the motile phenotype observed among MSV-MDCK-INV cells. The involvement of PI3-kinase in the modulation of c-Met activity, in the establishment of the cellular morphology and in the acquisition of motile (both sporadic and directional) and invasive properties in these MSV-MDCK-INV cells have been explored through the use of PI3-kinase inhibitors, namely LY294002 and wortmannin.

LY294002 and wortmannin, which induce respectively a complete or near complete inhibition of Akt phosphorylation, induce an elongation of the pseudopodial protrusions from the cells and result in the presence of cell-cell contacts. LY294002 partially but significantly inhibits both the sporadic and directional motility of MSV-MDCK-INV cells. LY294002 as well as wortmannin inhibit the invasive capacity of MSV-MDCK-INV cells by 52% and 23% respectively. These results demonstrate that PI3-kinase plays an important role in both the motile and invasive character of MSV-MDCK-INV cells, but that other signaling pathways are also involved. The respective role of PI3-kinase in motility and invasion, independent and dependent on c-Met's constitutive activity, remains an aspect to be examined. It is nonetheless obvious that PI3-kinase is not constitutively active in MSV-MDCK-INV cells that express a constitutively active c-Met receptor. At last, unexpected effects concerning the use of DMSO as a solvent for LY294002 were observed and are discussed.

Key words: *Hepatocyte growth factor (HGF), c-Met, PI3-kinase, Akt/PKB, LY294002, Wortmannin, Motility, Invasion.*

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	XIII
REMERCIEMENTS	XVIII
I. INTRODUCTION	1
I.1 LE CANCER	1
<i>I.1.1 La croissance tumorale.....</i>	<i>1</i>
<i>I.1.2 La formation de métastases</i>	<i>1</i>
I.1.2.1 L'adhésion cellulaire.....	2
I.1.2.1.1 Adhésion intercellulaire.....	2
I.1.2.1.2 Adhésion à la matrice extracellulaire.....	3
I.1.2.2 La motilité.....	5
I.1.2.3 L'invasion	7
I.2 LE HGF/SF ET LE RÉCEPTEUR HGF (C-MET).....	8
<i>I.2.1 Le HGF/SF.....</i>	<i>8</i>
I.2.1.1 Origine	8
I.2.1.2 Structure moléculaire du HGF	9
<i>I.2.2 Le récepteur HGF ou c-Met.....</i>	<i>10</i>
I.2.2.1 Distribution tissulaire.....	10
I.2.2.2 Structure.....	10
I.2.2.3 Activation et régulation de c-Met	11
I.2.2.3.1 Activation	11
I.2.2.3.2 Régulation positive par phosphorylation sur tyrosine ...	12
I.2.2.3.3 Régulation négative par phosphorylation sur sérine.....	13
I.2.2.4 Voies de signalisation activées	13
I.2.2.5 Rôles	15
<i>I.2.3 Implication du HGF et de son récepteur dans le cancer.....</i>	<i>16</i>
I.3 LA PI3-KINASE	16
<i>I.3.1 La grande famille des PI3-kinases.....</i>	<i>16</i>
<i>I.3.2 La PI3-kinase de classe Ia.....</i>	<i>17</i>

I.3.2.1	Structure.....	17
I.3.2.2	Activation	19
I.3.2.3	Activités.....	20
I.3.2.4	Cibles de la PI3-kinase	20
I.3.2.5	Implications physiologiques	22
I.3.2.5.1	Prolifération cellulaire	22
I.3.2.5.2	Motilité cellulaire.....	24
I.3.3	<i>Les inhibiteurs de la PI3-kinase</i>	27
I.3.3.1	La wortmannine	28
I.3.3.2	Le LY294002.....	30
I.3.4	<i>La PI3-kinase et le cancer</i>	31
I.3.4.2	Amplification et surexpression de la PI3-kinase	31
I.3.4.3	La PI3-kinase et les oncoprotéines	32
I.3.4.4	Une anomalie dans la synthèse ou l'hydrolyse des phospholipides	32
I.3.4.4.1	Inactivation de PTEN	33
I.3.4.4.2	Les récepteurs à activité tyrosine kinase amplifiés ou mutés	33
I.3.4.4.3	L'activation de l'oncogène Ras	33
I.4	LES CELLULES MSV-MDCK-INV	34
I.4.1	<i>Transformation par le virus du sarcome de Moloney</i>	34
I.4.2	<i>Sélection d'une population invasive</i>	35
I.4.3	<i>Caractéristiques des cellules MSV-MDCK-INV</i>	35
I.5	BUT DU PROJET	37
II.	MATÉRIEL ET MÉTHODES	38
II.1	ANTICORPS ET RÉACTIFS	38
II.1.1	<i>Réactif de culture cellulaire</i>	38
II.1.2	<i>Drogues</i>	38
II.1.3	<i>Anticorps primaires</i>	38
II.1.4	<i>Anticorps secondaires</i>	38
II.1.5	<i>Autres</i>	39
II.2	CULTURE CELLULAIRE.....	39
II.3	IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN	40

II.3.1	<i>Lysat cellulaire</i>	40
II.3.2	<i>Dosage des protéines</i>	40
II.3.3	<i>Séparation des protéines sur un gel de polyacrylamide</i>	41
II.3.4	<i>Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose</i>	42
II.3.5	<i>Révélation des protéines au Rouge Ponceau</i>	42
II.3.6	<i>Immunodétection</i>	43
II.3.6.1	Western blot anti-phosphotyrosine.....	43
II.3.6.2	Western blot anti-p125 ^{FAK}	43
II.3.6.3	Western blot anti-Akt et anti-phospho-Akt-serine	44
II.3.6.4	Western blot anti-phospho-c-Met.....	44
II.3.6.4	Western blot anti-PI3-kinase (p85)	44
II.3.7	<i>Révélation par chémiluminescence</i>	45
II.4	DÉCAPAGE (<i>STRIPPING</i>) DES ANTICORPS.....	45
II.5	IMMUNOFLUORESCENCE.....	46
II.6	VIDÉOMICROSCOPIE	46
II.7	CHAMBRE DE BOYDEN	47
II.8	TECHNIQUE DE LA GUÉRISON DE LA PLAIE.....	48
II.9	INCORPORATION DE LA ³ H-THYMIDINE.....	49
III.	RÉSULTATS	50
III.1	LE RÔLE DE LA PI3-KINASE DANS LA MOTILITÉ ACCRUE DES CELLULES MSV-MDCK-INV.	50
III.1.1	<i>La PI3-kinase est plus active dans les cellules MSV-MDCK-INV</i>	50
III.1.2	<i>Le LY294002 inhibe la croissance cellulaire et la phosphorylation de la protéine Akt des cellules MSV-MDCK-INV</i>	53
III.1.3	<i>Le LY294002 inhibe partiellement la motilité directionnelle des cellules MSV-MDCK-INV</i>	56
III.1.4	<i>La motilité aléatoire des cellules MSV-MDCK-INV est partiellement inhibée par le LY294002</i>	59
III.1.5	<i>Effet du LY294002 et de la wortmannine sur l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV dans une matrice de collagène de type I</i>	59
III.1.5.1	La wortmannine, à une concentration de 500 nM, inhibe partiellement la PI3-kinase.....	61

III.1.5.2 Le LY294002 et la wortmannine inhibent partiellement, et à des degrés différents, l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV dans la matrice de collagène de type I.....	61
III.1.6 <i>Le LY294002 et la wortmannine induisent une réorganisation du cytosquelette d'actine et un changement de morphologie des cellules MSV-MDCK-INV.</i>	67
III.2 EFFETS INATTENDUS DU LY294002 SUR LE DEGRÉ DE PHOSPHORYLATION DE C-MET DANS LES CELLULES MSV-MDCK-INV.....	70
III.2.1 <i>Le LY294002 induit une augmentation du degré de phosphorylation sur les résidus tyrosine de c-Met dans les cellules MSV-MDCK-INV.</i>	72
III.2.2 <i>Comparaison des effets du DMSO et du LY294002 sur le degré de phosphorylation de c-Met.</i>	76
IV. DISCUSSION.....	81
IV.1 LA PI3-KINASE EST IMPLIQUÉE DANS LA MOTILITÉ ET L'INVASION DES CELLULES MSV-MDCK-INV.....	81
IV.1.1 <i>La PI3-kinase module la motilité et la capacité d'invasion des cellules MSV-MDCK-INV.</i>	81
IV.1.2 <i>La PI3-kinase n'est pas constitutivement active dans les cellules MSV-MDCK-INV.</i>	84
IV.1.3 <i>Le rôle de la PI3-kinase dans la motilité et l'invasion, indépendantes et dépendantes de c-Met constitutivement actif, n'est pas bien défini dans les cellules MSV-MDCK-INV.</i>	86
IV.1.4 <i>Perspectives : Voies de signalisation et/ou protéines impliquées dans la motilité et l'invasion cellulaires autre que la PI3-kinase.</i>	88
IV.2 LA PI3-KINASE EST IMPLIQUÉE DANS L'ORGANISATION DU CYTOSQUELETTE DES CELLULES MSV-MDCK-INV.....	91
IV.3 LE RÔLE DE LA PI3-KINASE DANS LA RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ DE C-MET DANS LES CELLULES MSV-MDCK-INV DEMEURE INCERTAIN.....	95
IV.3.1 <i>La PI3-kinase ne semble pas moduler le degré d'activité de c-Met.</i>	96
IV.3.2 <i>Effet mitigé du DMSO sur l'activité de c-Met.</i>	97
IV.4 INTÉGRATION DES EFFETS DU DMSO ET DU LY294002 SUR LA MOTILITÉ ET L'INVASION DES CELLULES MSV-MDCK-INV.....	100
V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	101

VI. RÉFÉRENCES	103
VII. DOCUMENTS SPÉCIAUX	121
<i>Film 1 : Effet du LY294002 sur la motilité aléatoire des cellules MSV-MDCK- INV.....</i>	<i>121</i>

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Activité résiduelle des protéines tyrosine kinase en présence de wortmannine (1 μ M) et de LY294002 (50 μ M).....	29
Tableau 2: Paramètres de migration et de transfert des protéines.....	42
Tableau 3 (partie 1): Résumé des effets du LY294002 sur le degré de phosphorylation sur tyrosine de c-Met.....	73
Tableau 3 (partie 2):	74

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Mécanisme de base de la motilité cellulaire	4
Figure 2 : Shématisation des plaques d'adhésion focale.....	6
Figure 3 : Étapes impliquées dans la maturation du pré-pro-HGF en HGF.....	9
Figure 4 : Schématisation de la structure secondaire du récepteur HGF	11
Figure 5 : Activation du récepteur tyrosine kinase c-Met.....	12
Figure 6 : Les protéines de la signalisation intracellulaire recrutées par c-Met activé.....	14
Figure 7 : Structure fondamentale de la PI3-kinase de classe <i>Ia</i>	18
Figure 8 : Activation de la PI3-kinase classe <i>Ia</i> par les récepteurs à activité tyrosine kinase.....	20
Figure 9 : Modèle du mécanisme d'activation de Akt/PKB par la PI3-kinase.	22
Figure 10 : Le contrôle de la prolifération cellulaire par la PI3-kinase via le rôle central de PKB/Akt.	24
Figure 11 : Le contrôle de la motilité cellulaire par la PI3-kinase via l'activation des petites protéines G, Rho, Rac et cdc42 (114).....	26
Figure 12 : Structure moléculaire des inhibiteurs de la PI3-kinase.....	27
Figure 13 : La morphologie et l'organisation du cytosquelette d'actine des trois lignées cellulaires.	36
Figure 14 : Degré de phosphorylation sur les résidus tyrosine du récepteur HGF dans les trois lignées cellulaires.	37
Figure 15 : Principe de la chambre de Boyden	47
Figure 16 : Expression différentielle des protéines PI3-kinase et Akt dans les lignées cellulaires MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV.	51
Figure 17 : Effets du LY294002 sur la croissance cellulaire et le degré de phosphorylation de Akt des cellules MSV-MDCK-INV.	54

Figure 18 : Effet du LY294002 sur le degré de phosphorylation de Akt en fonction du temps de traitement.	55
Figure 19 : Effet de l'inhibition de la PI3kinase par le LY294002 sur la motilité directionnelle des cellules MSV-MDCK-INV.....	57
Figure 20 : Effet du LY294002 sur la motilité aléatoire des cellules MSV-MDCK-INV.....	60
Figure 21 : Le degré de phosphorylation de la protéine Akt est partiellement inhibé par la wortmannine 500 nM dans les cellules MSV-MDCK-INV.....	62
Figure 22 : Effet des traitements au LY294002 et à la wortmannine sur l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV à travers une matrice de collagène.	64
Figure 23 : Effet de l'orthovanadate de sodium sur la morphologie et la viabilité des cellules MSV-MDCK-INV.	66
Figure 24 : Effet du LY294002 et de la wortmannine sur la morphologie et l'organisation du cytosquelette d'actine des cellules MSV-MDCK-INV.....	68
Figure 25 : Effet d'un traitement au LY294002 20 µM sur le degré de phosphorylation sur tyrosine de c-Met.....	71
Figure 26 : Inhibition de l'incorporation de la ³ H-thymidine par le LY294002 de différentes compagnies.....	75
Figure 27 : Effet d'un traitement au LY294002 50 µM sur le degré de phosphorylation sur tyrosine de c-Met.....	77
Figure 28 : Effet d'un traitement au LY294002 50 µM et au DMSO 0.05% (témoin) sur le degré de phosphorylation sur les résidus tyrosine de c-Met.	79
Figure 29 : Effet du sérum et de l'anti-HGF sur le degré de phosphorylation de Akt et de c-Met des cellules MSV-MDCK-INV.....	85

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AP-1	Protéine activatrice 1 (<i>Activator protein-1</i>)
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BCA	Acide bicinchoninique (<i>bicinchoninic acid</i>)
BCR	Région qui regroupe des points de cassure (<i>breakpoint cluster region</i>)
BSA	Albumine sérique bovine (<i>bovine serum albumin</i>)
Ca ²⁺	ion calcium
Caco-2	Cellules épithéliales de cancer du colon (<i>colonic cancer epithelial cell</i>)
CAM	Molécule d'adhésion cellulaire (<i>cell adhesion molecule</i>)
CK2	Kinase 2 de la caséine (<i>casein kinase 2</i>)
CSF-1	Facteur 1 favorisant la formation des colonies (<i>Colony-stimulating factor-1</i>)
DMEM	Millieu essentiel minimum de Dulbecco (<i>Dulbecco's minimum essential medium</i>)
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
ECL	Chemiluminescence augmentée (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
EGF	Facteur de croissance épidermique (<i>epidermal growth factor</i>)
ERK1/2	Protéine kinase 1/2 régulée par un signal extracellulaire (<i>Extracellular signal-regulated protein kinase 1/2</i>)
ERK5	Protéine kinase 5 régulée par un signal extracellulaire (<i>Extracellular signal-regulated protein kinase 5</i>)
FBS	Sérum de bovin fœtal (<i>foetal bovine serum</i>)

FHR-TF	Facteur de transcription associé à la fourche (<i>forkhead-related transcription factor</i>)
Gab1	Adaptateur 1 associé à Grb2 (<i>Grb2-associated binder 1</i>)
GAP	Protéine activatrice de GTPase (<i>GTPase-activating protein</i>)
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
GNE	Échange de nucléotide guanine (<i>guanine nucleotide exchange</i>)
GEF	Facteur d'échange de guanine (<i>guanine exchange factor</i>)
GNEF	Facteur d'échange de nucléotide guanine (<i>guanine nucleotide exchange factors</i>)
Grb2	Protéine de liaison 2 aux récepteurs des facteurs de croissance (<i>growth factor receptor binding protein-2</i>)
GSK3	Glycogène synthetase kinase 3 (<i>glycogen synthase kinase 3</i>)
³ H	Tritium
HCC	Carcinome hépatocellulaire (<i>Hepatocellular carcinoma</i>)
HGF	Facteur de croissance hépatocytaire (<i>hepatocyte growth factor</i>)
HRP	Peroxydase du raifort (<i>Horseradish peroxidase</i>)
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazinéthanesulfonique
IC ₅₀	Concentration d'un composé provoquant 50% de l'inhibition
ILK	Kinase liée aux intégrines (<i>integrin-linked kinase</i>)
LY294002	2-(4-Morpholinyl)-8-phényl-4H-1-benzopyran-4-one
MAPK	Protéine kinase activée par les agents mitogènes (<i>Mitogen activated protein kinase</i>)
MBD	Domaine de liaison à c-Met (<i>Met binding domain</i>)

MDCK	Lignée cellulaire de tubules proximaux de rein de chien isolée par les chercheurs Madin et Darby (<i>Madin-Darby canine kidney cells</i>)
MSV-MDCK	Cellules MDCK transformées par le virus du sarcome de Moloney (<i>MSV</i>)
MSV-MDCK-INV	Cellules MDCK transformées par le virus du sarcome de Moloney et invasives
MEK 1/2	Kinase activée par les agents mitogènes et qui active la kinase ERK (<i>Mitogen-activated ERK-activating kinase</i>)
Mg ²⁺	ion magnésium
MLCK	Kinase de la chaîne légère de la myosine (<i>myosin light chain kinase</i>)
MMP	Métalloprotéase spécifique à la matrice extracellulaire (<i>matrix metalloprotease</i>)
Na ₃ VO ₄	Orthovanadate de sodium
p125 ^{FAK}	Kinase présente dans les points focaux d'adhésion (<i>focal adhesion kinase</i>)
PBS	Tampon salin à base de phosphate (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBS-CM	Tampon salin à base de phosphate contenant du calcium et du magnésium
PD098059	2-(2-amino-3-methoxyphényl)-4H-1-Benzopyran-4-one
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes sanguines (<i>Platelet derived growth factor</i>)
PDK1	Kinase-1 dépendante des phosphoinositides (<i>phosphoinositide-dependent kinase-1</i>)
PDK2	Kinase-2 dépendante des phosphoinositides (<i>phosphoinositide-dependent kinase-2</i>)
PH	Homologue à la pleckstrine (<i>pleckstrin homology</i>)
PI3-kinase	Phosphoinositide 3- kinase
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C

PLC γ	Phospholipase C- γ
PMSF	Phénylméthanesulfonyl fluorure
PRGFs	Facteur de croissance apparenté aux plasminogènes (<i>plasminogen Related Growth Factor</i>)
PTB	Domaine de liaison aux résidus tyrosine phosphorylés (<i>phosphotyrosine binding domain</i>)
PtdIns	Phosphatidylinositol
PTP α	Protéine tyrosine phosphatase α
PTP1B	Protéine tyrosine phosphatase 1B
PTP-PEST	Protéine tyrosine phosphatase PEST
PTP-S	Protéine tyrosine phosphatase S
R-HGF	Récepteur du HGF
SDS	Sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (<i>polyacrylamyl gel electrophoresis</i>)
SF	Facteur d'étalement (<i>Scatter Factor</i>)
SH2	Homologue de Src 2 (<i>Src-homology 2</i>)
SH3	Homologue de Src 3 (<i>Src-homology 3</i>)
SCLC	Cancer du poumon à petites cellules (<i>Small cell lung cancer</i>)
SOS	Protéine adaptatrice se fixant à ras nommée Son of sevenless (<i>Ras guanine nucleotide exchange factor son-of-sevenless</i>)
STAT3	Transducteur de signal et activateur de transcription 3 (<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>)
TBS	Tampon salin à base de Tris (<i>Tris buffered saline</i>)
TCA	Acide trichloroacétique
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
TGF- β 1	Facteur de croissance β 1 favorisant la transformation (<i>transforming growth factor-beta 1</i>)

TLC	Chromatographie en couche mince (<i>Thin layer chromatography</i>)
TR	Rouge de texan (<i>Texas Red</i>)
Tris	Tris (Hydroxyméthyl) Aminométhane
U0126	1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(o-aminophényl)mercapto
U73122	1-(6-((17 β -3-méthoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole-2,5-dione

REMERCIEMENTS

Je désire exprimer ma gratitude à ceux et celles qui ont rendu possible, de loin ou de près, l'accomplissement de ce mémoire. Tout d'abord, j'aimerais témoigner toute ma gratitude à mon père Yvon, ma mère Liliane ainsi qu'à leurs conjoints et mes sœurs Annick et Josianne pour leur soutien moral et la confiance qu'ils ont eue en mes compétences. Je tiens également à remercier mon amoureux, Jean-François, qui m'a soutenue durant certains mois difficiles de ma maîtrise et qui a réussi par sa joie de vivre, à rendre ces moments plus agréables.

Je voudrais également remercier tout particulièrement le Dr Josette Noël de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir supervisée d'une façon remarquable. Ses encouragements, son dévouement ainsi que ses conseils ont été très précieux tout au long de ces trois années et m'ont permis, à certains moments difficiles, de ne pas sombrer dans le découragement. Un merci spécial, aux membres du laboratoire, Joe Giannini Julie Vadnais, David Germain et Zeinab Daher pour leur grand soutien moral et technique, ainsi qu'à leur amitié. Je voudrais également remercier le Dr Calderone pour ces conseils judicieux, le Dr Béliveau pour son aide technique ainsi que le Dr Nabi pour la lignée cellulaire MSV-MDCK-INV et l'accès au microscope à fluorescence et au système de vidéomicroscopie.

Mes remerciements au Groupe de recherche sur le transport membranaire (GRTM) pour leur soutien financier indispensable, ainsi qu'à tous les chercheurs, étudiants et tous les membres du personnel dont Pierrette Fournel, Julie Verner et Johanne Payette pour leur aide. Finalement, je souhaite témoigner ma reconnaissance aux membres du jury, Dr Pierre Haddad et Dr Daniel Lajeunesse, d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

I. INTRODUCTION

I.1 LE CANCER

On estime que 139 900 nouveaux cas de cancer et 67 400 décès liés à cette maladie seront enregistrés au Canada en 2003 (21). D'après les taux d'incidence actuels, 38% des femmes et 41% des hommes seront atteints d'un cancer au cours de leur vie (21). Ainsi, le cancer, de par le nombre important de personnes qu'il atteint, constitue un problème majeur de santé publique. L'espoir de trouver un remède ne peut se nourrir que de la recherche. La plupart des travaux de recherche visent une meilleure compréhension des mécanismes du cancer. Comment apparaît le cancer? Comment les tumeurs se développent-elles? Comment peut-on freiner cette croissance? La recherche fondamentale, menée en laboratoire, permettra de trouver des réponses à ces questions et d'émettre de nouvelles hypothèses permettant d'orienter la recherche à long terme.

I.1.1 La croissance tumorale

La croissance des cancers comporte de multiples étapes : l'initiation (la transformation des cellules saines), la promotion (exposition prolongée, répétée ou continue, à une substance qui entretient et stabilise la lésion initiée) et la progression (croissance, angiogenèse tumorale, invasion cellulaire et formation de tumeurs secondaires) (55). La dissémination des cellules tumorales à travers l'organisme, phénomène connu sous le nom de métastase, constitue l'évènement majeur de la croissance d'un cancer puisque l'apparition des métastases reflète la gravité du cancer et annonce une rémission plus longue ou même impossible. Au contraire, lorsque la tumeur primaire est enlevée ou traitée dès son apparition, les chances de rémission sont très élevées.

I.1.2 La formation de métastases

L'acquisition d'une capacité métastatique par les cellules tumorales nécessite plusieurs changements biologiques: un évènement génétique telle une mutation, l'expression de propriétés cellulaires nouvelles telles la perte

de connexions intercellulaires, l'initiation d'une angiogenèse, l'augmentation de l'activité protéasique, le gain de motilité, l'altération des réponses aux facteurs de croissance, la perte d'expression d'antigènes permettant d'échapper à la reconnaissance immunitaire, et la constitution d'un environnement favorisant l'implantation des cellules tumorales dans différents organes (5). La formation de métastases suit donc une série d'étapes (5) :

- 1- L'échappement : détachement des cellules puis dégradation de la membrane basale, attachement à la matrice extracellulaire, dégradation de la matrice extracellulaire et enfin, migration jusqu'à la circulation.
- 2- La dissémination des cellules tumorales dans l'organisme via la voie sanguine, la voie lymphatique et la voie cœlomique (plèvre ou péritoine).
- 3- L'envahissement des tissus sains par les cellules métastatiques impliquant l'implantation, la dégradation de la matrice extracellulaire, l'infiltration et la croissance de la tumeur.

L'étude des comportements acquis par les cellules métastatiques a démontré un lien entre certaines protéines impliquées à la fois dans les fonctions cellulaires normales et les comportements des cellules métastatiques. Ainsi, les trois étapes de la formation de métastases sont donc accompagnées de trois comportements cellulaires : l'adhésion, la motilité et l'invasion cellulaire (82). Vu l'importance et la pertinence de ces phénomènes pour la compréhension de mon projet de recherche, je m'y attarderai plus longuement.

1.1.2.1 L'adhésion cellulaire

On peut distinguer deux modes d'adhésion cellulaire : l'adhésion intercellulaire et l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire (5).

1.1.2.1.1 Adhésion intercellulaire

Dans les tissus normaux, la cohésion des cellules entre elles est essentielle et elle résulte d'interactions directes entre les glycoprotéines de la surface cellulaire appelées CAM (*cell adhesion molecule*) et de la présence des structures spécialisées telles que les jonctions *gap* et les desmosomes (5). Les cellules métastatiques, au contraire, s'individualisent, c'est-à-dire

qu'elles perdent leur adhérence intercellulaire. Cette propriété leur permet de s'échapper de la masse tumorale pour former des métastases. L'individualisation des cellules est liée à un défaut de synthèse des composantes péricellulaires membranaires, dont les molécules CAM, qui servent à connecter les cellules entre elles (5).

I.1.2.1.2 Adhésion à la matrice extracellulaire

L'adhésion à l'environnement matriciel est assurée par la liaison spécifique entre des glycoprotéines de la surface cellulaire et différentes composantes de la matrice extracellulaire. Une importante famille de récepteurs, les récepteurs intégrines, se lie spécifiquement à des séquences peptidiques précises portées par différentes protéines de la matrice extracellulaire. Dans cette grande famille, on retrouve les récepteurs interagissant avec les collagènes de type I et IV, la laminine, la fibronectine, la vitronectine et plusieurs autres composantes de la matrice (5). La dimérisation des récepteurs intégrines induit une série de signaux intracellulaires via leur association avec de nombreuses protéines adaptatrices qui font la connexion entre le cytosquelette, les protéines kinases cytoplasmiques et les récepteurs de facteurs de croissance transmembranaires (49) (cette cascade d'évènements sera discutée plus longuement à la section I.1.2.2).

Ainsi, lors de la formation de tumeurs secondaires, la migration des cellules métastatiques nécessite un cycle adhésion-déadhésion des cellules à la matrice extracellulaire (84). Ce cycle commence par la formation d'une extension cytoplasmique en forme de pseudopode, menant à la formation d'un nouveau contact cellule-matrice. Il y a donc adhésion du pseudopode à la matrice extracellulaire via les récepteurs intégrines, déplacement du corps cellulaire vers la protusion afin d'incorporer le nouveau pseudopode dans le corps cellulaire, puis détachement du contact cellule-matrice à l'arrière de la cellule (déadhésion). La cellule répète ensuite ce mécanisme de base. La cellule motile passe donc alternativement par un état allongé (protusion des pseudopodes) et rond (73). Voir la **figure 1**.

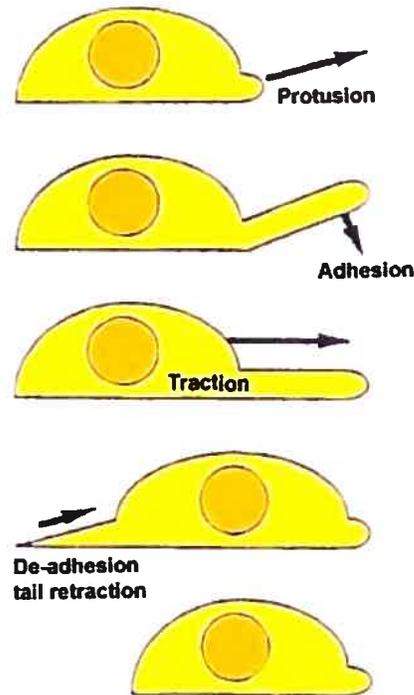


Figure 1 : Mécanisme de base de la motilité cellulaire montrant les trois grandes étapes impliquées: adhésion d'un pseudopode, déplacement du corps cellulaire et déadhesion du contact cellule-matrice à l'arrière de la cellule. Adapté de Mitchison et al (84).

L'attachement et le détachement des cellules tumorales à la matrice extracellulaire permettent également de fournir de l'information à la cellule à propos de son environnement et de ce fait, mènent à un changement dans l'expression de gènes spécifiques impliqués dans la prolifération cellulaire, l'invasion cellulaire et plusieurs autres processus cellulaires (142). Il est également important de mentionner que l'expression des récepteurs intégrines est altérée dans les cellules malignes comparées aux cellules normales. Cette perte ou ce gain d'expression ne semble cependant pas lié directement à la transformation maligne. Le changement dans l'expression des intégrines paraît être spécifique de la tumeur autant que du type de récepteur intégrine (142).

I.1.2.2 La motilité

La machinerie cellulaire impliquée dans la motilité des cellules est basée sur un réseau de filaments d'actine polymérisée qui soutient le cytoplasme en périphérie. Ce réseau est constitué de filaments d'actine agencés en une variété de configurations qui interagissent avec plusieurs protéines (*actin-associated proteins*). Ces dernières sont responsables de l'état de polymérisation des filaments d'actine. Pour que les cellules puissent bouger, le réseau d'actine doit être désassemblé (perte de monomères d'actine) pour former une protusion pseudopodiale et réassemblé (ajout de monomères d'actine) pour stabiliser le résultat de l'extension (27). Ainsi, le cytosquelette d'actine est un élément clé dans la modulation de la motilité cellulaire.

De plus, la matrice extracellulaire influence le cytosquelette d'actine via les voies de signalisation induites par l'activation des récepteurs intégrines. Celle-ci induit le regroupement des récepteurs intégrines et l'activation d'une variété de protéines tyrosine kinase telles que p125^{FAK} (*focal adhesion kinase*), Abl et la famille des Src, ainsi que la protéine sérine/thréonine kinase ILK (*integrin-linked kinase*) (49). Ainsi, les récepteurs intégrines, les protéines kinase et les protéines de structure, qui font le lien entre les intégrines et l'actine (telles la taline, l'actinine α , la vinculine, la paxilline et la tensine) forment un imposant complexe de protéines connu sous le nom de plaque d'adhésion focale (156) (Voir **Figure 2**). Ces nombreuses protéines kinase régulatrices présentent dans les plaques d'adhésion focales sont impliquées dans une variété d'évènements de la signalisation cellulaire qui régulent plusieurs processus cellulaires tels que la forme des cellules et la motilité cellulaire (142). Par exemple, dans une série de lignées cellulaires de mélanome humain, la migration des cellules est directement proportionnelle à l'expression de la protéine kinase p125^{FAK} (2). D'autre part, le degré de phosphorylation de la protéine p125^{FAK} semble dicter le comportement métastatique des mélanomes malins humain puisque la protéine p125^{FAK} est constitutivement active dans ces cellules (62).

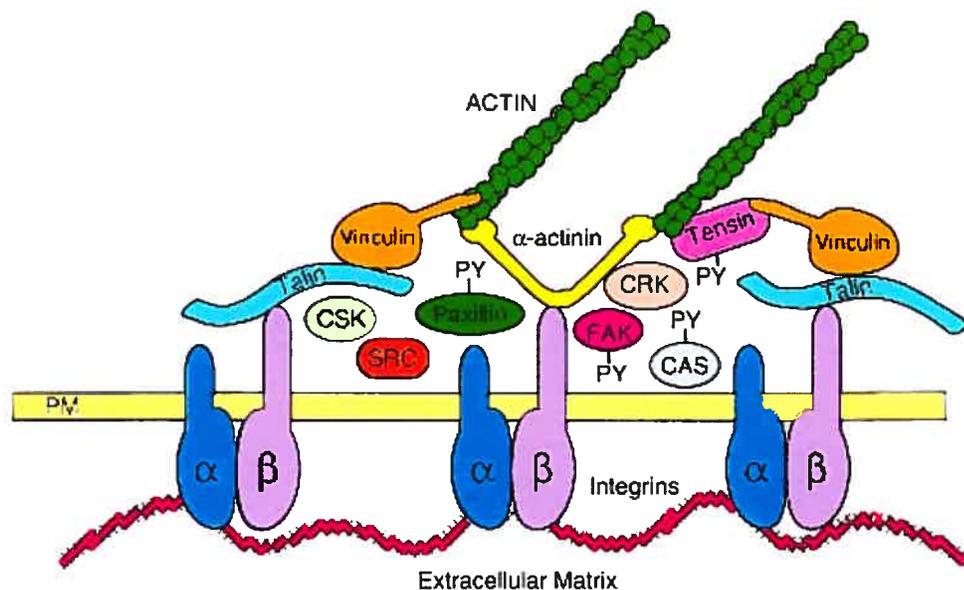


Figure 2 : Shématisation des plaques d'adhésion focale montrant les différentes interactions entre les récepteurs intégrine, l'actine et les protéines de structure. Adapté de Vuori et al. (156)

De plus, les récepteurs intégrines et les récepteurs de facteurs de croissance régulent l'étalement et la migration cellulaire via l'activation des protéines de la famille des Rho (Rho, Rac, cdc42) (49). Ces petites protéines à activité GTPase, de poids moléculaire moyen de 20 kDa, influencent plusieurs processus cellulaires mais plus particulièrement la régulation du cytosquelette d'actine (voir la section 1.3.2.5.2). La protéine Rho est impliquée dans la formation et le maintien des fibres de stress et de l'adhésion focale, la protéine Rac régule la structure corticale de l'actine en lamellipodes (structure large et plate) et la protéine cdc42 module la formation de filopodes (structure cylindrique) (99). Par l'établissement de ces différentes structures, les petites protéines G régulent le type de mouvement des cellules motiles.

La motilité cellulaire peut être évaluée et/ou quantifiée de différentes façons : *In vitro*, la **motilité aléatoire** ou **haptotaxisme** peut être quantifiée par vidéomicroscopie à l'aide de vecteurs de déplacement car les cellules sont libres de se déplacer dans toutes les directions. La **motilité**

directionnelle est plutôt mesurée par la technique de guérison d'une plaie car les cellules adjacentes à la plaie ne peuvent migrer qu'en direction de l'espace libre. La **capacité d'invasion** cellulaire est mesurée *in vitro* par le mouvement tridimensionnel des cellules à travers une matrice extracellulaire recouvrant un filtre poreux, dispositif appelé chambre de Boyden ou *transwell chamber*. Enfin, la **capacité métastatique** des cellules cancéreuses à se disséminer dans l'organisme est évaluée par l'utilisation de souris athymiques, lesquelles ont perdu toute capacité à se défendre contre l'invasion de cellules étrangères. (82)

1.1.2.3 L'invasion

L'invasion des cellules tumorales dans la matrice extracellulaire de l'organisme est associée à une dissolution localisée de la matrice adjacente au pseudopode qui la pénètre (142). La protéolyse de la matrice extracellulaire nécessite des enzymes qui dégradent la matrice extracellulaire : les métalloprotéases (MMP pour *matrix metalloprotease*), les protéases à sérine, les protéases à aspartate, les protéases à thréonine et les protéases à cystéine (142). Ces protéases sont produites de façon autocrine par les cellules tumorales ou de façon paracrine par les cellules stromales environnantes (82). Ainsi, les protéases jouent un rôle important dans l'invasion tumorale, la néovascularisation et la colonisation métastatique (82).

Nous avons souligné plus haut que le contrôle de plusieurs processus cellulaires dont le mouvement des cellules et de leur adhésion aux cellules voisines ou à la matrice est perturbé chez les cellules métastatiques. Une des avancées majeures de la biologie cellulaire a été de décrire certaines des molécules, dont les facteurs de croissance, impliquées dans le contrôle de ces multiples étapes. Les facteurs de croissance sont des protéines qui se lient à des récepteurs présents à la surface des cellules pour activer les programmes cellulaires nécessaires au bon fonctionnement de la cellule dans son environnement immédiat. Une perturbation au niveau de l'interaction facteur de croissance-récepteur ou à tout autre niveau de la cascade d'évènements enclenchée par l'activation de ces récepteurs peut

conduire à la transformation cellulaire, phénomène à la base du développement d'un cancer. Bloquer l'activation des récepteurs des facteurs de croissance des cellules tumorales est donc une piste prometteuse pour empêcher le dérèglement de la machinerie cellulaire qui cause le cancer. L'étude d'un facteur de croissance particulier, le HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), fait l'objet de ce projet de recherche. Ce facteur et son récepteur seront donc décrits extensivement.

