

Université de Montréal

**Étude du rôle de l'adaptateur Nck2 dans la progression métastatique du
mélanome humain**

Par
Mélissa Labelle-Côté

Programmes de biologie moléculaire
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en biologie moléculaire.

Décembre, 2009

© Mélissa Labelle-Côté, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :
Étude du rôle de l'adaptateur Nck2 dans la progression métastatique du mélanome
humain

Présenté par :
Mélicca Labelle-Côté

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr Philippe Roux
Président rapporteur

Dr Louise Larose
Directrice de recherche

Dr Jean-François Côté
Codirecteur

Dr Audrey Claing
Membre du jury

RÉSUMÉ

La dissémination métastatique est associée à de faibles chances de survie dans les cas de mélanomes humains, comme pour d'autres cancers. Le développement de métastases est un processus qui se fait en plusieurs étapes et nécessite la réorganisation du cytosquelette d'actine pour permettre la migration et l'invasion cellulaire. La protéine Nck2 est un adaptateur protéique principalement impliqué dans la réorganisation du cytosquelette. Une étude préliminaire réalisée dans notre laboratoire avait révélé que les niveaux de la protéine Nck2 et de son ARNm sont augmentés dans les lignées de mélanome métastatiques en comparaison aux lignées primaires. Le but de la présente recherche était donc d'étudier le rôle de l'adaptateur Nck2 dans la progression métastatique. Les résultats obtenus confirment que l'expression de Nck2 augmente de façon marquée au cours de la progression métastatique du mélanome humain. Cette étude révèle en plus que l'expression de hauts niveaux de Nck2 dans les cellules de mélanome primaire stimule la prolifération cellulaire et la migration, n'affecte pas l'invasion d'une matrice de collagène de type I, mais semble affaiblir les contacts cellule-cellule et l'adhésion au substrat. Une étude préliminaire effectuée *in vivo* révèle que ces phénomènes se traduisent par une légère augmentation de la tumorigenèse et de la croissance tumorale. Dans l'ensemble, les résultats obtenus suggèrent que Nck2 pourrait effectivement jouer un rôle dans la progression métastatique du mélanome en favorisant la prolifération des cellules tumorales et en facilitant leur détachement de la tumeur primaire, les rendant plus aptes à se disperser dans l'organisme et à établir des colonies métastatiques. Au niveau moléculaire, nous proposons que Nck2 est recruté dans les invadopodes pour favoriser la formation de complexes protéiques qui stimulent l'invasion. La mobilisation de Nck2 dans ces structures membranaires diminuerait sa disponibilité pour l'établissement d'autres complexes protéiques, entre autres dans les complexes d'adhésion focaux (FAs) et dans les jonctions adhérentes, diminuant ainsi les contacts des cellules cancéreuses avec la matrice extracellulaire et les cellules avoisinantes.

Mots clés : Nck2, adaptateur protéique, progression métastatique, mélanome humain.

ABSTRACT

The metastatic process is highly fatal in many cancers, including human melanoma. Metastatic progression is a multistep process in which cytoskeletal organization allows migration and invasion of cancer cells. Nck2 is an adaptor protein mainly associated with cytoskeletal organization. A preliminary study carried out in our laboratory has shown that Nck2 protein and mRNA levels are increased in metastatic melanoma cell lines compared to primary cell lines. In this study, the role of Nck2 in metastatic progression was further investigated. Results confirmed that Nck2 levels are increased in metastatic melanoma compared to primary cell lines. Nck2 overexpression in primary melanoma induced migration and cell proliferation, did not affect invasion in type I collagen matrix, but decreased cell-cell and cell-substrate adhesion. In addition, a preliminary *in vivo* study suggested that Nck2 overexpression slightly increased tumorigenesis and tumor growth in primary melanoma. All together, these results indicate that Nck2 may effectively influence metastatic progression of melanoma by increasing cancer cell proliferation and detachment from the primary tumor, allowing them to enter the blood circulation and form distant colonies. At the molecular level, we propose that Nck2 is recruited to invadopodia in order to form molecular complexes that increase cell invasion, and this may results in a decrease in Nck2 levels available to form other molecular complexes in others cell compartments, such as focal adhesions (FA) and adherent cell junctions.

Title : Role of Nck2 adaptor in metastatic progression of human melanoma

Key words : Nck2, adaptor protein, metastatic progression, human melanoma.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des matières	v
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux	x
Liste des sigles et abréviations	xi
Remerciements	xiii
Introduction	1
1.1 Mélanome	1
1.1.1 Origine et progression du mélanome.....	1
1.1.2 Altérations moléculaires.....	3
1.1.2.1 Régulation de la croissance, la prolifération, la survie et du cycle cellulaire	3
1.1.2.2 Molécules d'adhésion et interactions intercellulaires	5
1.1.2.3 Protéases et altération de l'environnement.....	6
1.2 Cancer	7
1.2.1 La transformation cellulaire et l'instabilité génétique.....	7
1.2.2 Caractéristiques typiques des cellules cancéreuses	8
1.2.2.1 Autosuffisance face aux facteurs de croissance	9
1.2.2.2 Insensibilité aux inhibiteurs de croissance	10
1.2.2.3 Évasion de l'apoptose.....	11
1.2.2.4 Immortalité cellulaire	11
1.2.2.5 Angiogenèse	12
1.2.2.6 Invasion et métastases	12
1.2.3 Progression métastatique.....	14
1.3 Signalisation cellulaire.....	15
1.4 L'adaptateur protéique Nck	18
1.4.1 Nck : Gènes et protéines.....	18
1.4.2 Interactions protéiques de Nck	20
1.4.3 Fonctions biologiques de Nck	23

1.4.3.1 Nck et la polymérisation d'actine.....	23
1.4.3.2 Nck et la morphologie, la motilité et l'adhésion	24
1.4.3.3 Nck et le guidage des axones	25
1.4.3.4 Nck et la filtration glomérulaire	26
1.4.3.5 Signalisation du récepteur des cellules T	27
1.4.3.6 Nck et la prolifération cellulaire.....	28
1.4.3.7 Nck et la synthèse protéiques	28
1.4.3.8 Nck et la réponse des cellules au stress.....	29
1.5 Nck dans le mélanome et autres cancers.	30
1.6 Hypothèse et objectifs de recherche	32
2 Matériel et Méthodes.....	34
3 Résultats	41
3.1 Expression de Nck2 selon le stade de progression métastatique de cellules de mélanome humain.....	41
3.2 Surexpression de Nck2 dans les cellules de mélanome primaire	42
3.3 Analyse de la prolifération cellulaire selon les niveaux d'expression de Nck2.....	44
3.4 Caractérisation des propriétés de migration et d'invasion des lignées de mélanome et des clones surexprimant Nck2	46
3.4.1 Migration bidimensionnelle suite à une rayure	46
3.4.2 Invasion tridimensionnelle par culture de sphéroïdes	47
3.5 Analyse moléculaire des lignées de mélanome humain et des clones surexprimant Nck2.....	50
3.5.1 Niveaux d'expression des molécules d'adhésion.....	50
3.5.2 La voie Ras-MAPKs	52
3.6 Localisation cellulaire de Nck2 et morphologie du cytosquelette, des structures d'adhésion et d'invasion	53
3.6.1 Localisation de Nck2 et complexes d'adhésion focaux (FAs).....	53
3.6.2 Localisation de Nck2 et invadopodes sur matrice de Matrigel™	55
3.7 Analyse <i>in vivo</i> de la tumorigenèse et du potentiel métastatique.....	57
4 Discussion.....	61
4.1 Expression de Nck2 dans le mélanome humain	61
4.2 Nck2 dans la progression métastatique du mélanome humain.....	63

4.2.1 Nck2 stimule la croissance cellulaire	63
4.2.2 Nck2 stimule la migration bidimensionnelle.....	64
4.2.3 Nck2 et l'invasion cellulaire	66
4.2.4 Nck2 fragilise les contacts cellule-cellule et cellule-matrice	69
4.2.5 Effets <i>in vivo</i> de la surexpression de Nck2 dans le mélanome	70
4.3 Modèle	71
4.4 Pertinence des résultats.....	73
Conclusion.....	75
Références	77
Annexe 1 : Résultats bruts des analyses <i>in vivo</i>	xv
Annexe 2 : Droits de reproduction des figures.....	xxi

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Progression du mélanome humain.....	p. 2
Figure 2 : Caractéristiques générales des cellules cancéreuses.....	p. 9
Figure 3 : Progression métastatique	p. 14
Figure 4 : Fonctions de l'adaptateur Nck.....	p. 19
Figure 5 : Niveaux d'expression de Nck1 et Nck2 dans différents tissus murins..	p. 20
Figure 6 : Homologie entre Nck1 et Nck2 et partenaires d'interaction de leurs différents domaines SH	p. 22
Figure 7 : La surexpression de Nck1 ou Nck2 induit la transformation cellulaire	p. 30
Figure 8 : Niveaux d'expression de Nck1 et Nck2 au cours de la progression de différents cancers.....	p. 32
Figure 9 : Carte du plasmide pEGFP-C1-Nck2.....	p. 34
Figure 10 : Analyse des anticorps spécifiques contre Nck1 et Nck2	p. 35
Figure 11 : Méthode d'analyse de la migration par recouvrement suite à une rayure	p. 39
Figure 12 : Technique de formation de sphéroïdes par gouttelettes inversées.....	p. 39
Figure 13 : Expression de Nck2, Nck1 et CrkII dans différentes lignées cellulaires de mélanome humain	p. 42
Figure 14 : Expression de Nck2, Nck1 et CrkII dans différentes lignées cellulaires de mélanome humain	p. 44
Figure 15 : Prolifération cellulaire selon les niveaux d'expression de Nck2.....	p. 45
Figure 16 : Migration bidimensionnelle suite à une rayure des cellules de mélanome primaire surexprimant Nck2.....	p. 47
Figure 17 : Invasion d'une matrice de collagène de type I par des cellules de mélanome cultivées en sphéroïdes	p. 49
Figure 18 : Expression de molécules impliquées dans les contacts cellule-cellule ou cellule-matrice chez les cellules de mélanome humain surexprimant ou non Nck2	p. 51
Figure 19 : Activation des voies de signalisation des MAPKs et d'Akt dans des clones de mélanome primaire surexprimant Nck2	p. 53

- Figure 20 : Localisation cellulaire de Nck2 et structure du cytosquelette d'actine dans des cellules de mélanome humain p. 54
- Figure 21 : Localisation de Nck2 au niveau des invadopodes dans des cellules de mélanome humain exprimant la protéine de fusion GFP-Nck2 p. 56
- Figure 22 : Croissance tumorale suite à l'injection de cellules de mélanome primaire WM278 exprimant ou non les protéines GFP ou GFPNck2 à des souris CD-1 immunodéficientes..... p. 58
- Figure 23 : Modèle décrivant l'implication de Nck2 dans la progression métastatique du mélanome humain p. 72
- Figure 24 : Modèle moléculaire décrivant un rôle pour Nck2 dans la progression métastatique du mélanome humain p. 73
- Figure 25 : Courbes de croissance des tumeurs suite à l'injection sous-cutanée de cellules de mélanome sur le flanc droit de souris immunodéficientes p. xx

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau I : Tumorigenèse et potentiel métastatique des cellules de mélanome humain
..... p. 57
- Tableau II : Taille des tumeurs et présence de renflements au niveau des ganglions
lymphatiques inguinaux suite à l'injection sous-cutanée de cellules de
mélanome sur le flanc droit de souris immunodéficientes p. xv

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

a.a.	acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Dock	<i>dreadlocks</i> ; homologue de Nck chez <i>Drosophila melanogaster</i>
DOCK1	<i>dedicator of cytokinesis 1</i> ; protéine avec une activité de GEF pour Rac
Dok1	<i>docking protein 1 (Downstream of kinase 1)</i> ; protéine d'ancrage (en aval des kinases) no.1
ECM	<i>Extracellular matrix</i> ; matrice extracellulaire
EGF	<i>Epithelial Growth Factor</i> ; facteur de croissance des cellules épithéliales
EMT	<i>Epithelial to Mesenchymal Transition</i> ; Transition épithéliale-mésenchymateuse
ERK	<i>Extracellular-Signal-Regulated kinase 1</i> ; kinase régulée par des signaux extracellulaires no.1
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i> ; kinase des complexes d'adhésion focaux
FAs	<i>Focal Adhesion</i> ; complexes d'adhésion focaux
FBS	<i>Fetal Bovin Serum</i> ; sérum de veau fœtal
FGF	<i>Fibroblasts Growth Factor</i> ; facteur de croissance des fibroblastes
GEF(s)	<i>Guanine nucleotide Exchange Factor(s)</i> ; Facteur(s) stimulant l'échange de guanosine
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> ; protéine fluorescente verte
GTPase(s)	<i>Guanosine triphosphate hydrolase</i> ; protéine hydrolisant le guanosine triphosphate
MAPK(s)	<i>Mitogen-activated protein (MAP) kinase(s)</i> ; kinase(s) activée par des agents mitogènes
MEK	<i>MAP ERK kinase</i> ; kinase de ERK
MITF	<i>Microphthalmia-Associated Transcription Factor</i> ; Facteur de transcription associée à la microphthalmia
Nck	<i>Non-catalytic (region of) kinase</i> ; région non catalytique de kinase
N-WASP	protéine WASP neuronale
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i> ; Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDGFR	Récepteur du PDGF

PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinases</i> ; kinase du phosphatidylinositol-3
PINCH	<i>Particularly interesting new cysteine-histidine rich protein</i> ; nouvelle protéine riche en cystéine-histidine particulièrement intéressante; protéine d'échafaudage composé essentiellement de domaines LIM
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> ; homologue de phosphatases et de tensines
pTyr	résidu tyrosine phosphorylé
RE	Réticulum Endoplasmique
Réf.	Référence
RGP	<i>Radial Growth Phase</i> ; phase de croissance radiale du mélanome
RTK(s)	<i>Receptor Tyrosine Kinase(s)</i> ; Récepteur(s) à activité tyrosine kinase
SH2	<i>Src Homology domain 2</i> ; domaine d'homologie de Src de type 2
SH3	<i>Src Homology domain 3</i> ; domaine d'homologie de Src de type 3
UV	ultraviolets
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> ; Facteur de croissance des cellules vasculaires endothéliales
VEGFR2	Récepteur du VEGF no.2
VGP	<i>Vertical Growth Phase</i> ; phase de croissance verticale du mélanome
WASP	<i>Wiskott-Aldrich Syndrome Protein</i> ; protéine associée au syndrome de Wiskott-Aldrich
WAVE	<i>WASP-family verprolin-homologous protein</i> ; protéine de la famille de WASP homologue à la verpoline
WIP	<i>WASP interacting protein</i> ; protéine interagissant avec WASP

REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement le Dr Louise Larose d'avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire, ainsi que pour sa judicieuse supervision, ses conseils, sa constante présence et son dynamisme. Je suis heureuse d'avoir fait partie de la stimulante équipe du Dr Louise Larose. Je remercie toute l'équipe du *Polypeptide Laboratory* pour leur support scientifique et leur amitié. Particulièrement, je remercie Mary Lapenna pour sa présence et son précieux support administratif et Tamara Moore pour m'avoir aidé à améliorer mes connaissances de l'anglais. Je voudrais aussi mentionner toutes les étudiantes et assistantes (présentes et passées) du laboratoire du Dr Larose : Vilayphone Luangrath, Geneviève Bourret, Marie-Kristine Laberge, Adiba Azad, Afnan Abu-Thuria, Hui Li pour leur dynamisme et leur sympathie et particulièrement Julie Dusseault pour ses précieux conseils et sa participation au projet, ainsi que Lama Yamani pour m'avoir aidé à faire la traduction de mes travaux.

Bien que nos échanges aient été finalement peu nombreux, j'aimerais aussi remercier le Dr Jean-François Côté pour avoir accepté d'être mon codirecteur et pour ses généreux encouragements.

Je me dois aussi de remercier les Programmes de biologie moléculaire de l'Université de Montréal, ainsi que les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) pour leur soutien financier. Je remercie particulièrement Mme Marie-Josée Lefebvre, coordonnatrice à l'exécution des programmes aux IRSC, pour son généreux support administratif.

J'adresse un merci particulier à Mme Vivianne Jodoin, coordonnatrice des Programmes de biologie moléculaire, pour ses judicieuses paroles qui m'ont donné le courage de persévérer malgré toutes les difficultés que j'ai pu rencontrer au cours de ces trois dernières années.

D'une manière plus personnelle, je remercie mes parents, ma sœur et son conjoint pour leur soutien et leurs encouragements inconditionnels, sans oublier la petite Mathilde Aubut pour sa joie de vivre et son énergie débordante. Finalement, je remercie particulièrement Philippe Mirabel pour la lecture de mon mémoire et ses commentaires éclairés, mais surtout pour sa présence durant les moments difficiles, son affectuosité débordante et son humour rafraîchissant.

INTRODUCTION

1.1 Mélanome

Le mélanome humain est le plus fréquent des cancers de peau et son incidence est en constante augmentation depuis plus de 30 ans¹. Il s'agit du troisième type de cancer diagnostiqué chez les jeunes âgés de 15 à 29 ans². Bien qu'il ne représente que 6 % des cancers de la peau, le mélanome est responsable de 78 % des décès associés à ce groupe de cancers². Le mélanome peut facilement être traité par chirurgie au cours des premiers stades de développement, avec un taux de survie sur 5 ans d'environ 90 %^{1,2}. Cependant, le mélanome est plus propice à la métastase que les autres types de cancer de la peau et la dispersion métastatique est associée à une baisse drastique des chances de survie. On note un taux de survie sur 5 ans de 99 % pour un cancer confiné à l'épiderme comparativement à 16 % pour un cancer dispersé¹. Cette diminution des chances de survie est due au fait que les mélanomes avec métastases sont résistants aux traitements existants³⁻⁵. Il est donc d'une importance capitale d'étudier le processus de métastase dans ce type de cancer afin de développer des traitements plus efficaces pour renverser ou enrayer ce processus.

1.1.1 Origine et progression du mélanome

Le mélanome provient des mélanocytes, les cellules pigmentaires de la peau situées dans les couches les plus profondes de l'épiderme, près de la membrane basale. La fonction première des mélanocytes est de protéger la peau des effets néfastes des rayons UV du soleil sur l'ADN en produisant la mélanine, le pigment de la peau qui absorbe l'énergie des UV³⁻⁵. L'intégrité de la peau et de la fonction des mélanocytes est maintenue grâce à l'interaction dynamique entre les mélanocytes et les cellules avoisinantes³. Les fibroblastes et les cellules endothéliales modulent la fonction des mélanocytes en sécrétant différents facteurs solubles. Les kératinocytes interagissent directement avec les mélanocytes par l'intermédiaire de molécules d'adhésion et exercent un étroit contrôle de leur prolifération et de leur morphologie, en plus d'activer et de disperser leur fonction de défense contre les UV³. Le mélanome se développe lorsque les mélanocytes parviennent à échapper à cette régulation.

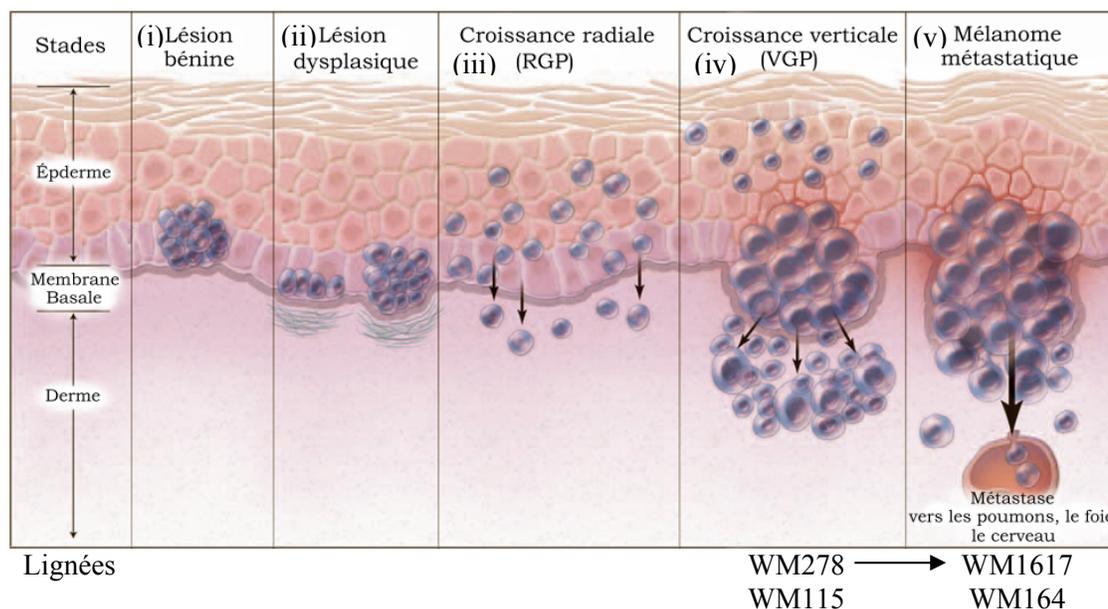


Figure 1 : Progression du mélanome humain ⁵ © Massachusetts Medical Society, 2006. Représentation schématique des 5 étapes de la progression du mélanome humain. Le stade de développement de quatre des lignées utilisées dans la présente recherche est indiqué dans le schéma. Reproduction adaptée de Miller et Mihn [Réf. 5] avec la permission du New England Journal of Medicine (Annexe 2).

Le processus du développement de ce cancer est bien caractérisé et, selon le modèle Clark, se divise en 5 étapes bien distinctes ⁵ (Figure 1, p.2). La première correspond à la formation d'une lésion bénigne (i) qui survient lorsque la prolifération cellulaire n'est plus adéquatement régulée. À ce stade, les cellules de mélanome prolifèrent plus rapidement. La taille de la tumeur demeure toutefois restreinte, car la survie est encore régulée. La tumeur devient dysplasique (ii) lorsqu'une seconde série de modifications entraîne une perte de la régulation du cycle cellulaire et de la survie. Les lésions dysplasiques peuvent se former à partir des lésions bénignes ou directement à partir de mélanocytes normaux. Lors de la phase de croissance radiale (RGP; iii), le mélanome prend de l'expansion, les cellules envahissent l'épiderme et commencent même à envahir les couches supérieures du derme. Survient ensuite la phase de croissance verticale (VGP; iv) au cours de laquelle les cellules tumorales traversent la membrane basale et envahissent le derme jusqu'aux couches les plus profondes. Les cellules cancéreuses isolées à ce stade sont capables de former des colonies en culture sur agar mou et des tumeurs lorsqu'elles sont injectées à des souris immunodéficientes. Lorsque certaines cellules du

mélanome parviennent à atteindre la circulation sanguine ou lymphatique, il y a finalement formation de métastases (v) ⁵.

1.1.2 Altérations moléculaires

De nombreuses altérations génétiques et moléculaires surviennent au cours des différentes étapes de développement du mélanome. Ces altérations peuvent être classées en trois grandes catégories selon la fonction des molécules impliquées : 1) les protéines intracellulaires régulant la croissance, la survie, la prolifération et le cycle cellulaire; 2) les molécules d'adhésion et de communication intercellulaire; 3) les protéases et les peptidases.

