

2m 11. 3466. 4

Université de Montréal

Rôles de Gab1/2 et de Shp2 dans l'établissement du phénotype transformé et invasif de
cellules MDCK infectées par le virus du sarcome de Moloney

par

Eugénie Goupil

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences en Biochimie

Décembre 2006

© Eugénie Goupil 2006

Université de Montréal



W

4

U58

2007

v.019

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.

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Rôles de Gab1/2 et de Shp2 dans l'établissement du phénotype transformé et invasif de
cellules MDCK infectées par le virus du sarcome de Moloney

présenté par :

Eugénie Goupil

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Mounib Elchebly

Président-rapporteur

Dr Josette Noël

Directeur de recherche

Dr Pascal Reboul

Membre du jury

Résumé

Gab1 est la protéine majeure de la voie de signalisation du récepteur proto-oncogène c-Met. La phosphorylation de ses résidus tyrosine permet l'ancrage de différentes protéines résultant en la potentialisation du signal induit par le HGF en aval de c-Met. Gab2 est un autre membre de la famille des Gab possédant pratiquement les mêmes domaines que Gab1 sauf celui permettant une interaction directe avec c-Met. La phosphatase à résidus tyrosine Shp2 fait partie d'une des nombreuses protéines pouvant lier Gab1 et Gab2.

L'objectif de l'étude était de déterminer l'implication des protéines adaptatrices Gab1 et Gab2, ainsi que de la phosphatase Shp2, dans le phénomène de transformation des cellules MDCK transformées par le virus du sarcome de Moloney, ainsi que dans l'acquisition du phénotype motile par les cellules MSV-MDCK-INV, un variant invasif sélectionné de cette population. L'activation autocrine du récepteur c-Met est impliquée dans la formation des pseudopodes et le caractère motile de ces cellules.

Nos résultats de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) démontrent que Gab1 est réprimée dans les lignées MDCK transformées par le virus du sarcome de Moloney. Malgré cela, nos études de co-immunoprécipitation démontrent que la phosphatase Shp2 est quand même recrutée à c-Met activé. Nous montrons que Shp2 n'est pas recrutée à c-Met via Gab2, mais plutôt via Grb2, d'une manière indépendante à Gab1 ou Gab2. Nous montrons, de plus, que Shp2 est impliquée dans la formation des protrusions pseudopodiales et par conséquent, dans la motilité des cellules MSV-MDCK-INV.

De manière générale, ces résultats montrent que la présence de la protéine d'échafaudage Gab1 n'est pas essentielle à l'acquisition d'un phénotype motile dépendant de la voie signalétique HGF/c-Met. De plus, nous montrons que la phosphatase Shp2 est impliquée dans ce phénotype motile, par sa capacité à réguler les voies de signalisation en aval menant à la formation et au dynamisme des protrusions pseudopodiales.

Mots clés : Facteur de croissance hépatique (HGF), c-Met, Gab1, Gab2, Shp2, calpeptine, invasion, cancer

Abstract

Gab1 is the major protein in the c-Met proto-oncogene receptor pathway. Phosphorylation on its tyrosine residues makes this docking protein a platform for the assembly of a multiprotein signalling complex downstream HGF-activated c-Met. Gab2, which is another member of the Gab family of adaptor proteins, is composed of almost the same domains as Gab1, except for the c-Met binding site. Among the proteins interacting directly with either Gab1 or Gab2, is the tyrosine phosphatase Shp2.

The purpose of the present research project was to assess the interplay between docking proteins Gab1 and Gab2, and also the tyrosine phosphatase Shp2, downstream activated c-Met, in the transforming phenotype of MDCK cells transformed by Moloney sarcoma virus, as though as in acquisition of a motile phenotype of MSV-MDCK-INV cells, an invasive variant isolated from this cell population. Autocrine activation of c-Met receptor is implicated in formation of pseudopodia and in the increased motility of these cells.

Our quantitative polymerase chain reaction (PCR) results show that Gab1 is repressed in Moloney sarcoma virus-transformed cell lines. Despite of this, our co-immunoprecipitation studies revealed that Shp2 is still recruited to activated c-Met. However, Shp2 is not recruited to the receptor by Gab2, but via the adaptor Grb2. Moreover, we have shown that Shp2 seems to be involved in pseudopodial protrusion formation and, in consequence, in motility of MSV-MDCK-INV cells.

Overall, our results show that the presence of a scaffold protein, such as Gab1, is not essential for acquisition of a motile phenotype which is dependant of HGF/c-Met signalling pathway. Also, we have shown that the phosphatase Shp2 is implicated in this motile phenotype, by its capacity to regulate downstream signalling pathways driving the formation of pseudopodial protrusions.

Keywords : Hepatocyte growth factor (HGF), c-Met, Gab1, Gab2 Shp2, calpeptin, invasion, cancer.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Listes des figures	ix
Liste des tableaux	xi
Liste des abréviations	xii
Remerciements	xv
1. Introduction	1
1.1 Le cancer	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.2 Définition.....	1
1.1.3 Notion d'oncogène, de proto-oncogène et d'anti-oncogène.....	2
1.1.4 La transition épithéliale-mésenchymale.....	2
1.1.5 L'invasion cellulaire et la métastase.....	4
1.1.5.1 La migration.....	4
1.1.5.2 Étapes responsables de l'établissement d'une métastase.....	7
1.1.5.3 Les structures cellulaires associées à la migration.....	8
1.2 Le facteur de croissance hépatique et son récepteur	10
1.2.1 Le facteur de croissance hépatique.....	10
1.2.1.1 Clonage, structure et sécrétion du HGF.....	10
1.2.1.2 Effet du <i>knock-out</i> du HGF.....	10
1.2.2 Le récepteur c-Met.....	11
1.2.2.1 Clonage et localisation.....	11
1.2.2.2 Structure et mécanisme d'activation de c-Met.....	12
1.2.2.3 Mécanismes régulateurs de c-Met.....	13
1.2.2.4 Effet du <i>knock-out</i> de c-Met.....	13
1.2.3 Rôle du système HGF/c-Met.....	14
1.2.4 Implications de c-Met dans la morphogenèse branchée.....	14
1.2.5 Implications du HGF et du récepteur c-Met dans le cancer.....	15
1.2.5.1 L'activation constitutive de c-Met.....	15
1.2.5.2 Modèles animaux et humains.....	15
1.2.5.3 Implication de c-Met dans l'EMT.....	16
1.2.5.4 Le récepteur oncogénique Trp-Met.....	16
1.2.6 La transduction du signal en aval de c-Met.....	17
1.3 La protéine adaptatrice Grb2	18
1.4 La famille des adaptateurs protéiques Gab	19
1.4.1 Généralités.....	19

1.4.1.1 Clonage et expression des Gab	20
1.4.1.2 Effet du <i>knock-out</i> des Gab	20
1.4.1.3 Structure de Gab1 et Gab2	21
1.4.1.4 Régulation négative de Gab1 et Gab2 par phosphorylation sur les résidus sérine et thréonine	23
1.4.2 Recrutement de Gab1 et de Gab2 à c-Met et activation.....	23
1.4.3 Les substrats de Gab1 et de Gab2 et leur implication dans la voie de c-Met ..	25
1.4.3.1 Shp2	25
1.4.3.2 La PI3K et la PLC γ	26
1.4.3.3 Les MAPK Erk1/2	26
1.4.4 Rôle compensatoire de Gab2 vis-à-vis de Gab1	27
1.4.5 Implication de Gab1 et Gab2 dans le cancer.....	27
1.5 La protéine-tyrosine-phosphatase Shp2.....	28
1.5.1 Généralités	28
1.5.1.1 Clonage, structure et expression de Shp2	28
1.5.1.2 Inhibiteurs de Shp2	29
1.5.1.3 Effet du <i>knock-out</i> de Shp2.....	30
1.5.2 Mécanismes d'activation et de régulation.....	30
1.5.3 Interactions.....	31
1.5.3.1 Grb2	32
1.5.3.2 Gab1 et Gab2	32
1.5.4 Fonctions de Shp2.....	32
1.5.4.1 Activation de la voie des MAPK	32
1.5.4.2 Remodelage du cytosquelette.....	34
1.5.5 Implication de Shp2 dans le cancer.....	34
1.6 Lignées cellulaires	34
1.6.1 Les cellules MDCK.....	35
1.6.2 Les cellules MSV-MDCK.....	35
1.6.2.1 Effet du virus du sarcome de Moloney (MSV) sur la transformation cellulaire menant à la tumorigenèse.....	35
1.6.2.2 Les propriétés des cellules MSV-MDCK	36
1.6.3 Les cellules MSV-MDCK-INV	37
1.6.3.1 Sélection.....	37
1.6.3.2 Propriétés	38
1.7 Hypothèses et objectifs.....	39
2. Matériel et méthodes	41
2.1 Anticorps et réactifs	42
2.1.1 Réactifs de culture cellulaire.....	42
2.1.2 Anticorps primaires.....	42
2.1.3 Anticorps secondaires	42
2.1.4 Autres produits.....	43
2.2 Culture cellulaire.....	43
2.2.1 Préparation des lysats cellulaires totaux	44
2.2.2 Dosage des protéines.....	44

2.3 Immunobuvardage de type Western (IB)	45
2.3.1 Séparation des protéines sur un gel de polyacrylamide	45
2.3.2 Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose	45
2.3.3 Révélation des protéines au Rouge Ponceau.....	46
2.3.4 Immunobuvardage de type Western avec les anticorps phospho-spécifiques	46
2.3.5 Immunobuvardage de type Western des protéines non-phosphorylées	46
2.3.6 Immunobuvardage de type Western des protéines phosphorylées sur tyrosine	47
2.3.7 Décapage (stripping) des anticorps	47
2.4 Immunoprécipitation	48
2.5 Immunofluorescence	48
2.6 Technique de la plaie et vidéomicroscopie	49
2.7 RT-PCR et qPCR	49
2.7.1 Isolation de l'ARN total	49
2.7.2 RT-PCR.....	50
2.7.3 PCR quantitative (qPCR)	51
3. Résultats	54
3.1 Niveau d'expression et d'implication de Gab1 dans les trois lignées cellulaires	55
3.1.1 Gab1 n'est pas détectée dans les lignées transformées par le MSV avec un anticorps ciblant sa partie C-terminale.....	55
3.1.2 Gab1 est faiblement reconnue chez les lignées transformées par un anticorps dirigé contre la partie centrale de la protéine	56
3.1.3 L'anticorps α -Gab1(H-198) permet la reconnaissance de Gab1 par immunofluorescence dans les lignées transformées par le MSV	57
3.1.4 Gab1 est réprimée dans les lignées transformées par le MSV	60
3.1.5 Gab1 est recrutée à c-Met mais ne recrute pas Shp2 dans les lignées MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV	64
3.2 Niveau d'expression et d'implication de Gab2 dans les trois lignées cellulaires	67
3.2.1 Gab2 est plus fortement exprimée dans les cellules MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV	67
3.2.2 Gab2 est recrutée à c-Met activé mais n'interagit pas avec Shp2 dans les lignées transformées par le MSV	69
3.3 Implication de c-Met et Shp2 dans les trois lignées cellulaires	69
3.3.1 c-Met recrute non-seulement Gab1, mais Shp2 dans toutes les lignées cellulaires.	70
3.3.2 Shp2 et Grb2 interagissent entre elles dans toutes les lignées.	71
3.4 Étude de l'implication de Shp2 dans les cellules MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV	73
3.4.1 L'inhibition de Shp2 induit la contraction et une relocalisation de l'actine dans les cellules transformées par le MSV.....	73

3.4.2 L'inhibition de Shp2 inhibe l'extension des protrusions pseudopodiales des cellules MSV-MDCK-INV	75
3.4.3 L'inhibition de Shp2 réduit la motilité des cellules MSV-MDCK-INV	78
3.4.3 La phosphorylation de la tyrosine 542 de Shp2 varie en fonction du niveau d'activation de Shp2.....	79
4. Discussion	84
4.1 La présence de Gab1 n'est pas essentielle dans l'acquisition d'un phénotype motile dans les cellules transformées par le virus du sarcome de Moloney.....	85
4.2 Malgré sa faible expression dans les cellules transformées par le MSV, Gab1 est recrutée à c-Met et Grb2.....	87
4.3 Gab2 ne prend pas le relais de Gab1 pour faire le lien entre c-Met et Shp2 dans les lignées MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV	88
4.4 La présence d'un adaptateur Gab n'est pas requise pour recruter Shp2 au récepteur c-Met	89
4.5 Shp2 recrutée à c-Met est impliquée dans la motilité accrue des cellules MSV-MDCK-INV	91
4.5.1 Shp2 est impliquée dans la régulation des fibres de stress des cellules MDCK et MSV-MDCK mais non des cellules MSV-MDCK-INV	92
4.5.2 Shp2 est impliquée dans la régulation des protrusions pseudopodiales des cellules MSV-MDCK-INV	94
4.5.3 La variation du niveau de phosphorylation de la tyrosine 542 de Shp2 est un indicateur de son activation.....	95
5. Conclusion et perspectives	98
6. Références.....	101
7. Documents spéciaux.....	116
Vidéo 1 : Effet de la calpeptine sur la motilité aléatoire des cellules MSV-MDCK-INV.	117
Vidéo 2 : Effet de l'inhibiteur de la calpaïne-I sur la motilité aléatoire des cellules MSV-MDCK-INV.	117

Listes des figures

Figure 1.1 : Sites de la transition épithéliale-mésenchymale (EMT) dans l'émergence et la progression d'un carcinome.	4
Figure 1. 2 : La migration cellulaire.....	5
Figure 1. 3 : Séquence des événements pour l'implantation d'une métastase.....	8
Figure 1. 4 : Schématisation du HGF et de son récepteur c-Met.....	11
Figure 1. 5 : Voie de signalisation du récepteur c-Met.	18
Figure 1. 6 : Domaines fonctionnels de Gab1 et Gab2 et leurs interactions respectives avec les protéines de la voie de signalisation en aval de c-Met.	21
Figure 1. 7 : Mécanismes de recrutement de Gab1 à c-Met par le domaine homologue à la pleckstrine (PH).	24
Figure 1. 8 : Structure et activation de Shp2.....	29
Figure 1. 9 : Modèles de régulation de l'activation de Ras par le recrutement de Shp2 à Gab.	33
Figure 1. 10 : Représentation des cellules MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV et niveau d'expression de c-Met phosphorylé.....	37
Figure 2.1 : Fonctionnement de la PCR quantitative en temps réel.....	52
Figure 3.1 : Expression différentielle de Gab1 dans les lignées MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV.	56
Figure 3.2 : Gab1 est détectée dans les lignées transformées par le MSV avec l'α-Gab1(H-198).....	57
Figure 3.3 : Gab1 est détectée par immunofluorescence dans les trois lignées.	59

Figure 3.4 : Quantification de l'ARNm codant pour Gab1 et séquençage de l'ADNc.	62
Figure 3.5 : Co-immunoprécipitation de c-Met et de Grb2 avec Gab1 dans toutes les lignées, mais non de Shp2.	66
Figure 3.6 : Gab2 est sur-exprimée et recrutée à c-Met activé dans les cellules transformées par le MSV mais ne réussit pas à recruter Shp2.....	68
Figure 3.7 : Le complexe entre c-Met, Grb2 et Shp2 est formé dans toutes les lignées.	71
Figure 3.8 : Étude du changement de distribution de l'actine suite à l'inhibition de Shp2 dans les trois modèles cellulaires.....	74
Figure 3.9 : L'effet de l'inhibition de Shp2 sur la formation des protrusions pseudopodiales des cellules MSV-MDCK-INV est réversible.....	77
Figure 3.10 : Effet de l'inhibition de Shp2 sur la motilité des cellules MSV-MDCK-INV.....	79
Figure 3.11 : Effet de la calpeptine sur la phosphorylation de Shp2.....	81
Figure 4. 1 : Modèle hypothétique de l'assemblage du complexe signalétique en aval de c-Met activé, dans les lignées cellulaires MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV.....	91
Figure 4.2 : Intégration des informations disponibles quant au rôle hypothétique de Shp2 dans la régulation du cytosquelette.....	93

Liste des tableaux

Tableau 1.1 Activités aberrantes de c-Met dans les cancers humains.	16
---	-----------

Liste des abréviations

α	Anti
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BCA	Acide bicinchoninique (<i>bicinchoninic acid</i>)
BSA	Albumine sérique bovine (<i>bovine serum albumin</i>)
Ca ²⁺	ion calcium
Caco-2	Cellules épithéliales de carcinome du colon (<i>colonic carcinoma epithelial cell</i>)
CSF	Facteur de stimulation de colonies (<i>Colony stimulating factor</i>)
DMEM	Milieu essentiel minimal de Dulbecco (<i>Dulbecco's minimum essential medium</i>)
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
ECL	Chimioluminescence augmentée (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
EGF	Facteur de croissance épidermique (<i>epidermal growth factor</i>)
Erk	Kinase régulée par un signal extracellulaire (<i>Extracellular-regulated kinase</i>)
FBS	Sérum de bovin foetal (<i>foetal bovine serum</i>)
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes (<i>Fibroblast growth factor</i>)
Gab	Adaptateur associé à Grb2 (<i>Grb2-associated binder</i>)
GAP	Protéine activatrice de GTPase (<i>GTPase-activating protein</i>)
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
GEF	Facteur d'échange de guanine (<i>guanine exchange factor</i>)
Grb2	Protéine de liaison 2 aux récepteurs des facteurs de croissance (<i>growth factor receptor binding protein-2</i>)
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazinéthanesulfonique
HGF	Facteur de croissance hépatique (<i>hepatocyte growth factor</i>)
HRP	Peroxydase du raifort (<i>Horseradish peroxidase</i>)

IB	Immunobuvardage de type Western
IGF	Facteur de croissance insulino-mimétique (<i>Insuline-like growth factor</i>)
IgG	Immunoglobuline G
IP	Immunoprécipitation
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>)
MBS	Site de liaison à c-Met (<i>Met binding site</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>)
MEK	Kinase activée par les agents mitogènes et qui active la kinase ERK (<i>Mitogen-activated ERK-activating kinase</i>)
Mg ²⁺	ion magnésium
MMP	Métalloprotéase matricielle (<i>matrix metalloprotease</i>)
MSV-MDCK	Cellules MDCK transformées par le virus du sarcome de Moloney (<i>MSV</i>)
MSV-MDCK-INV	Variante aux propriétés invasives sélectionnée à partir des cellules MDCK transformées par le virus du sarcome de Moloney
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	PBS contenant du calcium et du magnésium
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes sanguines (<i>Platelet derived growth factor</i>)
PH	Homologue à la pleckstrine (<i>pleckstrin homology</i>)
PI3-kinase	Phosphoinositide-3-kinase
PIP ₃	Phosphatidylinositol (3,4,5) phosphate
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PLC γ	Phospholipase C- γ
PMSF	Phénylméthanesulfonyl fluorure

PTB	Domaine de liaison aux résidus tyrosine phosphorylés (<i>phosphotyrosine binding domain</i>)
PTP α	Protéine tyrosine phosphatase α
PTP1B	Protéine tyrosine phosphatase 1B
qPCR	Méthode quantitative en temps réel de la réaction de polymérisation en chaîne (<i>quantitative-real time-polymerase chain reaction</i>)
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
RT-PCR	Transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (<i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>)
SDS	Sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SEA	Le récepteur tyrosine kinase « Sarcoma, erythroblastose et anémie »
SF	Facteur de dispersion (<i>Scatter Factor</i>)
SH	Domaine homologue de Src (<i>Src-homology domain</i>)
SOS	GEF de Ras (<i>Son of sevenless</i>)
Stat	Transducteur de signal et activateur de transcription (<i>signal transducer and activator of transcription</i>)
TBS	Tampon salin à base de Tris (<i>Tris buffered saline</i>)
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
TGF- β	Facteur de croissance transformant β (<i>transforming growth factor-β</i>)
TR	Rouge de texan (<i>Texas Red</i>)
Tris	Tris (Hydroxyméthyl) Aminométhane

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mes parents, Johanne Gagnon et Richard Goupil, qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui et à qui je dois ma réussite, ma sœur Roseline, ainsi que mes tantes Micheline et Marjolaine Gagnon

Je tiens à remercier mes amis, Yoann Lussier, Alexandra Raybaud, Marc-Olivier Raté, Dominique Gagnon, Alexandre Leduc-Nadeau, Maxime Blanchard, Jean-Philippe Longpré et François Dionne pour leur écoute et leur disponibilité. Merci à pour Sandra Da Cal, pour sa joie de vivre constante, son écoute et sa générosité. Merci à Yolaine, pour les innombrables discussions, son aide, son incroyable patience et son esprit critique. Je voudrais également remercier mes collègues de travail, Julie Verner, Pierrette Fournel, Louise Lefort, Mireille Marsolais, Michel Brunette, Line Garneau, Hélène Klein, Umberto Banderali et Bernadette Wallendorf, pour les heures de plaisir au dîner ou dans les couloirs du GÉPROM. J'aimerais aussi remercier Pierre Bissonnette, pour son humour et les nombreuses conversations, autant scientifiques que personnelles. Merci aussi à mes collègues de travail présents et passés, Mohammad Amraei, Ingrid Charles, Zeïnab Daher, Karl-Philippe Guérard et David Germain.

Je voudrais aussi remercier tout spécialement ma directrice de recherche, Josette Noël, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et aussi de son aide indispensable pendant la durée de mes études de maîtrise.

Finalement, je voudrais remercier Michael, pour son soutien constant, sa simplicité, sa gentillesse et sa générosité. *HD I.*

1. Introduction

1.1 Le cancer

1.1.1 Généralités

Le cancer est maintenant la principale cause de mortalité au Canada, devant les maladies cardiaques et vasculaires cérébrales (Statistiques Canada). Selon la Société Canadienne du Cancer, un Canadien sur quatre mourra du cancer, et le risque est un peu plus élevé chez les hommes que chez les femmes. Les cancers les plus observés sont ceux du sein, du colon et de la prostate. Le cancer du rein est le dixième cancer en importance dans les pays occidentaux (1). Le tiers des cas sont découverts une fois que le cancer a envahi des organes autres que le rein. Près de 50 % des patients décèdent au cours de la première année suivant le diagnostic et seulement 10 % des patients survivent plus de deux ans (38). Ces résultats demeurent faibles, dus à la résistance des tumeurs rénales à la chimiothérapie, la radiothérapie et l'hormonothérapie (65, 186). L'impact social et économique causé par ce cancer s'avère important. C'est pourquoi la recherche fondamentale est essentielle pour parvenir à une meilleure compréhension des phénomènes physiologiques qui sous-tendent cette maladie.

Il existe à ce jour de nombreux modèles cellulaires permettant une étude plus approfondie du cancer. Les cellules MDCK (décrites plus en détail dans la section 1.6.1) sont un excellent modèles pour mieux comprendre les multiples modifications se produisant lorsqu'une cellule normale acquiert un phénotype invasif.

1.1.2 Définition

Les cellules de notre organisme sont normalement contrôlées de manière stricte pour éviter tout échappatoire au niveau de leur développement. Durant l'embryogenèse, les cellules doivent se différencier, proliférer, migrer et éventuellement certaines d'entre elles vont entrer en apoptose pour permettre la création d'un organisme normal et fonctionnel. Bien que certaines de nos cellules (épithélium intestinal, moelle épinière) continuent de se diviser, la plupart demeurent dans un stade de quiescence.

De manière occasionnelle, certaines cellules perdent le contrôle de leur programme développemental et prolifèrent d'une manière excessive. Ceci mène à

l'apparition de tumeurs bénignes qui, si elle sont de nouveau altérées, donnent naissance à des tumeurs malignes, ou cancer. Il y a cinq caractéristiques phénotypiques permettant d'affirmer qu'une cellule est cancéreuse : la perte d'inhibition de contact (la capacité des cellules à s'empiler sans être gênées par la présence des autres cellules), la perte de dépendance vis-à-vis de l'ancrage, l'indépendance par rapport aux facteurs de croissance, l'immortalité et la tumorigénicité. Parmi la grande complexité des tumeurs identifiées à ce jour, il en ressort deux types distincts : le carcinome (tumeur d'origine épithéliale) et le sarcome (tumeur d'origine mésenchymale).

1.1.3 Notion d'oncogène, de proto-oncogène et d'anti-oncogène

De manière générale, les cellules cancéreuses ont subi des dommages soit à l'ADN, soit à la machinerie de réplication et réparation de ce dernier, ce qui mène à la tumorigénèse. Le cancer peut être causé par trois agents : les carcinogènes chimiques, la radiation (électromagnétique ou particulaire) ou les virus. Ces agents peuvent altérer les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs.

Un oncogène est un gène modifié pouvant induire la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse (158). Un proto-oncogène est un gène normal qui a la capacité d'être oncogénique, soit après avoir été muté de manière à être sur-activé, soit en étant sur-exprimé. Les proto-oncogènes codent pour des protéines qui régulent la croissance et la différenciation cellulaire, et sont souvent impliqués dans la transduction et l'exécution de signaux mitogènes .

Les gènes suppresseurs de tumeurs, ou anti-oncogènes, sont des gènes codant pour des protéines régulant la réparation de l'ADN endommagé ou favorisant l'apoptose des cellules ayant subi des dommages. Ils sont souvent altérés, inactivés ou non-exprimés dans les cellules cancéreuses (120).

1.1.4 La transition épithéliale-mésenchymale

La conversion d'une cellule épithéliale (donc polarisée) en une cellule mésenchymale avec un phénotype fibroblastoïde (non-polarisé) et hautement motile est un phénomène connu sous le nom de transition épithéliale-mésenchymale (EMT).

L'EMT est absolument essentielle dans des processus physiologiques requérant des mouvements morphogénétiques, tels la gastrulation, la formation du système nerveux et de l'endoderme et la formation de plusieurs organes (169, 170). Par contre, l'EMT peut s'avérer dramatique lors de la progression tumorale. En effet, il a été observé que ce processus a lieu, d'une manière incontrôlée, faisant d'un épithélium normal un carcinome invasif.

Au niveau moléculaire, l'EMT est enclenchée par une multitude de voies de signalisation dirigées elles-mêmes par l'activation des récepteurs tyrosine kinase, couplés aux protéines G et du TGF- β (170). De plus, il y a co-activation des récepteurs intégrines, responsables de la formation d'adhésion focales, lien moléculaire entre la matrice extracellulaire (ECM) et le cytosquelette d'actine la cellule.

Une des principales caractéristiques de l'EMT est la perte de la cadhérine-E, protéine responsable du maintien de l'interaction des cellules entre elles, appelées jonctions d'adhérence. La cadhérine-E interagit, d'une part, avec sa partie extracellulaire, avec les molécules des cellules voisines et d'autre part, avec sa partie intracellulaire, avec les microfilaments du cytoplasme, via les caténines. La cadhérine-E a vite été identifiée comme étant un gène suppresseur de tumeur (18), en faisant une protéine essentielle dans le maintien du phénotype épithélial et par conséquent, non tumoral. *In vitro*, une corrélation a été établie entre la perte de cadhérine-E et la perte du phénotype épithélial (13). De plus, une corrélation inverse a été observée entre le niveau de cadhérine-E présente chez des patients atteint du cancer et le grade de ce dernier (20). Le mécanisme par lequel la cadhérine-E est réprimée pendant l'EMT semble avoir lieu par l'activation de plusieurs récepteurs tyrosine kinase et TGF- β (71), ce qui a pour effet d'activer des répresseurs transcriptionnels en aval, qui réprimeront la production de cadhérine-E (12).

Les mécanismes gouvernant l'EMT, qui sont de mieux en mieux compris, sont illustrés à la **Figure 1.1**. L'épithélium normal peut proliférer et donner naissance à un adénome (ou dysplasie), un empilement de cellules donnant une tumeur bénigne glandulaire. Suite à certains changements épigénétiques et altérations géniques il y a transformation de la masse cellulaire en un carcinome *in situ*. Le carcinome *in situ* est confiné dans les limites du tissu puisque les protéines d'adhésion demeurent intactes et maintiennent leur fonction normale de compaction tissulaire et de reconnaissance des

composantes de la membrane basale. Il pourra alors y avoir d'autres altérations causant la progression du carcinome et induisant sa dissémination, ce qui est l'EMT proprement dite. Il y aura alors fragmentation de la membrane basale, puis l'invasion du carcinome. Les détails de cette étape importante seront décrits dans la section suivante.

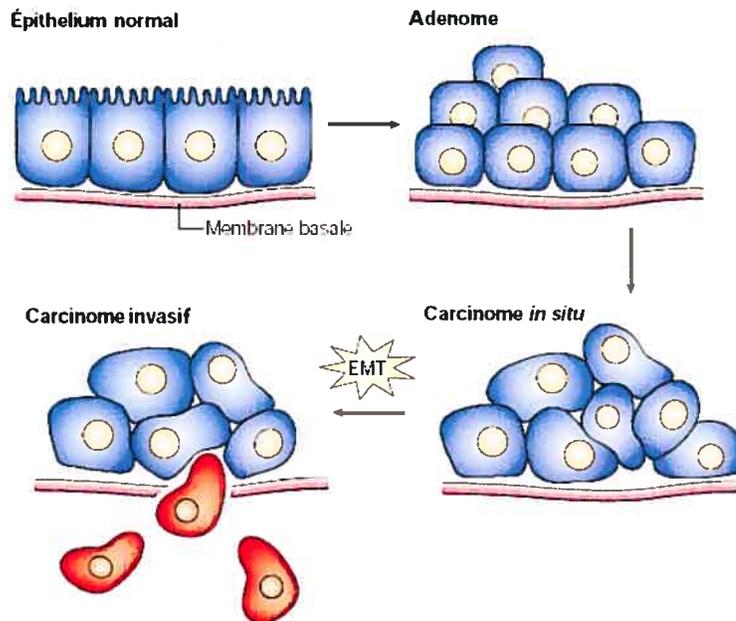


Figure 1.1 : Sites de la transition épithéliale-mésenchymale (EMT) dans l'émergence et la progression d'un carcinome.

(adapté de (169)).

1.1.5 L'invasion cellulaire et la métastase

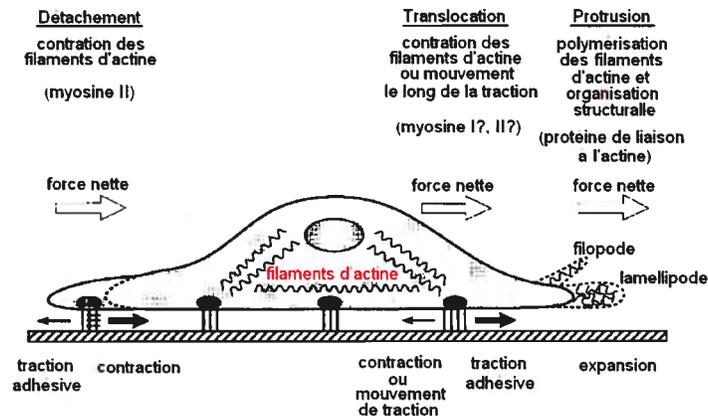
1.1.5.1 La migration

La migration cellulaire est un processus universel impliquant différents mécanismes et morphologies, dans différents types cellulaires et environnements. La plupart des études effectuées sur la motilité cellulaire ont exploité des systèmes cellulaires à deux dimensions, limitant la compréhension des mécanismes de la migration cellulaire, les cellules utilisant différentes stratégies en condition physiologiques à trois dimensions (144).

Dans la migration en deux dimensions (par exemple dans un Pétri), qui a lieu selon un cycle continu, il y a tout d'abord une polarisation morphologique de la cellule se

traduisant en extension de la membrane, la formation d'attachements cellule-substrat, le mouvement vers l'avant du corps cellulaire et la relâche des attachements à l'arrière de la cellule. Toutes ces étapes sont dirigées par la polymérisation de l'actine et la contraction du cytosquelette par les chaînes de myosine (52). Une représentation de la migration en deux dimensions est illustrée à la **Figure 1.2A**.

A



B

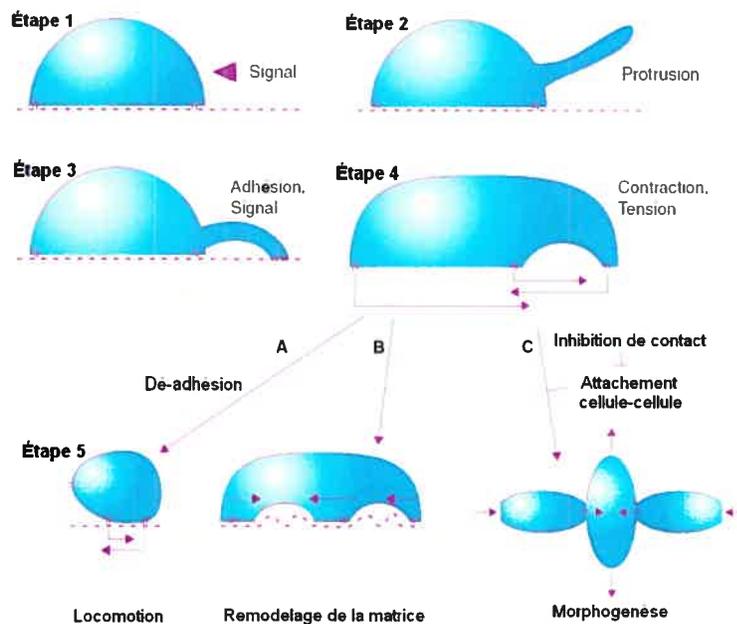


Figure 1. 2 : La migration cellulaire.

A) Les différentes forces impliquées dans la migration en deux dimensions. Modifié de Lauffenburger *et al.* (89). B) Le cycle de la migration (en cinq étapes) en trois dimensions et les conséquences physiologiques suite à l'étape 5. Adapté de Bailly & Condeelis (6).

En trois dimensions (**Figure 1.2B**), les cellules migrent dans un contexte cellulaire *in vivo*, ou dans un contexte cellulaire *in situ*, par exemple dans une matrice synthétique faite de collagène et d'agar. De ce fait, la migration en trois dimensions est appelée invasion, car la cellule doit pénétrer la matrice extracellulaire et l'envahir. L'invasion a lieu selon cinq étapes distinctes, de manière à former aussi un cycle continu (89). Il y a initialement la polarisation de la cellule dirigée par la polymérisation locale d'actine. Ceci sera suivi de la formation et l'extension d'une protrusion pseudopodiale (étape 1). Quand la protrusion pseudopodiale entre en contact avec les ligands présents dans l'ECM, les protéines du cytosquelette seront dirigées vers le site d'adhésion (étape 2). Les protéines responsables de cette réorganisation sont les récepteurs d'adhésion, appelés intégrines. Les intégrines font le lien entre l'ECM et les adaptateurs cytoplasmiques présents dans le pseudopode (53). Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires dont la partie extracellulaire lie l'ECM, et la partie intracellulaire lie des protéines cytoplasmiques telles la paxilline, la vinculine, la taline, qui sont impliquées dans des cascades de signalisation régulant le cytosquelette. Ces sites d'interactions particuliers entre les intégrines et les protéines de l'ECM se nomment points d'adhésion focale ou plaque d'adhésion focale.

Une fois que les plaques adhésion focale sont instaurées, il y a protéolyse de l'ECM, entre autre par l'intermédiaire des métalloprotéases matricielles (MMP), permettant l'avancement du corps cellulaire dans l'ECM (étape 3). Peu de temps après ou pendant l'interaction ligand-intégrine, les filaments d'actine interagissent avec des protéines contractiles du cytosquelette, telle la myosine de type II, ce qui aura pour effet de stabiliser et contracter les filaments d'actine (étape 4). Cette contraction de l'actine aura pour effet de contracter la cellule localement, favorisant le glissement du pôle postérieur de la cellule et sa translocation dans l'ECM (étape 5).

Les facteurs principaux stimulant la migration cellulaire sont les facteurs de croissance produits par les fibroblastes, les cytokines et les chémokines produites par les cellules inflammatoires (52). Plusieurs cellules, dont les cellules souches embryonnaires, les cellules T et B, les neutrophiles, les monocytes et les cellules tumorales sont capables d'une migration de type améboïde. Celle-ci est caractérisée par l'absence d'adhésion focale et de récepteurs d'intégrine mais définie par la présence de protrusions et

rétractations pseudopodiales toutefois, indépendantes de l'attachement à un substrat, contrairement aux protrusions guidées par les intégrines. Il a été démontré que dans le processus de migration en trois dimensions, il n'y a plus de fibres de stress, de points ou plaques d'adhésion focale et de gros lamellipodes mais plutôt des pseudopodes cylindriques (52).

1.1.5.2 Étapes responsables de l'établissement d'une métastase

La croissance invasive est un programme génétique complexe pendant lequel la prolifération cellulaire est combinée à la dissociation cellule-cellule et au mouvement, en plus de la dégradation de l'ECM et la survie de la cellules (25, 52, 184). L'invasion cellulaire, comme l'EMT, a lieu en conditions physiologiques, durant le développement ou la régénération des organes, dans la guidance axonale ou lors de la cicatrisation. Cependant, le phénomène d'invasion trouve son sens aussi lors de la progression d'une cellule tumorale venant d'une tumeur primaire vers un site secondaire, ou appelé métastase.

La métastase, ou la résultante de la dissémination des cellules cancéreuses d'une tumeur primaire vers un autre organe, est la cause de mortalité la plus fréquente chez les patients atteint d'un cancer (189). Heureusement, moins de 0,05% des cellules tumorales circulantes sont vouées à devenir des métastases (95).

Les différentes étapes dans l'établissement d'une tumeur métastatique sont illustrées à la **Figure 1.3**. Il y a initialement détachement des cellules d'une tumeur primaire, migration locale et invasion des tissus d'origine stromale, suivie de l'intravasation et le transit par les vaisseaux sanguins, puis finalement de l'extravasation des cellules invasives. Par la suite, il y a réincorporation des cellules métastatiques dans le nouveau tissu par l'invasion de ces dernières. Pour pouvoir pénétrer dans le nouveau site, ces cellules tumorales devront s'attacher à la matrice extracellulaire. Une fois les cellules bien ancrées dans le nouveau tissu, il y a formation de micrométastases et leur survie. Après une période de dormance des cellules métastatiques, il y aura prolifération de ces dernières, pour mener ultimement à la tumeur secondaire (25, 184). Au niveau moléculaire, ce processus est dirigé principalement par les facteurs de dispersion, les « scatter factor ».

La morphogénèse (166), la neurogénèse (185) et l'angiogénèse (45) sont toutes trois nécessaires pour l'installation d'un cancer dont les cellules tumorales ont des propriétés invasives. Alors que dans les cellules normales, la présence de protéines permettant l'adhésion à l'ECM est absolument essentielle, il en est tout autrement des cellules tumorales.

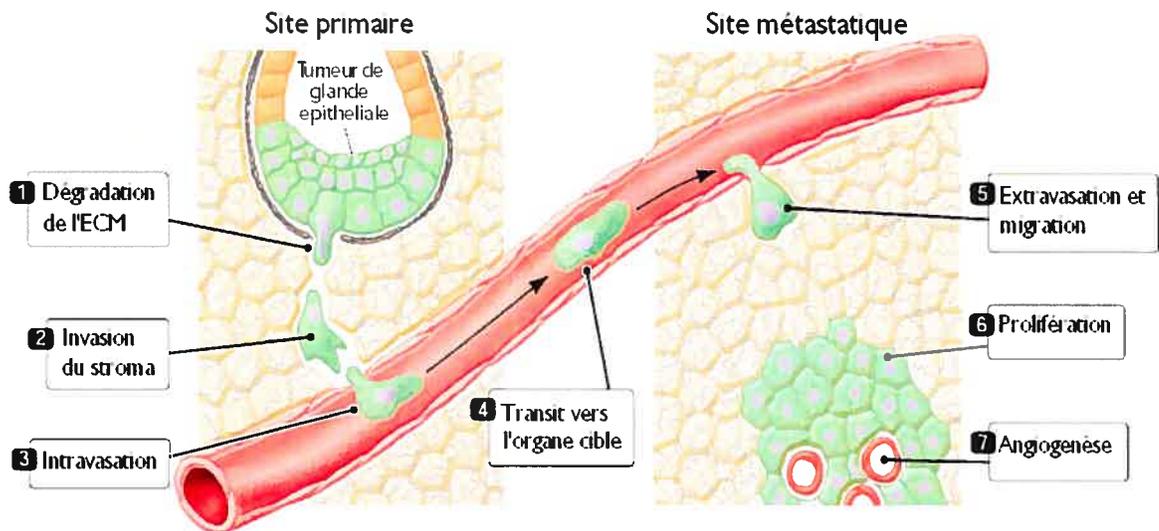


Figure 1.3 : Séquence des événements pour l'implantation d'une métastase.
(adapté de (52)).