I.2 LE HGF/SF ET LE RÉCEPTEUR HGF (C-MET)

I.2.1 Le HGF/SF

L'*Hepatocyte Growth Factor* (HGF), aussi connu sous le nom de *Scatter Factor* (SF), est une cytokine soluble qui appartient à la famille des *Plasminogen Related Growth Factor* (PRGFs) puisque sa structure est homologue aux enzymes de la cascade de la coagulation sanguine (136).

I.2.1.1 Origine

Le HGF a été isolé à partir des plaquettes de rat (91), du plasma humain (50, 165) et du sérum de lapin (165) pour son habileté à induire la croissance des hépatocytes. Pour sa part, le SF a été isolé des fibroblastes pour son habileté à induire la dissociation des cellules épithéliales (139, 140). Des analyses biochimiques ultérieures ont démontré que ces deux polypeptides ayant une activité biologique différente sont, en fait, la même molécule (95). En situation physiologique, le HGF est synthétisé principalement par les cellules d'origine mésenchymale et stromale (les cellules mésenchymales sont l'équivalent embryonnaire des cellules stromales), mais non par les cellules épithéliales. Curieusement, le récepteur HGF se trouve principalement dans les cellules épithéliales. Ceci indique que le HGF est un médiateur dans l'interaction entre les cellules mésenchymales et les cellules épithéliales (11, 139).

I.2.1.2 La structure moléculaire du HGF

Tout d'abord, le HGF est synthétisé sous forme de pré-pro-HGF et cette simple chaîne précurseure de 728 acides aminés est convertie en pro-HGF par une coupure intracellulaire (11). Le pro-HGF peut alors être sécrété de la cellule (11, 85) et une fois dans l'espace extracellulaire, il est converti en HGF mature par une simple coupure entre les acides aminés Arg⁴⁹⁴ et Val⁴⁹⁵ par des protéases à résidus sérines du sérum (*HGF-converting enzyme*). (11, 85, 89). Cette protéolyse est essentielle pour induire les réponses biologiques du HGF puisque le pro-HGF est inactif (85). Le HGF mature est une protéine hétérodimérique composée d'une sous-unité α (69 kDa) liée à une sous-unité β (34 kDa) par un pont disulfure entre les acides aminés Cys⁶⁰⁴ de la chaîne β et Cys⁴⁸⁷ de la chaîne α (89, 90). Voir **figure 3**.

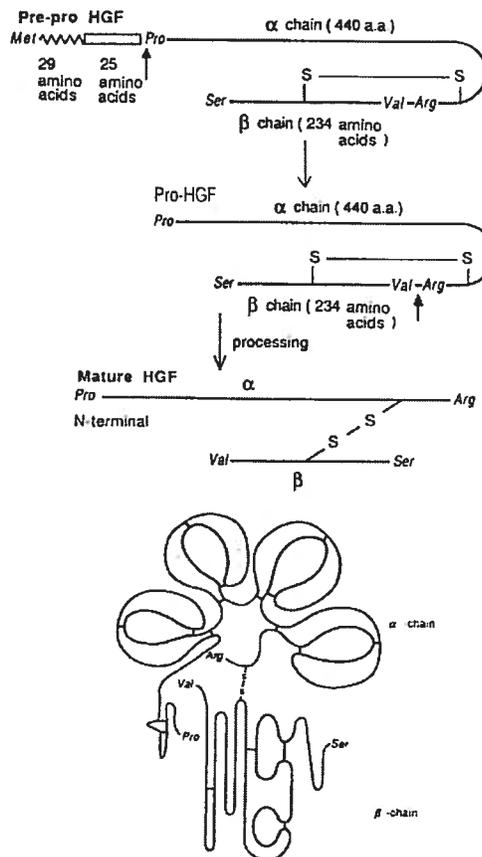


Figure 3 : Étapes impliquées dans la maturation du pré-pro-HGF en HGF. La structure secondaire du HGF mature est aussi montrée, laquelle est formée d'une sous-unité α de 69 kDa et sous-unité β de 34 kDa. Adapté de Nakamura, 1989 (90).

I.2.2 Le récepteur HGF ou c-Met

Le HGF se lie spécifiquement à son récepteur, le récepteur HGF (R-HGF), aussi connu sous le nom de c-Met.

I.2.2.1 Distribution tissulaire

Le récepteur HGF a été identifié dans une variété de cellules et tissus normaux, incluant le rein, le colon, le sein, le foie, les microglies du système nerveux central, le pancréas, les mélanocytes, la prostate et les cellules endothéliales vasculaires (11). Une implication de c-Met dans la pathogenèse des carcinomes a été suggérée puisque c-Met a également été trouvé dans un grand nombre de tissus malins (11) (sera discuté à la section I.2.3). Dans les cellules épithéliales, c-Met est exprimé sélectivement dans les membranes plasmiques basolatérales (26). Sa localisation facilite son interaction avec les cellules mésenchymales environnantes ainsi qu'avec le HGF présent dans la circulation au cours du développement et lors de la régénération des cellules à la suite d'une blessure. Cette localisation particulière de c-Met favorise aussi la transformation épithéliale lors de la formation d'un carcinome (11).

I.2.2.2 La structure

Le récepteur HGF est un récepteur tyrosine kinase encodé par le proto-oncogène *c-met*. Ce récepteur est un polypeptide dimérique transmembranaire de 190 kDa composé d'une chaîne α et d'une chaîne β . La chaîne α (50 kDa) est exposée à la surface de la cellule et est liée par un pont disulfure à la chaîne β (145 kDa) qui traverse la membrane plasmique (136) (**Figure 4**). La chaîne β comprend un domaine transmembranaire, un domaine juxtamembranaire, un domaine catalytique tyrosine kinase et un site de liaison multifonctionnel à l'extrémité C-terminale (15, 16). Les chaînes α et β sont toutes les deux essentielles pour promouvoir une liaison à haute affinité du HGF (136).

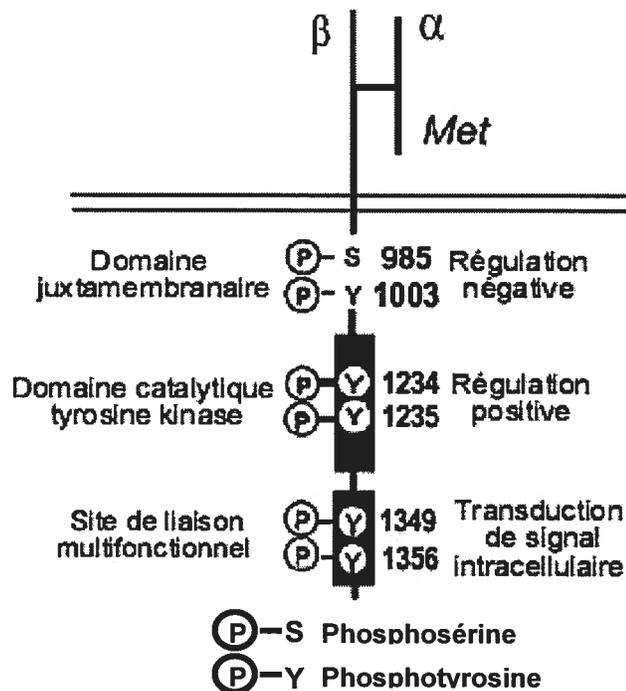


Figure 4 : Schématisation de la structure secondaire du récepteur HGF représentant les différents domaines et résidus tyrosine pouvant être phosphorylés à la suite de l'auto-activation du récepteur ou, dans le cas de S⁹⁸⁵ et Y¹⁰⁰³, de l'activation d'autres voies de signalisation intracellulaires.

Adapté de Bardelli, 1997 (16).

I.2.2.3 Activation et régulation de c-Met

I.2.2.3.1 Activation

Lorsque le HGF se lie à c-Met, il y a dimérisation des récepteurs et transphosphorylation réciproque de certains résidus tyrosines spécifiques du domaine catalytique et des autres domaines (15, 136) (**Figure 5**).

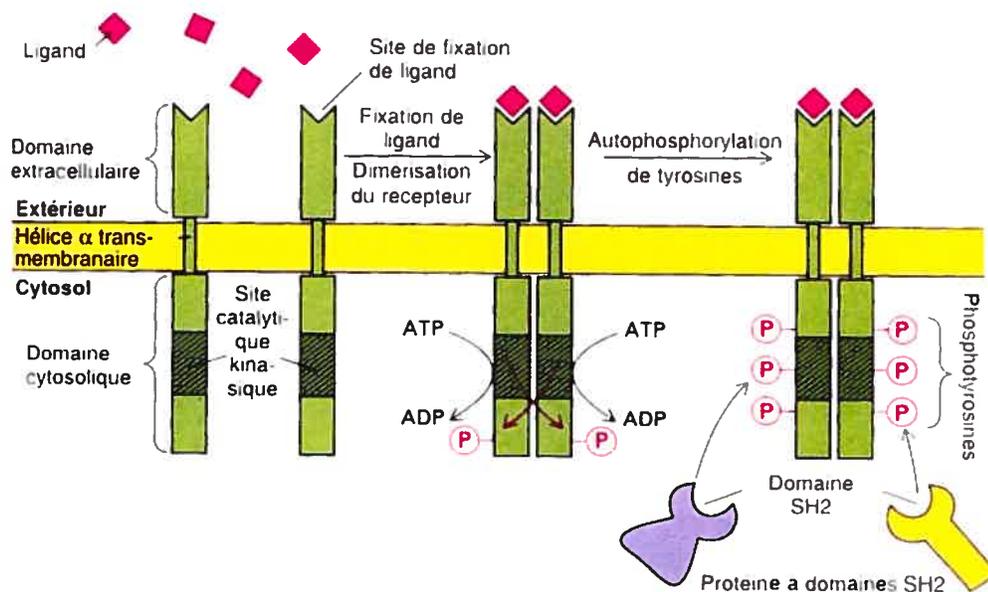


Figure 5 : Activation du récepteur tyrosine kinase c-Met : liaison du ligand au récepteur, dimérisation du récepteur, transphosphorylation de certains résidus tyrosine du domaine cytosolique. Les phosphotyrosines formées servent de site d'attache à plusieurs protéines à domaine SH2. Adapté de Lodish, 1997 (77)

I.2.2.3.2 Régulation positive par phosphorylation sur tyrosine

La phosphorylation des résidus Y^{1234} et Y^{1235} , situés dans le domaine kinase du récepteur HGF, est essentielle à son activation maximale (15). Le rôle de ces tyrosines dans la régulation positive de c-Met a été étudié par mutagenèse dirigée. Longati et al. ont démontré que la substitution de la Y^{1235} ou Y^{1234} réduisait significativement l'activité kinase *in vitro* de ces récepteurs mutés (78). De plus, d'autres sites à l'extérieur du domaine kinase sont importants dans la transduction de signal intracellulaire. Les résidus phosphorylés Y^{1349} et Y^{1356} , localisés dans le domaine C-terminal cytoplasmique de c-Met, forment un site de liaison aux transducteurs cytoplasmiques contenant un domaine SH2 (*Src-homology domain 2*) (discuté à la section I.2.2.4) (103). En bref, la régulation positive de l'activité kinase de c-Met par l'autophosphorylation des résidus Y^{1235} et Y^{1234} du domaine kinase est nécessaire pour la phosphorylation des résidus Y^{1349} et

Y¹³⁵⁶ du site de liaison multifonctionnel, impliqués dans le couplage du récepteur c-Met avec les transducteurs cytoplasmiques (15) (**Figure 4**).

I.2.2.3.3 Régulation négative par phosphorylation sur sérine

L'activation de la protéine kinase C (PKC) exerce un contrôle négatif sur la phosphorylation du récepteur c-Met (45). De plus, l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ inhibe la phosphorylation sur tyrosine de c-Met. Cette régulation négative de l'activité kinase de c-Met a lieu via la phosphorylation d'un résidu sérine par une protéine sérine kinase dépendante du Ca²⁺ (47). Le résidu S⁹⁸⁵, localisé dans le domaine juxtamembranaire de c-Met, a été identifié comme étant le site majeur de phosphorylation par les PKC et les protéines kinase dépendantes du Ca²⁺ (46) (**Figure 4**). De plus, la Tyr¹⁰⁰³ du domaine juxtamembranaire exerce également un effet inhibiteur sur l'activité du récepteur HGF. Cet effet négatif est moins clair, mais on sait qu'il dépend du recrutement par le récepteur d'une tyrosine phosphatase cytosolique (16, 154) (**Figure 4**).

I.2.2.4 Voies de signalisation activées

Les résidus phosphorylés Y¹³⁴⁹ et Y¹³⁵⁶ de c-Met activé forment un site de liaison multifonctionnel favorable à la liaison d'effecteurs cytoplasmiques contenant un domaine SH2, un domaine PTB (*phosphotyrosine binding domain*) et un domaine MBD (*Met binding domain*) (44, 103, 158). Le récepteur HGF recrute de multiples protéines (**Figure 6**) telles que les protéines adaptatrices Grb2 (*Growth factor receptor binding protein-2*), Shc, Gab1 (*Grb2-associated binder 1*) et Crk/CRKL. Plusieurs autres protéines ayant un rôle bien établi dans la transduction du signal telles que la PI3-kinase, STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*), phospholipase C- γ (PLC γ), SOS (*Ras guanine nucleotide exchange factor son-of-sevenless*), les kinases Src et la tyrosine phosphatase SHP2 interagissent également avec le récepteur HGF activé (44).

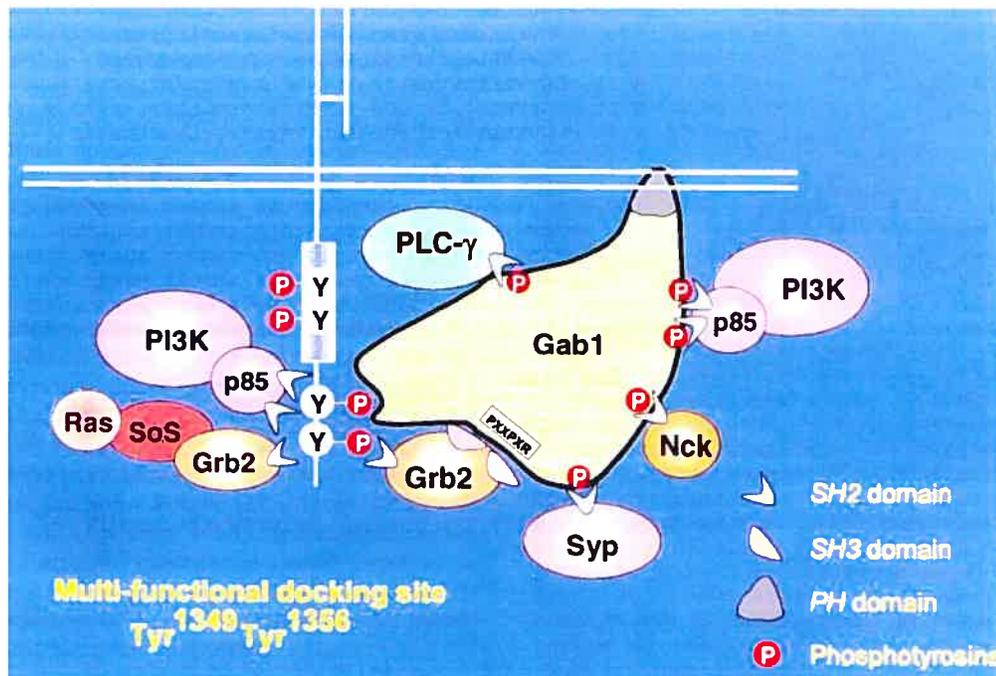


Figure 6: Les protéines de la signalisation intracellulaire recrutées par c-Met activé. Tiré de Bardelli et al, 1997 (16)

Bien que les voies de signalisation induites par l'activation du récepteur HGF soient très nombreuses, je m'attarderai uniquement à la voie de la PI3-kinase, intérêt principal de mon projet. Une co-immunoprécipitation de la PI3-kinase et de c-Met a été montrée par Graziani et al. Ceci suggère une interaction directe ou indirecte, via un complexe de protéines, entre la PI3-kinase et c-Met (51). De plus, c-Met possède un double site de liaison à la PI3-kinase, soient les séquences $Y^{1349}VHV$ et $Y^{1356}VNVK$ (102). L'existence de ces deux sites de liaison, à proximité l'un de l'autre, pourrait s'expliquer par la présence de deux domaines SH2 dans la sous-unité p85 de la PI3-kinase. Ainsi, les deux domaines SH2 de la PI3-kinase se lient simultanément aux deux sites de liaison de c-Met et confère au récepteur HGF une plus grande affinité pour la PI3-kinase (102). De plus, la PI3-kinase peut également se lier à c-Met activé indirectement via la protéine adaptatrice Gab1 (14, 158). Il a été démontré, par la technique du double hybride, que le récepteur HGF interagit avec Gab1, que cette interaction est possible grâce au domaine riche en proline MBD de Gab1 et que la

phosphorylation du domaine de liaison multifonctionnel de c-Met est requise pour induire cette interaction (158).

1.2.2.5 Rôles

Le récepteur HGF, par son activité tyrosine kinase, induit la transduction de multiples signaux biologiques et, de ce fait, est impliqué dans plusieurs processus cellulaires critiques pour le développement et le maintien des fonctions cellulaires normales. Une fois activé par son ligand, le récepteur HGF induit des réponses mitogéniques, motogéniques et morphogéniques (44). Le récepteur HGF peut induire différentes réponses biologiques dépendant du contexte cellulaire. En bref, le HGF est impliqué dans l'angiogenèse, dans le développement, dans la régénération du rein et du foie où il agit aussi comme un agent anti-apoptotique, dans la régulation du remodelage des os et dans l'organogenèse via le contrôle coordonné de la croissance invasive (136). Dans mon projet de recherche, nous nous intéressons plus particulièrement au rôle du HGF dans le processus de motilité cellulaire. En effet, plusieurs groupes de recherche indépendants ont trouvé que l'activation de c-Met stimule la motilité cellulaire, tout particulièrement via la voie de la PI3-kinase (sera discuté plus longuement à la section 1.3.2.5.2).

Je m'attarderai particulièrement au rôle de c-Met dans les cellules épithéliales de rein *Madin-Darby canine kidney* (MDCK), puisque ma recherche est basée sur l'étude de cellules tumorales qui proviennent des cellules MDCK (149). Les cellules MDCK sont souvent utilisées comme modèle *in vitro* pour des études qui portent sur le HGF/c-Met puisque ces cellules possèdent les caractéristiques *in vivo* de cellules épithéliales polarisées et qu'elles sont remarquablement sensibles au HGF. Les réponses des cellules MDCK au HGF varient en fonction des conditions de culture : dissociation et dispersion des cellules (cellules cultivées sur du plastique à faible densité), tubulogenèse (cellules en suspension dans du collagène) et perte de polarité (monocouche de cellules sur un filtre perméable) (10, 11).

I.2.3 Implication du HGF et de son récepteur dans le cancer.

À ce jour, il est clair que le récepteur HGF joue un rôle critique dans plusieurs types de tumeurs. Par exemple, c-Met est surexprimé dans les carcinomes humains de la thyroïde (32) et cette surexpression résulte en une réponse accrue au HGF et en une augmentation de l'invasion tumorale (117, 122). Ces résultats suggèrent que le HGF joue un rôle crucial dans l'invasion des cellules tumorales des carcinomes de la thyroïde. Le récepteur HGF est également surexprimé dans 28% des cancers des ovaires (33), dans 25% des carcinomes humains du poumon (97), dans les cancers humains du pancréas (36), dans 46% des carcinomes gastriques (87), dans 60% des ostéosarcomes (38), dans les cellules squameuses de carcinomes oraux (86) et dans 40% des adénocarcinomes humains de la prostate (56). Une amplification du gène c-Met a également été observée dans 10% des carcinomes gastriques humains (87). De plus, une surexpression du facteur HGF a été constatée dans le cancer humain du pancréas (36) et du poumon (97). Une boucle d'activation autocrine HGF/c-Met a aussi été observée dans les cancers du poumon (58, 143, 144) et du sein (106, 147). Des mutations dans le domaine tyrosine kinase de c-Met, qui mène à son activation constitutive, ont également été observées dans les carcinomes papillaires rénaux (124, 125). En bref, quel que soit le mécanisme par lequel le gène *met* est dérégulé dans les néoplasmes, surexpression, stimulation autocrine ou mutation, ils mènent tous à une sur-activation du récepteur (86) et de fait, à une sur-activation des voies de signalisation cellulaires dépendantes de c-Met, telle la voie de la PI3-kinase.

I.3 LA PI3-KINASE

I.3.1 La grande famille des PI3-kinases

Les phosphoinositide 3- kinases (PI3-kinase) constituent une famille d'enzymes ubiquitaires qui phosphorylent les lipides inositol (phosphatidylinositol) à la membrane, d'où l'appellation de lipide kinase

(135). Les lipides ainsi phosphorylés par cette enzyme jouent un rôle important dans la régulation de plusieurs processus cellulaires tels que la motilité, la prolifération, la croissance et la survie, le trafic intracellulaire et le métabolisme des hydrates de carbone (135). Ainsi, l'activation des PI3-kinases constitue une voie majeure des signaux de transduction intracellulaire (135). À ce jour, huit PI3-kinases ont été identifiées chez les mammifères et ont été subdivisées en trois classes : classe *I*, classe *II* et classe *III* (135). Celle qui nous intéresse est la PI3-kinase de classe *I*.

I.3.2 La PI3-kinase de classe *Ia*

À ce jour, quatre enzymes de la classe *I* ont été découvertes chez les mammifères et elles ont été cataloguées en deux sous-classes, *Ia* et *Ib*, selon leur mécanisme d'activation (135). La sous-classe *Ia* est activée par des récepteurs à activité tyrosine kinase (161), tandis que la PI3-kinase de classe *Ib* est activée par les sous-unités $\beta\gamma$ des récepteurs couplés aux protéines G (71, 138). Dans mon projet de recherche, nous nous intéressons plus particulièrement à la sous-classe *Ia* puisque le récepteur HGF est un récepteur à activité tyrosine kinase.

I.3.2.1 La structure

La PI3-kinase de classe *Ia* est une protéine hétérodimérique composée d'une sous-unité catalytique p110 et d'une sous-unité régulatrice (40). On retrouve chez les mammifères trois isoformes connues de la sous-unité p110: p110 α , p110 β , p110 δ (42-58% d'homologie) (152). Les isoformes p110 α et p110 β ont une distribution tissulaire ubiquitaire chez l'adulte, tandis que la p110 δ a une distribution plus restreinte, avec une haute expression dans les leucocytes (152). Chacune de ces protéines contient un domaine catalytique C-terminal, une région hélicoïdale qui agit comme échafaud (*scaffolding*) autour duquel se replie la protéine, un domaine C2 qui est connu pour lier les phospholipides, un domaine qui lie la petite protéine G Ras et une région N-terminal qui interagit avec la région inter-SH2 de la sous-unité régulatrice (135) (**Figure 7**).

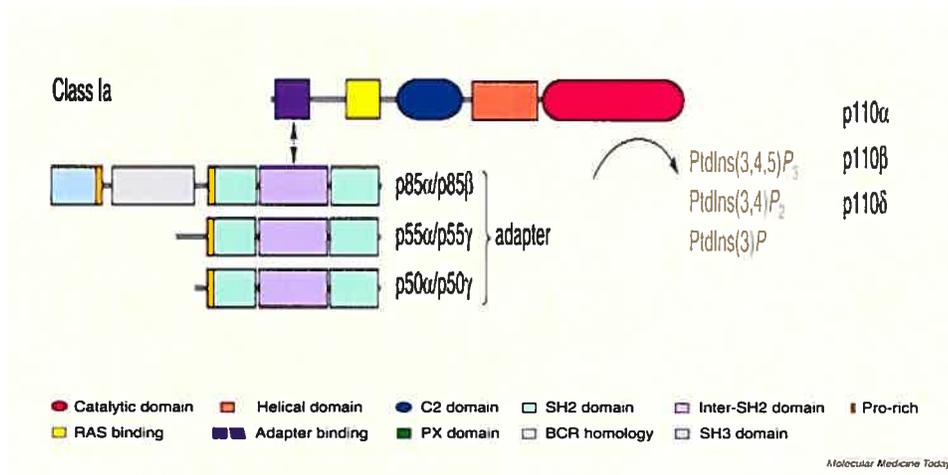


Figure 7: Structure fondamentale de la PI3-kinase de classe *Ia*. Tiré de Stein et al. 2000. (135)

Toutes les sous-unités catalytiques de la classe *Ia* interagissent avec une sous-unité régulatrice (135). Celle-ci est souvent désignée p85 puisque les deux premières isoformes purifiées (23) et clonées (37, 98, 130) avaient un poids moléculaire de 85 kDa et ont été nommées p85 α et p85 β . Il est important de mentionner que la protéine p85 ne possède aucune activité catalytique (40). Les sous-unités p85 α et p85 β contiennent aussi plusieurs domaines : un domaine SH3 (*src-homology domain 3*) N-terminal, deux ou trois segments riches en proline, une région d'homologie BCR (*breakpoint cluster region*) et deux domaines SH2 séparés par un domaine appelé inter-SH2 (40, 135). Cette région inter-SH2 est essentielle à son interaction avec le domaine N-terminal de la sous-unité catalytique (40). Il existe plusieurs autres sous-unités régulatrices issues de gènes différents ou d'un même gène. En effet, le gène p85 α possède plusieurs formes d'épissage variable codant pour les protéines régulatrices p50 α et p55 α (7, 39, 57) et un troisième gène code pour la sous-unité régulatrice p55 γ (101) (**Figure 7**). Ces protéines possèdent seulement un court domaine N-terminal et un C-terminal semblable à la sous-unité p85 α (40). À ce jour, il n'y a aucune indication que les différentes sous-unités régulatrices (p85 α , p85 β , p55 α , p55 γ et p50 α) se lient préférentiellement à l'une ou l'autre des isoformes de la p110 (α , β , δ) (152).

I.3.2.2 Activation

Les PI3-kinases de classe I sont inactives dans les cellules au repos et elles sont rapidement activées en présence de stimuli extracellulaires (161). Ainsi, les PI3-kinases de classe Ia peuvent être activées via quatre processus (161) :

- (1) L'activation des récepteurs tyrosines kinases (discuté plus loin),
- (2) L'interaction directe de Ras-GTP avec la sous-unité catalytique (109-111),
- (3) La liaison du domaine SH3 de p85 à la région riche en proline des protéines Shc, Cbl et dynamin (161),
- (4) La liaison de la région riche en proline de p85 au domaine SH3 des protéines Lyn, Fyn, v-Src, Grb2, Abl et Lck (161).

En ce qui a trait à mon projet, je m'intéresse particulièrement à l'activation de la PI3-kinase de classe Ia via les récepteurs à activité tyrosine kinase. Ainsi, la majorité des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase peuvent activer la PI3-kinase de classe Ia (161) avec des variations dans la puissance et la durée du signal (135). Plusieurs récepteurs comme le récepteur à l'insuline et le récepteur PDGF (*platelet derived growth factor*) activent la PI3-kinase fortement, tandis que le récepteur EGF (*epidermal growth factor*) active faiblement la PI3-kinase (135). Le récepteur HGF, qui est le sujet principal de ce mémoire, active également la PI3-kinase de classe Ia directement (51) ou indirectement via Gab1 (14, 158).

Nous avons déjà mentionné que la liaison du ligand HGF à son récepteur spécifique c-Met induit la phosphorylation de certains résidus tyrosine. Ces résidus phosphotyrosine créent un site favorable pour leur interaction avec les deux domaines SH2 de la sous-unité régulatrice (discuté à la section 1.2.2.4) (135). Ainsi, le recrutement du complexe p85/p110 augmente l'activité catalytique de la PI3-kinase (40) (**Figure 8**). L'activation de la kinase est probablement la conséquence d'une translocation de la PI3-kinase du cytosol à la membrane où son substrat est localisé et/ou d'un changement conformationnel induit lors de la liaison de la sous-unité régulatrice au récepteur (135).

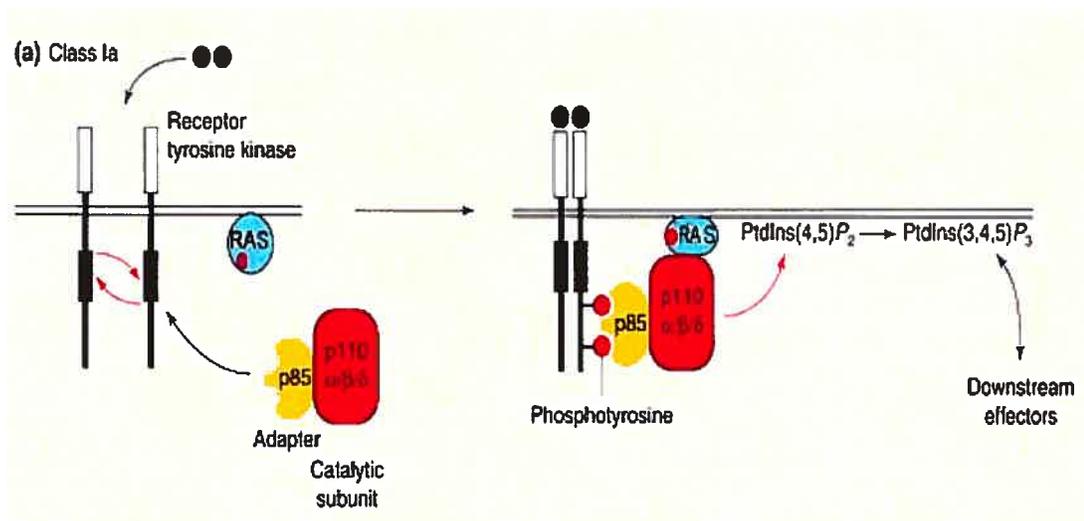


Figure 8 : Activation de la PI3-kinase classe *Ia* par les récepteurs à activité tyrosine kinase. Tiré de Stein et al. 2000 (135)

I.3.2.3 Activités

La PI3-kinase de classe *I* n'agit pas seulement comme lipide kinase, tel que spécifié à la section I.3.1, mais également comme une protéine kinase (135). Elles possèdent une activité kinase sérine/thréonine qui est inséparable de leur activité lipide kinase (22, 30, 152). Les substrats majeurs de l'activité kinase des PI3-kinases de classe *I* sont les résidus sérine de la sous-unité catalytique elle-même et/ou ceux de la sous-unité régulatrice. Dans les deux cas, la conséquence fonctionnelle de la phosphorylation est la régulation négative de l'activité lipide kinase de l'enzyme (22, 30, 152). *In vivo*, aucun autre substrat n'a encore été établi. Cependant, il se peut que l'activité kinase de l'enzyme soit utilisée dans un contexte de signalisation (19).

I.3.2.4 Cibles de la PI3-kinase

Les effecteurs primaires de la PI3-kinase sont des protéines cytoplasmiques qui contiennent un domaine PH (*pleckstrin homology*), c'est-à-dire un domaine qui lie les lipides. Par la liaison au lipide, le domaine PH facilite le recrutement direct de la molécule effectrice primaire par le second messenger (PtdIns(3,4,5)P₃) et joue un rôle critique dans le couplage du signal PI3-kinase/effecteur (65). De plus, le recrutement des protéines qui contiennent un domaine PH résulte en une colocalisation de l'enzyme et du

substrat, lequel, dans la majorité des cas, n'est pas dans le même compartiment subcellulaire en condition basale (65). Les protéines à activité kinase envers les résidus sérine/thréonine ou envers les résidus tyrosine, les GAP (*GTPase-activating protein*), le facteur GNE (*guanine nucleotide exchange*), les molécules adaptatrices de la signalisation cellulaire et les protéines du cytosquelette sont tous des effecteurs en aval de la PI3-kinase (65). Puisque ce sujet est très vaste et complexe, je discuterai uniquement de l'effecteur Akt/PKB, la protéine qui a été choisie dans mon projet de recherche comme indice de l'activité de la PI3-kinase.

La protéine Akt, aussi appelée PKB (protéine kinase B), est une protéine possédant une activité kinase envers les résidus sérine/thréonine. Elle possède un domaine PH liant préférentiellement le PtdIns(3,4,5)P₃ et le PI-3,4-P₂, des lipides générés par la PI3-kinase (59, 137). Le recrutement de Akt à la membrane par ces phospholipides induit un changement conformationnel de la protéine Akt (4, 150) (**Figure 9**). Ce changement rend accessible, à des kinases spécifiques, deux sites potentiels de phosphorylation (150). Ainsi, pour être totalement active, la protéine Akt doit être phosphorylée sur la Thr³⁰⁸ par PDK1 (*phosphoinositide-dependant kinase-1*) et Ser⁴⁷³ par PDK2 (*phosphoinositide-dependant kinase-2*) (3, 150). Une fois activée, Akt se détache de la membrane et se déplace à travers le cytosol jusqu'au noyau (4, 83).

Plusieurs groupes de recherche utilisent le degré de phosphorylation de Akt comme reflet de l'activité de la PI3-kinase. Celui de Carter Van Was (34) a démontré que le HGF induit l'expression des facteurs de l'angiogenèse dans des cellules tumorales via la voie de la PI3-kinase en étudiant le degré de phosphorylation de Akt en présence et/ou en absence de plusieurs composés, dont les inhibiteurs de la PI3-kinase. Cette approche a également été utilisée par le groupe de Alan Lichtenstein pour étudier le rôle de la PI3-kinase dans les réponses cellulaires de myélome multiple. (146).

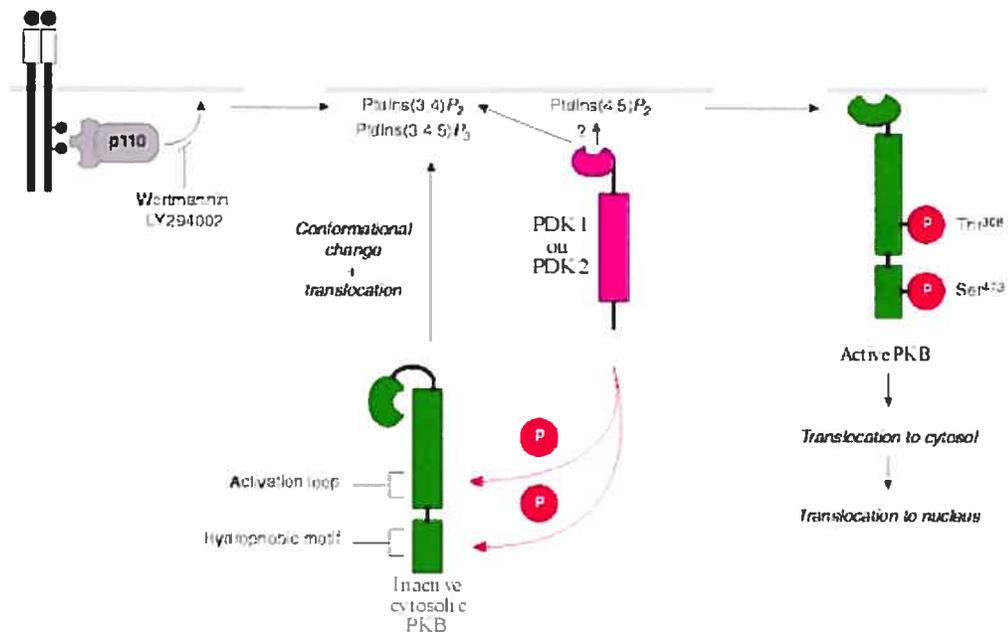


Figure 9 : Modèle du mécanisme d'activation de Akt/PKB par la PI3-kinase.
Adapté de Vanhaesebroeck et al. 2000. (150)

I.3.2.5 Implications physiologiques

La PI3-kinase est une protéine régulatrice essentielle dans le contrôle de plusieurs processus cellulaires tels que la prolifération, la croissance et la survie, la motilité, le trafic intracellulaire et le métabolisme des hydrates de carbone (135). Pour fin de simplicité, je ne décrirai que l'implication de la PI3-kinase dans les deux processus cellulaires étudiés dans mon projet de recherche soit dans la prolifération et la motilité cellulaire.