1.1.2.1 Régulation de la croissance, la prolifération, la survie et du cycle cellulaire

Au point de départ, la formation d'une lésion bénigne nécessite une perte de régulation de la croissance et la prolifération cellulaire. L'activation constitutive de la voie des MAPKs est le plus souvent à l'origine de la prolifération démesurée des cellules de mélanomes ^{4,5}. En effet, l'activité de la MAPK ERK est augmentée dans 90 % des cas de mélanomes, principalement à cause d'une mutation de la GTPase Ras ou la kinase Raf⁴. Le gène *NRAS* est muté dans environ 30 % des cas de mélanomes principalement par la substitution d'une leucine à la place de la glutamine en position 61 (Q61L) ⁴. Dans 70 % des cas de mélanome, on retrouve une mutation activatrice dans le gène *BRAF* qui consiste le plus souvent en une substitution de la valine en position 600 par l'acide glutamique (V600E) ⁶. D'ailleurs, toutes les lignées cellulaires de mélanome utilisées dans cette étude portent cette mutation ^{6,7}. L'activation constitutive de BRAF induit la prolifération cellulaire en conduisant à l'activation d'ERK. L'activation de BRAF induit aussi l'angiogenèse en stimulant la sécrétion autocrine du VEGF et favorise la sénescence en augmentant l'expression de l'inhibiteur de kinases du cycle cellulaire (INK4A). Les mutations des gènes *NRAS* et *BRAF* sont mutuellement exclusives, puisque Ras agit en amont de Raf; la double mutation serait donc inutile, voire nuisible ⁴.

La majorité des mélanomes bénins régressent et se différencient en mélanocytes fonctionnels, malgré que 80 % d'entre eux présentent une mutation de *BRAF* ⁴. Ce

phénomène s'explique entre autres par le fait que l'activation de BRAF, comme d'autres oncogènes, induit la sénescence. Cette effet apparemment contradictoire constitue un mécanisme cellulaire de protection contre le cancer. Il a été démontré que l'augmentation de la prolifération induite par la mutation V600E de BRAF est souvent suivie d'un arrêt de la croissance associé à l'activation de SA- β -GAL et de l'induction de INK4a⁸. Cette constatation indique néanmoins que l'activation de la MAPK ERK n'est pas suffisante pour promouvoir la progression du mélanome jusqu'aux stades plus agressifs. Une seconde série de mutations est donc nécessaire pour permettre la formation de lésions dysplasiques^{4,5}. Celle-ci affecte les protéines impliquées dans la régulation de la survie et de la progression du cycle cellulaire⁵. Pour ce qui est de la survie cellulaire, la voie de PI3K-Akt-PTEN est la plus souvent mutée^{4,5}. En effet, l'activité de la kinase Akt est augmentée dans 60 % des cas de mélanome, entre autres par l'activation de la PI3K, qui mène à l'activation d'Akt, ou l'inactivation de PTEN, une phosphatase menant à l'inhibition d'Akt⁴. La mutation du gène *BRAF* est combinée à celle du gène *PTEN* dans près de 20 % des mélanomes. Ces deux voies agissent de façon parallèle, en aval de Ras, et coopèrent pour faciliter la tumorigenèse⁴. Le gène *CDKN2A* qui encode ARF et INK4A, deux inhibiteurs du cycle cellulaire, ainsi que ceux encodant des protéines situées en aval de ces inhibiteurs sont souvent inhibés dans les cas de mélanome. L'altération de la signalisation en aval de INK4A est observée uniquement à partir du stade dysplasique et agit de concert avec les mutations de la voie des MAPKs pour permettre la prolifération infinie des cellules de mélanome en croissance^{4,5}. Les niveaux d'expression de MITF, un facteur de transcription qui contrôle la différenciation des mélanocytes, la survie et le cycle cellulaire, sont quant à eux, étroitement régulés au niveau génétique et au niveau par l'activation des MAPKs et de la β -caténine afin d'optimiser la progression du mélanome^{4,5,9}. L'expression de MITF ou l'inhibition de ces gènes cibles et la diminution de la pigmentation sont associées à un faible pronostic, ainsi qu'à la résistance aux agents chimiothérapeutiques⁵.

1.1.2.2 Molécules d'adhésion et interactions intercellulaires

Les interactions des cellules de mélanome avec les cellules avoisinantes ou la matrice extracellulaire sont très importantes pour le développement des mélanocytes. L'altération des molécules impliquées dans ces contacts constitue donc une composante critique de la progression du mélanome. Les changements dans l'expression des molécules d'adhésion commencent dès les premiers stades de développement du mélanome, mais ils s'accroissent durant la progression de la phase RGP vers la phase VGP^{3,10}.

Les cadhérines sont probablement les molécules d'adhésion les plus importantes pour le développement du mélanome. Il s'agit de la famille de molécules d'adhésion qui sont responsables des jonctions adhérentes par l'intermédiaire d'interactions homophiles¹¹. Au niveau de la peau, les kératinocytes expriment l'E-cadhérine, tandis que les fibroblastes et les cellules endothéliales expriment la N-cadhérine^{3,10}. L'expression de l'E-cadhérine par les mélanocytes est responsable de leur interaction avec l'E-cadhérine exprimée par les kératinocytes. La diminution de l'expression de l'E-cadhérine et l'augmentation de la N-cadhérine permet aux cellules de mélanome d'échapper au contrôle des kératinocytes et de former de nouvelles interactions avec les fibroblastes et les cellules endothéliales^{3,10}. Ces nouvelles interactions permettent aux mélanomes d'influencer l'activité biologique de leurs nouveaux partenaires afin de leur faire produire les facteurs de croissance et les protéines de la matrice extracellulaire qui leur sont utiles³. La transition des cadhérines est particulièrement critique pour la progression du mélanome. La surexpression de l'E-cadhérine dans des cellules de mélanome est suffisante pour renverser le processus de tumorigénèse, tandis que l'expression de la N-cadhérine par les mélanomes facilite la croissance, l'invasion et la formation de métastases^{3,10}.

Les intégrines sont une famille de molécules responsables de l'adhésion à la matrice extracellulaire. Elles se présentent à la surface sous forme de complexes hétérodimériques composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β ¹². Leurs niveaux d'expression et le type d'hétérodimères présentés à la surface des mélanocytes changent au cours de la progression du mélanome. Les modifications

s'effectuent principalement lors de la transition du stade RGP au stade VGP³. Parmi les intégrines surexprimées dans le mélanome, on compte les hétérodimères $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ ¹⁰. La sous-unité $\beta 3$ constitue à ce jour le marqueur le plus spécifique du stade VGP et ses niveaux d'expression corrélerent avec la capacité invasive des cellules³.

La molécule Mel-CAM1 (MUC18), un membre de la superfamille des immunoglobulines, est surexprimée dès la phase bénigne du mélanome et constitue un bon marqueur des capacités invasives de la tumeur³. Les éphrines et leurs partenaires Eph sont un autre groupe de protéines membranaires surexprimées lors de la progression du mélanome. Elles agissent comme des facteurs de croissance autocrines et semblent promouvoir l'angiogenèse et l'expulsion des cellules cancéreuses du tissu sain, facilitant ainsi la métastase³.

1.1.2.3 Protéases et altération de l'environnement

Les nombreux changements provoqués dans l'expression de molécules d'adhésion facilitent le détachement des cellules tumorales des cellules saines et contribuent à l'invasion. Mais, pour pouvoir se frayer un chemin à travers les tissus sains, les cellules cancéreuses utilisent un autre groupe de protéines, les protéases, qui dégradent la matrice extracellulaire.

Les protéases peuvent causer la dégradation de peptides solubles, de protéines transmembranaires ou encore des composants de la matrice extracellulaire. Elles permettent aussi de libérer certains facteurs solubles de leur ancrage, comme c'est le cas pour le facteur $TNF\alpha$ ³. L'expression de nombreuses protéases est modulée au cours de la progression du mélanome. Les protéases qui sont normalement responsables de l'inactivation de facteurs mitogènes et de la production d'inhibiteurs sont inhibées dans les cellules de mélanome. À l'opposé, l'activité et l'expression des protéases qui induisent l'activation d'agents mitogènes ou l'inactivation d'inhibiteurs sont augmentées³. Par exemple, l'expression des protéases APN, NEP et séparase est augmentée dans de nombreux cas de mélanome puisque leurs actions conjuguées facilitent la progression du cancer. Elles exhortent l'invasion et la progression

métastatique en dégradant la matrice extracellulaire et en diminuant les contacts avec le tissu sain. Elles peuvent aussi soutenir la vascularisation de la tumeur en favorisant l'angiogenèse³.

La transition entre les premiers stades de développement du mélanome se fait de façon nette et est associée à des modifications moléculaires distinctes, que ce soit l'activation de la voie des MAPKs pour l'initiation de la lésion bénigne ou la perte de régulation du cycle cellulaire pour le développement de la lésion dysplasique. Par contre, les altérations moléculaires qui mènent à la métastase surviennent progressivement dès le début de la phase VGP. Elles impliquent différents changements au niveau intracellulaire ou à la surface de la cellule et les interactions avec l'environnement sont très importantes dans le processus de métastase. Les cellules au stade VGP possèdent déjà des capacités propres aux cellules métastatiques, c'est-à-dire, la capacité de croître en agar mou et de développer des tumeurs lors de l'injection chez la souris³. Les facteurs décisifs du moment précis de la métastase sont encore mal connus et nécessitent de ce fait une plus grande investigation du processus métastatique. Il est donc primordial d'orienter nos efforts de recherche vers une meilleure compréhension des mécanismes qui déterminent la progression métastatique du mélanome étant donnée l'importance de cette maladie chez l'humain.

1.2 Cancer

1.2.1 La transformation cellulaire et l'instabilité génétique

Comme il a été décrit pour le cas du mélanome, la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse est un processus qui se déroule en plusieurs étapes et qui résulte d'une série de mutations qui sont transmises au fil des divisions cellulaires. D'une mutation à l'autre, les cellules évoluent progressivement de l'état normal à l'état cancéreux, en passant par différents stades précancéreux jusqu'aux stades invasif et métastatique¹³. Chacune de ces mutations confère un avantage à la cellule en transformation¹⁴. Cependant, la mutation génomique des cellules, et particulièrement sa transmission aux cellules filles, est un phénomène relativement rare. Les cellules sont normalement équipées de mécanismes pour éviter un tel

évènement. La progression du cycle cellulaire comprend plusieurs points de contrôles au cours desquels la cellule s'assure de l'intégrité de son génome et du maintien de l'état d'homéostasie ¹⁴.

Il existe plus de 100 types de cancer différents et de nombreux sous-types. Bien qu'ils possèdent tous les mêmes caractéristiques biologiques générales, chaque cancer présente des mutations différentes et chaque cellule cancéreuse développe de multiples mutations afin d'acquérir son état transformé. Cette instabilité génétique s'acquiert en dérégulant les composants de la machinerie cellulaire responsable du maintien de l'intégrité génomique. Parmi ces composants, le plus important est le suppresseur de tumeur p53 qui induit l'arrêt du cycle cellulaire pour permettre la réparation en cas de dommages à l'ADN. En conséquence, son expression ou sa fonction est perdue dans la vaste majorité des cas de cancers humains ¹⁴.

1.2.2 Caractéristiques typiques des cellules cancéreuses

En 2000, Hanahan et Weingerg ¹⁴ ont catégorisé six phénomènes cellulaires typiques des cellules cancéreuses (Figure 2 partie droite, p. 9). Il s'agit de changements affectant la prolifération et l'homéostasie cellulaire et qui sont partagés par la majorité, si ce n'est l'ensemble, des cellules cancéreuses : l'autosuffisance face aux facteurs de croissance, l'insensibilité aux mécanismes inhibiteurs de la croissance, l'évasion de l'apoptose, un potentiel de réplication illimité, l'angiogenèse accrue et, finalement, l'invasion des tissus voisins et la métastase. Tous ces changements confèrent un avantage répliatif à la cellule cancéreuse et la combinaison de ces six caractéristiques mène au développement d'un cancer agressif. Bien que ces changements physiologiques soient partagés par l'ensemble des cellules cancéreuses, la progression peut varier d'un cancer à l'autre au niveau de l'ordre dans lequel surviennent ces changements (Figure 2 partie gauche, p. 9). Dans certains cas, une seule mutation va permettre l'acquisition de plus d'une caractéristique réduisant ainsi le nombre d'étapes nécessaires pour la transformation cellulaire. Dans d'autres cas, plusieurs mutations sont nécessaires pour l'acquisition d'une seule des caractéristiques, prolongeant ainsi le processus de tumorigenèse.

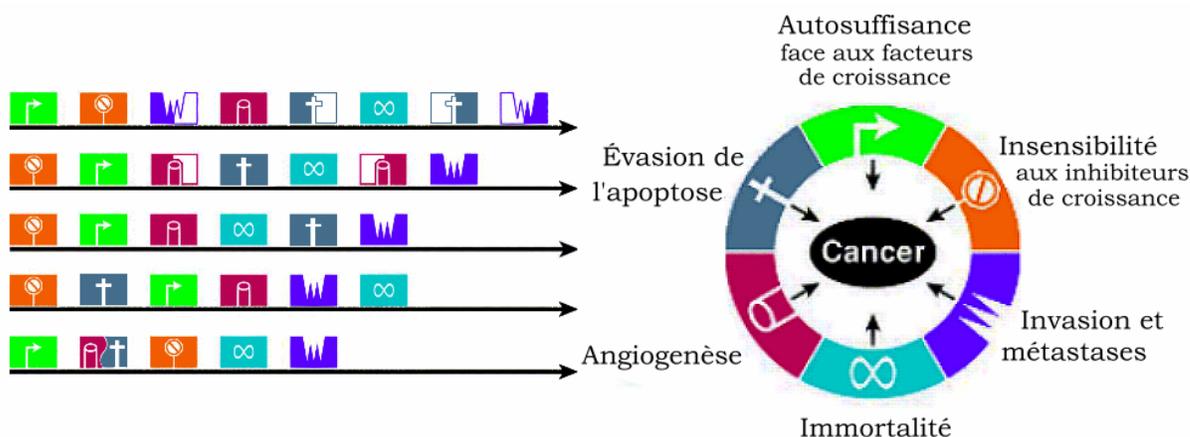


Figure 2. Caractéristiques générales des cellules cancéreuses ¹⁴ © Cell Press, 2000

Les cellules cancéreuses partagent toutes six altérations physiologiques nécessaires pour l'expansion de la tumeur : l'autosuffisance face aux facteurs de croissance, l'insensibilité aux inhibiteurs de croissance, l'évasion de l'apoptose, un potentiel de réplification illimité, l'angiogenèse accrue et l'invasion des tissus voisins et la métastase. Reproduction adaptée de Hanahan et Weinberg [Réf.14] avec la permission de Elsevier (Annexe 2).

1.2.2.1 Autosuffisance face aux facteurs de croissance

Les cellules normales ne peuvent pas proliférer sans l'apport de facteurs de croissance externes. La croissance cellulaire est stimulée par des facteurs solubles, des composants de la matrice extracellulaire ou encore par des contacts entre les cellules. L'une des premières étapes de la tumorigenèse consiste en la perte de cette dépendance aux composants extracellulaires ¹⁴. Les cellules cancéreuses développent généralement la capacité de produire par elles-mêmes les facteurs de croissance dont elles ont besoin, au lieu de dépendre de ceux produits par les autres cellules du tissu ¹⁴. La perte de dépendance face aux facteurs de croissance peut aussi être causée par l'altération des voies de signalisation qui leur sont associées. Cette signalisation est normalement activée par la liaison des facteurs de croissance aux récepteurs présentés à la surface des cellules, principalement des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs). Ces récepteurs sont souvent surexprimés par les cellules cancéreuses, les rendant hypersensibles à de faibles concentrations de facteurs et permettant même l'activation des récepteurs en absence de facteurs de croissance. Les cellules peuvent aussi exprimer des récepteurs rendus constitutivement actifs produits par un clivage protéique inhabituel ou par une mutation génomique ¹⁴. Les cellules cancéreuses

modulent aussi leurs contacts avec la matrice extracellulaire en modifiant la nature des hétérodimères présentés à la membrane plasmique pour favoriser ceux qui stimulent la croissance et la prolifération¹⁴. La signalisation des facteurs de croissance peut aussi être activée dans les cellules cancéreuses au niveau de la transmission intracellulaire. Par exemple, la GTPase Ras, principale voie de signalisation induite en réponse aux facteurs de croissance, est constitutivement activée par mutation dans plus de 25 % des cancers humains. La mutation du gène de Ras favorise la croissance des cellules cancéreuses entre autres en activant la voie de la MAPK ERK pour stimuler la croissance cellulaire et, en parallèle, la voie de la PI3K pour contrôler la survie cellulaire¹⁴.

1.2.2.2 Insensibilité aux inhibiteurs de croissance

Les tissus normaux possèdent des mécanismes qui limitent la croissance cellulaire et contribuent au maintien de l'homéostasie tissulaire.¹⁴ Les cellules cancéreuses contrecarrent l'action de ces inhibiteurs en augmentant l'expression des protéases qui les inactivent et les dégradent par clivage³. Les cellules cancéreuses peuvent aussi altérer la détection des inhibiteurs de croissance en produisant des récepteurs inactifs ou en inhibant leur expression¹⁴. Mais, les principaux mécanismes développés par les cellules cancéreuses pour contrecarrer l'effet des inhibiteurs agissent au niveau de la signalisation intracellulaire que ceux-ci induisent. Les inhibiteurs de croissance sont connus pour prévenir la prolifération, soit de façon temporaire en forçant les cellules à entrer en quiescence (phase G₀ du cycle cellulaire), soit de façon permanente en induisant les stades postmitotiques associés à la différenciation cellulaire. La majorité des voies de signalisation bloquant la prolifération convergent vers la protéine du rétinoblastome (Rb) qui contrôle la transcription des gènes essentiels pour le changement de la phase G1 à la phase S dans le cycle cellulaire¹⁴. L'activité de la protéine Rb est régulée par les kinases dépendantes des cyclines (CDK) qui l'inhibent par phosphorylation. Les inhibiteurs des CDK, dont INK4B, empêchent la phosphorylation de Rb et sont activés en amont par des signaux extracellulaires comme le TGFβ^{5,14}. Les gènes encodant Rb, INK4B ou le récepteur de TGFβ sont souvent mutés ou carrément supprimés dans les

cancers. Les cyclines peuvent aussi être mutées de façon à échapper à l'action des inhibiteurs. L'initiation de la différenciation est contrôlée entre autres par les complexes protéiques Myc-Max, antidifférenciation et proprolifération, et Mad-Max, prodifférenciation et antiprolifération. Les cellules cancéreuses inhibent la différenciation en favorisant le complexe Myc-Max aux dépens du complexe Mad-Max¹⁴.

1.2.2.3 Évasion de l'apoptose

En plus de posséder un pouvoir de prolifération accru, les cellules cancéreuses présentent une plus grande résistance à l'apoptose, leur procurant un avantage de survie nécessaire à l'établissement d'une large population cellulaire¹⁴. La machinerie cellulaire responsable de l'apoptose se compose de détecteurs et d'effecteurs, les premiers activant les seconds. Les détecteurs peuvent être soit localisés à la membrane, tels les récepteurs Fas et TNF α ou les molécules d'adhésions, pour déterminer si les conditions extracellulaires sont favorables ou non à la survie, soit au niveau intracellulaire, comme p53, pour détecter si la cellule se trouve ou non dans un état normal et propice à la survie. Les effecteurs sont principalement localisés au niveau de la mitochondrie et ils incluent les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, le cytochrome C et les caspases. Dans 50 % des cancers humains, les cellules cancéreuses échappent à l'apoptose grâce à l'inactivation de la protéine p53. À l'opposé, dans de nombreux cas de cancer une diminution de l'apoptose est associée à l'activation de la voie de signalisation PI3K-Akt qui favorise la survie cellulaire entre autres par l'activation constitutive de Ras ou l'inhibition de PTEN¹⁴.

1.2.2.4 Immortalité cellulaire

Lorsqu'elles sont mises en culture, les cellules normales possèdent un potentiel de réplication limité¹⁴. Après un certain nombre de divisions, elles entrent en sénescence et cessent de proliférer. L'inhibition des voies de Rb et p53 permet de relancer momentanément la division cellulaire, mais après environ 60 divisions additionnelles, les cellules cessent à nouveau de proliférer et meurent en grand nombre à cause de l'état de chaos dans lequel se trouve le caryotype des cellules. Ce phénomène s'explique par le fait que les chromosomes sont normalement raccourcis

à leurs extrémités à chaque cycle de réplication et finissent par coller ensemble, générant un caryotype chaotique. La majorité des cellules cancéreuses (85 % à 90 %) surexpriment l'enzyme télomérase dont la fonction est d'ajouter des séquences répétitives aux extrémités des chromosomes, contribuant ainsi au maintien de leur intégrité. Les cellules cancéreuses peuvent alternativement activer un autre mécanisme, appelé ALT, qui protège l'extrémité des chromosomes à l'aide de la recombinaison des chromosomes. Ces deux mécanismes contribuent à l'immortalité des cellules cancéreuses ¹⁴.

1.2.2.5 Angiogenèse

L'apport de nutriments et d'oxygène, ainsi que l'évacuation des déchets et toxines par l'intermédiaire de la circulation sanguine sont indispensables pour la survie cellulaire. Afin de pouvoir se développer en larges tumeurs, les cellules cancéreuses doivent donc stimuler la production de nouveaux vaisseaux sanguins ¹⁴. L'angiogenèse, processus par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins sont créés, est inactivée dans les tissus sains ayant atteint la maturité. Les cellules cancéreuses réactivent l'angiogenèse en agissant sur les inhibiteurs et les activateurs aux niveaux génétique et protéique. L'expression des gènes encodant le VEGF ou le FGF, les deux principaux activateurs de l'angiogenèse, est augmentée dans de nombreux cancers, entre autres par l'activation de Ras. À l'opposé, l'expression d'inhibiteurs tels la thrombospondine-1 et l'interféron- β est diminuée, entre autres par l'inactivation de p53. Les cellules cancéreuses affectent aussi la biodisponibilité des facteurs angiogéniques en surexprimant ou inhibant les protéases responsables de leur dégradation ou leur maturation. Par exemple, les protéases qui libèrent le bFGF de son ancrage à la matrice extracellulaire sont souvent activées, tandis que celles qui sont responsables de la dégradation du facteur proangiogénique plasmine sont inhibées ¹⁴.