L'établissement d'une tumeur secondaire nécessite donc une série d'interactions complexes entre les cellules tumorales, l'ECM, les cellules stromales et les vaisseaux sanguins (96). Les métalloprotéases matricielles régulent le remodelage du tissu stromal, en favorisant sa dégradation pour permettre aux cellules tumorales de quitter le site primaire et d'aller vers un site secondaire. Ainsi, une tumeur métastatique qui s'implante dans un second site devra faire l'action inverse de l'EMT, soit la transition mésenchymale-épithéliale, pour permettre aux cellules de survivre et proliférer dans ce nouveau site, en adhérant à la membrane basale et entre elles (169).

1.1.5.3 Les structures cellulaires associées à la migration

Comme il a été mentionné précédemment, la première étape dans la migration cellulaire est la protrusion de la membrane cellulaire. La formation d'une telle structure

est rendue possible par la polymérisation de l'actine, d'une manière localisée (135), pouvant se produire en réponse à des signaux chimiotactiques (36). De plus, les cellules tumorales invasives sont caractérisées par la sur-régulation de protéines permettant l'attachement à l'ECM, par exemple les intégrines et les laminines, via l'activation de Rac1, une protéine à activité GTPase de la famille Rho.

Les pseudopodes sont des protrusions tridimensionnelles de la membrane plasmique, donc observés dans un contexte *in situ* et *in vivo* (179). Ils sont morphologiquement divers et incluent les lamellipodes et les filopodes (121). Les lamellipodes sont des protrusions de la membrane cellulaire, de forme aplatie, observées en deux dimensions chez les cellules migrant *in vitro*, et semblent être fonctionnellement équivalents aux pseudopodes. Les filopodes sont des projections cylindriques étroites. Ces structures sont dépourvues d'organelles et sont très riches en actine et en protéines associées à l'actine.

Les invadopodes sont des protrusions qui s'étendent verticalement de la partie ventrale de la membrane plasmique. Ils sont appelés ainsi de par leur habileté à dégrader l'ECM. En plus d'avoir une forte concentration en actine, ces structures sont enrichies en molécules d'adhésion, protéines adaptatrices, protéines du remodelage de la membrane plasmique en plus des métalloprotéases matricielles (188). Un autre type de structure observée est le podosome, structure d'adhésion dynamique caractérisée par une forte concentration en actine. Le podosome a une composition moléculaire d'une grande similarité à celle de l'invadopode et est observé entre autres chez les macrophages et les fibroblastes transformés (94).

1.2 Le facteur de croissance hépatique et son récepteur

1.2.1 Le facteur de croissance hépatique

1.2.1.1 Clonage, structure et sécrétion du HGF

Comme son nom l'indique, le facteur de croissance hépatique (HGF, illustré à la **Figure 1.4A** est une cytokine d'abord identifiée en 1967 pour sa capacité mitogénique sur les hépatocytes en culture (43, 118). Quelques années plus tard, ce facteur a été partiellement purifié et nommé HGF (122). Pendant la même période, les études sur les interactions entre l'épithélium et le mésenchyme ont identifié un facteur produit par les fibroblastes stimulant le mouvement des cellules épithéliales en culture, par la dissociation des jonctions cellule-cellule et l'induction de la dispersion cellulaire (161), le « scatter factor » (SF). Suite à leur clonage complet respectif, l'identité du SF a été confirmée, et il s'est avéré que le SF était la même molécule que le HGF (180). Le HGF n'a pas de similarités structurales avec d'autres facteurs de croissance, sauf avec le plasminogène (123). Le pro-HGF est sécrété par les cellules du mésenchyme comme un précurseur inactif et activé par clivage protéolytique pour en faire un hétérodimère. Il est composée d'une chaîne α comprenant le domaine N-terminal et quatre domaines « kringle » et d'une chaîne β comprenant un motif similaire à celui des protéases à résidus sérine (« protease-like »), liées entre elles par des liens disulfures. Le HGF sécrété est ciblé principalement vers les cellules d'origine épithéliale qui expriment le récepteur au HGF (7). Ainsi, le HGF est un médiateur important des interactions épithéliales-mésenchymales (108, 160).

1.2.1.2 Effet du *knock-out* du HGF

Les souris *knock-out* pour le HGF, c'est-à-dire dont on a aboli l'expression du gène du HGF, meurent *in utero*. Les embryons sont caractérisés par un développement incomplet, au niveau du foie, qui est réduit en taille et montrent une perte des cellules du parenchyme. Le développement du placenta est aussi affecté (173). Cette étude a démontré que le HGF est un élément essentiel dans le programme d'invasion par des précurseurs cellulaires lors du développement embryonnaire.

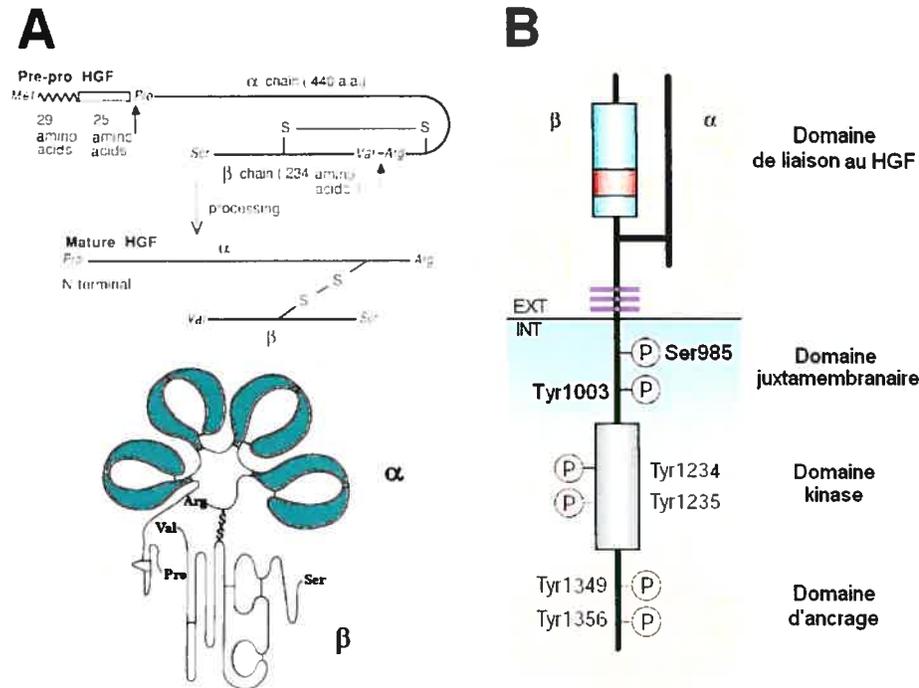


Figure 1.4 : Schématisation du HGF et de son récepteur c-Met.

A) Le HGF/SF. La pré-pro-forme du HGF contient un peptide signal (ici représenté par le préfixe « pré ») d'une longueur de 29 acides aminés et la pro-forme, d'une longueur de 25 acides aminés. Le clivage donnant la forme mature a lieu entre l'Asp54 et la Pro55 (adapté de (123)). **B)** Le récepteur au HGF, c-Met (adapté de (171)).

1.2.2 Le récepteur c-Met

1.2.2.1 Clonage et localisation

Le récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase ayant une forte affinité pour le HGF est c-Met, aussi appelé récepteur au HGF (HGFR, (23)). c-Met semble le seul récepteur fonctionnel pour le HGF, réciproquement le HGF semble être le seul ligand naturel de c-Met. Cependant, il existe *in vivo* trois variants issus de l'épissage de la séquence du HGF. Le premier variant, appelé delHGF, est identique au HGF pleine longueur, sauf pour une délétion de cinq acides aminés dans le premier domaine « kringle ». Ce variant, comme le HGF pleine longueur, présente des activités mitogéniques et de dispersion (29, 119). Les deux autres variants résultent en des protéines de plus petite taille que le HGF, et consistent en sa partie N-terminale suivie soit du premier (29) ou des deux premiers (26) domaines « kringle ». Ces deux variants

sont appelés HGF/NK1 et HGF/NK2, respectivement, et ont une activité agoniste autant qu'antagoniste. En effet, le phénotype de souris transgéniques du variant HGF/NK1 est similaire à celui observé chez des souris transgéniques sur-exprimant pour le HGF, démontrant que ce variant est un agoniste *in vivo* (75).

Le variant oncogénique du récepteur c-Met, Trp-Met (dont il sera question à la section 1.2.5.4) a été initialement identifié au début des années 1980, suite au traitement d'une lignée cellulaire humaine d'ostéosarcomes traitée avec un carcinogène chimique (30). Cette découverte a permis l'isolement de l'ADNc de c-Met (132). Le ligand de c-Met était inconnu à l'époque.

c-Met est localisé dans la membrane basolatérale dans les cellules d'origine épithéliale et endothéliale, faisant du système HGF/c-Met un modulateur de l'EMT (31). Ce récepteur a été identifié dans une variété de 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 (9).

1.2.2.2 Structure et mécanisme d'activation de c-Met

c-Met est un hétérodimère glycosylé de 190kDa. Son précurseur est activé de la même manière que le HGF, soit par clivage protéolytique. Il est composé d'une sous-unité α extracellulaire (50kDa), et d'une sous-unité β transmembranaire (145kDa), liées entre elles par un pont disulfure. Le récepteur est illustré à la **Figure 1.4B**. La sous-unité β est composée du domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'une portion cytoplasmique. Cette dernière contient le domaine juxtamembranaire (47 acides aminés, conservé entre les espèces (91)), le domaine à activité tyrosine kinase ainsi que la queue C-terminale servant de domaine d'ancrage.

Le mécanisme d'activation de c-Met est aussi celui de tous les récepteurs à activité tyrosine kinase. Les monomères de c-Met non-liés flottent librement dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique, où des contacts entre eux auront lieu, aléatoirement, de manière à former des dimères (93). La liaison avec le HGF sur la partie extracellulaire du dimère induit un changement de conformation dans le dimère, ce qui mène à sa stabilisation. Ce changement de conformation permet aussi la juxtaposition des domaines kinases catalytiques et leur activation par phosphorylation des tyrosines 1234

et 1235 (101). Il y a alors transphosphorylation (activation) réciproque des deux récepteurs (67, 93), dans le domaine C-terminal, au niveau des tyrosines 1349 et 1356, qui constituent un motif bidentate. Lorsque phosphorylées, ces deux résidus tyrosine servent de site d'ancrage permettant à des transducteurs du signal contenant des domaines SH2 d'interagir avec c-Met et de transmettre le signal en aval. La mutation de ce domaine résulte en la perte des fonctions signalétiques de c-Met (136). La tyrosine 1356 est cruciale pour la dissociation, la motilité et la formation de tubules branchés à partir des cellules épithéliales MDCK (Madin-Darby canine kidney, voir section 1.6.1) (46, 126, 197).

1.2.2.3 Mécanismes régulateurs de c-Met

Il existe dans le domaine kinase de c-Met un résidu tyrosine (Tyr1003), conservé parmi plusieurs familles de récepteurs à activité tyrosine kinase, exerçant un rôle régulateur sur c-Met. La mutation de ce site contrecarre l'effet de perte de fonction d'un récepteur mutant pour le site d'ancrage (Tyr 1349 et 1356) (182). Cbl, une ubiquitine ligase, lie ce résidu phosphorylé, ce qui résulte en l'ubiquitination de c-Met (77), son endocytose, son transport dans le compartiment endosomal et finalement, sa dégradation (134). Plus récemment, il a été démontré que la Tyr 1003 joue un rôle majeur dans le potentiel transformant de c-Met, par l'utilisation d'un mutant (Y1003F) empêchant l'ubiquitination de ce résidu. Ceci favorise l'activation soutenue du récepteur, ce qui mène éventuellement à la tumorigenèse (2).

Un autre résidu, présent dans la partie juxtamembranaire de c-Met, la sérine 985 (Sér985), semble aussi avoir un rôle de régulation négative du récepteur. L'activation des PKC augmente le degré de phosphorylation de la Sér985, ce qui a pour effet de diminuer la phosphorylation des tyrosines du domaine kinase (49). De plus, il semble que la régulation de la phosphorylation de la Ser985 passe par un mécanisme bidirectionnel : la phosphorylation par la PKC et sa déphosphorylation par la phosphatase PP2A (66).

1.2.2.4 Effet du *knock-out* de c-Met

L'effet du *knock-out* de c-Met chez une souris est semblable à l'effet de celui du HGF (21). Lors du développement embryonnaire de ces souris, les précurseurs

myogéniques ne réussissent pas à coloniser les bourgeons qui formeront les membres. Ces embryons meurent aussi *in utero*, dus à un défaut dans le développement placentaire.

1.2.3 Rôle du système HGF/c-Met

Dans un contexte normal, par son interaction avec c-Met, le HGF induit *in vivo* un large spectre d'événements biologiques, incluant la dispersion cellulaire, l'EMT, l'invasion, la prolifération, la transformation, l'angiogenèse et la morphogenèse branchée (19, 21, 48, 196). Ces activités supportent l'organisation tissulaire durant le développement embryonnaire, la régénération des organes et la cicatrisation. Cependant, la dérégulation et/ou l'activation constitutive de c-Met mène à l'apparition de cellules tumorales avec des caractéristiques invasives et métastatiques (109, 196). Ces différents destins de la signalisation HGF/c-Met seront explorés dans les deux sections suivantes.

1.2.4 Implications de c-Met dans la morphogenèse branchée

La morphogenèse branchée, ou tubulogenèse, est un processus critique requis pour la formation d'organes épithéliaux comme le rein, le pancréas, l'intestin, le foie et le poumon (7). Les événements cellulaires complexes induits par le HGF sont médiés principalement par des changements dans la forme cellulaire, par la polymérisation asymétrique des cellules dans la direction du tubule, par la modulation des contacts cellule-cellule, par le remodelage de l'ECM et la motilité cellulaire (196). Le seul facteur étant capable de favoriser l'apparition de tubules branchés chez les cellules MDCK est le HGF (114, 115). En réponse au HGF, ces cellules, exprimant c-Met, forment des tubules tridimensionnels dans le Matrigel® ou le collagène (115). Le processus a lieu en trois étapes (160): la dispersion, régulé par la voie PI3Kinase (142), et la GTPase Rac (140), la croissance, par la voie Ras-MAPKinase (137) et la tubulogenèse, par la voie Stat (22).

1.2.5 Implications du HGF et du récepteur c-Met dans le cancer

1.2.5.1 L'activation constitutive de c-Met

L'activation constitutive des récepteurs tyrosine kinase peut être obtenue par trois mécanismes : 1) une boucle autocrine ligand-récepteur, rendant la cellule libre de toute intervention extérieure; 2) la sur-expression du récepteur, favorisant l'oligomérisation des récepteurs locaux ainsi que leur activation réciproque même en l'absence de ligand ; 3) des altérations structurales du récepteur qui lui permet de fonctionner continuellement (64).

Les mutations rendant c-Met actif de manière constitutive dans les cancers humains sont observées la plupart du temps dans son domaine kinase. Trois boucles présentes dans ce domaine sont conservées pour les mutations observées : les résidus catalytiques, le site d'autophosphorylation et les résidus importants pour la liaison au substrat (19). Les mutations dans cette dernière région sont celles ayant la plus grande activité transformante.

1.2.5.2 Modèles animaux et humains

Les observations décrites à la section précédente ont été validées expérimentalement pour c-Met dans les modèles animaux. Par exemple, des cellules co-exprimant c-Met et le HGF, lorsqu'implantées dans des souris athymiques (« nude mice »), deviennent fortement tumorigènes (14). Les animaux transgéniques qui expriment des formes mutantes actives de manière constitutive de c-Met développent des carcinomes (76). La simple sur-expression de c-Met dans des hépatocytes le sur-active. Cette sur-activation est indépendante du HGF et mène à la formation de carcinomes. De plus cet effet est réversible alors que l'inactivation du transgène de c-Met sur-exprimé fait régresser ces tumeurs, même celles à un stade avancé (178). L'implication de c-Met dans la progression tumorale *in vivo* de cancer humain a été aussi démontrée (149), et quelques exemples sont illustrés au **Tableau 1.1**. Chez l'humain, l'apparition d'une boucle autocrine de HGF activant de manière soutenue les transformations oncogéniques induites par c-Met, est observée dans des tumeurs d'origine mésenchymale (42).

Tableau 1.1 Activités aberrantes de c-Met dans les cancers humains.

Lésion	Type de tumeur
Boucle autocrine dépendante du HGF	Ostéosarcome Rhabdomyosarcome Carcinome de la poitrine
Sur-expression de c-Met	Carcinome thyroïdien, ovarien et prostatique Carcinome pancréatique, rénal, du foie Carcinome gastrique, de l'œsophage, Carcinome de la poitrine et colorectal
Amplification (sur-expression) du gène de c-Met	Métastases du foie venant de carcinome du colon Carcinome du foie
Mutation de c-Met dans les cellules germinales	Carcinome rénal et gastrique
Mutations somatiques de c-Met	Carcinome rénal Carcinome du foie infantile Métastases des noeuds lymphatiques venant de carcinome de la tête et du cou

Tiré de (171)

1.2.5.3 Implication de c-Met dans l'EMT

La dispersion des cellules MDCK en réponse au HGF est un des modèles *in vitro* qui a été utilisé pour étudier les mécanismes par lesquels des cellules épithéliales groupées deviennent des cellules avec un phénotype fibroblastoïde, capable de motilité. Les étapes de l'EMT, décrites dans la section 1.1.4, s'appliquent aussi pour c-Met, dans un contexte *in vivo*. Les altérations sur-activant c-Met, telles que décrites précédemment, mènent à une dissociation des contacts cellule-cellule par la cadhérine-E (167), en plus de l'infiltration des tissus d'origine stromale par les cellules possédant ce c-Met activé par une sur-régulation quantitative ou fonctionnelle des intégrines (124). Aussi, le HGF favorise la redistribution des complexes cadhérine-caténine du cytosquelette d'actine vers la fraction membranaire des cellules (8, 9). La dégradation de l'ECM a lieu par l'intervention des MMPs, tel que décrit précédemment (116). La stimulation du récepteur c-Met par le HGF induit la synthèse de différents types de MMPs, favorisant l'EMT en conditions physiologiques invasives, mais aussi dans une cellule tumorale, favorisant l'invasion de celle-ci dans la circulation (116, 177).

1.2.5.4 Le récepteur oncogénique Trp-Met

Le récepteur Trp (« translocated promoter region »)-Met, tel que décrit plus tôt, est la forme oncogénique et chimérique de c-Met. Ce récepteur, comme son nom l'indique, est la résultante d'une translocation chromosomique entre le promoteur du gène *trp* du chromosome 1 et la région catalytique (le domaine à activité tyrosine kinase) et d'ancrage (région C-terminale) de c-Met présents sur le chromosome 7 (30). Le récepteur Trp-Met ne possède pas la région régulatrice (Ser985 et Tyr1003) et est actif de manière constitutive en absence de ligand. Il est souvent utilisé dans les cellules MDCK comme modèle dans l'étude de la transformation cellulaire menant à la tumorigenèse (39, 87, 134, 145).

1.2.6 La transduction du signal en aval de c-Met

Les résidus tyrosine 1349 et 1356, suite à leur phosphorylation par le domaine kinase de c-Met, interagissent avec une multitude de protéines pour transmettre le message du HGF en aval. La stœchiométrie des molécules recrutées à c-Met activé demeure complexe, même si plusieurs voies signalétiques en aval ont été déterminées. Une vue globale des interactions possibles et de leur implications cellulaires est représentée à la **Figure 1.5**.

Les transducteurs du signal interagissent directement avec c-Met, ou indirectement via les protéines adaptatrices Grb2 (136), SHC (133) et Gab1 (180).

La protéine adaptatrice Crk/CRKL est recrutée à c-Met par Gab1 (50) et est impliquée dans les jonctions d'adhérence, et donc la migration et l'invasion (87, 88). La PI3Kinase (56) interagit directement avec c-Met ou via Gab1 pour favoriser la survie et la migration cellulaire (141, 142). La PLC γ et la kinase Src sont impliquées dans la morphogenèse branchée et l'activité transformante de c-Met (63, 136). La PLC γ interagit directement ou indirectement (via Gab1) avec c-Met. La protéine facteur d'échange de guanine (GEF) de Ras, SOS (57), et la phosphatase Shp2 (44) interagissent indirectement avec c-Met à l'aide des protéines adaptatrices. Stat3 lie directement c-Met démontrant qu'un transducteur du signal contrôlant la transcription est requis pour réguler la morphogenèse branchée (22).

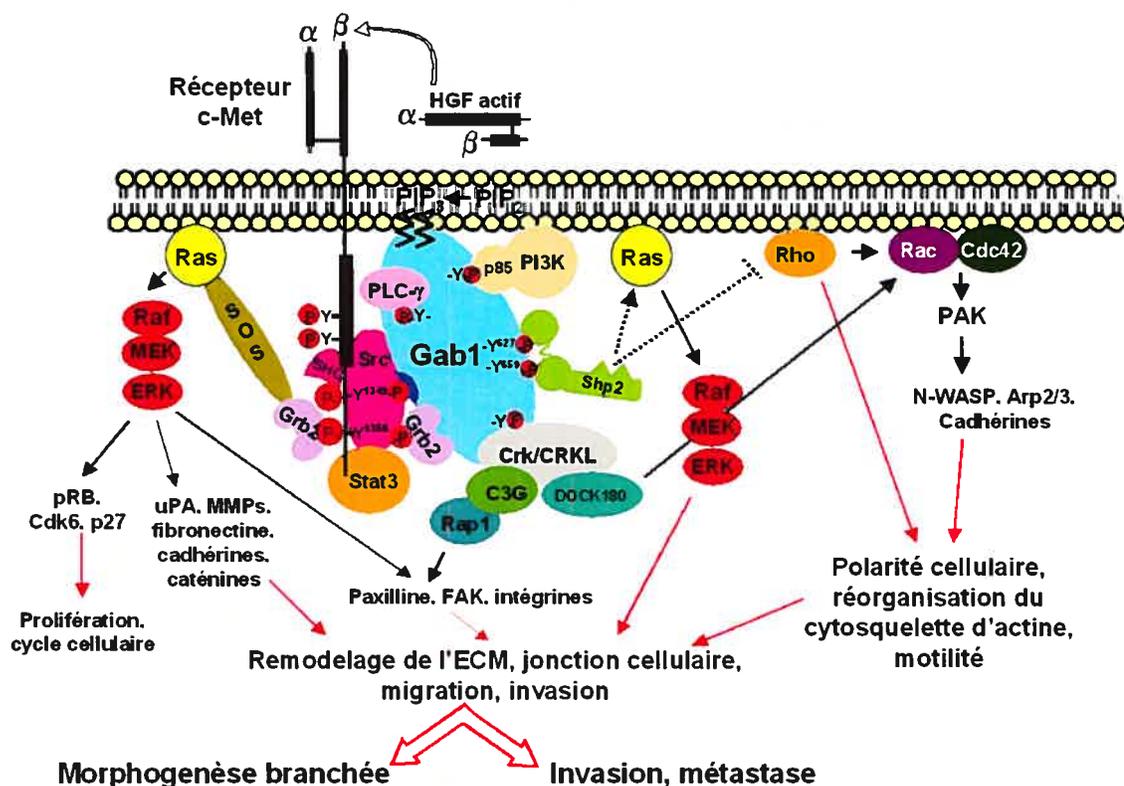


Figure 1.5 : Voie de signalisation du récepteur c-Met.

(inspiré de (19, 48, 196)).

Les protéines transmettant le signal du HGF par la voie de signalisation en aval de c-Met dont il sera question dans ce mémoire sont les protéines adaptatrices Grb2, Gab1 et Gab2, ainsi que la phosphatase à résidus tyrosine Shp2. Ces protéines seront décrites plus en détails dans les sections suivantes.

1.3 La protéine adaptatrice Grb2

La protéine Grb2 (Growth factor receptor bound protein 2) est une protéine adaptatrice clonée en 1992 pour sa capacité à interagir avec les tyrosines phosphorylées du récepteur à l'EGF (102). Grb2 est composée d'un domaine SH3 (domaine liant directement les résidus proline) flanqué par deux domaines SH2 (domaine liant directement les résidus tyrosine phosphorylés). En liant les résidus tyrosines dans la région C-terminale des récepteurs tyrosine kinase avec son domaine SH2, et les

domaines riches en prolines (« proline rich domain ») des protéines qu'elle recrute, elle fait le lien entre les récepteurs et des transducteurs du signal en aval de ceux-ci (197).

Grb2 est impliquée dans la dispersion des cellules MDCK et a un haut potentiel transformant (44), de par sa capacité à favoriser l'association de c-Met à Ras, par l'intermédiaire de SOS, son échangeur de GTP (148). Les cellules exprimant un récepteur mutant de c-Met étant incapable de s'associer à Grb2 (Asn1358His) ne peuvent pas former des tubules branchés en réponse au HGF, attribuant à Grb2 un rôle important dans les activités morphogéniques de ce facteur de croissance (46). De plus, une autre mutation ponctuelle sur c-Met, (His1351Asn) augmente la capacité transformante mais diminue le potentiel métastatique de ce dernier. Cette mutation favorise la liaison de Grb2 à un deuxième site sur c-Met, ce qui a pour effet de sur-activer la voie en aval de Ras. La complémentation de cette mutation (His1351Asn) à la mutation du site de liaison de Grb2 à c-Met (Asn1358His) permet à la cellule de recouvrer son phénotype invasif (54).

1.4 La famille des adaptateurs protéiques Gab

1.4.1 Généralités

Les protéines adaptatrices Gab (« Grb2-associated binder »), comprennent Gab1, Gab2 et Gab3 chez les mammifères et leur homologues DOS (« Daughter of Sevenless ») chez la Drosophile et Soc (« Suppressor-Of-Clear ») chez le Nématode. Ces protéines font partie d'une plus grande famille de protéines adaptatrices comprenant les IRS (« Insulin Receptor Substrate »)-1 à 3, Dok (« Downstream of kinases ») et FRS2 (« Fibroblast growth factor substrate 2 »). Elles sont dépourvues d'activité enzymatique, mais leurs motifs fonctionnels en font des protéines d'ancrages uniques dans la formation de complexes signalétiques. Elles sont impliquées dans l'assemblage et l'échafaudage de voies de signalisations multiples (59, 98). Pour cette raison, les protéines Gab sont des effecteurs majeurs pour transmettre le signal des récepteurs à activité tyrosines kinases et des autres récepteurs membranaires.

1.4.1.1 Clonage et expression des Gab

Gab1 est le premier membre des protéines adaptatrices Gab à avoir été identifié. L'ADNc de Gab1 a été isolé en 1996 d'une librairie d'expression venant d'une tumeur gliale, par son association à une protéine de fusion de Grb2 radiomarquée, d'où son nom (69). Gab2 a été clonée comme partenaire et substrat de Shp2 (60). Gab3 a été découverte plus tard, par des études de discrimination (« screening ») d'une banque d'ADNc, par homologie de séquence à Gab1 (183).

Gab1, Gab2 et Gab3 ont des patrons d'expressions différents mais qui se recouvrent (98). Gab1 semble être la protéine la plus abondante et exprimée dans la plus grande variété de tissus. Gab1 et Gab2 sont exprimées de manière ubiquitaire. Gab1 est plus fortement exprimée dans le cœur, le rein, l'intestin, le placenta, les gonades, le pancréas et les muscles squelettiques. Gab2 est plus fortement exprimée dans le cœur, les testicules et les poumons. Cependant, Gab1 et Gab2 sont exprimées plus faiblement dans les tissus d'origine lymphoïde et hématopoïétique (60, 69). D'une manière réciproque, Gab3 semble exprimée partout, mais d'une manière prépondérante dans les tissus d'origine hématopoïétique (183).

1.4.1.2 Effet du *knock-out* des Gab

Les souris déficientes pour la protéine Gab1 meurent *in utero*. Ces embryons sont caractérisés par une incapacité des cellules précurseurs des muscles des membres inférieurs à migrer, en plus d'une malformation du placenta (74, 143). Fait important, la conséquence de la perte de Gab1 chez ces souris est la même que pour les souris HGF^{-/-} et c-Met^{-/-}. Ces caractéristiques font de Gab1 la protéine majeure dans la voie de signalisation de c-Met.

Les souris Gab2^{-/-} sont généralement en santé et viables ; elles ont cependant une déficience au niveau de la réponse allergique, de par leur incapacité à stimuler le récepteur des immunoglobulines de type E, pour favoriser la dégranulation et l'expression des gènes codant pour les cytokines (61).

L'ablation de Gab3 chez les souris n'a aucun effet, suggérant que Gab3 est redondante à Gab1 et/ou Gab2 (153). Pour cette raison, dans ce mémoire, il sera uniquement question de Gab1 et Gab2.

1.4.1.3 Structure de Gab1 et Gab2

Le gène humain *gab1* donne deux transcrits (69). Le variant transcriptionnel 2 donne une protéine de 694 acides aminés, correspondant à l'isoforme b (la plus étudiée, l'isoforme a donnant 724 acides aminés) d'un poids d'environ 110kDa, variant selon les publications. Gab2 est une protéine de 97kDa et son gène donne aussi deux transcrits. L'isoforme a est composée de 676 acides aminés et l'isoforme b donne 638 acides aminés (60). Gab1 et Gab2 sont composées essentiellement des mêmes régions : un domaine PH, une région riche en proline et de multiples résidus tyrosine. Ces régions sont schématisées à la **Figure 1.6**. L'importance des résidus sérine et thréonine sera traitée dans la section sur la régulation de Gab1 (1.4.1.4).

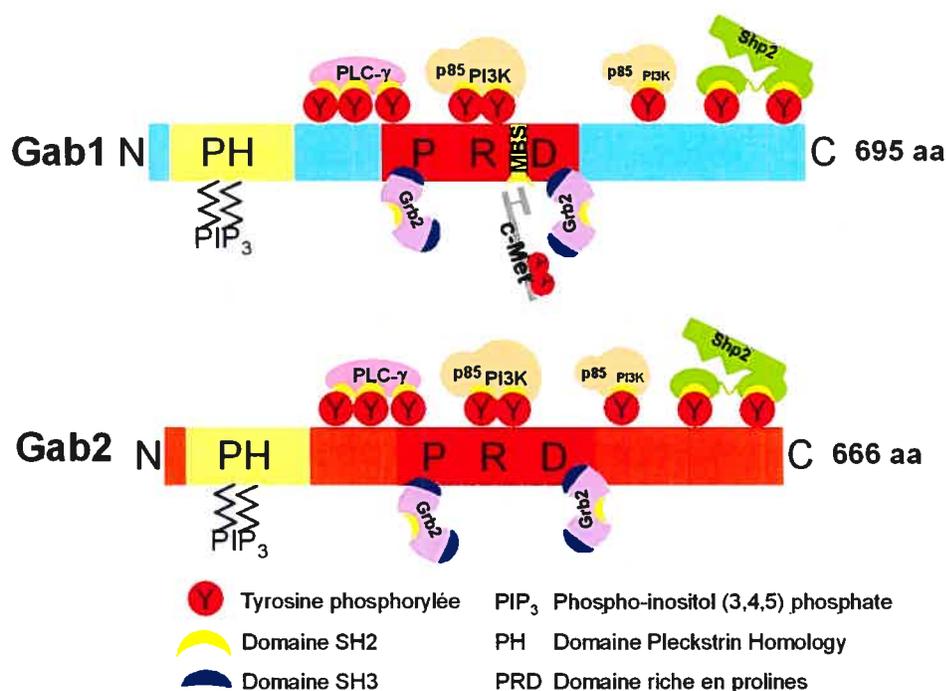


Figure 1. 6 : Domaines fonctionnels de Gab1 et Gab2 et leurs interactions respectives avec les protéines de la voie de signalisation en aval de c-Met.
Inspiré de (98).

Le domaine PH (Pleckstrin Homology) est un domaine permettant le ciblage d'une protéine à la membrane plasmique, par sa grande affinité avec les molécules de PIP₃ (92). Ce domaine est celui étant le plus conservé entre Gab1 et Gab2 (73% d'identité, (60)). Son importance n'est pas seulement au niveau du recrutement de Gab1 et Gab2 à la membrane, mais aussi de la soutenance et la persistance de ce signal.

L'ablation du domaine PH de Gab1 (Gab1 Δ PH) n'influence pas son recrutement au récepteur. Cependant, dans des cellules MDCK ayant perdu la capacité d'effectuer des tubules branchées, alors que Gab1 sauvage est capable de renverser cet effet, la protéine Gab1 Δ PH en est incapable (105). Par contre, la perte ou l'altération du domaine PH de Gab1 ou Gab2 n'entraîne pas de modification dans le niveau de phosphorylation sur tyrosine (58, 105). Finalement, le domaine PH de Gab1 contient aussi un site de localisation nucléaire (« nuclear localisation signal »), qui lui permet, en liant Erk1/2, d'aller activer le facteur de transcription Egr-1 (« early growth response factor-1 »), ce qui induit la migration cellulaire (130).

Le domaine central de Gab1 et Gab2 riche en prolines (PRD pour « proline rich domain »), est important dans la liaison de protéines contenant des domaines SH3, sur des motifs consensus de type Pro-X-X-Pro. La protéine Grb2 lie de manière constitutive le PRD des Gab (60, 69, 183).

Le PRD contient aussi le domaine de liaison à c-Met (MBD pour « Met binding domain »), que possèdent aussi toutes les protéines pouvant s'y lier. Dans ce grand domaine d'environ 83 acides aminés (pour Gab1, (181)), est contenue une séquence de 13 acides aminés qui lui est unique (par conséquent, absente de Gab2). Cette séquence est appelée site de liaison à c-Met (MBS pour « Met binding site ») et permet le recrutement direct de Gab1 à la tyrosine 1349 phosphorylée de c-Met (99, 147). Si un tel motif est inséré dans la protéine Gab2, il est suffisant pour que cette dernière soit recrutée directement à c-Met, en plus d'être essentiel pour diriger la morphogenèse branchée en aval (99). Osawa et al. ont démontré que le MBD contient aussi un site de rétention au cytoplasme (« cytoplasm retention signal », (130)). Cependant, cette étude ne spécifie pas comment Gab1 est retenue au cytoplasme par ce site de rétention.

Les séquences en acides aminés de Gab1 et de Gab2 contiennent 19 tyrosines. Suite à l'activation des récepteurs tyrosines kinase, des récepteurs couplés aux protéines G ou des récepteurs des cytokines, certains de ces résidus sont phosphorylés et deviennent des sites potentiels de liaison pour des protéines contenant des domaines SH2 ou des domaines de liaisons aux résidus tyrosine phosphorylés (PTB, « phosphotyrosine binding »). La phosphorylation sur tyrosine de Gab1 ou Gab2 est donc représentative de

leur capacité à lier des transducteurs du signal et indirectement de l'état d'activation de ces protéines.

1.4.1.4 Régulation négative de Gab1 et Gab2 par phosphorylation sur les résidus sérine et thréonine

Il existe dans la séquence de Gab1 humain 47 résidus sérine et thréonine pouvant être phosphorylés. Les résidus sérine et thréonine de Gab1 font partie d'une boucle de rétroaction négative du signal induit par le HGF (62). L'hyperphosphorylation de Gab1 par la PKB semble induire un changement de conformation dans Gab1. De plus, cette hyperphosphorylation des résidus sérine et thréonine corrèle avec une hypophosphorylation des résidus tyrosine, probablement parce que les sites phosphorylables sur tyrosine ne sont plus atteignables. Ceci rend Gab1 incapable à promouvoir le recrutement d'effecteurs en aval (62).

Une autre étude a révélé la présence d'un mécanisme semblable pour Gab2, par la phosphorylation d'un résidu sérine (Ser159) par la PKB, suite à l'activation des récepteurs Erb (de la famille du récepteur à l'EGR) stimulés par l'héréguline (de la famille de l'EGF). La phosphorylation de ce résidu concorde aussi avec une inhibition de la phosphorylation des résidus tyrosine de Gab2 (104).

1.4.2 Recrutement de Gab1 et de Gab2 à c-Met et activation

Gab1 est recrutée à c-Met suite à sa stimulation par le HGF. Plusieurs séquences d'événement sont possibles. La présence du domaine PH et de Grb2 influencent le recrutement de Gab1 à c-Met. La **Figure 1.7** illustre le cas du recrutement de Gab1 d'une manière dépendante ou indépendante au domaine PH. Comme décrit plus tôt, l'absence du domaine PH de Gab1 n'empêche pas le recrutement de Gab1 à c-Met mais modifie son activation. Selon le contexte, Gab1 est recrutée à c-Met activé, d'une manière soit dépendante de son domaine PH, par la liaison des PIP₃ produits par la PI3Kinase, soit indépendamment du domaine PH, qui ira lier des PIP₃ par la suite (105).

Grb2, à l'aide de ses deux domaines de liaison SH3, lie deux sites de liaison distinct sur Gab1, un site canonique (Pro-X₂-Pro-X-Arg) (126) et un autre atypique (Pro-

X₃-Arg-X₂-Lys-Pro) (100). L'importance de Grb2 dans le recrutement de Gab1 à c-Met a été soulevée lorsque la présence dans Gab1 du MBS a été découverte (99, 147). Gab1 peut être recrutée à c-Met, même si le site de liaison de c-Met à Grb2 est muté. Cependant, lorsqu'une forme mutante de c-Met, incapable d'induire un signal de morphogénèse dans les cellules MDCK, est transfectée dans ces cellules, il doit absolument y avoir recrutement de Gab1 via Grb2 pour renverser cet effet. Donc, il semble que la présence de Grb2 pour faire le lien entre c-Met et Gab1 soit essentielle pour récupérer la perte de la capacité de c-Met à médier le programme de tubulogénèse (99). Ceci suggère que la présence de Grb2 renforce cette interaction en augmentant le potentiel transformant de Gab1 (10).

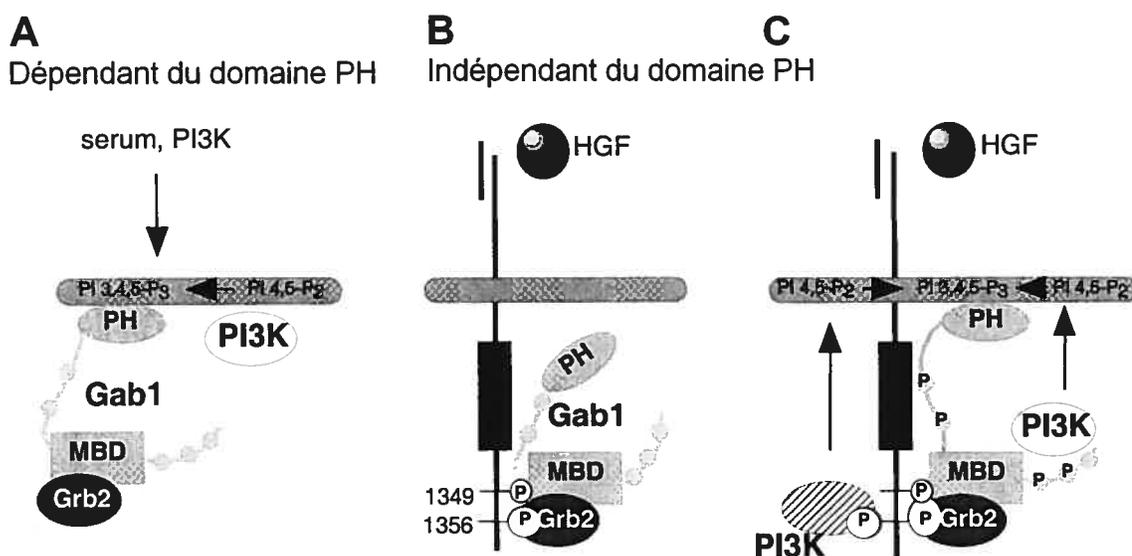


Figure 1. 7 : Mécanismes de recrutement de Gab1 à c-Met par le domaine homologue à la pleckstrine (PH).

A) Recrutement dépendant du domaine PH, en présence de sérum et nécessitant l'activité de la PI3K. Le recrutement de Gab1 d'une manière indépendante à son domaine PH a lieu en un premier temps par le recrutement direct de Gab1 à c-Met activé, tel que présenté en **B**). Lorsque Gab1 recruté à c-Met est phosphorylé, il y aura l'association de la PI3K directement à c-Met ou à Gab1, ce qui stabiliserait l'association de Gab1 à la membrane par la production de PIP₃, tel que présenté en **C**). Adapté de Maroun *et al.* (105).