I.3.2.5.1 Prolifération cellulaire

À ce jour, il est clair que la PI3-kinase est impliquée dans le phénomène de la prolifération cellulaire (135). Ce rôle a été démontré par plusieurs groupes de recherche indépendants via la technique de l'incorporation de la ^3H -thymidine (taux de synthèse de l'ADN) (12, 131). Skouteris et al. ont démontré que l'activation de la PI3-kinase est requise dans la prolifération cellulaire induite par le HGF chez les hépatocytes en

étudiant l'effet de la wortmannine (0.1 à 10 μM), un inhibiteur de la PI3-kinase, sur l'incorporation de la ^3H -thymidine (131). Band et al. ont également démontré l'implication de la PI3-kinase dans la synthèse d'ADN induite par le facteur de croissance EGF via l'incorporation de la ^3H -thymidine en présence de wortmannine (100 nM) ou de LY294002 (50 μM) (12). Il est donc sans équivoque que les inhibiteurs de la PI3-kinase, à une concentration qui inhibe la PI3-kinase de classe Ia, induisent une diminution de la croissance cellulaire (135). Cependant, plusieurs études indépendantes ont démontré que le degré d'implication de la PI3-kinase dans la prolifération cellulaire dépend du type cellulaire et du stimulus (revue par (114)). Ceci a été illustré par Roche et collaborateurs, dans le cas de l'implication de la PI3-kinase dans la prolifération cellulaire induite par les facteurs de croissance EGF et PDGF. À l'opposé, ils ont également montré que les facteurs de croissance bombésin et CSF-1 (*colony-stimulating factor-1*) induisent la synthèse d'ADN en absence de la PI3-kinase active (108).

L'implication de la PI3-kinase dans la prolifération cellulaire passe donc principalement par l'activation de Akt/PKB (**Figure 10**) (voir section I.3.2.4). Une fois activée, la protéine Akt peut catalyser la phosphorylation de plusieurs protéines telles que GSK3 (*glycogen synthetase kinase 3*), FHR-TF (*forkhead-related transcription factor*) et la p70^{S6} kinase, qui régulent à leur tour l'expression de la p27^{kip} et/ou de la cycline D1 (114).

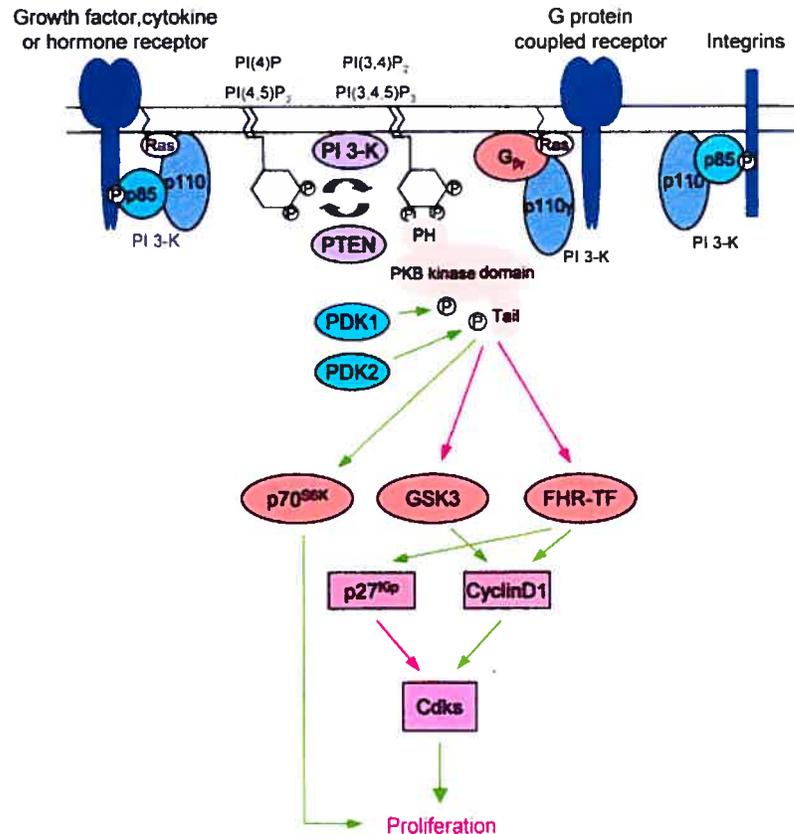


Figure 10 : Le contrôle de la prolifération cellulaire par la PI3-kinase via le rôle central de PKB/Akt. Les lignes vertes et roses représentent l'activation et l'inactivation respectivement des protéines cibles. Tiré de Roymans et al. 2001. (114)

1.3.2.5.2 Motilité cellulaire

La motilité cellulaire est un processus fondamental très complexe qui est régulé par de multiples protéines et voies de signalisation. Ce processus a été décrit en détail auparavant dans la section 1.1.2.2 de cette introduction. En conséquence, je décrirai uniquement l'implication de la PI3-kinase comme protéine modulatrice de ce phénomène.

Tout d'abord, l'implication de la PI3-kinase dans la motilité cellulaire a été largement démontrée par plusieurs groupes de recherche indépendants: (1) Royal et al. ont confirmé l'implication de la PI3-kinase dans la dissociation et l'étalement des cellules MDCK induits par le HGF, et ce, par le biais d'une inhibition de ces processus par la wortmannine (112, 113).

- (2) Les résultats obtenus par le groupe de Nakamura et al. indiquent que la surexpression de c-Met dans les cellules de carcinomes rénaux induit une augmentation de la motilité cellulaire et que la PI3-kinase contribue de façon importante à cette augmentation de la motilité (88).
- (3) Le groupe de Nakanishi et al. a démontré que le HGF induit la migration d'hépatocytes isolés de carcinomes humain via l'activation de la PI3-kinase en étudiant la migration cellulaire par l'utilisation des chambres de Boyden en présence de HGF et/ou de wortmannine (92).

L'implication de la PI3-kinase dans la motilité cellulaire a également été étudiée par plusieurs autres groupes de recherche (13, 68) et la conclusion est la même, c'est-à-dire que la PI3-kinase joue un certain rôle dans la motilité cellulaire.

La **figure 11** montre que la PI3-kinase est impliquée dans le contrôle de la motilité cellulaire via son implication dans de nombreux processus tels que l'adhésion cellulaire, la formation de lamellipodes et de filopodes, la régulation du cytosquelette d'actine (formation des fibres de stress) et la régulation des autres composantes du cytosquelette (114). Ainsi, la PI3-kinase est activée par des signaux extracellulaires agissant à travers les récepteurs à activité tyrosine kinase ou les récepteurs intégrine. Il y a liaison des phospholipides générés par la PI3-kinase aux facteurs GNEF (*guanine nucleotide exchange factors*), GEF (*guanine exchange factor*) ou GAP (*GTPase-activating protein*), qui catalysent la conversion des petites GTPase de la forme GDP à la forme GTP. Ainsi, ces facteurs activent spécifiquement un des membres de la famille des petites protéines G (Rho, Rac et cdc42) (75, 114). Une fois activées, les protéines cdc42, Rac et Rho sont capables d'activer plusieurs effecteurs en aval, ce qui conduit à l'activation de différentes protéines et processus impliqués dans la motilité (114) (**Figure 11**). Ainsi, la PI3-kinase régule plusieurs étapes de la motilité cellulaire via son contrôle sur l'activation des protéines GTPase (114).

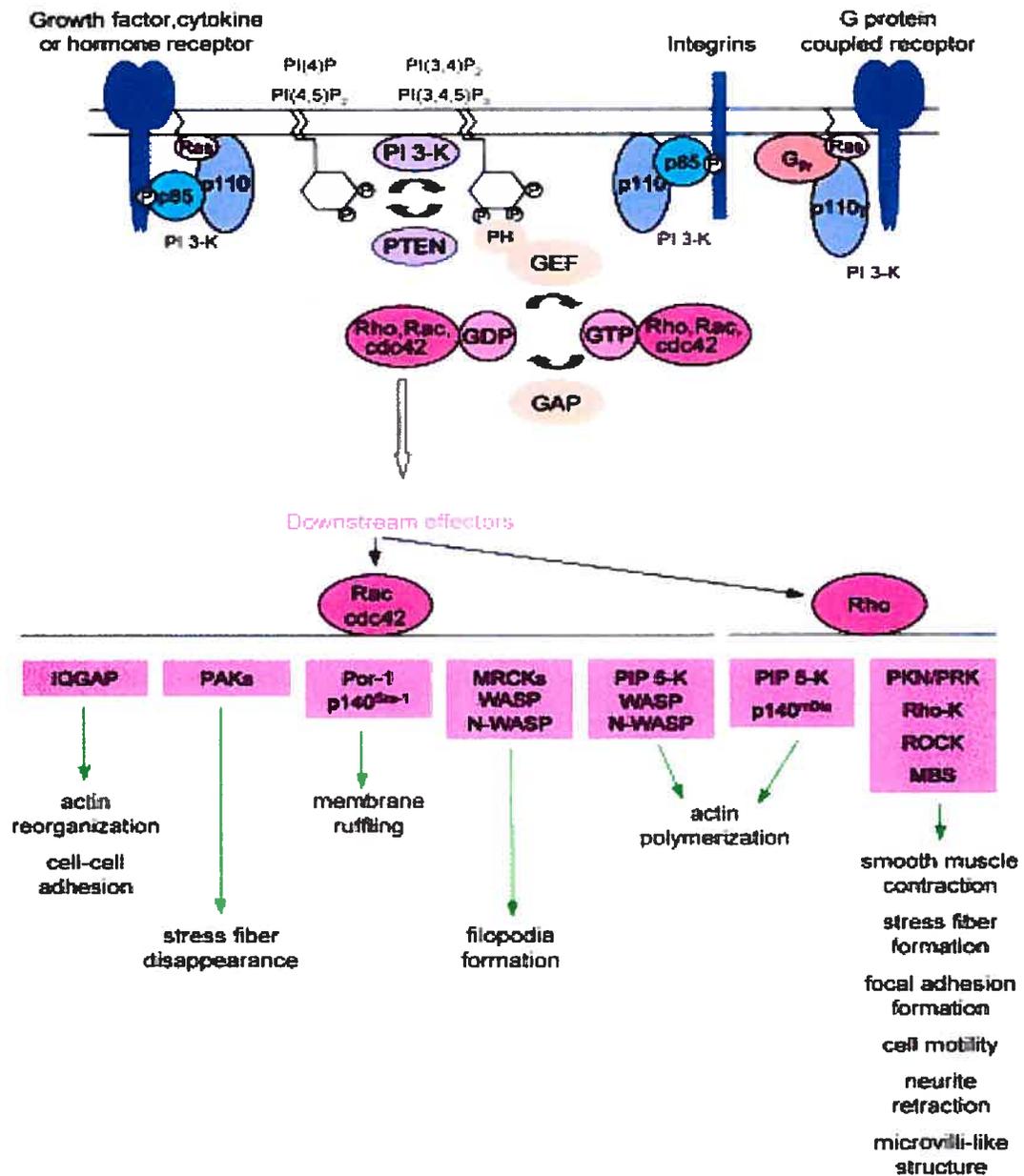


Figure 11 : Le contrôle de la motilité cellulaire par la PI3-kinase via l'activation des petites protéines G, Rho, Rac et cdc42 (114). *Les lignes vertes représentent l'activation des protéines cibles.* Tiré de Roymans et al. 2001. (114)

I.3.3 Les inhibiteurs de la PI3-kinase

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour étudier l'implication des PI3-kinases dans les processus cellulaires : l'utilisation d'inhibiteurs de la PI3-kinase, la microinjection d'anticorps neutralisant la PI3-kinase, la mutation des récepteurs membranaires, la transfection de protéines PI3-kinase à action dominante négative, l'étude de la génération des lipides inositol, et enfin, l'invalidation des gènes de la PI3-kinase (151). Dans mon projet de recherche, nous avons utilisé l'approche des inhibiteurs de la PI3-kinase. Il y a deux inhibiteurs connus de la PI3-kinase, la wortmannine et le LY294002 (Figure 12).

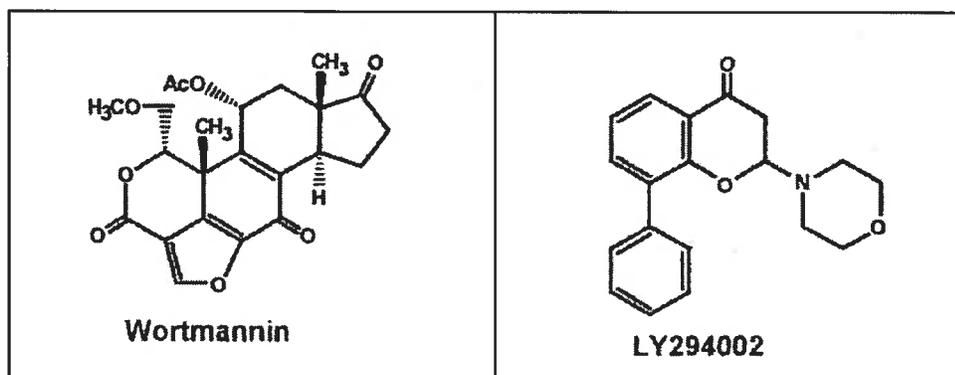


Figure 12 : Structure moléculaire des inhibiteurs de la PI3-kinase. Tiré de Stein et al. 2001 (134)

Ces deux inhibiteurs sont souvent utilisés en culture cellulaire pour étudier à court terme les fonctions biologiques modulées par la PI3-kinase de classe I (135) (40). Cependant, il est important de mentionner que la wortmannine et le LY294002 ne sont pas aussi spécifiques qu'attendu vis-à-vis la classe I des PI3-kinases. En effet, plusieurs isoformes de la PI3-kinase sont inhibées par ces deux drogues à des concentrations semblables à celles requises pour inhiber la p110 α /p85 α (135). De plus, la wortmannine et le LY294002 inhibent la croissance cellulaire à des concentrations qui inhibent la PI3-kinase de classe Ia. Ces deux composés, à des concentrations élevées, induisent l'apoptose en plus d'induire des effets non spécifiques (135). Cependant, utilisés à des doses raisonnables, ces deux inhibiteurs peuvent donner une bonne indication de l'implication ou non d'une activité PI3-kinase dans un type cellulaire donné.

I.3.3.1 La wortmannine

La wortmannine est un métabolite secondaire que l'on retrouve dans une grande variété d'espèces de champignons (104). À l'origine, la wortmannine était considérée comme un inhibiteur des MLCK (*myosin light chain kinase*) (93). Aujourd'hui, on considère la wortmannine comme un inhibiteur potentiel et sélectif de la PI3-kinase (104). Ainsi, ce métabolite fongique inhibe la formation des phosphatidylinositol-3-phosphates dans les cellules intactes (104). Des analyses détaillées ont démontré que la wortmannine est un inhibiteur irréversible non-compétitif de la PI3-kinase et qu'elle induit une inactivation de la PI3-kinase qui est dépendante du temps d'action et de sa concentration (104). Ainsi, la wortmannine inactive la PI3-kinase par une modification covalente de la Lys-802, un résidu de la p110 α impliqué dans la réaction de transfert des phosphates (160). La liaison de la wortmannine au site de liaison à l'ATP de la PI3-kinase induit donc un changement conformationnel du domaine catalytique (157). La concentration requise de wortmannine pour inhiber 50% de l'activité de la PI3-kinase (IC₅₀) des mammifères est de 1-10 nM (40). Une revue de la littérature montre cependant qu'il y a une grande variation de la concentration de wortmannine utilisée, en fonction des types cellulaires. Selon Nakanishi et al., la wortmannine est toxique à une concentration supérieure à 30 nM sur des cellules d'hépatocytes de carcinome humain (92), tandis que Royal et al. utilisent une concentration de 500 nM-1 μ M sur des cellules MDCK en culture (113). Encore selon Royal et al., la wortmannine, à une concentration de 100 nM et 1 μ M, inhibe l'activité de la PI3-kinase en présence de HGF seulement de 35% et 65% respectivement (113). Il est important de prendre en considération que lorsque la wortmannine est utilisée sur des cellules intactes, il est très difficile d'établir la concentration adéquate de drogue à utiliser puisque la wortmannine est très instable (151). Malgré cette controverse, il est certain que la concentration de wortmannine utilisée doit être très faible, de l'ordre du nanomolaire, puisque la wortmannine peut avoir un effet sur d'autres protéines kinase (28, 135). Le **tableau 1** résume l'effet de la wortmannine 1 μ M sur de nombreuses protéines à activité tyrosine kinase d'origine humaine (28). On observe que la wortmannine inhibe

complètement (100%) l'activité de la PI3-kinase et inhibe de 96 % l'activité de la SmMLCK .

Tableau 1: Activité résiduelle des protéines tyrosine kinase en présence de wortmannine (1 μ M) et de LY294002 (50 μ M). Adapté de Davies et al., 2000.

(28)

Protein kinase	Wortmannin LY	
	(1 μ M)	294002 (50 μ M)
(a) Core panel		
MKK1	96 \pm 1	101 \pm 1
MAPK2/ERK2	90 \pm 12	114 \pm 13
JNK1 α 1/SAPK1	97 \pm 1	108 \pm 0
SAPK2a/p38	86 \pm 5	98 \pm 3
SAPK2b/p38 β 2	74 \pm 3	98 \pm 0
SAPK3/p38 γ	75 \pm 5	97 \pm 2
SAPK4/p38 δ	79 \pm 11	94 \pm 1
MAPKAP-K1b	92 \pm 3	70 \pm 2
MAPKAP-K2	102 \pm 5	74 \pm 5
MSK1	99 \pm 4	83 \pm 7
PRAK	85 \pm 4	68 \pm 6
PKA	97 \pm 5	91 \pm 4
PKC α	100 \pm 2	91 \pm 4
PDK1	88 \pm 9	76 \pm 4
PKD α	96 \pm 6	60 \pm 2
SGK	101 \pm 7	72 \pm 1
S6K1	106 \pm 3	81 \pm 7
GSK3 β	85 \pm 10	53 \pm 1
ROCK-II	91 \pm 1	104 \pm 10
AMPK	106 \pm 1	103 \pm 0
CK2	98 \pm 3	18 \pm 1
PHK	100 \pm 4	44 \pm 10
LCK	95 \pm 4	85 \pm 8
CHK1	99 \pm 3	90 \pm 2
(b) Other kinases		
CAM-KII		
SKMLCK	104 \pm 1	
SmMLCK	4 \pm 1	
PKC δ		
MKK3		
MKK4		
MKK6		
MKK7		
PI 3-kinase	0 \pm 0	13 \pm 0
PRK2		

I.3.3.2 Le LY294002

Le LY294002, 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one, est un autre inhibiteur de la PI3-kinase communément utilisé. Il est un dérivé morpholino du bioflavonoïde quercétine, un inhibiteur de la PI3-kinase et de plusieurs autres protéines tyrosine kinase et protéines sérine/thréonine kinase (155). Plusieurs chromones ont été synthétisées et leur efficacité à inhiber la PI3-kinase a été évaluée (155). Un seul composé, le LY294002, s'est avéré être un inhibiteur sélectif de la PI3-kinase avec un potentiel 2.7 fois supérieur à la quercétine (155). De plus, le LY294002 50 μM n'a aucun effet inhibiteur sur plusieurs enzymes qui requièrent de l'ATP dont les récepteurs à activité tyrosine kinase EGF et PDGF (155). Cependant, il inhibe certaines autres protéines tyrosine kinase dont celles de la superfamille des PI3-kinases (28). L'effet du LY294002 sur l'activité de certaines protéines tyrosine kinase d'origine humaine est montré dans le **tableau 1**. On observe que le LY294002 inhibe la protéine CK2 (*casein kinase 2*) (82%) avec un potentiel similaire à celui de la PI3-kinase (87%) (28, 135). Toutes ces informations mènent à la conclusion que le LY294002 est moins efficace et spécifique que la wortmannine (28). Cependant, contrairement à la wortmannine, le LY294002 est un inhibiteur réversible compétitif du site de liaison à l'ATP de la PI3-kinase. Plusieurs groupes de recherche utilisent le LY294002 à une concentration qui varie entre 20 et 50 μM : Sipeki et al. (20 μM) (129), Royal et al (30 μM) (112) et Kamikura et al (50 μM) (63). Il est également important de mentionner que le LY294002, malgré sa faible solubilité dans l'eau, est beaucoup plus utilisé dans les cellules intactes que la wortmannine puisqu'il est beaucoup plus stable (157).

Étant donné le rôle de la PI3kinase dans la prolifération cellulaire, particulièrement dans le cancer et d'autres maladies prolifératives, l'inhibition de la PI3-kinase constitue un grand potentiel thérapeutique (135).

I.3.4 La PI3-kinase et le cancer

Malgré le manque de preuves d'une aberration génétique de la PI3-kinase dans les cancers, un grand nombre d'observations suggèrent que les voies de signalisation de la PI3-kinase peuvent être activées dans différents types de cancers (151). Ainsi, plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs et oncogènes sont des composantes du réseau de signalisation cellulaire de la PI3-kinase (65). De plus, la synthèse et/ou l'hydrolyse anormales des lipides phosphoinositides peuvent jouer un rôle dans la transformation cellulaire (65).

I.3.4.2 Amplification et surexpression de la PI3-kinase

L'expression de la PI3-kinase est augmentée dans 75% des cancers du sein (48) et il y a une augmentation de l'activité de la PI3-kinase dans 86% des cancers colorectaux (100). De plus, une amplification de *PIK3CA*, le gène codant pour la sous-unité catalytique p110 α , a été observée dans le cancer des ovaires (126) et du cervix (79). Ces observations suggèrent donc que la PI3-kinase est un oncogène qui joue un rôle important dans plusieurs cancers.

En plus du rôle direct de la PI3-kinase en tant qu'oncoprotéine, l'implication de la voie PI3-kinase dans le cancer peut être observée via la protéine Akt/PKB. Ainsi, la protéine Akt1 est surexprimée et amplifiée dans 20% des adénocarcinomes gastriques (132). La protéine Akt2 est également surexprimée et amplifiée dans 3% des cancers du sein (18), 12% des cancers des ovaires (18) et 10% des cancers du pancréas (25). La protéine Akt3 est surexprimée et amplifiée dans certains cancers du sein insensibles aux hormones stéroïdiennes (94). Le mécanisme d'action suggéré est que la surexpression de la protéine Akt induit un blocage de l'apoptose. Ceci pourrait expliquer l'implication de la PI3-kinase dans la transformation cellulaire (134).

À ce jour, il n'y a aucune mention de la présence de mutations de la PI3-kinase dans les cancers humains (135). Cependant, le groupe de Jimenez et al. ont démontré qu'un mutant de la sous-unité régulatrice p85 de

la PI3-kinase, obtenu à la suite d'une irradiation aux rayons X, induisait une activation constitutive de l'enzyme et contribuait à la transformation de ces cellules isolées d'une tumeur de tissus lymphoïde de souris (61). Ils n'ont cependant pas encore rapporté l'identification de cette mutation.

1.3.4.3 La PI3-kinase et les oncoprotéines

La double activité enzymatique de la PI3-kinase (lipide et protéine kinase) confère à cette enzyme l'habileté d'activer de nombreuses protéines de la signalisation cellulaire incluant les oncoprotéines Src, Ras, Rac, abl et l'antigène T (70). Il a été démontré que certaines oncoprotéines dont Src (42), abl (153) et l'antigène T (159) forment des complexes avec la PI3-kinase (70). De plus, la présence de la PI3-kinase dans la cellule est requise pour que ces oncoprotéines induisent la transformation cellulaire (70). Ainsi, la formation des complexes PI3-kinase/oncoprotéines induit l'activation de la PI3-kinase et une augmentation de la concentration cellulaire de PtdIns(3,4)P₂ et PtdIns(3,4,5)P₃ (43, 153). De plus, il a également été observé que le pouvoir transformant des oncoprotéines diminue en concordance avec la diminution intracellulaire des phosphoinositides (43, 153).

1.3.4.4 Une anomalie dans la synthèse ou l'hydrolyse des phospholipides

L'augmentation des lipides phosphoinositides peut mener à une croissance cellulaire indépendante des facteurs de croissance, à une augmentation de la prolifération cellulaire, à une augmentation de la motilité cellulaire et à l'échappement de l'apoptose; tous ces éléments conduisent à la transformation cellulaire (65). Il y a trois principaux mécanismes à travers lesquels une augmentation des lipides phosphoinositides peut avoir lieu dans un cancer: l'inactivation de la lipide phosphatase PTEN, l'amplification ou la mutation d'un récepteur et l'activation de la PI3-kinase via une mutation dans l'oncogène Ras (65).

I.3.4.4.1 Inactivation de PTEN

Un défaut dans la dégradation des seconds messagers générés par la PI3-kinase est un mécanisme alternatif pouvant induire une augmentation de l'activité de la voie PI3-kinase (135). Le gène *PTEN*, un gène qualifié de suppresseur de tumeur, encode une lipide phosphatase qui a la capacité d'hydrolyser le phosphate en position 3' du PtdIns(3,4,5)P₃ (31). On retrouve très souvent des mutations de PTEN chez les cancers humains et particulièrement chez les glioblastomes (76), le cancer de la prostate (76), le cancer du sein (76) et le cancer des ovaires (119). De plus, de récentes études ont démontré qu'une déficience de PTEN induit une diminution de l'apoptose et une augmentation de l'activité et de la phosphorylation de Akt, un régulateur crucial de la survie cellulaire (133).

I.3.4.4.2 Les récepteurs à activité tyrosine kinase amplifiés ou mutés

La PI3-kinase est activée par plusieurs récepteurs présents à la surface de la cellule, tels les récepteurs des facteurs de croissance PDGF et EGF, qui ont déjà un rôle établi d'oncogène (135). De même, l'amplification ou la mutation de c-Met induit une activation du récepteur qui mène indirectement à une augmentation de la production des lipides phosphoinositides et qui à leur tour, activent différentes voies de signalisation (65). Certaines études ont démontré que le récepteur c-Met muté est responsable du carcinome papillaire rénal héréditaire (123) et qu'une augmentation de l'activation de la PI3-kinase/Akt est associée à cette mutation de c-Met (162). D'autres exemples de l'implication de la PI3-kinase dans la transformation cellulaire via c-Met ont également été mentionnés dans la section 1.3.2.5.2.

I.3.4.4.3 L'activation de l'oncogène Ras

La protéine Ras est activée par une mutation dans approximativement 25% de toutes les tumeurs humaines et certaines de ces tumeurs acquièrent leur capacité transformante via leur association avec la PI3-kinase de classe I (65). Ainsi, l'activation de la PI3-kinase dépendante de Ras (expliqué dans la section 1.3.2.2) induit une régulation positive de la voie de Akt et permet à

la cellule d'éviter l'apoptose, ce qui contribue à un phénotype transformé des cellules (69).

I.4 LES CELLULES MSV-MDCK-INV

Les cellules MSV-MDCK-INV ont été isolées de la lignée de cellules MSV-MDCK par le laboratoire du Dr Ivan Robert Nabi du département de pathologie et biologie cellulaire de l'Université de Montréal (74). Elles sont particulièrement intéressantes du fait qu'elles possèdent des caractéristiques de cellules épithéliales transformées et de cellules invasives. En collaboration avec le Dr Nabi, le laboratoire de recherche du Dr Noël cherche à comprendre les mécanismes moléculaires régissant ces propriétés. Mon projet de recherche s'intègre dans cette thématique.

I.4.1 Transformation par le virus du sarcome de Moloney

Les cellules MDCK (*Mardin-Darby canine kidney*) sont un excellent modèle *in vitro* des cellules épithéliales puisqu'elles forment une monocouche de cellules polarisées reliées entre elles par des jonctions serrées (17). Tel que mentionné à la section I.2.2.5, les cellules MDCK répondent très bien au HGF, particulièrement la souche I de forte résistance transépithéliale. De ce fait, elles constituent un excellent modèle *in vitro* pour étudier les effets du HGF sur le mouvement cellulaire et le changement de morphologie (10). Ainsi, pour déterminer les bases moléculaires impliquées dans l'acquisition du phénotype motile et invasif des cellules épithéliales, un modèle de cellules MDCK transformées par le virus MSV (*Moloney sarcoma virus*) a été utilisé. Cette lignée de cellules transformées, les cellules MSV-MDCK, a été obtenue chez American Type Culture Collection. Les cellules MSV-MDCK ont une morphologie fibroblastique, elles ne forment pas de contacts intercellulaires serrés et elles ont perdu leur forme cuboïdale et leur capacité à se polariser (17). Comparées aux cellules MDCK, qui possèdent des fibres d'actine corticales et des fibres de stress, les cellules MSV-MDCK ont un cytosquelette d'actine désorganisé et possèdent moins de fibres de stress (74). De plus, comparées aux cellules MDCK, les cellules MSV-MDCK

possèdent une distribution différente de certaines protéines telles que la cadhérine E (médiateur de l'adhésion cellule-cellule), la desmoplakine (protéine spécifique des desmosomes) et ZO-1 (protéine spécifique des jonctions serrées) (17, 128). Dans les cellules MDCK, ces protéines sont localisées aux membranes latérales, alors que dans les cellules MSV-MDCK, il y a une perte ou une expression désorganisée de ces protéines (128). Une perturbation et/ou une diminution de l'expression de ces protéines dans les cellules MSV-MDCK suggèrent qu'elles jouent un rôle crucial dans le maintien du phénotype épithélial des cellules MDCK et l'acquisition du phénotype invasif des cellules MSV-MDCK (17, 128). Il a d'ailleurs été démontré par Behrens et al., ainsi que par Simard et al., que les cellules MSV-MDCK sont plus motiles et invasives que les cellules MDCK (17, 128) et que le mouvement des cellules MSV-MDCK est plus directionnel (128). Il est également important de mentionner que la lignée cellulaire MSV-MDCK est hétérogène et que certains clones ont une motilité accrue (128).

1.4.2 Sélection d'une population invasive

Comme mentionné ci-haut, les cellules MSV-MDCK-INV ont été isolées à partir de la population hétérogène de la lignée cellulaire MSV-MDCK. La sélection des cellules MSV-MDCK-INV a été réalisée sur la base de leur capacité à envahir une matrice extracellulaire, d'où leur nom MSV-MDCK-INVASIVE. Les chambres d'invasion, composées d'une chambre supérieure et d'une chambre inférieure séparées par un filtre poreux, ont été utilisées pour sélectionner ces cellules. Ainsi, les cellules MSV-MDCK ont étéensemencées dans la chambre supérieure sur le filtre recouvert de Matrigel® et après 24h d'incubation, les cellules qui ont réussi à traverser les pores de 8 μm ont été récoltées dans la chambre inférieure. Cette procédure a été répétée trois fois et la lignée cellulaire homogène MSV-MDCK-INV a été obtenue.(74) Ainsi, les cellules MSV-MDCK-INV possèdent un phénotype stable et distinct des lignées parentales, les cellules MDCK et MSV-MDCK.

1.4.3 Caractéristiques des cellules MSV-MDCK-INV

Les cellules MSV-MDCK-INV, comparées aux cellules MDCK et MSV-MDCK, possèdent de multiples pseudopodes, ne contiennent pas de fibres

de stress et font moins de contacts intercellulaires (**Figure 13**) (74). Contrairement aux cellules MDCK et MSV-MDCK, les cellules MSV-MDCK-INV montrent une augmentation de l'expression de l'actine β et une redistribution de l'actine β à l'extrémité des pseudopodes (74). De plus, l'actines α , γ , G et F ont une distribution différente dans les cellules MSV-MDCK-INV comparativement aux cellules MDCK et MSV-MDCK. L'actine est distribué à travers tout le cytoplasme et aussi en périphérie dans les cellules MDCK et MSV-MDCK, tandis que dans la lignée MSV-MDCK-INV, l'actine α , γ , G et F est relativement augmenté dans les pseudopodes tout en étant présente à travers le cytoplasme (74).

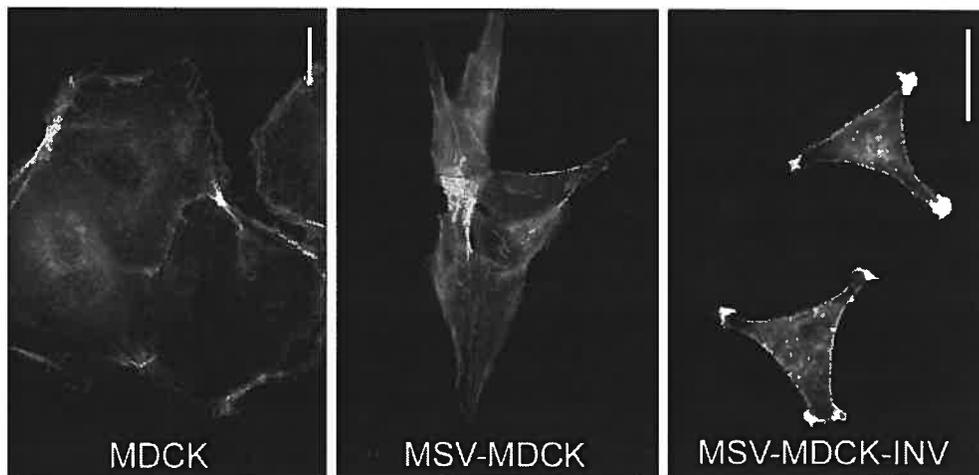


Figure 13 : La morphologie et l'organisation du cytosquelette d'actine des trois lignées cellulaires. Marquage de l'actine-F par la phalloïdine couplée au rouge texan. La barre = 10 μ M. Adapté de Vadnais et al. (149)

Il a également été démontré que les multiples protusions pseudopodiales riches en actine β sont concentrées en protéines phosphorylées, tel que révélé par un anticorps reconnaissant toutes les protéines contenant des résidus tyrosine phosphorylés (149). De nombreuses protéines sont hautement phosphorylées sur tyrosine dans les cellules MSV-MDCK-INV comparativement aux cellules MDCK et MSV-MDCK, et tout particulièrement le récepteur HGF (**Figure 14**). L'expression du récepteur HGF est constante dans les trois lignées cellulaires, ce qui

suggère que le récepteur HGF est constitutivement phosphorylé et activé dans les cellules MSV-MDCK-INV (149).

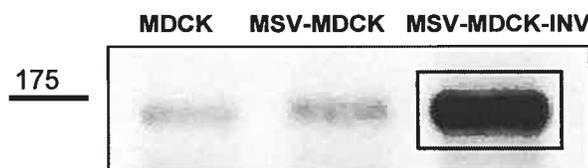


Figure 14 : Degré de phosphorylation sur les résidus tyrosine du récepteur HGF dans les trois lignées cellulaires. Immunoprécipitation et immunobuvardage de type western avec un anticorps anti-phosphotyrosine. Adapté de Vadnais et al. (149)

Il a également été démontré que cette activation constitutive du récepteur était due à une boucle autocrine et que cette boucle était directement responsable de la formation des pseudopodes et de ce fait, du potentiel motile des cellules MSV-MDCK-INV. (149)

I.5 BUT DU PROJET

On sait que le HGF, via la stimulation de son récepteur membranaire et l'activation subséquente de certaines voies de signalisation intracellulaire, peut induire une motilité ou une migration accrue de plusieurs types cellulaires. L'implication de la PI3-kinase comme régulateur positif de la motilité et de l'invasion cellulaire a été démontrée dans plusieurs types cellulaires et par plusieurs groupes de recherche indépendants. Sachant que les cellules MSV-MDCK-INV expriment le récepteur HGF (HGF-R), qu'il est hautement phosphorylé sur tyrosine dans les cellules MSV-MDCK-INV et qu'une boucle autocrine HGF-HGF-R module la motilité et le phénotype de ces cellules, l'objectif du présent projet de recherche est de déterminer l'implication de la PI3-kinase dans l'acquisition du phénotype motile des cellules MSV-MDCK-INV. Ainsi, nous cherchons à comprendre le ou les mécanisme(s) cellulaire(s) impliqué(s) dans la motilité des cellules MSV-MDCK-INV.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1 ANTICORPS ET RÉACTIFS

II.1.1 Réactif de culture cellulaire

Le FBS (*foetal bovine serum*), la glutamine, les acides aminés essentiels, les vitamines, la pénicilline, la streptomycine et la trypsine ont été achetés chez Gibco Life Technologies (Burlington, ON).

II.1.2 Drogues

Le LY294002 et la wortmannine sont produits par BIOMOL Research Laboratories Inc (Plymouth Meeting, PA) et distribués par Cedarlane Laboratories Limited (Hornby, ON). L'orthovanadate de sodium, l'herbimicyne et le premier LY294002 utilisé ont été obtenus de Sigma Chemical (St-Louis, MO). L'anti-HGF provient de Santa Cruz Biotechnologie (Santa Cruz, CA).