1.2.2.6 Invasion et métastases

À un moment ou à un autre au cours de leur développement, les cellules cancéreuses envahissent les tissus sains avoisinants et se dispersent à travers l'organisme. L'établissement de nouvelles colonies cancéreuses, processus appelé

métastase, est la plus mortelle des phases du cancer¹. Les processus d'invasion et de métastase impliquent des changements au niveau des interactions des cellules cancéreuses avec leur environnement. De ce fait, l'expression de plusieurs molécules extracellulaires responsables des interactions de type cellule-cellule ou cellule-matrice est altérée au cours de la progression du cancer. Parmi celles-ci, on compte les intégrines qui sont responsables des interactions avec la matrice extracellulaire et les CAMs (*Cell-cell Adhesion Molecules*), dont les membres de la superfamille des immunoglobulines et les membres de la famille des cadhérines, qui sont responsables des interactions cellule-cellule. En plus de servir de contacts physiques entre les cellules, les molécules d'adhésion agissent comme des récepteurs et induisent la transmission de signal intracellulaire. Elles ont donc le pouvoir d'influencer encore plus largement les fonctions biologiques des cellules cancéreuses¹⁴. La molécule d'adhésion la plus touchée durant la progression du cancer est sans doute l'E-cadhérine¹⁴, un membre de la famille des cadhérines qui est exprimée de façon ubiquitaire à la surface des cellules épithéliales¹⁵. En plus d'affecter les contacts entre les cellules épithéliales, la signalisation cellulaire engendrée par les interactions E-cadhérine–E-cadhérine inhibe la prolifération cellulaire en séquestrant la β -caténine à la membrane^{11,14}. L'expression de l'E-cadhérine est inhibée dans la majorité des cancers épithéliaux, dont le mélanome, par mutation, par répression de la transcription ou par protéolyse afin de rétablir la prolifération cellulaire¹⁴. Au cours du processus de métastase, les cellules cancéreuses vont traverser différents tissus et rencontrer différentes matrices extracellulaires. Afin de faciliter leur invasion et leur migration, les cellules métastatiques effectuent des changements au niveau des intégrines présentées à la surface afin de s'adapter au type de matrice extracellulaire rencontré¹⁴. Finalement, les cellules cancéreuses stimulent l'expression et l'activité des protéases qui contribuent à l'invasion en dégradant la matrice extracellulaire pour ouvrir le passage aux cellules invasives. Comme il a été mentionné précédemment, l'activité des protéases joue aussi un rôle dans l'angiogenèse et la croissance cellulaire. De cette façon, elles contribuent directement et indirectement à la progression métastatique¹⁴.

1.2.3 Progression métastatique

La formation de métastase est un processus qui se déroule en plusieurs étapes ¹⁶ (Figure 3, p. 14). Les cellules invasives qui se détachent de la tumeur primaire entrent d'abord dans les vaisseaux sanguins à proximité par intravasation. Elles peuvent aussi atteindre la circulation sanguine indirectement en passant d'abord par la circulation lymphatique. En utilisant la circulation sanguine, elles migrent et vont s'arrêter à un nouveau site où elles quittent la circulation par extravasation. Une fois établies au site secondaire, les cellules cancéreuses prolifèrent pour former une nouvelle tumeur ou restent en dormance pour un temps indéterminé avant de réinitialiser leur prolifération ¹⁶. Plusieurs études ont démontré que la métastase est un processus relativement inefficace. De nombreuses cellules se détachent de la tumeur principale pour entrer dans la circulation, par contre, la formation d'une tumeur secondaire n'est observable que dans relativement peu de cas. En effet, durant le processus de métastase, la cellule doit d'abord survivre assez longtemps dans la circulation sanguine pour atteindre un site d'établissement distant. La cellule doit ensuite

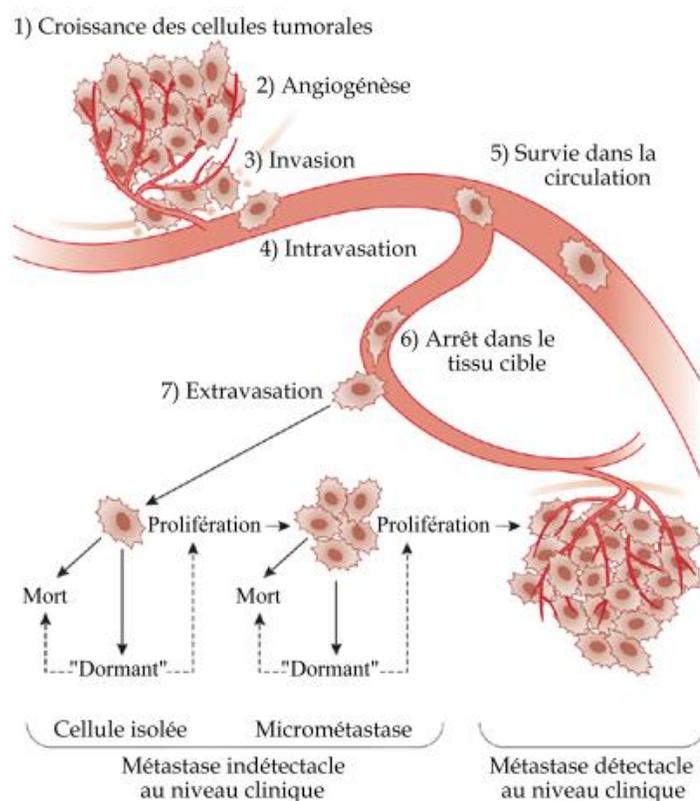


Figure 3 : Progression métastatique ¹⁷ © EMBO, 2006.

La dissémination métastatique se fait en plusieurs étapes. Lorsque la tumeur primaire est suffisamment développée (1) et riche en vaisseaux sanguins (2), certaines cellules invasives (3) peuvent atteindre la circulation (4). Elles migrent alors à travers les vaisseaux sanguins (5) et s'établissent à un site distant (6) pour développer de nouvelles colonies que l'on nomme métastases.

Reproduction traduite de McGee *et al.* [Réf. 17] avec la permission de Mcmillian Publishers (Annexe 2).

survivre et proliférer dans le nouvel environnement que constitue sa niche métastatique. Cette survie est fortement dépendante des interactions de la cellule cancéreuse avec les différents composants cellulaires et matriciels de son nouvel environnement ¹⁶.

Plusieurs mécanismes moléculaires et cellulaires sont impliqués dans la dissémination métastatique. Ils s'articulent tous autour de la réorganisation du cytosquelette et impliquent les interactions intercellulaires et la dégradation de la matrice environnante ¹⁸⁻²⁰. Les lamellipodes sont reconnus pour être la principale structure à diriger le sens de la migration. Ils répondent aux agents chimioattractants présents dans l'environnement et propulsent la membrane cellulaire vers l'avant. Ils sont un site d'intense polymérisation de l'actine impliquant l'activation du complexe Arp2/3 ²⁰. Les complexes d'adhésion focaux (FAs) sont aussi impliqués dans le processus de migration associé à la métastase. Ils sont responsables de l'attachement des cellules à la matrice extracellulaire et doivent donc être rapidement renouvelés par un cycle d'assemblage-désassemblage. Ces points d'adhésion dynamiques sont le site d'ancrage de larges fuseaux de filaments d'actine et impliquent l'activation des tyrosines kinases FAK et Src, ainsi que la formation de larges complexes protéiques par des protéines d'échafaudage et des adaptateurs ^{18, 19}. Finalement, les invadopodes sont des projections membranaires dynamiques propres aux cellules invasives. Il s'agit de structures riches en actine localisées principalement sur la face ventrale des cellules invasives. Ils sont le site d'une intense polymérisation de filaments d'actine parallèles impliquant principalement la GTPase Cdc42. Les kinases FAK et Src et la protéine cortactine sont recrutées et activées dans les invadopodes. Ces structures sont responsables de la dégradation localisée de la matrice extracellulaire grâce aux métalloprotéases membranaires présentes à leur extrémité ^{19, 20}.

1.3 Signalisation cellulaire

Il est connu que les cellules communiquent entre elles et avec leur environnement par l'intermédiaire d'ions, d'hormones, de cytokines, de facteurs de croissance, de protéines liées à la surface cellulaire ou de composantes de la matrice extracellulaire (ECM). Lorsque ces signaux extracellulaires se lient à leurs récepteurs à la surface

cellulaire, ces derniers sont activés et transmettent le signal vers l'intérieur de la cellule. Les cascades de signalisation intracellulaire ainsi activées induisent une ou plusieurs réponses cellulaires propres à chaque stimulus²¹. Elles sont entre autres responsables de l'initiation ou l'arrêt du cycle cellulaire, de changements dans l'expression des gènes, de l'organisation du cytosquelette, du trafic des protéines, de l'adhésion et la migration ou du métabolisme²². Ce processus de transmission du signal est indispensable pour le maintien de l'homéostasie cellulaire et son adaptation aux conditions du milieu, ce qui explique que de multiples voies de signalisation soient altérées dans les cellules cancéreuses.

Les nombreuses voies de signalisation d'une cellule communiquent entre elles et créent ainsi un vaste réseau de communication intracellulaire²³. Cette interconnexion des différentes voies de signalisation démontre que la transmission de signal est un processus fort complexe qui doit être soumis à une très fine régulation. La formation d'interactions protéine-protéine dynamiques et versatiles, qui sont réalisées par l'intermédiaire de différents domaines modulaires, constitue le principe de base par lequel la transmission de signal est aiguillée vers les voies de signalisation appropriées²². Bien qu'elles nécessitent une forte affinité entre les deux partenaires²⁴, ces interactions ne dépendent souvent que de quelques résidus dans chacune des protéines impliquées et la spécificité de l'interaction est déterminée par le contexte protéique et cellulaire. Elles peuvent être constitutives, mais peuvent aussi être régulées par des modifications post-traductionnelles ou des changements de conformation²⁴.

Il existe de nombreux types de domaine qui sont responsables de l'interaction entre les protéines. Parmi eux, les domaines d'homologie de Src de type 2 (SH2) et de type 3 (SH3) sont de loin les plus étudiés à cause de leur rôle primordial dans la signalisation des récepteurs avec activité tyrosine kinase (RTKs).

Les domaines SH2, composés d'environ 100 a.a., reconnaissent les résidus tyrosines phosphorylés (pTyr) présents dans les protéines avec lesquelles ils interagissent²¹. Les protéines qui contiennent un domaine SH2, par leur rôle dans la signalisation des RTKs, contribuent au métabolisme des lipides, à l'activation des

GTPases de la famille de Ras, à l'expression génique, au trafic des protéines, ainsi qu'à l'organisation du cytosquelette²². La liaison entre un domaine SH2 et son partenaire d'interaction est un processus dynamique puisqu'elle dépend de la phosphorylation d'un résidu tyrosine²⁴. La stabilité et la spécificité de l'interaction SH2-peptide sont déterminées principalement par les résidus situés aux positions +1 et +3 en C-terminal du résidu pTyr²⁵, mais les résidus situés en position +4 et +5 peuvent aussi être importants pour l'interaction²⁶. Au niveau de la séquence du SH2, le 5^e résidu de la quatrième structure β du domaine (résidu β D5) a été identifié comme étant le plus important pour déterminer la spécificité de la liaison, bien que d'autres résidus soient aussi importants²⁵.

Les domaines SH3, composés d'environ 50 a.a., lient les régions peptidiques riches en résidus prolines avec un motif consensus minimal PXXP (P = résidu proline, X = résidus quelconques)^{24,27,28}. Les domaines SH3 sont principalement impliqués dans l'organisation du cytosquelette d'actine par la formation de larges complexes enzymatiques en aval de la signalisation des protéines avec activité tyrosine kinases^{22,28}. L'interaction des SH3 avec leurs partenaires est généralement constitutive²⁷, mais elle peut être régulée par un changement de conformation, la compétition avec d'autres partenaires ou la localisation cellulaire²². Les domaines SH3 reconnaissent des séquences d'environ 10 a.a. où les résidus non prolines déterminent la spécificité de l'interaction²². L'orientation du peptide par rapport au SH3 est déterminée par la présence d'acides aminés basiques dans la séquence de liaison. Si le peptide ligand contient un résidu basique en N-terminal du motif PXXP, il s'agit d'un ligand de classe I et il adoptera une orientation amino-carboxyle par rapport au domaine SH3 et inversement pour un ligand de classe II. Ces deux possibilités augmentent le nombre de partenaires potentiels en plus de permettre une régulation de la signalisation selon l'orientation relative des différentes parties du complexe obtenu^{22,24,28}.

Les domaines SH2 et SH3 se retrouvent dans des protéines présentant une activité enzymatique, telles Src, PLC γ et RasGAP, ou dans des protéines dépourvues d'une telle activité que l'on appelle protéines adaptatrices. Ces dernières sont

représentées par les protéines Grb2, Shc, Nck, Crk et p85, la sous-unité régulatrice de la PI3K^{21,22,29,30}. Leur fonction générale est de faire le lien entre les récepteurs membranaires et leurs effecteurs intracellulaire et ils servent ainsi à aiguiller la transmission du signal permettant la réponse cellulaire^{28,31}. Ils permettent aussi la détection de coïncidences, c'est-à-dire, qu'ils rendent possible l'intégration de différents signaux lorsque deux, ou plusieurs, stimuli sont nécessaires pour induire une réponse cellulaire, augmentant ainsi la spécificité de la réponse. Finalement, ils régulent la réponse cellulaire en influençant aussi la localisation cellulaire des complexes ou la durée de la réponse³¹.

1.4 L'adaptateur protéique Nck

1.4.1 *Nck : Gènes et protéines*

Nck est un adaptateur protéique de 47 kDa qui se compose essentiellement de trois domaines SH3 et d'un domaine SH2³². Le rôle le plus connu pour Nck est de diriger la signalisation intracellulaire initiée par l'activation des RTKs vers l'organisation du cytosquelette d'actine²⁹ (Figure 4, p. 19). Nck est une protéine principalement cytosolique³², mais il peut aussi se trouver dans différents compartiments cellulaires. Lorsque la cellule est stimulée par un signal extracellulaire, Nck est transloqué à la membrane plasmique pour induire la signalisation à partir des récepteurs²⁸. Nck est aussi associé au réticulum endoplasmique (RE) où il interagit avec des protéines transmembranaires qui agissent comme des récepteurs en transmettant l'information provenant du RE au reste de la cellule³³. Dans certains cas, Nck peut aussi être localisé au noyau, mais son rôle dans cette organelle est encore mal défini^{34,35}. Un ADN encodant Nck fut découvert pour la première fois en 1990 en tant que faux positif lors du criblage d'une librairie d'expression d'ADNc de mélanome humain³². Un homologue murin, *grb4*, a ensuite été détecté à l'aide d'une librairie d'expression d'ADNc embryonnaire de souris en 1992³⁶. Une étude subséquente a révélé que ces ADNc provenaient en fait de deux gènes différents qui encodent les protéines Nck1 et Nck2 respectivement³⁷. Le gène *Nck1* humain est situé sur le chromosome 3q21^{38,39} et celui de *Nck2* sur le 2q12³⁷. Il

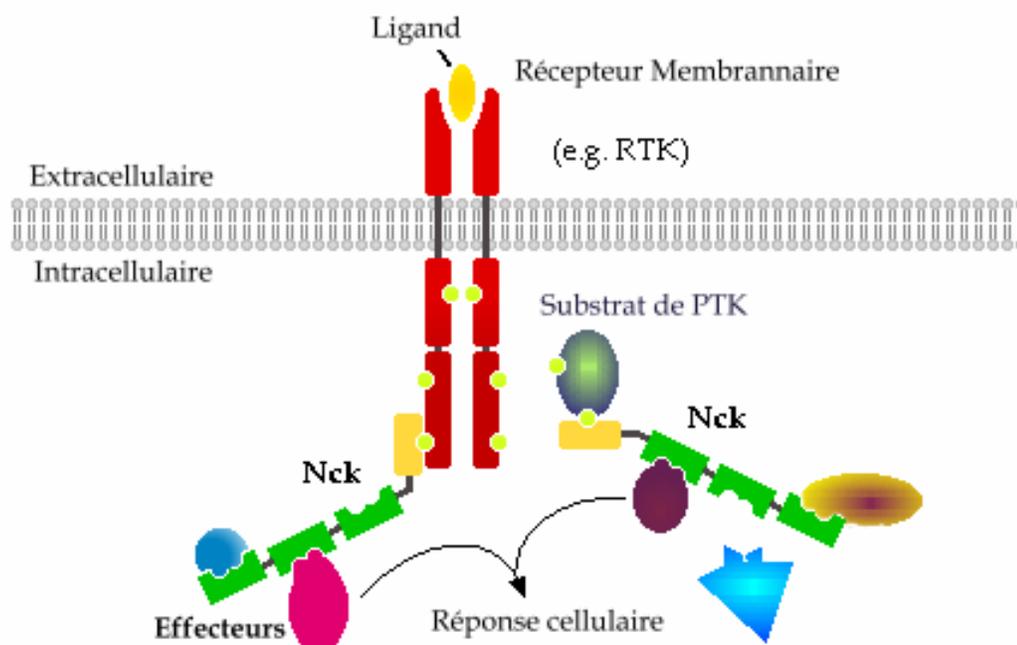


Figure 4 : Fonctions de l'adaptateur Nck © Mélissa Labelle-Côté, 2009

L'adaptateur Nck sert de pont entre les récepteurs tyrosines kinases (RTKs), ou autres protéines phosphorylées en tyrosines, et de nombreux effecteurs. Il permet ainsi d'aiguiller la signalisation cellulaire vers les voies qui induisent la réponse cellulaire appropriée.

n'existe qu'un seul homologue chez les invertébrés; le gène *nck* de *Xenopus* présente une plus grande homologie avec *Nck1*, tandis que l'analyse de l'homologie des gènes *dock* de la drosophile et *nck* de *C. elegans* ne permet pas leur appariement avec l'un ou l'autre des deux gènes humains en particulier^{27, 37, 40}. *Nck1* et *Nck2*, tant chez l'homme que chez la souris, présentent 68 % d'identité dans leur séquence globale d'acides aminés. La plus grande variation entre les deux protéines se situe dans les régions entre les domaines SH, comparativement à leurs domaines fonctionnels (SH2 et SH3) qui présentent jusqu'à 85 % d'identité^{37, 40} (Figure 6a, p. 22). Les régions non-codantes situées en 5' (5'-UTR) des gènes *Nck1* et *Nck2* présentent une homologie significative, suggérant que les deux gènes auraient une origine commune⁴⁰. Pour la suite de ce texte, le terme Nck représente soit l'ensemble des deux homologues, soit l'un ou l'autre de manière indistincte.

L'inactivation des deux gènes *Nck* est létale au stade embryonnaire, ce qui suggère que ces protéines jouent un rôle primordial au cours du développement. Les souris dont un seul des deux *Nck* a été inactivé sont viables, préconisant une certaine

redondance entre les deux protéines⁴¹. En effet, Nck1 et Nck2 partagent de nombreux partenaires d'interactions et semblent exercer des rôles similaires dans de nombreux processus^{27,29,40}. Cependant, le fait que les deux protéines soient exprimées simultanément dans les mêmes cellules suggère que Nck1 et Nck2 peuvent aussi être fonctionnellement différents³⁷. Certains rôles et partenaires spécifiques ont déjà été rapportés pour Nck1 et Nck2. Entre autres, Chen et ses collègues⁴² ont démontré que Nck2 présente une plus grande affinité que Nck1 pour le PDGFR et l'EGFR et que seule la surexpression de Nck2 induit une inhibition de la synthèse d'ADN en réponse au PDGF et au EGF. Ces observations, combinées au fait que le profil d'expression selon les organes diffère entre les deux protéines^{37,40,43} (Figure 5, p. 20), laissent croire qu'elles soient fonctionnellement différentes malgré leur très grande similitude architecturale.

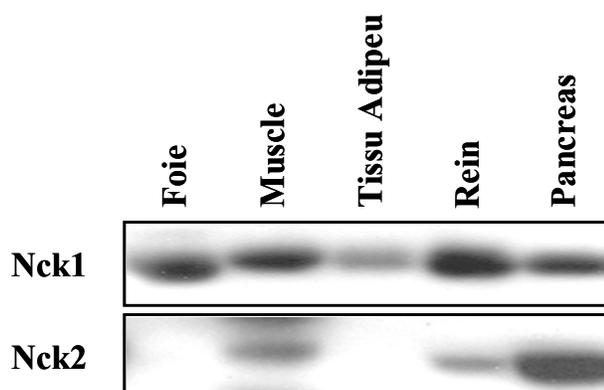


Figure 5 : Niveaux d'expression de Nck1 et Nck2 dans différents tissus murins⁴³

© Latreille, M. et Larose, L. 2007

Les lysats de différents tissus de souris ont été analysés par immunobuvardage à l'aide d'anticorps spécifiques pour Nck1 et Nck2.

1.4.2 Interactions protéiques de Nck

La figure 6b (p. 22) dresse une liste non exhaustive des principaux partenaires protéiques interagissant avec les différents domaines de Nck. Plus de 30 protéines lient les domaines SH3 de Nck et près de 15 lient le domaine SH2 ont été identifiées jusqu'à présent²⁹. Nck possède de nombreux autres partenaires pour lesquels le site spécifique d'interaction n'a pas été identifié et l'importance biologique de plusieurs de ces interactions n'a toujours pas été confirmée.

Les protéines se liant au domaine SH2 de Nck sont des protéines phosphorylées en tyrosine, tels les récepteurs tyrosines kinases⁴⁴⁻⁴⁶, ou les substrats de ces enzymes^{47,48}. Nck joue donc un rôle important dans la signalisation cellulaire²⁹. Il a été démontré à l'aide d'une librairie de peptides que le domaine SH2 de Nck reconnaît préférentiellement le motif pYDEP²⁵. Par contre, ce motif est peu représenté parmi les partenaires connus de Nck. L'analyse des séquences peptiques reconnues pour se lier au domaine SH2 de Nck fait plutôt ressortir la séquence consensus pY-résidu acide-résidu acide-P²⁸.

Les trois domaines SH3 de Nck lient, quant à eux, une vaste gamme de protéines. Il peut s'agir de kinases phosphorylant des résidus sérines/thréonines⁴⁹⁻⁵² ou des résidus tyrosines⁵³ ou encore de protéines régulatrices des GTPases^{54,55}, de phosphatases^{56,57} ou d'autres adaptateurs protéiques^{58,59}. L'adaptateur Nck est unique par le fait qu'il possède trois domaines SH3 consécutifs qui ne sont pas redondants^{28,50}. Leur multiplicité permet donc à Nck de lier différentes protéines simultanément et lui confère une grande polyvalence. Les domaines SH3 de Nck lui permettent aussi d'augmenter l'affinité de liaison lorsque plus d'un domaine SH3 lie la même protéine^{28,60,61}. Dans certains cas, la présence des différents domaines SH3 de Nck est absolument requise pour stabiliser l'interaction^{61,62}. Les trois domaines SH3 de Nck reconnaissent les motifs PXXP de classe II (résidus basiques en C-terminal)²⁸. Plus particulièrement, le second domaine SH3 de Nck semble lier préférentiellement le motif PXXPRXXS⁵⁷. Nck peut aussi interagir avec ses partenaires par des interactions non canoniques. Par exemple, l'interaction du troisième domaine SH3 de Nck2 avec la protéine PINCH n'implique pas un motif riche en proline, mais plutôt une séquence riche en cystéines et elle ne nécessite pas que le domaine SH3 de Nck soit fonctionnel⁶³.

Bien que Nck1 et Nck2 partagent la majorité de leurs partenaires d'interactions, chacune des deux protéines possède ses propres spécificités d'interactions. Par exemple, Nck1 se lie au PDGFR par une interaction entre son domaine SH2 et le résidu pY751, tandis que le domaine SH2 de Nck2 reconnaît le résidu pY1009^{42,45}.

Les protéines DOCK1 et PINCH ont été reconnues pour se lier uniquement à Nck2, mais pas à Nck1^{55,63}. Cette divergence dans la spécificité d'interaction des deux Nck s'explique par le fait que les séquences peptidiques des domaines SH responsables de la spécificité d'interaction varient entre les deux protéines, bien que dans l'ensemble leur domaine SH présente une grande identité. Ces substitutions d'acides aminés entre Nck1 et Nck2 sont conservées chez l'humain et chez la souris³⁷.

1.4.3 Fonctions biologiques de Nck

La majorité des processus cellulaires auxquels Nck est associé impliquent la réorganisation du cytosquelette d'actine. Nck influence aussi la prolifération cellulaire, la transcription ou la réponse des cellules aux conditions de stress.