Gab1 est la protéine la plus phosphorylée suite à l'activation de c-Met (126). Le récepteur lui-même peut phosphoryler Gab1 (10), ainsi que les kinases Src (27) et Erk1/2 (193).

Finalement, Gab2 est recrutée à c-Met d'une manière dépendante à Grb2. Ce complexe est présent en moins grande quantité, puisque Gab1 est préférentiellement

recrutée à c-Met (99). Les mécanismes d'activation de Gab2 en aval de c-Met activé ont été très peu étudiés. Cependant, dans d'autres systèmes de signalisation, Gab2 peut être phosphorylée par Src (83) et Erk1/2 (5)

1.4.3 Les substrats de Gab1 et de Gab2 et leur implication dans la voie de c-Met

1.4.3.1 Shp2

Les conséquences du recrutement de Shp2 à Gab1 ont été longuement étudiées au cours des dernières années. Shp2 interagit avec deux tyrosines phosphorylées de Gab1 (Tyr627 et Tyr659, (33)), suite à l'activation de c-Met (126). Cette interaction est responsable de l'activation de la voie des MAPKinases (106), par l'activation de Ras (125), en aval de plusieurs récepteurs tyrosine kinase dont c-Met, ce qui mène à la prolifération et à la morphogenèse. Une particularité du système de signalisation de c-Met est que cette interaction Gab1-Shp2 favorise une activation soutenue de la voie des MAPK. D'autres récepteurs, comme l'EGF, sont incapables d'activer à long terme Erk1/2 (106). Les cellules exprimant un mutant de Gab1 incapable de lier Shp2 (Gab1 Δ Shp2) sont incapables d'entamer le programme de morphogenèse branchée de c-Met (106). Au contraire, une chimère du domaine PH de Gab1 et du domaine protéine-tyrosine-phosphatase de Shp2 favorise une activation constitutive des MAPK en aval du récepteur à l'EGF (34). Le mécanisme d'activation de Ras par Shp2 sera discuté dans la section concernant Shp2.

La surexpression de mutants de Gab2, incapables de lier Shp2, empêche aussi l'activation de la voie des MAPK dans le système de signalisation du récepteur au CSF (« colony stimulating factor ») (97). Par contre, d'autres études ont montré que la voie des MAPK n'était pas ciblée lors de la perte de l'interaction Gab2-Shp2, mais plutôt l'activation précoce de certains gènes. Aussi, l'interaction entre Gab2 et Shp2 peut être régulée par l'ancrage de Erk1/2 sur Gab2, suite à l'activation du récepteur à l'interleukine-2 (60). Les MAPK Erk1/2 phosphorylent un résidu sérine spécifique de Gab2 (Ser623, (5)), présent dans le site consensus de liaison à Shp2. Le changement de conformation induit par cette phosphorylation empêche le recrutement de Shp2 à Gab2, ce qui inhibe l'activation de Erk1/2 dans les lymphocytes T (5). Ces résultats suggèrent donc que Gab2 semble impliquée dans l'activation de la voie des MAPK, par sa capacité

à recruter Shp2. Il est important de noter que l'implication du recrutement de Shp2 à Gab2 en aval de c-Met spécifiquement n'a pas été étudiée.

1.4.3.2 La PI3K et la PLC γ

La localisation de Gab1 aux sites de contact entre les cellules requiert l'activité de la PI3K (105). La PI3K peut lier trois résidus tyrosine sur Gab1 (126). Elle est impliquée dans la survie cellulaire, mais aussi dans la motilité induite par c-Met, par le désassemblage des jonctions adhérentes et la dispersion cellulaire (139). La PLC γ peut aussi lier Gab1 sur trois résidus tyrosine et est absolument essentielle dans le phénomène de tubulogénèse dirigée par c-Met (63). Gab2 peut aussi lier la PI3K (32, 60) et la PLC γ (60).

1.4.4.3 Les MAPK Erk1/2

Comme décrit plus tôt, les MAPK Erk1/2 interagissent avec Gab1 et Gab2. Erk1/2, par son association avec Gab1, peut réguler l'interaction de Gab1 avec la PI3K, suite à l'activation de c-Met, par la phosphorylation d'un des trois sites consensus permettant sa liaison (193). Il a été récemment montré que Gab1 possède un motif dans son domaine PH, pouvant servir de site de localisation nucléaire, ainsi qu'un site de rétention cytoplasmique dans son MBD. Il semble que l'interaction de Erk1/2 avec Gab1 favorise leur localisation au noyau, suite à la stimulation de la migration par le sérum, dans des cellules endothéliales (130). Par contre, au meilleur de notre connaissance, l'implication de cette interaction dans la voie de signalisation de c-Met n'a pas été étudiée. Gab2 peut aussi interagir avec Erk1/2, comme décrit ci-dessus, pour la régulation du recrutement de Shp2. Cependant, l'implication du recrutement de Erk1/2 à Gab2 suite à la stimulation de c-Met demeure inconnue. Il est possible de suggérer que le recrutement de Erk1/2 sur les adaptateurs Gab servirait de boucle de rétroaction négative dans l'interaction avec leurs substrats respectifs (PI3K, Shp2) en aval de c-Met.

1.4.4 Rôle compensatoire de Gab2 vis-à-vis de Gab1

Comme il a été question dans une section précédente, lorsque le MBS de Gab1 est inséré dans le MBD de Gab2, ceci est suffisant pour recruter directement Gab2 au récepteur c-Met activé, à la tyrosine 1349 (99). Cette étude démontre que dans des cellules MDCK transfectées avec un mutant de c-Met incapable de lier Grb2 (et par conséquent de promouvoir le programme de tubulogénèse de ces cellules), ni l'insertion du MBS dans Gab2, ni sa surexpression, ne réussissent à renverser cet effet. Ces cellules possèdent un mutant de c-Met incapable de lier Grb2 (99). Cependant, l'effet de l'ablation complète de Gab1 et l'implication de Gab2 dans ces conditions, en aval de c-Met activé, n'a pas été investigué à ce jour. Récemment, une étude a montré que Gab2 pouvait prendre le relais de Gab1, en aval du récepteur à l'EGF, dans des cellules où l'expression de Gab1 avait été abolie. La complémentation de la fonction de Gab1 par Gab2 fut montrée, entre autres, par le recrutement de Shp2 pour promouvoir l'activation de la voie des MAPK (111).

1.4.5 Implication de Gab1 et Gab2 dans le cancer

Gab1 est la protéine la plus phosphorylée dans les cellules épithéliales dirigeant un programme de morphogénèse (69, 126). L'implication de Gab1 dans la croissance et la transformation cellulaires a été démontrée dès le départ, lors de son clonage (69). Le recrutement constitutif de Gab1 à la membrane par l'ajout d'un signal de myristoylation à l'extrémité N-terminale induit, suite à la stimulation par le EGF, la transformation des cellules exprimant ce mutant et stimule leur capacité d'invasion, *in vitro* (107). De plus, l'interaction entre Gab1 et Shp2 est essentielle pour la transformation cellulaire induite par l'EGF (70, 191). Une étude récente démontre que la liaison de Gab1 à Trp-Met est essentielle pour l'induction de la progression du cycle cellulaire, de la prolifération et la transformation oncogénique (117). Ce fait soulève l'importance que pourrait avoir Gab1 dans des cellules tumorales où c-Met est activé de manière constitutive et dirige un programme d'invasion. Ainsi, l'ablation génique de Gab1 ou de c-Met, dans un tel modèle cellulaire, devrait avoir l'effet contraire.

Le rôle de Gab2 dans la promotion du cancer a été mis en évidence principalement dans celui du sein et du système immunitaire. Gab2 est sur-exprimée dans le cancer du sein. En effet, le gène encodant Gab2 est localisé sur le chromosome 11q13.3-14.2 (187) et une amplification de la région 11q13 est observée dans 10 à 15 % des cancers du sein (152). Finalement, la co-expression de ErbB2/Neu (membre de la famille des récepteurs à l'EGF) et de Gab2 dans des cellules tumorales induit un phénotype invasif, par l'activation de la voie Shp2-MAPK (16). Par ailleurs, des cellules déficientes en Gab2 sont plus résistantes à la transformation induite par le récepteur des cellules B activé de manière constitutive, dans la leucémie myélogène chronique (« chronic myelogenous leukemia »).

1.5 La protéine-tyrosine-phosphatase Shp2

1.5.1 Généralités

Les phosphatases contenant des domaines SH2, ou Shp (« SH2 domain-containing phosphatases ») sont de petites phosphatases non-membranaires à résidus tyrosine et conservées durant l'évolution. Dans ce mémoire, il sera question de Shp2.

1.5.1.1 Clonage, structure et expression de Shp2

Shp2, qui est encodée par le gène *PTPN11*, a été clonée en 1993 sous le nom de SH-PTP2 et a aussi été appelée Syp, SH-PTP3, PTP1D, et PTP2C (41, 47). Sa structure est représentée à la **Figure 1.8A**. Elle est composée de deux domaines SH2 en N-terminal (N-SH2 et C-SH2), puis d'un domaine protéine-tyrosine-phosphatase (PTP) contenu dans la queue C-terminale. La queue C-terminale possède aussi deux résidus tyrosine (Tyr542 et Tyr580), responsables de sa régulation. Ce domaine PTP contient un résidu cystéine, responsable du clivage d'un phosphate sur une tyrosine phosphorylée. Shp2 est exprimée de manière ubiquitaire.

catalytique de son domaine PTP. Le NSC-87877 inhibe l'activation de la voie des MAPK induite par l'interaction Gab1-Shp2, en aval du récepteur à l'EGF (28).

1.5.1.3 Effet du *knock-out* de Shp2

L'ablation du gène codant pour Shp2 a démontré son importance dans plusieurs processus développementaux, par exemple dans les mouvements morphogéniques observés durant la gastrulation (146). L'ablation de l'exon 2 ou de l'exon 3 chez la souris mène à la mort embryonnaire (175).

1.5.2 Mécanismes d'activation et de régulation

Sous sa forme inactive, Shp2 est en conformation « fermée », et son domaine PTP est inhibé par l'interaction avec son domaine N-SH2, qui se trouve inséré dans la boucle catalytique, tel que représenté à la **Figure 1.8B**. La mutation du motif compris dans le domaine N-SH2 liant le domaine PTP de Shp2 donne un mutant actif de cette dernière. La résultante fait que les sites de liaisons compris dans les domaines SH2 de Shp2 sont exposés au solvant et peuvent interagir avec leur partenaires habituels (129).

Deux mécanismes principaux sont proposés pour expliquer l'activation de Shp2. Shp2 peut entrer en contact avec une protéine de liaison qui contient deux résidus tyrosine phosphorylés, appelé motif BTAM (« biphosphoryl tyrosine-based activation motif »). Cette interaction induira un changement de conformation allostérique dans la protéine et Shp2 passera de la forme inactive à la forme active, tel que schématisé à la **Figure 1.8B**, mécanisme 1 (162). La révélation de la structure cristalline de Shp2 favorise grandement ce mécanisme (68). Des travaux plus récents (**Figure 1.8B**, mécanisme 2) suggèrent cependant un autre mécanisme d'activation, faisant intervenir les deux résidus tyrosine de la queue C-terminale de Shp2. Ces deux résidus phosphorylés seraient en mesure d'interagir avec les sites de liaisons des domaines SH2 et ainsi de libérer le domaine PTP (15). Cette seconde possibilité demeure cependant controversée (125).

Le domaine N-SH2 de Shp2 est responsable de la régulation de l'activité phosphatase (11). La queue C-terminale, plus particulièrement les deux résidus tyrosines,

semblent aussi impliqués dans la régulation de l'activité de Shp2. Par contre, ces mécanismes demeurent incompris et les études s'y reliant se contredisent. Deux fonctions de la phosphorylation des résidus de la queue C-terminale peuvent être proposées : 1) une fonction adaptatrice, en liant par exemple le domaine SH2 de Grb2 et 2) la régulation directe de l'activité phosphatase (138). Certains travaux suggèrent que la phosphorylation des Tyr542 et Tyr580 augmente l'activité catalytique de Shp2 (176), alors que d'autres études ne trouvent aucun lien entre la phosphorylation et l'activité PTP de Shp2. Une étude utilisant des phosphonates (des molécules non-hydrolysables mimant des tyrosines phosphorylées) à la place des Tyr542 et Tyr580, a révélée que la Tyr542 phosphorylée interagissait avec le domaine N-SH2, de manière à enlever l'inhibition du domaine PTP. La Tyr580, quand à elle, servirait plutôt à stimuler l'activité phosphatase, par son interaction avec le domaine C-SH2. De plus, la phosphorylation de ces deux résidus, suite à l'activation du récepteur du PDGF, stimule l'activité catalytique de Shp2 (103). Cependant, la mutation des résidus tyrosine de Shp2 pour des résidus phénylalanine n'ont pas d'effet suite à la stimulation par le FGF, dans un système modèle de Xénope (128).

D'autres auteurs ont voulu comprendre l'influence du contexte cellulaire dans l'activation de Shp2. Il ressort dans cette étude que la régulation de Shp2 semble être dépendante du type cellulaire et du facteur de croissance. Dans des fibroblastes, les Tyr542 et Tyr580 sont phosphorylées en réponse au PDGF, mais pas à l'EGF ni à l'IGF (4). La phosphorylation de ces deux résidus tyrosine semble avoir un rôle auxiliaire dans l'activation du domaine PTP de Shp2, puisque cette phosphorylation augmente très peu l'activité PTP, suite à l'activation de certains récepteurs (4). Aucune étude de la sorte n'a été effectuée dans le système de signalisation du récepteur c-Met.

1.5.3 Interactions

Shp2 lie directement ou via des intermédiaires une variété de protéines, incluant certains récepteurs à activité tyrosine kinase et les récepteurs des cytokines, les récepteurs inhibiteurs (« immune inhibitory receptors ») et les protéines d'échafaudage

IRS et FRS et les Gab (125). Il sera question dans cette section des interactions de Shp2 dans la voie de signalisation de c-Met.

1.5.3.1 Grb2

Comme décrit plus tôt dans les mécanismes de régulation de Shp2, il existe un modèle adaptateur où Shp2 est capable de recruter Grb2, sur la Tyr542 phosphorylée, suite à l'activation du PDGF (15). Cette interaction serait impliquée dans l'activation de la voie des MAPK (15). Par contre, il semble que cette interaction ne soit pas suffisante pour activer totalement la voie, car Erk1/2 demeurent phosphorylées au-dessus du niveau contrôle dans des cellules ayant un Shp2 mutant pour les résidus tyrosine de sa queue C-terminale (4).

1.5.3.2 Gab1 et Gab2

Les adaptateurs Gab semblent responsables du recrutement et de l'activation de Shp2. La phosphorylation des résidus tyrosine de ces protéines crée un motif BTAM, sur lequel Shp2 se lie, ce qui favorise sa conformation ouverte (33). Shp2, en étant liée à Gab1 ou Gab2, peut jouer un rôle important dans la régulation des sites de liaisons (sur les tyrosines phosphorylées) des protéines interagissant avec cette dernière. Des études de « substrate-trapping » ont révélé que Gab1 est un substrat de Shp2 (3). Il a été aussi démontré que Shp2 peut réguler l'interaction de Gab1 et de la PI3K, suite à l'activation du récepteur à l'EGF (195).

Comme il en a été question plus tôt, l'interaction Gab1-Shp2 est absolument essentielle pour une activation soutenue de la voie des MAPK, permettant à c-Met d'engager son programme de tubulogénèse chez les cellules MDCK (106).

1.5.4 Fonctions de Shp2

1.5.4.1 Activation de la voie des MAPK

Une des fonctions importantes et reconnues de Shp2 est l'activation de la voie des MAPK. La surexpression d'une forme catalytiquement inactive de Shp2 est suffisante pour inhiber la morphogénèse branchée dirigée par le HGF, dans des cellules épithéliales

(106). Pour activer Erk1/2, Shp2 doit être recrutée à Gab, ce qui lui permettra d'activer indirectement Ras, selon un mécanisme encore incompris. Plusieurs hypothèses ont été suggérées, mais encore une fois, le mécanisme dépend du récepteur.

Globalement, Shp2 régule par déphosphorylation l'activation de Ras de deux manières : 1) en activant des protéines activatrices de Ras, 2) en inhibant des protéines inhibitrices de Ras. Shp2 peut agir directement sur les protéines Gab, ou sur d'autres protéines.

Dans la **Figure 1.9A**, Shp2 est recrutée à Gab et régule un site de phosphorylation sur cette dernière, empêchant la liaison d'une protéine sur un résidu phosphotyrosine. Par exemple, dans le système de signalisation du récepteur à l'EGF, il semble que Shp2, une fois recrutée à Gab1, soit en mesure de déphosphoryler un site de liaison à RasGAP sur Gab1, enlevant de cette manière l'inhibition sur Ras (113). La **Figure 1.9B** représente un autre type de régulation, cette fois-ci sur une protéine liant Gab. Finalement, le mécanisme le plus favorisé est celui représenté à la **Figure 1.9C**, où Shp2 est recrutée à Gab et déphosphoryle d'une manière ciblée son substrat qui est localisé dans le compartiment membranaire, puisque les protéines Gab possèdent un domaine PH, qui les cible à la membrane.

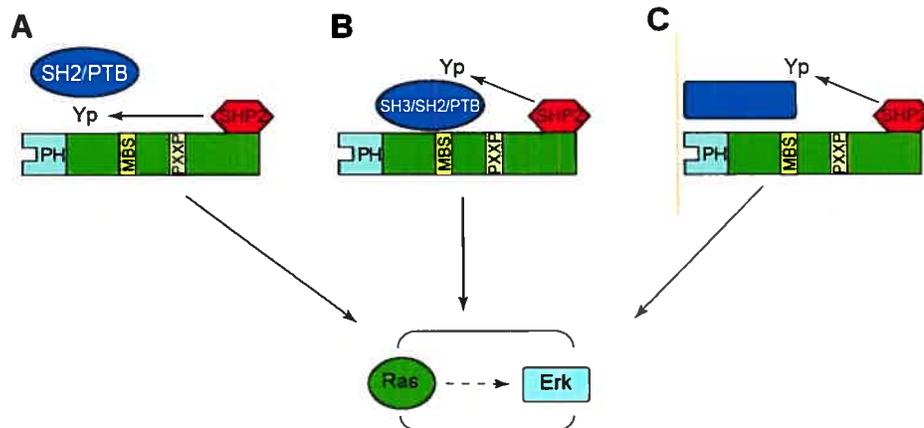


Figure 1. 9 : Modèles de régulation de l'activation de Ras par le recrutement de Shp2 à Gab.

Adapté de (59).

1.5.4.2 Remodelage du cytosquelette

Une autre fonction reconnue et bien étudiée dans le système de signalisation de c-Met est le remodelage du cytosquelette dirigé par Shp2. La sur-expression d'un mutant à action dominante négative de Shp2 a révélé qu'elle était impliquée dans l'organisation du cytosquelette, par la régulation de l'adhésion médiée par les intégrines, la dispersion et la migration et aussi la phosphorylation des protéines impliquées dans la formation des plaques d'adhésion focale (73). Suite à l'activation de c-Met, l'activation de Shp2 inhibe l'activité de la petite protéine G Rho (de la famille du même nom), diminuant la formation des fibres de stress et des plaques adhésion focale. Ainsi, l'activation de la voie c-Met/Shp2/Rho par le HGF régule en partie le réarrangement du cytosquelette menant à la dispersion des cellules MDCK (82). De plus, l'expression d'un mutant à activité dominante active de Rho inhibe l'effet du HGF chez ces cellules (140).

1.5.5 Implication de Shp2 dans le cancer

Shp2 semble la seule phosphatase à avoir un potentiel oncogénique (131). De par sa capacité à remodeler le cytosquelette, Shp2 est impliquée dans de nombreux phénomènes permettant aux cellules tumorales d'acquérir un phénotype invasif. Des mutations activatrices dans Shp2 ont été découvertes dans plusieurs tumeurs, incluant le poumon, le colon, les mélanomes et neuroblastomes (17, 168). Des mutants actifs de Shp2 sont oncogéniques pour les souris transgéniques (112).

1.6 Lignées cellulaires

Afin de mieux comprendre les phénomènes associés à l'acquisition des propriétés métastatiques des cellules tumorales, le laboratoire du Dr Noël utilise trois lignées cellulaires, représentées à la **Figure 1.10A**. Le présent projet de recherche s'intègre dans cette thématique.

1.6.1 Les cellules MDCK

Les cellules MDCK (Madin-Darby canine kidney) sont des cellules épithéliales polarisées dérivées du rein d'un épagneul, sans exposition intentionnelle aux carcinogènes (51). Lorsqu'elles sont cultivées dans un Pétri, elles forment une monocouche polarisée. En plus d'être largement utilisées pour des études de transport transépithélial d'ions (81, 127), les cellules MDCK servent de modèle *in vitro* pour l'étude des mécanismes complexes impliqués dans le mouvement des cellules épithéliales tels la dispersion (cellules cultivées à faible densité sur du plastique), la tubulogénèse (cellules cultivées sur un gel de collagène) et la dédifférenciation (cellules cultivées sur un filtre perméant) (Voir référence (7) pour plus de détails). Les cellules MDCK ont ainsi été les premières à être utilisées pour démontrer l'effet du HGF dans la dispersion des cellules (160). En effet, ces cellules répondent très bien au HGF, surtout la souche I, de forte résistance transépithéliale (7, 174).

1.6.2 Les cellules MSV-MDCK

1.6.2.1 Effet du virus du sarcome de Moloney (MSV) sur la transformation cellulaire menant à la tumorigénèse

Les virus sont liés à des formes de cancers spécifiques. Certains virus, qui ne sont pas directement impliqués dans la tumorigénèse, encodent des protéines capables d'immortaliser les cellules en culture et de causer des tumeurs dans des animaux transgéniques (85, 156, 159). Comme dans la plupart des cancers, les cancers associés à des virus présentent des anomalies chromosomiques, qui sont impliquées ou qui contribuent directement à la transformation cellulaire menant à la progression tumorale (37).

Le virus du sarcome de Moloney, ou MSV, induit rapidement des sarcomes locaux chez les souris (40). L'oncogène *v-mos*, dérivé du gène *c-mos*, est responsable des effets du MSV dans la cellule (164). Le gène *c-mos* est impliqué dans une multitude de phénomènes, incluant la croissance et la survie, mais surtout dans le cycle-cellulaire (192) où il est responsable entre-autres de la régulation de la voie des MAPK dans les

cellules germinales (163). La modification de ce gène pour une forme virale, en l'occurrence *v-mos*, est dommageable pour la cellule et entraîne l'apparition d'anormalités génétiques causant la transformation cellulaire et la formation de tumeurs (37, 155, 192).

1.6.2.2 Les propriétés des cellules MSV-MDCK

Afin de 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 murin a été utilisé. Cette lignée de cellules transformées, les cellules MSV-MDCK, a été obtenue chez American Type Culture Collection (sous le nom de DoCl1, #CCL-34.1). Les cellules MSV-MDCK ont une morphologie fibroblastoïde, ne forment pas de contacts intercellulaires serrés et ont perdu leur forme cuboïdale (**Figure 1.10A**) ainsi que leur capacité à se polariser (13, 154). En comparaison 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, possèdent moins de fibres de stress en plus d'avoir une distribution différente de certaines protéines telles que la cadhérine-E, la desmoplakine (desmosomes) et ZO-1 (jonction serrées) (13, 90, 154).

Dans les cellules MDCK, ces protéines (la cadhérine-E, la desmoplakine et la ZO-1) sont localisées aux membranes latérales, alors que dans les cellules MSV-MDCK, il y a une perte ou une expression désorganisée de ces protéines, d'où le phénotype fibroblastoïde. Une perturbation et/ou une diminution de l'expression de ces protéines dans les cellules MSV-MDCK suggère 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. Ces cellules MSV-MDCK sont d'ailleurs plus motiles et invasives que les cellules MDCK (154) et que le mouvement des cellules MSV-MDCK est plus directionnel (154). Il est également important de mentionner que la lignée cellulaire MSV-MDCK est hétérogène et que certains clones ont une motilité accrue (154).

1.6.3 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 I.R. Nabi (90). Elles sont particulièrement intéressantes du fait qu'elles possèdent des caractéristiques de cellules épithéliales transformées et de cellules invasives.

1.6.3.1 Sélection

Tel que mentionné, 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.

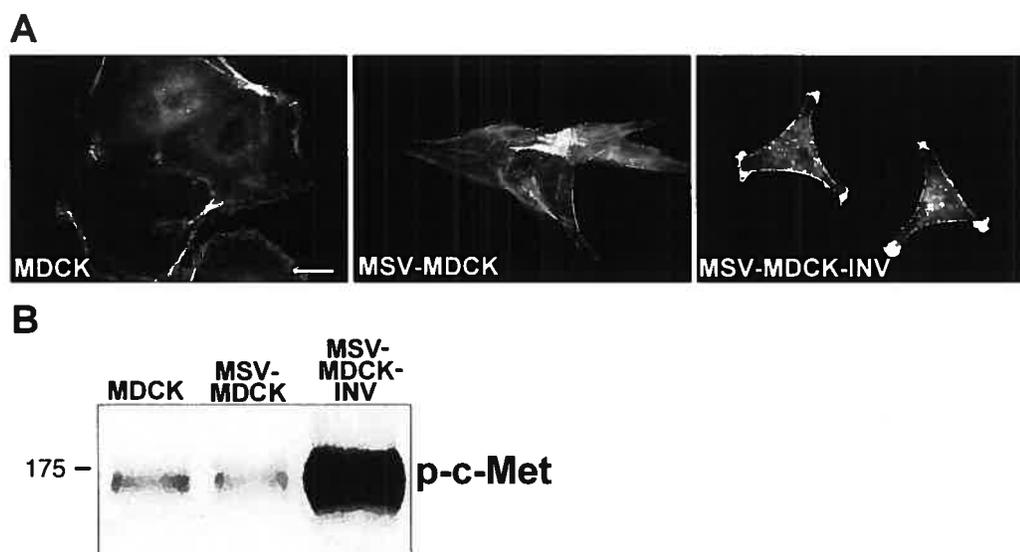


Figure 1. 10 : Représentation des cellules MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV et niveau d'expression de c-Met phosphorylé.

A) Marquage de l'actine-F dans les trois modèles cellulaires B) Immunoprécipitation de c-Met et détection des tyrosines phosphorylées par immunobuvardage de type Western. Figure adaptée de Vadnais *et al* (174).

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 été ensemencées dans la chambre supérieure sur le filtre recouvert de Matrigel® et après 24h d'incubation, les cellules ayant 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. Ainsi, les cellules MSV-MDCK-INV possèdent un phénotype stable et distinct des lignées parentales, les cellules MDCK et MSV-MDCK.

1.6.3.2 Propriétés

Les cellules MSV-MDCK-INV sont principalement caractérisées par de multiples pseudopodes, riches en actine (**Figure 1.10A**). Elles n'ont pas de fibres de stress et font moins de contacts intercellulaires (90). De plus, les actines α , γ , G et F sont distribuées à travers tout le cytoplasme et aussi en périphérie dans les cellules MDCK et MSV-MDCK, tandis que dans la lignée MSV-MDCK-INV, ces protéines sont plus concentrées dans les pseudopodes, mais en étant tout de même présentes à travers le cytoplasme (90).

Il a également été démontré que les multiples protusions pseudopodiales riches en actine β sont concentrées en protéines phosphorylées (174). De nombreuses protéines sont hautement phosphorylées sur les résidus tyrosine dans les cellules MSV-MDCK-INV en comparaison aux cellules MDCK et MSV-MDCK. Initialement, la découverte d'une protéine hautement phosphorylée ayant le poids moléculaire d'un récepteur membranaire a poussé l'équipe du Dr Noël à identifier si cette protéine était liée au phénotype particulier de ces cellules. Le séquençage de cette protéine phosphorylée a mené à l'identification du récepteur c-Met, représenté à la **Figure 1.10B** (174). 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. Il a également été démontré que cette activation constitutive du récepteur était due à une boucle autocrine et que la sécrétion de HGF par ces cellules suivie de l'activation de leurs récepteurs c-Met était directement responsable de la formation des pseudopodes et de ce fait, du potentiel motile des cellules MSV-MDCK-INV (174). Une étude récente a aussi démontré que les protéines RhoA, ROCK (Rho Kinase) et la MAPK p38 étaient présentes dans les protrusions pseudopodiales de ces cellules, et était en partie responsable de la régulation de la formation des pseudopodes et de bourgeonnements membranaires (« membrane blebbing »(79)).

1.7 Hypothèses et objectifs

Le laboratoire du Dr Noël se concentre sur la compréhension des modifications dans les voies de signalisation lors de l'acquisition par une cellule normale d'un phénotype tumoral et invasif.

c-Met est un récepteur tyrosine kinase impliqué, dans un contexte normal, dans le mouvement cellulaire invasif nécessaire à l'embryogenèse et à la cicatrisation. Lorsqu'il est dérégulé par différents mécanismes, ou qu'une voie d'activation autocrine s'installe, il devient sur-activé et participe ainsi à la progression et l'apparition de métastases. c-Met module ces messages par l'intermédiaire de molécules signalétiques, qui seront activées séquentiellement. Parmi ces effecteurs se trouvent la protéine adaptatrice Grb2, la protéine d'échafaudage Gab1 et la phosphatase à résidus tyrosine Shp2.

Gab1 est la protéine majeure de la voie de signalisation de c-Met. De par sa capacité à ancrer et à activer différentes protéines, elle concentre et potentialise le signal du HGF en aval de c-Met. Pour cette raison, le laboratoire du Dr Noël a voulu déterminer le rôle de Gab1 dans les modèles cellulaires transformés par le MSV, les cellules MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV.

Un immunobuvardage de type Western de Gab1, réalisé préalablement à la présente étude, avait montré que Gab1 est fortement exprimée dans les cellules parentales MDCK, tel que déterminé avec un anticorps ciblé contre l'extrémité C-terminale (acides aminés 664 à 694), mais qu'elle n'était pas détectée dans les cellules transformées. Considérant le rôle essentiel de Gab1 non-seulement dans la transduction du signal de c-Met, mais aussi dans la tumorigenèse en général, et considérant le phénotype invasif des cellules MSV-MDCK-INV où c-Met est constitutivement actif, il nous apparaissait impossible que Gab1 soit absente. L'objectif de mon projet était donc de déterminer l'importance de Gab1, de Gab2 et de Shp2 dans la voie de signalisation de c-Met constitutivement actif des cellules MSV-MDCK-INV.

Trois différentes possibilités ont été étudiées pour comprendre la signification de l'absence ou la non-détection de Gab1 dans les lignées MDCK transformées. Premièrement, nous avons émis l'hypothèse que Gab1 est présente, mais qu'une modification dans sa séquence empêchait sa reconnaissance par l'anticorps

utilisé. Nous croyions que Gab1 était modifiée, mais tout de même en mesure de recruter ses partenaires habituels, en particulier Shp2. Deuxièmement, nous avons abordé la possibilité que Gab1 soit absente, mais que Gab2 prenne le relais, de manière à compenser pour l'interaction avec Shp2, afin de faire un lien entre le récepteur c-Met activé et les effecteurs de la voie de signalisation en aval. Troisièmement, nous avons exploré l'hypothèse de la présence d'une voie de signalisation parallèle et indépendante des protéines Gab1/2 dans les cellules transformées, capable de relier c-Met à Shp2. Finalement, nous avons déterminé l'implication de Shp2 dans nos modèles cellulaires, en inhibant cette dernière et en observant les changements phénotypiques et moléculaires et leur implication dans le phénotype motile des cellules MSV-MDCK-INV.

2. Matériel et méthodes

2.1 Anticorps et réactifs

2.1.1 Réactifs de culture cellulaire

Le DMEM, le FBS, la glutamine, les acides aminés non-essentiels, les vitamines, la pénicilline, la streptomycine et la trypsine ont été achetés chez Gibco Life Technologies (Burlington, ON).

2.1.2 Anticorps primaires

Les anticorps (α) polyclonaux dirigés contre Gab1 (clone H-198), l' α -HGF et l' α -phosphotyrosine sont de la compagnie Santa Cruz (Santa Cruz, CA). L' α -CT-Gab1 et l' α -Gab2 sont de chez Upstate (Lake Placid, NY). L' α -phospho-c-Met (Tyr1230/1234/1235) et l' α -CT-c-Met sont de Biosource International (distribué par Medicorp Inc, Montréal, Qc). L' α -phospho-Shp2 (Y542), l' α -phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) et l' α -ERK1/2 et l' α -MEK2 sont de la compagnie Cell Signalling (distribué par New England Biolabs LTD., Mississauga, ON). Les anticorps monoclonaux α -Shp2 et α -Grb2 sont de la compagnie BD Transduction Laboratories (Mississauga, ON). L' α -actine- β est de la compagnie Sigma (St-Louis, MO). Le réactif utilisé pour marquer l'actine F est la Phalloïdine-Texas-Red, acheté de la compagnie Molecular Probes (Eugene, OR).

2.1.3 Anticorps secondaires

Les anticorps secondaires produits dans la chèvre et dirigés contre les immunoglobulines de type G (IgG) de souris ou de lapin couplés à l'enzyme HRP ont été obtenus de Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, PA). Les anticorps secondaires produits dans la chèvre et dirigés contre les immunoglobulines de type G de souris et de lapin couplés aux fluorophores Alexa 488nm ou 595nm sont de la compagnie Molecular Probes (Eugene, OR).

2.1.4 Autres produits

Le facteur de croissance hépatique recombinant humain (rHGF pour « recombinant recombinant hepatocyte growth factor ») est de la compagnie Biosource (distribué par Medicorp Inc, Montréal, Qc). La calpeptine (CP pour « calpeptin ») est de la compagnie Chemicon (La Jolla, CA). L'inhibiteur de la calpaine-I (CI-I pour « calpain inhibitor-I ») est de la compagnie Sigma (St-Louis, MO). Le réactif de chimioluminescence augmentée (ECL pour « enhanced chemiluminescence ») a été obtenu de Mandel (St-Laurent, Qc). Le réactif à base d'acide bicinchoninique (BCA pour « 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 transcriptase inverse SuperScriptIII, la RNaseH, la RNaseOUT, le TRIZol et les dNTPs sont de la compagnie Invitrogen (Burlington, ON). La polymérase Phusion est de la compagnie New England Biolabs (Mississauga, ON).

2.2 Culture cellulaire

Les cellules MDCK, MSV-MDCK (appelées MSV par la suite) et MSV-MDCK-INV (appelées INV par la suite) sont mises en culture dans du milieu DMEM contenant du NaHCO_3 25 mM (DMEM- NaHCO_3) supplémenté de FBS 10%, d'acides aminés non-essentiels 10 mM, de glutamine 1 mM, de vitamines 10 mM, de pénicilline et de streptomycine sous une atmosphère de 5% CO_2 , à 37°C. Afin de conserver les phénotypes propres à chacune de ces lignées (particulièrement pour les cellules MSV-MDCK-INV qui ne doivent pas atteindre une confluence de plus de 70%), il convient de respecter les densités d'ensemencement suivante entre les passages : 1×10^6 , 2×10^5 et 2×10^5 cellules par plat de 100 mm pour les MDCK, les MSV et les INV respectivement. Lors des passages effectués trois fois par semaine, les cellules MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV sont rincées au PBS et incubées 40 secondes avec la trypsine 0,05%. Les cellules MDCK, elles sont rincées et incubées pendant 20 minutes avec la trypsine 0,25%. Pour la préparation de lysats cellulaires totaux, les cellules sont ensemencées à

une densité de 1×10^6 , 6×10^5 et 5×10^5 cellules par plat de 100 mm pour les MDCK, les MSV et les INV respectivement, pendant 48h dans du milieu 10% FBS.

2.2.1 Préparation des lysats cellulaires totaux

Après une culture et des traitements d'une durée variable, les plats contenant les cellules sont directement déposés sur la glace et 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 500 μl /plat (MDCK) ou 300 μl /2 plats (MSV et INV) de tampon de lyse (PBS comprenant Triton 1%, Igepal 0,5%, EDTA 5 mM, Na_3VO_4 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sont ajoutés. Les cellules sont grattées et l'ADN est brisé par deux rondes de sonication de 15 secondes, force 2, au moyen d'un sonicateur Branson 450 (Danbury, CT), en maintenant le tube dans la glace pour éviter un réchauffement de l'échantillon. Les protéines sont récupérées à la suite d'une centrifugation (centrifugeuse Eppendorf) de 20 minutes à 18500 g à 4°C (les protéines se retrouvent dans le surnageant). Ces lysats sont ensuite utilisés pour l'immunobuvardage de type Western ou l'immunoprécipitation.

2.2.2 Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué avec le réactif à base d'acide bicinchoninique (BCA ; bicinchoninic acid) de chez Pierce (Rockford, IL), selon le protocole de la compagnie. Ce composé permet de détecter et de quantifier les protéines totales par colorimétrie. Le Cu^{2+} est réduit en Cu^{1+} par les protéines en milieu alcalin. Le réactif BCA possède une haute sensibilité et affinité pour le Cu^{1+} . Ainsi, la détection colorimétrique 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 en protéines. La concentration des protéines est toujours déterminée en référence à une courbe-étalon (0, 2, 4, 6, 16, 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$) préparée en parallèle en utilisant l'albumine de sérum bovin (BSA), qui permettra de déterminer la concentration inconnue des échantillons à doser. Deux volumes différents (3 et 5 μL)

d'échantillons à doser sont utilisés. Par la suite, 1 ml de réactif BCA est ajouté dans chaque tube et ceux-ci sont incubés 30 minutes à 37°C puis 15 minutes température pièce. L'absorbance des échantillons est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre, à une longueur d'onde de 562 nm. Une droite de régression linéaire établie à partir des quantités connues de BSA permet ensuite de connaître la concentration des échantillons.

2.3 Immunobuvardage de type Western (IB)

2.3.1 Séparation des protéines sur un gel de polyacrylamide

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE pour « polyacrylamide gel electrophoresis ») en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS) permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire. Le gel de séparation (Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1 %, acrylamide 7,5 ou 9%, TEMED 0,1%, ammonium persulfate 0,1%) est coulé et après sa polymérisation, le gel de concentration (Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1 %, acrylamide 4%, TEMED 0,1%, ammonium persulfate 0,05%) est ajouté. Les échantillons de protéines doivent être mélangés dans un ratio 2:1 à 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 (la concentration finale des constituants du tampon Laemmli doit être de 1X). Le tampon d'électrophorèse (Tris-base 25,2 mM, glycine 218,5 mM, SDS 0,1%) permet la migration des protéines vers l'anode. Le courant et les temps de migration utilisés varient selon le pourcentage et le nombre de gels et s'étend de 40 à 60 mA pour 2 gels durant 4h ou de 10 à 15 mA pour 2 gels pendant 18h.

2.3.2 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 μ m est conditionnée dans du tampon de transfert (glycine 120 mM, Tris-base 15,7 mM, pH 8,3). Les protéines sont transférées sur la membrane de nitrocellulose à 400 mA pendant 4h ou 100 mA pendant 18h.

2.3.3 Révélation des protéines au Rouge Ponceau

Le rouge Ponceau est un colorant qui interagit avec les protéines de façon réversible permettant de distinguer toutes les bandes de protéines sur la membrane de nitrocellulose, afin d'évaluer la qualité du transfert et l'homogénéité du chargement en protéines dans les différents puits. La membrane est recouverte avec la solution de rouge Ponceau (rouge Ponceau 0,5%, acide acétique glacial 1%) puis rincée avec de l'eau présentant une résistance électrique aux ions de 18.2 mΩ afin de retirer le colorant n'ayant pas interagit avec les protéines. Une photocopie est prise. Cette coloration permet d'apprécier d'une manière qualitative le contenu relatif en protéines dans les différents puits et la qualité du transfert.