II.1.3 Anticorps primaires

Les anticorps anti-phospho (Ser⁴⁷³)-Akt et anti-Akt ont été achetés chez Cell Signaling (distribués par New England Biolabs LTD., Mississauga, CN). Les anticorps anti-phosphotyrosine (PT) et anti-p125^{FAK} proviennent de Santa Cruz Biotechnologie (Santa Cruz, CA), l'anti-phospho-c-Met (Y^{1230,1234,1235}) de Biosource International (distribué par Medicorp Inc, Montréal, Qc) et l'anticorps anti-PI3-kinase (p85) de BD Biosciences (Mississauga, ON).

II.1.4 Anticorps secondaires

Les anticorps secondaires de chèvre AffiniPure anti-IgG de lapin et anti-IgG de souris couplés aux molécules de HRP (*horseradish peroxidase*) ont été obtenus de Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, PA).

II.1.5 Autres

La phalloïdine conjuguée au Texas red a été achetée chez Molecular Probes (Eugene, OR). Le réactif ECL (*enhanced chemiluminescence*) a été obtenu de Mandel (St-Laurent, Qc) et le réactif BCA (*bicinchoninic acid*) de Pierce Biotechnology Inc (Rockford, IL). La membrane de nitrocellulose Hybond-C Extra de 45 microns provient de Amersham Life Science (Arlington Heights, IL). La thymidine [methyl-³H] a été achetée chez ICN Biomedicals, Inc (Irvine, Californie). Le collagène de type I de queue de rat provient du laboratoire du Dr Richard Béliveau et les chambres de Boyden ont été obtenus de Fisher Scientific LTD (Corning, NY).

II.2 CULTURE CELLULAIRE

Les cellules MSV-MDCK-INV (Le et al., 1998) sont mises en culture dans du milieu *Dulbecco's minimum essential medium* contenant du NaHCO₃ 25 mM (DMEM-NaHCO₃) supplémenté de FBS 10%, d'acides aminés non-essentiels 10 mM, de glutamine 1 mM, de vitamines 10 mM, de la pénicilline et de la streptomycine sous une atmosphère de 5% CO₂ à 37°C. Les cellules ne doivent pas atteindre une confluence de plus de 70%. Il faut donc les diviser tous les lundi, mercredi et vendredi. Lors de la division, les cellules MSV-MDCK-INV sont rincées au PBS et incubées 40 secondes avec de la trypsine 0.05%. La trypsine digère les protéines nécessaires à l'adhésion cellulaire et permet ainsi la déadhésion (détachement) des cellules du plat de Pétri. Par la suite, les cellules sont comptées etensemencées à une densité de 100 000 à 250 000 cellules par plat de 10 cm de diamètre. Il est important de mentionner que les cellules MSV-MDCK-INV sont jetées après un passage supérieur à 18, le passage no 1 étant celui où les cellules ont été sélectionnées de la population totale des cellules MSV-MDCK (voir section I.4 de l'introduction). Ces conditions de culture sont aussi utilisées pour les cellules traitées avec les inhibiteurs LY294002, wortmannine, herbimycine et orthovanadate de sodium.

II.3 IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN

II.3.1 Lysat cellulaire

Les cellules MSV-MDCK-INV sontensemencées à une densité de 5×10^5 cellules par plat de 10 cm de diamètre et sont laissées en culture deux jours. Sur la glace, la monocouche de cellules est lavée deux fois avec du PBS-CM (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 2.7 mM, KH_2PO_4 2.7 mM, CaCl_2 0.1 mM et MgCl_2 1 mM) et 100 μL de tampon de lyse (PBS comprenant SDS 1%, EDTA 5 mM, orthovanadate de sodium 0.2 mM, glycérophosphate 40 mM et les inhibiteurs de protéases PMSF 0.1 mM, phénanthroline 0.1 mM, pepstatine 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, leupeptine 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, aprotinine 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) est ajouté dans chaque plat. Les cellules sont grattées et l'ADN est brisé par deux rondes de sonication de 15 sec, force 2, au moyen d'un sonicateur Branson 450 (Danbury, CT). Les protéines sont récupérées à la suite d'une centrifugation de 30 minutes à 12 800 RPM à 4°C (les protéines se retrouvent dans le surnageant).

II.3.2 Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué avec le réactif BCA (*bicinchoninic acid*) de chez Pierce (Rockford, IL). Ce composé permet de détecter et de quantifier les protéines totales par colorimétrie. Cette méthode est basée sur le principe que le Cu^{2+} est réduit en Cu^{1+} par les protéines en milieu alcalin et que le réactif BCA possède une haute sensibilité et affinité pour le Cu^{1+} . Ainsi, la détection colorimétrique (coloration mauve) est le produit de la chélation de deux molécules de BCA et d'un ion Cu^{1+} . Ce complexe soluble dans l'eau absorbe à une longueur d'onde de 562 nm de façon linéaire en fonction de la concentration. La concentration des protéines est généralement déterminée en référence à une courbe-étalon en utilisant la protéine BSA (*bovine serum albumin*). Dans des tubes, une série de concentrations de BSA est préparée (0, 2, 4, 6, 16, 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pour la courbe-étalon ainsi que deux quantités différentes (5 et 10 μL) pour tous les échantillons de protéines à doser. Par la suite, 1 ml de réactif BCA est ajouté dans chaque tube et ceux-ci sont incubés 30 minutes à

37°C. Après l'incubation, les tubes sont laissés à la température de la pièce 10 minutes puisque l'intensité de la coloration varie beaucoup moins en fonction du temps à cette température. À l'aide d'un spectrophotomètre, à la longueur d'onde de 562 nm, l'absorbance du témoin (sans protéine), des étalons et de tous les échantillons à doser sont mesurées dans un délai de 10 minutes pour éviter les erreurs significatives dues au changement de couleur continue du réactif BCA. Les absorbances obtenues pour les étalons ainsi que leur concentration connue en protéines permettent de faire une courbe sur laquelle on peut déduire la concentration en protéine des échantillons à doser puisque l'absorbance a été mesurée.

II.3.3 Séparation des protéines sur un gel de polyacrylamide

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire. Une concentration de 7.5% a toujours été utilisée pour mes expériences puisque celle-ci permet une bonne séparation des protéines de haut poids moléculaires (protéines c-Met environ de 160 kDa) tout en ne désavantageant pas la séparation des protéines de bas poids moléculaire (protéine Akt de 65 kDa).

Tout d'abord, l'assemblage des vitres propres est effectué et le gel de séparation (Tris-HCL 375 mM pH 8.8, SDS 0.1 %, acrylamide 7.5%, TEMED 0.1%, ammonium sulfate 0.1%) est coulé. Après une période de polymérisation de 45 minutes, le gel d'entassement (Tris-HCL 375 mM pH 8.8, SDS 0.1 %, acrylamide 4%, TEMED 0.1%, ammonium sulfate 0.05%) est coulé et un peigne de 10, 15 ou 20 puits est inséré. Les échantillons de protéines doivent être préparés avec du tampon Laemmli 3X (β -mercaptoéthanol 15%, SDS 7.5%, glycérol 30%, Tris-HCL 300 mM pH 6.8 et bleu de bromophénol) pour dénaturer les protéines. Environ 50 à 100 μ g de protéines de lysat cellulaire sont utilisées et la concentration finale du Laemmli doit être de 1X. Une fois les échantillons prêts, les puits sont chargés avec les échantillons, le tampon d'électrophorèse (Tris-base 25.2 mM, glycine 218.5 mM, SDS 0.1%) est ajouté et le système

Hoefler (gros gel) ou *BioRad* (petit gel) est assemblé. Le **tableau 2** indique les temps et voltages variables qui ont été utilisés selon les types d'appareil de migration.

Tableau 2: Paramètres de migration et de transfert des protéines

		Migration	Transfert
BioRad	1 ou 2 gels	120 V environ 1h30	100 V 2h 20 V O/N
Hoefler	1 gel	30 mA environ 4h 5 mA O/N	100 mA O/N 400 mA 4h
	2 gels	60 mA environ 4h 10 mA O/N	100 mA O/N 400 mA 4h

V = volt ; mA = milliampère; O/N = *over night*

II.3.4 Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose

Une fois la migration terminée, la membrane de nitrocellulose Hybond-C Extra ayant des pores de 45 micron est conditionnée au moins 10 minutes dans du tampon de transfert (glycine 120 mM, Tris-base 15.7 mM). Ce tampon assure le transfert des protéines de haut poids moléculaire tout comme celui des protéines de poids moléculaire d'environ 60 kDa. Pour terminer, le système de transfert est assemblé, l'appareil est rempli avec du tampon de transfert et les protéines sont transférées selon les paramètres indiqués au **tableau 2**.

II.3.5 Révélation des protéines au Rouge Ponceau

Le Rouge Ponceau est un colorant qui interagit avec les protéines de façon réversible. Cette coloration, réalisée sur chaque membrane de nitrocellulose immédiatement après le transfert, permet de distinguer toutes les bandes de protéines, et ainsi, évaluer la qualité du transfert et le chargement en protéines des différents puits. La membrane est recouverte avec la solution de rouge ponceau (rouge ponceau 0.5%, acide acétique glaciale 1%), puis agitée 2 à 3 minutes. Le rinçage avec de l'eau 18.2 mΩ retire tout le colorant qui n'a pas

interagit avec les protéines et révèle les nombreuses protéines transférées sur la nitrocellulose.

II.3.6 Immunodétection

Les protéines que l'on veut détecter sont révélées avec un anticorps primaire et un anticorps secondaire anti-IgG-HRP selon un protocole différent pour chaque anticorps.

II.3.6.1 Western blot anti-phosphotyrosine

La membrane est incubée 1 heure à 37°C ou O/N à 4°C dans du tampon de blocage (Tris 10 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM pH 8.0, BSA 2%, Tween 20 0.1%; filtré) et par la suite, elle est incubée 1 heure à la température de la pièce ou O/N à 4°C avec l'anticorps anti-phosphotyrosine (0.1 µg/ml) dilué dans le tampon de blocage. À la température de la pièce, la membrane est rincée 4 fois 10 minutes avec du tampon B (Tris 25 mM pH 8.0, NaCl 150 mM), incubée 30 minutes avec du tampon de blocage, incubée 1 heure avec l'anticorps anti-IgG de souris-HRP (0.27 µg/ml) dilué dans du tampon de blocage, lavée 4 fois 10 minutes avec du tampon B et pour terminer, 2 lavages de 10 minutes sont effectués avec du tampon D (Tris 100 mM pH 8.0).

II.3.6.2 Western blot anti-p125^{FAK}

La membrane est bloquée 30 minutes avec du tampon de blocage (PBS contenant du lait écrémé 5%, Tween 20 0.05%) et incubée 1 heure avec l'anticorps anti-p125^{FAK} (0.4 µg/ml) dilué dans du tampon de blocage. Par la suite, la membrane est lavée 3 fois 5 minutes avec du tampon de lavage (PBS contenant Tween 20 0.05%) et incubée 1 heure avec l'anticorps anti-IgG de lapin-HRP (0.08 µg/ml) dilué dans du tampon de blocage. Pour terminer, la membrane est lavée 3 fois 5 minutes avec du tampon de lavage et lavée une fois 5 minutes avec du PBS. Toutes ces étapes sont effectuées à la température de la pièce.

II.3.6.3 Western blot anti-Akt et anti-phospho-Akt-serine

La membrane est bloquée 1 heure avec du TBS (Tris-base 20 mM, NaCl 42 mM pH 7.6) contenant du lait écrémé 5% et du Tween 20 0.1%, lavée 3 fois 5 minutes avec du tampon de lavage (TBS contenant Tween 20 0.1%) et incubée O/N avec l'anticorps anti-Akt (1 :1000) ou anti-phospho-Akt-Ser⁴⁷³ (1 :1000) dilué dans du TBS contenant de la BSA 5% et Tween 20 0.1%. Par la suite, la membrane est lavée 3 fois 5 minutes avec du tampon de lavage et incubée 1 heure avec l'anticorps anti-IgG de lapin-HRP (0.08 µg/ml) dilué dans du TBS contenant du lait écrémé 5% et du Tween 20 0.1%. Pour terminer, la membrane est lavée trois fois 5 minutes avec du tampon de lavage. Toutes ces étapes sont effectuées à la température de la pièce sauf l'hybridation O/N avec le premier anticorps qui est effectuée à 4°C.

II.3.6.4 Western blot anti-phospho-c-Met

La membrane est incubée 1 heure à 37°C ou O/N à 4°C dans du TBS contenant de la BSA 4% et du Tween 20 0.05% et incubée O/N à 4°C ou 2h à la température de la pièce avec l'anticorps anti-phospho-c-Met (Y^{1230,1234,1235}) (0.025 µg/ml) dilué dans du TBS contenant de la BSA 1% et du Tween 20 0.05%. Par la suite, la membrane est lavée 6 fois 10 minutes avec du tampon de lavage (TBS contenant Tween 20 0.05%) et incubée 1 heure avec l'anticorps anti-IgG de lapin-HRP (0.08 µg/ml) dilué dans du TBS contenant de la BSA 1% et du Tween 20 0.05%. Pour terminer, la membrane est lavée 6 fois 10 minutes avec du tampon de lavage. Toutes ces étapes sont effectuées à la température de la pièce sauf le premier blocage et l'hybridation avec le premier anticorps O/N qui est effectuée à 4°C.

II.3.6.4 Western blot anti-PI3-kinase (p85)

La membrane est incubée 30 minutes à 37°C dans du PBS contenant du lait écrémé 5% et du Tween 20 0.2% et incubée 1h à 37°C avec l'anticorps anti-PI3-kinase (1 µg/ml) dilué dans du PBS contenant du lait écrémé 5% et du

Tween 20 0.2%. Par la suite, la membrane est lavée 2 fois 5 minutes avec du tampon de lavage (PBS contenant Tween 20 0.2%) et incubée 1 heure avec l'anticorps anti-IgG de souris-HRP (0.27 $\mu\text{g/ml}$) dilué dans du PBS contenant du lait écrémé 5% et du Tween 20 0.2%. Pour terminer, la membrane est lavée 4 fois 10 minutes avec du tampon de lavage. Toutes ces étapes sont effectuées à la température de la pièce sauf le premier blocage et l'hybridation avec le premier anticorps qui est réalisée à 37°C.

II.3.7 Révélation par chémiluminescence

On utilise le réactif de chémiluminescence ECL de la compagnie Mandel (St-Laurent, Qc) pour détecter les protéines qui sont liées à un anticorps couplé à une molécule de HRP (*horseradish peroxidase*). L'enzyme HRP catalyse l'émission de lumière à partir de l'oxydation du luminol (ECL). Après l'addition d'une fine couche de ECL sur la membrane, il y a dégradation oxydative du luminol, ce qui produit une émission de lumière. Cette lumière est capturée par un film Kodak BioMax Light (BML).

II.4 DÉCAPAGE (*STRIPPING*) DES ANTICORPS

L'enlèvement complet des anticorps primaires et secondaires de la membrane est possible mais doit être réalisé avec beaucoup de rigueur pour en assurer le succès. La température et la durée du traitement sont critiques. Lorsque maintenue dans d'excellentes conditions, la membrane peut être nettoyée des anticorps liés sans toutefois endommager ni perdre les protéines liées à la membrane de nitrocellulose. Il y a un grand avantage à utiliser cette procédure lorsque plusieurs protéines doivent être détectées dans un même échantillon et que la quantité de celui-ci est limitée. Nous nous assurons cependant pour chaque anticorps utilisé que des résultats identiques sont obtenus avant ou après décapage. Ainsi, nous avons noté que phospho-Akt ne peut être détecté après une telle procédure. Aussi, nous vérifions l'efficacité du décapage par une exposition prolongée (de l'ordre de 30 min à 2 heures) contre un film avant d'amorcer une seconde hybridation. Pour effectuer ce décapage,

la membrane doit être submergée et incubée dans un tampon comprenant du 2-mercaptoethanol 100 mM, SDS 2% et Tris-HCl 62.5 mM pH 6.7 pour une durée de 30 minutes à 50°C. Par la suite, la membrane est lavée deux fois avec un grand volume de PBS contenant du Tween 20 0.1% à la température de la pièce. La membrane peut alors être réutilisée immédiatement pour une autre immunodétection ou conservée à 4°C pour une utilisation ultérieure.

II.5 IMMUNOFLUORESCENCE

Les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 15 minutes, lavées avec du PBS-CM filtré et les membranes sont perméabilisées avec de la saponine 0.075% pour 10 minutes. Les cellules sont mises en contact durant 45-60 minutes avec la phalloïdine couplée au rouge texan pour marquer l'actine-F. Par la suite, les lamelles sont montées sur des lames avec de l'agent de montage (propyl gallate 100mM, glycérol 50%, Tris-HCL 100mM pH 8.0) et scellées avec une couche mince de vernis à ongle. Les lamelles sont observées sur un microscope à fluorescence Zeiss AxioSkop équipé d'un objectif 63X et d'un filtre pour le rouge texan.

II.6 VIDÉOMICROSCOPIE

Les cellules sontensemencées dans des puits de 2.5 cm de diamètre dans du milieu DMEM-NaHCO₃ complet et supplémenté de FBS 10%. Environ 3 heures avant le début de l'enregistrement, le milieu est changé pour du milieu DMEM-HEPES supplémenté de FBS 10% pour permettre aux cellules de s'équilibrer dans ce milieu qui servira aux enregistrements en absence de CO₂. Le LY294002 50 µM ou le DMSO 0.1% est ajouté au milieu DMEM-HEPES supplémenté de FBS 10%, la plaque de cellules est déposée sur une plaque chauffante maintenue à 37°C et les cellules sont recouvertes d'une mince couche d'huile de paraffine pour prévenir l'évaporation du milieu lors de l'expérience. Les cellules sont observées pendant 48h avec un microscope Zeiss Axiovert muni d'un objectif 10X et équipé d'une caméra vidéo Princeton Microview. Les images sont enregistrées toutes les 15 minutes et analysées par

le logiciel d'analyse d'image Northern Eclipse (Empix Imaging, Mississauga, ON). Les films sont convertis en fichier *avi* pour visualiser l'effet en fonction du temps.

II.7 CHAMBRE DE BOYDEN

La chambre de Boyden est un système composé d'une chambre supérieure et d'une chambre inférieure séparées par un filtre criblé de pores de 8 microns. Ce système permet donc d'étudier la migration des cellules en étudiant la capacité de celles-ci à envahir la membrane recouverte d'une matrice appropriée. Ainsi, les cellules motiles ont le pouvoir de passer à travers le filtre (**Figure 15**).

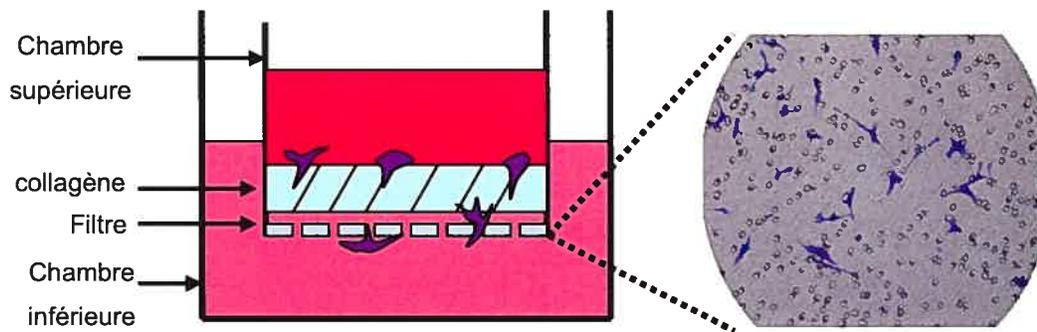


Figure 15: Principe de la chambre de Boyden

Pour effectuer cet essai de migration, les deux cotés du filtre sont recouverts avec du collagène de type I isolé de la queue de rat à une concentration de 6 $\mu\text{g/ml}$. Cette concentration optimale a été déterminée au laboratoire lors d'essais cinétiques sur différentes matrices. Ainsi, le filtre est incubé 2h à 37°C en présence de collagène et rincé avec du PBS. Une fois le filtre recouvert de collagène, les cellules sontensemencées sur le filtre du côté de la chambre supérieure (20 000 cellules dans 100 μL de milieu DMEM- NaHCO_3 supplémenté de FBS 10%), 600 μL du milieu DMEM- NaHCO_3

supplémenté de FBS 10% est ajouté dans la chambre inférieure et le système est incubé sous une atmosphère de CO₂ 5% à 37°C pour une durée de 30 minutes pour permettre aux cellules d'adhérer au collagène. Il faut noter que pour étudier la capacité d'invasion des cellules MSV-MDCK-INV, aucun agent au pouvoir attracteur n'est utilisé dans la chambre inférieure, comme c'est souvent le cas, puisque ces cellules sécrètent leur propre HGF (149). Le milieu de la chambre inférieure et supérieure est changé par du milieu DMEM-NaHCO₃ supplémenté de FBS 10% contenant ou non les inhibiteurs. Les cellules migrent durant 4h sous une atmosphère de CO₂ 5% à 37°C. Par la suite, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% durant 20 minutes, colorées avec du cristal violet (MeOH 20%, cristal violet 0.1%) durant 20 minutes ou O/N et rincées plusieurs fois avec de l'eau distillée. Les cellules n'ayant pas migré sont méticuleusement enlevées de la chambre supérieure avec un coton-tige. Des photographies de cinq champs différents sont prises au hasard à l'aide d'un microscope équipé d'un oculaire 10 X, d'un objectif 10X et d'une caméra numérique; les cellules sont comptées manuellement à l'aide du logiciel Alphamager 5.5.

II.8 TECHNIQUE DE LA GUÉRISON DE LA PLAIE

Cette technique est basée sur la capacité des cellules motiles à envahir une plaie pour permettre la cicatrisation de celle-ci; ceci reflète donc le degré de motilité de ces cellules. Ainsi, les cellules ont étéensemencées à haute densité (200 000 cellules/puits 35 mm) sur des lamelles en milieu DMEM-NaHCO₃ supplémenté de FBS 10 %. Environ 48h après, une rayure a été effectuée sur la monocouche de cellules à l'aide d'une seringue tuberculine recourbée et la capacité des cellules à envahir la plaie en fonction du temps et en absence (DMSO 0.05 %) ou en présence des composés LY294002 50 µM et herbimycine 4 µM a été observée au moyen d'un microscope. Les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 15 minutes et lavées avec du PBS-CM filtré. Par la suite, les lamelles sont montées sur des lames avec de

l'agent de montage et les lamelles sont observées sur un microscope à fluorescence Zeiss AxioSkop équipé d'un objectif 10X.

II.9 INCORPORATION DE LA ^3H -THYMIDINE

La thymidine marquée à l'isotope tritium (^3H) est rapidement incorporée dans l'ADN des cellules en culture. Cette technique est fréquemment utilisée pour étudier le taux de synthèse d'ADN, c'est-à-dire la prolifération cellulaire. Ainsi, les cellules (100 000 cellules/puits de 1.25 cm) sont cultivées pendant 24h à 37°C dans du milieu DMEM-NaHCO₃ contenant du FBS 10% sous atmosphère de CO₂. Par la suite, elles sont traitées avec différentes concentrations de LY294002 (1-100 μM) ou DMSO pendant 16h avant que le milieu contenant de la ^3H -thymidine à une concentration de 2 mCi/ml soit ajouté pour une période additionnelle de 4 h. Les cellules sont ensuite précipitées au TCA 5%, lysées par le NaOH 0.1N et la radioactivité est comptée dans un compteur à scintillation beta.

III. RÉSULTATS

III.1 LE RÔLE DE LA PI3-KINASE DANS LA MOTILITÉ ACCRUE DES CELLULES MSV-MDCK-INV.

Le but du projet est de déterminer l'implication de la PI3-kinase dans le phénotype motile et invasif des cellules MSV-MDCK-INV. Pour ce faire, il est essentiel d'estimer le degré d'activité de la PI3-kinase dans les cellules MSV-MDCK-INV afin de le comparer à celui des cellules MSV-MDCK et MDCK.

III.1.1 La PI3-kinase est plus active dans les cellules MSV-MDCK-INV.

Notre objectif premier était de mesurer l'activité de la PI3-kinase dans les trois lignées cellulaires. Ceci consiste à extraire les protéines des cellules et à immunoprécipiter la p110 en utilisant un anticorps dirigé contre la sous-unité p85 de la PI3-kinase. Le complexe p85/p110 est incubé avec du (γ -³²P)ATP afin de permettre la synthèse de lipides PI-phosphate marqués. L'extraction de ces lipides se fait avec du CHCl₃ suivie d'une séparation par TLC (*Thin Layer Chromatography*). L'autoradiographie de la plaque de TLC permet la localisation des lipides PI-phosphate marqués. L'activité de la PI3-kinase est proportionnelle à la synthèse de PtdIns(3,4,5)P₃ radioactif. Celui-ci peut alors être quantifié par analyse de densitométrie des taches correspondant aux PtdIns(3,4,5)P₃. Cette approche a dû être exclue puisque aucun anticorps dirigé contre la p85 de la PI3-kinase d'origine canine capable de l'immunoprécipiter n'a été trouvé. Deux anticorps de différentes compagnies (Santa Cruz Biotechnology et BD Biosciences) ont été testés à plusieurs reprises et avec différents protocoles. Le seul anticorps à reconnaître la p85 de la PI3-kinase d'origine canine en immunobuvardage de type western est celui de chez BD Biosciences (**Figure 16A**). Cependant, cet anticorps n'a jamais permis d'immunoprécipiter la p85 de nos trois lignées cellulaires d'origine canine. Plusieurs conditions d'immunoprécipitation ont été testées et tout particulièrement, les protéines G-agarose et A-sépharose, qui possèdent différentes affinités de liaison pour les

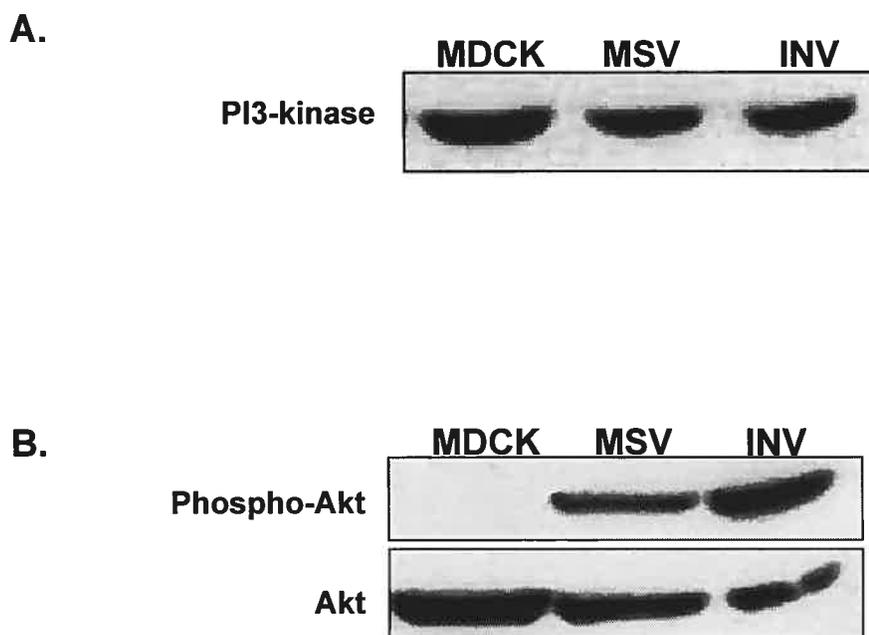


Figure 16

Expression différentielle des protéines PI3-kinase et Akt dans les lignées cellulaires MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV.

(A) La protéine PI3-kinase a été étudiée par immunobuvardage de type western avec un anticorps anti-PI3-kinase (p85) sur des lysats totaux (50 μ g de protéines). Les cellules MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV ont été mises en culture en présence de FBS 10% pendant deux jours. Les résultats sont représentatifs de 2 expériences similaires. (B) Le degré de phosphorylation de la protéine Akt a été étudié par immunobuvardage de type western avec un anticorps anti-phospho-Akt-Ser⁴⁷³ sur des lysats totaux (50 μ g de protéines). Les cellules MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV ont été mises en culture en présence de FBS 10% pendant deux jours. La protéine Akt a été identifiée sur la membrane de nitrocellulose décapée. Les résultats sont représentatifs de 2 expériences similaires.

sous-classes d'IgG. Par la suite, nos efforts ont été dirigés vers l'utilisation d'un anticorps reconnaissant la forme phosphorylée de la sous-unité p85 de la PI3-Kinase, l'anti-phospho-PI3-kinase p85 α (tyr⁵⁰⁸) de chez Santa Cruz Biotechnology. Il a en effet été démontré que la stimulation des récepteurs à activité tyrosine kinase de l'insuline et du PDGF induit une augmentation du degré d'activité de la PI3-kinase (augmentation des produits de la PI3-kinase) (9, 53, 118) d'une part, et induit la phosphorylation sur tyrosine de la sous-unité p85 de la PI3-kinase (54, 66), d'autre part. Ces observations suggèrent donc que le degré de phosphorylation de la p85 est un indice de l'activité de la PI3-kinase. Le récepteur HGF est également un récepteur de facteur de croissance à activité tyrosine kinase qui active la PI3-kinase (51). Il était donc pertinent de vérifier le degré de phosphorylation de la p85 dans notre modèle cellulaire. Cependant, un immunobuvardage de type western avec l'anticorps anti-phospho-PI3-kinase p85 α (tyr⁵⁰⁸) donnait toujours un signal non-spécifique. L'utilisation du peptide spécifique à l'anticorps n'a pas permis de déterminer quelle bande correspondait à la sous-unité p85 phosphorylée puisque toutes les bandes étaient déplacées par le peptide.

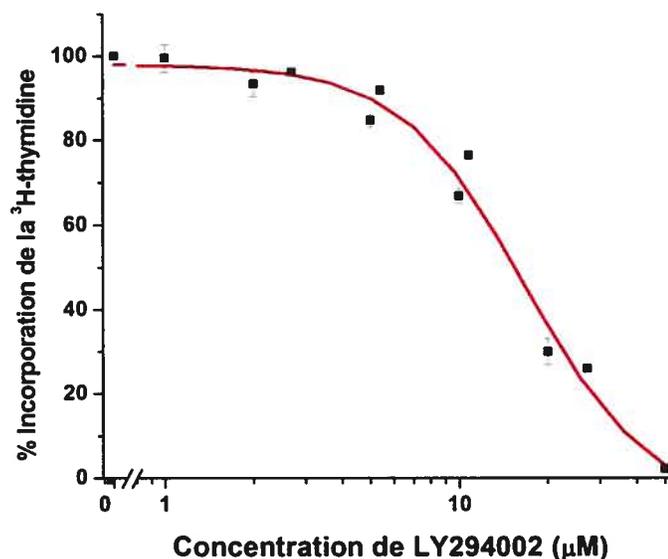
En absence d'anticorps reconnaissant la p85 et/ou la p85 activée (phosphorylée) de chien, le degré de phosphorylation de Akt, une protéine en aval de la PI3-kinase et reflétant l'activité de la PI3-kinase, a été étudié (34, 146). On observe à la **figure 16B** que la protéine Akt est, dans des conditions normales de culture (2 jours de culture en présence de sérum 10 %), plus phosphorylée dans les cellules MSV-MDCK-INV comparativement aux cellules MSV-MDCK pour une quantité inférieure de protéines; dans ces conditions, la protéine Akt n'est pas phosphorylée dans les cellules MDCK. Ces résultats indiquent que l'activité intrinsèque de la protéine Akt dans les cellules MSV-MDCK-INV est nettement plus élevée que dans les cellules MDCK et MSV-MDCK. L'activité de la PI3-kinase des cellules MSV-MDCK-INV semble donc supérieure à celle des deux autres types cellulaires. On observe également à la

figure 16A que la quantité de PI3-kinase est inférieure dans les cellules MSV-MDCK-INV et MSV-MDCK comparativement aux cellules MDCK.

III.1.2 Le LY294002 inhibe la croissance cellulaire et la phosphorylation de la protéine Akt des cellules MSV-MDCK-INV.

Le rôle de la PI3-kinase dans la prolifération, la croissance et la survie cellulaire a été très bien démontré (105, 131, 135). Afin de déterminer la dose optimale à laquelle la PI3-kinase est inhibée dans les cellules MSV-MDCK-INV, l'effet du LY294002, un inhibiteur de la PI3-kinase, sur la croissance des cellules MSV-MDCK-INV a été étudié. L'incorporation de la ^3H -thymidine en présence de FBS 10% et de différentes concentrations de LY294002 a été mesuré (**Figure 17A**). En accord avec la littérature (63), une concentration de 50 μM de LY294002 inhibe la prolifération des cellules MSV-MDCK-INV à plus de 95% ($\text{IC}_{50} = 17 \mu\text{M}$). Ceci démontre clairement le rôle majeur de la PI3-kinase dans la réponse mitogénique des cellules MSV-MDCK-INV. L'estimation de l'activité de la PI3-kinase via l'étude du degré de phosphorylation de la protéine Akt a également été étudiée. En effet, le degré de phosphorylation de Akt est significativement diminué à la suite d'un traitement de 1 heure au LY294002 10 μM , tandis qu'un traitement au LY294002 20 μM déphosphoryle complètement la protéine (**Figure 17B**). Plusieurs groupes de recherche utilisent des concentrations de 20 à 50 μM de LY294002 sans observer d'effets secondaires (63, 112, 129). Ainsi, la concentration la plus convenable à utiliser, en étant certain que la PI3-kinase des cellules MSV-MDCK-INV soit inhibée sans toutefois influencer d'autres voies de signalisation, est de 50 μM de LY294002. Le temps d'action du LY294002 50 μM a également été déterminé en étudiant le degré de phosphorylation de la protéine Akt. On observe à la **figure 18** que la protéine Akt est déphosphorylée après seulement 15 minutes de traitement au LY294002 et que même après un long traitement de 16-24h au LY294002 la protéine Akt est encore significativement déphosphorylée. Ces résultats indiquent que le LY294002 50 μM inhibe rapidement la PI3-kinase, en moins de 15 minutes, et que son effet est de longue durée.

A.



B.



Figure 17

Effets du LY294002 sur la croissance cellulaire et le degré de phosphorylation de Akt des cellules MSV-MDCK-INV.

(A) L'incorporation de ³H-thymidine dans les cellules MSV-MDCK-INV a été mesurée à la suite d'un traitement de 16h en présence de différentes concentrations de LY294002 et en présence de FBS 10% ($X \pm SEM$, $n=1-3$)

(B) Le degré de phosphorylation de la protéine Akt des cellules MSV-MDCK-INV a été étudié par immunobuvardage de type western avec un anticorps anti-phospho-Akt-Ser⁴⁷³ sur des lysats totaux (50 µg de protéines). Les cellules ont été traitées pendant 1 heure en présence de DMSO (solvant du LY294002) ou de différentes concentrations de LY294002, et en présence de FBS 10%. La protéine Akt a été identifiée sur la membrane de nitrocellulose décapée, comme témoin de chargement des échantillons. Les résultats sont représentatifs de 2 expériences similaires.

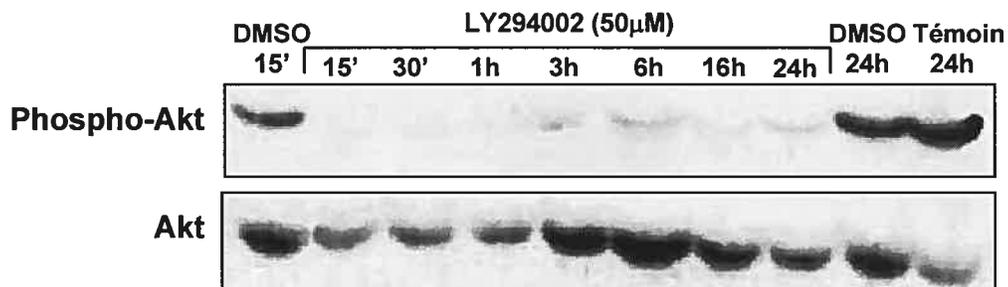


Figure 18

Effet du LY294002 sur le degré de phosphorylation de Akt en fonction du temps de traitement.