1.4.3.1 Nck et la polymérisation d'actine

De façon générale, Nck participe à l'organisation du cytosquelette au niveau de la nucléation des molécules d'actine en favorisant la formation de complexes qui régissent le branchement, la polymérisation et l'élongation de filaments d'actine. En effet, Nck lie et recrute à la membrane différentes protéines connues pour jouer un rôle important dans l'organisation de l'actine, telles N-WASP⁶⁴, WIP⁶⁵ et Nap1⁶⁶⁻⁶⁸. Les protéines de la famille de WASP (WASP, N-WASP et WAVE1, 2 et 3) régulent la polymérisation d'actine en liant le troisième monomère d'actine nécessaire à la nucléation d'un nouveau filament et en stimulant, par un changement de conformation, l'activité d'Arp2/3⁶⁹. Arp2/3 est un complexe multiprotéique responsable de la nucléation de nouveaux embranchements de filaments d'actine en liant deux monomères d'actine à un filament d'actine préexistant⁶⁹⁻⁷¹. Les protéines WIP et Nap1, auxquelles Nck2 s'associe, lient et contribuent à l'activation des protéines WASPs et WAVEs respectivement^{65,66,69,70}. Nck interagit aussi avec la protéine cortactine⁷² qui, seule ou en synergie avec WASP, induit la nucléation de l'actine et stabilise les filaments en se liant directement à Arp2/3 et à l'actine⁷³.

Nck contribue aussi à la dynamique du cytosquelette d'actine en favorisant l'activation des petites GTPases de la famille de Rho (Rac1, Cdc42, RhoA) qui imposent une régulation spatiale très stricte favorisant la polymérisation d'actine à

des sites bien spécifiques. Les Rho GTPases régulent les différentes étapes de la polymérisation d'actine et agissent entre autres lors de la nucléation et l'élongation des filaments d'actine en modulant l'activité de WASP/WAVE et Arp2/3^{70,71}. Nck agit en amont des GTPases en liant différentes GEFs (*Guanine Exchange Factors*), qui favorisent l'activation des GTPases, pour les recruter à la membrane plasmique. Par exemple, Nck2 interagit spécifiquement avec DOCK1, une GEFs pour Rac qui joue un rôle dans les processus de polarité cellulaire, de motilité et de phagocytose^{55,74}. En aval de GTPases, Nck lie la kinase Pak, un important effecteur de Rac et Cdc42 aussi impliqué dans la régulation du cytosquelette d'actine^{49,60}. Nck aussi est responsable de la relocalisation à la membrane plasmique du complexe Pak/Pix qui régule la polymérisation d'actine. Finalement, Nck interagit directement avec une GTPase d'une autre famille, la GTPase dynamine, qui est impliquée dans la formation de vésicules enrobées de clathrine⁷⁵.

Le rôle crucial de Nck dans la polymérisation d'actine a été confirmé par la découverte que plusieurs pathogènes utilisent Nck, et sa capacité à interagir avec des protéines qui régissent l'organisation du cytosquelette d'actine, pour s'introduire dans la cellule hôte. Par exemple, la protéine A36R produite par le virus Vaccinia lie directement Nck par une interaction pTyr-SH2⁷⁶. Ce type d'évènement permet aux pathogènes d'utiliser la machinerie de polymérisation d'actine de l'hôte, via Nck, pour faciliter l'infection et leur propagation^{76,77}.

1.4.3.2 Nck et la morphologie, la motilité et l'adhésion

Par ses interactions avec différentes protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine, Nck est au cœur des processus de phagocytose, de migration, de polarité et d'adhésion cellulaire. Différentes études ont permis de démontrer l'importance de Nck dans ces processus cellulaires. D'abord, Rivera et ses collègues⁷⁸ ont révélé que l'agrégation d'une protéine de fusion contenant les trois domaines SH3 de Nck ancrés à la membrane plasmique est suffisante pour induire la réorganisation du cytosquelette et la polymérisation d'actine spécifiquement aux sites d'agrégation de Nck. Plus récemment, Ruusala et ses collègues⁷⁹ ont montré que la suppression des deux Ncks dans des fibroblastes embryonnaires murins entraîne une diminution

des ondulations membranaires dites « rufflings », de la chimiotaxie et la migration, ainsi que de l'attachement des cellules au substrat et la formation de complexes d'adhésion focaux (FAs).

La migration cellulaire est un processus qui se déroule en quatre grandes étapes : 1) la formation de larges protubérances membranaires, appelées lamellipodes, qui dirigent la migration, 2) l'attachement de ces structures d'actine au substrat par l'intermédiaire de complexes d'adhésion focaux et des intégrines, 3) le déplacement du corps cellulaire vers l'avant à l'aide des forces contractiles du cytosquelette et 4) la dissociation des complexes d'adhésion à l'arrière de la cellule⁶⁹. Nck est impliqué dans la formation des lamellipodes par l'activation de la voie de signalisation Rac-WAVE-Arp2/3⁷⁰. Nck régule aussi la formation et la dissociation des complexes d'adhésion focaux en réponse à la signalisation des intégrines. Nck se lie à PINCH, une protéine associée aux intégrines.⁶³ Cette liaison est de faible affinité (K_D : 3×10^{-3} M) et pourrait donc permettre un cycle de dissociation-formation des FAs très rapide⁸⁰. En plus, Nck2 se lie spécifiquement à FAK (*Focal Adhesion Kinase*), une kinase qui, de concert avec Src, est impliquée dans les complexes d'adhésion focaux^{47, 81}. Finalement, il a été démontré à l'aide d'un dominant négatif que Nck, par l'intermédiaire de Pak, est impliqué dans la dissociation des FAs en réponse au facteur de croissance VEGF⁸².

Nck est aussi impliqué dans la formation des filopodes, de longues et fines protubérances membranaires impliquées dans la détection des signaux extracellulaires, puisqu'il interagit avec WASP et peut ainsi réguler l'action de Cdc42^{67, 70}. Antoku et ses collègues⁸³ ont d'ailleurs démontré que l'activation de Nck par la kinase cytosolique Abl est importante pour basculer de la formation de lamellipodes à la formation de filopodes.

1.4.3.3 Nck et le guidage des axones

Le cône de croissance d'un neurone est situé à l'apex d'un axone en formation. Cette structure cellulaire présente de nombreux filopodes et est spécialisée dans la détection des signaux extracellulaires qui dictent le guidage des axones vers le site où

ils doivent faire synapse. Nck a été associé pour la première fois au guidage axonal lors de la découverte de son homologue chez la drosophile, le gène *dock*⁸⁴. La protéine Dock est fortement exprimée au niveau du cône de croissance des cellules R (ensemble de photorécepteurs de l'œil de la Drosophile) et son expression est importante pour le guidage axonal et la connexion des axones à leurs cibles. Dock est impliqué dans le guidage axonal au niveau des récepteurs neuronaux, puisqu'il se lie au récepteur Dscam et à la protéine transmembranaire Kette dont la signalisation induit la réorganisation du cytosquelette nécessaire au guidage axonal^{85,86}. Au niveau intracellulaire, le mode d'action de Dock varie selon le type de neurone. Dans les neurones ganglionnaires, le second domaine SH3 et le domaine SH2 doivent être fonctionnels pour transmettre le signal, tandis que dans les cellules R, le second SH3 agit en combinaison avec soit le domaine SH2, soit les deux autres domaines SH3⁸⁷.

Chez les mammifères, Nck fait partie de différentes voies de signalisation associées au guidage axonal. Nck1 s'associe directement au domaine cytoplasmique de DCC par l'intermédiaire de son premier et son troisième domaine SH3 et permet ainsi la transmission du signal induite par la liaison de la Nétrine-1 à ce récepteur pour réguler la migration des neurones⁸⁸. Nck participe aussi à la rétraction du cône de croissance induite par les éphrines puisque le domaine SH2 de Nck2 se lie aux éphrines et son second domaine SH3 se lie aux effecteurs Pak et DOCK1¹⁴². Finalement, Fawcett et ses collègues⁸⁹ ont démontré que Nck1 et Nck2 sont impliqués dans l'organisation des circuits neuronaux important pour la locomotion des souris et qu'ils agiraient en aval du récepteur EhpA4.

1.4.3.4 Nck et la filtration glomérulaire

La fonction de filtration des glomérules rénaux nécessite une stricte régulation de la morphologie et des interactions intercellulaires au niveau des podocytes qui tapissent les capillaires glomérulaires. Ces interactions intercellulaires et l'intégrité de la fente de filtration sont maintenues par les récepteurs membranaires de la famille des néphrines⁹⁰. L'adaptateur Nck se lie aux néphrines et participe à la réorganisation de cytosquelette d'actine induite par ces récepteurs. Il joue ainsi un rôle essentiel pour la morphologie et les interactions intracellulaires des podocytes⁹¹. Les interactions

des domaines SH2 de plusieurs protéines Nck avec les trois séquences pYDXV des néphrines, ainsi que l'interaction de diverses protéines avec les trois domaines SH3 de Nck permettent de générer une haute concentration d'effecteurs à la membrane pour y induire une intense polymérisation d'actine ⁹².

1.4.3.5 Signalisation du récepteur des cellules T

La réponse cellulaire induite par la reconnaissance d'un peptide immunogène par le récepteur des lymphocytes T (TCR) nécessite un contact étroit et stable entre la cellule présentant l'antigène et la cellule T. La signalisation du TCR implique donc une réorganisation du cytosquelette d'actine qui mène à la formation d'une synapse immunologique (SI). La cascade signalétique activée par la liaison du TCR à son ligand mène à la relocalisation de la protéine SLP76 qui recrute à son tour la GEF Vav dans le complexe immunologique pour activer les GTPases Rac1 et Cdc42 à la membrane. La polymérisation d'actine par Arp2/3 et les protéines de la famille de WASP est alors activée ⁹³. Nck sert de pont entre la signalisation proximale du TCR et la machinerie de la polymérisation ⁹³. D'un côté, Nck se lie à la protéine d'échafaudage SLP76 par son domaine SH2 ⁹⁴ ou directement à la sous-unité CD3 ϵ du TCR par l'intermédiaire de son premier domaine SH3 ⁹⁵. De l'autre, ses domaines SH3 recrutent Arp2/3 et les effecteurs WASP et WIP à proximité de leurs activateurs Vav, Rac et Cdc42 ⁹³. Il est à noter que l'interaction CD3 ϵ -Nck dépend du changement de conformation de la sous-unité CD3 ϵ ⁹⁵. Cependant, l'implication biologique de cette interaction est encore contestée puisque plusieurs études contredisent l'existence d'une telle voie de signalisation ^{93,96}. Par son interaction avec Pak, Nck est aussi impliqué dans d'autres voies de signalisation qui sont importantes pour l'activation des cellules T ⁹³. Nck participe au recrutement et à l'activation de Pak à la synapse immunologique en faisant le pont entre le complexe SLP-76/Vav et l'effecteur Pak. Ce dernier se trouve alors à proximité des Rho GTPases Rac1 et Cdc42 qui facilitent son activation et de la GEF Vav qui active ces GTPases ^{93,94}. Nck, en liant Git, pourrait aussi être impliqué dans le recrutement de Pak par l'intermédiaire du complexe Pak/Pix/Git, indépendant de SLP-76 et Vav ⁹³. L'activation de Pak à synapse immunologique contribue à l'activation de la MAPK

ERK et du facteur de transcription NFAT ou à la modulation du flux calcique induits par l'activation du TCR^{93,94}. Finalement, Nck serait aussi impliqué dans le transport de la protéine transmembranaire FasL, un membre de la famille du TNF pouvant causer la mort cellulaire (Death Factor), à la synapse immunologique suite à l'activation du TCR⁹⁷. Le rôle de Nck dans ce processus résulterait de sa liaison au domaine cytosolique de FasL⁹⁷ et possiblement de son interaction avec le complexe Cdc42/WASP impliqué dans le transport vésiculaire^{61,71}.

1.4.3.6 Nck et la prolifération cellulaire

Nck est impliqué dans la transmission du signal en réponse à de nombreux facteurs de croissance, notamment le PDGF et l'EGF^{21,28,29,42}. Il ne serait donc pas surprenant de découvrir que Nck joue un rôle important dans la régulation de la prolifération et la survie cellulaire. En ce sens, il a été démontré que la surexpression de Nck est suffisante pour induire l'activation d'un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur du gène *c-fos*⁵⁴. Cet effet de Nck s'explique par l'activation de la GTPases Ras résultant de l'interaction de Nck avec Sos, une GEF pour Ras⁵⁴. De plus, Nck est connu pour jouer un rôle dans l'activation d'ERK1 en réponse au FGF⁹⁸. Finalement, la kinase Pak, lorsqu'elle est régulée par Cdc42, est impliquée dans l'activation de deux autres voies de MAPK, soit JNK et p38⁹⁹. Donc, en interagissant avec Pak, Nck pourrait aussi être impliqué dans le contrôle de la prolifération et la survie cellulaire, via JNK et p38^{21,60}. Malgré toutes ces études, l'implication de Nck dans la prolifération cellulaire initiée par l'activation des MAPKs n'a pas encore été directement démontrée²⁹.

1.4.3.7 Nck et la synthèse protéiques

Il a été démontré que Nck joue un rôle dans le processus de traduction de l'ARNm en protéines par l'interaction directe entre la sous-unité β du facteur eucaryotique d'initiation de la traduction 2 (eIF2 β) et deux de ses domaines SH3¹⁰⁰. En effet, la surexpression de Nck1 induit une augmentation de la traduction *in vitro* dans des cellules HEK293, ainsi que dans un système acellulaire utilisant les réticulocytes de lapin¹⁰⁰. La phosphorylation en Ser51 de la sous-unité α d'eIF2 (eIF2 α) entraîne son inactivation et inhibe la traduction. Nck promeut l'activité

d'eIF2 en prévenant sa phosphorylation par trois des quatre kinases phosphorylant eIF2 α ¹⁰¹. De plus, en assemblant un complexe protéique qui contient eIF2 et la phosphatase PP1c, Nck favorise l'activité d'eIF2 en maintenant eIF2 α faiblement phosphorylée^{56, 100}.

1.4.3.8 Nck et la réponse des cellules au stress

Le réticulum endoplasmique (RE) est le site de synthèse de protéines membranaires, des protéines sécrétées et des protéines destinées au RE, au Golgi, aux endosomes et aux lysosomes¹⁰². Lorsque le nombre de protéines en production dépasse la capacité du RE ou que l'un des mécanismes impliqués dans le repliement des protéines est défectueux, il y a une accumulation de protéines mal conformées dans l'espace luminal du RE qui crée un stress au niveau du RE. Il s'en suit une réponse cellulaire bien définie, l'UPR (*Unfolded Protein Response*), qui constitue un mécanisme permettant d'améliorer la capacité du RE à gérer les protéines en production ou ultimement, d'induire l'apoptose si la condition de stress perdure. Il a été démontré que Nck lie et module l'activité de PERK et d'IRE1 α , deux protéines impliquées dans l'UPR^{33, 56, 103}. Nck joue donc un rôle dans la réponse au stress du RE et la surexpression de Nck1 diminue la réponse UPR et la survie cellulaire en réponse au stress du RE^{56, 103}.

Les protéines HRI et PKR sont aussi des kinases d'eIF2 α comme PERK, mais elles répondent chacune à des conditions de stress bien distinctes¹⁰⁴. Nck module aussi la phosphorylation d'eIF2 α par ces kinases et se trouve ainsi impliqué dans la réponse à différents types de stress cellulaire. Lors de l'activation de PKR par une chaîne synthétique d'ARN double brin, reproduisant un stress viral, Nck lie et limite l'activation de PKR¹⁰⁵. Selon des études préliminaires effectuées dans notre laboratoire, Nck participerait à un mécanisme de garde contre l'activation spontanée de PKR, limitant ainsi son effet inhibiteur sur la synthèse protéique en absence de stress.

Nck est aussi impliqué dans une autre forme de stress, le dommage à l'ADN. Suite à l'exposition aux rayons UV, la protéine SOCS7 est transloquée au noyau afin

de protéger la cellule contre les dommages à l'ADN causés par les UV³⁴. Puisque Nck se lie à SOCS7 par son second domaine SH3, Nck est aussi recruté au noyau cellulaire en cas de dommages à l'ADN. Cette translocation cause une diminution importante de la concentration cytosolique de Nck et induit de ce fait une réorganisation du cytosquelette d'actine puisque Nck n'y est plus associé. Par ce mécanisme, les dommages à l'ADN affectent indirectement le cytosquelette d'actine en modulant les niveaux de Nck dans les différents compartiments cellulaires³⁴.

1.5 Nck dans le mélanome et autres cancers.

De nombreuses études ont démontré que Nck possède un potentiel oncogénique^{44, 106, 107}. La surexpression de Nck1 dans des fibroblastes murins (NIH3T3) est suffisante pour induire la transformation cellulaire, comme en témoignent la formation de foyer oncogéniques dans les cultures cellulaires⁴⁴ et la formation de colonies dans des cultures en agar mou^{106, 107} (Figure 7, p. 30). De plus, des cellules surexprimant Nck1 (3Y1) sont capables de former des tumeurs chez des souris immunodéficientes (Nude BALB/c)¹⁰⁶. Nck n'est pas considéré comme un oncogène fort puisqu'il est difficile de reproduire les résultats de transformation cellulaire suite à sa surexpression. Nck1 et Nck2 peuvent toutefois potentialiser la transformation cellulaire induite par des oncogènes forts, tels Ras et Abl⁴⁰. Les mécanismes impliqués dans ce processus n'ont pas encore été identifiés.

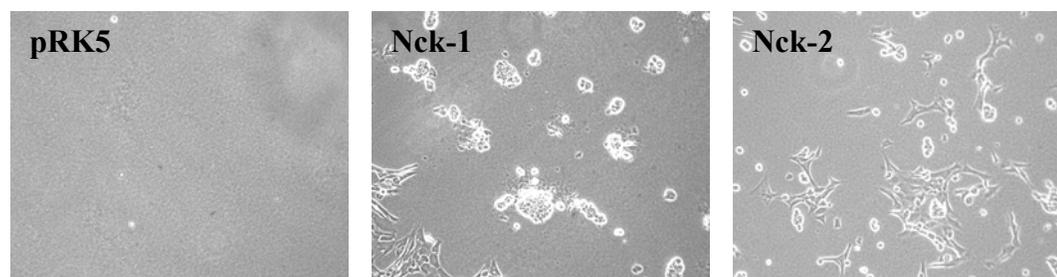


Figure 7 : La surexpression de Nck1 ou Nck2 induit la transformation cellulaire¹⁰⁷
© Louise Larose, 2000.

Des fibroblastes Rat1 ont été transfectés de façon transitoire avec le vecteur PRK5 vide ou exprimant Nck1 ou Nck2. Les cellules ont été mises en culture en agar mou, 48 h après la transfection, pour 16 jours. Image en contraste de phase, magnitude : 10X.

L'implication de Nck dans le processus de transformation cellulaire est cohérente avec son rôle dans le développement embryonnaire tel que démontré par l'étude des souris double KO. Elle est aussi cohérente avec son rôle dans la réorganisation du cytosquelette d'actine impliquée dans la migration cellulaire. L'adaptateur Nck joue aussi un rôle dans la formation des invadopodes et des complexes d'adhésions focaux, en plus d'être impliqué dans les contacts intercellulaires par l'intermédiaire de la cortactine^{47, 72, 108, 109}.

Comme mentionné précédemment, Nck fut découvert lors du criblage d'une librairie d'expression d'ADNc de mélanome humain avec un anticorps dirigé contre MUC18, une protéine sans aucun lien avec Nck³². Le fait que Nck ait été repêché à plusieurs reprises comme faux positifs lors de ce criblage suggère que les cellules de mélanome humain présentent de hauts niveaux d'ARNm codant pour Nck. Cette hypothèse fut confirmée quelques années plus tard par une analyse de micropuces d'ADN¹¹⁰. Cette étude de Wit *et al.* a démontré que les cellules métastatiques de mélanomes humains présentent de plus hauts niveaux d'ARNm encodant Nck2 que les cellules de lésions bénignes. L'augmentation des niveaux d'expression des protéines Nck au cours de la progression métastatique de différents cancers a aussi été observée dans notre laboratoire¹¹¹ (Figure 8, p. 32).

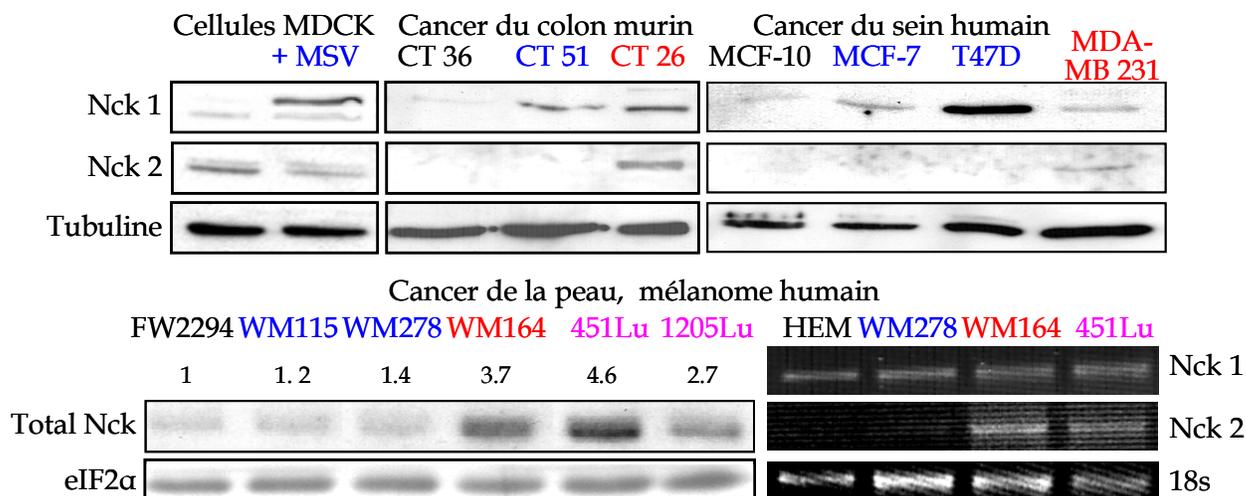


Figure 8 : Niveaux d'expression de Nck1 et Nck2 au cours de la progression de différents cancers ¹¹¹ © Salma Ismail et Louise Larose, 2006.

Les lignées cellulaires normales sont indiquées en noir, les cellules transformées en **bleu** et les lignées métastatiques sont indiquées en **rouge**. Les lignées 451Lu et 1205Lu en **rose** ont été isolées des poumons de souris suite à l'injection de lignées métastatique ou primaire, respectivement, dans la veine de la queue. Nck1 est plus fortement exprimé dans les cellules transformées que dans les cellules non transformées. Nck2 est plus fortement exprimé dans les lignées métastatiques que dans les cellules de tumeur primaire. Les niveaux des deux protéines Nck ont été révélés par immunobuvardage avec des anticorps spécifiques contre chacun des Ncks. Les niveaux d'ARNm ont aussi été analysés dans les cellules de mélanomes.