2.3.4 Immunobuvardage de type Western avec les anticorps phospho-spécifiques

La membrane de nitrocellulose est d'abord incubée pendant une heure à 37°C dans du tampon de blocage (TBS 1X, BSA 4%). Par la suite, la membrane est incubée toute la nuit (O/N pour « over night ») à 4°C ou pendant 1h à la température de la pièce (TP) avec l'anticorps primaire (p-c-Met^{1230,1234,1235}, selon une dilution 1/20000; p-Erk1/2, 1/1000; p-Shp2⁵⁴², 1/1000) dilué dans le tampon de blocage (TBS1X, BSA 2%, Tween-20 0,05%). À la température de la pièce, la membrane est rincée 6 fois pendant 10 minutes avec du tampon TBS contenant du Tween-20 0,1%. L'anticorps secondaire est incubé pendant une heure (anti-IgG-HRP de lapin 1/5000) dilué dans le tampon de blocage. À la fin de l'incubation, la membrane est lavée de la même manière qu'après l'anticorps primaire.

2.3.5 Immunobuvardage de type Western des protéines non-phosphorylées

La membrane de nitrocellulose est d'abord incubée pendant une heure à TP dans du tampon de blocage (TBS, lait 5%, Tween-20 0,05%). Par la suite, elle est incubée O/N à 4°C ou pendant 1h à TP avec l'anticorps primaire (CT-c-Met, Gab1, MEK2, Erk1/2, Gab2 1/1000; Grb2 et Shp2, 1/2500) dilué dans le tampon de blocage. À la température

de la pièce, la membrane est rincée 6 fois pendant 10 minutes (3 fois 10 minutes pour Grb2 et Shp2) avec du tampon TBS contenant du Tween-20 0,1%. Par la suite, pour les anticorps dirigés contre Gab1, Gab2 et CT-c-Met, la membrane est incubée pendant 30 minutes dans du tampon de blocage. L'anticorps secondaire est incubé pendant une heure (anti-IgG-HRP de lapin 1/5000 ou anti-IgG-HRP de souris 1/3000) dilué dans le tampon de blocage. À la fin de l'incubation, la membrane est lavée de la même manière qu'après l'anticorps primaire.

2.3.6 Immunobuvardage de type Western des protéines phosphorylées sur tyrosine

La membrane est incubée pendant une 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 pendant une heure à la température de la pièce ou O/N à 4°C avec l'anticorps α -phosphotyrosine (1/2000) 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 pendant 30 minutes avec du tampon de blocage, incubée une heure avec l'anticorps anti-IgG de souris-HRP (1/3000) 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).

2.3.7 Décapage (stripping) des anticorps

L'enlèvement complet des anticorps primaires et secondaires de la membrane est réalisé en mettant cette dernière en présence de la solution de décapage (β -mercaptoethanol 100 mM, SDS 2% et Tris-HCl 62,5 mM pH 6,7) pendant 30 min à 50°C. Par la suite, la membrane est lavée deux fois avec le tampon de lavage et on procède à l'immunobuvardage de type Western.

2.4 Immunoprécipitation

Les protéines totales (2 mg) de lysats de cellules MDCK, MSV ou INV ont été utilisées pour les études d'immunoprécipitation. Premièrement, les lysats sont pré-nettoyés avec 30µl de billes (mélangées avec le tampon de lyse 1 :1) couplées à la protéine A-sépharose (de la compagnie Sigma) ou protéine G-agarose (de la compagnie Santa Cruz) pendant 1h à 4°C, sous agitation. Pour les IP effectuées avec soit l'α-Gab1(H-198), l'α-Gab2, l'α-CT-c-Met, la protéine A est utilisée, car les IgG de lapin ont une très grande affinité pour cette dernière. Puisque les anticorps α-Shp2, l'α-Grb2 n'ont aucune affinité pour la protéine A, la protéine G est utilisée, car les IgG₁ de souris ont une très grande affinité pour cette dernière. Suite au pré-nettoyage, les lysats sont incubés avec les anticorps (2µg) O/N h à 4°C, avec rotation. Les immunoprécipitats sont recueillis par une incubation d'une heure à 4 °C en présence de 40µl de billes. Après 6 lavages dans le tampon de lyse, les protéines du complexes sont séparées entre elles et des billes en ajoutant du tampon Laemmli 3X et sont migrés sur un gel SDS-PAGE puis transférés sur une membrane de nitrocellulose.

2.5 Immunofluorescence

Les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% (contenu dans du PBS1X, pH 7,4 et chauffé à 37 °C) pendant 15 minutes, lavées avec du PBS-CM filtré et les membranes sont perméabilisées avec de la saponine 0,075% (Phalloïdine et Gab1) ou du Triton-X-100 0,1% (p-c-Met^{1230,1234,1235}) pendant 10 minutes. Les cellules sont mises en contact durant 45 à 60 minutes avec la Phalloïdine (une toxine qui a une forte affinité pour l'actine dépolymérisée et les filaments d'actine) (1/1000) couplée au rouge texan, l'α-p-c-Met^{1230,1234,1235} (1/100) ou l'α-Gab1(H-198) (1/100). Suite à six lavages dans du PBS-CM filtré, les cellules sont mises en contact durant 45 minutes avec les anticorps secondaires α-lapin-Alexa (1/1000), sauf la Phalloïdine, qui est déjà couplée au rouge texan. Les cellules sont ensuite lavées dans du PBS-CM, six fois. Les lamelles sont montées sur des lames avec de l'agent de montage (propyl gallate 100mM, gelvatol). Les

lamelles sont observées sur un microscope à fluorescence Zeiss AxioSkop équipé d'un objectif 63X et d'un filtre pour le rouge texan ou pour l' α -lapin-Alexa 488nm.

2.6 Technique de la plaie et vidéomicroscopie

Cette technique est basée sur la capacité des cellules motiles à envahir une plaie pour permettre la fermeture de celle-ci. Les cellules MSV-MDCK-INV sontensemencées sur des lamelles à très haute densité (300 000 cellules/plats 35mm) dans du milieu DMEM-NaHCO₃ 10%FBS pendant 24h. Par la suite, le milieu est changé pour du milieu DMEM-Hepes supplémenté avec du FBS 10% sans atmosphère de CO₂ 5%, pendant 2h, afin de permettre aux cellules de s'équilibrer dans ce milieu. Pour les expériences de vidéomicroscopie, réalisées sans atmosphère contrôlée (la concentration de CO₂ dans l'air étant négligeable), le milieu DMEM-Hepes est essentiel pour tamponner le pH du milieu de culture. Une rayure est effectuée sur la monocouche de cellules à l'aide d'un embout de pipette de 10 μ l. Par la suite, les cellules sont mises en présence d'un milieu contenant du DMSO 0,05% (témoin) ou de la calpeptine 0,1mg/ml. La capacité des cellules à envahir la plaie en fonction du temps a été observée au moyen d'un microscope Olympus IX81, à raison d'une image par cinq minutes pendant 17h. L'aire de la plaie a pu être calculée par la suite avec le logiciel Image Pro Plus.

2.7 RT-PCR et qPCR

2.7.1 Isolation de l'ARN total

Le réactif TRIzol (Invitrogen) est utilisé pour lyser les cellules après que le milieu ait été retiré et l'extraction de l'ARN total se fait selon le protocole proposé par la compagnie. Le réactif TRIZOL est une solution monophasique de phénol et de guanidine isothiocyanate. Pendant l'homogénéisation ou la lyse de l'échantillon, le TRIzol maintient l'intégrité de l'ARN, tout en détruisant les cellules et leurs composantes. Après la lyse dans le TRIzol, l'addition de chloroforme, suivi d'une centrifugation (15 minutes à 10 000g), sépare la solution en une phase aqueuse et une phase organique. L'ARN se retrouve dans la phase aqueuse. Après le transfert de la phase aqueuse, l'ARN est

récupéré par sa précipitation dans l'alcool isopropylique. L'ARN est conservé pour la transcription inverse (RT) à -30°C.

2.7.2 RT-PCR

La réaction de transcription inverse (RT) permet, à partir de l'ARN total des cellules, de synthétiser un brin d'ADN complémentaire (ADNc). L'enzyme qui catalyse cette réaction le fait à partir d'un oligonucléotide. Cet oligonucléotide peut être complémentaire à l'ARNm d'un gène spécifique, ou être non-spécifique. De tels oligonucléotides sont appelés hexamères, et n'ont pas de spécificité proprement dite, et iront se lier d'une manière aléatoire sur l'ARN. Pour cette raison, lorsque l'on utilise ce type d'oligonucléotide, on synthétise un mélange d'ADNc représentatifs de l'ensemble de l'ARN présent dans la cellule.

Pour cette étude, nous avons utilisé l'ARN total, isolé de nos différentes lignées cellulaires, pour effectuer la réaction de transcription inverse (RT). Des oligonucléotides aléatoires (hexamères) ont été utilisés (250ng). La réaction de RT produit le premier brin d'ADNc (« first strand cDNA synthesis »). Lors de la RT, l'ARN total (2,5µg) est mis en présence des hexamères et des dNTP (10mM final) dans un volume final de 26µl. Le mélange est chauffé à 65°C pendant 5 minutes, puis refroidi à 0°C pendant 2 minutes. Par la suite, le tampon (First strand buffer, 1X final) fourni avec l'enzyme SuperScript III (400 unités), le DTT (0,1M final, un agent réducteur), la RNaseOUT (80 unités, est une protéine utilisée pour inhiber des ribonucléases présentes en solution) sont ajoutés au mélange et la synthèse de l'ADNc a lieu à 50°C pendant 45 minutes, puis à 70°C pendant 15 minutes, afin d'inactiver les enzymes. Finalement, 8 unités de RNaseH (une endonucléase qui peut hydrolyser spécifiquement les liens phosphodiester de l'ARN hybridé à l'ADN) sont ajoutés au mélange pendant 20 minutes à 37°C. La réaction de RT, qui a un volume final de 50µl, est conservée à -30°C jusqu'à son utilisation.

Pour la réaction de PCR, 2µl de la réaction de RT ont été utilisés, en présence de dNTPs (10mM final), MgCl₂ (10mM final), des oligonucléotides (10µM final) du tampon (Phusion HF Buffer, 1X final) et de la polymérase Phusion (0,8 unité). La réaction a lieu dans un volume final de 50µl. Les oligonucléotides (de la compagnie

AlphaDNA, Montréal, Qc) ont été conçus à partir de la séquence canine prédite de Gab1 (GeneBank, numéro d'accèsion XM_540929). Les paires d'amorces utilisées sont les suivantes (voir **Figure 3.4A**, S = sens et AS = anti-sens) : combinaison 1 : Gab1S 5'-ATG GCG CTA TTT AGT ATA GGA GCA-3' et Gab1AS 5'-TCA TTT CAC GAT CTT GGC TGG-3'. Combinaison 2 : Gab1-141S 5'-TGC CAA GAA GCC TAT CCG TAT-3' et Gab1AS. Combinaison 3 : MBSS 5'-GGAATGCAAGTTCCTCCTCCT-3' et Gab1AS. Pour MEK2, qui a servi de témoin, les oligonucléotides sont les suivants : MEK2S 5'-GATGCTGGCCCGGAGGAAG-3' et MEK2AS 5'-CACTGTCACACGGCGGTGC-3'. La température d'hybridation est de 54°C pour la combinaison 1, 65°C pour la combinaison 2 et 72°C pour la combinaison 3 et de 89°C pour MEK2. La durée des étapes de dénaturation et d'hybridation sont de 15 et 30 secondes, respectivement, pour toutes les combinaisons. La température d'élongation est de 72°C pour une durée de 60 secondes pour les combinaisons 1, 2 et MEK2 et 30 secondes pour la combinaison 3, pour 35 cycles (combinaison 1, 2 et MEK2) ou 30 cycles (combinaison 3).

2.7.3 PCR quantitative (qPCR)

La technique de qPCR en temps réel (« real-time quantitative PCR ») permet que l'accumulation du produit de PCR amplifié soit détectée et mesurée pendant que la réaction progresse, c'est-à-dire en « temps réel ». La détection des produits de qPCR est réalisée par l'incorporation, lors de la réaction de PCR, d'un oligonucléotide marqué par une molécule fluorescente. L'oligonucléotide marqué utilisé dans nos expériences est couplé à la fluorescéine (FAM), tel que représentés à la **Figure 2.1B**. Ainsi, la fluorescence mesurée est proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié à chaque cycle pendant la PCR.

L'oligonucléotide, en plus de contenir un rapporteur fluorescent (en l'occurrence la fluorescéine) à l'extrémité 5' a aussi un extincteur (« quencher ») à l'extrémité 3'. Lorsqu'il est intact, il y a extinction de la fluorescence du rapporteur, due à la proximité avec l'extincteur. Durant l'hybridation et l'extension, lors de la réaction de PCR, l'oligonucléotide marqué s'hybride avec l'ADN cible et l'activité spécifique exonucléase

5'→3' de la polymérase Taq enlève le rapporteur. Ainsi, le rapporteur se trouve séparé de l'extincteur et le signal de fluorescence peut être détecté par l'appareil.

L'aspect quantitatif de la technique de qPCR est basé sur la mesure de la fluorescence enregistrée durant la PCR. Le graphique d'amplification est représenté à la **Figure 2.1A**. Initialement, la fluorescence est au niveau du bruit de fond, et le demeure, bien que le produit s'accumule de manière exponentielle (ici représenté aux cycles 1 à 18). Éventuellement, il y aura assez de produit amplifié accumulé pour que le signal de fluorescence devienne détectable. Le nombre de cycles auquel cet état se produit est appelé le « cycle threshold » ou C_T . C'est cette valeur qui est utilisée pour comparer différentes amplifications de qPCR entre elles. Elle peut aussi être le reflet de la quantité relative d'un ARNm donné présent entre différentes lignées cellulaires.

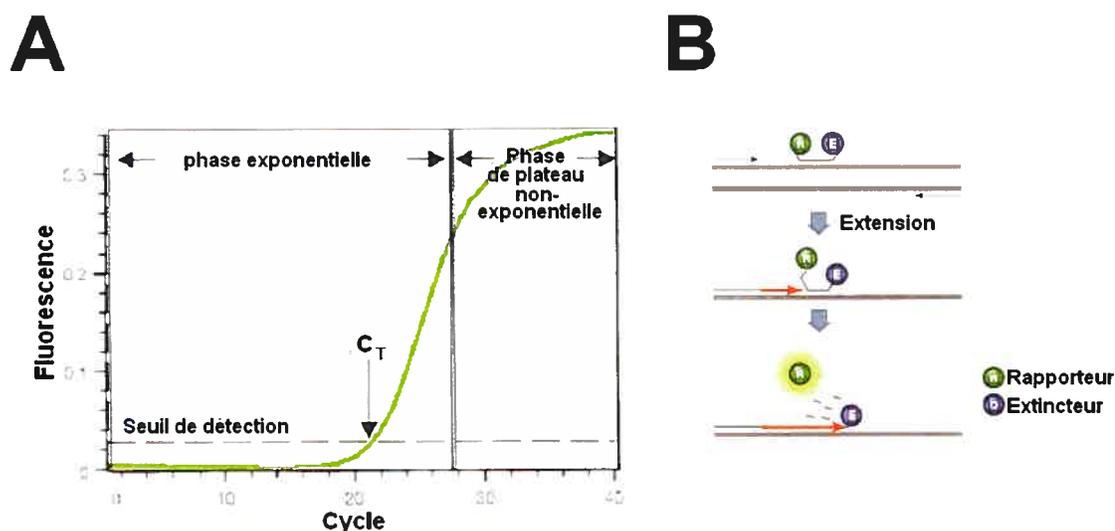


Figure 2.1 : Fonctionnement de la PCR quantitative en temps réel.

A) Graphique d'amplification de la technique de qPCR. La fluorescence venant de la réaction d'amplification mesurée est représentée en fonction du nombre de cycles. C_T = cycle threshold. B) Représentation du fonctionnement des oligonucléotides marqués avec un fluorophore de type FAM. Adapté du guide Bio-Rad Real-Time PCR.

Ainsi, l'équation permettant de comparer l'expression de Gab1 (en supposant qu'il y a duplication du produit de PCR à chaque cycle) dans les cellules transformées par le MSV par rapport aux cellules MDCK est la suivante :

$$\text{Différence de signal} = (\text{MDCK/lignées transformées par le MSV}) = 2^{(C_T(\text{MDCK}) - C_T(\text{lignées transformées}))}$$

La RT-PCR en temps réel quantitative a été effectuée en une seule étape, selon le protocole proposé par la compagnie Invitrogen. 500ng d'ARN total ont été utilisés. L'ARN total a été mis en présence du Reaction Mix (2X final, fournit par la compagnie), des oligonucléotides (10 μ M final) et du mélange SuperScriptIII/Taq polymerase (0,5 μ l). La réaction a lieu dans un volume final de 50 μ l. Les oligonucléotides (Invitrogen, Burlington, ON) ont été conçues à partir de la séquence canine prédite de Gab1 (GeneBank, numéro d'accèsion XM_540929). La paire d'amorces utilisées est la suivante (voir **Figure 3.4C**) : oligonucléotide marqué avec le fluorophore FAM, 5'-cggatCATGCCAAGAAGCCTATCG-3', oligonucléotide non marqué 5'-ACGTCAATCCAGCATCAACTTGT-3'. Le cycle utilisé était : dénaturation à 98°C de 15 secondes, hybridation à 55°C de 30 secondes et élongation à 68°C pendant 30 secondes, pour 30 cycles.

3. Résultats

3.1 Niveau d'expression et d'implication de Gab1 dans les trois lignées cellulaires

Afin de déterminer l'importance de Gab1 dans la voie de signalisation constitutivement active de c-Met chez les cellules MSV-MDCK-INV, l'expression protéique et nucléaire de Gab1 dans les trois modèles cellulaires a été déterminée.

3.1.1 Gab1 n'est pas détectée dans les lignées transformées par le MSV avec un anticorps ciblant sa partie C-terminale.

Le résultat préliminaire obtenu qui justifie la présente étude est illustré à la **Figure 3.1**. Avec un anticorps reconnaissant les 30 derniers acides aminés de Gab1 (α -CT-Gab1, **Figure 3.1A**), il a été possible, par immunobuvardage de type Western (IB) de détecter une très forte expression de cette protéine dans la lignée parentale, les cellules MDCK, tel qu'observé précédemment de nombreuses fois (99, 126). Par contre, l'IB effectué n'a permis de détecter aucun signal dans les lignées cellulaires transformées par le MSV, tel que représenté à la **Figure 3.1B**. L'IB de MEK2 est utilisé afin de s'assurer qu'une la même quantité de protéines est présente dans chaque puit. Afin de déterminer si l'absence de Gab1 était une caractéristique des cellules transformées et/ou tumorales, un IB a été effectué à partir de lysats de différentes lignées cellulaires. L'IB α -CT-Gab1 est illustré à la **Figure 3.1C**. Ces différentes lignées cellulaires proviennent : d'un cancer du tissu conjonctif (HT-1080), d'un carcinome de la peau (A-431), d'un cancer cervical (HeLa), d'un cancer du colon (Caco-2), de différents stades de cancer du sein dont certains invasifs (MDA231 et MDA435, les cellules MCF7 sont seulement transformées). Il est possible d'observer que l'expression de Gab1 varie selon les lignées, ainsi que la présence des deux isoformes. Toutefois, Gab1 est présente dans toutes ces lignées de type tumoral.

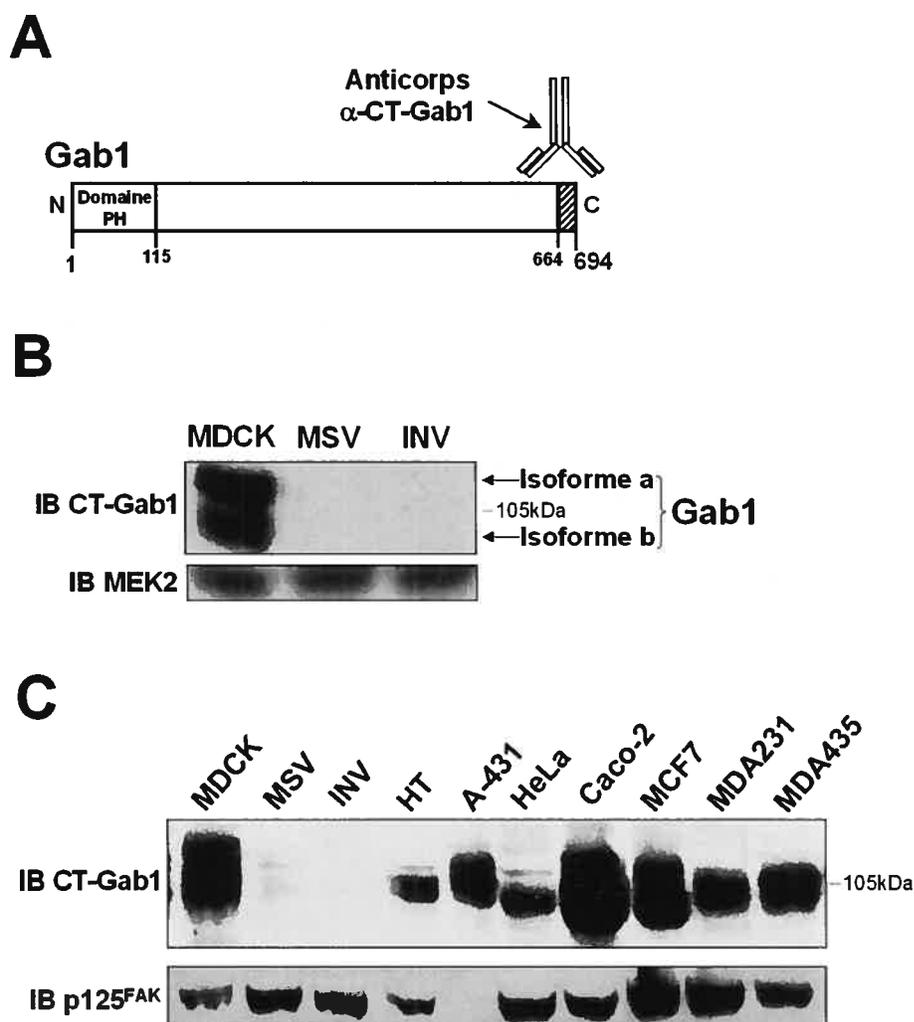


Figure 3.1 : Expression différentielle de Gab1 dans les lignées MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV.

A) Représentation de la région de Gab1 ciblée par l' α -CT-Gab1, qui reconnaît les acides aminés 664 à 694 de la séquence humaine. B,C) IB avec l' α -CT-Gab1 sur des lysats cellulaires totaux (60 μ g de protéines) provenant des trois modèles cellulaires étudiés (B) et de différents tissus cancéreux (C). Les IB MEK2 et p125^{FAK} sont utilisés pour s'assurer qu'il n'y a pas de variation de la quantité de protéines entre les différents puis. Ces résultats sont représentatifs de cinq (B) et de deux (C) expériences similaires.

3.1.2 Gab1 est faiblement reconnue chez les lignées transformées par un anticorps dirigé contre la partie centrale de la protéine

Afin de déterminer si l'anticorps utilisé était en cause dans le résultat négatif obtenu à la Figure 3.1B, dans les lignées transformées par le MSV, et considérant que plusieurs modifications dans le génome d'une cellule transformée peut altérer, sous/sur-réguler certains gènes, nous avons essayé en IB d'autres anticorps α -Gab1. Gab1 n'étant

pas reconnue avec un anticorps ciblé contre sa région C-terminale (α -CT-Gab1), nous cherchions des anticorps dirigés contre des régions plus en amont. L'anticorps disponible, ciblé vers la région la plus N-terminale, s'est avéré être l' α -Gab1(H-198). Cet anticorps est ciblé contre une région de 197 acides aminés qui suit le domaine PH de Gab1 (**Figure 3.2A**). Comme démontré à la **Figure 3.2B**, Gab1 est très faiblement détectée dans les lignées MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV, suggérant qu'il y aurait une répression de l'expression de la protéine, ou une reconnaissance sous-optimale par l'anticorps utilisé.

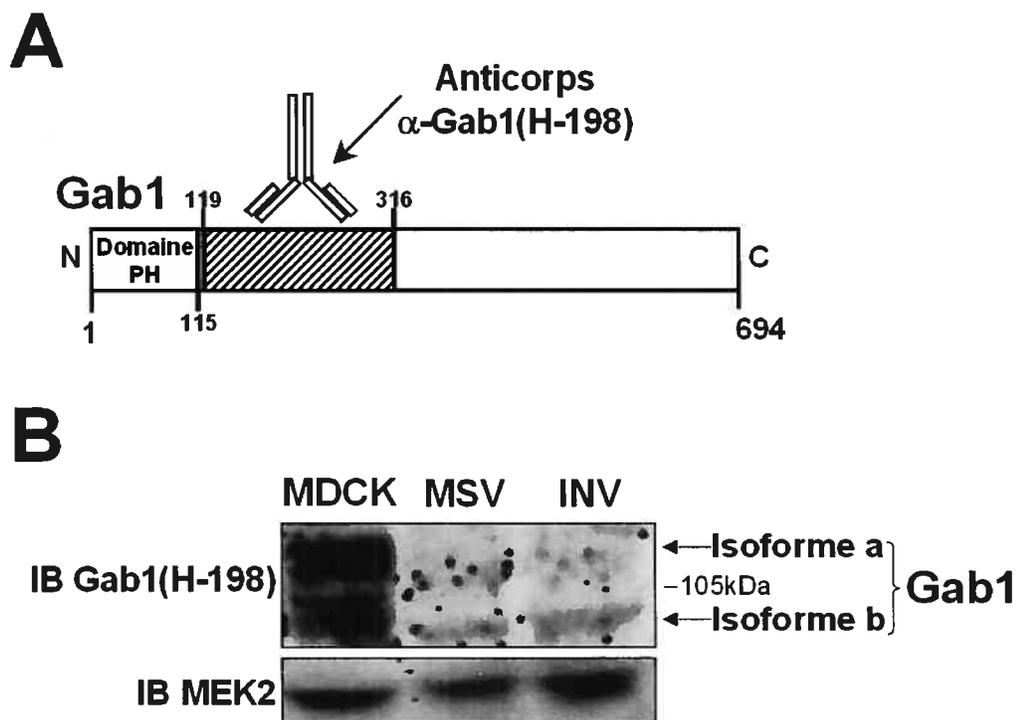


Figure 3.2 : Gab1 est détectée dans les lignées transformées par le MSV avec l' α -Gab1(H-198)

A) Représentation de la région de Gab1 ciblée par l' α -Gab1(H-198), lequel reconnaît les acides aminés 119 à 316 de la séquence humaine. **B)** IB de Gab1 de lysats cellulaires totaux (60 μ g de protéines) avec l' α -Gab1(H-198). Ces résultats sont représentatifs de six expériences similaires.

3.1.3 L'anticorps α -Gab1(H-198) permet la reconnaissance de Gab1 par immunofluorescence dans les lignées transformées par le MSV

Puisque nous avons en main un anticorps pouvant reconnaître Gab1 dans les trois lignées en IB, nous avons par la suite tenté de détecter Gab1 par immunofluorescence (IF),

avec ce même anticorps. Nous avons déterminé la localisation de Gab1 dans les trois lignées cellulaires stimulées ou non au rHGF. Bien que Gab1 soit très faiblement reconnue avec cet anticorps dans les lignées transformées en IB, il semble qu'en IF la reconnaissance soit plus efficace, tel qu'observé à la **Figure 3.3A**. On déduit que Gab1 est reconnue par cet anticorps dans sa conformation native, parce que la fixation conserve la conformation tertiaire et quaternaire des protéines dans la cellule. La **Figure 3.3A** montre que le traitement au rHGF induit un recrutement de Gab1 à la membrane dans les cellules MDCK, tel qu'observé précédemment dans la littérature (99). Ceci suggère fortement que l'anticorps utilisé reconnaît spécifiquement Gab1, du moins, qu'une partie du signal observé est caractéristique à Gab1. Il nous a été impossible de tester la spécificité de la réactivité de l' α -Gab1(H-198) puisqu'aucun peptide correspondant à la région reconnue par l'anticorps n'est disponible. Il demeure donc probable qu'une fraction du signal observé ne soit pas due à Gab1.

Le traitement au rHGF des cellules MSV-MDCK semble favoriser le retrait de Gab1 du noyau, sans qu'il n'y ait une re-localisation nette à la membrane plasmique. Cependant, ce résultat n'est pas surprenant, puisqu'il a été démontré par le passé que la localisation de Gab1 dans les cellules épithéliales est dépendante du temps d'ensemencement des cellules et de la concentration en sérum. En effet, la privation en sérum redistribue Gab1 au cytoplasme (105). Avec les conditions qui ont été utilisées pour l'IF représentée à la **Figure 3.3A** (24h en présence sérum 10%), Gab1 se retrouve dans le cytoplasme et dans le noyau, alors qu'en absence de sérum, par exemple, Gab1 quitte le noyau et demeure uniquement dans le cytoplasme (105). Suite à la stimulation de c-Met par le rHGF, il est évident que Gab1 doit se trouver à proximité du récepteur lorsque ce dernier est activé, ce qui expliquerait ce déplacement observé dans les cellules MSV-MDCK (**Figure 3.3A**).

Dans les cellules MSV-MDCK-INV, qui sont constamment exposées au HGF sécrété par ces cellules, Gab1 est localisée dans le cytoplasme (donc sans localisation au noyau) et sur tout le longueur des pseudopodes, sans qu'il n'y ait détection de concentrations à l'extrémité des protrusions pseudopodiales, comme c'est le cas pour c-Met phosphorylé ou l'actine (**Figures 3.3C et D**).

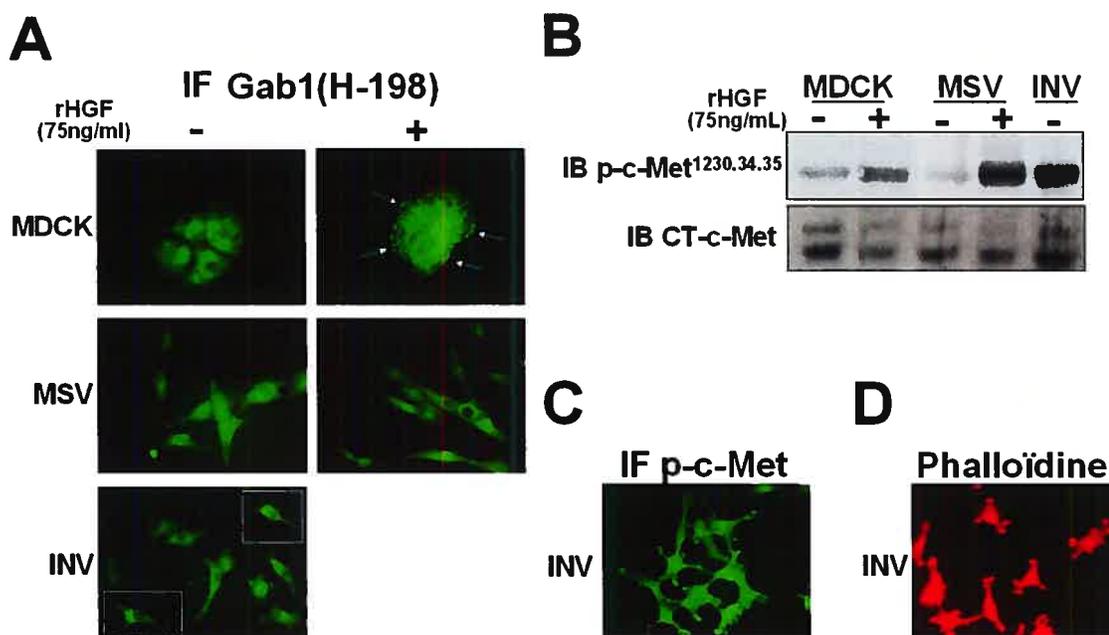


Figure 3.3 : Gab1 est détectée par immunofluorescence dans les trois lignées.

A) Marquage de Gab1 dans les trois lignées avec l' α -Gab1(H-198). Les cellules MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV (20 000 cellules) ont été cultivées sur les lamelles de verre 24h en présence de sérum 10% dans des plats de 35mm. Par la suite, les cellules ont été traitées avec ou sans rHGF (75ng/ml) pendant 15 minutes, fixées pour l'IF **B**) IB α -p-c-Met^{1230.34.35} sur 60 μ g de protéines totales. Les cellules ont été cultivées pendant 24h en présence de sérum, rincées et privées de sérum pendant 6h. Suite au traitement avec le rHGF pour 15 minutes, les cellules ont été lysées pour l'IB. **C**) Marquage des MSV-MDCK-INV avec l' α -p-c-Met^{1230.34.35}. **D**) Marquage de l'actine des MSV-MDCK-INV avec la phalloïdine. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences similaires.

Pour s'assurer de l'efficacité du traitement au rHGF, c'est-à-dire que c-Met est vraiment phosphorylé (activé) suite à l'ajout de rHGF, un IB a été effectué avec un anticorps ciblé contre la région catalytique de c-Met (les Tyr1230, 1234 et 1235). Cet IB, qui représente le niveau d'activation du récepteur, a été effectué en parallèle de l'IF α -Gab1(H-198) et est représenté à la **Figure 3.3B**. L'ajout de rHGF entraîne l'activation de c-Met dans les cellules MDCK parentales et les cellules MSV-MDCK, ce qui indique que le récepteur était bien stimulé lors des IF menées en parallèle de cet IB (**Figure 3.3A**). Étant donné que c-Met est actif de manière constitutive dans les cellules MSV-MDCK-INV (174), et qu'il a été démontré précédemment que le traitement au rHGF n'induit pas d'augmentation du niveau de phosphorylation (174), ces cellules n'ont pas été traitées avec du rHGF exogène ici, et pour la suite des expériences présentées dans ce mémoire. Globalement, les résultats d'IB et d'IF suggèrent que Gab1 est mieux reconnue dans sa conformation native, c'est-à-dire en IF, comparativement à sa forme

partiellement dénaturée, en IB, mais que Gab1 est probablement moins exprimée dans les cellules transformées par le MSV.

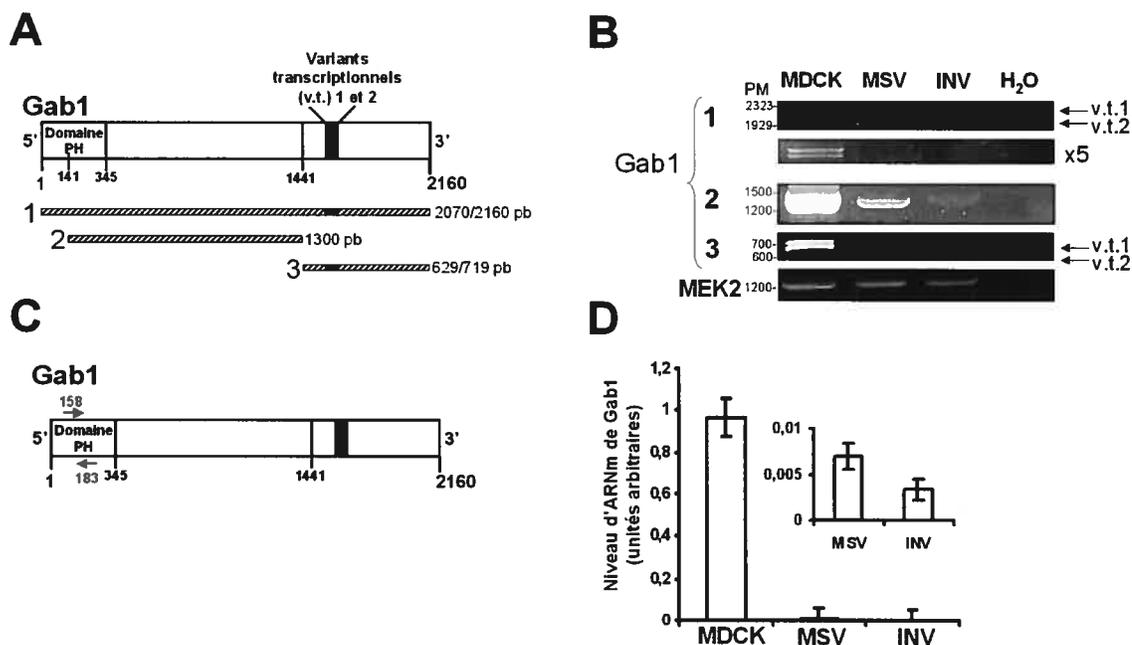
3.1.4 Gab1 est réprimée dans les lignées transformées par le MSV

Les résultats obtenus aux **Figures 3.1** et **3.2** nous ont incités à déterminer si Gab1 est réprimée au niveau transcriptionnel. Pour ce faire, nous avons choisi d'amplifier l'ADNc de Gab1 obtenu par transcription inverse de l'ARN total des trois lignées cellulaires à l'étude. Les cellules MDCK sont des cellules canines où le génome de chien, n'avait pas été séquencé dans sa totalité, rendant difficile l'ébauche d'oligonucléotides pour l'amplification de Gab1. En 2005, la publication de la séquence codante prédite de Gab1 (codant pour l'isoforme a) dans GeneBank (numéro d'accèsion XM_540929) a permis de réaliser l'amplification du gène de Gab1. Suite à la transcription inverse, la réaction de PCR a été effectuée dans des conditions favorisant l'appariement d'oligonucléotides, lesquels furent synthétisés d'après la séquence prédite.

Parmi les différents essais effectués, trois combinaisons d'oligonucléotides sont schématisées à la **Figure 3.4A**. Le résultat de ces RT-PCR est présenté à la **Figure 3.4B**. La séquence codante du gène de Gab1 a été amplifiée chez les lignées normales, mais à peine chez les lignées transformées (**Figure 3.4A**, combinaison 1). Il semble que l'amplification de Gab1 par sections (**Figure 3.4A**, combinaisons 2 et 3) soit plus efficace car une quantité importante d'ADNc est décelée dans les lignées transformées. En effet, l'amplification de Gab1 la séquence complète (« pleine longueur ») dans les cellules MDCK s'est avérée peu efficace, et très difficile à obtenir dans les cellules transformées par le MSV. En ajoutant une plus grande quantité d'ADNc (cinq fois plus), l'amplification de Gab1 « pleine longueur » est réalisable, quoiqu'à peine détectable (**Figure 3.4A**, combinaison 1 x5). Différents facteurs peuvent rendre compte de ces observations, telle une différence de compatibilité des oligonucléotides choisis pour l'amplification, ainsi que des conditions expérimentales sous-optimales d'amplification. Il est important de noter que les ADNc ne sont pas en cause, puisque que l'ADNc de MEK2, qui sert ici de gène rapporteur, est amplifié en quantité équivalente dans les trois lignées. De plus, une quantité équivalente d'ARN totaux est toujours utilisée. Surtout, les

PCR sont réalisées à partir des ADNc des trois lignées synthétisées lors d'une même réaction de transcription inverse.

Le séquençage des produits de PCR obtenus a été effectué pour la lignée MDCK et confirme qu'il s'agit de Gab1 d'origine canine, identique à 99% à la séquence prédite publiée dans GeneBank. Un alignement de la séquence prédite de Gab1 canin tirée de GeneBank, de la séquence de Gab1 humain et de la séquence de Gab1 que nous avons obtenue pour les cellules MDCK est présenté à la **Figure 3.4E**. Comme il est possible de le constater, l'homologie entre Gab1 humain et canin prédit est très élevée, soit de 91%. La différence de un pour cent entre la version prédite et notre version est due à deux éléments : 1) l'absence d'une région de 12pb en 5' et 2) la présence d'une insertion de 81pb entre les positions 579 et 580pb de la séquence prédite. Ces modifications ne changent pas le cadre de lecture de la séquence codante de Gab1 obtenue expérimentalement, qui a une longueur de 2229 nucléotides. De plus, l'analyse de cette séquence de 81pb (par le logiciel BLAST) révèle qu'il s'agit d'une séquence intronique du gène de Gab1 humain (positions 97762 à 97841). Ces résultats concordent avec la possibilité de reconnaître Gab1 dans les cellules MDCK par l' α -Gab1(H-198), dirigé contre la séquence de Gab1 humain.