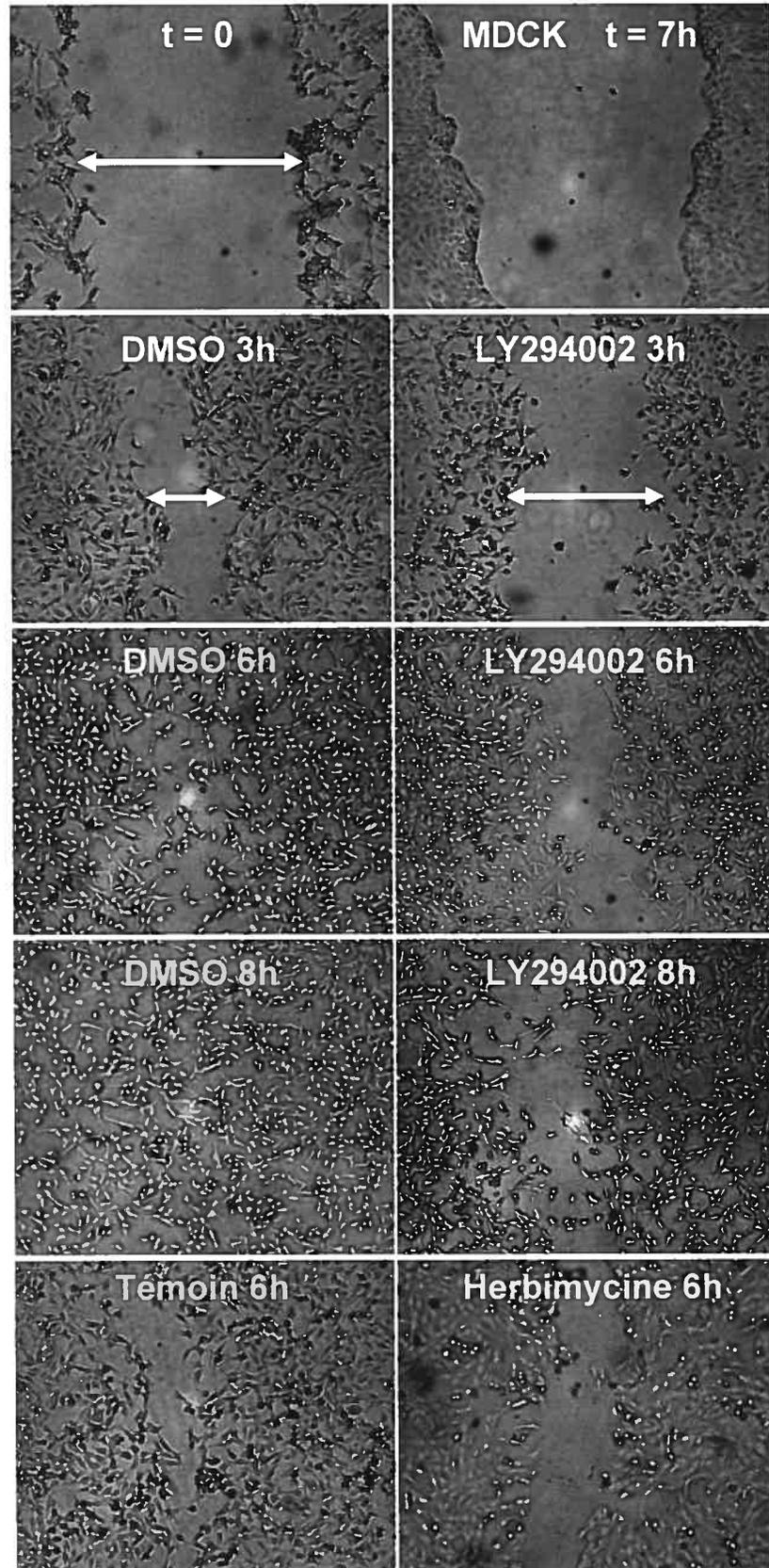
Le degré de phosphorylation de la protéine Akt des cellules MSV-MDCK-INV a été étudié par immunobuvardage de type western avec l'anticorps anti-phospho-Akt-Ser⁴⁷³ sur des lysats totaux (50μg de protéines). Les traitements au LY294002 50 μM ont été réalisés pendant différents temps et en présence de FBS 10%. La protéine Akt a été identifiée sur la membrane de nitrocellulose décapée comme témoin de chargement des échantillons. Ce test permet de déterminer qu'une quantité plus importante de protéines a été déposée dans les pistes « 3 et 6 h ». L'intensité du signal phospho-Akt doit donc être corrigée proportionnellement. Les résultats sont représentatifs de 2 expériences similaires.

III.1.3 Le LY294002 inhibe partiellement la motilité directionnelle des cellules MSV-MDCK-INV.

La technique de guérison de plaie (*wound healing assay*) est utilisée pour mesurer l'habileté des cellules MSV-MDCK-INV à se déplacer dans une direction donnée. Les cellules ont étéensemencées à haute densité sur une lamelle, une rayure a été effectuée sur la monocouche de cellules (temps 0; largeur de 30.8 mm) et la capacité des cellules à envahir la plaie a été observée en fonction du temps. Cette technique est expliquée en détail dans la section II.8 matériel et méthodes. On observe à la **figure 19** que la capacité des cellules à envahir la plaie est inhibée d'environ 50 % par un traitement de 3h au LY294002 50 μ M (distance parcourue de 11.8 mm) comparativement au témoin DMSO 3h (distance parcourue de 20.3 mm). L'effet inhibiteur du LY294002 est également visible après une incubation de 6h et 8h alors que les cellules en condition DMSO ont recouvert entièrement la plaie. Les cellules MDCK ont été utilisées comme cellules non-motiles. Elles n'envahissent pas la plaie et on distingue une belle définition de la rayure. Puisqu'il est connu que l'herbimycine, un inhibiteur des kinases à résidus tyrosine, induit la formation de contacts cellule-cellule, et inhibe présumément la motilité cellulaire des cellules MSV-MDCK-INV (149), elle a été utilisée comme témoin (149). Tel que prévu, l'herbimycine a inhibé significativement la capacité des cellules à envahir la plaie, mais pas complètement. Ces résultats sont en accord avec le fait qu'une incubation de 24 h en présence d'herbimycine 4 μ M n'a pas entièrement aboli le degré de phosphorylation de c-Met des cellules MSV-MDCK-INV (149). Bien que qualitatifs, ces résultats indiquent que le LY294002 inhibe de façon significative, et comparable à l'herbimycine, la motilité directionnelle des cellules MSV-MDCK-INV.

Figure 19**Effet de l'inhibition de la PI3kinase par le LY294002 sur la motilité directionnelle des cellules MSV-MDCK-INV.**

La capacité d'invasion des cellules MSV-MDCK-INV a été mesurée par la technique de la plaie. Une rayure a été effectuée sur la monocouche de cellules et la capacité des cellules à envahir la plaie a été observée en présence de LY294002 50 μ M après 3h, 6h et 8h de traitement, d'herbimycine 4 μ M après 6h (traitement préalable de 16h), de DMSO 0.05% après 3h, 6h et 8h comme témoin pour le LY294002 et de DMSO 0.2% pendant 6h comme témoin pour l'herbimycine. Ces traitements ont tous été effectués en présence de FBS 10%. Une rayure au temps 0 a également été photographiée pour fin de comparaison. Les cellules MDCK en présence de FBS 10% après 7h de culture dans du milieu normal ont été utilisées comme témoin de cellules non-motiles. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences.



III.1.4 La motilité aléatoire des cellules MSV-MDCK-INV est partiellement inhibée par le LY294002

La motilité aléatoire des cellules MSV-MDCK-INV est de 2 et 2.5 fois supérieure aux cellules MSV-MDCK et MDCK respectivement (149). De plus, la sécrétion de HGF par les cellules MSV-MDCK-INV suivie de l'activation autocrine des récepteurs c-Met est directement impliquée dans le phénomène de motilité accrue de ces cellules (149). Ainsi, nous avons voulu déterminer si l'inhibition de la PI3-kinase par le LY294002 50 μ M influençait le mouvement aléatoire des cellules MSV-MDCK-INV. La **figure 20**, tirée d'une étude de vidéomicroscopie en mode *time-lapse* (**Film 1**, voir la section documents spéciaux) montre qu'en fonction du temps, les cellules MSV-MDCK-INV s'allongent et forment de longues protusions pseudopodiales. Cette réorganisation du cytosquelette, conduisant à la formation de ces longs pseudopodes, a été étudiée plus en détails et les résultats sont présentés à la section III.1.6. Ces longs pseudopodes demeurent dynamiques et la motilité des cellules est très peu diminuée au cours des premières 12 à 16 heures d'enregistrement. Cependant, le mouvement des cellules diminue significativement, mais pas totalement, après une longue incubation avec le LY294002. Il est malheureusement impossible de quantifier cette inhibition de motilité puisque les cellules forment des contacts cellule-cellule, nous empêchant de suivre le mouvement individuel des cellules.

III.1.5 Effet du LY294002 et de la wortmannine sur l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV dans une matrice de collagène de type I.

Afin de s'assurer que l'inhibition de la motilité observée à la suite des traitements au LY294002 était due à l'inhibition de la PI3-kinase et non à des effets secondaires du LY294002, l'effet de la wortmannine et du LY294002 ont été étudiés parallèlement au niveau de la capacité invasive des cellules MSV-MDCK-INV. Pour ce faire, il fallait d'abord déterminer la dose de wortmannine à utiliser pour inhiber de façon optimale la PI3-kinase.

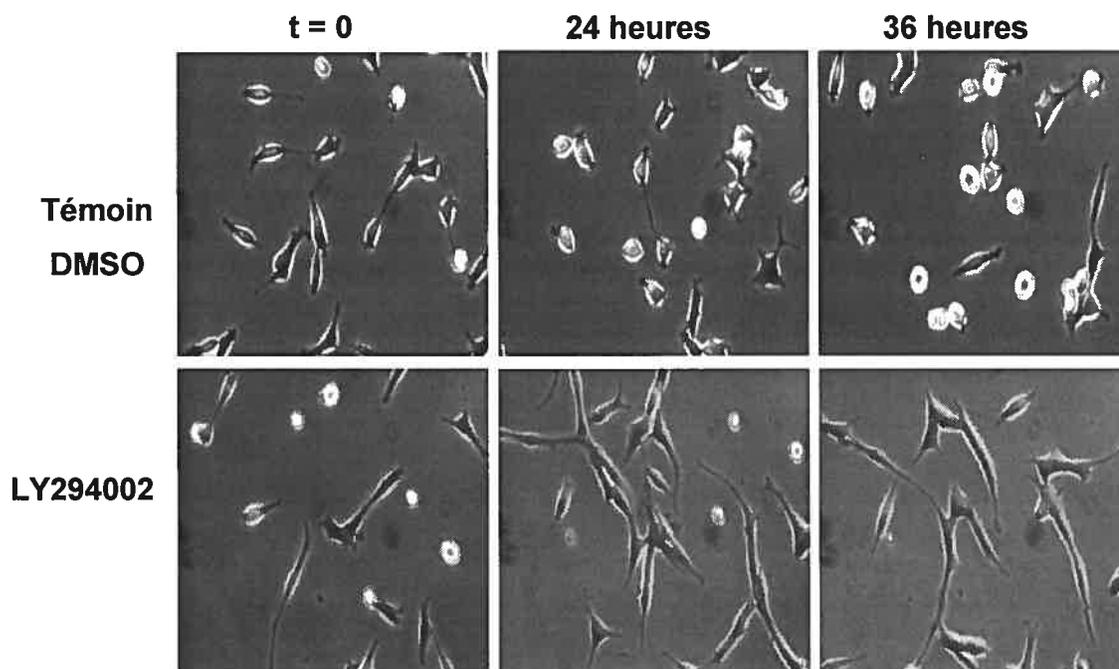


Figure 20

Effet du LY294002 sur la motilité aléatoire des cellules MSV-MDCK-INV.

Les cellules MSV-MDCK-INV ont été incubées dans du milieu DMEM-HEPES complet et supplémenté de FBS 10% contenant du DMSO 0.1% ou du LY294002 50 μ M. Les images ont été enregistrées toutes les 15 minutes pour une période de 48h. Trois images représentatives sont montrées à temps 0, 24 et 36h pour le témoin DMSO et le LY294002. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences.

III.1.5.1 La wortmannine, à une concentration de 500 nM, inhibe partiellement la PI3-kinase.

Le degré de phosphorylation de la protéine Akt a été étudié afin de déterminer la dose de wortmannine à utiliser pour inhiber la PI3-kinase. On observe à la **figure 21** que le degré de phosphorylation de la protéine Akt est significativement diminué à la suite d'un traitement de 1h à la wortmannine 50 nM en présence de FBS 10%. À des concentrations supérieures, de 500 nM et 1 μ M, la wortmannine inhibe fortement la PI3-kinase, mais pas complètement puisque la protéine Akt est toujours faiblement phosphorylée. Des concentrations de 500 nM et 1 μ M sont toutefois bien supérieures aux concentrations utilisées par les autres groupes de recherche (39, 93, 113). Malgré cette apparente controverse, nous avons décidé d'utiliser une concentration de 500 nM de wortmannine pour les expériences subséquentes. Cette décision, qui est principalement basée sur les résultats de la **figure 21**, prend aussi en considération les résultats obtenus par Royal et al. (113). Ce groupe de recherche a démontré que des concentrations de 100 nM et de 1 μ M de wortmannine inhibent l'activité de la PI3-kinase en présence de HGF de seulement 35% et 65% respectivement sur des cellules MDCK en culture (113). Puisque les cellules MDCK sont à l'origine du modèle cellulaire utilisé, les cellules MSV-MDCK-INV, une concentration de 500 nM a été utilisée, comme Royal et al. (113), en étant toutefois conscient que la PI3-kinase n'est pas complètement inhibée.

III.1.5.2 Le LY294002 et la wortmannine inhibent partiellement, et à des degrés différents, l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV dans la matrice de collagène de type I.

Les doses adéquates de wortmannine et de LY294002 étant déterminées, l'effet des deux inhibiteurs de la PI3-kinase sur la capacité d'invasion des cellules MSV-MDCK-INV dans du collagène de type I a été étudié. Pour ce faire, un filtre poreux a été recouvert d'une matrice de collagène de type I et la capacité des cellules à infiltrer le collagène et à traverser les

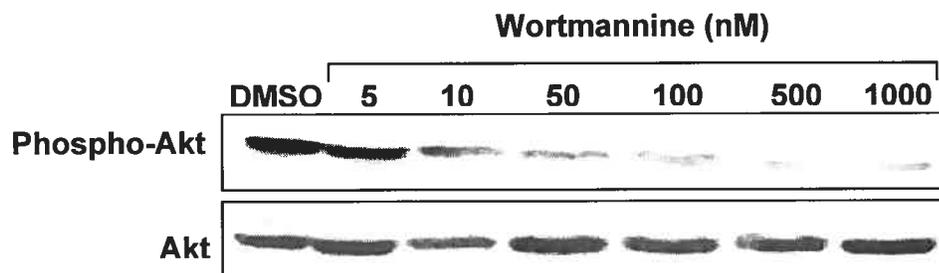


Figure 21

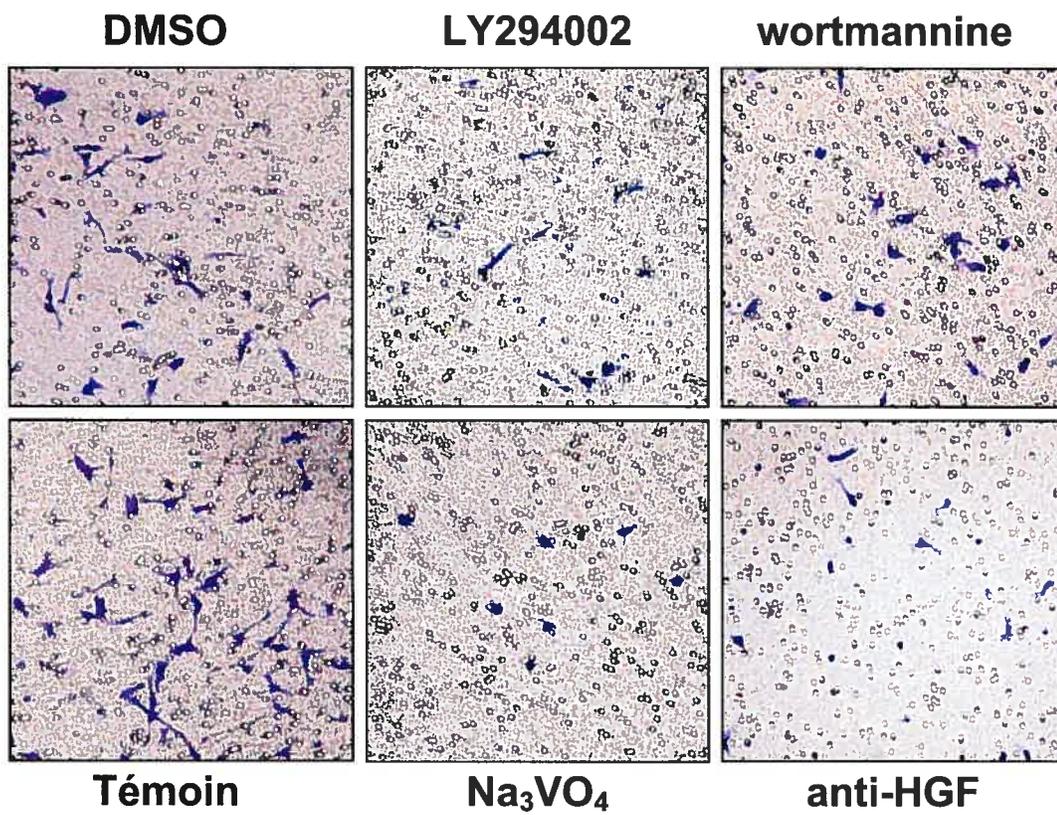
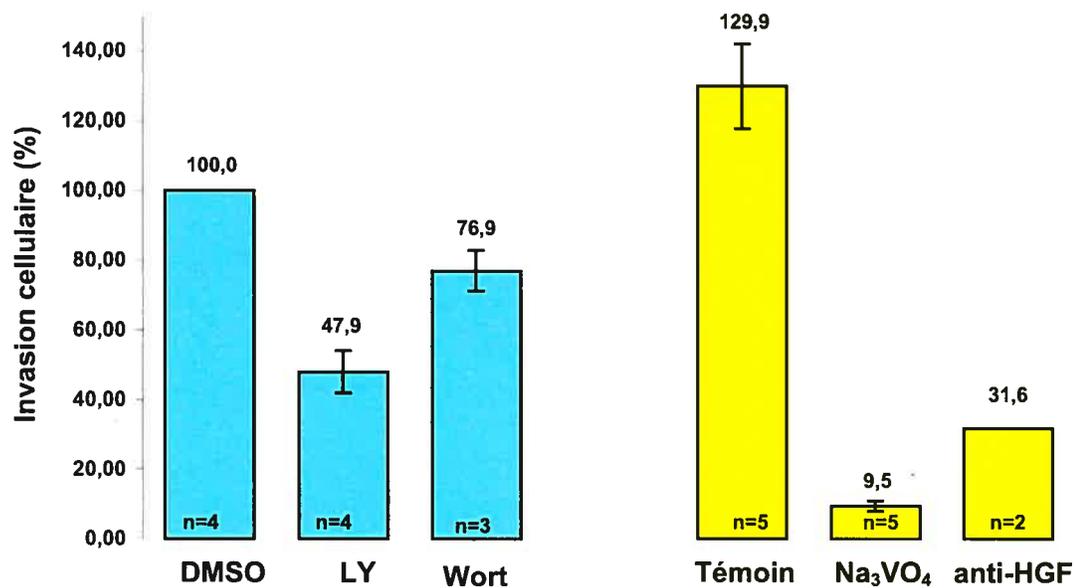
Le degré de phosphorylation de la protéine Akt est partiellement inhibé par la wortmannine 500 nM dans les cellules MSV-MDCK-INV.

Le degré de phosphorylation de la protéine Akt des cellules MSV-MDCK-INV a été étudié par immunobuvardage de type western avec un anticorps anti-phospho-Akt-Ser⁴⁷³ sur des lysats totaux (50µg de protéines). Les cellules ont été traitées pendant 1 heure avec différentes concentrations de wortmannine et en présence de FBS 10%. La protéine Akt a été identifiée sur la membrane de nitrocellulose décapée comme témoin de chargement des échantillons. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences.

pores a été mesurée via l'utilisation des chambres de Boyden (technique expliquée à la section II.7 matériel et méthodes). Les résultats obtenus sont présentés à la **figure 22**. Il a été déterminé que le LY294002 inhibe l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV de 52 % comparativement à la wortmannine qui l'inhibe de 23 % (en fonction du témoin DMSO). Parallèlement au LY294002 et à la wortmannine, l'effet de deux inhibiteurs connus de la motilité des cellules MSV-MDCK-INV a été étudié: l'anti-HGF et l'orthovanadate de sodium. En effet, nous avons démontré par vidéomicroscopie que l'ajout d'anticorps anti-HGF aux cellules MSV-MDCK-INV inhibe leur motilité (149). Tel qu'attendu, l'anticorps anti-HGF inhibe l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV de 76 % par rapport au témoin (**Figure 22**). De plus, il a été démontré que l'orthovanadate de sodium, un inhibiteur des phosphatases à tyrosine, induit l'arrondissement des cellules MSV-MDCK-INV et probablement une diminution de la motilité cellulaire (**Figure 23**). Ces résultats pourraient s'expliquer par le rôle important que les phosphatases à tyrosine joue dans le phénomène adhésion-déadhésion cellulaire. Pour être certain que l'orthovanadate de sodium ne cause pas la mort cellulaire, le bleu de trypan a été utilisé pour étudier la viabilité cellulaire. Ce produit, non toxique pour la cellule, a tendance à entrer dans la cellule. Les cellules viables ont des mécanismes de rejet du bleu de trypan, tandis que les cellules mortes ne peuvent l'éliminer et l'accumulent. Il est donc facile, par observation au microscope, de distinguer les cellules mortes (couleur bleue) des cellules viables (aucune coloration). Ce simple test a permis de confirmer que les cellules MSV-MDCK-INV sont toujours viables à la suite d'un traitement de 4h et 24h à l'orthovanadate de sodium. Ainsi, il a été démontré que l'effet de l'orthovanadate de sodium sur les cellules MSV-MDCK-INV est réversible. On observe à la **figure 23** que les cellules MSV-MDCK-INV commencent à perdre leur phénotype après seulement 4 heures de traitement à l'orthovanadate de sodium 100 μ M et qu'elles deviennent complètement rondes après 24h. Par contre, les cellules retrouvent leur phénotype après une incubation de 24h dans du milieu complet en absence d'orthovanadate de sodium. Cette remarquable récupération des cellules confirme les tests de viabilité et la réversibilité de l'effet de l'orthovanadate de sodium. Ainsi, l'effet de l'orthovanadate de sodium sur l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV dans une matrice de collagène de type I est très significatif. On observe une inhibition de 90 % de l'invasion par rapport au témoin (**Figure 22**).

Figure 22**Effet des traitements au LY294002 et à la wortmannine sur l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV à travers une matrice de collagène de type I.**

L'invasion des cellules MSV-MDCK-INV dans du collagène de type I est mesurée dans des chambres de Boyden modifiées (principe expliqué à la section II.7 matériel et méthodes). Les cellules MSV-MDCK-INV sont traitées pendant 4h avec du LY294002 50 μ M, de la wortmannine 500 nM, du DMSO 0.1% comme témoin pour le LY294002 et la wortmannine, de l'orthovanadate de sodium (Na_3VO_4) 100 μ M et de l'anticorps anti-HGF 5 μ g/ml (traitement préalable de 16h). Ces traitements ont tous été effectués en présence de milieu supplémenté de FBS 10%. Des cellules non traitées ont été testées comme témoin pour le Na_3VO_4 et l'anti-HGF. **(A)** Compilation des différents essais pour chaque condition (moyenne de 5 champs pour chaque essai). $X \pm \text{SEM}$ (n). **(B)** Pour visualiser les effets des différents inhibiteurs sur l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV, une photo représentative de chaque condition est montrée. On observe pour chaque condition un champ du filtre (vu du côté inférieur) avec les cellules MSV-MDCK-INV ayant passé à travers les pores.



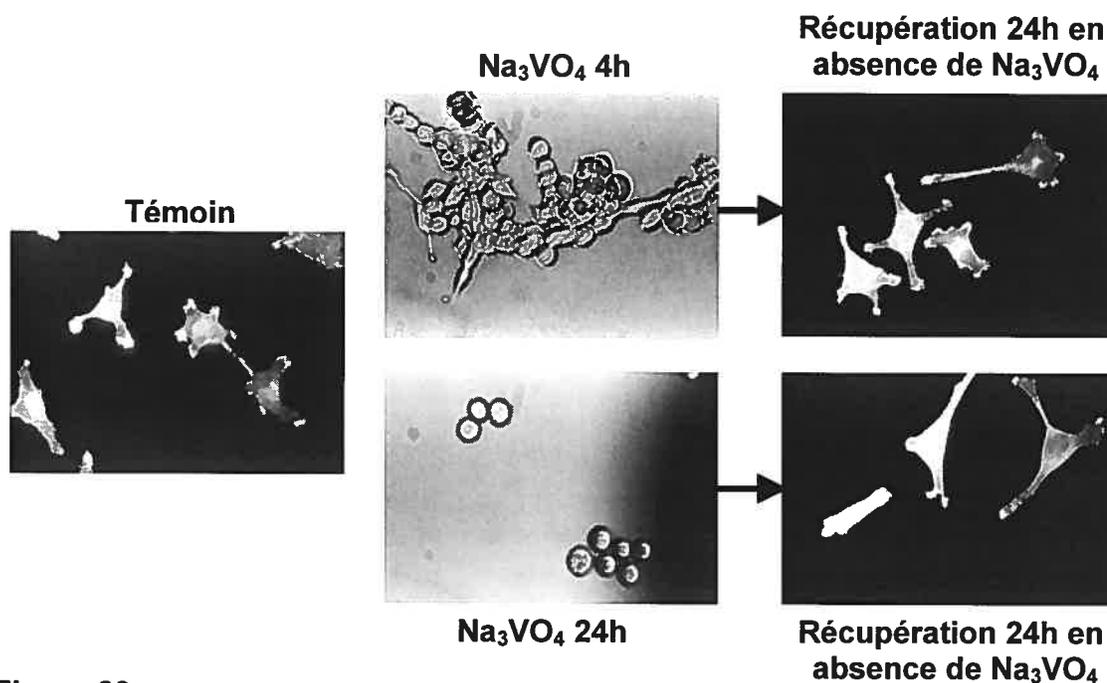


Figure 23

Effet de l'orthovanadate de sodium sur la morphologie et la viabilité des cellules MSV-MDCK-INV.

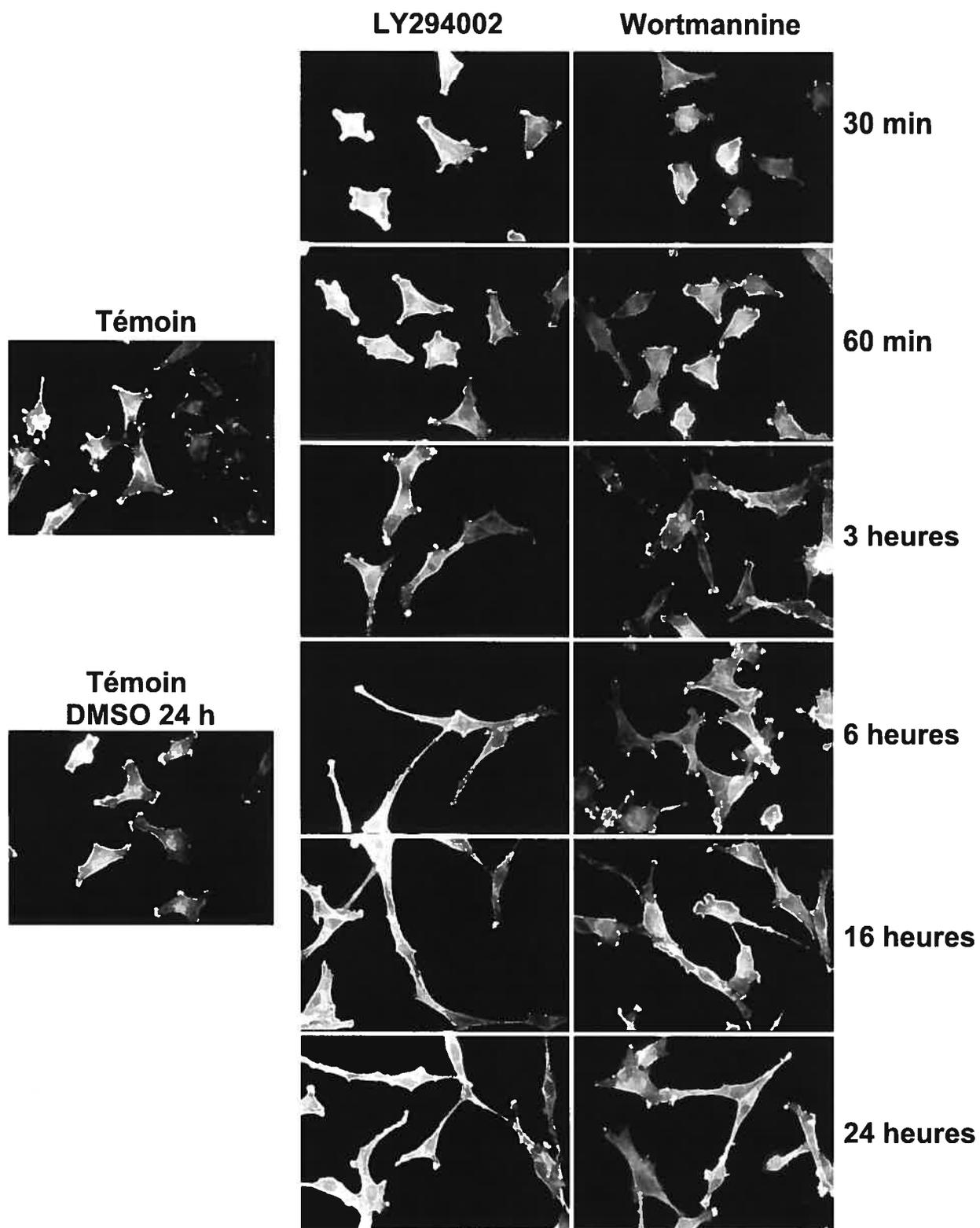
Les cellules MSV-MDCK-INV traitées à l'orthovanadate de sodium (Na_3VO_4) $100 \mu\text{M}$ pendant 4h et 24h ont été photographiées à l'aide d'un microscope à fluorescence (lumière visible) directement dans les pétris de culture cellulaire. Le milieu des cellules MSV-MDCK-INV a été changé par du milieu frais sans Na_3VO_4 et les cellules ont récupéré pendant 24h avant d'être marquées avec la phalloïdine couplée au rouge texan et prises en photos à l'aide d'une caméra couplée à un microscope à fluorescence. Des cellules MSV-MDCK-INV non-traitées ont également été marquées avec la phalloïdine couplée au rouge texan et photographiées pour servir de témoin au Na_3VO_4 . Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences.

III.1.6 Le LY294002 et la wortmannine induisent une réorganisation du cytosquelette d'actine et un changement de morphologie des cellules MSV-MDCK-INV.

Il a été démontré par le groupe du Dr Nabi que les cellules MSV-MDCK-INV possèdent de multiples pseudopodes riches en actine, ne contiennent aucune fibre de stress et font peu de contact intercellulaire (74). Contrairement aux cellules MDCK et MSV-MDCK, les cellules MSV-MDCK-INV montrent une redistribution de l'actine β aux extrémités des pseudopodes (74). Ces pseudopodes riches en actine β expriment également l'actine F et G. Auparavant, à la section III.1.4, il a été observé que les cellules MSV-MDCK-INV s'allongent, développent de longues protusions pseudopodiales et forment des contacts intercellulaires à la suite d'un traitement au LY294002. Il a donc paru nécessaire de vérifier si c'était l'inhibition de la PI3-kinase, et non un effet secondaire du LY294002, qui induisait cette réorganisation du cytosquelette. De plus, afin de vérifier si les inhibiteurs de la PI3-kinase induisait une redistribution de l'actine, un marquage de l'actine-F avec de la phalloïdine couplée au rouge texan a été effectué. On observe à la **figure 24** que les cellules MSV-MDCK-INV commencent à s'allonger après une incubation de 3 heures en présence de LY294002. Par la suite, l'allongement des cellules et des pseudopodes paraît plus évident et prononcé en fonction du temps. L'actine-F des cellules MSV-MDCK-INV traitées au LY294002, pendant 3 heures et moins, est distribuée en périphérie des cellules et de façon diffuse à travers tout le cytoplasme, tout en étant relativement augmentée aux extrémités des pseudopodes. Lorsque les contacts intercellulaires formés par les longs pseudopodes apparaissent, l'accumulation d'actine-F aux extrémités des pseudopodes est préservée mais ceux-ci semblent moins nombreux. Des traitements à la wortmannine induisent le même effet que le LY294002 sur la morphologie et la distribution de l'actine-F des cellules MSV-MDCK-INV. Cependant, l'allongement des cellules et la formation de longs pseudopodes apparaissent à des temps d'incubation plus longs avec la wortmannine (16 heures) qu'avec le LY294002 (6 heures).

Figure 24**Effet du LY294002 et de la wortmannine sur la morphologie et l'organisation du cytosquelette d'actine des cellules MSV-MDCK-INV.**

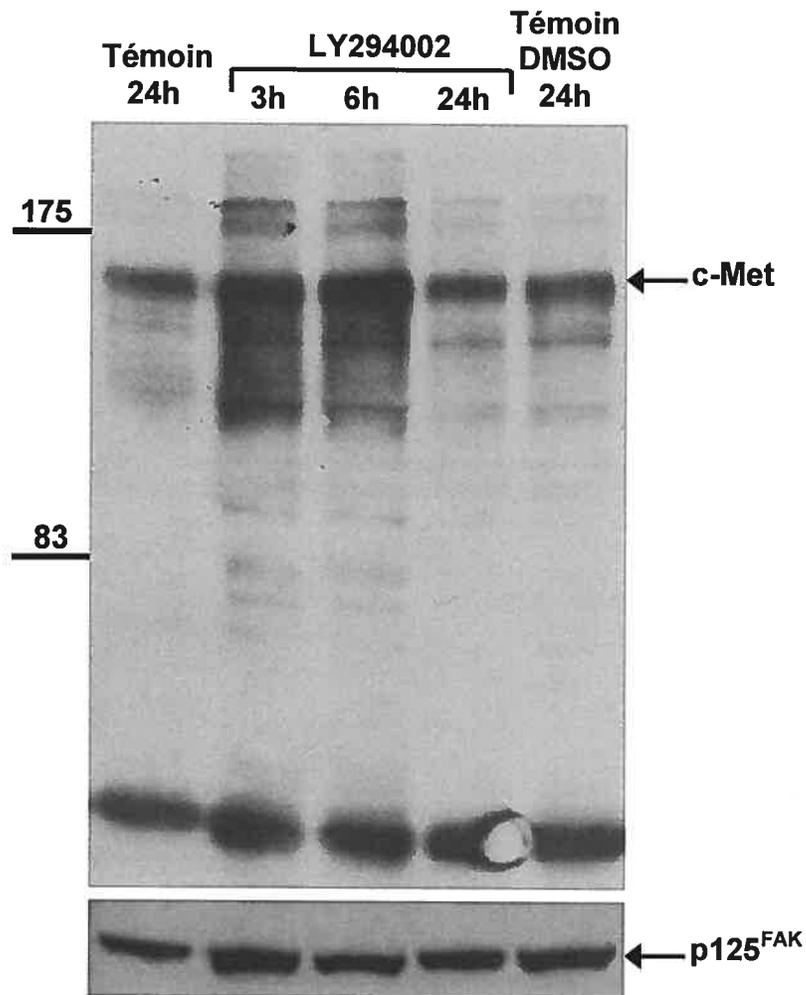
L'actine-F des cellules MSV-MDCK-INV traitées au LY294002 50 μ M et à la wortmannine 500 nM a été marquée avec la phalloïdine couplée au rouge texan et des photos ont été prises avec une caméra couplée au microscope à fluorescence. Des traitements de 30min, 1h, 3h, 6h, 16h et 24h ainsi que des témoins de 24h en présence de DMSO 0.1% ont été effectués. Un champ de cellules non traitées est montré pour comparaison (témoin). Ces résultats sont représentatifs de 9 expériences pour le LY294002 et de 2 expériences pour la wortmannine.



III.2 EFFETS INATTENDUS DU LY294002 SUR LE DEGRÉ DE PHOSPHORYLATION DE C-MET DANS LES CELLULES MSV-MDCK-INV.