1.6 Hypothèse et objectifs de recherche

Ensemble, ces analyses suggèrent que Nck pourrait jouer un rôle dans la transformation cellulaire et, plus particulièrement, que Nck2 serait impliqué dans la progression métastatique. Cependant, aucune étude n'a jusqu'à maintenant établi un lien solide entre l'adaptateur protéique Nck et le développement ou la progression du cancer. Le but de mes recherches était donc de déterminer si Nck2 participe à la progression du cancer vers la métastase. Le mélanome humain a été choisi comme modèle d'étude, d'abord parce qu'il s'agit du système avec lequel Nck a été découvert, mais aussi parce que la progression du mélanome est très bien détaillée et qu'il existe de nombreuses lignées cellulaires humaines bien caractérisées

correspondant à chacune des étapes de cette progression. Dans cette étude, le rôle de Nck2 dans les processus cellulaires associés à la progression métastatique a été étudié par la surexpression de Nck2 dans une lignée de mélanome primaire (WM278; voir la figure 1, p. 2). Les différentes interactions protéiques et les voies de signalisations impliquées dans différents processus cellulaires caractéristiques des mélanomes métastatiques ont aussi été analysées afin d'élucider les mécanismes moléculaires soutenant le rôle de Nck2 dans la progression métastatique du mélanome humain.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Lignées et culture cellulaire

Toutes les lignées cellulaires utilisées dans cette recherche proviennent du laboratoire du Dr Meenhard Herlyn de l'Institut Wistar, Philadelphia, où elles ont été établies¹¹². La lignée WM278 a été établie à partir d'une tumeur primaire en phase de croissance radiale (VGP) isolée en 1981. Ces cellules sont tumorigènes (formation de colonies *in vitro* en agar mou et de tumeurs *in vivo* lors de l'injection dans des souris), mais elles sont peu ou pas invasives (*in vitro*) ou métastatiques (*in vivo*). La lignée WM1617 est une lignée métastatique isolée du ganglion lymphatique axillaire chez la même patiente que les WM278. La lignée WM164 est une lignée métastatique comparable à la lignée WM1617, mais isolée à partir d'un ganglion lymphatique d'une autre patiente. La lignée 451Lu a été purifiée à partir d'un foyer métastatique pulmonaire chez une souris injectée avec les cellules WM164.

Les lignées cellulaires ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Gibco™, Invitrogen Corp.) reconstitué au laboratoire et complété avec du bicarbonate de sodium, un mélange d'antibiotiques et antimycotiques (Anti-Anti, Gibco™, Invitrogen Corp.) et 10 % de sérum de veau fœtal (FBS; Gibco™, Invitrogen Corp.). Les cellules ont été maintenues dans un environnement contrôlé à 37 °C avec 5 % de CO₂ et 95 % d'air humidifié.

Surexpression de Nck2

L'adaptateur Nck2 humain a été surexprimé de façon stable dans les cellules de mélanome primaire (WM278) sous forme de protéine de fusion GFP-Nck2. L'ADNc du gène Nck2 a été extraite du plasmide pRK5-HA-Nck2³⁷ (gracieusement fourni par le Dr W. Li, San Diego) par une digestion *EcoRI* et *BamHI*, puis inséré dans le vecteur pEGFP-C1 (Clontech, No GeneBank : U55763) préalablement digéré avec les mêmes enzymes (Figure 9, p. 34). Les cellules WM278

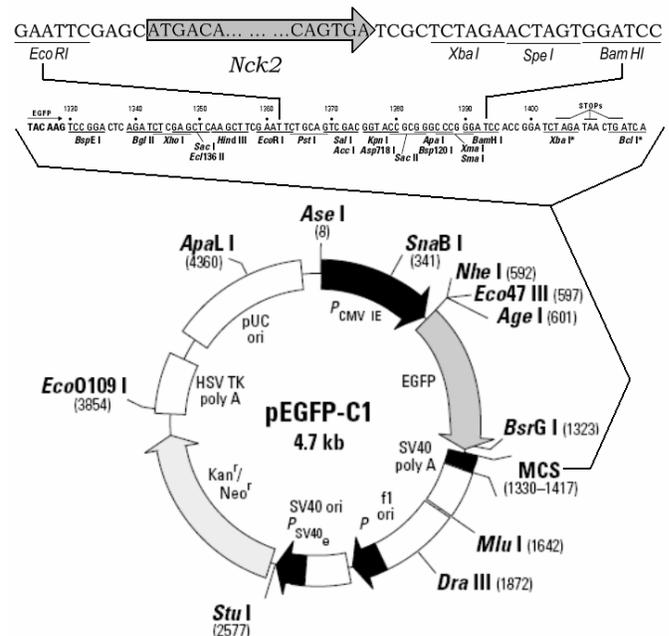


Figure 9 : Carte du plasmide pEGFP-C1-Nck2
© Becton, Dickinson et compagnie, 2002.

ont été transfectées par la méthode du phosphate de calcium ¹¹³ avec le plasmide pEGFP-C1-Nck2 ou le plasmide pEGFP-C1 vide comme contrôle. Les cellules transfectées ont été mises en sélection durant trois semaines en présence de 400 µg/ml de généticine (G418, Gibco™, Invitrogen) dans le milieu de culture. Les colonies obtenues ont été repiquées, remises en culture, puis analysées pour déterminer les niveaux d'expression de GFP et de GFP-Nck2. Les clones choisis ont été maintenus dans un milieu de sélection composé de RPMI 1640 complété avec 10 % de FBS et 40 µg/ml de G418. L'ajout du marqueur GFP à la protéine Nck2 ne semble pas affecter sa localisation puisque la distribution de la fluorescence GFP, telle qu'observée par microscopie, correspond à la localisation attendue pour Nck2, soit concentrée dans la région périnucléaire correspondant au RE et au niveau de la membrane plasmique (Figure 20D et données non montrées). L'effet du marqueur GFP sur la fonction de Nck2 n'a pas encore été analysé.

Anticorps et marqueurs immunofluorescents

Les anticorps polyclonaux contre les protéines Nck développés au sein de notre laboratoire (Figure 10, p. 35) ont été générés par immunisation de lapins avec une protéine de fusion GST codant soit pour les trois domaines SH3 du Nck humain (résidus 1-251; Nck total) ³⁷ soit pour une séquence spécifique de Nck1 (Nck1 : QNNPLTSGLEPSPQCDY IRPSLTGKFAGNP) ou de Nck2 (VVLSGDGPALHPAHAPQISYTGP SSSGRFAGRE) localisée entre le troisième domaine SH3 et le domaine

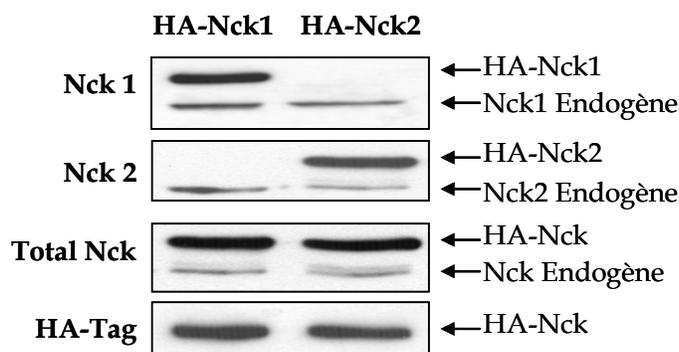


Figure 10 : Analyse des anticorps spécifiques contre Nck1 et Nck2 ¹⁰⁷ © Louise Larose, 2000.

Des cellules ont été transfectées pour exprimer la protéine Nck1 ou Nck2 complète liée à l'épitope HA. Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés à l'aide des anticorps spécifiques contre Nck1, Nck2 ou Nck total. L'anticorps anti-HA a été utilisé comme contrôle des niveaux de surexpression.

SH2. Les anticorps primaires polyclonaux de lapin détectant les protéines CrkII (clone C-18), Intégrine β3 (H-96), FAK (A-17), Pak (N-20) et ERK1 (C-16), ainsi que les anticorps monoclonaux de souris détectant GFP (B-2) et pTyr204 ERK1/2 (clone E-4) ont été achetés chez Santa Cruz Biotechnology. Les anticorps monoclonaux de souris détectant les molécules d'adhésion Intégrine β1 (anti-CD29, clone 18), E-Cadhérine (clone 34) et N-Cadhérine (clone 32) ont été achetés de Becton Dickinson et compagnie (BD). Les anticorps

polyclonaux de lapin contre les kinases MEK1/2, pSer217/221 MEK1/2, Akt et pThr308 Akt proviennent de Cell Signaling Inc. Les anticorps primaires monoclonaux de souris anti-vinculine (clone hVIN-1) et anti- β -tubuline (clone TUB2.1) ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Les anticorps caprins anti-IgG de souris ou anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase du raifort (GAM-HRP et GAR-HRP) proviennent de chez Bio-Rad Laboratories Inc. et l'anti-IgG de souris couplée au fluorochrome rhodamine (GAM-TRITC) provient de chez Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. La toxine phalloïdine couplée au fluorochrome AlexaFluor®555 ou AlexaFluor®488 sont des produits de Molecular Probes (Invitrogen).

Extraction des protéines cellulaires

Afin d'extraire les protéines cytosoliques et membranaires qui peuvent être solubilisées par le Triton, les cellules cultivées à 70-80% de confluence ont été rincées sur glace avec du PBS (Phosphate Buffered Saline : 91mM Na₂HPO₄•7H₂O, 17mM NaH₂PO₄•H₂O, 0,15M NaCl, pH 7,5) froid, puis lysées 10 min à 4 °C dans le tampon de lyse PLC (50mM HEPES, 0,15M NaCl, 10 % glycérol, 1 % Triton-X 100, 1,5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1mM Pyrophosphate de sodium, 100mM NaF, pH 7,5) contenant le mélange d'inhibiteurs de protéases cOmplete® (Roche). Lors de l'analyse des niveaux de phosphorylation de protéines, 17,5 mM de l'inhibiteur de phosphatases β -glycérophosphate a été ajouté au tampon de lyse. Les lysats ainsi obtenus ont été clarifiés par centrifugation (10 min, 13 300 rpm, 4 °C), puis les concentrations de protéines ont été mesurées par la méthode Bradford¹¹⁴ en utilisant le réactif de la compagnie Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay dye reagent, concentrate). Des échantillons de quantités prédéterminées d'albumine sérique bovine (BSA; fraction V, heat shock, Roche) ont servi de courbe étalon pour la quantification des protéines.

Immunobuvardage (Western Blot)

Les niveaux d'expression de différentes protéines ont été mesurés par immunobuvardage. Les protéines des lysats totaux (20 à 50 μ g de protéines) ont été séparées selon leur poids moléculaire par migration sur gel d'acrylamide 10 % (Bio-Rad) contenant 0,1 % de SDS (SDS-PAGE). Les protéines ainsi séparées ont été transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF; Bio-Rad) en utilisant un tampon de transfert composé de 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,01 % SDS et 15 % méthanol. Les membranes ont été bloquées avec une solution saline tamponnée par le Tris contenant 0,1 % Tween-20 (TBS-T pour Tris Buffered Saline avec Tween) et 10 % de lait en poudre (Carnation, sans gras) pour

une durée minimale de 30 minutes, afin de réduire l'adhésion non spécifique des anticorps à la membrane. Alternativement, une solution de TBS contenant 5 % de BSA a été utilisée pour l'analyse des niveaux d'expression de la protéine Akt phosphorylée et totale. Les membranes ont ensuite été incubées avec un anticorps primaire spécifique durant toute la nuit à 4 °C, puis avec l'anticorps secondaire approprié couplé à l'enzyme HRP durant 1 h à température pièce. Les anticorps étaient dilués dans la solution de blocage (TBS-T 10 % lait) ou une solution de TBS-T contenant 1 % de BSA pour les anticorps primaires anti-Akt et anti-pThr308-Akt. La présence des anticorps a été détectée par chimiluminescence avec le réactif ECL Plus (AmershamTM, GE), selon les spécifications du fabricant, et le signal a été révélé à l'aide de films pour autoradiographie (HyBlot CL, Denville Scientific Inc.) qui ont été développés à l'aide du développeur X-OMAT 2000A (Kodak).

Les immunobuvardages contrôles (dirigés contre la β -tubuline ou contre les protéines totales correspondantes dans les cas d'immunobuvardage anti-phospho-protéines) ont été faits sur la même membrane que l'immunobuvardage test. Pour ce faire, les membranes ont été dénudées des anticorps du premier immunobuvardage par l'incubation dans une solution contenant 0,06M Tris à pH 6,7, 2 % SDS et 0,7 % β -mercaptoéthanol durant 30 min à 65 °C. Après deux lavages au TBS-T, les membranes ont été soumises à un nouvel immunobuvardage.

Dans certains cas, l'intensité du signal représentant les niveaux d'expression a été quantifiée. Pour ce faire, les signaux ont été numérisés à l'aide du densitomètre calibré GS-800 (Bio-Rad) et la densité optique des différentes bandes a été évaluée à l'aide du programme QuantityOne (version 4.6.7, 1-D Analysis Software, Bio-Rad).

Immunofluorescence et Microscopie

La localisation des protéines de fusion GFP-Nck2 et vinculine, ainsi que l'organisation du cytosquelette d'actine ont été analysées par immunofluorescence. Les cellules ont été mises en culture sur des lamelles de verre prétraitées (rondes, 22 mm de diamètre, Fisher) à raison de 3×10^4 cellules par puits (plaque 24 puits, Sarstedt) pour une période de 24 h. Après avoir aspiré le milieu de culture, les cellules ont été lavées une fois avec du PBS froid, puis fixées avec une solution de formaldéhyde à 3,7 % dans du PBS pendant 10 min à température pièce. Les cellules ont ensuite été perméabilisées avec une solution de triton à 0,2 % dans du PBS pendant 5 min à température pièce. Pour le marquage des complexes d'adhésions focaux, les cellules ont ensuite été incubées dans le noir à température ambiante dans une solution de PBS avec l'anticorps primaire (anti-vinculine 1 : 400) pour 1 h, puis avec l'anticorps

secondaire (GAM-TRITC 1 : 200) pour 30 min. L'actine a été marquée à l'aide de la toxine phalloïdine couplée au fluorochrome AlexaFluor®488 (vert) ajoutée lors de l'incubation avec l'anticorps secondaire ou à l'aide de la phalloïdine-AlexaFluor®555 (rouge) incubée seule dans une solution de PBS pour 30 min. Les lamelles lavées au PBS et à l'eau distillée ont ensuite été montées sur des lames de microscopie avec l'agent de montage ProLong Gold (Invitrogen).

Pour l'analyse des invadopodes, les lamelles ont été préalablement couvertes d'une couche de Matrigel™ (BD) à 5 % dans du milieu de culture RPMI sans sérum. Pour ce faire, une goutte de 40 µL a été déposée sur lamelle, puis la lamelle a été placée, Matrigel™ dessous, dans le pétri de culture et incubée 1 h à 37 °C.

Les cellules ont été observées et photographiées à l'aide d'un microscope inversé Axiovert 200M (Zeiss) muni d'une caméra CoolSNAP™ES (Photometrics®, Roper Scientific) et d'une lampe X-Cite® series 120 (EXFO) pour la fluorescence. Les images obtenues ont été analysées et superposées à l'aide du programme MetaMorph® (version 6.3, Molecular Devices Corp.) afin d'évaluer la colocalisation des différentes protéines marquées.

Essais de prolifération

Pour mesurer la prolifération cellulaire, 4×10^3 cellules de chaque lignée ont été mises en culture dans des plaques 96 puits à raison de 6 puits par lignée. Après, 24 h, 48 h, 72 h ou 96 h, les cellules ont été fixées durant 20 min à 210 rpm, température pièce, en ajoutant une solution de glutaraldéhyde (concentration finale de 1 %) directement dans le milieu de culture, afin d'éviter tout décollement de cellules. Les cellules ont été lavées deux fois à l'eau désionisée, puis colorées avec une solution de Crystal Violet (0,4 % dans 10 % d'éthanol; Sigma) durant 20 min. Après trois lavages à l'eau distillée, le Crystal Violet incorporé dans les cellules a été dissous avec une solution d'acide acétique à 10 %, puis la densité optique à 570 nm a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman Coulter. La valeur moyenne obtenue pour les puits incubés sans cellules a été utilisée comme blanc et soustraite de toutes les autres valeurs.

Migration par recouvrement suite à une rayure (Wound Healing)

Pour mesurer la migration, les cellules ont été cultivées jusqu'à confluence dans des plaques de 6 puits sous lesquelles deux traits distants de quelques millimètres ont préalablement été dessinés. Au temps 0, le tapis cellulaire a été rayé perpendiculairement aux traits

préalablement dessinés, à l'aide d'un embout de pipette de 200 μL (No 24-T-200-C, Progene, Ultident), puis le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais pour éliminer les cellules en suspension. Les rayures ont été photographiées entre les deux traits dessinés sous la plaque au temps 0 et après 8 h d'incubation.

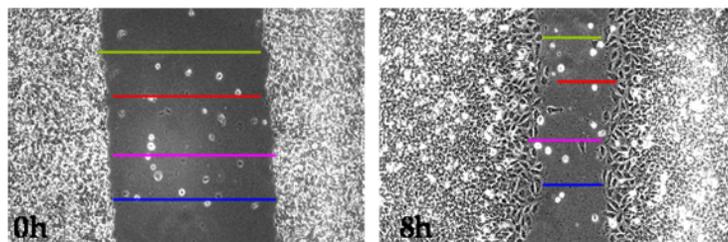


Figure 11 : Méthode d'analyse de la migration par recouvrement suite à une rayure © Mélissa Labelle-Côté, 2009

Les images obtenues ont été analysées à l'aide du programme MetaMorph®. La largeur de chaque rayure au temps 0 et à 8 h a été mesurée à 8 endroits différents (Figure 11, p. 39).

La valeur moyenne au temps 8 h a été soustraite de la valeur moyenne au temps 0 pour obtenir la distance de migration. Cette valeur est exprimée en pourcentage de la largeur de la rayure au temps 0.

Analyse de l'invasion en 3D par culture en sphéroïdes

Afin de produire les sphéroïdes utilisés pour l'essai d'invasion, des gouttes de 20 μL milieu de culture contenant 2×10^4 cellules (1×10^6 cellules/ml) ont été déposées sur le couvercle d'un pétri de culture de 100 mm, puis incubées par inversion au-

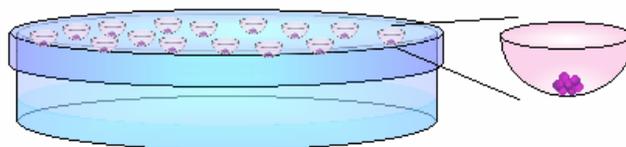


Figure 12 : Technique de formation de sphéroïdes par gouttelettes inversées. © Mélissa Labelle-Côté, 2009

dessus d'un pétri contenant 10 mL de PBS à 37 °C durant 48 h (Figure 12, p. 39). Les sphéroïdes ont été transférés dans du milieu de culture sur un tapis d'agar à 2 % dans du PBS (Agar Select, Invitrogen) pour les laisser croître en suspension pendant 72 h. Pour l'essai d'invasion, 4 sphéroïdes de chaque lignée cellulaire ont été transférés dans une matrice de collagène de type IV à 80 % (PureCol®, Advanced BioMatrix) dans du milieu RPMI 1640 sans sérum. Chaque sphéroïde a été déposé au centre d'un puits d'une plaque 4 puits contenant 500 μL de la matrice de collagène, les puits ont ensuite été incubés 30 min à 37 °C pour permettre la polymérisation de la matrice, puis recouverts de 500 μL de milieu RPMI

10 % FBS. Les sphéroïdes ont été photographiés au temps 0, puis à tous les 24 h, jusqu'à une durée maximale de 4 jours.

Tumorigenèse *in vivo*

Les analyses *in vivo* ont été effectuées suite à l'injection sous-cutanée de 5×10^6 cellules au niveau du flanc droit de souris CD-1 (Nudes) femelles âgées de 6 semaines (Charles River), 5 souris par lignée cellulaire. Pour ce faire, 5×10^7 cellules ont été récoltées par l'aide de Trypsine (Gibco™, Invitrogen Corp.) et resuspendues dans 500 μ L de Matrigel™ à 50 % dans du PBS et conservées sur glace jusqu'au moment de l'injection. Un volume de 50 μ L de cette suspension a été injecté dans les souris à l'aide d'une seringue de 1 mL (BD) munie d'une aiguille 26G $\frac{5}{8}$. Le volume des tumeurs a été mesuré chaque semaine à l'aide d'un pied à coulisse muni d'un vernier ($\text{Volume} = [\text{Largeur}^2 \times \text{Longueur} \times \pi] / 6$). Les souris ont été sacrifiées au moment où la tumeur atteignait un volume de 1,5 cm³ ou 19,6 semaines (137 jours) après l'injection. L'état d'enflure des ganglions lymphatiques inguinaux a aussi été observé comme indicateur potentiel de métastase. Au moment du sacrifice, la tumeur, les poumons, le foie et les ganglions lymphatiques inguinaux ont été prélevés et fixés dans une solution de formaline (3,7 % formaldéhyde, 45 mM Na₂HPO₄ et 33 mM NaH₂PO₄) pour une éventuelle analyse histologique. Les études *in vivo* ont été faites en collaboration avec le Dr Peter Siegel, du Centre de Recherche sur le Tissu osseux et le Parodonte, Université McGill, grâce à l'aimable contribution de Caterina Russo.

Analyses statistiques

Les résultats obtenus pour les différentes lignées cellulaires ont été comparés selon le test *t* de Student (Student's *t*-test). Les comparaisons dont la valeur de *p* obtenue par le test *t* est inférieure à 0,05 sont donc considérées comme significativement différentes. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Microsoft Excel. Les valeurs illustrées dans les graphiques représentent les valeurs moyennes de l'ensemble des mesures d'une même expérience et les barres d'erreurs représentent les écarts types tels que calculés par le logiciel Microsoft Excel.

3 RÉSULTATS

3.1 Expression de Nck2 selon le stade de progression métastatique de cellules de mélanome humain.

Les niveaux d'expression de Nck1 et Nck2 avaient déjà été analysés au cours d'études antérieures effectuées au sein de notre laboratoire (Figure 8, p. 32). Ces résultats ont été reproduits en ajoutant une nouvelle lignée cellulaire, WM1617. Cette lignée métastatique a été isolée d'un ganglion lymphatique chez la même patiente que la lignée primaire WM278. La comparaison de ce duo de lignées cellulaires permet d'éliminer le facteur de variation inter-individu et d'étudier plus précisément le phénomène de progression métastatique. L'analyse des lysats cellulaires préparés à partir de la lignée primaire WM278 et des trois lignées métastatiques WM1617, WM164 et 451Lu a permis de confirmer que les niveaux de Nck2 sont augmentés jusqu'à huit fois dans les lignées de mélanomes isolées de métastases en comparaison à la lignée primaire (Figure 13a, p. 42). La spécificité de la régulation de Nck2 a été étudiée en analysant les niveaux d'autres protéines de signalisation qui contiennent des domaines SH2 et SH3 dans les différentes lignées. En utilisant l'expression de la protéine tubuline comme marqueur de la quantité de protéine soumise à l'étude, l'analyse par immunobuvardage des niveaux d'expression de la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K, de la Phospholipase C γ 1 et de l'adaptateur Grb2 (données non montrées), ainsi que de l'homologue Nck1 ou de l'adaptateur CrkII (Figure 13b, p. 42) a révélé que l'expression de ces protéines demeure inchangée au cours de la progression du mélanome. Ces résultats montrent que l'expression de Nck2 est spécifiquement augmentée au cours de la progression entre le stade VGP et celui de la métastase dans le mélanome humain.

Il est à noter que, dans les lignées de mélanome, le Nck2 endogène est détecté comme un doublet dont l'origine nous est encore inconnue. Il s'agit peut-être d'espèces phosphorylées et non phosphorylées de Nck2, mais de plus amples analyses sont requises pour confirmer cette hypothèse.