E

Canin	-----ATGGCCGATTTAGTATAGGA--CGAGGTGATCTCCCTTACATA 43	Canin	CAAOTGACAGGCTAGTCTACTTGAAGGCTTCCATAACCACTTTAAAATATAAATATAT 1282
Experimental	-----ATGGCCGATTTAGTATAGGA--CGAGGTGATCTCCCTTACATA 43	Experimental	CAAOTGACAGGCTAGTCTACTTGAAGGCTTCCATAACCACTTTAAAATATAAATATAT 1351
Humain	ATGAGCGGTGCTGAAGTGGT-CTGCTCCGGATGGCTCCGCAAGTC-CCGCCGGAGAGA 58	Humain	CAAOTGACAGGCTAGTCTACTTGAAGGCTTCCATAACCACTTTAAAATATAAATATAT 1297
Canin	CAGTGGCATAATCCGGATGGAAAGAGAGATGGTTTGTGTTACGAGTGGTCCCTTAATC 103	Canin	TGACAGTGGGAAAGTGTATCAAAATGAAGACTGGAGAAATTAAGTCCCAATGAATCCCA 1342
Experimental	CAGTGGCATAATCCGGATGGAAAGAGAGATGGTTTGTGTTACGAGTGGTCCCTTAATC 91	Experimental	TGACAGTGGGAAAGTGTATCAAAATGAAGACTGGAGAAATTAAGTCCCAATGAATCCCA 1411
Humain	AGTTGAAAGCGTTATGCAATGGAAAGAGATGGTTTGTGTTACGAGTGGTCCCTTAATC 118	Humain	TGACAGTGGGAAAGTGTATCAAAATGAAGACTGGAGAAATTAAGTCCCAATGAATCCCA 1357
Canin	GAGATCCAGATGCTTGGAACTACAAAATGATCCATGCCAAGAGCCCTATCCGATTA 163	Canin	ATTCTCCCTCCAGCAGCAATCTCAGAGTTTTCAGGAAOCCATTCAGGAAAGCAAAATATG 1402
Experimental	GAGATCCAGATGCTTGGAACTACAAAATGATCCATGCCAAGAGCCCTATCCGATTA 151	Experimental	ATTCTCCCTCCAGCAGCAATCTCAGAGTTTTCAGGAAOCCATTCAGGAAAGCAAAATATG 1471
Humain	GAGATCCAGATGCTTGGAACTACAAAATGATCCATGCCAAGAGCCCTATCCGATTA 178	Humain	ATTCTCCCTCCAGCAGCAATCTCAGAGTTTTCAGGAAOCCATTCAGGAAAGCAAAATATG 1417
Canin	TTGATTTAAATTTATGTCACAAAGTGGATCCGGATTTGACGTTTAAACAAAAGAGTTG 223	Canin	TOCCAATGACTCCAGGAGCATTTGATTTTTCATTCATTCGAAATGCAGTCTCCCTCCCTG 1462
Experimental	TTGATTTAAATTTATGTCACAAAGTGGATCCGGATTTGACGTTTAAACAAAAGAGTTG 211	Experimental	TOCCAATGACTCCAGGAGCATTTGATTTTTCATTCATTCGAAATGCAGTCTCCCTCCCTG 1531
Humain	TTGATTTAAATTTATGTCACAAAGTGGATCCGGATTTGACGTTTAAACAAAAGAGTTG 238	Humain	TOCCAATGACTCCAGGAGCATTTGATTTTTCATTCATTCGAAATGCAGTCTCCCTCCCTG 1477
Canin	AAAACAGCTACATTTTGTATACACACCATTGACCGAATTTTCTACTGTGGAGAGCA 283	Canin	CTCACATGGGCTTCGGTCCAGCCCAAAGACCCCTCCCGAAGGCCAGTCTCTCTGTCAG 1522
Experimental	AAAACAGCTACATTTTGTATACACACCATTGACCGAATTTTCTACTGTGGAGAGCA 271	Experimental	CTCACATGGGCTTCGGTCCAGCCCAAAGACCCCTCCCGAAGGCCAGTCTCTCTGTCAG 1591
Humain	AAAACAGCTACATTTTGTATACACACCATTGACCGAATTTTCTACTGTGGAGAGCA 298	Humain	CTCACATGGGCTTCGGTCCAGCCCAAAGACCCCTCCCGAAGGCCAGTCTCTCTGTCAG 1537
Canin	GTCGAGAGAGATGATTAAGTGGTTCCTGTTGATTTGATGATCTCTGGGTTAACTCTA 343	Canin	ACTGTGAGCCACTCTCCGTGATAGAGACTCAAGCTGACAGGAAAGTCTCTCTCTGTCAG 1582
Experimental	GTCGAGAGAGATGATTAAGTGGTTCCTGTTGATTTGATGATCTCTGGGTTAACTCTA 331	Experimental	ACTGTGAGCCACTCTCCGTGATAGAGACTCAAGCTGACAGGAAAGTCTCTCTCTGTCAG 1597
Humain	GTCGAGAGAGATGATTAAGTGGTTCCTGTTGATTTGATGATCTCTGGGTTAACTCTA 358	Humain	ACTGTGAGCCACTCTCCGTGATAGAGACTCAAGCTGACAGGAAAGTCTCTCTCTGTCAG 1577
Canin	CAGAAAGAGATCTGTAAGGCCACTGGCAGCTCATACAAGCTCCAGCTGATTTACCTT 403	Canin	AAATTTTAAATTTTATGTCACAAAGTGGATCCGGATTTGACGTTTAAACAAAAGAGTTG 1642
Experimental	CAGAAAGAGATCTGTAAGGCCACTGGCAGCTCATACAAGCTCCAGCTGATTTACCTT 391	Experimental	AAATTTTAAATTTTATGTCACAAAGTGGATCCGGATTTGACGTTTAAACAAAAGAGTTG 1711
Humain	CAGAAAGAGATCTGTAAGGCCACTGGCAGCTCATACAAGCTCCAGCTGATTTACCTT 418	Humain	AAATTTTAAATTTTATGTCACAAAGTGGATCCGGATTTGACGTTTAAACAAAAGAGTTG 1657
Canin	TAGCTGTAAATACAGGCCACCATTCCACCAGTGGATTCATCTCCAGTGTCCACCTC 463	Canin	TTTGGAGTAACTGCTCTGAGTCTCCAGTGGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTG 1702
Experimental	TAGCTGTAAATACAGGCCACCATTCCACCAGTGGATTCATCTCCAGTGTCCACCTC 451	Experimental	TTTGGAGTAACTGCTCTGAGTCTCCAGTGGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTG 1771
Humain	TAGCTGTAAATACAGGCCACCATTCCACCAGTGGATTCATCTCCAGTGTCCACCTC 478	Humain	TTTGGAGTAACTGCTCTGAGTCTCCAGTGGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTG 1717
Canin	CTCCGATCAAGTAAATTAAGCTACACCACTGAGAACTCTGGGATCCAGGAGGATC 523	Canin	AAGAACTCAAGGCCCCAGTGAAGTCTCCATCTCAGGAAATTTGCTGAGTCTGAGTCTG 1762
Experimental	CTCCGATCAAGTAAATTAAGCTACACCACTGAGAACTCTGGGATCCAGGAGGATC 511	Experimental	AAGAACTCAAGGCCCCAGTGAAGTCTCCATCTCAGGAAATTTGCTGAGTCTGAGTCTG 1831
Humain	CTCCGATCAAGTAAATTAAGCTACACCACTGAGAACTCTGGGATCCAGGAGGATC 538	Humain	AAGAACTCAAGGCCCCAGTGAAGTCTCCATCTCAGGAAATTTGCTGAGTCTGAGTCTG 1777
Canin	CTCAAGACTACCTTCTGCTAATCACTGCTCAAGGCTGAGGCTGAGCCAGCCAGC 579	Canin	GCTTCTCTGCTCTCCAGGCTGAGTCTCCAGTGGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTG 1822
Experimental	CTCAAGACTACCTTCTGCTAATCACTGCTCAAGGCTGAGGCTGAGCCAGCCAGC 571	Experimental	GCTTCTCTGCTCTCCAGGCTGAGTCTCCAGTGGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTG 1891
Humain	CTCAAGACTACCTTCTGCTAATCACTGCTCAAGGCTGAGGCTGAGCCAGCCAGC 594	Humain	GCTTCTCTGCTCTCCAGGCTGAGTCTCCAGTGGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTG 1837
Canin	AGTATTTTGGTTTCAAGAGGAGAGGAAATTAAGTGAAGAACTTTAAAGAA 631	Canin	ACGACAGTGAAGAAATTAAGTGGTCCATTAAGCCAAAGCTCTCCGGGAAAGCTGCAATC 1882
Experimental	AGTATTTTGGTTTCAAGAGGAGAGGAAATTAAGTGAAGAACTTTAAAGAA 622	Experimental	ACGACAGTGAAGAAATTAAGTGGTCCATTAAGCCAAAGCTCTCCGGGAAAGCTGCAATC 1951
Humain	AGTATTTTGGTTTCAAGAGGAGAGGAAATTAAGTGAAGAACTTTAAAGAA 657	Humain	ACGACAGTGAAGAAATTAAGTGGTCCATTAAGCCAAAGCTCTCCGGGAAAGCTGCAATC 1897
Canin	ACACATGCTGATTCGGAAATCCACTCTCTGAAACAGACT 622	Canin	TTTTGGCAGTAAAGCTCTGATGGAGAGAGCTCTCTATGTTGCAAGCCAAAAGAGACA 1942
Experimental	AAAAGATTAATTAAGTGGTCCATTAAGCCAAAGCTCTCCGGGAAAGCTGCAATC 622	Experimental	TTTTGGCAGTAAAGCTCTGATGGAGAGAGCTCTCTATGTTGCAAGCCAAAAGAGACA 2011
Humain	ACACATGCTGATTCGGAAATCCACTCTCTGAAACAGACT 657	Humain	TTTTGGCAGTAAAGCTCTGATGGAGAGAGCTCTCTATGTTGCAAGCCAAAAGAGACA 1957
Canin	GCAATGATAGCTGCTCTCTCAAAAATTTCTGCTCTCCAGAGCAAGATGGAGTGA 682	Canin	AACAAAGTGGAAATACCTAGAGCTGGATTTAGATTTGGAATAATCACACCAAGCAAGTGAAG 2002
Experimental	GCAATGATAGCTGCTCTCTCAAAAATTTCTGCTCTCCAGAGCAAGATGGAGTGA 674	Experimental	AACAAAGTGGAAATACCTAGAGCTGGATTTAGATTTGGAATAATCACACCAAGCAAGTGAAG 2071
Humain	GCAATGATAGCTGCTCTCTCAAAAATTTCTGCTCTCCAGAGCAAGATGGAGTGA 697	Humain	AACAAAGTGGAAATACCTAGAGCTGGATTTAGATTTGGAATAATCACACCAAGCAAGTGAAG 2017
Canin	ATGGCTTTTCTAGCAGCAATTCATGATGCTCTCAGGCTCTGCTGCTGCTCTGTT 742	Canin	AAAAGAGCAAGTGGCTCAGCAGCAAGTGGATTTAGATTTGGAATAATCACACCAAGCAAGTGAAG 2062
Experimental	ATGGCTTTTCTAGCAGCAATTCATGATGCTCTCAGGCTCTGCTGCTGCTCTGTT 734	Experimental	AAAAGAGCAAGTGGCTCAGCAGCAAGTGGATTTAGATTTGGAATAATCACACCAAGCAAGTGAAG 2131
Humain	ATGGCTTTTCTAGCAGCAATTCATGATGCTCTCAGGCTCTGCTGCTGCTCTGTT 757	Humain	AAAAGAGCAAGTGGCTCAGCAGCAAGTGGATTTAGATTTGGAATAATCACACCAAGCAAGTGAAG 2077
Canin	CTGTAGACTCAGCCCTTTATAAAGTGGCTAGGAGTACTTCCAGAGTTTAAACAAAG 802	Canin	ATCAACAGAGCAAGTGGCTCAGCAGCAAGTGGATTTAGATTTGGAATAATCACACCAAGCAAGTGAAG 2122
Experimental	CTGTAGACTCAGCCCTTTATAAAGTGGCTAGGAGTACTTCCAGAGTTTAAACAAAG 794	Experimental	ATCAACAGAGCAAGTGGCTCAGCAGCAAGTGGATTTAGATTTGGAATAATCACACCAAGCAAGTGAAG 2191
Humain	CTGTAGACTCAGCCCTTTATAAAGTGGCTAGGAGTACTTCCAGAGTTTAAACAAAG 817	Humain	ATCAACAGAGCAAGTGGCTCAGCAGCAAGTGGATTTAGATTTGGAATAATCACACCAAGCAAGTGAAG 2137
Canin	TGCTCTCTCAGTACCGCAAGTGGAGTGGAGTCTTATGTTTAAATCCCAATTCGGGA 862	Canin	CCACAAGTCTGAAGCAAGTGGCTCAGCAGCAAGTGGATTTAGATTTGGAATAATCACACCAAGCAAGTGAAG 2180
Experimental	TGCTCTCTCAGTACCGCAAGTGGAGTGGAGTCTTATGTTTAAATCCCAATTCGGGA 854	Experimental	CCACAAGTCTGAAGCAAGTGGCTCAGCAGCAAGTGGATTTAGATTTGGAATAATCACACCAAGCAAGTGAAG 2249
Humain	TGCTCTCTCAGTACCGCAAGTGGAGTGGAGTCTTATGTTTAAATCCCAATTCGGGA 877	Humain	CCACAAGTCTGAAGCAAGTGGCTCAGCAGCAAGTGGATTTAGATTTGGAATAATCACACCAAGCAAGTGAAG 2175
Canin	CATCAAGTGTAGAGACTCAAAATGAGGATGATATTAAGTATGACATCTCTCCAAAC 922	Canin	CATCAAGTGTAGAGACTCAAAATGAGGATGATATTAAGTATGACATCTCTCCAAAC 914
Experimental	CATCAAGTGTAGAGACTCAAAATGAGGATGATATTAAGTATGACATCTCTCCAAAC 914	Experimental	CATCAAGTGTAGAGACTCAAAATGAGGATGATATTAAGTATGACATCTCTCCAAAC 983
Humain	CATCAAGTGTAGAGACTCAAAATGAGGATGATATTAAGTATGACATCTCTCCAAAC 937	Humain	CATCAAGTGTAGAGACTCAAAATGAGGATGATATTAAGTATGACATCTCTCCAAAC 937
Canin	CTGGTAATTAATTAAGTATCCAGCAATTTCCAGAGGAACTTTGGGACAGAGTCAAA 982	Canin	CTGGTAATTAATTAAGTATCCAGCAATTTCCAGAGGAACTTTGGGACAGAGTCAAA 1051
Experimental	CTGGTAATTAATTAAGTATCCAGCAATTTCCAGAGGAACTTTGGGACAGAGTCAAA 974	Experimental	CTGGTAATTAATTAAGTATCCAGCAATTTCCAGAGGAACTTTGGGACAGAGTCAAA 997
Humain	CTGGTAATTAATTAAGTATCCAGCAATTTCCAGAGGAACTTTGGGACAGAGTCAAA 1027	Humain	CTGGTAATTAATTAAGTATCCAGCAATTTCCAGAGGAACTTTGGGACAGAGTCAAA 997
Canin	AGCTAGACACTATTCAGATCTCTCTCTCTGCGCCAGCCAGCAACATCCAGCTCATG 1042	Canin	AGCTAGACACTATTCAGATCTCTCTCTCTGCGCCAGCCAGCAACATCCAGCTCATG 1042
Experimental	AGCTAGACACTATTCAGATCTCTCTCTCTGCGCCAGCCAGCAACATCCAGCTCATG 1111	Experimental	AGCTAGACACTATTCAGATCTCTCTCTCTGCGCCAGCCAGCAACATCCAGCTCATG 1111
Humain	AGCTAGACACTATTCAGATCTCTCTCTCTGCGCCAGCCAGCAACATCCAGCTCATG 1057	Humain	AGCTAGACACTATTCAGATCTCTCTCTCTGCGCCAGCCAGCAACATCCAGCTCATG 1057
Canin	ACCAGTCTCTCTGGAAAGCTGCAAGTATCACAGCCAGGCTCAGATCTGACAGTATG 1102	Canin	ACCAGTCTCTCTGGAAAGCTGCAAGTATCACAGCCAGGCTCAGATCTGACAGTATG 1102
Experimental	ACCAGTCTCTCTGGAAAGCTGCAAGTATCACAGCCAGGCTCAGATCTGACAGTATG 1171	Experimental	ACCAGTCTCTCTGGAAAGCTGCAAGTATCACAGCCAGGCTCAGATCTGACAGTATG 1171
Humain	ACCAGTCTCTCTGGAAAGCTGCAAGTATCACAGCCAGGCTCAGATCTGACAGTATG 1117	Humain	ACCAGTCTCTCTGGAAAGCTGCAAGTATCACAGCCAGGCTCAGATCTGACAGTATG 1117
Canin	ACTGTATCCCTCAGCAGGAGTCCACCATCAGTATGATTAACCAATTTCCACTGTGAT 1162	Canin	ACTGTATCCCTCAGCAGGAGTCCACCATCAGTATGATTAACCAATTTCCACTGTGAT 1162
Experimental	ACTGTATCCCTCAGCAGGAGTCCACCATCAGTATGATTAACCAATTTCCACTGTGAT 1231	Experimental	ACTGTATCCCTCAGCAGGAGTCCACCATCAGTATGATTAACCAATTTCCACTGTGAT 1177
Humain	ACTGTATCCCTCAGCAGGAGTCCACCATCAGTATGATTAACCAATTTCCACTGTGAT 1177	Humain	ACTGTATCCCTCAGCAGGAGTCCACCATCAGTATGATTAACCAATTTCCACTGTGAT 1177
Canin	TGAAACAAATTCGAAAGAGTGGTATGTTCTCAAGCTGCTATGATATCCAGCAACTTC 1222	Canin	TGAAACAAATTCGAAAGAGTGGTATGTTCTCAAGCTGCTATGATATCCAGCAACTTC 1222
Experimental	TGAAACAAATTCGAAAGAGTGGTATGTTCTCAAGCTGCTATGATATCCAGCAACTTC 1291	Experimental	TGAAACAAATTCGAAAGAGTGGTATGTTCTCAAGCTGCTATGATATCCAGCAACTTC 1291
Humain	TGAAACAAATTCGAAAGAGTGGTATGTTCTCAAGCTGCTATGATATCCAGCAACTTC 1237	Humain	TGAAACAAATTCGAAAGAGTGGTATGTTCTCAAGCTGCTATGATATCCAGCAACTTC 1237

Figure 3.4 : Quantification de l'ARNm codant pour Gab1 et séquençage de l'ADNc.

A) Schéma représentant les régions (trois combinaisons) amplifiées dans la séquence codante de Gab1. B) Fragments d'ADN amplifiés dans les trois lignées à partir des ADNc produits par transcription inverse (RT) venant de l'ARN total des cellules. H₂O représente le témoin sans ADN. v.t.= variants transcriptionnels. L'amplification de MEK2 sert de témoin et a été effectuée en parallèle de l'amplification de Gab1 à partir de la même réaction de RT. C) Schéma représentant la région (indiquée en rouge) utilisée pour l'amplification dans la réaction de qPCR. D) Histogramme représentant la quantité relative d'ARNm de Gab1, pour 500ng d'ARN total, présente dans les lignées transformées, par rapport à la lignée parentale MDCK, tel qu'obtenu par qPCR. Voir la section Matériel et méthodes pour plus de détails. E) Alignement de la séquence expérimentale obtenue pour les cellules MDCK (Experimental), de la séquence humaine

(Humain, numéro d'accèsion NM_207123) et de la séquence canine prédite dans GeneBank (Canin). La séquence en vert représente le v.t. 1, présent dans l'isoforme a de Gab1, mais absente dans l'isoforme b. La région surlignée en jaune représente la région reconnue par l' α -Gab1(H-198). La région surlignée en rouge représente l'insertion de 81pb observée dans la séquence expérimentale par rapport aux séquences canine et humaine. Ces résultats sont représentatifs de quatre (B) et deux (D, E) expériences similaires, respectivement.

De plus, nous avons été en mesure de séquencer deux variants transcriptionnels (présentés à la **Figure 3.4B**, combinaisons 1 et 3). Bien que le deuxième variant transcriptionnel ne soit pas présent dans GeneBank, l'alignement de la séquence humaine de Gab1 (v.t.2) avec la séquence expérimentale des cellules MDCK (v.t.2) a permis de constater que l'absence de 90pb observée correspond bel et bien à la taille attendue d'un deuxième variant transcriptionnel. De plus, les deux isoformes de Gab1, correspondant aux deux variants transcriptionnels, sont reconnues en IB, dans les cellules MDCK et ont environ une différence de 12kDa (**Figure 3.1B** et **3.2B**). La région surlignée en vert, à la **Figure 3.4E**, représente cette région.

Bien que très informative, la RT-PCR conventionnelle ne permet pas une appréciation quantitative de l'ARNm de Gab1 présente dans les lignées transformées par rapport à la lignée parentale MDCK. Nous avons donc aussi utilisé une méthode quantitative, la PCR quantitative en temps réel, appelée qPCR (« quantitative PCR » : voir section 2.7.3 pour une description de la technique). Cette technique très sensible (peut détecter l'ADN à partir de 10 copies) permet de normaliser directement les signaux obtenus en considérant le nombre de cellules ou la quantité d'acide nucléique utilisés lors de la PCR, sans avoir à utiliser un gène référentiel comme dans le cas de la PCR conventionnelle. À partir de l'ARN total, il a été possible de faire la RT et la PCR de Gab1 dans une même réaction.

Les données obtenues de l'appareil de PCR en temps réel donnent le C_T (« cycle threshold»), qui représente le nombre de cycles à partir duquel la fluorescence peut être détectée pendant la réaction de PCR (voir **Figure 2.1** pour plus de détails). Pour que le niveau d'ADN amplifié de Gab1 (cette région est illustrée à la **Figure 3.4C**) atteigne cet état dans la lignée parentale MDCK, il a fallu 20 cycles d'amplification, alors qu'il a fallu 27 ou 28,5 cycles pour obtenir le même résultat dans les lignées MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV, respectivement. Considérant qu'il y a duplication du produit amplifié à chaque cycle de PCR, il s'agit d'une diminution d'environ 137 et 298 fois, pour les

cellules MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV, respectivement. Ces résultats, qui sont représentés sous forme d'histogramme à la **Figure 3.4D**, sont exprimés par rapport à ceux obtenus pour la lignée MDCK. L'ARNm de Gab1 est beaucoup moins présent dans les cellules MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV. Au contraire de ce que nous avons d'abord pensé, considérant le caractère invasif des cellules MSV-MDCK-INV, ces résultats nous permettent d'affirmer qu'il y a une répression de Gab1 au niveau transcriptionnel dans cette lignée ainsi que dans la lignée transformée mais non-invasive.

3.1.5 Gab1 est recrutée à c-Met mais ne recrute pas Shp2 dans les lignées MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV

Suite aux résultats obtenus à la section 3.1.4, nous avons voulu déterminer s'il y avait quand même recrutement de Shp2 à c-Met activé, dans les lignées MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV, malgré le fait que Gab1 y soit très faiblement exprimée. Comme il a été démontré plusieurs fois dans la littérature (99, 106, 147) suite à l'activation de c-Met par le HGF, il y a recrutement de Grb2, Gab1 et Shp2 à ce dernier, en moins de 15 minutes. Ces interactions ont été démontrées par des études de co-immunoprécipitation (co-IP). La co-IP permet, suite à l'immunoprécipitation d'une protéine d'intérêt, d'identifier par IB les protéines qui interagissent avec cette dernière, d'une manière directe ou indirecte à l'intérieur d'un même complexe. Afin de s'assurer qu'une quantité équivalente d'anticorps est utilisée entre les différentes conditions, un IB des IgG est présenté dans toutes les IP effectuées dans ce mémoire. Puisque les IgG sont des anticorps, il nous est possible, lorsque l'immunoprécipitat est déposé sur le gel SDS-PAGE, de révéler les chaînes lourdes de ces dernières à 50kDa, avec l'anticorps secondaire. Les études citées précédemment (99, 100, 105-107, 111, 147) furent réalisées avec des protéines exprimées de façon exogène (par transfection), dont la séquence avait été couplée aux étiquettes (l'hémagglutinine ou Myc, par exemple). Pour notre part, nous voulions étudier la formation du complexe c-Met/Grb2/Gab1/Shp2 dans nos trois lignées, en utilisant les protéines endogènes. Pour ce faire, nous avons déterminé le moment propice à la formation du complexe c-Met/Grb2/Gab1/Shp2 suite à la stimulation de c-Met par le rHGF, dans la lignée parentale MDCK. Puisque le complexe est connu pour

exister dans ces cellules et que nous ne savions pas s'il était présent dans les lignées transformées par le MSV, ces résultats nous ont servi de référence. Nous avons pris comme acquis que les conditions choisies pour l'établissement de ce complexe dans les cellules MDCK devaient être identiques dans les cellules MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV.

Nous avons effectué une immunoprécipitation (IP) de Gab1, après différents temps de stimulation des cellules MDCK par le rHGF. Le résultat est présenté à la **Figure 3.5A**. Ainsi qu'il a été démontré dans la littérature (147), le complexe se forme très rapidement, soit après une minute de stimulation. Suite à l'activation de c-Met, Shp2 et Grb2 restent liés à Gab1, pour une durée d'environ dix minutes. Par contre, c-Met demeure liée à Gab1 plus longtemps, soit environ 30 minutes. Il a donc été décidé que le traitement avec le rHGF durerait cinq minutes, afin de se situer à un moment où les interactions entre les différentes protéines du complexe semblent être optimales, illustré à la **Figure 3.5B**.

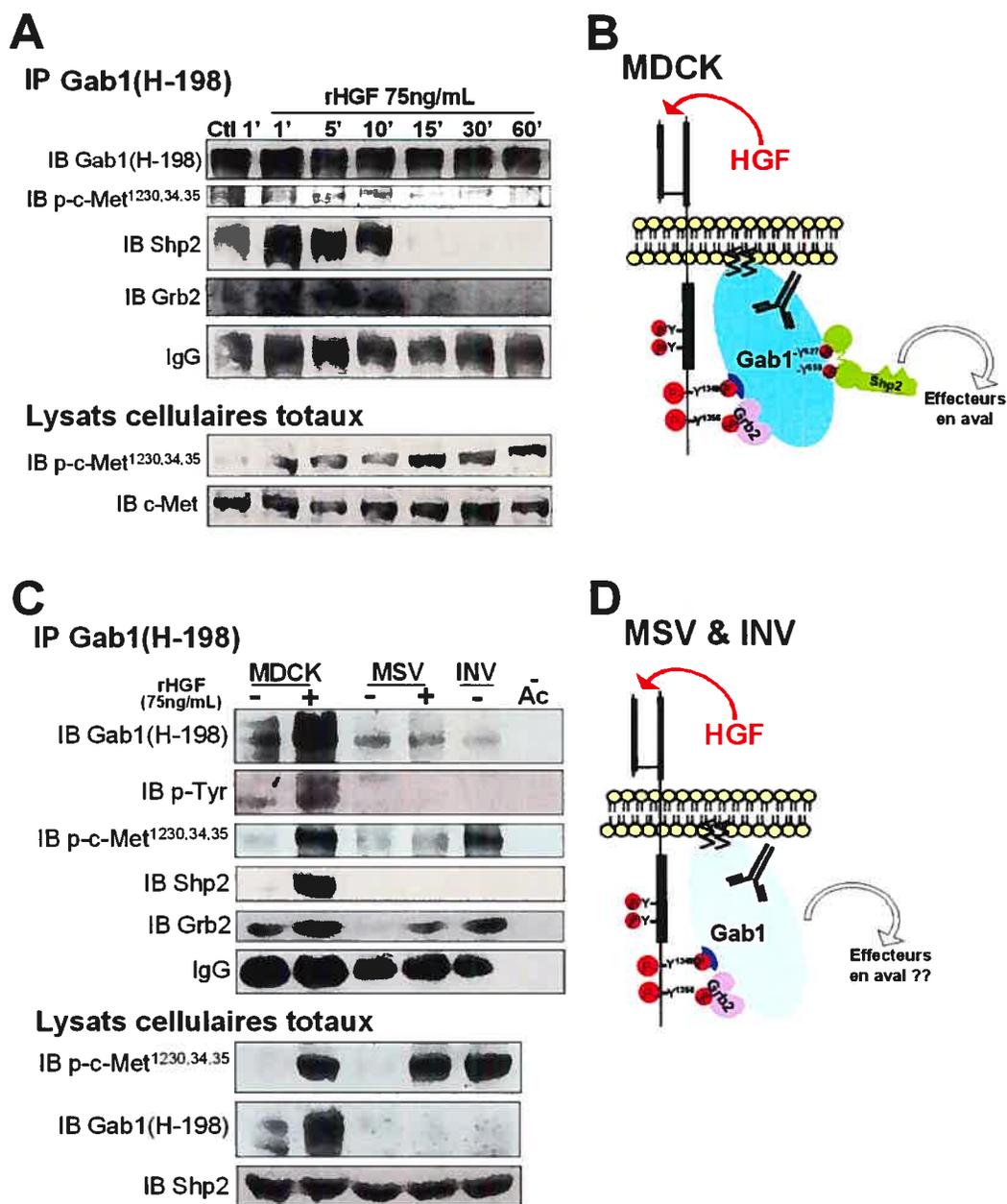


Figure 3.5 : Co-immunoprécipitation de c-Met et de Grb2 avec Gab1 dans toutes les lignées, mais non de Shp2.

A) Détermination du temps d'assemblage du complexe c-Met/Grb2/Gab1/Shp2 dans les cellules MDCK. Les cellules MDCK ont été mises en culture 24h dans du milieu contenant 10% sérum. Suite à un rinçage dans du milieu sans sérum, les cellules ont été privées de sérum pendant 24h puis traitées avec ou sans rHGF pour les temps indiqués. 2 mg de lysat cellulaire total pré-nettoyé ont été utilisés pour l'IP et mis en présence de 2µg d' α -Gab1(H-198). Suite à la récupération des immunoprécipitats et leur lavages, les IP ont été soumises aux IB indiqués (voir Matériel et méthodes). **B)** Schéma représentant les interactions observées, suite à l'IP avec l' α -Gab1(H-198) dans les cellules MDCK. **C)** Comparaison des complexes protéiques assemblés à Gab1 dans les trois lignées cellulaires. L'IP de Gab1 dans les trois lignées est réalisée dans les mêmes conditions qu'en A. Les cellules ont été traitées avec du rHGF pendant 5 min. « - Ac » représente l'IP témoin sans anticorps. Ces résultats sont représentatifs de quatre expériences similaires. Les IB sur les lysats cellulaires totaux sont utilisées pour démontrer la variation de la forme active de c-Met, avec ou sans stimulation au rHGF, ainsi qu'il n'y a pas de variation de la quantité de

protéines dans les différentes lignées. **D)** Schéma représentant les interactions observées, suite à l'IP avec l' α -Gab1(H-198) dans les cellules MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV.

Puisque nous étions en mesure d'observer la formation du complexe c-Met/Grb2/Gab1/Shp2 dans la lignée parentale MDCK après cinq minutes de traitement au rHGF, nous avons cherché à déterminer si ce complexe existait dans les lignées transformées par le MSV, malgré la faible expression de Gab1. La **Figure 3.5C** représente une IP effectuée sur des lysats des trois lignées cellulaires stimulées ou non au rHGF. Cette IP démontre que Gab1 interagit avec Grb2 et est recrutée à c-Met activé dans les trois lignées, mais est incapable de recruter Shp2 dans les lignées MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV, contrairement à ce qui est observé dans la lignée MDCK. De plus, les tyrosines phosphorylées de Gab1 ne sont pas détectées dans les lignées transformées par le MSV, contrairement à ce qui est obtenu dans la lignée parentale. Un schéma des interactions observées dans les lignées MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV est illustré à la **Figure 3.5D** et à la **Figure 3.5B** pour les cellules MDCK, suggérant que la phosphatase à résidus tyrosine Shp2 n'interagit pas avec Gab1 dans les lignées transformées.

3.2 Niveau d'expression et d'implication de Gab2 dans les trois lignées cellulaires

Les résultats obtenus précédemment montrent que Gab1 est réprimée et incapable de recruter Shp2 dans les lignées MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV. Pour cette raison, nous avons abordé le deuxième objectif de ce projet, c'est-à-dire déterminer si Gab2 a un rôle spécifique à jouer dans ces lignées. Plus particulièrement, nous avons évalué l'habileté de Gab2 à recruter Shp2, dans les lignées transformées par le MSV.

3.2.1 Gab2 est plus fortement exprimée dans les cellules MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV

Certaines protéines peuvent être sur-exprimées dans les cellules cancéreuses, comme c'est le cas de Gab2 dans les tumeurs mammaires (35). Cette sur-expression de Gab2 l'implique souvent dans une sur-activation des voies de signalisation en aval (16,

24). Afin de déterminer s'il y avait une variation de l'expression de Gab2 dans les cellules MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV par rapport aux cellules MDCK des IB α -Gab2 ont été effectués. La quantification des IB représentée à la **Figure 3.6A** permet d'affirmer que Gab2 est plus fortement exprimée dans les cellules transformées par le MSV que dans la lignée parentale. En effet, comparativement aux cellules MDCK, les cellules MSV-MDCK et les MSV-MDCK-INV ont une expression protéique de 10% et 26% plus élevée, respectivement.

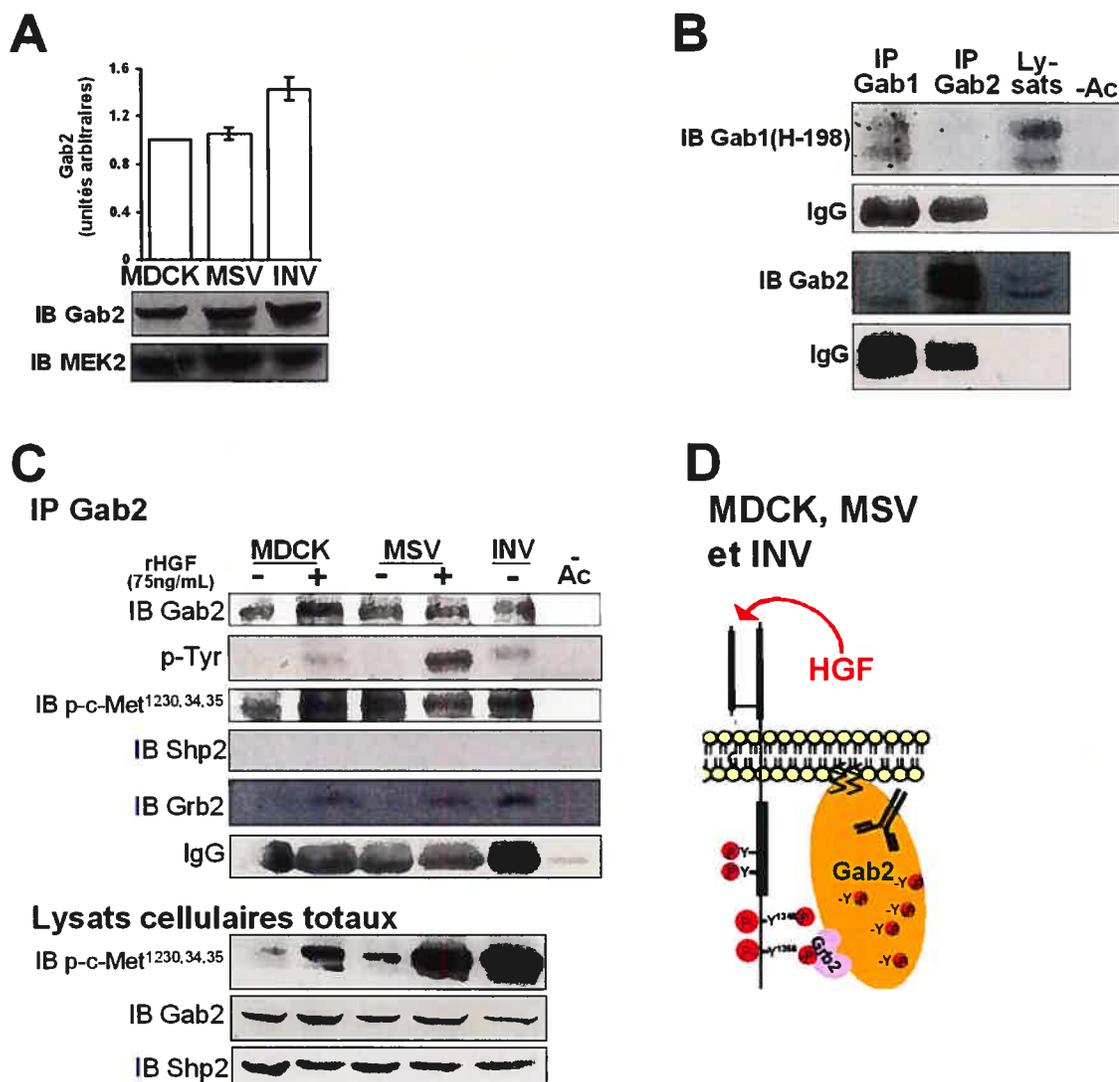


Figure 3.6 : Gab2 est sur-exprimée et recrutée à c-Met activé dans les cellules transformées par le MSV mais ne réussit pas à recruter Shp2.

A) IB effectué sur des lysats cellulaires totaux (60 μ g de protéines) des trois lignées avec l' α -Gab2. L'histogramme représente le niveau relatif de Gab2 par rapport aux cellules MDCK. B) IP α -Gab1(H-198) et α -Gab2 à partir de 500 μ g de lysat cellulaire total provenant des cellules MDCK avec 0,5 μ g d'anticorps.

60 µg de protéines ont été utilisés pour les lysats. « -Ac » représente le témoin d'IP sans anticorps. **C)** IP effectuée avec l' α -Gab2 dans les trois lignées cellulaires, dans les mêmes conditions que la Figure 3.5C. **D)** Schéma représentant les interactions observées dans les trois modèles cellulaires, suite à l'IP de Gab2. Ces résultats sont représentatifs de quatre (A) et trois (B) expériences similaires.

3.2.2 Gab2 est recrutée à c-Met activé mais n'interagit pas avec Shp2 dans les lignées transformées par le MSV

Nous avons démontré que Gab1 est réprimée et incapable de recruter Shp2 à c-Met activé. Nous avons voulu déterminer si Gab2 pouvait remplacer Gab1, pour faire le lien entre c-Met et Shp2 et ainsi moduler cette voie de signalisation. En premier, nous avons déterminé si l'anticorps α -Gab2 utilisé était bien spécifique à Gab2, et réciproquement pour Gab1. Les résultats de ce test sont présentés à la **Figure 3.6B**. Comme il est possible de le constater, l' α -Gab1(H-198) reconnaît uniquement Gab1 et il en est de même pour l' α -Gab2. Ainsi, les résultats obtenus pour les IP de Gab1 (**Figure 3.5C**) et Gab2 (**Figure 3.6C**) sont fiables et peuvent conduire à des conclusions claires.

L'IP Gab2 est présentée à la **Figure 3.6C**. Gab2 est recrutée à c-Met activé et à Grb2, dans une proportion intéressante, sans toutefois interagir avec Shp2. Du moins, l'interaction n'a pas pu être mise en évidence ici. De plus, Gab2 est phosphorylée sur les résidus tyrosine suite à l'activation de c-Met par le HGF. Donc, il semble que même si Gab2 est sur-exprimée dans les lignées transformées comparativement à la lignée normale, il n'y ait pas de différences dans les interactions effectuées par cette protéine avec c-Met et Grb2 dans nos trois modèles cellulaires (**Figure 3.6D**). Ainsi, Gab2 ne semble pas pouvoir prendre le relais de Gab1 dans les lignées MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV, du moins au niveau de son interaction avec Shp2.

3.3 Implication de c-Met et Shp2 dans les trois lignées cellulaires

Puisque les protéines adaptatrices Gab1 et Gab2 ne peuvent pas faire le lien entre le récepteur c-Met et la phosphatase Shp2 dans les lignées MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV, nous avons envisagé la possibilité de l'existence d'une autre voie de

signalisation permettant le lien entre ces protéines dans les cellules transformées par le MSV.

3.3.1 c-Met recrute non-seulement Gab1, mais Shp2 dans toutes les lignées cellulaires.

En premier lieu, une IP avec un anticorps ciblé contre la partie C-terminale de c-Met (α -CT-c-Met) a été effectuée afin de s'assurer de la réciprocity des résultats obtenus aux **Figures 3.5** et **3.6**. Comme il est observé à la **Figure 3.7A**, c-Met recrute Gab1 et Grb2 dans toutes les lignées stimulées au rHGF. De plus, Shp2 semble être recrutée dans les trois lignées. Une plus forte quantité de Shp2 recrutée dans les cellules MSV-MDCK que dans les cellules MDCK et les MSV-MDCK-INV. Néanmoins, cette IP est la première preuve d'une interaction entre le récepteur et la phosphatase, dans les lignées MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV. Aucune autre mention d'une telle interaction, dans ces modèles cellulaires, n'est rapporté dans la littérature.