Dans le cadre du projet visant à déterminer l'implication de la PI3-kinase dans la motilité accrue des cellules MSV-MDCK-INV, il était très intéressant d'explorer la possibilité que la PI3-kinase ait un effet modulateur direct ou indirect sur le degré de phosphorylation de c-Met, à défaut d'en moduler la synthèse. En effet, l'activation de c-Met par son ligand, le HGF/SF, est impliquée dans la régulation de son expression (1).

Malgré le manque de constance dans la reproductibilité de nos données portant sur l'effet du LY294002 sur le degré de phosphorylation de c-Met, nous croyons qu'il convient de rapporter ces résultats, ne serait-ce que pour documenter le phénomène et pouvoir discuter des hypothèses que ces résultats nous ont inspirées. En effet, ayant d'abord cru à un phénomène important, comme le laissaient supposer nos premiers résultats (**Figure 25**), nous y avons consacré beaucoup de temps et d'énergie. Pendant plus d'un an et demi, nous avons cherché à reproduire nos résultats initiaux et à tester de nombreuses conditions expérimentales afin de les raffiner pour les rendre publiables. Ce n'est qu'après tout ce temps, que les résultats des tests réalisés en vue d'améliorer nos conditions « témoin » ont mis en doute le bien fondé de nos observations positives antérieures. Ceci, combiné à la variabilité de nos résultats et à la rigueur scientifique dont nous devons faire preuve, nous empêche de les présenter avec la conviction qu'ils représentent un phénomène réel. Nous croyons toutefois qu'il vaut la peine d'en faire mention du fait que 1- nous avons fait cette observation à plusieurs reprises, 2- ces résultats ont fait l'objet de deux résumés de communication, dont l'un pour un congrès international, 3- ces observations nous ont entraînés sur une piste de recherche des plus intéressante qui est en cours d'étude dans le laboratoire du Dr Noël et, 4- nous y avons consacré tellement d'énergie et de temps.



Expérience du 31-01-2001

Figure 25

Effet d'un traitement au LY294002 20 μ M sur le degré de phosphorylation sur tyrosine de c-Met.

Le degré de phosphorylation sur les résidus tyrosine de c-Met des cellules MSV-MDCK-INV a été étudié par immunobuvardage de type western avec un anticorps anti-phosphotyrosine sur des lysats totaux (50 μ g de protéines). Les traitements au LY294002 20 μ M ont été réalisés pendant différents temps et en présence de FBS 10%. La protéine p125^{FAK} a été identifiée sur la membrane de nitrocellulose décapée comme témoin de chargement des échantillons.

III.2.1 Le LY294002 induit une augmentation du degré de phosphorylation sur les résidus tyrosine de c-Met dans les cellules MSV-MDCK-INV.

Nos résultats initiaux montrent qu'un traitement au LY294002 20 μM d'une durée de 3 et 6 heures induit une augmentation du degré de phosphorylation sur tyrosine de c-Met, ce qui était très inattendu (**Figure 25**). Tel que décrit précédemment, un immunobuvardage de la protéine p125^{FAK} permet de s'assurer que des quantités équivalentes d'échantillon ont été déposées dans chaque puits. Par la suite, cette augmentation du degré de phosphorylation de c-Met induite par un traitement au LY294002 a été observée à deux reprises (**Tableau 3**). Cependant, il y avait un problème de reproductibilité des résultats. Plusieurs expériences réalisées n'ont pas mené à ces résultats. De plus, d'une expérience à l'autre, l'augmentation du degré de phosphorylation apparaissait à des temps variables, parfois à la suite d'un traitement au LY294002 de 3h et 6h (**Figure 25; Tableau 3 : 31-01-01 et 15-02-01**), et parfois, de 1h et 6h (**Tableau 3 : 15-03-01**). Pendant neuf mois, ces expériences ont été répétées de nombreuses fois et cette augmentation du degré de phosphorylation de c-Met n'a jamais été reproduite (**Tableau 3**). Plusieurs variables de l'expérience ont été soupçonnées: la densité d'ensemencement des cellules, le nombre de passages des cellules étudiées, l'efficacité du LY294002 (le lot et le temps en solution), la technique de préparation des lysats et l'efficacité des inhibiteurs de protéases. De nombreux tests ont donc été réalisés afin de comprendre et de résoudre le problème. Pour raison de simplicité et de clarté, je m'attarderai uniquement aux tests concernant le LY294002. Nous en étions effectivement venus à douter de son efficacité à inhiber la PI3-kinase. Ainsi, les LY294002 de deux compagnies, BIOMOL Research laboratories et Calbiochem, ont été testés afin de déterminer lequel il serait préférable d'utiliser pour nos expériences à venir. Nous avons vu précédemment que l'inhibition de la PI3-kinase induit une diminution de la prolifération cellulaire (105, 131). Ainsi, l'incorporation de ³H-thymidine dans les cellules MSV-MDCK-INV a été mesurée afin de tester l'efficacité du LY294002 des différentes compagnies. La **figure 26** montre que le LY294002 50 μM de

Tableau 3 (partie 1): Résumé des effets du LY294002 sur le degré de phosphorylation sur tyrosine de c-Met.

Date (J-M-A)	Dose LY (µM)	Effet	Effet observé du LY294002 sur le degré de phosphorylation de c-Met.																
			DMSO 15'	LY 15'	DMSO 30'	LY 30'	DMSO 1h	LY 1h	DMSO 3h	LY 3h	DMSO 6h	LY 6h	DMSO 16h	LY 16h	DMSO 24h	LY 24h	Témoin 24h		
31-01-01	20	Oui							↑↑↑								T	=	↓
15-02-01	20	Oui							↑↑↑								T	=	=
15-03-01	20	Oui							↓↓								T	↓	↓↓↓
03-07-01	20	Non						T ¹	= / ↓ ¹	T ²		T ³	↓↓↓ ³				T ⁴	↓ ⁴	= / ↓ ⁴
06-07-01	20	Oui															T	↑↑	
	30	Oui															T	↑	
	50	Oui															T	↑↑↑	
03-10-01	50	Non								T									
	10	Non																	
	20	Non																	
	30	Non																	
	50	Non								T									
7-11-01	10	Oui																	
	20	Non											↑						
	30	Non											=						
	50	non											↓						
16-11-01	10	Non															T	↓↓	
	20	Non																	
	30	Non																	
	50	Non								T									

Référez à la fin de la deuxième partie du tableau 3 pour la légende.

Tableau 3 (partie 2)

Date (J-M-A)	Dose LY (μ M)	Effet	Effet observé du LY294002 sur le degré de phosphorylation de c-Met.																			
			DMSO 15'	LY 15'	DMSO 30'	LY 30'	DMSO 1h	LY 1h	DMSO 3h	LY 3h	DMSO 6h	LY 6h	DMSO 16h	LY 16h	DMSO 24h	LY 24h	Témoïn 24h					
18-12-01	10	Non																				
	20	Non																				
	30	Non																				
	50	Non																				
10-01-02	20	Non																				
	50	Non																				
	100	Non																				
13-02-02	100	Non																				
11-03-02	50	Non																				
25-03-02	50	Oui	=	↑																		
10-04-02	50	Oui	=	=																		
19-04-02	50	Oui	=	=																		
11-06-02	50		T ¹	↑ ¹	T ²	= / ↓ ²	↑	T ³	= / ↓ ³	T ⁴	↓ ⁴	T ⁵	↓ ⁵	T ⁶	↓ ⁶	T ⁷	↓ ⁷					
10-07-02	50		T ¹	= ¹	T ²	↓ ²	↓ ³	T ³	↓ ³	T ⁴	= ⁴	T ⁵	= ⁵	T ⁶	↓ ⁶	T ⁷	↓ ⁷					
07-08-02	50		T ¹	↓ ¹	T ²	↓ ²	↓ ³	T ³	↓ ³	T ⁴	= / ↓ ⁴	T ⁵	↓ ⁵	T ⁶	↓ ⁶	T ⁷	↓ ⁷					
14-08-02	50		T ¹	= ¹	T ²	↓ ²	↓ ³	T ³	= ³	T ⁴	= / ↑ ⁴	T ⁵	= / ↓ ⁵	T ⁶	↑ ⁶	T ⁷	↓ ⁷					

- Quantification d'immunobuvardage de type western anti-phosphotyrosine ou anti-phospho-c-Met.
- T : Condition qui sert de témoin afin de comparer l'intensité du signal.
- ↓, ↑, =, = / ↓ ou = / ↑: Diminution, augmentation, aucun effet, très faible diminution ou très faible augmentation du degré de phosphorylation sur tyrosine de c-Met

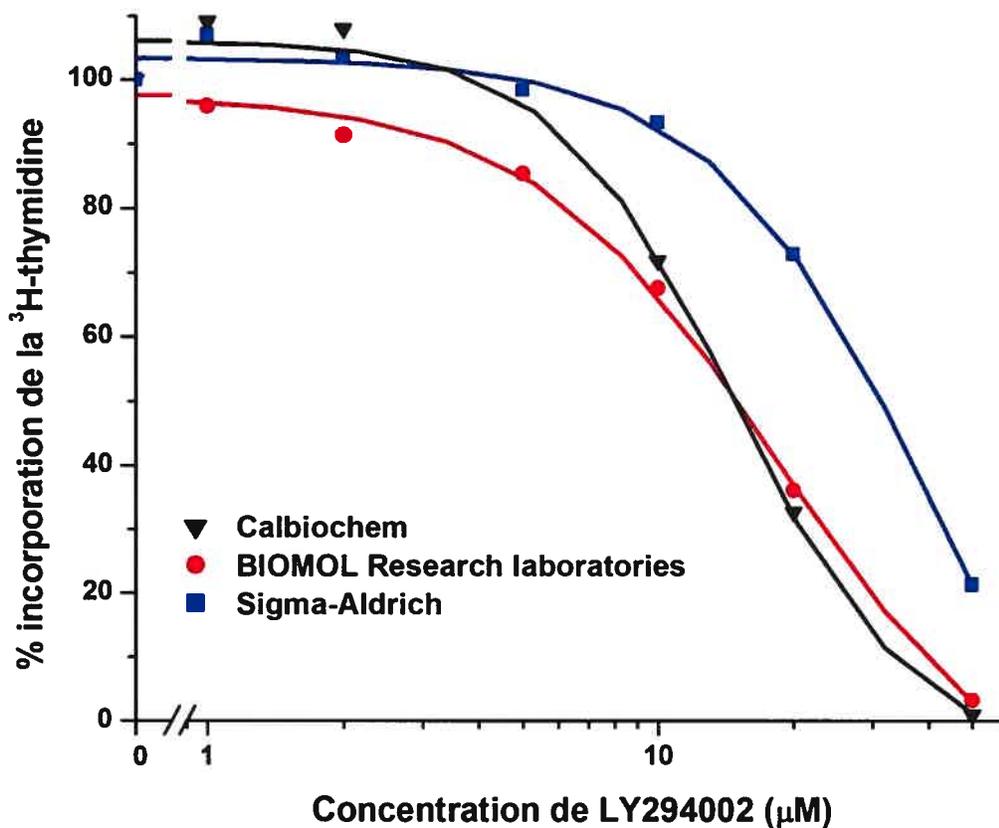


Figure 26

Inhibition de l'incorporation de la ³H-thymidine par le LY294002 de différentes compagnies.

L'incorporation de ³H-thymidine dans les cellules MSV-MDCK-INV a été mesurée à la suite d'un traitement de 16h en présence de différentes concentrations de LY294002 et en présence de FBS 10%. Le LY294002 en provenance de 3 compagnies a été testé: Sigma-Aldrich, Calbiochem et BIOMOL Research laboratories.

chez BIOMOL et Calbiochem inhibe la prolifération des cellules MSV-MDCK-INV de 100%, tandis que le LY294002 de chez Sigma l'inhibe de 78%. Ceci pourrait expliquer le manque de reproductibilité de nos résultats. Nous avons choisi d'utiliser celui de chez BIOMOL vu la bonne renommée de cette compagnie. Il est important de mentionner qu'une fois en solution, le LY294002 était bon pour une durée de 3 mois et que les expériences présentées à la section III.1 ont toutes été effectuées avec du LY294002 de chez BIOMOL.

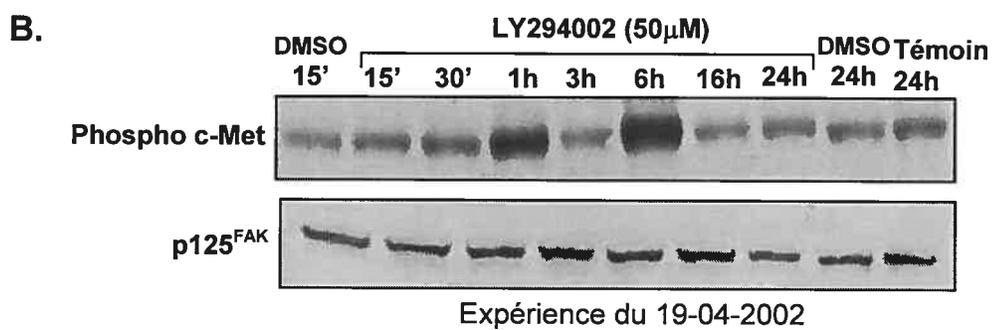
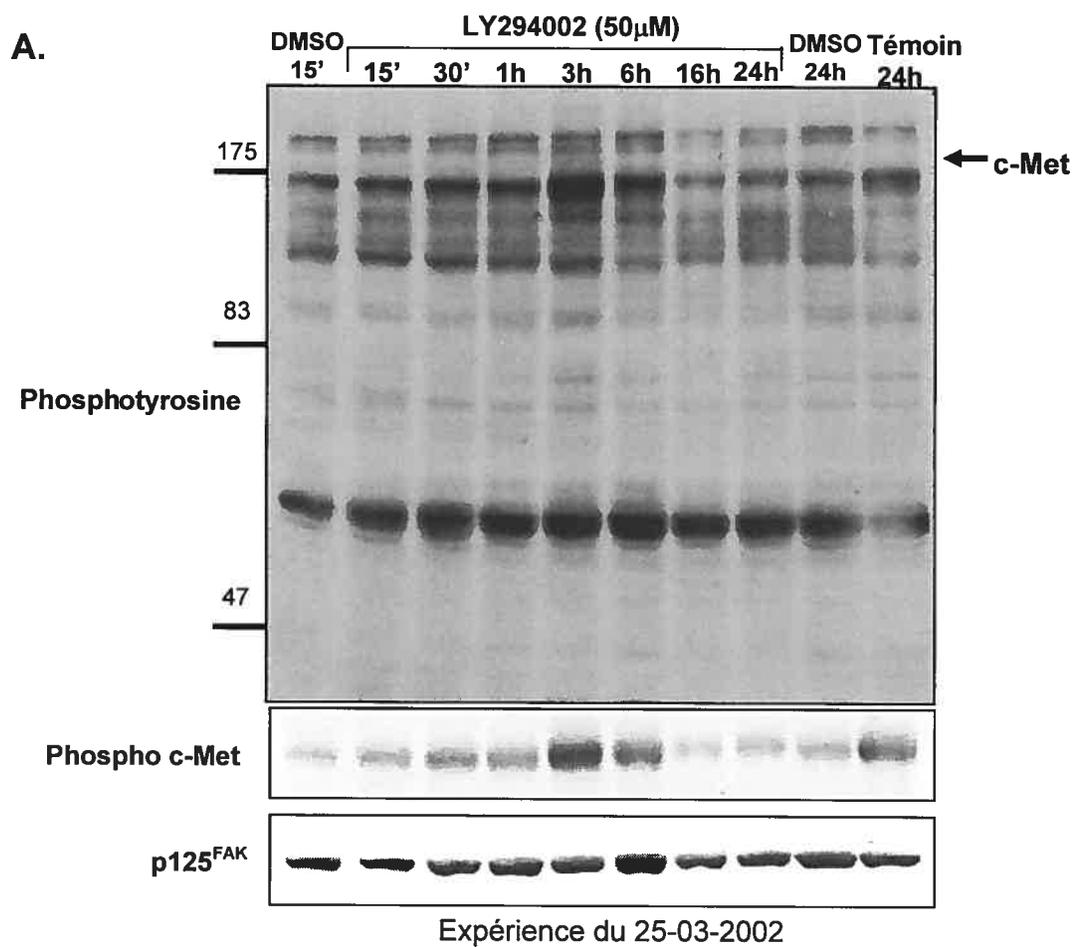
L'augmentation du degré de phosphorylation de c-Met observée initialement sur l'immunobuvardage anti-phosphotyrosine (LY294002 de chez Sigma-Aldrich) a alors été reproduite en utilisant le LY294002 de chez BIOMOL, à la fois, sur l'immunobuvardage anti-phosphotyrosine et anti-phospho-c-Met (**Figure 27**). Dans les deux cas, cependant, l'augmentation du degré de phosphorylation de c-Met apparaissait encore à des temps variables d'une expérience à l'autre. On observe ainsi à la **figure 27** que l'augmentation du degré de phosphorylation de c-Met est visible après un traitement au LY294002 de 3h et 6h (**Figure 27A**) et parfois à la suite d'un traitement de 1h et 6h (**Figure 27B**). Comme précédemment, l'identification de la protéine p125^{FAK} permet de s'assurer que l'augmentation du degré de phosphorylation de c-Met n'est pas dû à une erreur dans le dépôt des échantillons.

III.2.2 Comparaison des effets du DMSO et du LY294002 sur le degré de phosphorylation de c-Met.

Dans le but de mieux contrôler la variabilité des effets du traitement au LY294002 sur le degré de phosphorylation de c-Met, un témoin DMSO pour chaque temps de traitement a été effectué. On observe à la **figure 28A** que le LY294002 n'induit aucune augmentation du degré de phosphorylation de c-Met lorsqu'on le compare à son témoin DMSO respectif. Dans les deux expériences réalisées, on observe plutôt une diminution minimale du degré de phosphorylation de c-Met à la suite des traitements au LY294002. On remarque au contraire que le DMSO induit une augmentation du degré de phosphorylation de c-Met en fonction du temps de traitement.

Figure 27**Effet d'un traitement au LY294002 50 μ M sur le degré de phosphorylation sur tyrosine de c-Met.**

(A) Expérience du 25-03-2002. Le degré de phosphorylation sur les résidus tyrosine de toutes les protéines (panneau du haut) et le degré de phosphorylation sur les tyrosines en position 1230,1234,1235 ($Y^{1230,1234,1235}$) de c-Met (panneau du centre) des cellules MSV-MDCK-INV ont été étudiés par immunobuvardage de type western avec des anticorps spécifiques. Les lysats totaux (50 μ g de protéines) ont été préparés à la suite de traitements au LY294002 50 μ M de la compagnie BIOMOL pendant différents temps et en présence de FBS 10%. La protéine p125^{FAK} a été identifiée sur la membrane de nitrocellulose décapée comme témoin de chargement des échantillons (panneau du bas). **(B) Expérience du 19-04-2002.** Le degré de phosphorylation sur les résidus tyrosine de c-Met des cellules MSV-MDCK-INV a été étudié dans les mêmes conditions avec l'anticorps anti-phospho-c-Met ($Y^{1230,1234,1235}$). Comme précédemment, la protéine p125^{FAK} a été identifiée comme témoin de chargement des échantillons.



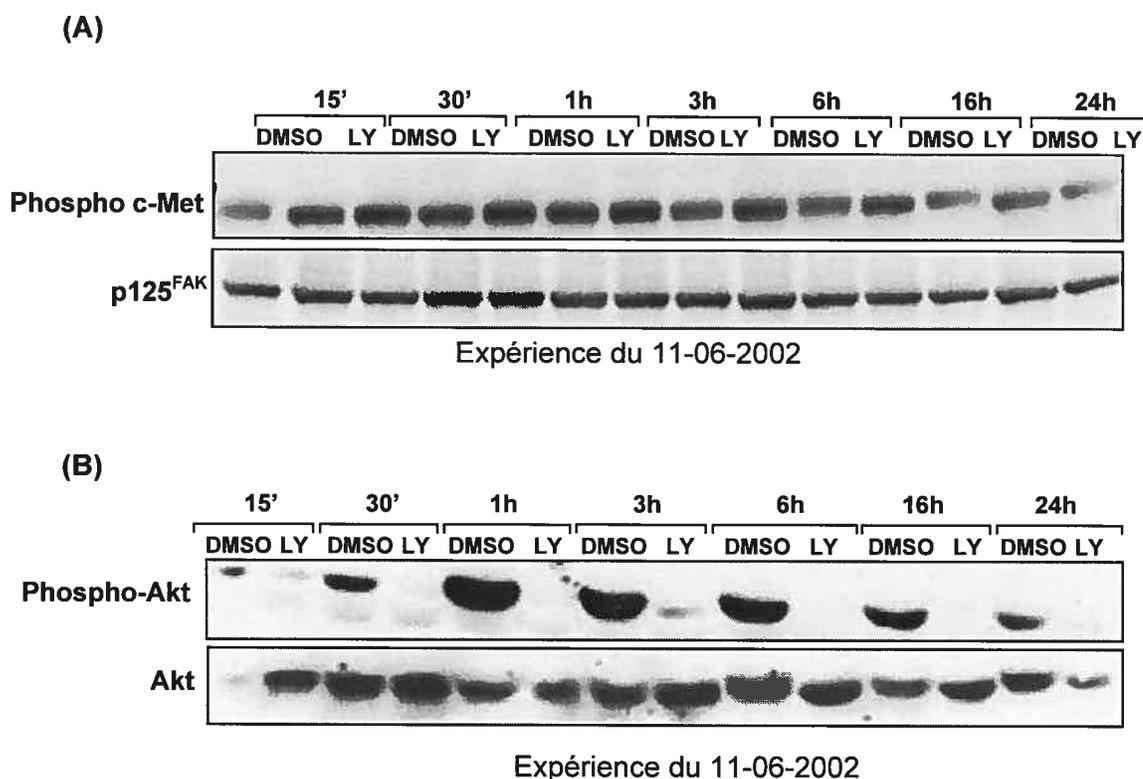


Figure 28

Effet d'un traitement au LY294002 50 μ M et au DMSO 0.05% (témoin) sur le degré de phosphorylation sur les résidus tyrosine de c-Met.

Expérience du 11-06-2002. (A) Le degré de phosphorylation sur les résidus tyrosine de c-Met des cellules MSV-MDCK-INV a été étudié par immunobuvardage de type western sur des lysats totaux (50 μ g de protéines) avec l'anticorps anti-phospho-c-Met ($Y^{1230,1234,1235}$). Les traitements au LY294002 50 μ M de chez BIOMOL ou au DMSO 0.05% (témoin) ont été réalisés pendant différent temps et en présence de FBS 10%. La protéine p125^{FAK} a été identifiée sur la membrane de nitrocellulose décapée comme témoin de chargement des échantillons. (B) Sur les même lysats cellulaires, le degré de phosphorylation de la protéine Akt a été étudié par immunobuvardage de type western avec l'anticorps anti-phospho-Akt-Ser⁴⁷³. La protéine Akt a été identifiée sur la membrane de nitrocellulose décapée comme témoin de chargement des échantillons.

Ceci pourrait expliquer l'augmentation de signal observée initialement et le manque de reproductibilité de nos résultats. Il est toutefois difficile d'expliquer pourquoi, dans les présentes expériences, le LY294002 n'a pas au moins le même effet que le DMSO. Pour vérifier que le LY294002 inhibe réellement la PI3-kinase, le degré de phosphorylation de la protéine Akt a été étudié. On observe à la **figure 28B** que le LY294002 induit une déphosphorylation de la protéine Akt, confirmant que le LY294002 inhibe la PI3-kinase dans ces conditions. Toutes ces observations et les résultats obtenus, résumés dans le **tableau 3** nous amènent à conclure, qu'en dépit des résultats initiaux qui paraissaient forts intéressants, il est peu probable qu'un traitement prolongé au LY294002 induise une augmentation du degré de phosphorylation de c-Met dans les cellules MSV-MDCK-INV. Les résultats présentés suggèrent plutôt que l'effet observé n'était qu'un effet du DMSO.

IV. DISCUSSION

Notre objectif premier était d'étudier les voies de signalisation possiblement associées au récepteur HGF constitutivement actif et au phénotype motile et invasif des cellules MSV-MDCK-INV (149). Plusieurs groupes de recherche ont démontré que le HGF induit une augmentation de la motilité et de l'invasivité de certains types de cellules cancéreuses via la voie de la PI3-kinase (68, 88, 92). Il a donc paru envisageable que la voie de la PI3-kinase puisse être impliquée dans la motilité accrue des cellules MSV-MDCK-INV. Pour cette raison, nous avons décidé d'investiguer cette voie de signalisation plutôt qu'une autre. Le but de mon projet était donc d'étudier l'effet des inhibiteurs de la PI3-kinase, le LY294002 et la wortmannine, sur la motilité (aléatoire et directionnelle), la capacité d'invasion, la morphologie, l'organisation du cytosquelette d'actine et l'activation de c-Met dans les cellules MSV-MDCK-INV.

IV.1 LA PI3-KINASE EST IMPLIQUÉE DANS LA MOTILITÉ ET L'INVASION DES CELLULES MSV-MDCK-INV.

IV.1.1 La PI3-kinase module la motilité et la capacité d'invasion des cellules MSV-MDCK-INV.

Nous avons montré que la capacité des cellules MSV-MDCK-INV à envahir une plaie (motilité directionnelle) est inhibée d'environ 50 % par un traitement au LY294002 (**Figure 19**). Il est important de mentionner que ce pourcentage d'inhibition de la motilité n'est qu'une estimation. Nous ne disposons pas du matériel adéquat pour mesurer cette inhibition de façon précise. La largeur des plaies a été mesurée avec une simple règle directement sur les photographies. Le degré d'inhibition observé sur cette photographie est toutefois le reflet de l'observation visuelle de plusieurs plaies, réalisées à diverses reprises. Pour obtenir des données quantitatives précises, il aurait fallu observer la guérison de la plaie par vidéomicroscopie en mode *time-lapse* et par la suite, mesurer par des vecteurs le déplacement des cellules (96). L'accès à cet équipement était malheureusement devenu

impossible. Une autre méthode possible consiste à faire une plaie circulaire (sans cellule à l'intérieur du cercle) à l'aide d'un outil spécial qui marque l'endroit original de la rayure et à calculer ensuite de façon aléatoire le nombre de cellules qui ont traversé cette ligne (107).

Nous avons aussi montré que la motilité aléatoire des cellules MSV-MDCK-INV est inhibée partiellement et significativement par un traitement au LY294002 (**Figure 20** et **Film 1**). Ces résultats, ainsi que ceux obtenus par l'étude de la motilité directionnelle, suggèrent une implication directe de la PI3-kinase dans la motilité accrue des cellules MSV-MDCK-INV. À ce jour, plusieurs groupes de recherche ont démontré que la PI3-kinase joue un rôle important dans la motilité de plusieurs types cellulaires (24, 81, 96). Nobes et al. ont montré qu'un traitement au LY294002 20 μM inhibe de 25% la réparation de la plaie par des fibroblastes embryonnaires de rat (motilité directionnelle) (96). Il a également été démontré par Chandrasekher et al. que l'inhibition de la PI3-kinase par la wortmannine 125 nM inhibe de 30% le recouvrement de la plaie par des cellules épithéliales de la cornée préalablement stimulées au HGF (motilité directionnelle) (24). Quant à eux, Maulik et al. ont observé, par vidéomicroscopie en mode *time-lapse*, qu'un traitement au LY294002 50 μM diminue la vitesse de mouvement des cellules SCLC (*small cell lung cancer*) ayant un récepteur HGF sur-exprimé (motilité aléatoire) (81). Nos observations sont en accord avec ces résultats obtenus avec différents types cellulaires, la différence étant que dans notre modèle cellulaire, le HGF est sécrété par les cellules et non ajouté de façon exogène.

Il a également été établi que le LY294002 et la wortmannine inhibent l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV dans une matrice de collagène de type I, respectivement de 53% et 23% (**Figure 22**). L'implication de la PI3-kinase dans l'invasion cellulaire a par ailleurs été démontrée par plusieurs groupes de recherche. Voici les faits saillants de leurs découvertes :

- 1) Nakamura et al. ont montré que la wortmannine 100 nM et le LY294002 50 μM inhibent chacun d'environ 85% l'invasion par des cellules de

carcinome rénal (VMRC-RCW) d'une matrice de collagène de type I. Ces cellules VMRC-RCW possèdent un récepteur HGF constitutivement actif et une motilité accrue (88).

- 2) Kermorgant et al. ont prouvé que la wortmannine inhibe de 60% l'invasion induite par le HGF des cellules Caco-2 (*colonic cancer epithelial cell*) à travers du Matrigel® (68).
- 3) Nakanishi et al. ont démontré que la wortmannine 30 nM supprime à 100% l'effet chémoattractant du HGF chez des cellules HCC (*Hepatocellular carcinoma*) migrant à travers du Matrigel® (92).
- 4) Keely et al. ont observé que des cellules épithéliales mammaires transfectées avec la sous-unité catalytique p110 mutée (K227E) (l'activité PI3-kinase étant trois fois supérieure au témoin) possède une capacité à envahir une matrice de collagène 4 fois supérieure au témoin (67).

Cependant, nous observons une différence significative de 30% entre l'inhibition de l'invasion induite par le LY294002 (53%) et la wortmannine (23%) (**Figure 22**). La wortmannine 500 nM n'induit pas une inhibition complète de la PI3-kinase dans les cellules MSV-MDCK-INV puisque le degré de phosphorylation de la protéine Akt n'est pas complètement aboli dans ces conditions (**Figure 21**). Cette inhibition partielle de la PI3-kinase par la wortmannine à des concentrations élevées a également été trouvée par Royal et al. (113). Ce groupe de recherche affirme que la wortmannine, à des concentrations de 100 nM et 1 μ M, inhibe l'activité de la PI3-kinase des cellules MDCK stimulées par le HGF de seulement 35% et 65% respectivement (113). Ainsi, l'inhibition partielle de la PI3-kinase par la wortmannine dans notre modèle cellulaire pourrait expliquer cet écart d'inhibition de l'invasion de 30% observé entre le LY294002 et la wortmannine

Il peut paraître étonnant d'observer que le DMSO inhibe l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV d'environ 30% comparativement au témoin sans DMSO (**Figure 22**). Cet effet significatif du DMSO n'est pas si surprenant lorsqu'on porte attention aux nombreux effets non-spécifiques du DMSO rapportés dans la littérature, mais encore peu connus de la communauté

scientifique (120, 163). Ces effets du DMSO sont discutés en détail dans les sections IV.3.2 et IV.4 de cette discussion.

IV.1.2 La PI3-kinase n'est pas constitutivement active dans les cellules MSV-MDCK-INV.

Le haut niveau d'activité de la protéine Akt dans les cellules MSV-MDCK-INV, comparativement aux cellules parentales MDCK et MSV-MDCK, suggère que la PI3-kinase est impliquée dans la motilité accrue de ces cellules (**Figure 16**). Une explication possible, inspirée par ces résultats, serait que la PI3-kinase soit constitutivement active dans les cellules MSV-MDCK-INV étant donné l'activation constitutive de c-Met. Ceci pourrait expliquer la motilité accrue des cellules MSV-MDCK-INV. Nakamura et al. travaillent avec un modèle cellulaire semblable au nôtre, les cellules VMRC-RCW (88). Celles-ci possèdent un récepteur HGF constitutivement actif et une motilité accrue. Ce groupe de recherche a démontré qu'un traitement au HGF n'active pas davantage la PI3-kinase et que le LY294002 et la wortmannine inhibent fortement le degré d'activité de la PI3-kinase des cellules VMRC-RCW. Ces résultats indiquent que la PI3-kinase est active de façon chronique dans ces cellules (88). Cependant, des résultats récents obtenus dans le laboratoire du Dr Noël par Julie Vadnais, démontrent que la PI3-kinase des cellules MSV-MDCK-INV n'est pas constitutivement active. Au contraire, la PI3-kinase est active (phosphorylation de Akt) uniquement en présence de sérum contrairement à c-Met qui est actif en absence et en présence de sérum (**Figure 29A**). Le sérum doit contenir un ou des facteurs importants pour l'activation de la PI3-kinase. Nous concluons de ces expériences que l'activation constitutive de c-Met n'est pas suffisante et une stimulation exogène par un facteur quelconque présent dans le sérum est essentielle à activer la PI3-Kinase dans les cellules MSV-MDCK-INV.

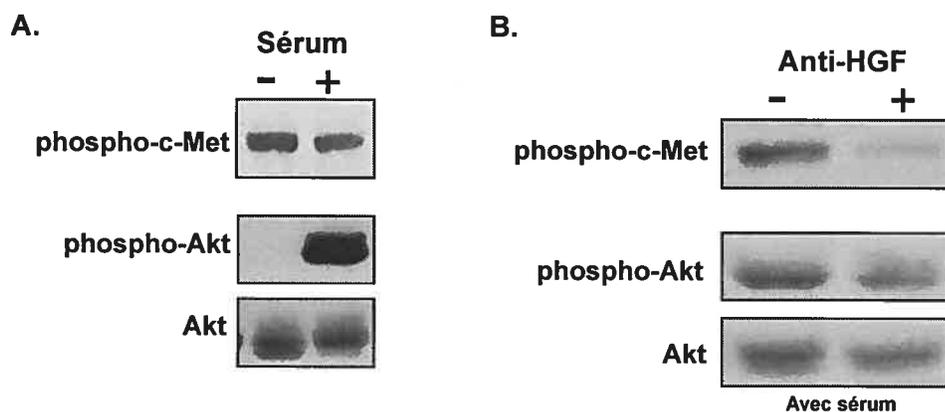


Figure 29

Effet du sérum et de l'anti-HGF sur le degré de phosphorylation de Akt et de c-Met des cellules MSV-MDCK-INV.

(A) Le degré de phosphorylation de Akt et c-Met des cellules MSV-MDCK-INV a été étudié par immunobuvardage de type western avec les anticorps anti-phospho-Akt-Ser⁴⁷³ et anti-phospho-c-Met (Y^{1230,1234,1235}) sur des lysats totaux. La protéine Akt a été identifiée sur la membrane de nitrocellulose décapée comme témoin de chargement des échantillons. Les cellules MSV-MDCK-INV ont été mises en culture pendant 24 heures en présence de sérum 10%. Par la suite, les cellules ont été privées de sérum pendant 24 heures et du sérum 10% a été ajouté ou non pour une période de 10 minutes. (B) Le degré de phosphorylation de la protéine Akt et c-Met des cellules MSV-MDCK-INV a été étudié par immunobuvardage de type western avec les anticorps anti-phospho-Akt-Ser⁴⁷³ et anti-phospho-c-Met (Y^{1230,1234,1235}) sur des lysats totaux. Les cellules MSV-MDCK-INV ont été mises en culture pendant 24 heures en présence de sérum 10%. Par la suite, le milieu de culture a été changé par du milieu sans sérum avec ou sans anticorps anti-HGF 10 µg/ml pour une durée de 24h et du sérum 10% a été ajouté pour une période de 10 minutes. Comme précédemment, la protéine Akt a été identifiée comme témoin de chargement des échantillons. Ces résultats préliminaires (n=2), ont été effectués par la technicienne du laboratoire du Dr Noël, Julie Vadnais, après mon départ du laboratoire.

IV.1.3 Le rôle de la PI3-kinase dans la motilité et l'invasion, indépendantes et dépendantes de c-Met constitutivement actif, n'est pas bien défini dans les cellules MSV-MDCK-INV.

La PI3-kinase est active uniquement en présence de sérum dans les cellules MSV-MDCK-INV, ce qui suggère une très faible implication de la PI3-kinase dans la motilité et l'invasion induites par c-Met constitutivement actif. Afin de vérifier cette hypothèse et de bien faire la distinction entre l'implication de la PI3-kinase dans la motilité et l'invasion dépendantes et indépendantes de c-Met constitutivement actif, il était important d'étudier l'activité de la PI3-kinase en présence d'anti-HGF et de sérum, c'est-à-dire en condition où c-Met serait minimalement activé. Ce protocole est important puisque, contrairement à la plupart des recherches visant à déterminer le rôle de la PI3-kinase dans la motilité induite par le HGF, les cellules MSV-MDCK-INV ont un récepteur HGF constitutivement actif et n'ont pas besoin d'une stimulation exogène par du HGF; elles sont continuellement activées par la sécrétion autocrine de HGF. Ainsi, il est très difficile dans notre modèle cellulaire d'étudier uniquement l'implication de la PI3-kinase (ou d'une autre voie de signalisation) dans la motilité et l'invasion induites uniquement par le HGF. Par ailleurs, la motilité accrue des cellules MSV-MDCK-INV comparativement aux cellules MSV-MDCK n'est pas exclusivement due à c-Met constitutivement actif et plusieurs autres facteurs peuvent être impliqués dans cette motilité (149). La transformation des cellules MDCK par le virus du sarcome de Moloney (cellules MSV-MDCK) a certainement causé des modifications au niveau cellulaire autres que l'activation constitutive de c-Met que l'on retrouve dans une sous-population de cette lignée cellulaire hétérogène. Ceci pourrait expliquer que la stimulation des cellules MSV-MDCK par le HGF induit une forte augmentation du degré de phosphorylation de c-Met sans toutefois modifier la motilité aléatoire de ces cellules (149). Il est possible que ces modifications soient également impliquées dans la motilité accrue des cellules MSV-MDCK-INV sélectionnées à partir des cellules MSV-MDCK.