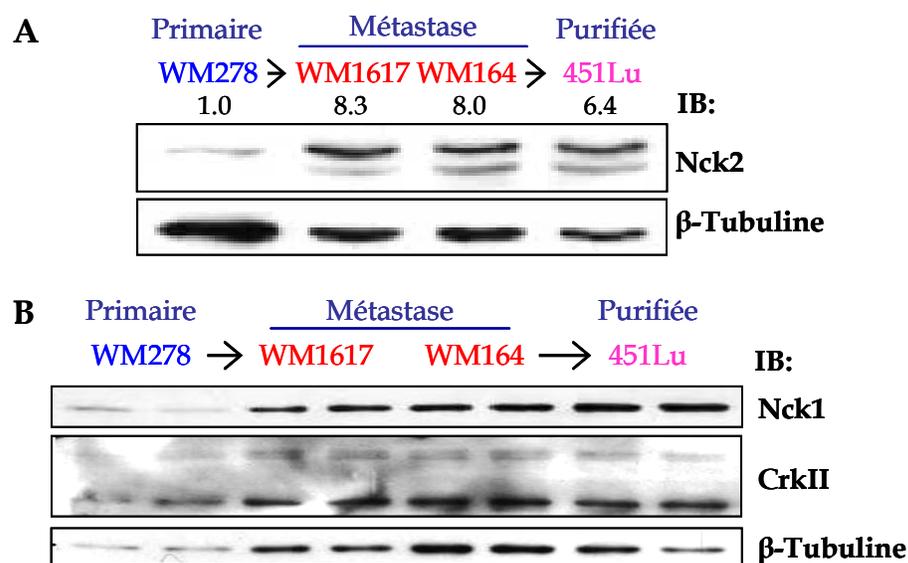


Figure 13 : Expression de Nck2, Nck1 et CrkII dans différentes lignées cellulaires de mélanome humain.

A) Les lysats totaux d'une lignée primaire (en bleu), de deux lignées métastatiques (en rouge) et d'une lignée métastatique purifiée (en rose; voir Matériel et Méthodes pour les détails) de mélanome humain ont été analysés par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps spécifique contre l'adaptateur Nck2. Les nombres inscrits représentent le ratio de l'intensité du signal pour chaque lignée sur l'intensité mesurée pour la lignée WM278. Résultats représentatifs de quatre analyses indépendantes. B) Les lysats totaux des mêmes lignées cellulaires ont été analysés en duplicata à l'aide d'anticorps spécifiques contre Nck1 et CrkII. Résultats représentatifs de trois analyses indépendantes. A) et B) L'immunobuvardage anti-β-Tubuline a été utilisé comme contrôle de la quantité de protéines chargées sur gel.

3.2 Surexpression de Nck2 dans les cellules de mélanome primaire

Bien que l'augmentation de Nck2 soit unique parmi l'ensemble des protéines analysées, d'autres protéines ou propriétés cellulaires peuvent différer entre les cellules de mélanome primaire et métastatique. Afin de déterminer spécifiquement la contribution de l'adaptateur Nck2 dans le processus métastatique, les niveaux d'expression de Nck2 ont été artificiellement augmentés dans des cellules de mélanome primaire. Des cellules WM278 ont été transfectées avec un plasmide pEGFP-C1-Nck2 codant pour la protéine de fusion GFP-Nck2 ou le vecteur pEGFP-C1 vide codant pour la protéine contrôle GFP seule. Les niveaux d'expression de Nck2 et de GFP des différents clones stables obtenus ont été analysés par immunobuvardage. Trois clones exprimant différents niveaux de GFP-Nck2 (nommés N15, N7 et N14), ainsi qu'un clone contrôle exprimant la protéine GFP

(nommé C2) ont été sélectionnés pour l'étude (Figure 14a, p. 44). L'immunobuvardage anti-GFP a permis de détecter les protéines GFP tandis que l'immunobuvardage anti-Nck2 a servi à établir les niveaux de surexpression comparativement aux niveaux de Nck2 endogène. À l'aide de l'immunobuvardage anti-GFP, mais pas celui anti-Nck2, il a été possible de détecter la présence de la protéine de fusion GFP-Nck2 dans le clone N15, suggérant que la surexpression de Nck2 est très faible dans cette lignée. Par contre, le clone N7 montre un niveau total d'expression correspondant à près de deux fois les niveaux de Nck2 observés dans la lignée de mélanome primaire, tandis que le clone N14 surexprime 11,5 fois le niveau endogène. Le niveau de Nck2 détecté dans la lignée N14 est comparable ou légèrement supérieur à ceux observés dans les lignées métastatiques WM1617 et WM164. Les niveaux d'expression de p85, PLC γ 1 et Grb2 (données non montrées), ainsi que des adaptateurs Nck1 et CrkII (Figure 14b, p. 44) ont aussi été analysés dans les quatre clones pour s'assurer que la surexpression de Nck2 n'avait pas d'effet sur l'expression de ces autres protéines.

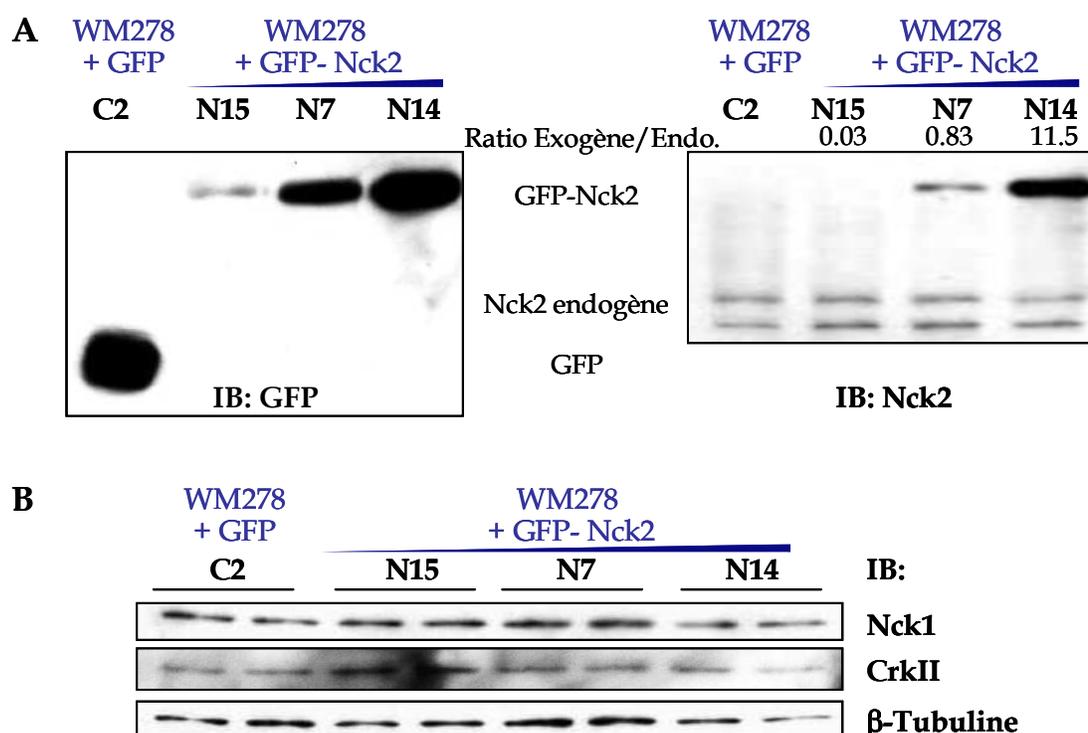


Figure 14 : Expression de Nck2, Nck1 et CrkII dans différentes lignées cellulaires de mélanome humain.

A) Les lysats totaux de cellules WM278 transfectées pour exprimer la protéine contrôle GFP (C2) ou la protéine de fusion GFP-Nck2 (N15, N7, N14) ont été analysés par immunobuvardage à l'aide d'anticorps spécifiques contre la protéine GFP ou Nck2. Les nombres inscrits représentent le ratio de l'intensité du signal GFP-Nck2 sur l'intensité mesurée pour la protéine Nck2 endogène. Résultats représentatifs de quatre analyses indépendantes. B) Les lysats totaux des mêmes lignées cellulaires ont été analysés en duplicata à l'aide d'anticorps spécifiques contre Nck1 et CrkII. A) et B) Résultats représentatifs de trois analyses indépendantes. L'immunobuvardage anti- β -Tubuline a été utilisé comme contrôle de la quantité de protéines chargées sur gel.

3.3 Analyse de la prolifération cellulaire selon les niveaux d'expression de Nck2

Il est connu que les cellules cancéreuses présentent des capacités de croissance accrues favorisant la prolifération de colonies métastatiques au sein d'un nouvel environnement¹⁴. L'effet de Nck2 sur le taux de croissance cellulaire a donc été étudié. Les différentes lignées de mélanome primaire et métastatique, ainsi que les clones surexprimant Nck2 ont été mises en culture dans des plaques 96 puits. À chaque jour après la mise en culture, les cellules de six puits pour chaque lignée ont été fixées, puis colorées au Crystal Violet et le nombre de cellules a été évalué par la

mesure de la densité optique. Les résultats obtenus montrent qu'après quatre jours de culture, les cellules WM1617 ont un taux de prolifération correspondant à 220 % de celui des cellules WM278 (Figure 15, graphique de gauche, p. 45). Les clones N15, N7 et N14 présentent des taux de croissance correspondant à 105 %, 110 % et 120 % de celui du clone C2, respectivement (Figure 15, graphique de droite, p. 45). Les niveaux de prolifération du clone C2 sont comparables à ceux des cellules WM278 parentales. La surexpression de Nck2 est donc suffisante pour stimuler la prolifération cellulaire, et ce, de façon dose dépendante. L'augmentation de la prolifération observée est significative pour le clone N14 présentant les plus hauts niveaux de GFP-Nck2. Par contre, cette lignée n'atteint pas le niveau de prolifération observé chez la lignée métastatique correspondante WM1617, bien qu'elles expriment toutes deux des niveaux élevés de Nck2. Cette observation démontre que l'augmentation d'expression de Nck2 contribue à la prolifération du mélanome, mais ne constitue pas le seul facteur déterminant de la forte prolifération des cellules métastatiques.

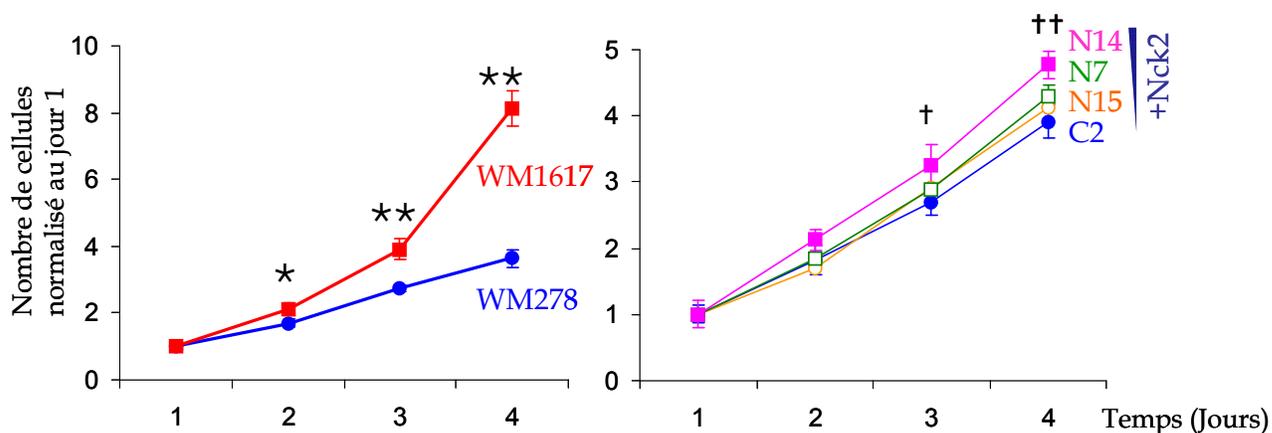


Figure 15 : Prolifération cellulaire selon les niveaux d'expression de Nck2.

Les cellules des lignées de mélanome primaire (WM278●), métastatique (WM1617■) ou WM278 transfectées pour exprimer la protéine contrôle GFP (C2●) ou la protéine de fusion GFP-Nck2 (N15□, N7□, N14■) ont été mises en culture, puis fixées et colorées au Crystal Violet aux temps indiqués. La croissance cellulaire a été évaluée en mesurant la densité optique à 570 nm après solubilisation du Crystal Violet (Voir Matériel et Méthodes pour les détails). Les valeurs indiquées en ordonnée représentent la valeur moyenne du ratio de la densité optique au temps x sur la densité moyenne au jour 1. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type. Résultats représentatifs de quatre expériences comportant 6 mesures chacune. Analyses statistiques : test t de Student, * $p < 0,01$ et ** $p < 0,001$ entre WM1617 et WM278; † $p < 0,01$ et †† $p < 0,001$ entre C2 et N14.

L'effet de Nck2 sur la prolifération cellulaire a aussi pu être observé au jour le jour lors du maintien des différentes lignées cellulaires en culture. Les cellules WM1617, N14 et, à un moindre niveau, les cellules N7 atteignent la confluence plus rapidement que les cellules WM278 ou C2 et devraient être passées plus fréquemment ou à plus forte dilution.

3.4 Caractérisation des propriétés de migration et d'invasion des lignées de mélanome et des clones surexprimant Nck2

3.4.1 Migration bidimensionnelle suite à une rayure

La migration cellulaire a d'abord été analysée par la méthode de recouvrement suite à une rayure (Wound healing). Les tapis cellulaires amenés à confluence ont été rayés à l'aide d'un embout de plastique, puis le taux de recouvrement de l'espace vide créé a été utilisé comme indice du taux de migration. Dans ce test, les cellules de mélanome primaire WM278 et celles du clone GFP contrôle C2 migrent relativement peu. Pour ces deux lignées, la fente n'était pas complètement recouverte même après 24 h de migration (données non montrées) et les cellules C2 ne présentaient que 38 % de recouvrement après 8 h de migration (Figure 16, p. 47). En comparaison aux lignées contrôles, les cellules surexprimant Nck2 présentent une meilleure capacité de migration bidimensionnelle sur plastique lorsque le mouvement des cellules est induit par une rayure. Pour les trois clones de mélanome primaire surexprimant Nck2 (N15, N7 et N14), la fente était complètement comblée après 24 h de migration et même après seulement 17 h dans le cas du clone N14 (données non montrées). Après 8 h de migration, les cellules N15 présentaient 47 % de recouvrement, les cellules N7, 51 %, et les cellules N14, 58 % de recouvrement (Figure 16, p. 47). La même tendance de Nck2 à stimuler la migration de façon dose dépendante a été observée pour différents temps de migration (6,5 h, 8 h, 17-18 h et 24 h) suite à la rayure du tapis cellulaire. Ces résultats démontrent que Nck2 favorise la migration bidimensionnelle sur plastique et, puisque la migration fait partie intégrante du processus de métastase, ces résultats supportent l'hypothèse que l'augmentation de l'expression de Nck2 pourrait contribuer à la progression métastatique du mélanome humain en favorisant la migration des cellules cancéreuses.

d'invasion des lignées primaire et métastatique de mélanome humain et des clones surexprimant Nck2 a été analysée dans un modèle tridimensionnel : la culture en sphéroïdes. Cette approche est maintenant utilisée de façon courante pour étudier la biologie des cellules cancéreuses. Contrairement aux méthodes traditionnelles de culture en deux dimensions, cette technique présente l'avantage de reproduire la structure tridimensionnelle que les cellules cancéreuses adoptent *in vivo* et la matrice de collagène reproduit en partie le microenvironnement habituel des cellules de mélanome¹¹⁵. Les sphéroïdes ont été produits par la mise en culture des cellules des différentes lignées dans des gouttelettes inversées au-dessus d'un pétri de PBS. Après deux jours d'agrégation, les sphéroïdes ont été cultivés en suspension sur un tapis d'agar mou durant trois jours pour leur permettre de proliférer avant d'être transférés dans une matrice de collagène de type I. Afin d'analyser l'invasion de la matrice, les sphéroïdes ont été photographiés au temps 0, 24 et 48 h après la mise en culture dans la matrice de collagène. La figure 17 (p. 49) montre l'évolution des sphéroïdes de cellules de mélanome primaire WM278 parentales ou exprimant la protéine GFP contrôle (C2) ou la protéine de fusion GFP-Nck2 (N14) et de cellules métastatiques WM1617. Les résultats obtenus ne montrent pas de différences majeures au niveau de la distance d'invasion, mais des différences morphologiques ont pu être observées, particulièrement entre les lignées primaire et métastatique. Les cellules WM1617 présentent de longues projections membranaires, tandis que les cellules WM278 transfectées ou non demeurent rondes. Certaines cellules N14 présentent une morphologie plus allongée, mais ce phénomène ne semble pas assez fréquent pour être jugé significatif ou reproductible (Figure 17, image du clone N14 à 24 h, p. 49). L'observation la plus marquante par rapport à la morphologie des sphéroïdes a été faite au cours de la formation et de la culture de ceux-ci. Au cours des différentes étapes de changement de culture, les sphéroïdes de WM1617 se sont avérés très friables et par conséquent difficiles à transférer d'une culture à l'autre. Cette friabilité et l'irrégularité des sphéroïdes de WM1617 sont particulièrement observables au temps 0 de la culture en matrice de collagène (Figure 17, p. 49). Bien

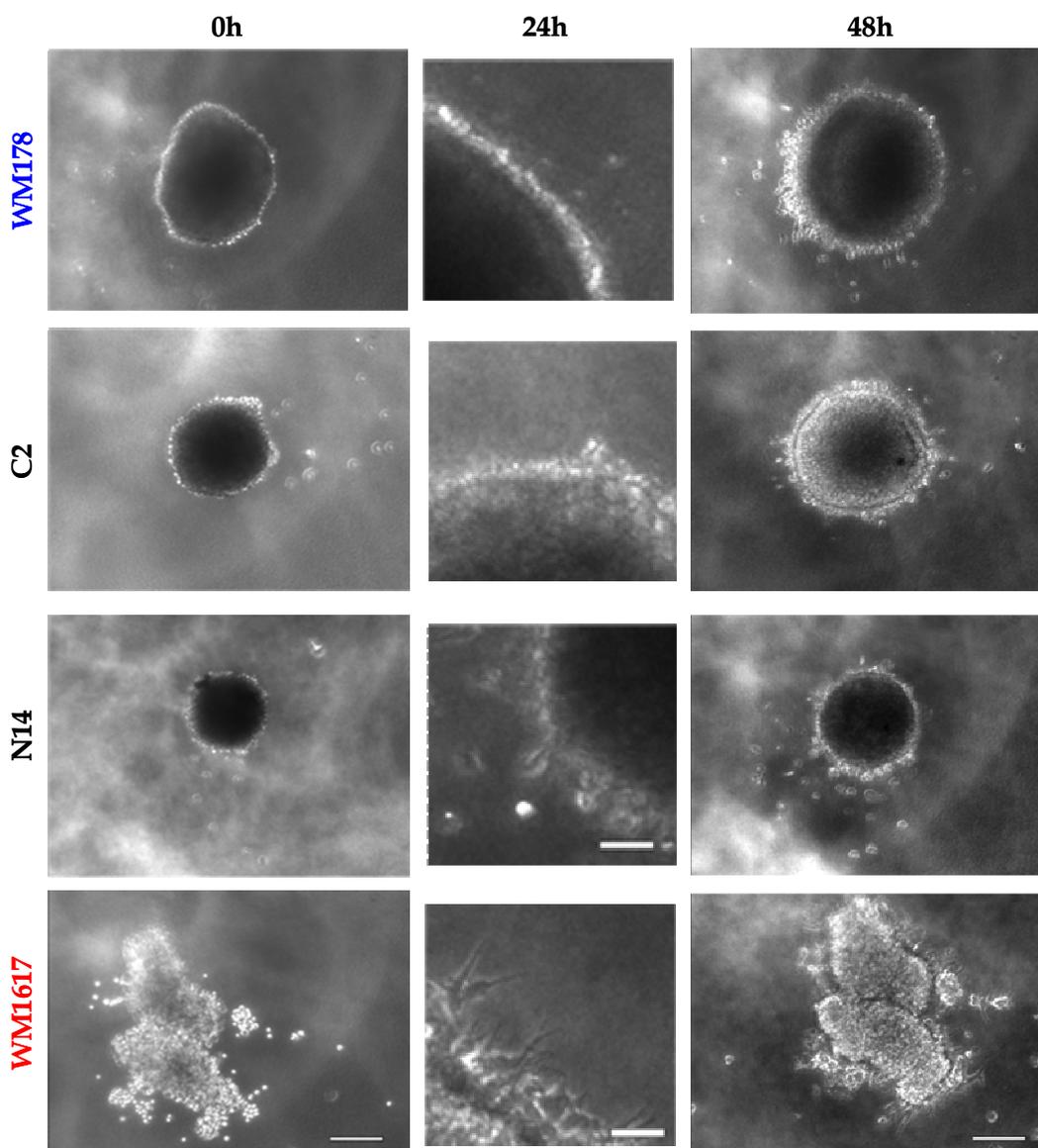


Figure 17 : Invasion d'une matrice de collagène de type I par des cellules de mélanome cultivées en sphéroïdes.

Des sphéroïdes de cellules de mélanome primaire (WM278), métastatique (WM1617) ou WM278 exprimant la protéine contrôle GFP (C2) ou la protéine fusion GFP-Nck2 (N14) ont été mis en culture dans une matrice de collagène de type I (Voir Matériel et Méthodes pour la formation des sphéroïdes). Les sphéroïdes ont été photographiés aux temps 0, 24 et 48 h après la mise en culture. Images représentatives de quatre expériences indépendantes. Grossissement : 10X; barre de graduation : 200 μm pour les images à 0 et 48 h, 50 μm pour les images à 24 h.

que les cellules N14 produisent des sphéroïdes ronds, comme les WM278, ces derniers présentaient, comme les WM1617, une plus grande friabilité. Il est d'ailleurs possible d'observer sur les images de la figure 17 certaines cellules détachées du sphéroïde de cellules N14. Ces résultats indiquent que Nck2 aurait peu ou pas d'effet sur la capacité d'invasion des cellules de mélanome. Ils suggèrent toutefois que les contacts cellule-cellule pourraient être altérés par la surexpression de Nck2.

Des résultats préliminaires obtenus lors d'un test d'adhésion sur différentes matrices (plastique, fibronectine, collagène de type I, Matrigel™) montrent qu'un nombre significativement réduit de cellules WM1617 adhèrent au substrat après 20 min, en comparaison aux cellules WM278. Les différents clones exprimant Nck2 (N15, N7 et N14) montrent aussi une tendance à diminuer leur adhésion au substrat comparativement au clone contrôle C2. Cependant, les résultats obtenus pour les clones surexprimant Nck2 ne semblent pas toujours consistants et ne sont pas suffisamment reproductibles pour permettre une conclusion claire. De tels résultats sont toutefois cohérents avec les observations faites au cours de la culture des sphéroïdes et du test de migration et ensemble ils suggèrent une diminution de l'adhésion générale des cellules métastatiques et des clones de mélanome primaire surexprimant Nck2. Ce phénomène pourrait aussi contribuer au processus de métastase en facilitant le détachement de cellules à partir de la tumeur primaire.