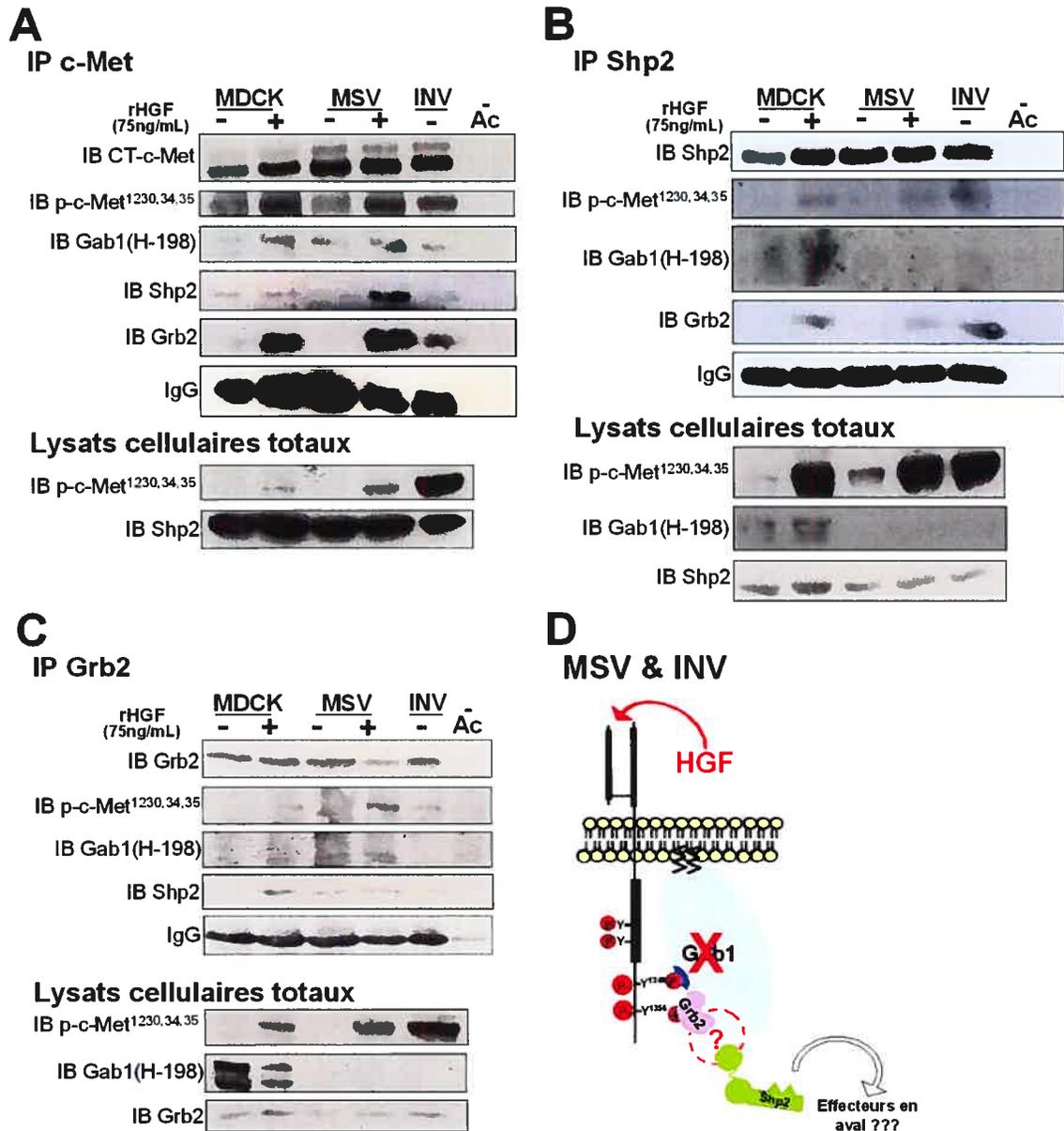


Figure 3.7 : Le complexe entre c-Met, Grb2 et Shp2 est formé dans toutes les lignées.
Les IP (A-C) sont effectuées dans les mêmes conditions que l'IP 3.5C. **A)** IP de c-Met. **B)** IP de Shp2. **C)** L'IP de Grb2. **D)** Schématisation résumant les interactions observées par co-immunoprécipitation dans les cellules transformées par le MSV. Le cercle pointillé et le point d'interrogation signifient qu'une interaction entre Grb2 et Shp2 est observée, mais que les expériences ne peuvent affirmer qu'il s'agit d'une interaction soit directe, soit via une autre protéine. Ces expériences (A-C) sont représentatives de 3 résultats similaires.

3.3.2 Shp2 et Grb2 interagissent entre elles dans toutes les lignées.

Suite aux résultats obtenus démontrant la co-immunoprécipitation (co-IP) entre c-Met et Shp2 dans les lignées MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV, nous avons voulu

identifier les interactions protéine-protéine, même indirectes établies par Shp2, suite à l'activation de c-Met. La **Figure 3.7B** démontre que Shp2 semble co-immunoprécipiter Gab1 seulement dans la lignée parentale, bien que le signal obtenu en IB ne soit jamais clair. Le plus important est la découverte d'une l'interaction entre Shp2 et c-Met activé, probablement via Grb2, dans toutes les lignées. Ce dernier résultat nous a amenés à effectuer une IP Grb2, afin de s'assurer de la réciprocité des résultats obtenus en A et B.

Comme le montre la **Figure 3.7C**, Grb2 est recrutée à c-Met activé. Il nous a été impossible de clairement déterminer la co-IP entre Grb2 et Gab1 dans l'IB présenté à cette figure. De plus, dans les cellules MSV-MDCK-INV, alors que Grb2 interagit avec Gab1, l'inverse ne semble pas être observé. Cependant, dans une autre expérimentation, il nous a été possible de détecter Gab1 en co-IP avec Grb2 (**Figure 3.7C**), très faiblement. Néanmoins, le signal très clair observé à la **Figure 3.5C** nous indique que l'interaction entre Gab1 (IP) et Grb2 (IB) existe, mais que la co-IP réciproque, entre Grb2 (IP) et Gab1 (IB) est plus difficile à obtenir. De manière générale, l'IP Grb2 est difficile à réaliser. Aussi, Shp2 est recruté à Grb2 dans toutes les lignées. Encore une fois, dans la lignée MSV-MDCK-INV, cette interaction est moins forte. La quantité d'anticorps utilisée n'est pas en cause, puisque le signal correspondant aux chaînes lourdes des IgG est équivalent dans toutes les lignées (**Figure 3.7C**).

L'ensemble des résultats des **Figures 3.5C** et **3.7** permet l'établissement d'un modèle préliminaire, illustré à la **Figure 3.7D**, des interactions observées dans les lignées MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV. Malgré l'incapacité de Gab1 à recruter Shp2 (dans les conditions de tampon et d'incubation utilisées) dans les cellules transformées par le MSV, une voie parallèle entre Grb2 et Shp2 permettrait de transmettre le signal d'activation à Shp2 et aux effecteurs en aval. Par conséquent, dans les cellules transformées par le MSV, Gab1 et de Gab2 (tel que démontré à la **Figure 3.6C**) ne participent pas dans le recrutement de Shp2 à c-Met. Ainsi, Shp2 est tout de même recrutée au récepteur, mais via Grb2. Toutefois, il faut retenir que la co-IP est une technique qui ne permet pas de discerner entre une interaction directe ou une interaction par l'intermédiaire d'autres protéines, c'est-à-dire faisant partie d'un complexe.

3.4 Étude de l'implication de Shp2 dans les cellules MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV

Dans la section précédente, nous montrons que Shp2 participe à la formation du complexe signalétique en aval de c-Met, et ce même s'il y a répression de Gab1. Ces résultats nous ont poussés à vouloir déterminer plus spécifiquement l'implication de Shp2 dans les lignées transformées par le MSV, particulièrement dans l'acquisition de leur phénotype.

3.4.1 L'inhibition de Shp2 induit la contraction et une relocalisation de l'actine dans les cellules transformées par le MSV

Un inhibiteur reconnu de Shp2 est la calpeptine, un dipeptide aldéhyde qui a pour fonction première d'inhiber la calpaïne, en interagissant avec le résidu cystéine de son site catalytique. Le mécanisme, qui doit être semblable pour Shp2 (150, 151), est illustré à la **Figure 3.8A**. Il a été démontré précédemment que la calpeptine inhibe l'activité phosphatase de Shp2 de 60% avec une concentration 0,1mg/ml. Cette inhibition va jusqu'à 90% avec 1mg/ml de calpeptine (151).

L'activation de c-Met par le HGF a une grande importance dans le remodelage du cytosquelette des cellules MDCK (140), en favorisant la perte des fibres de stress et la dispersion cellulaire. Il en va de même pour les cellules MSV-MDCK. La boucle autocrine de HGF activant le récepteur c-Met des cellules MSV-MDCK-INV régule la formation des protrusions pseudopodiales et la localisation des protéines du cytosquelette d'actine (78, 79, 90, 174). RhoA est une petite protéine G, de la famille Rho, responsable de la formation des fibres de stress dans plusieurs types cellulaires dont les cellules MDCK (140). Lorsqu'un facteur de croissance active son récepteur, RhoA est inhibée dans certains systèmes cellulaires, via Shp2 (151), tel qu'illustré à la **Figure 3.8B**. Cette inhibition de RhoA inhibe la formation des fibres de stress et favorise la motilité des cellules. Ainsi, nous avons voulu déterminer l'impact de l'inhibition de Shp2 par la

calpeptine dans nos trois lignées cellulaires sur la localisation et l'état de polymérisation de l'actine, dont les fibres de stress et les bourgeonnements membranaires.

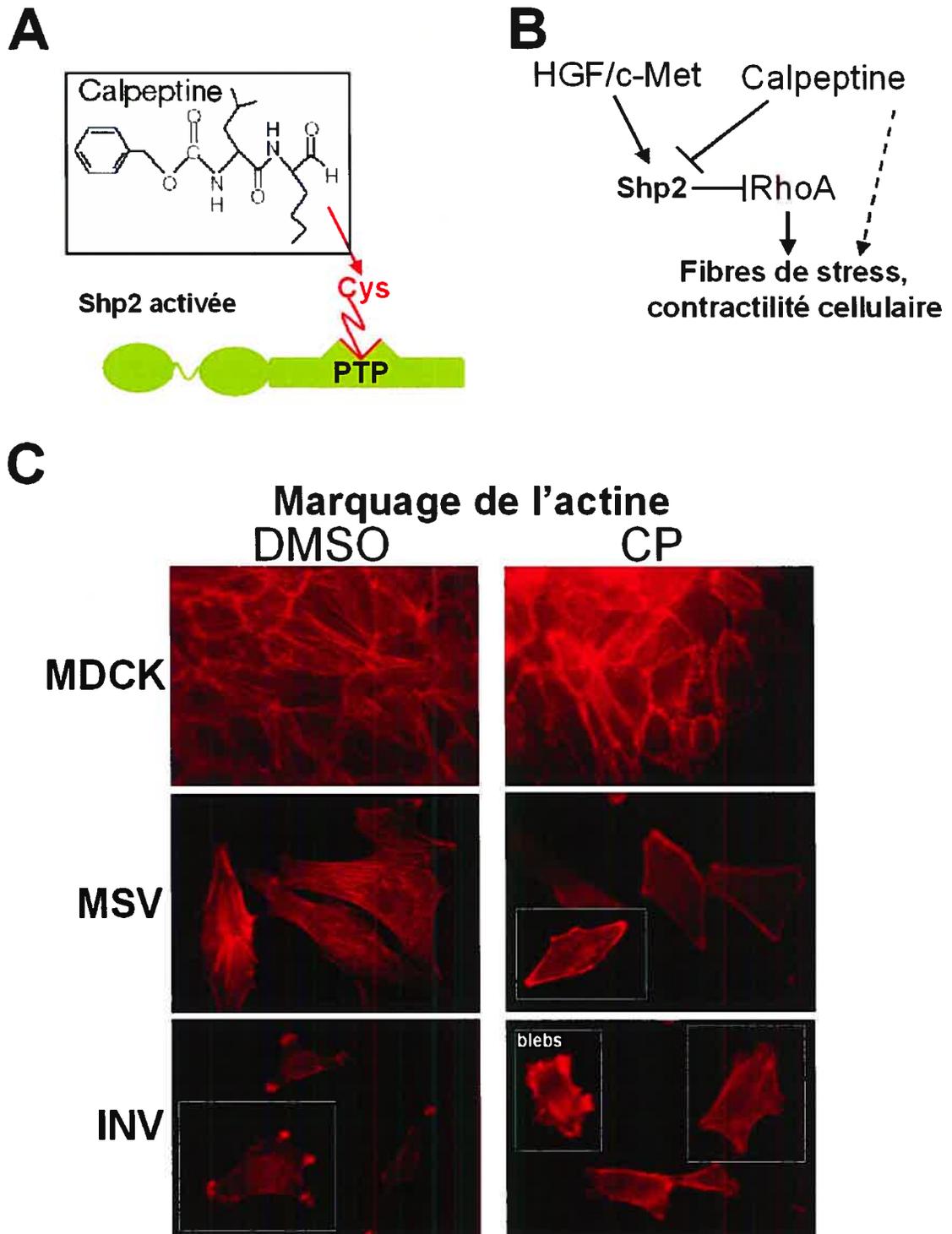


Figure 3.8 : Étude du changement de distribution de l'actine suite à l'inhibition de Shp2 dans les trois modèles cellulaires.

A) Structure de la calpeptine et site d'action probable sur Shp2. **B)** Schéma démontrant le lien entre l'activation de Shp2 par le HGF et l'inhibition de la formation des fibres de stress via RhoA. **C)** Les cellules MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV ont été ensemencées à 20 000 cellules dans du milieu contenant 10% de sérum (72h pour les cellules MDCK, 24h pour les autres lignées) dans des plats de 35mm. Les cellules ont ensuite été traitées avec de la calpeptine (CP) 0,1mg/ml ou du DMSO (véhicule de la CP, donc servant de témoin) 0,05% pour 30 minutes, à 37°C. Suite à leur fixation dans du PFA 4%, les cellules ont été sujettes à un marquage de l'actine avec la phalloïdine-TR. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences similaires.

Le traitement des cellules MDCK avec la calpeptine induit une perte des fibres de stress, tel qu'observé à la **Figure 3.8C**, en concordance avec les données de la littérature (55). L'effet induit dans les cellules MSV-MDCK est semblable. De plus, une contraction cellulaire, autre effet régulé par la GTPase RhoA est observé. Les cellules MSV-MDCK-INV sont normalement dépourvues de fibres de stress et leur protrusions pseudopodiales sont enrichies en actine- β (**Figure 3.8C**, DMSO). L'inhibition de Shp2 mène à une perte de l'actine dans les pseudopodes, en plus d'une contraction cellulaire (**Figure 3.8C**, CP). De plus, le traitement à la calpeptine de certaines cellules MSV-MDCK-INV induit la formation de petits bourgeonnements de la membrane plasmique, aussi appelés « blebs » (**Figure 3.8C**). Un effet similaire a été observé dans ces cellules par un traitement au nocodazole, qui induit la dépolymérisation des microtubules, ce qui a pour effet d'activer RhoA (194). De plus l'expression d'un mutant dominant actif de RhoA a le même effet dans ces cellules (79).

3.4.2 L'inhibition de Shp2 inhibe l'extension des protrusions pseudopodiales des cellules MSV-MDCK-INV

Afin de déterminer l'effet de la calpeptine sur la morphologie des protrusions pseudopodiales des cellules MSV-MDCK-INV, une expérience de vidéomicroscopie a été effectuée en prenant une photographie toutes les minutes. Un résumé de cette expérience est présenté à la **Figure 3.9A** et le film complet condensé en quelques secondes peut être visualisé sur un cédérom fourni à cet effet (**Vidéo 1**). Les photographies des cellules MSV-MDCK-INV ont été prises en temps réel dans le spectre visible, en trois étapes. Pour ce faire, les cellules ont été rincées et du milieu contenant du DMSO a été ajouté, des photographies ont été prises toutes les minutes, toujours dans le même champ. Les cellules MSV-MDCK-INV en présence de DMSO ont réagit

normalement, c'est-à-dire que leur protrusions pseudopodiales sont dynamiques, s'étendent et se rétractent rapidement (**Vidéo 1**). Lorsque l'on ajoute la calpeptine, les cellules se contractent très rapidement, dès les cinq premières minutes et restent ainsi. Finalement, lorsque l'on enlève le milieu contenant la calpeptine après 1h et qu'on le remplace par du milieu frais ne contenant que du DMSO, les protrusions pseudopodiales s'étendent à nouveau, et après 120 minutes, le phénotype initial des cellules est récupéré. On note donc une réversibilité de l'effet calpeptine.

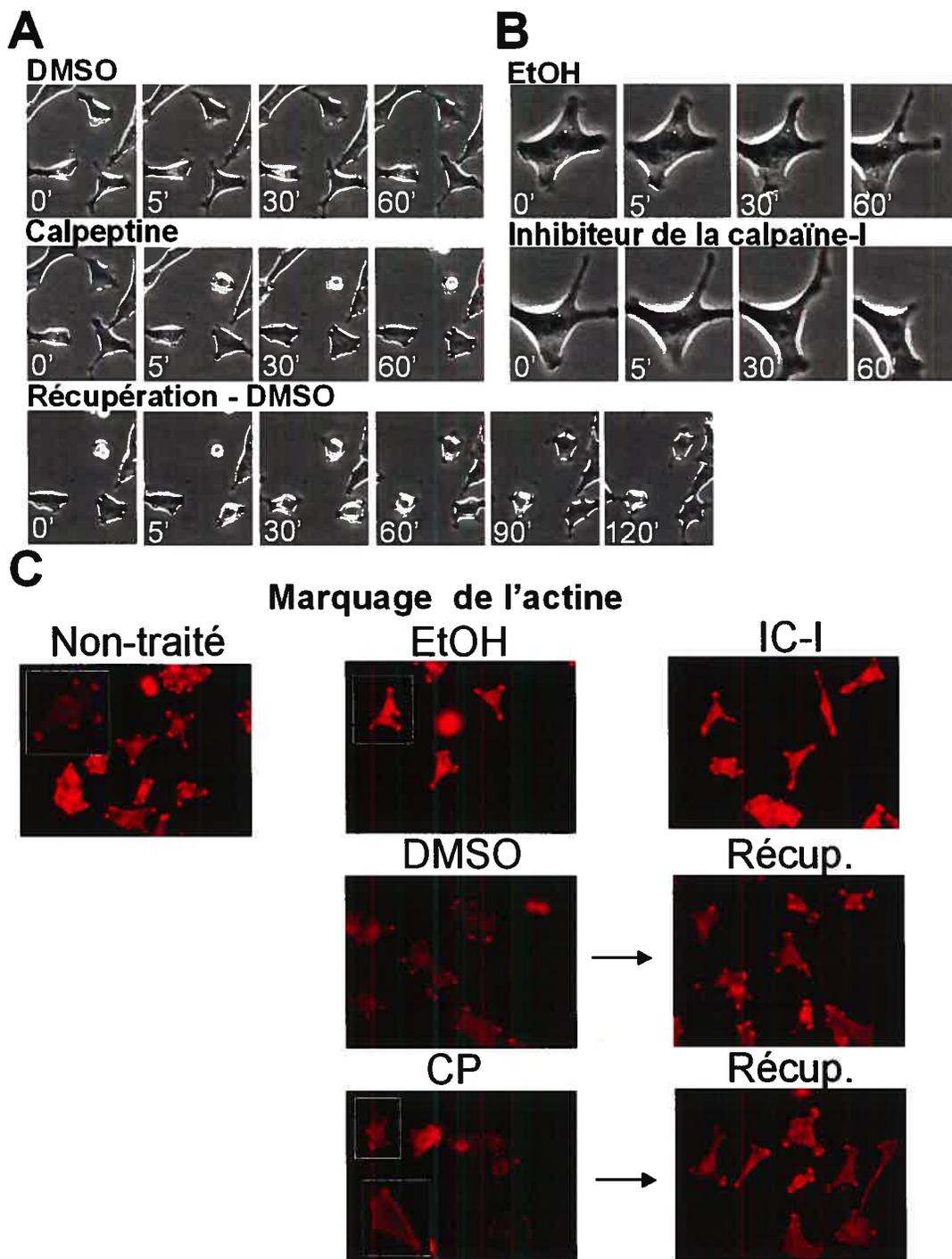


Figure 3.9 : L'effet de l'inhibition de Shp2 sur la formation des protrusions pseudopodiales des cellules MSV-MDCK-INV est réversible

A) Étude de l'effet de la calpeptine sur les cellules MSV-MDCK-INV. Ici est présenté un résumé des observations. Les cellules MSV-MDCK-INV (40 000 cellules) ont été ensemencées dans un plat de 35 mm dans du milieu contenant 10% sérum pendant 24h. Ensuite du milieu frais DMEM-Hepes contenant 10% sérum est ajouté. Les images ont été prises et enregistrées toutes les minutes. DMSO = milieu témoin 0,05%, CP = traitement à la calpeptine 0,1mg/ml, Recup = milieu témoin. Voir chapitre 7, Vidéo 1 pour plus de détails. **B)** Les cellules MSV-MDCK-INV ont été traitées de la même manière qu'en A, mais avec de l'EtOH (véhicule du CI-I), puis l'inhibiteur de la calpaïne-I (IC-I, 10 μ M) pendant 60 minutes,

respectivement. Voir Vidéo 2 au Chapitre 7. C) Les cellules MSV-MDCK-INV (40 000 cellules) ont étéensemencées dans du milieu contenant 10% de sérum pendant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées avec de la calpeptine (CP) 0,1mg/ml, du DMSO 0,05% pendant 30 minutes à 37°C. Pour démontrer la récupération du phénotype, un plat traité soit avec la CP, soit avec le DMSO pendant 30 minutes a été rincé et mis en présence de DMSO pour 2h (Recup). Non-traité représente un témoin sans traitement. Suite à leur fixation dans du PFA 4%, les cellules ont été sujettes à un marquage de l'actine avec la phalloïdine-TR. Ces résultats sont représentatifs de trois (A), de deux (B) et de une (C) expériences similaires.

Afin de s'assurer que cet effet n'était pas dû à l'inhibition de la calpaïne cellulaire par la calpeptine, un autre inhibiteur de la calpaïne, l'IC-I (l'inhibiteur de la calpaïne-I), a été utilisé à des fins de témoin (**Vidéo 2**). Cet inhibiteur n'a aucun effet sur les cellules MSV-MDCK-INV, comme il est démontré à la **Figure 3.9B**. Dans les cellules MSV-MDCK-INV, il est connu que l'actine est localisée de manière plus concentrée dans les protrusions pseudopodiales. Cette caractéristique permet de confirmer la récupération du phénotype suite au traitement à la calpeptine. En concordance avec les résultats présentés à la **Figure 3.8C**, la calpeptine induit une contraction cellulaire et une rétraction des pseudopodes, ainsi que la perte de la concentration d'actine à cet endroit (**Figure 3.9C**). Lorsque du milieu frais ne contenant que du DMSO est ajouté aux cellules traitées à la calpeptine, il y a réversibilité de cet effet. Les protrusions pseudopodiales réapparaissent et l'actine s'y retrouve aussi concentrée. Par ailleurs, aucun changement semblable à celui causé par la calpeptine dans ces cellules n'a été observé en présence de l'IC-I.

3.4.3 L'inhibition de Shp2 réduit la motilité des cellules MSV-MDCK-INV

Afin de déterminer si la motilité des cellules MSV-MDCK-INV est régulée en partie par Shp2, une étude de fermeture de plaie a été effectuée en présence de la calpeptine. Pour ce faire, les cellules MSV-MDCK-INV ont été ensemencées à haute densité, et une rayure sur la monocouche de cellules été faite dans le but de stimuler leur motilité naturelle. Par la suite, la capacité des cellules MSV-MDCK-INV à refermer la plaie est évaluée par la mesure de la surface de la plaie, après quelques heures. Une photographie du même champs est prise toutes les 5 minutes, et ce pour 17 heures. L'aire de la plaie des cellules traitées à la calpeptine peut ensuite être déterminée pour différents temps et comparée à la condition témoin.

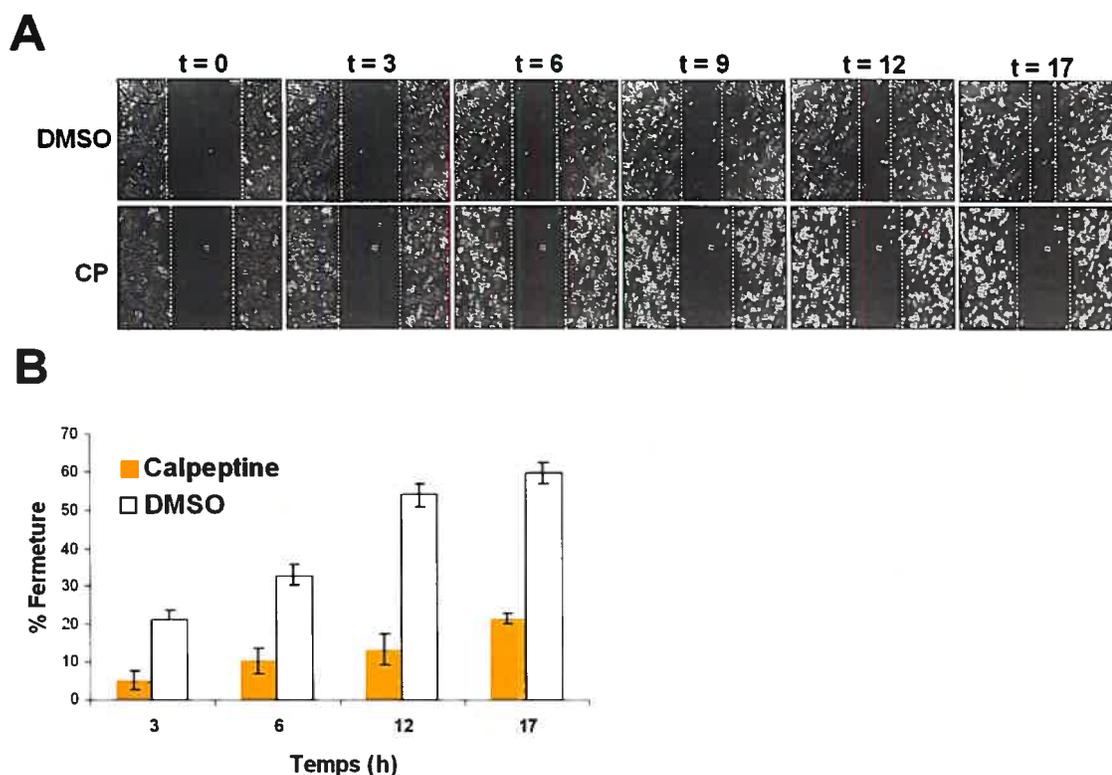


Figure 3.10 : Effet de l'inhibition de Shp2 sur la motilité des cellules MSV-MDCK-INV.

A) Étude de la capacité des cellules MSV-MDCK-INV à refermer une plaie, avec ou sans la présence de calpeptine. Les cellules ont été traitées avec le milieu témoin (DMSO, 0,05%) ou avec la calpeptine (0,1mg/ml) pour une durée de 17 heures. **B)** Histogramme représentant la capacité des cellules MSV-MDCK-INV à fermer une plaie en fonction du temps, tel que représentée en A. Ces résultats sont la moyenne de trois expériences similaires.

Un résumé de cette expérience est présenté à la **Figure 3.10A**. Le milieu témoin, contenant du DMSO, permet aux cellules MSV-MDCK-INV de bouger en bordure de la plaie et ainsi de l'envahir en fonction du temps. La plaie est refermée à 60% après 17h (**Figure 3.10B**). L'inhibition de Shp2 par la calpeptine induit un arrondissement des cellules et une contraction, tel qu'observé à la **Figure 3.9A**. La motilité est significativement inhibée car la plaie ne se referme en moyenne que de 22%. Ainsi, Shp2 semble avoir un rôle très important dans la régulation des protrusions pseudopodiales responsables de la motilité accrue des cellules MSV-MDCK-INV.

3.4.3 La phosphorylation de la tyrosine 542 de Shp2 varie en fonction du niveau d'activation de Shp2

Finalement, nous avons voulu aborder le mécanisme moléculaire de l'effet de la calpeptine sur Shp2. Cette dernière possède deux résidus tyrosines (Tyr542 et Tyr580) dans sa queue C-terminale, pouvant être phosphorylées. À ce jour, aucune étude n'a fait un lien entre la phosphorylation de ces tyrosines et l'activation de Shp2, en aval de c-Met. Nous avons donc tenté de comprendre le lien entre l'activation de Shp2 et le niveau de phosphorylation de la Tyr 542. Pour ce faire, des IB en utilisant un anticorps phospho-spécifique dirigé contre la tyrosine 542 de Shp2 ont été effectués (α -p-Shp2⁵⁴²). Cet anticorps reconnaît les résidus entourant la Tyr542 dans la partie C-terminale de Shp2, lorsque cette dernière est phosphorylée (voir **Figure 1.6A**).

L'effet de la calpeptine sur la phosphorylation de cette tyrosine a donc été déterminé. La **Figure 3.11A** représente un IB réalisé avec l' α -Shp2⁵⁴² avec des lysats cellulaires isolés des trois lignées cellulaires, traitées ou non avec la calpeptine. Le DMSO sert de témoin, puisqu'il est le véhicule de la calpeptine. Pour s'assurer que le DMSO n'a pas d'effet sur la phosphorylation de Shp2, un témoin non-traité a été effectué en parallèle des traitements de DMSO et de calpeptine.

Shp2 n'est pas ou peu phosphorylée sur la Tyr542 au niveau basal, tel qu'il est possible de l'observer à la **Figure 3.11A** (première condition), lorsqu'elle n'est pas activée par le HGF. L'activation de c-Met, par le HGF, induit une faible diminution du degré de phosphorylation de la Tyr542 aux cellules non-traitées ou traitées avec le DMSO. Lorsque Shp2 est inhibée par la calpeptine, il y a augmentation du degré de phosphorylation de la Tyr542. De plus, le pré-traitement à la calpeptine empêche l'activation de c-Met de diminuer le degré de phosphorylation de la Tyr542 (**Figure 3.11A**, comparer le champ « CP » avec ou sans rHGF). Allant dans le même sens, les résultats obtenus pour les cellules MSV-MDCK-INV montrent que la phosphorylation de la Tyr542 augmente suite au traitement par la calpeptine. Ces résultats suggèrent que la calpeptine, en inhibant Shp2, module le degré de phosphorylation de la Tyr542. Il nous a été impossible d'effectuer un IB sur Shp2 suite au décapage de la membrane après l'IB p-Shp2⁵⁴². Pour cette raison, cet IB n'est pas représenté à la **Figure 3.11A**. Cependant, l'IB CT-c-Met peut être utilisé pour permettre de comparer la quantité de protéines dans chaque puit.

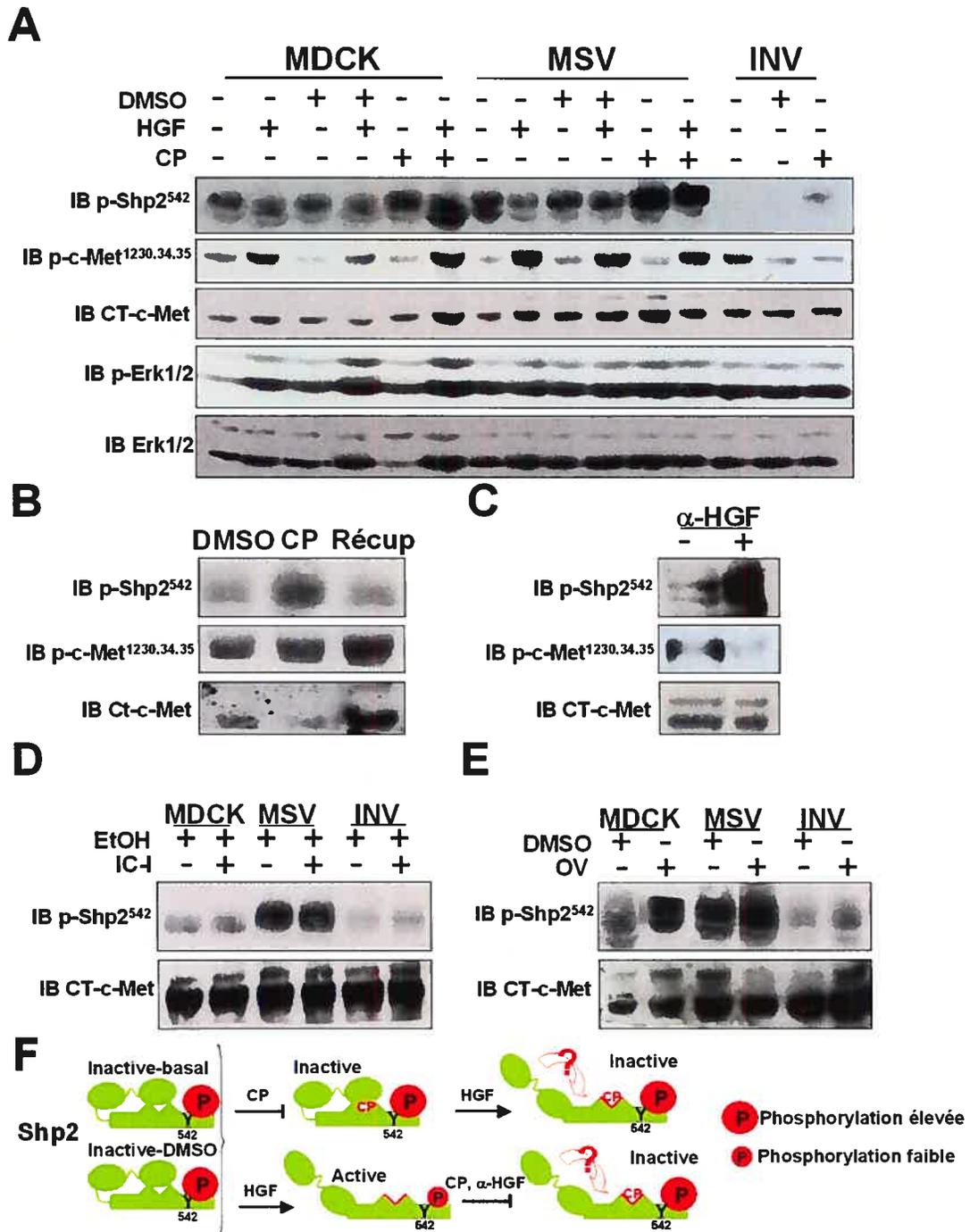


Figure 3.11 : Effet de la calpeptine sur la phosphorylation de Shp2.

Pour toutes ces expériences (A-E), les trois lignées cellulaires ont été ensemencées (1 000 000 pour les cellules MDCK et 500 000 pour les lignées transformées) dans des plats de 100mm pendant 24h en présence de sérum et 24h sans sérum. Les IB sont ensuite effectués sur 60 μ g de lysats cellulaires totaux des trois lignées. **A)** Les trois lignées ont été pré-traitées ou non avec du DMSO 0,05% ou de la calpeptine (CP) 0,1mg/ml, pendant 30 minutes. Par la suite, le rHGF a été ajouté ou non au milieu afin d'avoir une concentration finale de 75ng/ml pour une durée de 5 minutes. **B)** Les cellules MSV-MDCK-INV ont été traitées avec du DMSO 0,05% pour 30 minutes. Ensuite, la CP 0,1mg/ml a été ajoutée pour 30 minutes. Finalement, les cellules ont été rincées deux fois puis remises en milieu DMSO 0,05% pour 120 minutes (Récup), pour permettre la récupération. **C)** Les cellules MSV-MDCK-INV ont été traitées ou non pendant

18h en présence d' α -HGF (5 μ g/ml). **D**) Traitement des cellules avec l'EtOH (véhicule) ou l'inhibiteur de la calpaïne-I (IC-I, 10 μ M) pour 30 minutes. **E**) Traitement des cellules avec le DMSO 0,05% ou l'orthovanadate de sodium (OV, 100 μ M) pour 30 minutes. **F**) Schéma hypothétique expliquant le lien entre l'activation/l'inhibition de Shp2 et le degré de phosphorylation de la Tyr542. Le point d'interrogation signifie que nous ignorons la conformation que Shp2 adopte. Ces résultats sont représentatifs de trois (A-C) et deux (D,E) expériences similaires.

Comme il a été décrit dans l'introduction, une des fonctions de Shp2 est l'activation de Erk1/2. Nous avons voulu vérifier si l'inhibition de Shp2 par la calpeptine avait un effet sur le degré de phosphorylation des MAPK Erk1/2. L'inhibition de Shp2 par la calpeptine semble empêcher, dans une faible proportion, l'activation des MAPK Erk1/2, dans les cellules MDCK, suite à la stimulation de c-Met (**Figure 3.11A**, IB p-Erk1/2). Il est important de noter que dans la figure présentée, il y a plus de protéines dans le puit pré-traité avec la calpeptine en présence de HGF (comparer les IB Erk1/2 et p-Erk1/2). Cependant, l'inhibition de Shp2 ne semble avoir aucun effet sur le degré de phosphorylation constitutif (résultats non-publiés du laboratoire) de Erk1/2 des cellules transformées par le MSV, suggérant que Shp2 n'est pas impliquée dans l'activation de Erk1/2 dans ces cellules. Il n'y a pas de variation de la phosphorylation de c-Met par le traitement à la calpeptine. Les effets observés sont dus à une différence dans la quantité de protéines chargées lors de l'IB (comparer l'IB p-c-Met^{1230,34,35} avec l'IB CT-c-Met).

Comme il a été démontré à la **Figure 3.9A**, l'effet de la calpeptine est réversible, au niveau de la récupération du phénotype des cellules MSV-MDCK-INV. Afin de visualiser cet effet sur la protéine Shp2 au niveau moléculaire, nous avons reproduit le même protocole, mais en lysant les cellules à chaque étape. Tel que présenté à la **Figure 3.11B**, le niveau de phosphorylation de Shp2 sur la Tyr542 est bas en présence de DMSO et augmente significativement suite au traitement avec la calpeptine (**Figure 3.11B**, CP). Lorsque les cellules MSV-MDCK-INV sont traitées avec de la calpeptine, rincées avec du milieu frais et remises en présence de DMSO, le niveau de phosphorylation de la Tyr542 de Shp2 retourne au niveau basal (**Figure 3.11B**, Récup).

De plus, l'inhibition de la boucle autocrine avec de l' α -HGF, qui a pour effet d'inhiber l'activation du récepteur c-Met (**Figure 3.11C**, IB p-c-Met (174)), a le même effet que le traitement avec la calpeptine sur les cellules MSV-MDCK-INV. En effet, le degré de phosphorylation de la Tyr542 augmente fortement suite au traitement avec l' α -HGF, dans ces cellules, comme c'est le cas lorsque Shp2 est inhibée par la calpeptine.

Ceci démontre une fois de plus que le degré de phosphorylation de la Tyr542 de Shp2 est modulé par l'activation de c-Met par le HGF.

Afin de s'assurer que la variation du degré de phosphorylation de la Tyr542 de Shp2 n'était pas due à l'inhibition de la calpaïne, un IB p-Shp2⁵⁴² a été effectué sur des cellules traitées avec ou sans l'IC-I. Comme il est possible de le constater à la **Figure 3.11D**, l'inhibition de la calpaïne ne fait pas varier le degré de phosphorylation de la Tyr542 de Shp2. Finalement, l'inhibition de Shp2 par l'orthovanadate de sodium, un inhibiteur non-spécifique des phosphatases à résidus tyrosine, produit le même effet que la calpeptine sur le degré de phosphorylation de la Tyr542 de Shp2. Le niveau de phosphorylation de la Tyr542 de Shp2 augmente suite au traitement à l'orthovanadate de sodium, tel que présenté à la **Figure 3.11E**. Les effets de la calpeptine sur la phosphorylation de la Tyr542 de Shp2 sont résumés dans un schéma présenté à la **Figure 3.11F**. Ainsi, le degré de phosphorylation de la Tyr542 augmente lorsque Shp2 est inhibée, et ce phénomène semble dynamique, puisqu'il est réversible.

4. Discussion

Dans cette étude, nous voulions comprendre si Gab1 était réellement absente des lignées cellulaires MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV et si c'était le cas, identifier le mécanisme compensatoire utilisé par ces cellules pour transmettre le signal de c-Met.