Il est donc important d'étudier l'implication de la PI3-kinase dans la motilité et l'invasion dépendantes de c-Met constitutivement actif en étudiant

l'effet de l'anti-HGF en présence de sérum sur le degré de phosphorylation de la protéine Akt. Les résultats obtenus par Julie Vadnais montrent que l'anti-HGF induit, tel qu'attendu, une diminution importante du degré de phosphorylation de c-Met en présence de sérum (**Figure 29B**). Dans ces conditions, le degré de phosphorylation de Akt n'est que faiblement diminué (**Figure 29B**). Ces résultats préliminaires suggèrent que la contribution de la PI3-kinase à la motilité et l'invasion dépendantes de c-Met des cellules MSV-MDCK-INV est minime. Il serait essentiel de vérifier que la faible stimulation de la PI3-kinase induite par c-Met constitutivement actif est réellement impliquée dans la motilité et l'invasion cellulaires. Pour ce faire, il faudrait étudier l'effet du LY294002 sur la capacité d'invasion des cellules MSV-MDCK-INV pré-traitées à l'anti-HGF. La différence entre l'inhibition de l'invasion induite par l'anti-HGF en présence et en absence de LY294002 représenterait le degré d'implication de la PI3-kinase dans l'invasion indépendante de c-Met. La soustraction de cette contribution à celle de la PI3-kinase totale (traitement au LY294002 seul) représenterait l'implication de la PI3-kinase dans la motilité dépendante de c-Met.

Il est important de mentionner que l'anti-HGF inhibe à des degrés différents la motilité aléatoire (149) et l'invasion (**Figure 22**) des cellules MSV-MDCK-INV. L'anti-HGF inhibe fortement la motilité aléatoire des cellules MSV-MDCK-INV (149). Un très faible mouvement des cellules est distinguable après 48 heures d'enregistrement en présence d'anti-HGF 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (149). Par contre, l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV à travers une matrice de collagène est inhibée de seulement 76% à la suite d'un traitement de 4 heures avec l'anti-HGF 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (les cellules avaient toutefois été pré-traitées avec de l'anti-HGF pendant 24 h avant trypsination) (**Figure 22**). La variable « temps » semble jouer un rôle important dans l'effet de l'anti-HGF sur la motilité et l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV. Cependant, on peut tout de même affirmer, avec suffisamment de confiance, qu'un mouvement résiduel des cellules MSV-MDCK-INV est toujours observé à la suite d'un traitement prolongé avec l'anti-HGF. L'amplitude de ce mouvement dépend du temps de traitement. Ainsi, ces résultats confirment l'existence d'une motilité indépendante de c-Met dans les cellules MSV-

MDCK-INV. Par contre, il serait très difficile de vérifier l'implication de la PI3-kinase dans la motilité aléatoire dépendante et indépendante de c-Met dans les cellules MSV-MDCK-INV puisque nous ne disposons pas de mesures quantitatives. Il serait toutefois intéressant d'étudier l'effet du LY294002 sur des cellules pré-traitées avec l'anti-HGF et l'effet de l'anti-HGF seul sur la motilité directionnelle (technique de la plaie).

IV.1.4 Perspectives : Voies de signalisation et/ou protéines impliquées dans la motilité et l'invasion cellulaires autre que la PI3-kinase.

Il est évident que une ou plusieurs autres voies de signalisation sont impliquées dans la motilité et l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV puisque le LY294002 n'inhibe pas complètement la motilité et l'invasion de ces cellules (environ 50%). Plusieurs groupes de recherche ont démontré l'implication de nombreuses voies de signalisation dans l'invasion cellulaire (20, 64, 68). Karihaloo et al. ont montré que le PD098059 50 μ M, un inhibiteur de l'activation de MEK1/2, inhibe de 75% l'invasion des cellules épithéliales rénales induite par le HGF. Par ailleurs, le U0126 20 μ M, un inhibiteur de la forme active et inactive de MEK1/2, prévient complètement l'invasion induite par le HGF. Le même laboratoire a démontré que la wortmannine 100 nM inhibe de 60% l'invasion induite par le HGF, tandis que le U73122, un inhibiteur des PLC, inhibe complètement l'invasion induite par le HGF. Ces résultats indiquent qu'une activation coordonnée de la PI3-kinase, de la PLC γ et des MAP kinases par c-Met activé est nécessaire à la promotion du caractère invasif de ce type de cellules (64).

Des résultats préliminaires obtenus après mon départ du laboratoire, indiquent que la voie des MAP kinases est aussi impliquée dans la motilité des cellules MSV-MDCK-INV. Le U0126 inhibe l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV à travers une matrice de collagène de type I de 28% (n=2). De plus, l'inhibition de la PI3-kinase et des MAP kinases, par l'ajout simultané de LY294002 et de U0126, inhibe l'invasion de 71.5% (n=3). L'inhibition de la motilité par le LY294002 et le U0126 est additive puisque le LY294002 et le U0126 seuls inhibent l'invasion de 52% et 28% respectivement. On ne

retrouve dans la littérature que quelques exemples de travaux qui ont porté à la fois sur l'étude de l'implication des MAP kinases et de la PI3-kinase dans l'invasion cellulaire (29, 64, 148). Ueoka et al. ont observé une implication des MAP kinases et de la PI3-kinase dans l'invasivité et la motilité induites par le HGF des cellules cancéreuses d'ovaires (148). Delehedde et al. ont démontré que la wortmannine 100 nM prévient totalement l'invasion des fibroblastes mammaires de rat induite par le HGF, tandis que le PD098059 50 μ M, un inhibiteur de la cascade MEK-ERK1/2, inhibe l'invasion induite par le HGF de 64% (29). Il serait donc également intéressant de déterminer le degré d'implication de la voie des MAP Kinases (raf-MEK-ERK) dans la motilité et l'invasion dépendantes et indépendantes de c-Met dans les cellules MSV-MDCK-INV via l'utilisation simultanée des inhibiteurs des MAP Kinases et de l'anti-HGF.

Afin de mieux caractériser et comprendre le phénomène de motilité et d'invasion des cellules MSV-MDCK-INV, il serait également très important d'étudier la voie des PLC γ -PKC. En effet, le U73122, un inhibiteur des PLC, prévient complètement l'invasion des cellules épithéliales rénales induite par le HGF (64). Il a également été démontré que certains isoformes conventionnels de la PKC sont impliqués dans la motilité et l'invasion des cellules métastatiques. Sullivan et al. ont établi que l'inhibition de la PKC α par les UV ou le dequalinium induit une inhibition de 40 à 60% de l'invasion et une inhibition complète de la motilité des cellules de mélanome (141). Par ailleurs, le groupe de Sanz-Navares a démontré que l'expression de la PKC ζ , une PKC atypique, supprime la migration des cellules de mélanome (121). Il semble donc que les différents isoformes de PKC régulent différemment la capacité motile de certaines cellules tumorales. Il serait donc très intéressant d'aborder le rôle de celles-ci dans la motilité aléatoire et directionnelle des MSV-MDCK-INV ainsi que dans le phénomène d'invasion cellulaire.

De plus, il serait très intéressant d'étudier quelles voies de signalisation régulent les petites protéines GTPases cdc42, Rac et Rho

puisqu'elles sont connues pour moduler la motilité et l'invasion cellulaires via leur implication dans l'homéostasie du cytosquelette d'actine (Voir **Figure 11**) (96). Tout d'abord, il faudrait vérifier l'expression et l'activité de ces protéines dans les trois lignées cellulaires MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV. Par la suite, il faudrait tester les différents inhibiteurs des voies de signalisation sur le degré d'activité de ces GTPases cdc42, Rac et Rho. Ceci permettrait de connaître quelles voies de signalisation régulent la motilité et l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV via les protéines cdc42, Rac et Rho. Keely et al. ont démontré que cdc42 et Rac1 sont impliqués dans la motilité et l'invasion des cellules épithéliales mammaires via la PI3-kinase (67).

L'étude des métalloprotéases (MMP) et des voies de signalisation associées à leur régulation dans les cellules MSV-MDCK-INV est aussi un projet captivant. Il est connu que l'invasion cellulaire nécessite une dégradation de la matrice extracellulaire par les MMPs (142) et que le HGF stimule la production des MMPs dans certains cancers (8, 41, 68). Kermorgant et al. ont observé que le HGF induit une augmentation de la capacité d'invasion des cellules de cancer du colon (Caco-2). Cette invasivité accrue est associée à une production exagérée de MMPs via les voies de signalisation de la PI3-kinase et de la PKC. Récemment, une nouvelle étudiante en maîtrise dans le laboratoire du Dr Noël a commencé un projet concernant les MMP impliquées dans la capacité invasive des cellules MSV-MDCK-INV.

Il serait également très intéressant d'étudier l'implication des phosphatases dans la régulation de la motilité et l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV. Il est connu que plusieurs protéines à activité tyrosine phosphatase telles que SHP-2, PTEN, PTP-PEST (*protein tyrosine phosphatase PEST*), PTP α (*protein tyrosine phosphatase alpha*), PTP1B (*protein tyrosine phosphatase 1B*) et bien d'autres jouent un rôle important dans la migration cellulaire (revue par (6)). Il a également été démontré par le groupe de Villa-Moruzzi que la phosphatase PTP-S (*protein tyrosine phosphatase S*) se lie au domaine juxtamembranaire de c-Met (154). Un autre groupe de recherche a démontré que la phosphatase SHP-2 est

requis pour l'activation soutenue de ERK induite par c-Met (80). Ce projet est aussi présentement à l'étude dans le laboratoire du Dr Noël et vise à déterminer si, dans les cellules de reins de chien, le degré de phosphorylation sur les résidus tyrosine de c-Met est aussi régulé par l'activité de SHP-2. En fait, le Dr Noël cherche à déterminer si le fort degré de phosphorylation de c-Met dans les cellules MSV-MDCK-INV est en partie ou principalement dû à un défaut de couplage ou d'activité entre SHP-2 et c-Met. Une information intéressante sera tirée de la comparaison des trois lignées cellulaires MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV.

La voie de signalisation activée par le TGF- β 1 (*transforming growth factor-beta 1*), connue pour contrôler la prolifération, la différenciation, l'invasion et la motilité cellulaire, est également impliquée dans le développement de certains cancers lorsque cette voie est dérégulée (revue par (127)). Le groupe de Tse et al. a démontré que le TGF- β 1 prévient complètement l'effet stimulant du HGF sur la motilité et l'invasion des trophoblastes, cellules extra-embryonnaires qui fixent l'embryon à la paroi utérine (145). Le mécanisme par lequel le TGF β règle l'invasion et l'activité de c-Met n'est pas bien défini. Il serait donc très intéressant d'étudier l'implication du facteur TGF- β 1 sur la motilité et l'invasion des cellules MDV-MDCK-INV, comparé à l'effet induit sur les cellules parentales MDCK et MSV-MDCK.

IV.2 LA PI3-KINASE EST IMPLIQUÉE DANS L'ORGANISATION DU CYTOSQUELETTE DES CELLULES MSV-MDCK-INV.

Les cellules MSV-MDCK-INV possèdent de multiples pseudopodes riches en actine, ne contiennent aucune fibre de stress et établissent peu de contacts inter-cellulaires (74). Contrairement aux cellules MDCK et MSV-MDCK, les cellules MSV-MDCK-INV montrent une redistribution de l'actine β aux extrémités des pseudopodes (74). Ces pseudopodes riches en actine β , exprimant également l'actine F et G, représentent un site actif de remodelage de l'actine (74). Il a été démontré que les résidus phosphotyrosine (149) et la

protéine c-Met phosphorylée (60) sont également concentrés aux extrémités des pseudopodes des cellules MSV-MDCK-INV. Ces résultats indiquent qu'il y a une activation localisée de c-Met ainsi qu'une concentration de certaines protéines phosphorylées sur tyrosine aux extrémités des pseudopodes. Ceci suggère que ce micro-domaine joue un rôle actif dans le remodelage de l'actine et dans la formation des protusions pseudopodiales, modulant ainsi la motilité cellulaire (149).

Il était donc très pertinent d'étudier l'effet des inhibiteurs de la PI3-kinase, connus pour inhiber la motilité et l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV (section IV.1 de cette discussion), sur la distribution de l'actine. Les cellules MSV-MDCK-INV traitées au LY294002 forment de longues protusions pseudopodiales et de nombreux contacts inter-cellulaires (**Figures 20 et 24; Film 1**). Nous avons montré que ce changement de morphologie induit par un traitement au LY294002 ne modifie pas la distribution de l'actine-F (**Figure 24**). L'actine est toujours distribuée en périphérie des cellules et de façon diffuse à travers tout le cytoplasme, tout en étant relativement concentrée aux extrémités des pseudopodes. Cependant, les pseudopodes riches en actine sont moins nombreux à la suite d'un traitement au LY294002 (environ 2 pseudopodes par cellule) puisqu'il y a formation de nombreux contacts inter-cellulaires. Les effets du LY294002 observés sur la morphologie des cellules MSV-MDCK-INV sont des effets réels de l'inhibition de la PI3-kinase et non des effets secondaires du LY294002. En effet, la wortmannine, un autre inhibiteur de la PI3-kinase, induit également avec le temps l'allongement des pseudopodes et l'apparition de contacts inter-cellulaires sans toutefois modifier la distribution de l'actine-F aux extrémités des pseudopodes des cellules MSV-MDCK-INV (**Figure 24**). Les effets de la wortmannine sont cependant moins prononcés que ceux du LY294002. Encore une fois, ceci pourrait s'expliquer par une inhibition partielle de la PI3-kinase par la wortmannine dans les cellules MSV-MDCK-INV. En effet, des doses de 500 nM et 1 μ M n'inhibent pas complètement la phosphorylation de la protéine Akt (**Figure 21**).

Il convient de se demander si les effets des inhibiteurs de la PI3-kinase observés sur la morphologie des cellules MSV-MDCK-INV sont des effets réels ou des effets pouvant être attribués au solvant DMSO. En effet, des conséquences importantes de l'utilisation du DMSO ont été rapportées dans la littérature. Yumura et al. ont démontré que le DMSO 5% induit un arrondissement des cellules de l'amibe *Dictyostelium* (un modèle eucaryote) (164). Le DMSO 5% induit également la formation de plusieurs petites projections (*filopodelike*) sur la partie antérieure des cellules de *Dictyostelium* (164). Cependant, il est peu probable que le DMSO ait un effet important sur l'organisation du cytosquelette d'actine des cellules MSV-MDCK-INV. En effet, le DMSO a souvent été utilisé, dans le laboratoire du Dr Noël, à des concentrations inférieures à 0.1%, et aucun effet secondaire n'a été observé jusqu'à maintenant (72, 149). De plus, aucun effet du DMSO 0.1% en vidéomicroscopie n'a été observé sur la morphologie des cellules MSV-MDCK-INV (**Figure 20** et **Film 1**). Il serait toutefois rassurant de vérifier l'effet du DMSO seul à différentes concentrations (0.05% à 1%) et différents temps (30 minutes à 48 heures) sur l'organisation du cytosquelette d'actine des cellules MSV-MDCK-INV via un marquage avec la phalloïdine couplée au rouge texan. Étant donné que le témoin DMSO 24h ne présentent pas ces longs prolongements (**Figure 24**), nous croyons que les effets observés avec le LY294002 et la wortmannine sont réels.

Contrairement aux inhibiteurs de la PI3-kinase, l'EIPA (inhibiteur de l'échangeur Na^+/H^+ NHE1), connu pour inhiber la motilité aléatoire des cellules MSV-MDCK-INV (72), et l'orthovanadate de sodium, connu pour inhiber l'invasion de ces mêmes cellules (**Figure 22** et **23**), induisent une rétraction des pseudopodes et l'arrondissement des cellules MSV-MDCK-INV. De plus, un traitement des cellules MSV-MDCK-INV avec l'anticorps anti-HGF (**Figure 22**) induit la rétraction des pseudopodes de même qu'un étalement des cellules (149). Dans la littérature, aucune étude ne fait mention de l'apparition de longues protusions pseudopodiales induites par l'inhibition de la PI3-kinase ou de toute autre voie de signalisation. À l'opposé, les articles démontrent plutôt un arrondissement des cellules et la disparition des pseudopodes à la suite de l'inhibition de la PI3-kinase (67).

Ainsi, il a été démontré par Keely et al. qu'un traitement au LY294002 empêche la formation de longs lamellipodes induite par l'activation de Cdc42 chez les cellules mammaires (67). Il est aussi surprenant de toujours observer une accumulation d'actine aux extrémités des longs pseudopodes des cellules MSV-MDCK-INV à la suite d'un traitement au LY294002 ou à la wortmannine. Ceci suggère en effet que l'inhibition de l'activité PI3-kinase n'altère pas le remodelage de l'actine aux extrémités des pseudopodes des cellules MSV-MDCK-INV. Voici donc encore une indication que la machinerie cellulaire de ces cellules tumorales est particulière et qu'il est pertinent d'en étudier les différentes composantes. Il serait intéressant d'examiner la distribution de la protéine c-Met phosphorylée et des résidus phosphotyrosine dans les cellules MSV-MDCK-INV à la suite d'un traitement au LY294002 versus le DMSO afin de vérifier s'ils sont toujours accumulés aux extrémités des pseudopodes.

Dans les cellules MSV-MDCK-INV, l'inhibition de la PI3-kinase par le LY294002 et la wortmannine induit également l'apparition de nombreux contacts inter-cellulaires. Cet effet n'est pas très surprenant puisque l'anticorps anti-HGF induit également chez les cellules MSV-MDCK-INV l'apparition de nombreux contacts inter-cellulaires (149). De plus, les cellules parentales MSV-MDCK, qui sont beaucoup moins motiles que les cellules MSV-MDCK-INV, effectuent de nombreux contacts inter-cellulaires (**Figure 13**) (149). Ainsi, l'apparition des contacts inter-cellulaires indique une diminution de la capacité motile des cellules MSV-MDCK-INV, tel que confirmé par les images enregistrées en fonction du temps (**Film 1**). Vadnais et al. ont également montré que l'ajout de HGF recombinant aux cellules MDCK formant des îlots serrés induit leur dissociation. Ceci confirme qu'il y a désorganisation des jonctions inter-cellulaires lorsque les cellules acquièrent la capacité de bouger.

IV.3 LE RÔLE DE LA PI3-KINASE DANS LA RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ DE C-MET DANS LES CELLULES MSV-MDCK-INV DEMEURE INCERTAIN.

L'activation de c-Met par son ligand, le HGF/SF, est impliquée dans la régulation de son expression (1). Dans les cellules cancéreuses, en particulier les cellules de glioblastome humain, plusieurs seconds messagers prennent part à cette modulation dont AP-1, ras-MAP Kinase et parfois PKC et PI3-kinase (1). Il a été démontré par le groupe de Abounader que le LY294002 et la wortmannine inhibent complètement la production de l'ARNm de c-Met, respectivement de 83% et 111%, dans les cellules de glioblastome T98G et que la wortmannine inhibe de 140% la synthèse de la protéine c-Met (1). Cela porte à penser que l'activation de c-Met par le HGF conduit à une activité transcriptionnelle accrue et à une synthèse augmentée de récepteurs, amplifiant ainsi la réponse au HGF (1). Dans les cellules MSV-MDCK-INV, cependant, l'activation autocrine de c-Met n'induit pas une augmentation du nombre de récepteurs exprimés à la membrane comparativement aux lignées parentales MDCK et MSV-MDCK (149). L'activation autocrine mène plutôt à une phosphorylation constitutive de c-Met en conditions normales de culture, c'est-à-dire en absence de HGF dans le milieu. Reboul et al. ont en effet récemment démontré que le sérum ne contient pas de HGF (52). La sécrétion de HGF par les cellules MSV-MDCK-INV suffit donc à stimuler et à auto-activer les récepteurs exprimés à la surface (149). Le fait que la quantité de récepteurs à la membrane des cellules MSV-MDCK-INV soit équivalente à celle des cellules MSV-MDCK et des cellules MDCK, en présence d'une synthèse réglée par l'activation autocrine de c-Met (activation continue), suggère que la demi-vie des récepteurs c-Met des cellules MSV-MDCK-INV soit plus faible que dans les cellules parentales. Une dégradation par le protéasome à la suite d'une ubiquitinylation est donc possible. Il serait intéressant de tester rapidement la validité de cette hypothèse via la réalisation d'un immunobuvardage visant à déceler les résidus ubiquitine sur des lysats de cellules obtenus des trois lignées cellulaires. Un marquage métabolique à la ³⁵S-méthionine suivi d'une chasse à différents temps permettrait, de plus, de démontrer une telle

dégradation métabolique dans les cellules MSV-MDCK-INV et d'évaluer la demi-vie de c-Met dans les trois lignées.

IV.3.1 La PI3-kinase ne semble pas moduler le degré d'activité de c-Met.

Dans le cadre de notre projet visant à déterminer l'implication de la PI3-kinase dans la motilité accrue des cellules MSV-MDCK-INV, il était très intéressant d'explorer la possibilité que la PI3-kinase ait un effet modulateur direct ou indirect sur le degré de phosphorylation de c-Met. Une boucle de rétroaction négative pourrait en effet être présente dans les cellules normales mais absente ou non-fonctionnelle dans les cellules tumorales. C'est dans cette optique que nous avons amorcé les expériences visant à étudier le degré d'activation de c-Met, par le biais de son degré de phosphorylation, en absence d'activité PI3-kinase c'est-à-dire après un traitement au LY294002.

La somme de nos résultats nous porte à croire que l'inhibition de la PI3-kinase, par le LY294002, n'induit aucun effet significatif sur le degré de phosphorylation sur tyrosine de c-Met lorsqu'on le compare à son témoin DMSO respectif (**Figure 28; Tableau 3**). Ceci indique que la PI3-kinase ne module pas directement ou indirectement le degré d'activité de c-Met à court (30 min) et moyen (16-24 h) terme. La PI3-kinase ne modulerait donc probablement pas la synthèse de c-Met. Nous devons noter que la quantité totale de récepteurs HGF n'a pu être mesurée à la suite d'un traitement au LY294002. Ceci est relié, encore une fois, à l'absence d'anticorps sur le marché reconnaissant la forme canine de c-Met en immunobuvardage. En effet, trois anticorps différents ont été extensivement testés dans le cadre d'une étude antérieure sans qu'aucun signal n'ait été détecté dans les cellules MSV-MDCK-INV. La biotinylation de surface suivie d'une immunoprécipitation du récepteur et d'une révélation par la streptavidine-HRP permet d'évaluer la quantité de récepteurs exprimés à la surface mais non la quantité totale de récepteurs synthétisés dans une condition donnée (149). Pour contrecarrer cette difficulté, il faudrait réaliser des marquages métaboliques en absence et en présence de LY294002 pendant différents temps et révéler par autoradiographie la quantité de récepteurs synthétisés

(immunoprécipités par l'anticorps) dans chaque condition afin de déterminer l'effet réel de l'inhibition de l'activité PI3-kinase sur la synthèse de c-Met.

IV.3.2 Effet mitigé du DMSO sur l'activité de c-Met.

Le DMSO, utilisé pour dissoudre le LY294002, a un effet variable sur le degré de phosphorylation de c-Met. Nous avons observé que le DMSO 0.05% induit une faible augmentation du degré de phosphorylation de c-Met en fonction du temps de traitement (**Figure 28**). Ce résultat nous a beaucoup surpris puisque le DMSO est très utilisé en laboratoire lors d'études biologiques (*in vivo* et *in vitro*) (120), pour ses propriétés physico-chimiques. Le DMSO est en effet utilisé pour suspendre de nombreuses drogues ou substances insolubles en milieu aqueux (120, 163). Le DMSO est également un agent cryoprotecteur (protège la cellule durant une exposition à une température en dessous du point de congélation), un agent radioprotecteur (protège la cellule contre les radiations ionisantes), un agent favorisant la fusion entre les cellules ou avec les liposomes et une substance connue pour pénétrer les membranes (revue par (120, 163)). En plus de ces aspects positifs bien connus du DMSO, plusieurs effets néfastes du DMSO, souvent négligés ou méconnus des chercheurs, ont cependant été observés et étudiés (revus par (120, 163)). Ainsi, le DMSO induit des effets variables et parfois néfastes au niveau du métabolisme des lipides, de l'apoptose, de l'inflammation, du cycle cellulaire, de l'expression des protéines, de l'activité d'enzymes, de la différenciation cellulaire, de l'interaction ligand-récepteur, de la polarisation cellulaire ainsi que dans le domaine de la signalisation cellulaire (revue par (120, 163)). Ceci porte à croire qu'il y a peut-être d'autres effets du DMSO toujours inconnus. Ainsi, il semble possible que le DMSO puisse moduler positivement le degré de phosphorylation de c-Met. En effet, il a été rapporté que le DMSO peut modifier l'activité de protéines membranaires à activité tyrosine kinase, tel que le récepteur EGF (*epidermal growth factor*) (115). Le groupe de Earp a observé que le DMSO stimule de façon sélective la phosphorylation sur tyrosine du récepteur du facteur de croissance EGF isolé d'une préparation membranaire de foie de rat (fraction microsomiale). Cette phosphorylation du récepteur EGF induit par le DMSO est dépendante de la concentration en DMSO, et lui est spécifique puisque le

degré de phosphorylation des autres protéines n'est pas affecté (115). Ces résultats sont très intéressants dans le contexte de la présente étude puisqu'ils ressemblent beaucoup à l'effet du DMSO observé sur le degré de phosphorylation de c-Met. Il est évidemment dommage que nous n'ayons pas pris connaissance de cette littérature auparavant. Cependant, avant de conclure que le DMSO induit une augmentation du degré de phosphorylation sur tyrosine de c-Met tel qu'observé par le groupe de Earp sur le récepteur EGF, il est primordial de confirmer ces effets par l'exécution d'autres expériences. Ainsi, il serait essentiel de tester l'effet de plusieurs concentrations de DMSO sur le degré de phosphorylation sur tyrosine de c-Met et d'autres protéines dépendantes et indépendantes de la cascade d'activation de c-Met. De plus, il serait intéressant de vérifier l'effet du DMSO sur le degré de phosphorylation des résidus sérine de c-Met et d'autres protéines afin de déterminer si l'effet du DMSO est spécifique aux résidus tyrosine. Les artéfacts expérimentaux causés par le DMSO pourraient dans un tel cas mener à une interprétation erronée des résultats et à une conclusion inexacte.

Ainsi, selon nos observations préliminaires et les informations fournies de la littérature, il semble possible que le DMSO puisse avoir un effet sur l'activation de c-Met. Cependant, le mécanisme par lequel le DMSO régulerait l'activation de c-Met (phosphorylation) demeure inconnu. L'hypothèse la plus plausible, en comparaison avec les résultats obtenus par le groupe de Earp (35), serait que le DMSO agisse directement sur le récepteur en induisant un changement conformationnel qui serait plus favorable à l'auto-phosphorylation des résidus tyrosine. Ce changement conformationnel pourrait induire une augmentation de l'activité intrinsèque du récepteur. Earp et al. ont démontré que le DMSO altère la conformation du récepteur EGF et réduit de façon réversible l'affinité de l'EGF pour son récepteur (35). Ils ont conclu qu'il était possible que ce soit cette même altération de la structure tertiaire, induite par le DMSO, qui stimule la phosphorylation du récepteur. De plus, Rubin et al. ont démontré que le DMSO induit la phosphorylation du récepteur EGF même lorsque celui-ci est bloqué par la concanacalinalin A (116). Il serait donc intéressant de poursuivre,

à l'image du groupe de Earp, l'étude du DMSO sur le degré de phosphorylation de c-Met afin d'être certain de la signification de nos résultats. Nous pourrions alors émettre une hypothèse basée sur des données plus complètes.

Il est toutefois difficile d'expliquer pourquoi, dans nos expériences, le LY294002 n'a pas eu au moins le même effet que le DMSO puisque le LY294002 est dissout dans le DMSO (**Figure 28**). Une hypothèse possible est que l'inhibition de la PI3-kinase par le LY294002 induit une diminution du degré de phosphorylation de c-Met et que cet effet, ajouté à celui du DMSO (augmentation du degré de phosphorylation de c-Met) résulte en l'absence d'effet significatif sur le degré de phosphorylation de c-Met. Il est clair que ceci devrait être confirmé par des expériences supplémentaires. Bien que plausible, il est toutefois peu probable que cette hypothèse soit valide puisque le DMSO est utilisé à une concentration de seulement 0.05% dans nos expériences. À cette concentration, selon les observations de Earp et al, le DMSO devrait avoir peu ou pas d'effet sur c-Met phosphorylé. Earp et al ont observé un effet du DMSO sur le récepteur EGF phosphorylé à partir d'une concentration de 3%. Cet effet était faible comparativement au DMSO 20% qui augmente le degré de phosphorylation du récepteur EGF de 14.3 fois (115). Bien que similaires, ces deux récepteurs à activité tyrosine kinase ne sont pas identiques au niveau de la séquence en acides aminés entourant les résidus tyrosine d'auto-activation. Il demeure donc possible qu'un tel effet ait lieu sur c-Met à une faible concentration en DMSO.

Il est donc difficile de conclure en ce qui concerne le rôle de la PI3-kinase dans l'activation de c-Met puisque l'inhibiteur est dissout dans un solvant qui semble avoir un effet sur la variable étudiée. Il faudrait tout d'abord étudier et bien caractériser l'effet du DMSO sur le degré de phosphorylation de c-Met et utiliser, en parallèle, un mutant de la PI3-kinase à activité dominante négative (dominant négatif) pour étudier son rôle dans la régulation de c-Met. Cette approche est de plus en plus utilisée pour palier aux effets inattendus des solvants et des inhibiteurs. L'approche idéale

consiste en fait, lorsque les outils moléculaires sont disponibles, à tester à la fois les inhibiteurs et les dominants négatifs.

IV.4 INTÉGRATION DES EFFETS DU DMSO ET DU LY294002 SUR LA MOTILITÉ ET L'INVASION DES CELLULES MSV-MDCK-INV.

La découverte récente de cette littérature sur les nombreux effets secondaires du DMSO nous a fait douter de nos résultats portant sur le rôle de la PI3-kinase dans la motilité et l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV. Tel que discuté précédemment à la section IV.1.1, le DMSO induit une inhibition de 30% de l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV comparativement au témoin sans DMSO (**Figure 22**). Ce résultat, un peu surprenant à la base, est en contradiction avec l'effet du DMSO observé sur le degré d'activité de c-Met. En effet, le DMSO semble induire une augmentation du degré de phosphorylation sur tyrosine de c-Met. De ce fait, une augmentation de l'activité de c-Met était attendue. Ainsi, selon notre raisonnement, les cellules MSV-MDCK-INV devraient être plus motiles en présence de DMSO et non, moins motiles. Toutefois, étant donné les nombreux effets indésirables du DMSO rapportés dans la littérature, il est possible que le DMSO module l'activité ou l'interaction d'autres protéines impliquées dans l'invasion cellulaire. Même si c'est le cas, nos résultats obtenus sur la motilité et l'invasion des cellules MSV-MDCK-INV restent valides puisque nous observons une importante inhibition de la motilité et de l'invasion avec le LY294002 comparativement au DMSO seul.

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous avons démontré que la voie de signalisation de la PI3-kinase joue un rôle important dans la motilité directionnelle et aléatoire, dans l'invasion, ainsi que dans l'établissement de la morphologie des cellules MSV-MDCK-INV. Les protéines qui sont régulées par l'activation de la PI3-kinase et qui sont impliquées dans la motilité, l'invasion et la morphogénèse des cellules MSV-MDCK-INV demeurent à être identifiées. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition de la PI3-kinase sur les protéines modulant la motilité, l'invasion et/ou la morphologie telles que les petites GTPases cdc42, Rac et Rho, les métalloprotéases et les phosphatases dans les cellules MSV-MDCK-INV. Il est toutefois exclu que la PI3-kinase soit constitutivement active dans ces cellules, au contraire de c-Met qui est activé en permanence via une boucle autocrine. Afin de bien caractériser la voie PI3-kinase dans les cellules MSV-MDCK-INV, il serait également indispensable de préciser l'implication respective de la PI3-kinase dans la motilité et l'invasion dépendantes et indépendantes de c-Met constitutivement actif. Puisque la PI3-kinase n'est pas responsable de la totalité de l'activité motile et invasive des cellules MSV-MDCK-INV, il serait primordial de bien définir l'implication des autres voies de signalisation impliquées dans ce phénotype, telle que la voie des MAP Kinases (raf-MEK-ERK) et des PLC-PKC. Nous espérons qu'une meilleure connaissance des voies de signalisation et protéines impliquées dans le phénotype tumoral et invasif des cellules MSV-MDCK-INV, ainsi que dans différents modèles de cellules cancéreuses humaines, permettra d'identifier de nouvelles cibles pharmacologiques afin de lutter contre la progression du cancer et la formation de métastases.

Certains résultats, très inattendus, nous ont également entraînés sur une piste de recherche des plus intéressante. En effet, lorsque nous avons voulu étudier le rôle joué par la PI3-kinase dans la régulation de l'activité de c-Met, nous avons observé un effet imprévu du solvant DMSO. Celui-ci semble induire une activation de c-Met et de ce fait, nous empêche de

conclure quant à l'implication réelle de la PI3-kinase dans la régulation de l'activité de c-Met. Cependant, la caractérisation des effets du DMSO sur les cellules MSV-MDCK-INV, autant sur le degré d'activité de c-Met, la morphologie, la motilité et l'invasion, devient une étape essentielle. Nous croyons que la publication de telles informations contribuerait à mieux documenter les artéfacts expérimentaux causés par le DMSO et aussi, à éviter la publication de résultats de recherche faussement interprétés.

VI. RÉFÉRENCES

1. Abounader, R., S. Ranganathan, B. Y. Kim, C. Nichols, and J. Laterra. Signaling pathways in the induction of c-met receptor expression by its ligand scatter factor/hepatocyte growth factor in human glioblastoma. *J Neurochem* 76: 1497-508., 2001.
2. Akasaka, T., R. L. van Leeuwen, I. G. Yoshinaga, M. C. Mihm, Jr., and H. R. Byers. Focal adhesion kinase (p125FAK) expression correlates with motility of human melanoma cell lines. *J Invest Dermatol* 105: 104-8., 1995.
3. Alessi, D. R., S. R. James, C. P. Downes, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, C. B. Reese, and P. Cohen. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* 7: 261-9., 1997.
4. Andjelkovic, M., D. R. Alessi, R. Meier, A. Fernandez, N. J. Lamb, M. Frech, P. Cron, P. Cohen, J. M. Lucocq, and B. A. Hemmings. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 272: 31515-24., 1997.
5. Andrieu, J.-M., V. Barritaut, V. Blanquet, B. Boyer, C. Brechot, P. Briand, D. Brouty-Boye, B. Caillou, F. Calvo, J. Y. Charcosset, P. Colonna, P. M. Dansette, J. De Grouchy, D. Dormont, B. Dutrillaux, W. H. Fridman, L. Gazollo, R. Giavazzi, N. Ofrah, N. Janin, S. Kelly, A. E. Lagarde, R. Levy, J. C. Lissitzky, P. Marche, P. Martiat, P. M. Martin, M. Moenner, M. F. Poupon, D. T. Purtleto, G. Riou, B. A. F. Rousset, A. Sarasin, P. Tambourin, J. P. Thiery, G. Thomas, and C. Turleau. *Biologie des cancers. ELLIPSES/EDICEF*, 1991, p. 1-432.
6. Angers-Loustau, A., J. F. Cote, and M. L. Tremblay. Roles of protein tyrosine phosphatases in cell migration and adhesion. *Biochem Cell Biol* 77: 493-505., 1999.