3.5 Analyse moléculaire des lignées de mélanome humain et des clones surexprimant Nck2

3.5.1 Niveaux d'expression des molécules d'adhésion.

Les observations faites au cours des essais de migration et d'invasion ainsi que lors de tests préliminaires d'adhésion suggèrent que les cellules métastatiques et les clones surexprimant Nck2 auraient une capacité d'adhésion réduite comparativement aux cellules de mélanome primaire. Afin de documenter ces observations d'un point de vue moléculaire, les niveaux d'expression de différentes protéines impliquées dans les contacts cellule-cellule ou cellule-matrice ont été déterminés. Il est connu que la transition d'expression de la protéine E-cadhérine vers la N-cadhérine observée au cours de la progression de mélanome affecte la nature des contacts

intercellulaires^{3,10}. Les niveaux d'expression de ces deux types de cadhérines ont donc été analysés dans nos lignées de mélanomes surexprimant ou non Nck2. De plus, la progression du mélanome humain est caractérisée par une transition au niveau des hétérodimères d'intégrines exprimés en surface, qui affecte la nature des contacts cellule-matrice^{3,10}. Puisque l'intégrine $\beta 3$ est la sous-unité la plus représentative des stades avancés du mélanome^{3,5}, ses niveaux d'expression ont été étudiés dans les cellules de mélanome. Les niveaux d'expression de l'intégrine $\beta 1$ ont aussi été analysés, à titre d'indicateur d'un stade peu avancé, non métastatique. Finalement, les niveaux d'expression de deux composantes des complexes d'adhésion focaux, soit les kinases Pak et FAK, ont aussi été analysés par immunobuvardage.

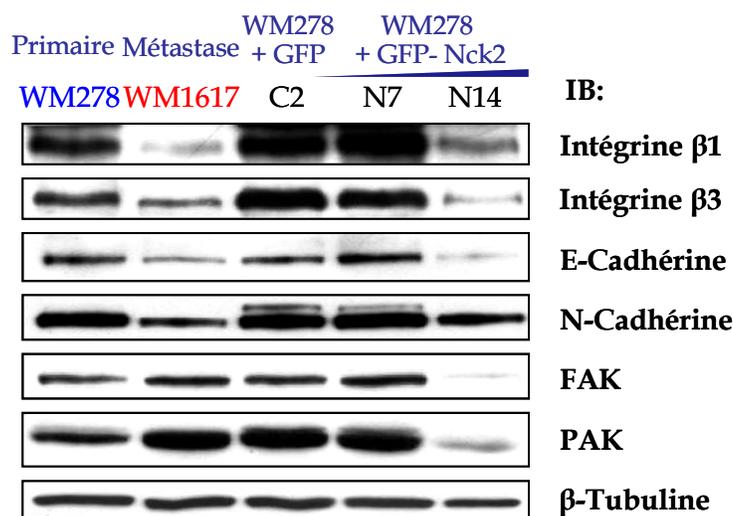


Figure 18 : Expression de molécules impliquées dans les contacts cellule-cellule ou cellule-matrice chez les cellules de mélanome humain surexprimant ou non Nck2.

Les lysats totaux de cellules de mélanome primaire (WM278), métastatique (WM1617) ou WM278 exprimant la protéine contrôle GFP (C2) ou la protéine de fusion GFP-Nck2 (N7, N14) ont été analysés par immunobuvardage à l'aide d'anticorps spécifiques contre les molécules de surface intégrine- $\beta 1$, intégrine- $\beta 3$, E-cadhérine et N-cadhérine ou les kinases intracellulaires Pak et FAK. L'immunobuvardage anti- β -tubuline a été utilisé comme contrôle de la quantité de protéines chargées sur gel. Résultats représentatifs de trois analyses indépendantes.

Les résultats obtenus par immunobuvardages (Figure 18, p. 51) montrent que les niveaux d'expression des quatre molécules d'adhésion analysées sont nettement diminués dans la lignée métastatique WM1617 et le clone N14, comparativement à la lignée primaire WM278 ou aux clones C2 et N7. En ce qui concerne les niveaux d'expression des kinases Pak et FAK, ils apparaissent diminués que dans les cellules

N14. Par contre, il est à noter que la kinase Pak est détectée en immunobuvardage sous la forme d'un doublet dans les lignées de mélanomes qui expriment de faibles niveaux de Nck2 (WM278, C2 et N7), tandis qu'elle migre en une seule bande dans les échantillons de mélanomes qui expriment de plus hauts niveaux de Nck2 (WM1617 et N14). Le doublet Pak peut représenter la forme non activée, observée dans toutes les lignées, et la forme activée de l'enzyme, qui semble absente de la lignée métastatique WM1617 et du clone N14. Ces résultats suggèrent que la kinase Pak serait inhibée en présence de hauts niveaux de Nck2. Ensemble, les différentes observations concernant l'adhésion cellulaire montrent une relation inverse entre les niveaux d'expression de Nck2 et ceux des protéines régissant l'interaction des cellules entre elles ou avec la matrice extracellulaire. Ces données supportent l'idée que Nck2 pourrait contribuer à la progression des mélanomes vers un stade métastatique en modulant leurs propriétés de migration et d'adhésion.

3.5.2 La voie *Ras-MAPKs*

Toutes les lignées de mélanome humain utilisées dans cette étude portent la mutation V600E de BRAF qui aboutit à l'activation constitutive de la voie de MAPK Raf-MEK-ERK^{7,116}. Cette voie de signalisation est impliquée dans la régulation de la croissance et la prolifération cellulaire. Les niveaux de phosphorylation des kinases MEK et ERK situées en aval de Raf, et de la kinase Akt, qui peut être activée en aval de Ras parallèlement à la voie des MAPKs, ont été mesurés afin d'analyser l'activation de ces voies de signalisation dans les lignées de mélanomes surexprimant ou non Nck2.

L'analyse par immunobuvardage a montré que la surexpression de Nck2 n'affecte pas l'activation de la voie des MAPKs ou celle d'Akt (Figure 19, p. 53). Les niveaux de phosphorylation de MEK, ERK ou Akt, lorsque normalisés selon les niveaux de la protéine totale, sont relativement semblables chez les quatre clones de WM278 analysés. Ces résultats laissent croire que Nck2 stimule la prolifération cellulaire par un mécanisme autre que la régulation de ces deux voies de signalisation.

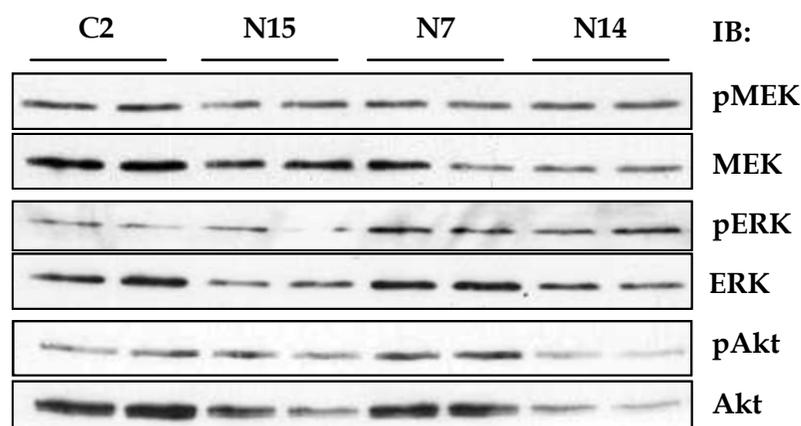


Figure 19 : Activation des voies de signalisation des MAPKs et d’Akt dans des clones de mélanome primaire surexprimant Nck2.

Les lysats totaux de cellules de mélanome primaire WM278 exprimant la protéine contrôle GFP (C2) ou la protéine de fusion GFP-Nck2 (N7, N14) ont été analysés en duplicata par immunobuvardage à l’aide d’anticorps phospho-spécifiques pour déterminer les niveaux de phosphorylation des kinases MEK, ERK et Akt. Les niveaux d’expression des protéines totales ont été utilisés comme contrôle de la quantité de protéines chargées sur gel. Résultats représentatifs de trois analyses indépendantes.

3.6 Localisation cellulaire de Nck2 et morphologie du cytosquelette, des structures d’adhésion et d’invasion

3.6.1 Localisation de Nck2 et complexes d’adhésion focaux (FAs)

Nck2 est reconnu pour interagir avec de nombreuses composantes impliquées dans la dynamique du cytosquelette et ses modulateurs (résumé dans la section 1.2.3), dont la kinase des complexes d’adhésion focaux FAK. Les effets de la surexpression de Nck2 observés sur la migration et l’adhésion des cellules de mélanome pourraient s’expliquer par son rôle dans la réorganisation du cytosquelette d’actine. Pour explorer cette hypothèse, la localisation cellulaire de Nck2, ainsi que la morphologie du cytosquelette, ont été étudiées par immunofluorescence dans les cellules de mélanome préalablement mises en culture sur des lamelles de verre pour environ 18 h. La surexpression de Nck2 dans les cellules de mélanome primaire n’induit pas de changements majeurs dans l’organisation du cytosquelette d’actine (Figure 20a, p. 54). Les cellules transfectées, tout comme les cellules WM278 parentales, présentent de nombreuses, longues et larges fibres de stress, qui traversent la cellule d’un bout à l’autre ainsi que quelques ondulations de la membrane de type « ruffling ». À l’opposé, la structure de l’actine dans les cellules WM1617 semble

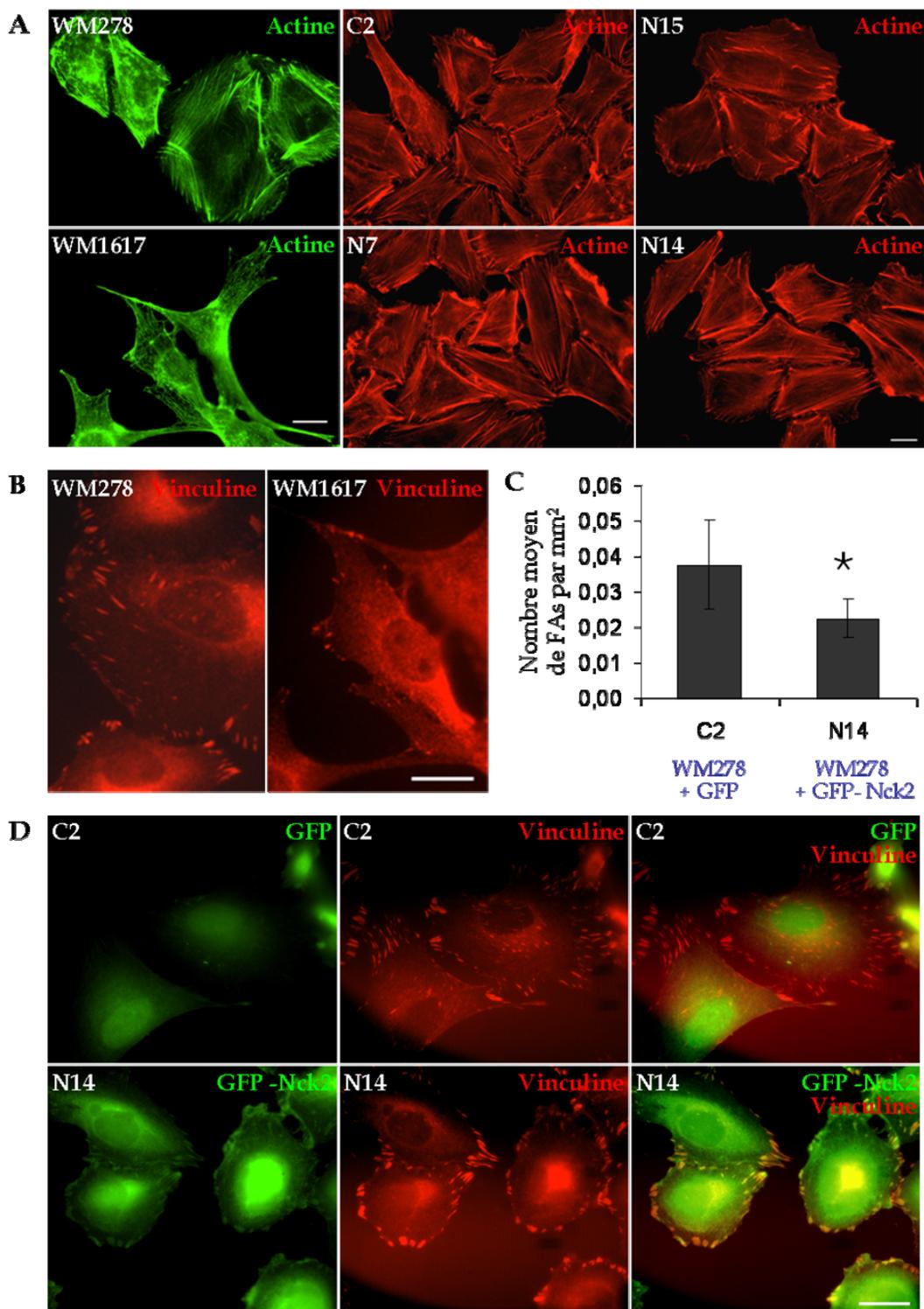


Figure 20 : Localisation cellulaire de Nck2 et structure du cytosquelette d'actine dans des cellules de mélanome humain. Les lignées cellulaires et les clones de mélanome humain indiqués ont été marqués par immunofluorescence comme décrit dans le Matériel et Méthodes. A) Marquage avec la toxine phalloïdine couplée au fluorochrome AlexaFluor®488 (WM278 et WM1617) ou AF555 (C2 et N14). B) Marquage avec les anticorps anti-vinculine et GAM-TRICT. C) Le nombre de FAs a été compté manuellement dans 20 cellules, puis normalisé pour la taille des cellules. * $p < 0,001$ test t de Student relatif au contrôle C2. D) Autofluorescence de la GFP et marquage avec les mêmes anticorps qu'en B. Grossissement : 63X (A et B) ou 100x (D); Barre de graduation : 20 μm .

plus désorganisée. On note une diminution marquée des fibres de stress et les cellules, nettement plus allongées, projettent de longues et fines extensions vers leurs points d'adhésion. La surexpression de Nck2 est suffisante pour induire des changements au niveau des structures d'adhésions (Figure 20c et d, p. 54). Le marquage des cellules pour la vinculine, une composante des complexes d'adhésion focaux (FAs), a permis de constater que les cellules surexprimant de hauts niveaux de Nck2 (N14) présentent des FAs moins nombreux comparativement aux cellules contrôle exprimant GFP (C2). Les cellules métastatiques WM1617 présentent aussi moins de FAs que les cellules de mélanome primaire WM278, de plus, leurs FAs sont de plus petite taille (Figure 20b, p. 54). Finalement, l'autofluorescence de la protéine GFP a permis de constater que la protéine de fusion GFP-Nck2, contrairement à la protéine contrôle GFP, est concentrée entre autres dans les mêmes structures que la vinculine, c'est-à-dire, les FAs.

Ces résultats suggèrent que Nck2 est recruté dans les complexes d'adhésion focaux où il pourrait contribuer à leur dynamique en régulant leur assemblage ou leur dissolution. La diminution du nombre de FAs dans les cellules de mélanome qui surexpriment Nck2 et les cellules métastatiques WM1617 est en accord avec l'apparente diminution d'adhésion de ces cellules, telle qu'observée lors de tests préliminaires d'adhésion ou suggéré par le test d'invasion. Cette observation corrèle aussi avec la diminution des niveaux d'expression de FAK observée par immunobuvardage.

3.6.2 Localisation de Nck2 et invadopodes sur matrice de Matrigel™

Les invadopodes sont des structures membranaires riches en actine associées aux cellules invasives. Une étude récente a montré que Nck est impliqué dans la formation de ces structures en servant de pont entre la kinase Src, et son substrat Tks5, et la machinerie de la polymérisation d'actine¹⁰⁹. La présence de Nck2 dans les invadopodes a donc été étudiée dans certains des clones de mélanome humain. Pour ce faire, la distribution de l'actine et de la protéine GFP-Nck2 a été analysée par immunofluorescence dans les cellules de mélanomes mises en culture sur une matrice de Matrigel™. Les résultats préliminaires montrent tout d'abord que le modèle

d'étude est propice pour observer la formation d'invadopodes. En effet, bien qu'elles ne soient pas très nombreuses, certaines cellules présentent des structures riches en actine situées sur la face ventrale de la cellule (Figure 21, p. 56, têtes de flèche). Les images obtenues montrent aussi que Nck2 est recruté dans ces structures ventrales. Des analyses additionnelles impliquant une quantification rigoureuse sont nécessaires pour déterminer si l'augmentation des niveaux de Nck2 est suffisante pour stimuler la formation d'invadopodes. D'autres marqueurs des invadopodes, tels la cortactine et tks5, pourront aussi être utilisés pour confirmer la nature des structures observées.

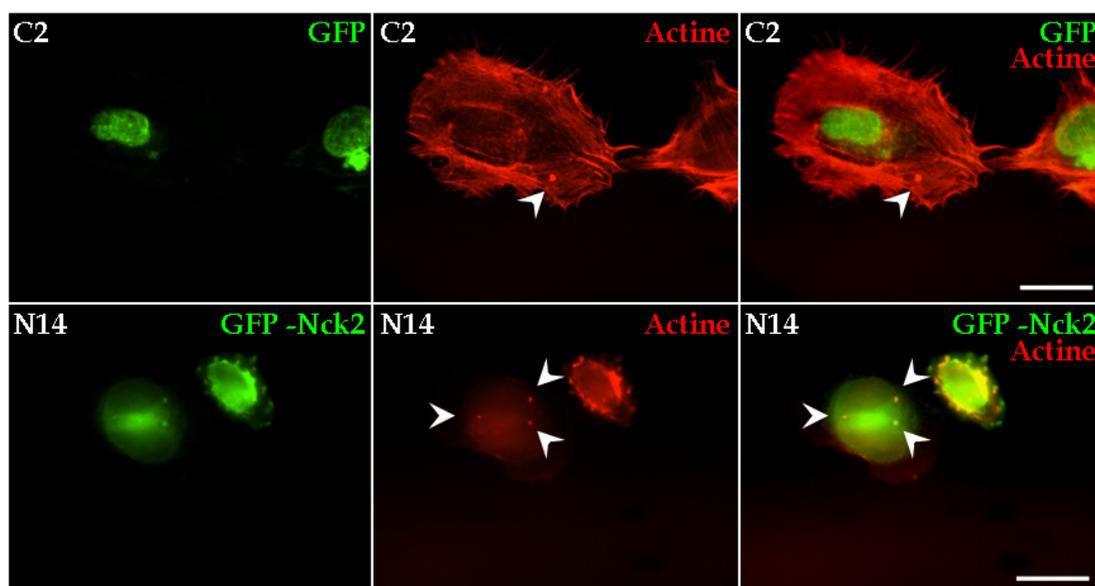


Figure 21 : Localisation de Nck2 au niveau des invadopodes dans des cellules de mélanome humain exprimant la protéine de fusion GFP-Nck2.

Des cellules de mélanome primaire WM278 exprimant la protéine contrôle GFP (C2) ou la protéine de fusion GFP-Nck2 (N14) ont été mises en culture sur des lamelles de verre préalablement recouvertes d'une couche de Matrigel™ (Voir Matériel et Méthodes pour les détails). L'actine des cellules a été marquée à l'aide de la toxine phalloïde couplée au fluorochrome AlexaFluor®555 (rouge). La protéine contrôle GFP et la protéine de fusion GFP-Nck2 ont été visualisées grâce à l'autofluorescence de la GFP (vert). Les têtes de flèche blanches indiquent les invadopodes. Grossissement : 100X. Barre de graduation : 20 µm.

3.7 Analyse *in vivo* de la tumorigenèse et du potentiel métastatique

Des analyses *in vivo* ont finalement été effectuées pour étudier l'effet de Nck2 sur la tumorigenèse, la croissance tumorale et la formation de métastase. Des cellules de mélanome humain primaire (WM278), métastatique (WM1617) ou primaire surexprimant Nck2 (N7, N14) ou exprimant la protéine contrôle GFP (C2) ont été injectées sous la peau du flanc droit de souris femelles immunodéficientes (Nude CD-1), à raison de 5 souris par lignée cellulaire. Puisque la faible surexpression de Nck2 dans le clone N15 n'a pas permis d'observer de différences significatives dans les essais *in vitro*, le clone N15 n'a pas été utilisé pour l'étude *in vivo*, afin de minimiser le nombre d'animaux. Le clone N7 a été utilisé afin de dissocier un effet sur la tumorigenèse et la formation de métastase de l'effet prolifératif de Nck2 observé *in vitro*, puisque le clone N7 ne présentait pas d'augmentation significative de la prolifération, contrairement au clone N14. La taille des tumeurs a été mesurée à chaque semaine à partir du moment d'injection. Les souris ont été sacrifiées lorsque la tumeur primaire atteignait un volume supérieur à 1,5 cm³. Autrement, les souris ont été sacrifiées au jour 137 postinjection (19,6 semaines). Les résultats recueillis sont résumés dans le tableau I (p. 57) et la figure 22 (p. 58). Les résultats bruts sont montrés en annexe (Annexe 1, p. xv).

Tableau I : Tumorigenèse et potentiel métastatique des cellules de mélanome humain

Lignée cellulaire	Tumorigenèse au site d'injection		Potentiel métastatique
	Moment d'apparition de la première tumeur [†] (Nbr. sem. postinjection)	Nombre de souris présentant une tumeur [†] 19,6 sem. postinjection	Moment d'apparition d'une masse aux ganglions inguinaux (Nbr. sem. postinjection)
WM278	12	1	8
WM1617	2	5	6
C2	16	1	7
N7	14	2	5
N14	13	2	5

[†]Le volume seuil pour qu'une masse soit considérée comme une tumeur est de 50mm³

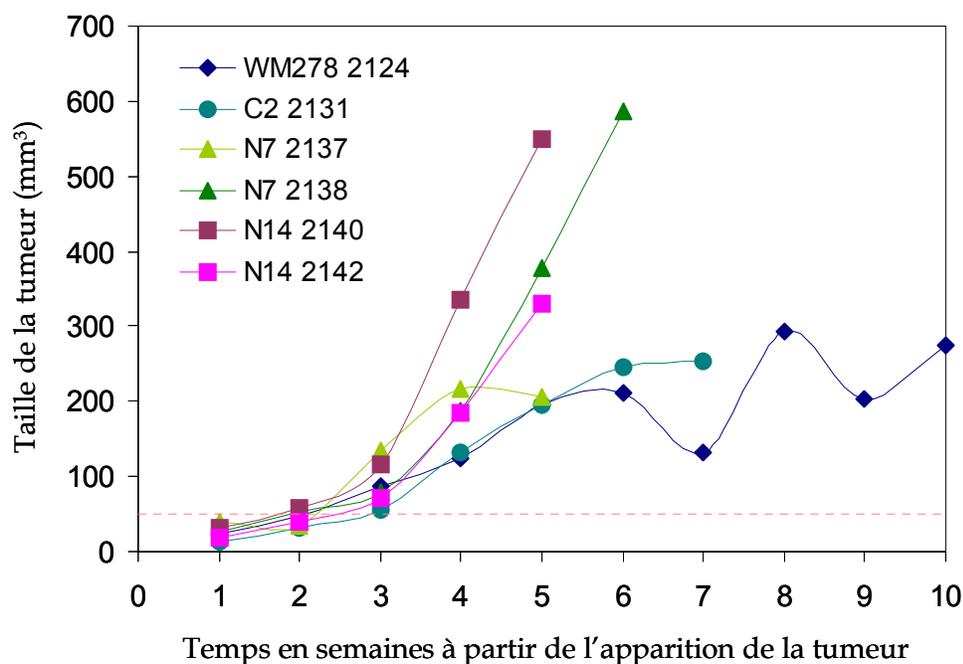


Figure 22 : Croissance tumorale au site d'injection de cellules de mélanome primaire WM278 exprimant ou non les protéines GFP ou GFP-Nck2 chez des souris CD-1 immunodéficientes.