4.1 La présence de Gab1 n'est pas essentielle dans l'acquisition d'un phénotype motile dans les cellules transformées par le virus du sarcome de Moloney

Comme il a été déjà mentionné, dans tous les systèmes cellulaires étudiés à ce jour, Gab1 est essentielle pour transmettre un message de motilité. Par exemple, en aval d'un récepteur c-Met oncogénique constitutivement activé (Trp-Met), l'implication de Gab1 est essentielle dans la tumorigenèse et la transformation (117). De plus, les cellules Gab1^{-/-} sont incapables d'induire le message de transformation d'une forme active du récepteur ErbB2, que se soit par la formation de colonies dans l'agar mou ou la formation de tumeurs dans des souris athymiques (190). Les mutants à action dominante négative de Gab1 qui ne peuvent pas lier Shp2 sont incapables de promouvoir l'activation de la voie des MAPK menant à la morphogénèse épithéliale (106, 147). Gab1 est donc considérée comme une protéine d'importance capitale égale à c-Met, pour la promotion de la transformation et l'invasion des cellules tumorales.

Les résultats préliminaires obtenus au début de cette étude révélaient qu'aucun signal Gab1 n'était détecté dans les cellules MSV-MDCK et leur variant hautement motile, les cellules MSV-MDCK-INV. La contradiction entre le rôle prépondérant de Gab1 et nos résultats suggérait la présence de mutations ou de délétions dans la séquence génique de Gab1, résultant en une protéine altérée ou tronquée. De telles modifications auraient permis d'expliquer la différence du signal détecté en IB avec l'anticorps α -CT-Gab1, entre les cellules MDCK et les lignées transformées par le MSV (**Figure 3.1B**). De plus, les résultats obtenus à la **Figure 3.2B** avec l' α -Gab1(H-198), ciblé contre la partie centrale de la protéine, permettait aussi de penser qu'il y avait des modifications dans la séquence codante de Gab1.

Nous avons donc abordé une deuxième hypothèse en parallèle, c'est-à-dire que la transcription de *Gab1* ait été réprimée en conséquence de l'infection des cellules MDCK par le virus du sarcome de Moloney. Les résultats de RT-PCR (**Figure 3.4B**) et de PCR quantitatif (**Figure 3.4D**) montrent que *Gab1* est beaucoup moins exprimée dans les lignées MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV, deux lignées aux propriétés transformées, dont un variant invasif. Ces observations sont en faveur d'une répression génique de *Gab1*. Fait intéressant, il y a encore moins de *Gab1* dans le variant invasif des cellules MDCK transformées par le MSV, que dans le modèle cellulaire transformé parental (**Figure 3.4B et 3.4D**). Ainsi, il semble qu'il y ait corrélation entre la quantité de *Gab1* exprimée et l'évolution du phénotype motile de ces cellules (**Figure 1.9A**). La répression génique peut donc expliquer à elle seule, sans avoir à invoquer des mutations, la faible détection/expression observée en IB. Aussi, la présence de la séquence additionnelle de 81pb dans la séquence codante de *Gab1* des cellules MDCK (**Figure 3.4E**) ne semble apporter aucune modification visible à *Gab1*. En effet, cette séquence se retrouve dans le site par reconnaissance de l' α -*Gab1*(H-198). En plus de reconnaître *Gab1* en IB, cet anticorps permet de recruter c-Met, Grb2 et Shp2 à cette dernière. L'existence d'une voie de signalisation dépendante de c-Met dans les cellules hautement motiles MSV-MDCK-INV fait en sorte qu'un mécanisme compensatoire est suspecté pour rendre compte de ce phénotype.

Nous avons aussi tenté de déterminer s'il existait des cellules tumorales d'origine humaine isolées de différents tissus où *Gab1* était aussi réprimée, mais sans succès. De plus, nous avons vérifié l'expression de *Gab1* dans des lignées cancéreuses provenant de différents tissus (**Figure 3.1C**) et dans d'autres lignées rénales tumorales d'origine humaine, récemment acquises par le laboratoire, dont deux expriment c-Met activé de manière constitutive : les cellules CAKI-1, G-401 et ACHN. Les résultats préliminaires obtenus en IB, avec l' α -*Gab1*(H-198) (résultats non-présentés) démontrent que *Gab1* est aussi exprimée en quantité importante dans ces lignées, contrastant avec les résultats obtenus dans nos lignées rénales d'origine canines transformées par le MSV. Cette différence d'expression de *Gab1* entre différentes lignées rénales aux propriétés tumorales est tout à fait étonnante.

L'oncogène *v-mos*, présent dans le virus du sarcome de Moloney, est l'un des premiers oncogènes à avoir été identifié. Sa contrepartie cellulaire, le proto-oncogène *c-mos*, encode une sérine/thréonine kinase (110), impliquée entre autres dans le contrôle du cycle cellulaire méiotique (192). Il semble que *v-mos* induise la transformation cellulaire en régulant la traduction de gènes en aval de sa séquence (157). La répression génique de Gab1 dans les cellules MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV pourrait donc être une conséquence de l'infection virale. Cette hypothèse demeure en suspens puisqu'aucune information disponible à ce jour ne permet une explication plus complète.

4.2 Malgré sa faible expression dans les cellules transformées par le MSV, Gab1 est recrutée à c-Met et Grb2

Malgré le fait que Gab1 soit présente en très faible quantité dans les lignées transformées par le MSV, son recrutement à c-Met a lieu et Grb2 est présent dans ce complexe (**Figure 3.5C**). Bien que l'IP ne permette pas la détermination d'interactions directes, nous croyons que Gab1, dans les lignées transformées par le MSV, interagit avec c-Met selon les deux mécanismes classiques connus : directement, via son MBS et indirectement, via Grb2. Cependant, alors que Gab1 est recrutée à c-Met dans ces lignées, il semble qu'elle ne soit pas phosphorylée sur ses résidus tyrosine. Il se peut toutefois que la faible quantité de Gab1 rende difficile la révélation de ses tyrosines phosphorylées. De plus, nous montrons aussi que Shp2 n'est pas recrutée à Gab1 dans les cellules MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV (**Figure 3.5C**). Encore une fois, pour la même raison, la très faible quantité de Gab1 pourrait rendre impossible la détection de l'interaction entre Shp2 et c-Met dans ces cellules.

Cependant, dans les cellules transformées par le MSV, nos résultats montrent qu'il y a quand même recrutement de Shp2 en aval de c-Met, tel que présenté à la **Figure 3.7A-B**. Ces résultats sont rassurants, considérant que Shp2 est une phosphatase recrutée à la membrane, normalement par Gab1, essentielle pour la transmission d'un signal de morphogénèse. Il semble donc que la présence Gab1 dans les lignées MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV ne soit pas essentielle pour le bon fonctionnement de la voie de signalisation de c-Met.

4.3 Gab2 ne prend pas le relais de Gab1 pour faire le lien entre c-Met et Shp2 dans les lignées MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV

Le rôle qu'on attribue à Gab2 dans les tumeurs humaines prend de plus en plus d'importance. La possibilité que Gab2 prenne le relais pour Gab1 dans les lignées transformées par le MSV nous semblait évidente, considérant le fait que ces deux protéines possèdent les mêmes sites de liaison pour différents substrats de plusieurs voies signalétiques. Il a été récemment démontré qu'en aval du récepteur du EGF, la répression de Gab1, par l'utilisation de siRNA spécifique à sa séquence, peut être compensée par la l'expression exogène de Gab2 (111).

Ainsi, puisque dans les lignées transformées par le MSV, Gab1 est réprimée (**Figure 3.4**) et que Gab2 est plus fortement exprimée (**Figure 3.6A**), cette combinaison nous semblait propice à permettre le recrutement de Shp2 au récepteur c-Met activé, via Gab2. De plus, le fait que la quantité de Gab2 soit plus élevée, dans les cellules MSV-MDCK-INV, suggère qu'un mécanisme d'amplification de Gab2 a été instauré lors de l'acquisition du phénotype invasif de ces cellules. Nous ne nous attendions pas à observer de co-immunoprécipitation entre Gab2 et Shp2 dans les cellules MDCK, puisque Gab1 est présente dans ces cellules et que Gab2 n'a pas de rôle spécifique en aval de c-Met (99). De plus, dans les cellules MDCK, Gab2 est plus faiblement phosphorylée que Gab1 après un traitement au HGF (99), ce qui indique qu'elle est moins apte à recruter d'autres protéines pour transmettre un signal en aval. Si Gab2 avait pris la place de Gab1 pour faire le lien entre c-Met et Shp2 dans les lignées transformées par le MSV, une interaction de la même force que celle observée entre Gab1 et Shp2 dans les cellules MDCK aurait due être observée (comparer **Figure 3.5C** et **3.6C**). Cependant, les résultats obtenus montrent que la sur-expression de Gab2 dans les cellules MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV n'est pas suffisante pour permettre l'interaction avec Shp2. Par contre, le fait que Gab2 soit recrutée à c-Met activé et soit phosphorylée sur les résidus tyrosine (**Figure 3.6C**) suggère que d'autres effecteurs pourraient y être recrutés. Ainsi, la possibilité que Gab2 puisse compenser l'absence de Gab1 pour d'autres voies de signalisation en aval de c-Met n'est pas exclue. Les voies PLC γ -PKC α , δ et ζ ainsi que la voie PI3Kinase-Akt devraient être explorées, particulièrement dans les cellules

MSV-MDCK-INV, puisque ces deux voies de signalisation sont impliquées dans le phénomène de motilité cellulaire (19, 80, 139, 141, 142).

4.4 La présence d'un adaptateur Gab n'est pas requise pour recruter Shp2 au récepteur c-Met

Les résultats obtenus lors de cette étude ont permis d'établir que Gab2 ne remplace pas Gab1 dans les lignées MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV, pour le recrutement de Shp2 à c-Met. Les études utilisant des mutants à action dominante négative de Shp2 incapables de lier Gab1 démontrent que la transformation, la morphogénèse et la motilité cellulaire sont altérées dans ces modèles cellulaires (106, 147). Ces faits suggèrent la nécessité de l'établissement d'une voie signalétique non-conventionnelle, dans les cellules transformées par le MSV, pour combler l'absence de Gab1 et permettre à Shp2 d'être présente dans le compartiment membranaire lorsque c-Met est activé.

Les trois protocoles de co-IP effectués avec c-Met, Shp2 et Grb2 ont permis de déterminer la réciprocité de certaines interactions. Il est important de noter qu'au contraire de la plupart des études de caractérisation de complexes protéiques publiées relatives aux protéines Gab (99, 105-107, 147), les études de co-IP présentées dans cette étude ont été effectuées avec les protéines endogènes, rendant parfois plus difficile l'obtention d'un signal intense. Ainsi, les conditions d'immunoprécipitation auraient peut-être dû être optimisées pour chaque protéine immunoprécipitée, pour augmenter les chances d'obtenir un fort signal. Toutefois, le fait que les interactions soient détectables dans la lignée parentale suggèrent que nos conditions expérimentales étaient adéquates.

Le résultat le plus frappant de ces études de co-IP est sans contredit la présence de Shp2 dans le complexe associé à c-Met, dans les lignées transformées par le MSV (**Figure 3.7A**). Nous avons voulu comprendre, sans que Gab1 ou Gab2 soient des intermédiaires, comment Shp2 pouvait être recrutée au récepteur activé. Les interactions déjà reconnues dans la littérature pour être directes, telles : c-Met-Gab1, Gab1-Shp2, c-Met-Grb2, sont beaucoup plus faciles à détecter en IB que les interactions indirectes, telles c-Met-Shp2 (comparer les **Figures 3.5C** et **3.7A**). Le signal plus faible ainsi obtenu

peut être indicatif d'un recrutement indirect de Shp2 à c-Met via un intermédiaire. Réciproquement, l'interaction entre Shp2 et Grb2 est très forte (**Figure 3.7**), ce qui suggère que le recrutement de Shp2 à c-Met pourrait être directement effectué par Grb2, dans les lignées transformées par le MSV. Shp2 possède en effet plusieurs motifs PXXP, compatibles avec les domaines SH3 de Grb2. Toutefois, nous devons aussi envisager la possibilité qu'un intermédiaire puisse être présent entre Grb2 et Shp2, puisque la technique d'IP ne permet pas d'affirmer, même si de fortes quantités de protéine sont co-immunoprécipitées, que les interactions observées sont directes, mais ont plus souvent lieu à l'intérieur d'un même complexe.

Il a déjà été démontré qu'en aval du récepteur oncogénique Trp-Met actif de manière constitutive, Grb2 et Shc sont suffisants pour induire un signal de transformation et de métastase. Grb2 peut interagir directement avec c-Met, ou indirectement, via Shc (145). Ainsi, nos résultats concordent avec ce fait, puisque le récepteur c-Met est aussi activé de manière constitutive dans les cellules MSV-MDCK-INV, et que Grb2 y est recrutée. Il est possible que Shc ait un rôle important en aval de c-Met, dans l'établissement du phénotype invasif des cellules MSV-MDCK-INV. Le rôle prépondérant de Grb2 dans la transformation cellulaire et l'acquisition d'un phénotype invasif a été démontré de nombreuses fois (44, 46, 54). Il a déjà été démontré qu'une mutation dupliquant le site de liaison de Grb2 à c-Met sur-activait la voie Ras rendant ces cellules hautement tumorigènes (54). Ainsi, puisque Gab1 semble absente dans les cellules MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV, ceci pourrait avoir pour effet de dupliquer la quantité de Grb2 pouvant lier c-Met, rendant ainsi la voie plus active. Il serait intéressant de déterminer l'implication de Grb2 dans l'acquisition du phénotype motile des cellules MSV-MDCK-INV en éteignant son gène avec un siRNA et déterminer si les cellules MSV-MDCK-INV changent de phénotype. Il serait évidemment pertinent de déterminer si le lien entre Grb2 et Shp2 s'effectue via un intermédiaire. Shc serait une possibilité intéressante. Le complexe c-Met/Grb2/Shc serait en mesure de recruter Shp2 à la membrane.

Les résultats obtenus lors de cette étude nous ont permis d'établir un modèle de la voie de signalisation de c-Met dans les cellules transformées par le MSV, illustré à la **Figure 4.1**. Les résultats démontrent qu'il y a 1) le recrutement de Gab2 à c-Met,

probablement via Grb2, et sa phosphorylation sur les résidus tyrosines, ainsi que 2) le recrutement de Shp2 au complexe de signalisation de c-Met activé, probablement via Grb2.

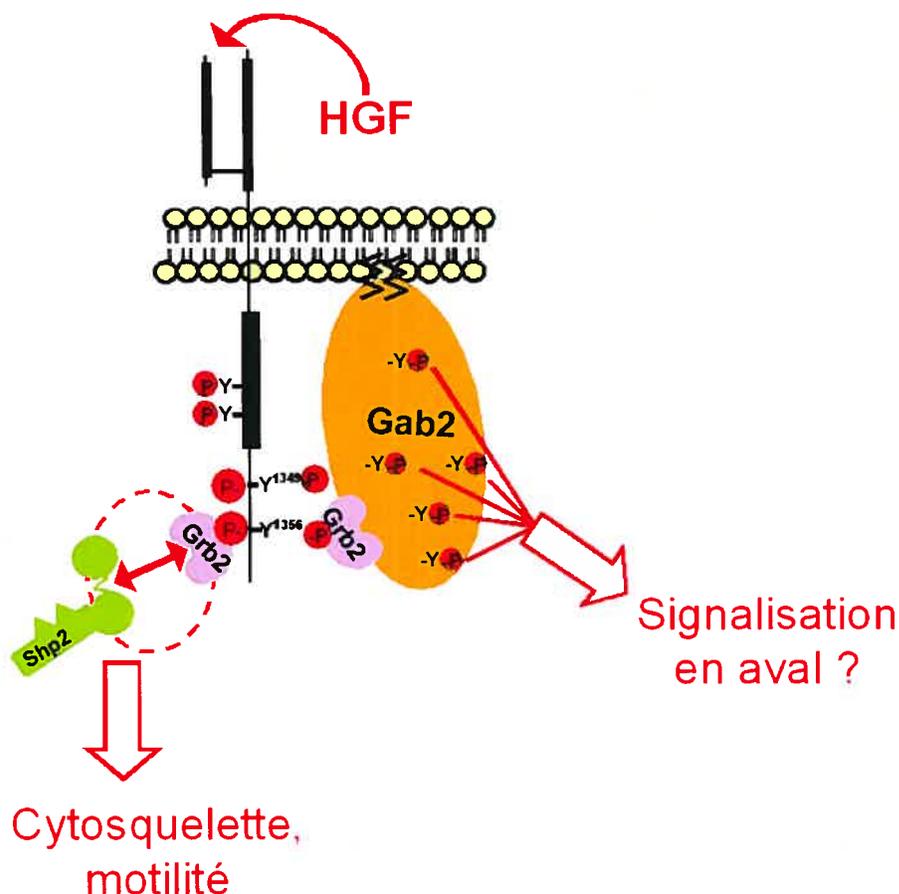


Figure 4. 1 : Modèle hypothétique de l'assemblage du complexe signalétique en aval de c-Met activé, dans les lignées cellulaires MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV.

4.5 Shp2 recrutée à c-Met est impliquée dans la motilité accrue des cellules MSV-MDCK-INV

Dans la dernière partie de cette étude, nous nous sommes particulièrement intéressés aux résultats obtenus relatifs au recrutement de Shp2 à c-Met dans les lignées transformées par le MSV, en dépit de l'absence de Gab1.

Dans les cellules MDCK, suite à l'activation de c-Met, Shp2 sera recrutée à proximité de la membrane plasmique, afin de réguler indirectement l'activité de protéines membranaires. Les plus connues sont Ras (activation de la voie des MAPK) et Rho

(régulation du cytosquelette), deux effecteurs importants impliqués dans l'invasion cellulaire (19, 34, 73, 82, 106, 125). Ainsi, comme Shp2 est une protéine importante dans la régulation de phénomènes moléculaires impliqués dans l'invasion, nous avons tenté de déterminer son rôle dans la motilité accrue des cellules MSV-MDCK-INV, ainsi que dans la réorganisation du cytosquelette d'actine des cellules MSV-MDCK.

4.5.1 Shp2 est impliquée dans la régulation des fibres de stress des cellules MDCK et MSV-MDCK mais non des cellules MSV-MDCK-INV

L'implication de Shp2, dans le remodelage du cytosquelette en général, a été étudié. Plus particulièrement, nous voulions comprendre le rôle qu'occupe Shp2 dans le phénomène de motilité accrue et la capacité invasive des cellules MSV-MDCK-INV.

Les cellules MSV-MDCK-INV sont un modèle de cellules hautement motiles, très faciles et intéressantes à utiliser pour déterminer l'importance d'un effecteur d'une voie de signalisation sur la motilité. En effet, une corrélation directe peut être établie entre le phénotype des cellules, pouvant être observé en temps réel, et la modulation de l'activité d'une protéine (par exemple c-Met et p38, voir (78, 79, 174)) y jouant un rôle majeur. À l'aide de la calpeptine, nous avons étudié l'importance de Shp2.

La calpeptine active Rho dans les fibroblastes (150, 151). De plus, il a été démontré que la calpeptine peut avoir des effets opposés sur la formation des fibres de stress, dans des cellules épithéliales de différentes origines (55). Alors qu'un mutant catalytiquement inactif de Shp2 (Shp2-C/S), favorise une augmentation drastique de la formation de fibres de stress dans les cellules MDCK (82), la calpeptine présente un effet totalement opposé (55). Cependant, dans l'étude avec le mutant Shp2-C/S, les auteurs n'ont pas réussi à démontrer qu'il y avait régulation de la GTPase Rho, alors que c'est le cas dans les cellules MDCK traitées à la calpeptine (55). Dans ces cellules, la calpeptine régule Rho en la laissant sous sa forme inactive (liée au GDP), ce qui mène au désassemblage des fibres de stress.

En concordance avec les résultats obtenus dans les lignées MDCK, nos résultats démontrent que dans les lignées MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV, Shp2 est aussi impliquée dans le remodelage du cytosquelette (**Figures 3.8A, 3.9C et 4.1**). Fait

intéressant, l'inhibition de Shp2 par la calpeptine dans les cellules transformées par le MSV donne le même phénotype que l'activation de Rho (78, 79). Ainsi, lorsque Shp2 est inactive, l'inhibition sur Rho est levée ce qui induit un remodelage du cytosquelette menant à la contraction cellulaire, la perte des pseudopodes et l'apparition de bourgeons dans les cellules MSV-MDCK-INV. Il semble que Shp2 soit responsable de l'assemblage des fibres de stress, dans les cellules MDCK et MSV-MDCK, des cellules de type épithélial. Cependant, dans les cellules MSV-MDCK-INV, au phénotype fibroblastoïde, Shp2 semble impliquée dans la formation des protrusions pseudopodiales (Figures 3.8C et 4.2A).

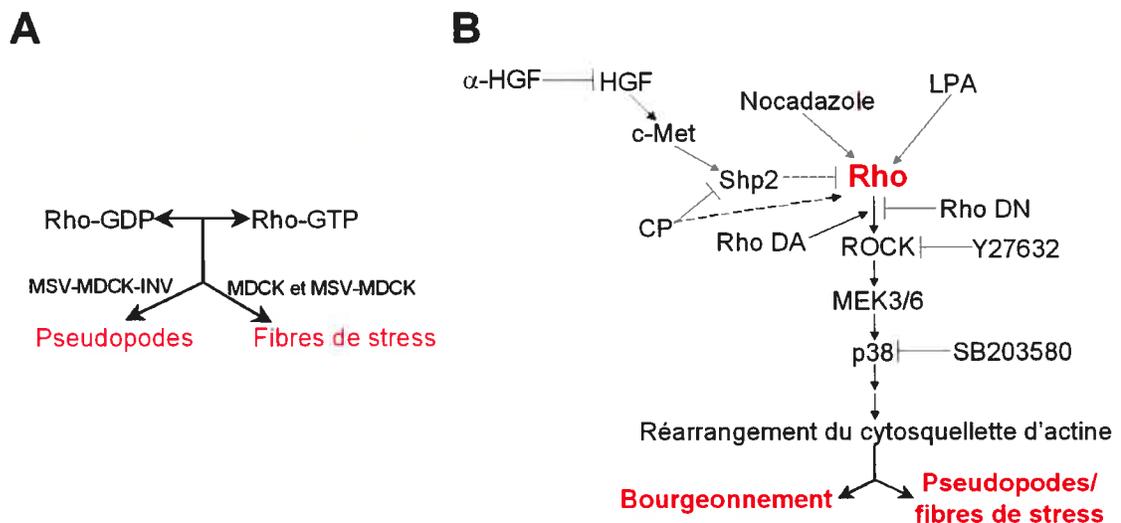


Figure 4.2 : Intégration des informations disponibles quant au rôle hypothétique de Shp2 dans la régulation du cytosquelette.

A) Représentation des signaux dirigés par Rho dans des cellules de type fibroblastoïde (MSV-MDCK-INV) ou dans les cellules de type épithélial (MDCK et MSV-MDCK) Inspiré de (78, 86) **B)** Modulation de la voie Rho-p38 pour le contrôle de la motilité des cellules MSV-MDCK-INV. Les lignes pointillées signifient un lien indirect. CP = calpeptine. DN = mutant à action dominante négative. DA = mutant à action dominante active. LPA = acide lysophosphatidique. Le SB203580 et le Y27632 sont des inhibiteurs pharmacologiques. Inspiré de (79).

Il demeure encore indéterminé si la calpeptine a des effets sur d'autres phosphatases que Shp2, dans les cellules épithéliales, puisqu'au départ son effet avait été répertorié dans des fibroblastes. Comme il en sera question à la section 4.5.3, les résultats obtenus en IB confirment qu'il y a bien modulation du niveau de la phosphorylation de la Tyr542, laquelle semble proportionnelle à l'activité de Shp2 (Figure 3.11). De plus, la calpeptine n'affecte pas le niveau de phosphorylation de c-Met, situé en amont dans la

cascade signalétique. Il a été démontré précédemment que l'effet de la calpeptine sur la voie de signalisation de Rho était indépendant de son effet sur la calpaïne (55, 150). Ces résultats ont pu être confirmés de nouveau avec nos observations (**Figures 3.9B et 3.11D**).

Une synthèse des acteurs impliqués dans le remodelage du cytosquelette en aval de c-Met, dans les cellules MSV-MDCK-INV est illustré à la **Figure 4.2**. Ce modèle tient compte des résultats de la présente étude, ainsi que des résultats obtenus précédemment en collaboration avec l'équipe du Dr Nabi (78, 79, 174). Ces résultats illustrent encore une fois l'équilibre établi entre l'activation de Rho et la régulation d'effecteurs en aval, impliqué dans le remodelage du cytosquelette menant à la formation/rétraction des pseudopodes ou au bourgeonnement.

L'activation de Rho dans les cellules neuronales induit la rétraction des neurites et l'arrondissement de la cellule (84). Il en va autrement chez les fibroblastes, où Rho est responsable de la formation des fibres de stress. Globalement, le résultat final est que la formation de filament d'actine-myosine contractiles est dépendante de l'activation de Rho. Il est important de noter que les effets de Rho sont dépendants du type cellulaire, du type de stimulus, du type de substrat. C'est la balance entre la forme active (liée au GTP) et inactive (liée au GDP) de Rho qui régule la formation de structures dynamiques du cytosquelette, tels l'assemblage/désassemblage des fibres de stress, la formation/rétraction de protrusions pseudopodiales ou l'apparition de bourgeonnement dans la membrane plasmique (**Figure 4.2**). L'établissement d'un modèle général est donc très complexe à établir.

4.5.2 Shp2 est impliquée dans la régulation des protrusions pseudopodiales des cellules MSV-MDCK-INV

L'inhibition de la boucle autocrine de HGF avec l' α -HGF, dans les cellules MSV-MDCK-INV induit une rétraction des pseudopodes et une apparition importante de fibres de stress, tout comme à la suite de l'inhibition de toute activité tyrosine kinase par l'herbimycine (174) et la geldanamycine (78). De plus, la formation des pseudopodes dans les cellules MSV-MDCK-INV est régulée par RhoA, et l'inhibition de la kinase de

Rho (ROCK) régule la translocation de l'ARNm de RhoA dans les pseudopodes, transformant ces structures en lamellipodes (78). Nous avons observé l'apparition de bourgeonnements dans une fraction non-négligeable de cellules MSV-MDCK-INV, après un traitement à la calpeptine. Ce phénotype est le même que celui observé en conséquence de l'inhibition de la voie Rho/ROCK/p38 par les inhibiteurs Y27632 et SB203580 (79). Sachant que Shp2 est en amont de Rho dans les cellules MDCK, nos résultats suggèrent que Shp2 est impliquée dans ce complexe de régulation des protrusions pseudopodiales des cellules MSV-MDCK-INV (**Figure 4.2**).

Ainsi, une corrélation directe peut être établie entre la rétraction des pseudopodes lors du traitement à la calpeptine des cellules MSV-MDCK-INV, et la perte de leur capacité motile (**Figures 3.9A et 3.10**). Il est fort probable que la calpeptine inhibe aussi le phénomène d'invasion. Une étude de la capacité des MSV-MDCK-INV à traverser un filtre recouvert de collagène (chambre de Boyden) suite au traitement de la calpeptine, répondrait à cette question.

4.5.3 La variation du niveau de phosphorylation de la tyrosine 542 de Shp2 est un indicateur de son activation

Les résultats obtenus démontrent qu'il y a un lien direct entre l'altération du domaine PTP de Shp2 par sa liaison à la calpeptine, et le degré de phosphorylation de Shp2 sur la Tyr542 (**Figure 3.11**). Ce mécanisme semble être partagé par les cellules ayant un phénotype épithélial (MDCK et MSV-MDCK), autant que les cellules dérivées ayant un phénotype fibroblastoïde (MSV-MDCK-INV). De plus, le fait que la phosphorylation de cette tyrosine soit légèrement diminuée suite à la stimulation de c-Met (**Figure 3.11B**) suggère une régulation de l'activité de Shp2 par sa phosphorylation sur son domaine C-terminal. Il est important de noter que la quantité de calpeptine utilisé dans nos expériences inhibe l'activité PTP de Shp2 de 60%. Il serait essentiel d'effectuer une étude du degré de phosphorylation de la Tyr542 de Shp2 en fonction de la quantité de calpeptine ajoutée aux cellules.

Dans les expériences présentées, les cellules ont été traitées préalablement avec la calpeptine, et Shp2 était probablement alors dans sa conformation fermée. Ainsi, dans le

modèle proposé à la **Figure 3.11F**, nous ignorons si la protéine Shp2, dans les cellules traitées d'abord à la calpeptine puis au rHGF, réussit à changer de conformation ou non, afin de s'ouvrir et libérer son activité PTP. Cependant, dans les cellules MSV-MDCK-INV, la présence de la boucle autocrine de HGF doit induire l'activation constante de Shp2, et par conséquent favoriser la conformation « ouverte », c'est-à-dire l'activation de l'activité PTP. Or, le degré de phosphorylation de la Tyr542 est plus faible dans les MSV, suite au traitement avec le rHGF. Ces résultats concordent avec ceux obtenus suite au traitement avec l' α -HGF des cellules MSV-MDCK-INV (**Figure 3.11C**), démontrant que le HGF régule le degré de phosphorylation de la Tyr542 de Shp2.

Le traitement à la calpeptine induit une légère augmentation de la phosphorylation de la Tyr542 de Shp2 dans les cellules MSV-MDCK, leur niveau basal de phosphorylation est souvent plus élevé que dans les autres modèles cellulaires. Curieusement, nous avons pu observer que ce niveau de phosphorylation basal augmente lorsque les cellules sont ensemencées à plus haute densité. Ce plus haut degré de phosphorylation s'explique probablement par l'absence de sécrétion de HGF par les cellules MSV-MDCK. En effet, il est démontré à la **Figure 3.11C** que l'inhibition de l'activation de c-Met dans les cellules MSV-MDCK-INV, par l' α -HGF, induit une augmentation du degré de phosphorylation de la Tyr542 de Shp2. De plus, les cellules MSV-MDCK possèdent beaucoup de fibres de stress, parfois plus que les cellules MDCK. Il est donc possible que Shp2 soit plus inhibée et Rho plus activée dans ces cellules. Il serait intéressant de mesurer l'état d'activation de Rho entre nos modèles cellulaires, suite au traitement à la calpeptine, en comparant la proportion de Rho liée au GDP (inactive) par rapport à Rho liée au GTP (active) et de mesurer en parallèle l'activité phosphatase d'un immunoprécipitat de Shp2.

Bien qu'à ce jour aucun modèle universel ne soit disponible pour comprendre l'implication des résidus tyrosine dans la queue C-terminale de Shp2, il est toutefois clair que l'inhibition de Shp2 favorise une augmentation de la phosphorylation de la Tyr542, et que cette phosphorylation, en plus d'être modulable par l'activation de la voie de signalisation de c-Met, est réversible (**Figures 3.11 B et 3.11C**).

Les résultats obtenus en IB permettent de faire un lien entre le degré de phosphorylation de Shp2 sur la Tyr542, et son niveau d'activation. Ceci pourra servir

d'outil éventuel pour d'autres expérimentations sur l'implication de Shp2 dans différentes voies de signalisation en aval de c-Met. Il est intéressant aussi de constater que ces observations sur l'augmentation du degré de phosphorylation de la Tyr542 lors de l'inhibition de Shp2 sont contradictoires avec le modèle « adaptateur ». Ce modèle suggère que l'activation de Shp2 par certains facteurs de croissance induit la phosphorylation des tyrosines 542 et 580, ce qui favorise le recrutement de Grb2 via son domaine SH2. Une étude du rôle de la phosphorylation de ces résidus tyrosine démontre qu'alors que le niveau de phosphorylation sur la Tyr542 de Shp2 augmente suite à la stimulation par le IGF, le FGF ou le PDGF, l'ajout de EGF n'induit pas l'augmentation du degré de phosphorylation de la Tyr542 (4). Ces résultats sont en concordance avec ceux que nous observons. Il semble que la modulation du degré de phosphorylation des résidus tyrosine de Shp2 soit différente selon la voie de signalisation en amont, et même du type cellulaire. Comme la calpeptine n'est pas au départ un inhibiteur dirigé uniquement contre Shp2, il serait capital de confirmer nos observations en répétant ces expériences avec le composé NSC-87877, un inhibiteur spécifique à Shp2, récemment disponible sur le marché. Il serait aussi intéressant d'effectuer ces traitements sur un autre modèle tumoral rénal humain, tel les cellules ACHN, isolées d'un adénocarcinome.

5. Conclusion et perspectives

Dans cette étude, nous avons démontré que la transformation des cellules épithéliales MDCK par le virus du sarcome de Moloney induit une répression de Gab1 au niveau transcriptionnel. Cette répression semble plus élevée dans les cellules MSV-MDCK-INV que dans la lignée parentale transformée, les cellules MSV-MDCK. Le mécanisme de cette répression demeure cependant inconnu. Malgré l'absence de Gab1, il semble que la signalisation de c-Met ne soit pas altérée, comme en témoigne le phénotype invasif des cellules MSV-MDCK-INV.

Bien que Gab2 ne recrute pas Shp2 à c-Met activé, il semble qu'elle soit en mesure de recruter d'autres effecteurs. De plus, nous avons démontré que Shp2 est recrutée au récepteur c-Met activé via une voie de signalisation parallèle, qui fait intervenir Grb2. Ce recrutement de Shp2 à proximité de la membrane plasmique est impliqué dans la modulation du cytosquelette d'actine des cellules MDCK et MSV-MDCK. Shp2 semble ainsi être responsable de la régulation de la formation des protrusions pseudopodiales, directement responsables de la motilité accrue des cellules MSV-MDCK-INV.

En perspective, il serait intéressant de comprendre quels sont les mécanismes responsables de la répression de Gab1. Il faudrait faire un immunobuvardage de type Southern permettant de déterminer le niveau d'expression du gène de Gab1 est bien présent en quantité égale dans les trois lignées. En effet, les techniques utilisées jusqu'à maintenant nous ont permis d'évaluer uniquement le niveau d'ARNm, et nous ignorons toujours ce qui se passe pendant la transcription. Ces informations indiqueront, si des quantités équivalentes du gène de Gab1 sont détectées, que la stabilité des ARNm de Gab1 est affecté, ou qu'il y a un mécanisme de régulation de la transcription, conduisant à une baisse du niveau d'ARNm dans ces cellules transformées. Si par contre, des niveaux beaucoup plus faibles dans les lignées transformées par le MSV, nous pourrions conclure à une répression transcriptionnelle de Gab1, induite par l'infection.

Afin de déterminer si Shp2 est impliqué dans les propriétés invasives des cellules MSV-MDCK-INV, des essais d'invasion avec la technique de la chambre de Boyden pourront être expérimentés. De plus, il serait intéressant de regarder le niveau de phosphorylation de la Tyr580 de Shp2, suite à son inhibition par la calpeptine, en aval de c-Met, mais aussi de d'autres récepteurs. Aussi, il a été proposé que la phosphorylation

sur les résidus sérine (Ser576 et Ser591) de Shp2 pouvait la réguler négativement (138). Il serait pertinent d'étudier cette possibilité dans le système de signalisation de c-Met, et de voir si la phosphorylation des résidus sérine de Shp2 concorde avec la perte du phénotype invasif des cellules MSV-MDCK-INV. Il serait intéressant de confirmer que Shp2 est impliquée dans l'activation de Rho dans les cellules MSV-MDCK-INV. En étudiant le niveau d'activation de protéines en aval de Rho, suite à l'inhibition de Shp2 par la calpeptine, nous serions en mesure d'établir un modèle plus solide des voies signalitiques impliquées dans la formation des protrusions pseudopodiales.

Finalement, bien que Gab1 ait été identifiée comme une protéine essentielle à la signalisation de c-Met, cette étude aura permis de déterminer qu'il existe des mécanismes par lesquels un modèle cellulaire aux propriétés tumorales et invasives, dépendant du HGF, peut pallier à l'absence de Gab1.

6. Références

1. 1996. Cancer facts & figures. *In* A. C. Society (ed.), Atlanta.
2. **Abella, J. V., P. Peschard, M. A. Naujokas, T. Lin, C. Saucier, S. Urbe, and M. Park.** 2005. Met/Hepatocyte growth factor receptor ubiquitination suppresses transformation and is required for Hrs phosphorylation. *Mol Cell Biol* **25**:9632-45.
3. **Agazie, Y. M., and M. J. Hayman.** 2003. Development of an efficient "substrate-trapping" mutant of Src homology phosphotyrosine phosphatase 2 and identification of the epidermal growth factor receptor, Gab1, and three other proteins as target substrates. *J Biol Chem* **278**:13952-8.
4. **Araki, T., H. Nawa, and B. G. Neel.** 2003. Tyrosyl phosphorylation of Shp2 is required for normal ERK activation in response to some, but not all, growth factors. *J Biol Chem* **278**:41677-84.
5. **Arnaud, M., C. Crouin, C. Deon, D. Loyaux, and J. Bertoglio.** 2004. Phosphorylation of Grb2-associated binder 2 on serine 623 by ERK MAPK regulates its association with the phosphatase SHP-2 and decreases STAT5 activation. *J Immunol* **173**:3962-71.
6. **Bailly, M., and J. Condeelis.** 2002. Cell motility: insights from the backstage. *Nat Cell Biol* **4**:E292-4.
7. **Balkovetz, D. F.** 1998. Hepatocyte growth factor and Madin-Darby canine kidney cells: in vitro models of epithelial cell movement and morphogenesis. *Microsc Res Tech* **43**:456-63.
8. **Balkovetz, D. F., A. L. Pollack, and K. E. Mostov.** 1997. Hepatocyte growth factor alters the polarity of Madin-Darby canine kidney cell monolayers. *J Biol Chem* **272**:3471-7.
9. **Balkovetz, D. F., and V. Sambandam.** 1999. Dynamics of E-cadherin and gamma-catenin complexes during dedifferentiation of polarized MDCK cells. *Kidney Int* **56**:910-21.
10. **Bardelli, A., P. Longati, D. Gramaglia, M. C. Stella, and P. M. Comoglio.** 1997. Gab1 coupling to the HGF/Met receptor multifunctional docking site requires binding of Grb2 and correlates with the transforming potential. *Oncogene* **15**:3103-11.
11. **Barford, D., and B. G. Neel.** 1998. Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Structure* **6**:249-54.
12. **Battle, E., E. Sancho, C. Franci, D. Dominguez, M. Monfar, J. Baulida, and A. Garcia De Herreros.** 2000. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* **2**:84-9.
13. **Behrens, J., M. M. Mareel, F. M. Van Roy, and W. Birchmeier.** 1989. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* **108**:2435-47.
14. **Bellusci, S., G. Moens, G. Gaudino, P. Comoglio, T. Nakamura, J. P. Thiery, and J. Jouanneau.** 1994. Creation of an hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine loop in carcinoma cells induces invasive properties associated with increased tumorigenicity. *Oncogene* **9**:1091-9.