7. Antonetti, D. A., P. Algenstaedt, and C. R. Kahn. Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain. *Mol Cell Biol* 16: 2195-203., 1996.
8. Aparicio, T., S. Kermorgant, M. J. Lewin, and T. Lehy. Effects of HGF on the production of matrix metalloproteinases by colonic cancer cells DHD/K12. *C R Seances Soc Biol Fil* 192: 311-5., 1998.
9. Auger, K. R., L. A. Serunian, S. P. Soltoff, P. Libby, and L. C. Cantley. PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells. *Cell* 57: 167-75., 1989.
10. Balkovetz, D. F. Hepatocyte growth factor and Madin-Darby canine kidney cells: in vitro models of epithelial cell movement and morphogenesis. *Microsc Res Tech* 43: 456-63., 1998.
11. Balkovetz, D. F., and J. H. Lipschutz. Hepatocyte growth factor and the kidney: it is not just for the liver. *Intern Rev of Cytol* 186: 225-61., 1999.
12. Band, C. J., C. Mounier, and B. I. Posner. Epidermal growth factor and insulin-induced deoxyribonucleic acid synthesis in primary rat hepatocytes is phosphatidylinositol 3-kinase dependent and dissociated from protooncogene induction. *Endocrinology* 140: 5626-34., 1999.
13. Bardelli, A., M. L. Basile, E. Audero, S. Giordano, S. Wennstrom, S. Menard, P. M. Comoglio, and C. Ponzetto. Concomitant activation of pathways downstream of Grb2 and PI 3-kinase is required for MET-mediated metastasis. *Oncogene* 18: 1139-46., 1999.
14. Bardelli, A., P. Longati, D. Gramaglia, M. C. Stella, and P. M. Comoglio. Gab1 coupling to the HGF/Met receptor multifunctional docking site requires binding of Grb2 and correlates with the transforming potential. *Oncogene* 15: 3103-11., 1997.

15. Bardelli, A., C. Ponzetto, and P. M. Comoglio. Identification of functional domains in the hepatocyte growth factor and its receptor by molecular engineering. *J Biotechnol* 37: 109-22., 1994.
16. Bardelli, A., L. Pugliese, and P. M. Comoglio. "Invasive-growth" signaling by the Met/HGF receptor: the hereditary renal carcinoma connection. *Biochim Biophys Acta* 1333: M41-51., 1997.
17. Behrens, J., M. M. Mareel, F. M. Van Roy, and W. Birchmeier. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 108: 2435-47., 1989.
18. Bellacosa, A., D. de Feo, A. K. Godwin, D. W. Bell, J. Q. Cheng, D. A. Altomare, M. Wan, L. Dubeau, G. Scambia, V. Masciullo, G. Ferrandina, P. Benedetti Panici, S. Mancuso, G. Neri, and J. R. Testa. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer* 64: 280-5., 1995.
19. Bondeva, T., L. Pirola, G. Bulgarelli-Leva, I. Rubio, R. Wetzker, and M. P. Wymann. Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK. *Science* 282: 293-6., 1998.
20. Cai, W., S. L. Rook, Z. Y. Jiang, N. Takahara, and L. P. Aiello. Mechanisms of hepatocyte growth factor-induced retinal endothelial cell migration and growth. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 1885-93., 2000.
21. Canada. Statistiques canadiennes sur le cancer 2003. Institut national du cancer du Canada, 2003.
22. Carpenter, C. L., K. R. Auger, B. C. Duckworth, W. M. Hou, B. Schaffhausen, and L. C. Cantley. A tightly associated serine/threonine protein kinase regulates phosphoinositide 3-kinase activity. *Mol Cell Biol* 13: 1657-65., 1993.

23. Carpenter, C. L., B. C. Duckworth, K. R. Auger, B. Cohen, B. S. Schaffhausen, and L. C. Cantley. Purification and characterization of phosphoinositide 3-kinase from rat liver. *J Biol Chem* 265: 19704-11., 1990.
24. Chandrasekher, G., A. H. Kakazu, and H. E. Bazan. HGF- and KGF-induced activation of PI-3K/p70 s6 kinase pathway in corneal epithelial cells: its relevance in wound healing. *Exp Eye Res* 73: 191-202., 2001.
25. Cheng, J. Q., B. Ruggeri, W. M. Klein, G. Sonoda, D. A. Altomare, D. K. Watson, and J. R. Testa. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3636-41., 1996.
26. Crepaldi, T., A. L. Pollack, M. Prat, A. Zborek, K. Mostov, and P. M. Comoglio. Targeting of the SF/HGF receptor to the basolateral domain of polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 125: 313-20., 1994.
27. Cunningham, C. C. Actin structural proteins in cell motility. *Cancer Metastasis Rev* 11: 69-77., 1992.
28. Davies, S. P., H. Reddy, M. Caivano, and P. Cohen. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351: 95-105., 2000.
29. Delehedde, M., N. Sergeant, M. Lyon, P. S. Rudland, and D. G. Fernig. Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates migration of rat mammary fibroblasts through both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways. *Eur J Biochem* 268: 4423-9., 2001.
30. Dhand, R., I. Hiles, G. Panayotou, S. Roche, M. J. Fry, I. Gout, N. F. Totty, O. Truong, P. Vicendo, K. Yonezawa, and et al. PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. *Embo J* 13: 522-33., 1994.

31. Di Cristofano, A., and P. P. Pandolfi. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 100: 387-90., 2000.
32. Di Renzo, M. F., M. Olivero, S. Ferro, M. Prat, I. Bongarzone, S. Pilotti, A. Belfiore, A. Costantino, R. Vigneri, M. A. Pierotti, and et al. Overexpression of the c-MET/HGF receptor gene in human thyroid carcinomas. *Oncogene* 7: 2549-53., 1992.
33. Di Renzo, M. F., M. Olivero, D. Katsaros, T. Crepaldi, P. Gaglia, P. Zola, P. Sismondi, and P. M. Comoglio. Overexpression of the Met/HGF receptor in ovarian cancer. *Int J Cancer* 58: 658-62., 1994.
34. Dong, G., Z. Chen, Z. Y. Li, N. T. Yeh, C. C. Bancroft, and C. Van Waes. Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 61: 5911-8., 2001.
35. Earp, H. S., Q. Lin, and J. Blaisdell. Dimethyl sulfoxide decreases specific EGF binding. *J Cell Biochem* 26: 221-30., 1984.
36. Ebert, M., M. Yokoyama, H. Friess, M. W. Buchler, and M. Korc. Coexpression of the c-met proto-oncogene and hepatocyte growth factor in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 54: 5775-8., 1994.
37. Escobedo, J. A., S. Navankasattusas, W. M. Kavanaugh, D. Milfay, V. A. Fried, and L. T. Williams. cDNA cloning of a novel 85 kd protein that has SH2 domains and regulates binding of PI3-kinase to the PDGF beta-receptor. *Cell* 65: 75-82., 1991.
38. Ferracini, R., M. F. Di Renzo, K. Scotlandi, N. Baldini, M. Olivero, P. Lollini, O. Cremona, M. Campanacci, and P. M. Comoglio. The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit. *Oncogene* 10: 739-49., 1995.

39. Fruman, D. A., L. C. Cantley, and C. L. Carpenter. Structural organization and alternative splicing of the murine phosphoinositide 3-kinase p85 alpha gene. *Genomics* 37: 113-21., 1996.
40. Fruman, D. A., R. E. Meyers, and L. C. Cantley. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* 67: 481-507, 1998.
41. Fujiuchi, Y., O. Nagakawa, K. Murakami, H. Fuse, and I. Saiki. Effect of hepatocyte growth factor on invasion of prostate cancer cell lines. *Oncol Rep* 10: 1001-6., 2003.
42. Fukui, Y., and H. Hanafusa. Phosphatidylinositol kinase activity associates with viral p60src protein. *Mol Cell Biol* 9: 1651-8., 1989.
43. Fukui, Y., A. R. Saltiel, and H. Hanafusa. Phosphatidylinositol-3 kinase is activated in v-src, v-yes, and v-fps transformed chicken embryo fibroblasts. *Oncogene* 6: 407-11., 1991.
44. Furge, K. A., Y.-W. Zhang, and G. F. Vande Woude. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 19: 5582-5589, 2000.
45. Gandino, L., M. F. Di Renzo, S. Giordano, F. Bussolino, and P. M. Comoglio. Protein kinase-c activation inhibits tyrosine phosphorylation of the c-met protein. *Oncogene* 5: 721-5., 1990.
46. Gandino, L., P. Longati, E. Medico, M. Prat, and P. M. Comoglio. Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase. *J Biol Chem* 269: 1815-20., 1994.
47. Gandino, L., L. Munaron, L. Naldini, R. Ferracini, M. Magni, and P. M. Comoglio. Intracellular calcium regulates the tyrosine kinase receptor encoded by the MET oncogene. *J Biol Chem* 266: 16098-104., 1991.
48. Gershtein, E. S., V. A. Shatskaya, V. D. Ermilova, N. E. Kushlinsky, and M. A. Krasil'nikov. Phosphatidylinositol 3-kinase expression in human breast cancer. *Clin Chim Acta* 287: 59-67., 1999.

49. Giancotti, F. G., and E. Ruoslahti. Integrin signaling. *Science* 285: 1028-32., 1999.
50. Gohda, E., H. Tsubouchi, H. Nakayama, S. Hirono, O. Sakiyama, K. Takahashi, H. Miyazaki, S. Hashimoto, and Y. Daikuhara. Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure. *J Clin Invest* 81: 414-9., 1988.
51. Graziani, A., D. Gramaglia, L. C. Cantley, and P. M. Comoglio. The tyrosine-phosphorylated hepatocyte growth factor/scatter factor receptor associates with phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 266: 22087-90., 1991.
52. Guevremont, M., J. Martel-Pelletier, F. Massicotte, G. Tardif, J. P. Pelletier, P. Ranger, D. Lajeunesse, and P. Reboul. Human adult chondrocytes express hepatocyte growth factor (HGF) isoforms but not HGF: potential implication of osteoblasts on the presence of HGF in cartilage. *J Bone Miner Res* 18: 1073-81., 2003.
53. Hawkins, P. T., T. R. Jackson, and L. R. Stephens. Platelet-derived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P₃ by activating a PtdIns(4,5)P₂ 3-OH kinase. *Nature* 358: 157-9., 1992.
54. Hayashi, H., S. Kamohara, Y. Nishioka, F. Kanai, N. Miyake, Y. Fukui, F. Shibasaki, T. Takenawa, and Y. Ebina. Insulin treatment stimulates the tyrosine phosphorylation of the alpha-type 85-kDa subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in vivo. *J Biol Chem* 267: 22575-80., 1992.
55. Heron, J. F., J. C. Gallard, Y. Denoux, and B. Gery. Cours de cancérologie générale. [Online] Faculté de médecine de CAEN, Centre François BACLESSE. <http://www.baclesse.fr/cours/generale/index.html>. [1997].
56. Inoue, K., M. Chikazawa, T. Karashima, T. Iiyama, M. Kamada, T. Shuin, M. Furihata, and Y. Ohtsuki. Overexpression of c-Met/hepatocyte growth factor receptors in human prostatic adenocarcinoma. *Acta Med Okayama* 52: 305-10., 1998.

57. Inukai, K., M. Funaki, T. Ogihara, H. Katagiri, A. Kanda, M. Anai, Y. Fukushima, T. Hosaka, M. Suzuki, B. C. Shin, K. Takata, Y. Yazaki, M. Kikuchi, Y. Oka, and T. Asano. p85alpha gene generates three isoforms of regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-Kinase), p50alpha, p55alpha, and p85alpha, with different PI 3-kinase activity elevating responses to insulin. *J Biol Chem* 272: 7873-82., 1997.
58. Itakura, Y., T. Yamamoto, K. Matsumoto, and T. Nakamura. Autocrine stimulation of motility in SBC-5 human lung carcinoma cells by a two-kringle variant of HGF. *Cancer Lett* 83: 235-43., 1994.
59. James, S. R., C. P. Downes, R. Gigg, S. J. Grove, A. B. Holmes, and D. R. Alessi. Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *Biochem J* 315: 709-13., 1996.
60. Jia, Z., L. Barbier, J. Vadnais, M. Lu, S. Pelech, J. Noel, and I. R. Nabi. Autocrine HGF-R activation in the pseudopodial domain of MSV-MDCK-INV cells directs rho and p38 MAPKinase activation towards bleb formation. *À soumettre à J Cell Biol., septembre 2003.*
61. Jimenez, C., D. R. Jones, P. Rodriguez-Viciano, A. Gonzalez-Garcia, E. Leonardo, S. Wennstrom, C. von Kobbe, J. L. Toran, R. B. L. V. Calvo, S. G. Copin, J. P. Albar, M. L. Gaspar, E. Diez, M. A. Marcos, J. Downward, A. C. Martinez, I. Merida, and A. C. Carrera. Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Embo J* 17: 743-53., 1998.
62. Kahana, O., M. Micksche, I. P. Witz, and I. Yron. The focal adhesion kinase (P125FAK) is constitutively active in human malignant melanoma. *Oncogene* 21: 3969-77., 2002.
63. Kamikura, D. M., H. Khoury, C. Maroun, M. A. Naujokas, and M. Park. Enhanced transformation by a plasma membrane-associated met oncoprotein: activation of a phosphoinositide 3'-kinase-dependent

- autocrine loop involving hyaluronic acid and CD44. *Mol Cell Biol* 20: 3482-96., 2000.
64. Karihaloo, A., D. A. O'Rourke, C. Nickel, K. Spokes, and L. G. Cantley. Differential MAPK pathways utilized for HGF- and EGF-dependent renal epithelial morphogenesis. *J Biol Chem* 276: 9166-73., 2001.
 65. Katso, R., K. Okkenhaug, K. Ahmadi, S. White, J. Timms, and M. D. Waterfield. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 615-75., 2001.
 66. Kavanaugh, W. M., C. W. Turck, A. Klippel, and L. T. Williams. Tyrosine 508 of the 85-kilodalton subunit of phosphatidylinositol 3-kinase is phosphorylated by the platelet-derived growth factor receptor. *Biochemistry* 33: 11046-50., 1994.
 67. Keely, P. J., J. K. Westwick, I. P. Whitehead, C. J. Der, and L. V. Parise. Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* 390: 632-6., 1997.
 68. Kermorgant, S., T. Aparicio, V. Dessirier, M. J. Lewin, and T. Lehy. Hepatocyte growth factor induces colonic cancer cell invasiveness via enhanced motility and protease overproduction. Evidence for PI3 kinase and PKC involvement. *Carcinogenesis* 22: 1035-42., 2001.
 69. Khwaja, A., P. Rodriguez-Viciana, S. Wennstrom, P. H. Warne, and J. Downward. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *Embo J* 16: 2783-93., 1997.
 70. Krasilnikov, M. A. Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. *Biochemistry (Mosc)* 65: 59-67., 2000.
 71. Krugmann, S., P. T. Hawkins, N. Pryer, and S. Braselmann. Characterizing the interactions between the two subunits of the

- p101/p110gamma phosphoinositide 3-kinase and their role in the activation of this enzyme by G beta gamma subunits. *J Biol Chem* 274: 17152-8., 1999.
72. Lagana, A., J. Vadnais, P. U. Le, T. N. Nguyen, R. Laprade, I. R. Nabi, and J. Noel. Regulation of the formation of tumor cell pseudopodia by the Na(+)/H(+) exchanger NHE1. *J Cell Sci* 113: 3649-62., 2000.
 73. Lauffenburger, D. A., and A. F. Horwitz. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84: 359-69., 1996.
 74. Le, P. U., T. N. Nguyen, P. Drolet-Savoie, N. Leclerc, and I. R. Nabi. Increased β -actin expression in an invasive Moloney Sarcoma Virus-transformed MDCK cell variant concentrates to the tip of multiple pseudopodia. *Cancer Res.* 58: 1631-35., 1998.
 75. Leever, S. J., B. Vanhaesebroeck, and M. D. Waterfield. Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol* 11: 219-25., 1999.
 76. Li, J., C. Yen, D. Liaw, K. Podsypanina, S. Bose, S. I. Wang, J. Puc, C. Miliareis, L. Rodgers, R. McCombie, S. H. Bigner, B. C. Giovanella, M. Ittmann, B. Tycko, H. Hibshoosh, M. H. Wigler, and R. Parsons. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275: 1943-7., 1997.
 77. Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaira, and Darnell. *Biologie moléculaire de la cellule*. DeBoeck Université, 1997, p. 1-1343.
 78. Longati, P., A. Bardelli, C. Ponzetto, L. Naldini, and P. M. Comoglio. Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene* 9: 49-57., 1994.
 79. Ma, Y. Y., S. J. Wei, Y. C. Lin, J. C. Lung, T. C. Chang, J. Whang-Peng, J. M. Liu, D. M. Yang, W. K. Yang, and C. Y. Shen. PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. *Oncogene* 19: 2739-44., 2000.

80. Maroun, C. R., N. MA., H.-M. M., W. AJ., and P. M. The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase and epithelial morphogenesis downstream from the Met receptor tyrosine kinase. *Molecular & Cellular Biology* 20: 8513-25., 2000.
81. Maulik, G., P. Madhiwala, S. Brooks, P. C. Ma, T. Kijima, E. V. Tibaldi, E. Schaefer, K. Parmar, and R. Salgia. Activated c-Met signals through PI3K with dramatic effects on cytoskeletal functions in small cell lung cancer. *J Cell Mol Med* 6: 539-53., 2002.
82. McClatchey, A. I. Modeling metastasis in the mouse. *Oncogene* 18: 5334-9., 1999.
83. Meier, R., D. R. Alessi, P. Cron, M. Andjelkovic, and B. A. Hemmings. Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase Bbeta. *J Biol Chem* 272: 30491-7., 1997.
84. Mitchison, T. J., and L. P. Cramer. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84: 371-9., 1996.
85. Mizuno, K., T. Takehara, and T. Nakamura. Proteolytic activation of a single-chain precursor of hepatocyte growth factor by extracellular serine-protease. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 1631-8., 1992.
86. Morello, S., M. Olivero, M. Aimetti, M. Bernardi, S. Berrone, M. F. Di Renzo, and S. Giordano. MET receptor is overexpressed but not mutated in oral squamous cell carcinomas. *J Cell Physiol* 189: 285-90., 2001.
87. Nakajima, M., H. Sawada, Y. Yamada, A. Watanabe, M. Tatsumi, J. Yamashita, M. Matsuda, T. Sakaguchi, T. Hirao, and H. Nakano. The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. *Cancer* 85: 1894-902., 1999.
88. Nakamura, T., S. Kanda, K. Yamamoto, T. Kohno, K. Maeda, T. Matsuyama, and H. Kanetake. Increase in hepatocyte growth factor

receptor tyrosine kinase activity in renal carcinoma cells is associated with increased motility partly through phosphoinositide 3-kinase activation. *Oncogene* 20: 7610-23., 2001.

89. Nakamura, T., K. Nawa, A. Ichihara, N. Kaise, and T. Nishino. Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *FEBS Lett* 224: 311-6., 1987.
90. Nakamura, T., T. Nishizawa, M. Hagiya, T. Seki, M. Shimonishi, A. Sugimura, K. Tashiro, and S. Shimizu. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342: 440-3., 1989.
91. Nakamura, T., H. Teramoto, and A. Ichihara. Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 6489-93., 1986.
92. Nakanishi, K., J. Fujimoto, T. Ueki, K. Kishimoto, T. Hashimoto-Tamaoki, J. Furuyama, T. Itoh, Y. Sasaki, and E. Okamoto. Hepatocyte growth factor promotes migration of human hepatocellular carcinoma via phosphatidylinositol 3-kinase. *Clin Exp Metastasis* 17: 507-14., 1999.
93. Nakanishi, S., S. Kakita, I. Takahashi, K. Kawahara, E. Tsukuda, T. Sano, K. Yamada, M. Yoshida, H. Kase, and Y. Matsuda. Wortmannin, a microbial product inhibitor of myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 267: 2157-63., 1992.
94. Nakatani, K., D. A. Thompson, A. Barthel, H. Sakaue, W. Liu, R. J. Weigel, and R. A. Roth. Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *J Biol Chem* 274: 21528-32., 1999.
95. Naldini, L., K. M. Weidner, E. Vigna, G. Gaudino, A. Bardelli, C. Ponzetto, R. P. Narsimhan, G. Hartmann, R. Zarnegar, G. K. Michalopoulos, W. Birchmeier, and P. M. Comoglio. Scatter factor and

- hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the *MET* receptor. *EMBO.J.* 10: 2867-78., 1991.
96. Nobes, C. D., and A. Hall. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* 144: 1235-44., 1999.
 97. Olivero, M., M. Rizzo, R. Madeddu, C. Casadio, S. Pennacchiotti, M. R. Nicotra, M. Prat, G. Maggi, N. Arena, P. G. Natali, P. M. Comoglio, and M. F. Di Renzo. Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in human non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 74: 1862-8., 1996.
 98. Otsu, M., I. Hiles, I. Gout, M. J. Fry, F. Ruiz-Larrea, G. Panayotou, A. Thompson, R. Dhand, J. Hsuan, N. Totty, A. D. Smith, S. J. Morgan, S. A. Courtneidge, P. J. Parker, and M. D. Waterfield. Characterization of two 85 kd proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60c-src complexes, and PI3-kinase. *Cell* 65: 91-104., 1991.
 99. Parise, L. V., J. Lee, and R. L. Juliano. New aspects of integrin signaling in cancer. *Semin Cancer Biol* 10: 407-14., 2000.
 100. Phillips, W. A., F. St Clair, A. D. Munday, R. J. Thomas, and C. A. Mitchell. Increased levels of phosphatidylinositol 3-kinase activity in colorectal tumors. *Cancer* 83: 41-7., 1998.
 101. Pons, S., T. Asano, E. Glasheen, M. Miralpeix, Y. Zhang, T. L. Fisher, M. G. Myers, Jr., X. J. Sun, and M. F. White. The structure and function of p55PIK reveal a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 15: 4453-65., 1995.
 102. Ponzetto, C., A. Bardelli, F. Maina, P. Longati, G. Panayotou, R. Dhand, M. D. Waterfield, and P. M. Comoglio. A novel recognition motif for phosphatidylinositol 3-kinase binding mediates its association with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor. *Mol Cell Biol* 13: 4600-8., 1993.

103. Ponzetto, C., A. Bardelli, Z. Zhen, F. Maina, P. dalla Zonca, S. Giordano, A. Graziani, G. Panayotou, and P. M. Comoglio. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 77: 261-71., 1994.
104. Powis, G., R. Bonjouklian, M. M. Berggren, A. Gallegos, R. Abraham, C. Ashendel, L. Zalkow, W. F. Matter, J. Dodge, G. Grindey, and C. J. Vlahos. Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res* 54: 2419-23., 1994.
105. Rahimi, N., E. Tremblay, and B. Elliott. Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for hepatocyte growth factor-induced mitogenic signals in epithelial cells. *J Biol Chem* 271: 24850-5., 1996.
106. Rahimi, N., E. Tremblay, L. McAdam, M. Park, R. Schwall, and B. Elliott. Identification of a hepatocyte growth factor autocrine loop in a murine mammary carcinoma. *Cell Growth Differ* 7: 263-70., 1996.
107. Rieck, P. W., S. Cholidis, and C. Hartmann. Intracellular signaling pathway of FGF-2-modulated corneal endothelial cell migration during wound healing in vitro. *Exp Eye Res* 73: 639-50., 2001.
108. Roche, S., M. Koegl, and S. A. Courtneidge. The phosphatidylinositol 3-kinase alpha is required for DNA synthesis induced by some, but not all, growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9185-9., 1994.
109. Rodriguez-Viciana, P., and J. Downward. Ras activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. *Methods Enzymol* 333: 37-44., 2001.
110. Rodriguez-Viciana, P., P. H. Warne, R. Dhand, B. Vanhaesebroeck, I. Gout, M. J. Fry, M. D. Waterfield, and J. Downward. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370: 527-32., 1994.

111. Rodriguez-Viciana, P., P. H. Warne, B. Vanhaesebroeck, M. D. Waterfield, and J. Downward. Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *Embo J* 15: 2442-51., 1996.
112. Royal, I., T. M. Fournier, and M. Park. Differential requirement of Grb2 and PI3-kinase in HGF/SF-induced cell motility and tubulogenesis. *J Cell Physiol* 173: 196-201., 1997.
113. Royal, I., and M. Park. Hepatocyte growth factor-induced scatter of Madin-Darby canine kidney cells requires phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 270: 27780-7., 1995.
114. Roymans, D., and H. Slegers. Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression. *Eur J Biochem* 268: 487-98., 2001.
115. Rubin, R. A., and H. S. Earp. Dimethyl sulfoxide stimulates tyrosine residue phosphorylation of rat liver epidermal growth factor receptor. *Science* 219: 60-3., 1983.
116. Rubin, R. A., and H. S. Earp. Solubilization of EGF receptor with Triton X-100 alters stimulation of tyrosine residue phosphorylation by EGF and dimethyl sulfoxide. *J Biol Chem* 258: 5177-82., 1983.
117. Ruco, L. P., T. Ranalli, A. Marzullo, P. Bianco, M. Prat, P. M. Comoglio, and C. D. Baroni. Expression of Met protein in thyroid tumours. *J Pathol* 180: 266-70., 1996.
118. Ruderman, N. B., R. Kapeller, M. F. White, and L. C. Cantley. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1411-5., 1990.
119. Saito, M., A. Okamoto, T. Kohno, S. Takakura, H. Shinozaki, S. Isonishi, T. Yasuhara, T. Yoshimura, Y. Ohtake, K. Ochiai, J. Yokota, and T. Tanaka. Allelic imbalance and mutations of the PTEN gene in ovarian cancer. *Int J Cancer* 85: 160-5., 2000.

120. Santos, N. C., J. Figueira-Coelho, J. Martins-Silva, and C. Saldanha. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol* 65: 1035-41., 2003.
121. Sanz-Navares, E., N. Fernandez, M. G. Kazanietz, and S. A. Rotenberg. Atypical protein kinase Czeta suppresses migration of mouse melanoma cells. *Cell Growth Differ* 12: 517-24., 2001.
122. Scarpino, S., A. Stoppacciaro, C. Colarossi, F. Cancellario, A. Marzullo, M. Marchesi, M. Biffoni, P. M. Comoglio, M. Prat, and L. P. Rucio. Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates tumour invasiveness in papillary carcinoma of the thyroid. *J.Pathol.* 189: 570-5., 1999.
123. Schmidt, L., F. M. Duh, F. Chen, T. Kishida, G. Glenn, P. Choyke, S. W. Scherer, Z. Zhuang, I. Lubensky, M. Dean, R. Allikmets, A. Chidambaram, U. R. Bergerheim, J. T. Feltis, C. Casadevall, A. Zamarron, M. Bernues, S. Richard, C. J. Lips, M. M. Walther, L. C. Tsui, L. Geil, M. L. Orcutt, T. Stackhouse, B. Zbar, and et al. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 16: 68-73., 1997.
124. Schmidt, L., F.-M. Duh, F. Chen, T. Kishida, L. Glenn, P. Choyke, S. W. Scherer, Z. Zhuang, I. Lubensky, M. Dean, R. Allikmets, A. Chidambaram, U. R. Bergerheim, J. T. Feltis, C. Casadevall, A. Zamarron, M. Bernues, S. Richard, C. J. M. Lips, M. M. Walther, L.-C. Tsui, L. Geil, M. L. Orcutt, T. Stackhouse, J. Lipan, L. Slife, H. Brauch, J. Decker, G. Niehans, M. D. Hughson, H. Moch, S. Storkel, M. I. Lerman, W. M. Linehan, and B. Zbar. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nature Genetics* 16: 68-73., 1997.
125. Schmidt, L., K. Junker, G. Weirich, G. Glenn, P. Choyke, I. Lubensky, Z. Zhuang, M. Jeffers, G. Vande Woude, H. Neumann, M. Walther, W. M. Linehan, and B. Zbar. Two north american families with hereditary

- papillary renal carcinoma and identical novel mutations in the MET proto-oncogene. *Cancer Res.* 58: 1719-22., 1998.
126. Shayesteh, L., Y. Lu, W. L. Kuo, R. Baldocchi, T. Godfrey, C. Collins, D. Pinkel, B. Powell, G. B. Mills, and J. W. Gray. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet* 21: 99-102., 1999.
 127. Shi, Y., and J. Massague. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685-700., 2003.
 128. Simard, D., and I. R. Nabi. Inverse relation of autocrine motility factor receptor and E-cadherin expression following MDCK cell transformation. *Biochem Biophys Res Comm* 219: 122-7., 1996.
 129. Sipeki, S., E. Bander, L. Buday, G. Farkas, E. Bacsy, D. K. Ways, and A. Farago. Phosphatidylinositol 3-kinase contributes to Erk1/Erk2 MAP kinase activation associated with hepatocyte growth factor-induced cell scattering. *Cell Signal* 11: 885-90., 1999.
 130. Skolnik, E. Y., B. Margolis, M. Mohammadi, E. Lowenstein, R. Fischer, A. Drepps, A. Ullrich, and J. Schlessinger. Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases. *Cell* 65: 83-90., 1991.
 131. Skouteris, G. G., and E. Georgakopoulos. Hepatocyte growth factor-induced proliferation of primary hepatocytes is mediated by activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 218: 229-33., 1996.
 132. Staal, S. P. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 5034-7., 1987.
 133. Stambolic, V., A. Suzuki, J. L. de la Pompa, G. M. Brothers, C. Mirtsos, T. Sasaki, J. Ruland, J. M. Penninger, D. P. Siderovski, and T. W. Mak. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95: 29-39., 1998.

134. Stein, R. C. Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment. *Endocr Relat Cancer* 8: 237-48., 2001.
135. Stein, R. C., and M. D. Waterfield. PI3-kinase inhibition: a target for drug development? *Mol Med Today* 6: 347-57., 2000.
136. Stella, M. C., and P. M. Comoglio. HGF: a multifunctional growth factor controlling cell scattering. *IJBCB* 31: 1357-62., 1999.
137. Stephens, L., K. Anderson, D. Stokoe, H. Erdjument-Bromage, G. F. Painter, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, C. B. Reese, F. McCormick, P. Tempst, J. Coadwell, and P. T. Hawkins. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 279: 710-4., 1998.
138. Stephens, L. R., A. Eguinoa, H. Erdjument-Bromage, M. Lui, F. Cooke, J. Coadwell, A. S. Smrcka, M. Thelen, K. Cadwallader, P. Tempst, and P. T. Hawkins. The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* 89: 105-14., 1997.
139. Stoker, M., E. Gherardi, M. Perryman, and J. Gray. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* 327: 239-42., 1987.
140. Stoker, M., and M. Perryman. An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *J Cell Sci* 77: 209-23., 1985.
141. Sullivan, R. M., M. Stone, J. F. Marshall, F. Uberall, and S. A. Rotenberg. Photo-induced inactivation of protein kinase calpha by dequalinium inhibits motility of murine melanoma cells. *Mol Pharmacol* 58: 729-37., 2000.
142. Tannock, I. F., and R. P. Hill. The basic science of oncology. Third Edition. McGraw-Hill, 1998, p. 1-539.
143. Tokunou, M., T. Niki, K. Eguchi, S. Iba, H. Tsuda, T. Yamada, Y. Matsuno, H. Kondo, Y. Saitoh, H. Imamura, and S. Hirohashi. c-MET

- expression in myofibroblasts: role in autocrine activation and prognostic significance in lung adenocarcinoma. *Am J Pathol* 158: 1451-63., 2001.
144. Tsao, M. S., H. Zhu, A. Giaid, J. Viallet, T. Nakamura, and M. Park. Hepatocyte growth factor/scatter factor is an autocrine factor for human normal bronchial epithelial and lung carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 4: 571-9., 1993.
145. Tse, W. K., G. S. Whitley, and J. E. Cartwright. Transforming growth factor-beta1 regulates hepatocyte growth factor-induced trophoblast motility and invasion. *Placenta* 23: 699-705., 2002.
146. Tu, Y., A. Gardner, and A. Lichtenstein. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses. *Cancer Res* 60: 6763-70., 2000.
147. Tuck, A. B., M. Park, E. E. Sterns, A. Boag, and B. E. Elliott. Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma. *Am J Pathol* 148: 225-32., 1996.
148. Ueoka, Y., K. Kato, and N. Wake. Hepatocyte growth factor modulates motility and invasiveness of ovarian carcinomas via ras mediated pathway. *Mol Cell Endocrinol* 202: 81-8., 2003.
149. Vadnais, J., G. Nault, Z. Daher, M. Amraei, Y. Dodier, I. R. Nabi, and J. Noel. Autocrine activation of the HGF-R/Met tyrosine kinase induces tumor cell motility by regulating pseudopodial protrusion. *J Biol Chem* 277: 48342-50., 2002.
150. Vanhaesebroeck, B., and D. R. Alessi. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346 Pt 3: 561-76., 2000.
151. Vanhaesebroeck, B., R. C. Stein, and M. D. Waterfield. The study of phosphoinositide 3-kinase function. *Cancer Surv* 27: 249-70., 1996.

152. Vanhaesebroeck, B., M. J. Welham, K. Kotani, R. Stein, P. H. Warne, M. J. Zvelebil, K. Higashi, S. Volinia, J. Downward, and M. D. Waterfield. P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4330-5., 1997.
153. Varticovski, L., G. Q. Daley, P. Jackson, D. Baltimore, and L. C. Cantley. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cells expressing abl oncogene variants. *Mol Cell Biol* 11: 1107-13., 1991.
154. Villa-Moruzzi, E., F. Puntoni, A. Bardelli, E. Vigna, S. De Rosa, and P. M. Comoglio. Protein tyrosine phosphatase PTP-S binds to the juxtamembrane region of the hepatocyte growth factor receptor Met. *Biochem J* 336: 235-9., 1998.
155. Vlahos, C. J., W. F. Matter, K. Y. Hui, and R. F. Brown. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269: 5241-8., 1994.
156. Vuori, K. Integrin signaling: tyrosine phosphorylation events in focal adhesions. *J Membr Biol* 165: 191-9., 1998.
157. Walker, E. H., M. E. Pacold, O. Perisic, L. Stephens, P. T. Hawkins, M. P. Wymann, and R. L. Williams. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol Cell* 6: 909-19., 2000.
158. Weidner, K. M., S. Di Cesare, M. Sachs, V. Brinkmann, J. Behrens, and W. Birchmeier. Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature* 384: 173-6., 1996.
159. Whitman, M., D. R. Kaplan, B. Schaffhausen, L. Cantley, and T. M. Roberts. Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. *Nature* 315: 239-42., 1985.
160. Wymann, M. P., G. Bulgarelli-Leva, M. J. Zvelebil, L. Pirola, B. Vanhaesebroeck, M. D. Waterfield, and G. Panayotou. Wortmannin

inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol Cell Biol* 16: 1722-33., 1996.

161. Wymann, M. P., and L. Pirola. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* 1436: 127-50., 1998.
162. Xiao, G. H., M. Jeffers, A. Bellacosa, Y. Mitsuuchi, G. F. Vande Woude, and J. R. Testa. Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 247-52., 2001.
163. Yu, Z. W., and P. J. Quinn. The modulation of membrane structure and stability by dimethyl sulphoxide (review). *Mol Membr Biol* 15: 59-68., 1998.
164. Yumura, S., and Y. Fukui. Filopodelike projections induced with dimethyl sulfoxide and their relevance to cellular polarity in *Dictyostelium*. *J Cell Biol* 96: 857-65., 1983.
165. Zarnegar, R., and G. Michalopoulos. Purification and biological characterization of human hepatopoietin A, a polypeptide growth factor for hepatocytes. *Cancer Res* 49: 3314-20., 1989.

VII. DOCUMENTS SPÉCIAUX

Film 1 :

Effet du LY294002 sur la motilité aléatoire des cellules MSV-MDCK-INV.

La première partie du film représente les cellules MSV-MDCK-INV dans du milieu complet contenant du FBS 10% et du DMSO 0.1% (témoin). Les 7 secondes d'enregistrement représentent 48 heures; les images ayant été enregistrées toutes les 15 minutes. La deuxième partie représente les cellules MSV-MDCK-INV dans du milieu complet contenant du FBS 10% et du LY294002 à une concentration de 50 μ M. Les 7 secondes d'enregistrement représentent 48h. Du LY294002 a été ajouté après 48 h d'enregistrement à une concentration finale de 50 μ M. Ces résultats sont représentatifs de 3 enregistrements similaires.

Le film est sous la forme d'un fichier *avi*. Pour lire ce fichier, il est essentiel d'avoir le lecteur *Windows Media*. Il est préférable de transférer le fichier sur le disque dur de votre ordinateur puisque le fichier est très volumineux. La lecture du fichier directement sur le cédérom altère le déroulement du film.