15. **Bennett, A. M., T. L. Tang, S. Sugimoto, C. T. Walsh, and B. G. Neel.** 1994. Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor receptor beta to Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:7335-9.
16. **Bentires-Alj, M., S. G. Gil, R. Chan, Z. C. Wang, Y. Wang, N. Imanaka, L. N. Harris, A. Richardson, B. G. Neel, and H. Gu.** 2006. A role for the scaffolding adapter GAB2 in breast cancer. *Nat Med* **12**:114-21.
17. **Bentires-Alj, M., J. G. Paez, F. S. David, H. Keilhack, B. Halmos, K. Naoki, J. M. Maris, A. Richardson, A. Bardelli, D. J. Sugarbaker, W. G. Richards, J. Du, L. Girard, J. D. Minna, M. L. Loh, D. E. Fisher, V. E. Velculescu, B. Vogelstein, M. Meyerson, W. R. Sellers, and B. G. Neel.** 2004. Activating mutations of the noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 gene in human solid tumors and adult acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* **64**:8816-20.
18. **Berx, G., A. M. Cleton-Jansen, F. Nollet, W. J. de Leeuw, M. van de Vijver, C. Cornelisse, and F. van Roy.** 1995. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *Embo J* **14**:6107-15.
19. **Birchmeier, C., W. Birchmeier, E. Gherardi, and G. F. Vande Woude.** 2003. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:915-25.
20. **Birchmeier, W., and J. Behrens.** 1994. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* **1198**:11-26.
21. **Bladt, F., D. Riethmacher, S. Isenmann, A. Aguzzi, and C. Birchmeier.** 1995. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* **376**:768-71.
22. **Boccaccio, C., M. Ando, L. Tamagnone, A. Bardelli, P. Michieli, C. Battistini, and P. M. Comoglio.** 1998. Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* **391**:285-8.
23. **Bottaro, D. P., J. S. Rubin, D. L. Faletto, A. M. Chan, T. E. Kmiecik, G. F. Vande Woude, and S. A. Aaronson.** 1991. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* **251**:802-4.
24. **Brummer, T., D. Schramek, V. M. Hayes, H. L. Bennett, C. E. Caldon, E. A. Musgrove, and R. J. Daly.** 2006. Increased proliferation and altered growth factor dependence of human mammary epithelial cells overexpressing the Gab2 docking protein. *J Biol Chem* **281**:626-37.
25. **Chambers, A. F., A. C. Groom, and I. C. MacDonald.** 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* **2**:563-72.
26. **Chan, A. M., J. S. Rubin, D. P. Bottaro, D. W. Hirschfield, M. Chedid, and S. A. Aaronson.** 1991. Identification of a competitive HGF antagonist encoded by an alternative transcript. *Science* **254**:1382-5.
27. **Chan, P. C., Y. L. Chen, C. H. Cheng, K. C. Yu, L. A. Cary, K. H. Shu, W. L. Ho, and H. C. Chen.** 2003. Src phosphorylates Grb2-associated binder 1 upon hepatocyte growth factor stimulation. *J Biol Chem* **278**:44075-82.
28. **Chen, L., S. S. Sung, M. L. Yip, H. R. Lawrence, Y. Ren, W. C. Guida, S. M. Sebt, N. J. Lawrence, and J. Wu.** 2006. Discovery of a novel shp2 protein tyrosine phosphatase inhibitor. *Mol Pharmacol* **70**:562-70.
29. **Cioce, V., K. G. Csaky, A. M. Chan, D. P. Bottaro, W. G. Taylor, R. Jensen, S. A. Aaronson, and J. S. Rubin.** 1996. Hepatocyte growth factor (HGF)/NK1 is

- a naturally occurring HGF/scatter factor variant with partial agonist/antagonist activity. *J Biol Chem* **271**:13110-5.
30. **Cooper, C. S., M. Park, D. G. Blair, M. A. Tainsky, K. Huebner, C. M. Croce, and G. F. Vande Woude.** 1984. Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* **311**:29-33.
 31. **Crepaldi, T., A. L. Pollack, M. Prat, A. Zborek, K. Mostov, and P. M. Comoglio.** 1994. Targeting of the SF/HGF receptor to the basolateral domain of polarized epithelial cells. *J Cell Biol* **125**:313-20.
 32. **Crouin, C., M. Arnaud, F. Gesbert, J. Camonis, and J. Bertoglio.** 2001. A yeast two-hybrid study of human p97/Gab2 interactions with its SH2 domain-containing binding partners. *FEBS Lett* **495**:148-53.
 33. **Cunnick, J. M., L. Mei, C. A. Doupnik, and J. Wu.** 2001. Phosphotyrosines 627 and 659 of Gab1 constitute a bisphosphoryl tyrosine-based activation motif (BTAM) conferring binding and activation of SHP2. *J Biol Chem* **276**:24380-7.
 34. **Cunnick, J. M., S. Meng, Y. Ren, C. Desponts, H. G. Wang, J. Y. Djeu, and J. Wu.** 2002. Regulation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway by SHP2. *J Biol Chem* **277**:9498-504.
 35. **Daly, R. J., H. Gu, J. Parmar, S. Malaney, R. J. Lyons, R. Kairouz, D. R. Head, S. M. Henshall, B. G. Neel, and R. L. Sutherland.** 2002. The docking protein Gab2 is overexpressed and estrogen regulated in human breast cancer. *Oncogene* **21**:5175-81.
 36. **DesMarais, V., M. Ghosh, R. Eddy, and J. Condeelis.** 2005. Cofilin takes the lead. *J Cell Sci* **118**:19-26.
 37. **Ebbesen, P., L. Olsson, O. Rudkobing, S. Haahr, and G. Kristensen.** 1977. Correlation of in vivo cancer, net outer charge, in vitro migration, interferon activity, in vitro growth rates, and chalone-like activity to transformation-reversion in cloned Moloney and Kristen sarcoma virus-transformed mouse 3T3 cells. *Cancer Res* **37**:4285-90.
 38. **Elson, P. J., R. S. Witte, and D. L. Trump.** 1988. Prognostic factors for survival in patients with recurrent or metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Res* **48**:7310-3.
 39. **Fan, S., Y. X. Ma, M. Gao, R. Q. Yuan, Q. Meng, I. D. Goldberg, and E. M. Rosen.** 2001. The multisubstrate adapter Gab1 regulates hepatocyte growth factor (scatter factor)-c-Met signaling for cell survival and DNA repair. *Mol Cell Biol* **21**:4968-84.
 40. **Fefer, A., J. L. McCoy, and J. P. Glynn.** 1967. Studies on the growth and regression of a transplantable Moloney sarcoma. *Cancer Res* **27**:2207-11.
 41. **Feng, G. S., and T. Pawson.** 1994. Phosphotyrosine phosphatases with SH2 domains: regulators of signal transduction. *Trends Genet* **10**:54-8.
 42. **Ferracini, R., M. F. Di Renzo, K. Scotlandi, N. Baldini, M. Olivero, P. Lollini, O. Cremona, M. Campanacci, and P. M. Comoglio.** 1995. 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.
 43. **Fisher, B., P. Szuch, M. Levine, and E. R. Fisher.** 1971. A portal blood factor as the humoral agent in liver regeneration. *Science* **171**:575-7.

44. **Fixman, E. D., T. M. Fournier, D. M. Kamikura, M. A. Naujokas, and M. Park.** 1996. Pathways downstream of Shc and Grb2 are required for cell transformation by the tpr-Met oncoprotein. *J Biol Chem* **271**:13116-22.
45. **Folkman, J.** 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **285**:1182-6.
46. **Fournier, T. M., D. Kamikura, K. Teng, and M. Park.** 1996. Branching tubulogenesis but not scatter of madin-darby canine kidney cells requires a functional Grb2 binding site in the Met receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* **271**:22211-7.
47. **Freeman, R. M., Jr., J. Plutzky, and B. G. Neel.** 1992. Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homolog of Drosophila corkscrew. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:11239-43.
48. **Furge, K. A., Y. W. Zhang, and G. F. Vande Woude.** 2000. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* **19**:5582-9.
49. **Gandino, L., P. Longati, E. Medico, M. Prat, and P. M. Comoglio.** 1994. Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase. *J Biol Chem* **269**:1815-20.
50. **Garcia-Guzman, M., F. Dolfi, K. Zeh, and K. Vuori.** 1999. Met-induced JNK activation is mediated by the adapter protein Crk and correlates with the Gab1 - Crk signaling complex formation. *Oncogene* **18**:7775-86.
51. **Gaush, C. R., W. L. Hard, and T. F. Smith.** 1966. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc Soc Exp Biol Med* **122**:931-5.
52. **Geho, D. H., R. W. Bandle, T. Clair, and L. A. Liotta.** 2005. Physiological Mechanisms of Tumor-Cell Invasion and Migration. *Physiology* **20**:194-200.
53. **Giancotti, F. G., and E. Ruoslahti.** 1999. Integrin signaling. *Science* **285**:1028-32.
54. **Giordano, S., A. Bardelli, Z. Zhen, S. Menard, C. Ponzetto, and P. M. Comoglio.** 1997. A point mutation in the MET oncogene abrogates metastasis without affecting transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:13868-72.
55. **Gopalakrishnan, S., M. A. Hallett, S. J. Atkinson, and J. A. Marrs.** 2003. Differential regulation of junctional complex assembly in renal epithelial cell lines. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**:C102-11.
56. **Graziani, A., D. Gramaglia, L. C. Cantley, and P. M. Comoglio.** 1991. The tyrosine-phosphorylated hepatocyte growth factor/scatter factor receptor associates with phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **266**:22087-90.
57. **Graziani, A., D. Gramaglia, P. dalla Zonca, and P. M. Comoglio.** 1993. Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates the Ras-guanine nucleotide exchanger. *J Biol Chem* **268**:9165-8.
58. **Gu, H., H. Maeda, J. J. Moon, J. D. Lord, M. Yoakim, B. H. Nelson, and B. G. Neel.** 2000. New role for Shc in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Mol Cell Biol* **20**:7109-20.
59. **Gu, H., and B. G. Neel.** 2003. The "Gab" in signal transduction. *Trends Cell Biol* **13**:122-30.

60. **Gu, H., J. C. Pratt, S. J. Burakoff, and B. G. Neel.** 1998. Cloning of p97/Gab2, the major SHP2-binding protein in hematopoietic cells, reveals a novel pathway for cytokine-induced gene activation. *Mol Cell* **2**:729-40.
61. **Gu, H., K. Saito, L. D. Klamann, J. Shen, T. Fleming, Y. Wang, J. C. Pratt, G. Lin, B. Lim, J. P. Kinet, and B. G. Neel.** 2001. Essential role for Gab2 in the allergic response. *Nature* **412**:186-90.
62. **Gual, P., S. Giordano, S. Anguissola, P. J. Parker, and P. M. Comoglio.** 2001. Gab1 phosphorylation: a novel mechanism for negative regulation of HGF receptor signaling. *Oncogene* **20**:156-66.
63. **Gual, P., S. Giordano, T. A. Williams, S. Rocchi, E. Van Obberghen, and P. M. Comoglio.** 2000. Sustained recruitment of phospholipase C-gamma to Gab1 is required for HGF-induced branching tubulogenesis. *Oncogene* **19**:1509-18.
64. **Hanahan, D., and R. A. Weinberg.** 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**:57-70.
65. **Harris, D. T.** 1983. Hormonal therapy and chemotherapy of renal-cell carcinoma. *Semin Oncol* **10**:422-30.
66. **Hashigasako, A., M. Machide, T. Nakamura, and K. Matsumoto.** 2004. Bi-directional regulation of Ser-985 phosphorylation of c-met via protein kinase C and protein phosphatase 2A involves c-Met activation and cellular responsiveness to hepatocyte growth factor. *J Biol Chem* **279**:26445-52.
67. **Heldin, C. H.** 1995. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* **80**:213-23.
68. **Hof, P., S. Pluskey, S. Dhe-Paganon, M. J. Eck, and S. E. Shoelson.** 1998. Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell* **92**:441-50.
69. **Holgado-Madruga, M., D. R. Emlet, D. K. Moscatello, A. K. Godwin, and A. J. Wong.** 1996. A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature* **379**:560-4.
70. **Holgado-Madruga, M., and A. J. Wong.** 2004. Role of the Grb2-associated binder 1/SHP-2 interaction in cell growth and transformation. *Cancer Res* **64**:2007-15.
71. **Huber, M. A., N. Kraut, and H. Beug.** 2005. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* **17**:548-58.
72. **Imamura, H., K. Takaishi, K. Nakano, A. Kodama, H. Oishi, H. Shiozaki, M. Monden, T. Sasaki, and Y. Takai.** 1998. Rho and Rab small G proteins coordinately reorganize stress fibers and focal adhesions in MDCK cells. *Mol Biol Cell* **9**:2561-75.
73. **Inagaki, K., T. Noguchi, T. Matozaki, T. Horikawa, K. Fukunaga, M. Tsuda, M. Ichihashi, and M. Kasuga.** 2000. Roles for the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in cytoskeletal organization, cell adhesion and cell migration revealed by overexpression of a dominant negative mutant. *Oncogene* **19**:75-84.
74. **Itoh, M., Y. Yoshida, K. Nishida, M. Narimatsu, M. Hibi, and T. Hirano.** 2000. Role of Gab1 in heart, placenta, and skin development and growth factor- and cytokine-induced extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase activation. *Mol Cell Biol* **20**:3695-704.

75. **Jakubczak, J. L., W. J. LaRochelle, and G. Merlino.** 1998. NK1, a natural splice variant of hepatocyte growth factor/scatter factor, is a partial agonist in vivo. *Mol Cell Biol* **18**:1275-83.
76. **Jeffers, M., M. Fiscella, C. P. Webb, M. Anver, S. Koochekpour, and G. F. Vande Woude.** 1998. The mutationally activated Met receptor mediates motility and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:14417-22.
77. **Jeffers, M., G. A. Taylor, K. M. Weidner, S. Omura, and G. F. Vande Woude.** 1997. Degradation of the Met tyrosine kinase receptor by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol* **17**:799-808.
78. **Jia, Z., L. Barbier, H. Stuart, M. Amraei, S. Pelech, J. W. Dennis, P. Metalnikov, P. O'Donnell, and I. R. Nabi.** 2005. Tumor cell pseudopodial protrusions. Localized signaling domains coordinating cytoskeleton remodeling, cell adhesion, glycolysis, RNA translocation, and protein translation. *J Biol Chem* **280**:30564-73.
79. **Jia, Z., J. Vадnais, M. L. Lu, J. Noel, and I. R. Nabi.** 2006. Rho/ROCK-dependent pseudopodial protrusion and cellular blebbing are regulated by p38 MAPK in tumour cells exhibiting autocrine c-Met activation. *Biol Cell* **98**:337-51.
80. **Kermorgant, S., D. Zicha, and P. J. Parker.** 2004. PKC controls HGF-dependent c-Met traffic, signalling and cell migration. *Embo J* **23**:3721-34.
81. **Klein, M., P. Seeger, B. Schuricht, S. L. Alper, and A. Schwab.** 2000. Polarization of Na(+)/H(+) and Cl(-)/HCO₃(-) exchangers in migrating renal epithelial cells. *J Gen Physiol* **115**:599-608.
82. **Kodama, A., T. Matozaki, A. Fukuhara, M. Kikyo, M. Ichihashi, and Y. Takai.** 2000. Involvement of an SHP-2-Rho small G protein pathway in hepatocyte growth factor/scatter factor-induced cell scattering. *Mol Biol Cell* **11**:2565-75.
83. **Kong, M., C. Mounier, V. Dumas, and B. I. Posner.** 2003. Epidermal growth factor-induced DNA synthesis. Key role for Src phosphorylation of the docking protein Gab2. *J Biol Chem* **278**:5837-44.
84. **Kozma, R., S. Sarner, S. Ahmed, and L. Lim.** 1997. Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol Cell Biol* **17**:1201-11.
85. **Kryukova, I. N., I. B. Obuch, and T. I. Biryulina.** 1968. Tumour production in adult mice by syngeneic embryonic cultured cells containing the incomplete Rous virus. *Nature* **219**:174-6.
86. **Lagana, A., J. Vадnais, P. U. Le, T. N. Nguyen, R. Laprade, I. R. Nabi, and J. Noel.** 2000. Regulation of the formation of tumor cell pseudopodia by the Na(+)/H(+) exchanger NHE1. *J Cell Sci* **113 (Pt 20)**:3649-62.
87. **Lamorte, L., D. M. Kamikura, and M. Park.** 2000. A switch from p130Cas/Crk to Gab1/Crk signaling correlates with anchorage independent growth and JNK activation in cells transformed by the Met receptor oncoprotein. *Oncogene* **19**:5973-81.
88. **Lamorte, L., I. Royal, M. Naujokas, and M. Park.** 2002. Crk adapter proteins promote an epithelial-mesenchymal-like transition and are required for HGF-

- mediated cell spreading and breakdown of epithelial adherens junctions. *Mol Biol Cell* **13**:1449-61.
89. **Lauffenburger, D. A., and A. F. Horwitz.** 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**:359-69.
 90. **Le, P. U., T. N. Nguyen, P. Drolet-Savoie, N. Leclerc, and I. R. Nabi.** 1998. Increased beta-actin expression in an invasive moloney sarcoma virus-transformed MDCK cell variant concentrates to the tips of multiple pseudopodia. *Cancer Res* **58**:1631-5.
 91. **Lee, C. W., K. H. Lee, S. B. Lee, D. Park, and S. G. Rhee.** 1994. Regulation of phospholipase C-beta 4 by ribonucleotides and the alpha subunit of Gq. *J Biol Chem* **269**:25335-8.
 92. **Lemmon, M. A., and K. M. Ferguson.** 1998. Pleckstrin homology domains. *Curr Top Microbiol Immunol* **228**:39-74.
 93. **Lemmon, M. A., and J. Schlessinger.** 1994. Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci* **19**:459-63.
 94. **Linder, S., and M. Aepfelbacher.** 2003. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol* **13**:376-85.
 95. **Liotta, L. A., J. Kleinerman, and G. M. Sidel.** 1974. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* **34**:997-1004.
 96. **Liotta, L. A., and E. C. Kohn.** 2001. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* **411**:375-9.
 97. **Liu, Y., B. Jenkins, J. L. Shin, and L. R. Rohrschneider.** 2001. Scaffolding protein Gab2 mediates differentiation signaling downstream of Fms receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* **21**:3047-56.
 98. **Liu, Y., and L. R. Rohrschneider.** 2002. The gift of Gab. *FEBS Lett* **515**:1-7.
 99. **Lock, L. S., C. R. Maroun, M. A. Naujokas, and M. Park.** 2002. Distinct recruitment and function of Gab1 and Gab2 in Met receptor-mediated epithelial morphogenesis. *Mol Biol Cell* **13**:2132-46.
 100. **Lock, L. S., I. Royal, M. A. Naujokas, and M. Park.** 2000. Identification of an atypical Grb2 carboxyl-terminal SH3 domain binding site in Gab docking proteins reveals Grb2-dependent and -independent recruitment of Gab1 to receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* **275**:31536-45.
 101. **Longati, P., A. Bardelli, C. Ponzetto, L. Naldini, and P. M. Comoglio.** 1994. Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene* **9**:49-57.
 102. **Lowenstein, E. J., R. J. Daly, A. G. Batzer, W. Li, B. Margolis, R. Lammers, A. Ullrich, E. Y. Skolnik, D. Bar-Sagi, and J. Schlessinger.** 1992. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* **70**:431-42.
 103. **Lu, W., D. Gong, D. Bar-Sagi, and P. A. Cole.** 2001. Site-specific incorporation of a phosphotyrosine mimetic reveals a role for tyrosine phosphorylation of SHP-2 in cell signaling. *Mol Cell* **8**:759-69.
 104. **Lynch, D. K., and R. J. Daly.** 2002. PKB-mediated negative feedback tightly regulates mitogenic signalling via Gab2. *Embo J* **21**:72-82.
 105. **Maroun, C. R., M. Holgado-Madruga, I. Royal, M. A. Naujokas, T. M. Fournier, A. J. Wong, and M. Park.** 1999. The Gab1 PH domain is required for

- localization of Gab1 at sites of cell-cell contact and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* **19**:1784-99.
106. **Maroun, C. R., M. A. Naujokas, M. Holgado-Madruga, A. J. Wong, and M. Park.** 2000. 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. *Mol Cell Biol* **20**:8513-25.
 107. **Maroun, C. R., M. A. Naujokas, and M. Park.** 2003. Membrane targeting of Grb2-associated binder-1 (Gab1) scaffolding protein through Src myristoylation sequence substitutes for Gab1 pleckstrin homology domain and switches an epidermal growth factor response to an invasive morphogenic program. *Mol Biol Cell* **14**:1691-708.
 108. **Matsumoto, K., K. Date, H. Ohmichi, and T. Nakamura.** 1996. Hepatocyte growth factor in lung morphogenesis and tumor invasion: role as a mediator in epithelium-mesenchyme and tumor-stroma interactions. *Cancer Chemother Pharmacol* **38 Suppl**:S42-7.
 109. **Matsumoto, K., and T. Nakamura.** 2003. NK4 (HGF-antagonist/angiogenesis inhibitor) in cancer biology and therapeutics. *Cancer Sci* **94**:321-7.
 110. **Maxwell, S. A., and R. B. Arlinghaus.** 1985. Serine kinase activity associated with Maloney murine sarcoma virus-124-encoded p37mos. *Virology* **143**:321-33.
 111. **Meng, S., Z. Chen, T. Munoz-Antonia, and J. Wu.** 2005. Participation of both Gab1 and Gab2 in the activation of the ERK/MAPK pathway by epidermal growth factor. *Biochem J* **391**:143-51.
 112. **Mohi, M. G., I. R. Williams, C. R. Dearolf, G. Chan, J. L. Kutok, S. Cohen, K. Morgan, C. Boulton, H. Shigematsu, H. Keilhack, K. Akashi, D. G. Gilliland, and B. G. Neel.** 2005. Prognostic, therapeutic, and mechanistic implications of a mouse model of leukemia evoked by Shp2 (PTPN11) mutations. *Cancer Cell* **7**:179-91.
 113. **Montagner, A., A. Yart, M. Dance, B. Perret, J. P. Salles, and P. Raynal.** 2005. A novel role for Gab1 and SHP2 in epidermal growth factor-induced Ras activation. *J Biol Chem* **280**:5350-60.
 114. **Montesano, R., K. Matsumoto, T. Nakamura, and L. Orci.** 1991. Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* **67**:901-8.
 115. **Montesano, R., G. Schaller, and L. Orci.** 1991. Induction of epithelial tubular morphogenesis in vitro by fibroblast-derived soluble factors. *Cell* **66**:697-711.
 116. **Monvoisin, A., C. Bisson, K. Si-Tayeb, C. Balabaud, A. Desmouliere, and J. Rosenbaum.** 2002. Involvement of matrix metalloproteinase type-3 in hepatocyte growth factor-induced invasion of human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer* **97**:157-62.
 117. **Mood, K., C. Saucier, A. Ishimura, Y. S. Bong, H. S. Lee, M. Park, and I. O. Daar.** 2006. Oncogenic Met receptor induces cell-cycle progression in *Xenopus* oocytes independent of direct Grb2 and Shc binding or Mos synthesis, but requires phosphatidylinositol 3-kinase and Raf signaling. *J Cell Physiol* **207**:271-85.
 118. **Moolten, F. L., and N. L. Bucher.** 1967. Regeneration of rat liver: transfer of humoral agent by cross circulation. *Science* **158**:272-4.

119. **Morimoto, A., K. Okamura, R. Hamanaka, Y. Sato, N. Shima, K. Higashio, and M. Kuwano.** 1991. Hepatocyte growth factor modulates migration and proliferation of human microvascular endothelial cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* **179**:1042-9.
120. **Motoyama, N., and K. Naka.** 2004. DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr Opin Genet Dev* **14**:11-6.
121. **Nabi, I. R.** 1999. The polarization of the motile cell. *J Cell Sci* **112** (Pt **12**):1803-11.
122. **Nakamura, T., K. Nawa, and A. Ichihara.** 1984. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* **122**:1450-9.
123. **Nakamura, T., T. Nishizawa, M. Hagiya, T. Seki, M. Shimonishi, A. Sugimura, K. Tashiro, and S. Shimizu.** 1989. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* **342**:440-3.
124. **Nebe, B., H. Sanftleben, H. Pommerenke, A. Peters, and J. Rychly.** 1998. Hepatocyte growth factor enables enhanced integrin-cytoskeleton linkage by affecting integrin expression in subconfluent epithelial cells. *Exp Cell Res* **243**:263-73.
125. **Neel, B. G., H. Gu, and L. Pao.** 2003. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci* **28**:284-93.
126. **Nguyen, L., M. Holgado-Madruga, C. Maroun, E. D. Fixman, D. Kamikura, T. Fournier, A. Charest, M. L. Tremblay, A. J. Wong, and M. Park.** 1997. Association of the multisubstrate docking protein Gab1 with the hepatocyte growth factor receptor requires a functional Grb2 binding site involving tyrosine 1356. *J Biol Chem* **272**:20811-9.
127. **Noel, J., D. Roux, and J. Pouyssegur.** 1996. Differential localization of Na⁺/H⁺ exchanger isoforms (NHE1 and NHE3) in polarized epithelial cell lines. *J Cell Sci* **109** (Pt **5**):929-39.
128. **O'Reilly, A. M., and B. G. Neel.** 1998. Structural determinants of SHP-2 function and specificity in *Xenopus* mesoderm induction. *Mol Cell Biol* **18**:161-77.
129. **O'Reilly, A. M., S. Pluskey, S. E. Shoelson, and B. G. Neel.** 2000. Activated mutants of SHP-2 preferentially induce elongation of *Xenopus* animal caps. *Mol Cell Biol* **20**:299-311.
130. **Osawa, M., S. Itoh, S. Ohta, Q. Huang, B. C. Berk, N. L. Marmarosh, W. Che, B. Ding, C. Yan, and J. Abe.** 2004. ERK1/2 associates with the c-Met-binding domain of growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2)-associated binder-1 (Gab1): role in ERK1/2 and early growth response factor-1 (Egr-1) nuclear accumulation. *J Biol Chem* **279**:29691-9.
131. **Ostman, A., C. Hellberg, and F. D. Bohmer.** 2006. Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**:307-20.
132. **Park, M., M. Dean, C. S. Cooper, M. Schmidt, S. J. O'Brien, D. G. Blair, and G. F. Vande Woude.** 1986. Mechanism of met oncogene activation. *Cell* **45**:895-904.
133. **Pelicci, G., S. Giordano, Z. Zhen, A. E. Salcini, L. Lanfrancone, A. Bardelli, G. Panayotou, M. D. Waterfield, C. Ponzetto, P. G. Pelicci, and et al.** 1995.

- The motogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the Shc adaptor protein. *Oncogene* **10**:1631-8.
134. **Peschard, P., T. M. Fournier, L. Lamorte, M. A. Naujokas, H. Band, W. Y. Langdon, and M. Park.** 2001. Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol Cell* **8**:995-1004.
 135. **Pollard, T. D., and G. G. Borisy.** 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**:453-65.
 136. **Ponzetto, C., A. Bardelli, Z. Zhen, F. Maina, P. dalla Zonca, S. Giordano, A. Graziani, G. Panayotou, and P. M. Comoglio.** 1994. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* **77**:261-71.
 137. **Ponzetto, C., Z. Zhen, E. Audero, F. Maina, A. Bardelli, M. L. Basile, S. Giordano, R. Narsimhan, and P. Comoglio.** 1996. Specific uncoupling of GRB2 from the Met receptor. Differential effects on transformation and motility. *J Biol Chem* **271**:14119-23.
 138. **Poole, A. W., and M. L. Jones.** 2005. A SHPing tale: perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail. *Cell Signal* **17**:1323-32.
 139. **Potempa, S., and A. J. Ridley.** 1998. Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositide 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter factor-induced adherens junction disassembly. *Mol Biol Cell* **9**:2185-200.
 140. **Ridley, A. J., P. M. Comoglio, and A. Hall.** 1995. Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. *Mol Cell Biol* **15**:1110-22.
 141. **Royal, I., T. M. Fournier, and M. Park.** 1997. Differential requirement of Grb2 and PI3-kinase in HGF/SF-induced cell motility and tubulogenesis. *J Cell Physiol* **173**:196-201.
 142. **Royal, I., and M. Park.** 1995. Hepatocyte growth factor-induced scatter of Madin-Darby canine kidney cells requires phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **270**:27780-7.
 143. **Sachs, M., H. Brohmann, D. Zechner, T. Muller, J. Hulsken, I. Walther, U. Schaeper, C. Birchmeier, and W. Birchmeier.** 2000. Essential role of Gab1 for signaling by the c-Met receptor in vivo. *J Cell Biol* **150**:1375-84.
 144. **Sahai, E., and C. J. Marshall.** 2003. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* **5**:711-9.
 145. **Saucier, C., V. Papavasiliou, A. Palazzo, M. A. Naujokas, R. Kremer, and M. Park.** 2002. Use of signal specific receptor tyrosine kinase oncoproteins reveals that pathways downstream from Grb2 or Shc are sufficient for cell transformation and metastasis. *Oncogene* **21**:1800-11.
 146. **Saxton, T. M., M. Henkemeyer, S. Gasca, R. Shen, D. J. Rossi, F. Shalaby, G. S. Feng, and T. Pawson.** 1997. Abnormal mesoderm patterning in mouse embryos mutant for the SH2 tyrosine phosphatase Shp-2. *Embo J* **16**:2352-64.

147. **Schaeper, U., N. H. Gehring, K. P. Fuchs, M. Sachs, B. Kempkes, and W. Birchmeier.** 2000. Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *J Cell Biol* **149**:1419-32.
148. **Schlessinger, J.** 1993. How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci* **18**:273-5.
149. **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, 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.** 1997. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet* **16**:68-73.
150. **Schoenwaelder, S. M., and K. Burridge.** 1999. Evidence for a calpeptin-sensitive protein-tyrosine phosphatase upstream of the small GTPase Rho. A novel role for the calpain inhibitor calpeptin in the inhibition of protein-tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* **274**:14359-67.
151. **Schoenwaelder, S. M., L. A. Petch, D. Williamson, R. Shen, G. S. Feng, and K. Burridge.** 2000. The protein tyrosine phosphatase Shp-2 regulates RhoA activity. *Curr Biol* **10**:1523-6.
152. **Schwab, M.** 1998. Amplification of oncogenes in human cancer cells. *Bioessays* **20**:473-9.
153. **Seiffert, M., J. M. Custodio, I. Wolf, M. Harkey, Y. Liu, J. N. Blattman, P. D. Greenberg, and L. R. Rohrschneider.** 2003. Gab3-deficient mice exhibit normal development and hematopoiesis and are immunocompetent. *Mol Cell Biol* **23**:2415-24.
154. **Simard, D., and I. R. Nabi.** 1996. Inverse relation of autocrine motility factor receptor and E-cadherin expression following MDCK epithelial cell transformation. *Biochem Biophys Res Commun* **219**:122-7.
155. **Singh, B., and R. B. Arlinghaus.** 1992. The mos proto-oncogene product: its role in oocyte maturation, metaphase arrest, and neoplastic transformation. *Mol Carcinog* **6**:182-9.
156. **Soda, Y., A. Jinno, Y. Tanaka, T. Akagi, K. Shimotohno, and H. Hoshino.** 2000. Rapid tumor formation and development of neutrophilia and splenomegaly in nude mice transplanted with human cells expressing human T cell leukemia virus type I or Tax1. *Leukemia* **14**:1467-76.
157. **Steel, L. F., D. L. Telly, J. Leonard, B. A. Rice, B. Monks, and J. A. Sawicki.** 1996. Elements in the murine c-mos messenger RNA 5'-untranslated region repress translation of downstream coding sequences. *Cell Growth Differ* **7**:1415-24.
158. **Stehelin, D., R. V. Guntaka, H. E. Varmus, and J. M. Bishop.** 1976. Purification of DNA complementary to nucleotide sequences required for neoplastic transformation of fibroblasts by avian sarcoma viruses. *J Mol Biol* **101**:349-65.
159. **Stiles, C. D., W. Desmond, L. M. Chuman, G. Sato, and M. H. Saier.** 1976. Growth control of heterologous tissue culture cells in the congenitally athymic nude mouse. *Cancer Res* **36**:1353-60.

160. **Stoker, M., E. Gherardi, M. Perryman, and J. Gray.** 1987. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* **327**:239-42.
161. **Stoker, M., and M. Perryman.** 1985. An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *J Cell Sci* **77**:209-23.
162. **Sugimoto, S., R. J. Lechleider, S. E. Shoelson, B. G. Neel, and C. T. Walsh.** 1993. Expression, purification, and characterization of SH2-containing protein tyrosine phosphatase, SH-PTP2. *J Biol Chem* **268**:22771-6.
163. **Sun, Q. Y., H. Breitbart, and H. Schatten.** 1999. Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. *Reprod Fertil Dev* **11**:443-50.
164. **Swan, D., M. Oskarsson, D. Keithley, F. H. Ruddle, P. D'Eustachio, and G. F. Vande Woude.** 1982. Chromosomal localization of the Moloney sarcoma virus mouse cellular (c-mos) sequence. *J Virol* **44**:752-4.
165. **Takaishi, K., T. Sasaki, H. Kotani, H. Nishioka, and Y. Takai.** 1997. Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol* **139**:1047-59.
166. **Talhok, R. S., M. J. Bissell, and Z. Werb.** 1992. Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *J Cell Biol* **118**:1271-82.
167. **Tannapfel, A., W. Yasui, H. Yokozaki, C. Wittekind, and E. Tahara.** 1994. Effect of hepatocyte growth factor on the expression of E- and P-cadherin in gastric carcinoma cell lines. *Virchows Arch* **425**:139-44.
168. **Tartaglia, M., E. L. Mehler, R. Goldberg, G. Zampino, H. G. Brunner, H. Kremer, I. van der Burgt, A. H. Crosby, A. Ion, S. Jeffery, K. Kalidas, M. A. Patton, R. S. Kucherlapati, and B. D. Gelb.** 2001. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet* **29**:465-8.
169. **Thiery, J. P.** 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2**:442-54.
170. **Thiery, J. P., and J. P. Sleeman.** 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**:131-42.
171. **Trusolino, L., and P. M. Comoglio.** 2002. Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat Rev Cancer* **2**:289-300.
172. **Tsujinaka, T., Y. Kajiwara, J. Kambayashi, M. Sakon, N. Higuchi, T. Tanaka, and T. Mori.** 1988. Synthesis of a new cell penetrating calpain inhibitor (calpeptin). *Biochem Biophys Res Commun* **153**:1201-8.
173. **Uehara, Y., O. Minowa, C. Mori, K. Shiota, J. Kuno, T. Noda, and N. Kitamura.** 1995. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* **373**:702-5.
174. **Vadnais, J., G. Nault, Z. Daher, M. Amraei, Y. Dodier, I. R. Nabi, and J. Noel.** 2002. Autocrine activation of the hepatocyte growth factor receptor/met tyrosine kinase induces tumor cell motility by regulating pseudopodial protrusion. *J Biol Chem* **277**:48342-50.
175. **Van Vactor, D., A. M. O'Reilly, and B. G. Neel.** 1998. Genetic analysis of protein tyrosine phosphatases. *Curr Opin Genet Dev* **8**:112-26.
176. **Vogel, W., R. Lammers, J. Huang, and A. Ullrich.** 1993. Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Science* **259**:1611-4.

177. **Wang, H., and J. A. Keiser.** 2000. Hepatocyte growth factor enhances MMP activity in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **272**:900-5.
178. **Wang, R., L. D. Ferrell, S. Faouzi, J. J. Maher, and J. M. Bishop.** 2001. Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice. *J Cell Biol* **153**:1023-34.
179. **Wang, W., J. B. Wyckoff, V. C. Frohlich, Y. Oleynikov, S. Huttelmaier, J. Zavadil, L. Cermak, E. P. Bottinger, R. H. Singer, J. G. White, J. E. Segall, and J. S. Condeelis.** 2002. Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling. *Cancer Res* **62**:6278-88.
180. **Weidner, K. M., N. Arakaki, G. Hartmann, J. Vandekerckhove, S. Weingart, H. Rieder, C. Fonatsch, H. Tsubouchi, T. Hishida, Y. Daikuhara, and et al.** 1991. Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:7001-5.
181. **Weidner, K. M., S. Di Cesare, M. Sachs, V. Brinkmann, J. Behrens, and W. Birchmeier.** 1996. Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature* **384**:173-6.
182. **Weidner, K. M., M. Sachs, D. Riethmacher, and W. Birchmeier.** 1995. Mutation of juxtamembrane tyrosine residue 1001 suppresses loss-of-function mutations of the met receptor in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:2597-601.
183. **Wolf, I., B. J. Jenkins, Y. Liu, M. Seiffert, J. M. Custodio, P. Young, and L. R. Rohrschneider.** 2002. Gab3, a new DOS/Gab family member, facilitates macrophage differentiation. *Mol Cell Biol* **22**:231-44.
184. **Woodhouse, E. C., R. F. Chuaqui, and L. A. Liotta.** 1997. General mechanisms of metastasis. *Cancer* **80**:1529-37.
185. **Wu, D. Y., and D. J. Goldberg.** 1993. Regulated tyrosine phosphorylation at the tips of growth cone filopodia. *J Cell Biol* **123**:653-64.
186. **Yagoda, A.** 1989. Chemotherapy of renal cell carcinoma: 1983-1989. *Semin Urol* **7**:199-206.
187. **Yamada, K., K. Nishida, M. Hibi, T. Hirano, and Y. Matsuda.** 2001. Comparative FISH mapping of Gab1 and Gab2 genes in human, mouse and rat. *Cytogenet Cell Genet* **94**:39-42.
188. **Yamaguchi, H., M. Lorenz, S. Kempiak, C. Sarmiento, S. Coniglio, M. Symons, J. Segall, R. Eddy, H. Miki, T. Takenawa, and J. Condeelis.** 2005. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J Cell Biol* **168**:441-52.
189. **Yamaguchi, H., J. Wyckoff, and J. Condeelis.** 2005. Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol* **17**:559-64.
190. **Yamasaki, S., K. Nishida, Y. Yoshida, M. Itoh, M. Hibi, and T. Hirano.** 2003. Gab1 is required for EGF receptor signaling and the transformation by activated ErbB2. *Oncogene* **22**:1546-56.
191. **Yart, A., P. Mayeux, and P. Raynal.** 2003. Gab1, SHP-2 and other novel regulators of Ras: targets for anticancer drug discovery? *Curr Cancer Drug Targets* **3**:177-92.
192. **Yew, N., M. Strobel, and G. F. Vande Woude.** 1993. Mos and the cell cycle: the molecular basis of the transformed phenotype. *Curr Opin Genet Dev* **3**:19-25.

193. **Yu, C. F., B. Roshan, Z. X. Liu, and L. G. Cantley.** 2001. ERK regulates the hepatocyte growth factor-mediated interaction of Gab1 and the phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **276**:32552-8.
194. **Zhang, Q., M. K. Magnusson, and D. F. Mosher.** 1997. Lysophosphatidic acid and microtubule-destabilizing agents stimulate fibronectin matrix assembly through Rho-dependent actin stress fiber formation and cell contraction. *Mol Biol Cell* **8**:1415-25.
195. **Zhang, S. Q., W. G. Tsiras, T. Araki, G. Wen, L. Minichiello, R. Klein, and B. G. Neel.** 2002. Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2. *Mol Cell Biol* **22**:4062-72.
196. **Zhang, Y. W., and G. F. Vande Woude.** 2003. HGF/SF-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion. *J Cell Biochem* **88**:408-17.
197. **Zhu, H., M. A. Naujokas, E. D. Fixman, K. Torossian, and M. Park.** 1994. Tyrosine 1356 in the carboxyl-terminal tail of the HGF/SF receptor is essential for the transduction of signals for cell motility and morphogenesis. *J Biol Chem* **269**:29943-8.

7. Documents spéciaux

Vidéo 1 : Effet de la calpeptine sur la motilité aléatoire des cellules MSV-MDCK-INV.

Le vidéo est constitué de trois parties distinctes, enregistrées sur la même prise de vue pour une période totale de 240 minutes. Une image a été enregistrée chaque minute.

La première partie du vidéo représente les cellules MSV-MDCK-INV dans du milieu complet contenant du sérum 10% et du DMSO 0.05% (témoin). Les 6 secondes d'enregistrement représentent 60 minutes.

La deuxième partie représente les cellules MSV-MDCK-INV suite à l'ajout de milieu frais contenant du sérum 10% et de la calpeptine à une concentration de 0,1 mg/mL. Les 9 secondes d'enregistrement représentent 60 minutes.

La troisième partie représente du vidéo les cellules MSV-MDCK-INV tel que filmées dans la deuxième partie. Après le rinçage rapide des cellules, du milieu frais contenant du sérum 10% et du DMSO 0,05% a été ajouté afin de voir la récupération du phénotype de motilité aléatoire de ces cellules. Les 13 secondes d'enregistrement représentent 120 minutes. Ces résultats sont représentatifs de 3 enregistrements similaires.

Vidéo 2 : Effet de l'inhibiteur de la calpaïne-I sur la motilité aléatoire des cellules MSV-MDCK-INV.

Le vidéo est constitué de deux parties distinctes, enregistrées sur la même prise de vue pour une période totale de 120 minutes. Une image a été enregistrée chaque minute.

La première partie du vidéo représente les cellules MSV-MDCK-INV dans du milieu complet contenant du sérum 10% et de l'éthanol 0,0004% (témoin). Les 6 secondes d'enregistrement représentent 60 minutes.

La deuxième partie représente les cellules MSV-MDCK-INV suite à l'ajout de milieu frais contenant du sérum 10% et l'inhibiteur de la calpaïne-I (10 μ M). Les 9 secondes d'enregistrement représentent 60 minutes.