Des cellules de mélanome humain primaire WM278 parentales ou exprimant la protéine contrôle GFP (C2) ou la protéine de fusion GFP-Nck2 (N7 et N14) ont été injectées sous la peau du flanc droit de 5 souris CD-1 (Nude) par lignée (5×10^6 cellules). La taille de la tumeur au site d'injection a été mesurée chaque semaine et le volume calculé selon l'équation $V = \text{Longueur} \times \text{Largeur}^2 \times \pi/6$. La semaine 1 correspond au moment où la masse au site d'injection dépassait un volume de 10 mm^3 . Chaque courbe représente le profil de la croissance tumorale chez une seule souris. Le trait pointillé rouge indique le volume seuil de 50 mm^3 pour qu'une masse soit considérée comme une tumeur.

Les souris injectées avec les cellules WM1617 ont rapidement présenté des tumeurs avec un haut taux de croissance. Deux semaines seulement après l'injection, deux souris de ce groupe présentaient déjà une masse ayant un volume supérieur à 50 mm^3 (Tableau I, p. 57). Ces deux souris ont dû être euthanasiées moins de 6 semaines après l'injection, parce que leur tumeur atteignait la limite de $1,5 \text{ cm}^3$ permise par le comité d'éthique en soins animalier de l'Université McGill. Après huit semaines, toutes les souris injectées avec les cellules métastatiques WM1617 présentaient une tumeur (Tableau I) et quatre des cinq souris ont dû être euthanasiées avant la fin de l'expérience en raison de la taille de leur tumeur. Dans le cas des quatre autres lignées, les cellules cancéreuses sont demeurées dormantes durant 10 semaines avant de commencer à former des tumeurs au site d'injection. Parmi les souris injectées avec des cellules WM278, la première tumeur est apparue dans le

groupe de souris injectée avec les cellules parentales, puis dans l'ordre : chez deux souris du groupe N14, une dans le groupe N7, une deuxième dans le groupe WM278, une première dans le groupe C2 et finalement une deuxième dans le groupe N7. Bien que les masses tumorales soient apparues un peu plus tardivement dans le groupe de souris injectées avec les cellules N14 que dans le groupe WM278, elles étaient plus nombreuses dans les groupes N7 et N14 (Tableau I, p. 57) et le taux de croissance des tumeurs surexprimant Nck2 était plus élevé que celui des tumeurs contrôles GFP ou non transfectées (Figure 22, p. 58). Le fait que des résultats semblables aient été obtenus chez les souris injectées avec les cellules N7 et N14 suggère qu'il ne s'agit pas d'un artéfact et que l'expression de hauts niveaux de Nck2 confère un avantage pour le développement tumoral.

Les deux souris du groupe N14 qui présentaient une tumeur, ainsi que l'une des souris du groupe N7, ont dû être euthanasiées avant la fin de l'expérience, parce que le centre de la tumeur était ulcéré. Aucune des tumeurs chez les souris injectées avec des cellules WM278 parentales ou contrôle n'a montré un tel phénotype. Des analyses histologiques sont en cours pour déterminer l'origine de cette nécrose du tissu tumoral.

Cinq semaines après l'injection sous-cutanée des mélanomes, une masse au niveau de l'aîne a été observée chez les deux groupes de souris injectées avec les cellules surexprimant Nck2 (N7 et N14), puis la semaine suivante chez des souris injectées avec les cellules métastatiques et finalement, ces masses ont été observées chez les souris injectées avec les cellules primaires ou contrôle à partir de la septième semaine (Tableau I, p. 57). À la fin de l'expérience, au jour 137, toutes les souris présentaient des ganglions lymphatiques plus ou moins enflés. Ce phénomène peut résulter d'une simple réponse inflammatoire ou de la dissémination métastatique. La présence d'inflammation ou de métastases devra être confirmée par l'analyse histologique des ganglions lymphatiques qui ont été prélevés au moment de l'euthanasie des souris.

Étant donnée le petit nombre de souris ayant développé une tumeur parmi celles injectées avec des cellules WM278 parentales ou transfectées (1-2 souris par groupe,

soit trop peu pour permettre une analyse statistique), il n'est pas possible pour l'instant de conclure si les résultats observés quant à l'effet de la surexpression de Nck2 sur la tumorigenèse, la croissance tumorale et le potentiel métastatique sont significatifs ou non. Des études additionnelles devront être menées pour confirmer les observations préliminaires. De plus, l'analyse histologique des tumeurs, des poumons et du foie, prélevés chez toutes les souris de l'étude, est nécessaire pour déterminer si la surexpression de Nck2 est importante dans le processus de métastases.

4 DISCUSSION

La dissémination métastatique est associée à de faibles chances de survie dans les cas de mélanomes humains, comme pour d'autres cancers. Le développement de métastases est un processus qui se fait en plusieurs étapes et nécessite la réorganisation du cytosquelette d'actine pour permettre la migration et l'invasion cellulaire^{14, 16}. La protéine Nck2 est un adaptateur protéique principalement impliqué dans la réorganisation du cytosquelette²⁹. Une étude préliminaire réalisée au laboratoire avait révélé que les niveaux de la protéine Nck2 et de son ARNm sont augmentés dans les lignées de mélanome métastatiques en comparaison aux lignées primaires¹⁰⁷. Le but de la présente recherche était donc d'étudier le rôle de l'adaptateur Nck2 dans la progression métastatique.

Les résultats obtenus dans cette étude confirment que l'expression de Nck2 augmente de façon marquée au cours de la progression métastatique du mélanome humain. Cette étude révèle en plus que l'expression de hauts niveaux de Nck2 dans les cellules de mélanome primaire stimule la prolifération cellulaire et la migration bidimensionnelle suite à une rayure, n'affecte pas l'invasion d'une matrice de collagène de type I, mais semble affaiblir les contacts cellule-cellule et l'adhésion au substrat. La diminution apparente d'adhésion des cellules qui expriment fortement Nck2 corrèle avec une baisse des niveaux d'expression de molécules d'adhésion et du nombre de foyers d'adhésion focaux (FAs). Une étude préliminaire effectuée *in vivo* révèle que ces phénomènes se traduisent par une augmentation de la tumorigénèse et de la croissance tumorale.

4.1 Expression de Nck2 dans le mélanome humain

Une étude préliminaire effectuée au sein du laboratoire avait caractérisé les niveaux d'expression des deux Nck dans différentes lignées cancéreuses. Les résultats avaient alors révélé que l'expression de Nck1 semble augmenter lors de la transformation cellulaire, tandis que l'expression de Nck2 augmente de façon marquée entre les lignées primaire et métastatique. Ces observations ont été confirmées dans la présente étude (Figure 13a, p. 42). La comparaison d'une lignée

primaire et d'une lignée métastatique provenant de la même patiente a permis d'éliminer le facteur de variation interindividu et de consolider l'hypothèse que l'expression de hauts niveaux de Nck2 corrèle avec la progression métastatique.

La protéine Nck a été découverte accidentellement lors du criblage d'une librairie d'expression de mélanome humain³². Le fait que la protéine Nck ait été repêchée à plusieurs reprises comme un faux positif lors de ce criblage suggérait que les niveaux d'ARNm de Nck sont élevés dans les cellules de mélanome. En accord avec cette hypothèse, une étude a démontré que les niveaux d'ARNm de Nck2 étaient augmentés dans les échantillons de mélanome métastatique en comparaison aux échantillons provenant de lésions mélanocytiques d'un stade peu avancé (nevocellular nevus)¹¹⁰. La présente étude est la première à démontrer que les niveaux de la protéine Nck2 sont aussi augmentés au cours de la progression métastatique du mélanome.

L'analyse des niveaux d'expression d'autres adaptateurs protéiques montre que la régulation de l'expression au cours de la progression métastatique du mélanome est spécifique à Nck2 (Figure 13b, p. 42). Même les niveaux de Nck1, son homologue, et de CrkII, un adaptateur très semblable au niveau structural, demeurent inchangés. Il s'agit de la première démonstration que les niveaux de Nck1 et Nck2 peuvent être régulés différemment. Bien que les études dans des souris génétiquement dépourvues de Nck montrent que Nck1 et Nck2 sont fonctionnellement redondants, de plus en plus d'études leur associent des fonctions distinctes. L'une des premières en ce sens fut celle révélant que Nck1 et Nck2 se lient à différents sites sur le récepteur PDGF β et que seul Nck2 induit la réorganisation du cytosquelette d'actine en aval de ce récepteur⁴². Il a aussi été démontré que seul Nck2 lie la protéine PINCH, un important régulateur de la signalisation des intégrines, et que suivant cette interaction, Nck2 est impliqué dans la régulation du renouvellement des complexes d'adhésion focaux^{63, 80}. Dans cette étude, nous avons tenté d'étudier la spécificité de Nck2 par rapport à Nck1 dans la progression métastatique. Des cellules de mélanome primaire WM278 surexprimant Nck1 ont été développées et analysées parallèlement aux clones surexprimant Nck2. Cependant, les différents clones Nck1 que nous avons

isolés se comportaient de façon diamétralement opposée dans les essais de prolifération, d'adhésion et de migration et aucune corrélation n'a pu être observée avec les niveaux d'expression (données non montrées). Il n'était pas possible de déterminer si les résultats contradictoires observés étaient dus à un artefact clonal ou à un réel effet de Nck1. De nouveaux clones surexprimant Nck1 devront donc être développés pour déterminer si le rôle de Nck dans les processus cellulaires associés à la progression métastatique est unique à l'homologue Nck2.

4.2 Nck2 dans la progression métastatique du mélanome humain

4.2.1 Nck2 stimule la croissance cellulaire

Les résultats de la présente étude ont permis de démontrer que la surexpression de Nck2 stimule la prolifération cellulaire *in vitro* (Figure 15, p. 45) et semble favoriser la croissance tumorale *in vivo* (Figure 22, p. 58). Ces observations sont en accord avec le fait que l'adaptateur Nck2 est connu pour faire partie de la cascade de signalisation induite par l'activation de différents récepteurs de facteurs de croissance. Nck2 est notamment impliqué dans la signalisation du PDGFR⁴², du VEGFR2¹¹⁷ et du récepteur de l'insuline^{48, 118}. De plus, d'autres études ont déjà rapporté que Nck est impliqué dans la régulation positive de la prolifération des lymphocytes T en réponse à l'activation du récepteur de cellules T^{119, 120}.

De façon générale, l'une des principales voies de signalisation qui régule la prolifération cellulaire est celle des MAPKs. Les résultats ont révélé que la voie MEK/ERK n'est pas activée davantage dans les cellules surexprimant Nck2 en comparaison aux cellules contrôle C2 (Figure 19, p. 53). Puisque cette voie de signalisation est déjà activée par une mutation du gène BRAF dans les cellules de mélanomes utilisées dans cette étude, il n'est pas surprenant que cette voie ne soit pas davantage activée par la surexpression de Nck2. Rockow et ses collègues¹²¹ ont démontré que Nck pouvait favoriser la prolifération cellulaire sans affecter la voie des MAPKs. Il a aussi été rapporté que Nck est impliqué dans la division cellulaire en aval du PDGFR par une voie indépendante de Ras. Il est donc possible que Nck2 contribue à la prolifération cellulaire en participant à d'autres voies de signalisation que celle de Ras-Raf-MEK-ERK. En effet, différentes études ont démontré que Nck

est impliqué dans l'activation de la kinase JNK^{117, 122-125}, un autre membre de la famille des MAPKs qui est aussi impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire et l'apoptose¹²⁶. La GTPase Rac1 est aussi connue pour réguler la prolifération des cellules cancéreuses¹²⁷⁻¹²⁹. Bauer et ses collègues ont rapporté que la lignée de mélanome FEMX-I hautement proliférative exprimait des niveaux plus élevés de Rac1 que la lignée FEMX-V ayant un taux de prolifération moins rapide¹²⁸. Plus récemment, il a été démontré que DOCK1, une GEF pour Rac1, est exprimée dans les cellules de cancer de l'ovaire SKOV3 et s'associe avec CrkI et ELMO1. L'inhibition de l'expression de DOCK1 dans ces cellules entraîne une diminution de l'activité de Rac1 qui se traduit par un changement de morphologie et une réduction de la prolifération et de la migration¹²⁹. Étant donné que Nck2 interagit avec la protéine DOCK1⁵⁵, il est aussi possible que Nck2 contribue à la prolifération des mélanomes par l'intermédiaire de Rac1. Finalement, Nck est reconnu pour réguler la synthèse protéique au niveau de la traduction¹⁰⁰. Il pourrait donc stimuler indirectement la prolifération cellulaire en augmentant la synthèse des protéines qui favorisent la croissance et la division cellulaire. Ces différents mécanismes pourraient expliquer l'effet positif de Nck2 sur la prolifération cellulaire.

4.2.2 *Nck2 stimule la migration bidimensionnelle*

L'analyse de la migration des cellules de mélanome par l'essai de recouvrement suite à une rayure a permis de démontrer que Nck2 stimule ce mode de migration (Figure 16, p. 47). L'importance de Nck dans la migration bidimensionnelle sur une surface solide avait déjà été démontrée en utilisant des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) dépourvus des deux gènes *Nck* (Double Knock Out)^{41, 79}. Dans ces études, le recouvrement suite à la rayure était presque totalement inhibé par la suppression des deux gènes *Nck* et la réintroduction du gène *Nck1* permettait de rétablir que partiellement la migration, suggérant que les deux Nck sont nécessaires pour la migration dans ces conditions^{41, 79}.

Le processus de migration cellulaire nécessite la réorganisation du cytosquelette d'actine pour que la cellule se projette vers l'avant, ainsi que la dissociation et la formation en continu des complexes d'adhésion focaux pour permettre l'attachement

des nouvelles projections de la membrane à l'avant et le détachement de l'arrière de la cellule⁷¹. Les résultats d'immunofluorescence n'indiquent pas de changements majeurs au niveau de l'organisation du cytosquelette d'actine suite à la surexpression de Nck2 dans les mélanomes primaires (Figure 20a, p. 54). Cependant, le marquage de l'actine a été réalisé sur des cellules adhérentes durant 24 h de culture sur une lame de verre. Il est possible que, dans un contexte propice à la migration, les cellules présentant de plus hauts niveaux de Nck2 produisent plus de projections membranaires. Pour répondre à cette question, il faudrait étudier la dynamique du processus en marquant l'actine de cellules à différents temps après la rayure du tapis cellulaire ou, même, en suivant la réorganisation d'actine en temps réel. Pour ce qui est des complexes d'adhésion focaux (FAs), les résultats d'immunofluorescence indiquent que la surexpression de Nck2 diminue le nombre de FAs par cellule (Figure 20c et d, p. 54). Ces résultats sont en accord avec une récente étude qui a démontré que le nombre de FAs est diminué en réponse à l'engagement de Nck par la kinase Abl⁸³. Par contre, il a aussi été rapporté que la suppression des deux gènes Nck dans les MEFs cause aussi une diminution du nombre de FAs⁷⁹. La contradiction apparente entre ces résultats et ceux présentés ici peut s'expliquer par le fait que les analyses ont été effectuées après différents temps d'adhésion et aussi par la différence entre la suppression des deux gènes ou la surexpression d'un seul des Nck. En tant qu'adaptateur, l'augmentation tout comme la diminution des niveaux de Nck2 altèrent l'homéostasie des complexes protéiques dont il fait partie. Dans un cas comme dans l'autre, les résultats montrent qu'un certain niveau de Nck2 est important pour maintenir l'homéostasie et permettre la régulation du nombre de complexes d'adhésion. Finalement, le phénomène le plus important pour la migration cellulaire n'est peut-être pas le nombre de FAs comme tel, mais plutôt le taux de renouvellement des FAs selon le sens de la migration^{18,19}. Comme il a été suggéré pour l'actine, les complexes d'adhésion devraient aussi être étudiés de façon dynamique lors de l'essai de migration afin de déterminer si la surexpression de Nck2 dans les cellules de mélanome induit un taux de renouvellement des FAs favorable à la migration.

4.2.3 Nck2 et l'invasion cellulaire

L'analyse de l'invasion par la culture de sphéroïdes dans une matrice composée à 80 % de collagène de type I n'a pas permis d'observer de différences significatives entre les différents clones et lignées cellulaires au niveau de la distance d'invasion. Cependant, ce résultat ne permet pas de conclure que Nck2 n'exerce aucun effet sur l'invasion cellulaire dans un contexte physiologique et n'exclut pas la possibilité que Nck2 soit impliquée dans la progression métastatique. Différentes études ont révélé que les résultats d'invasion sont grandement influencés par la densité et la nature de la matrice utilisée^{130,131}. Entre autres, une étude menée avec des cellules du cancer de l'ovaire a montré que l'invasion dans une matrice de collagène de type I extrait à l'aide de la pepsine, comme celui de la marque PureCol utilisée ici, ne nécessite pas l'activité de métalloprotéases¹³². Cela signifie que si les cellules WM1617 ou N14 possèdent un avantage d'invasion attribuable à une plus grande activité des métalloprotéases, cet effet n'a pu être apprécié dans le modèle utilisé ici. Bien que nous ayons tenté de choisir les conditions les plus favorables pour déterminer si la surexpression de Nck2 peut influencer l'invasion, les conditions utilisées n'étaient pas nécessairement celles optimales. D'autres analyses sont en cours pour répondre à cette question en utilisant une matrice 2D de Matrigel™ dans un essai appelé « Chambres de Boyden ». Il serait aussi pertinent de réaliser de nouvelles analyses avec les sphéroïdes en utilisant d'autres densités ou d'autres composantes comme matrice, afin de déterminer si Nck2 peut influencer l'invasion cellulaire dans d'autres contextes que la matrice composée à 80 % de collagène de type I utilisée ici.

Bien qu'une stimulation de l'invasion par la surexpression de Nck2 n'a pas pu être observée directement, plusieurs évidences suggèrent un tel rôle pour Nck2. Dans un premier temps, les résultats *in vivo* ont montré que les souris injectées avec des cellules surexprimant Nck2 ont présenté une masse au niveau des ganglions lymphatiques inguinaux de façon plus hâtive que celles injectées avec les cellules contrôles (Tableau I, p. 57). Si cette observation représente bien une infiltration de cellules de mélanome dans le ganglion, ce résultat suggère que les cellules N14 auraient traversé plus rapidement les tissus sains au site d'injection pour atteindre la

circulation lymphatique. Ensuite, les images préliminaires d'autofluorescence indiquent que Nck2 est localisé dans des structures membranaires apparentées aux invadopodes (Figure 21, p. 56). Considérant le rôle de Nck dans la formation d'invadopodes¹⁰⁹, il est possible que la surexpression de Nck2 dans les cellules de mélanome primaire stimule leur capacité d'invasion en favorisant la formation de ces structures d'actine.

En parallèle, la culture des sphéroïdes a permis d'observer que les cellules métastatiques WM1617 formaient des sphères moins compactes que les cellules de mélanome primaire WM278. Les sphéroïdes composés de cellules primaires exprimant fortement Nck2 (N14) semblent aussi se dissocier plus facilement que ceux de cellules primaires contrôles (C2 ou WM278). Il a été rapporté qu'une variation au niveau de la cohésion des sphéroïdes se traduit par une variation au niveau de la capacité d'invasion de la matrice *in vitro*^{133, 134}. L'une de ces études, utilisant des lignées cellulaires du cancer de l'ovaire, révèle que plus les sphères sont cohésives, plus elles seront invasives¹³³. Au contraire, une autre étude, utilisant des cellules tumorales du cerveau, affirme que les sphères les plus cohésives sont moins invasives¹³⁴. Cette divergence de relation ne permet pas de présumer quelles cellules seraient plus ou moins invasives dans notre modèle d'étude, mais ces études suggèrent que la surexpression de Nck2 pourrait effectivement modifier les capacités d'invasion dans les conditions optimales d'analyse puisque Nck2 affecte la cohésion des sphéroïdes.

Les images de sphéroïdes ont aussi permis de constater que la morphologie des cellules WM1617 est différente de celle des autres lignées. Ces différences morphologiques étaient aussi observables lors de la culture cellulaire. Les cellules métastatiques WM1617 sont filiformes et présentent de longues projections à la manière des fibroblastes. Les cellules primaires WM278 au contraire sont arrondies et plus étalées. À faible confluence, les cellules N14, qui surexpriment Nck2, adoptent une morphologie semblable aux cellules WM278, mais à confluence elles ont tendance à se compacter davantage que les cellules parentales ou contrôle C2. Le phénomène de transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) est un processus

associé à la progression du cancer et qui implique entre autres les changements de morphologie¹³⁵. Les cellules cancéreuses originaires d'un tissu épithélial vont modifier le profil d'expression des molécules de surface afin d'adopter un phénotype plus semblable aux cellules mésenchymateuses. Cette transformation facilite l'invasion des tissus avoisinants par la cellule cancéreuse pour éventuellement permettre la dissémination métastatique¹³⁵. La transition morphologique peut aussi être associée à différents modes de migration cellulaire¹³⁶. La migration mésenchymateuse est généralement associée aux cellules de forme allongée et nécessite la sécrétion de protéases¹³⁶. La migration amiboïde, quant à elle, est plus souvent associée aux cellules de forme arrondie. Elle est indépendante des protéases, mais implique l'activité contractile de l'actomyosine¹³⁶. Selon Sanz-Moreno et ses collègues¹³⁶, les deux types de migration sont nécessaires pour observer une dissémination métastatique efficace et adaptée au microenvironnement. La migration mésenchymateuse est plus propice pour l'invasion de matrices denses parce les métalloprotéases produites permettent de digérer la matrice. À l'opposé, les cellules amiboïdes envahissent mieux les matrices à faible densité qui sont suffisamment souples pour permettre aux cellules de se faufiler entre les mailles de la matrice¹³⁶. La migration mésenchymateuse implique l'activité des protéines NEDD9, DOCK3, Rac1 et Wave2, tandis que la migration amiboïde implique les protéines Rho, ROCK et la phosphorylation de pMCL2. Ces deux modes de migration sont mutuellement exclusifs puisque des interactions moléculaires spécifiques associées à ceux-ci causent une inhibition réciproque des voies de signalisation¹³⁶. L'interaction avec Nck2 a été démontrée autant pour des protéines de la voie mésenchymateuse (des GEFs pour Rac1, dont DOCK1⁵⁵, ou des effecteurs de Rac1, dont WIP⁶⁵ et WAVE⁶⁷) que pour des protéines de la voie amiboïde (GEFs pour Rho¹³⁷). L'homéostasie des complexes associés à Nck2 pourrait donc être un facteur déterminant du type de migration utilisé et pourrait ainsi faciliter l'invasion des cellules cancéreuses en contribuant à son adaptation au microenvironnement rencontré.

4.2.4 *Nck2 fragilise les contacts cellule-cellule et cellule-matrice*

Le comportement des sphéroïdes en culture suggère que la surexpression de Nck2 fragilise les contacts intercellulaires. Cette constatation est supportée par les résultats d'immunobuvardage qui montrent que les niveaux d'expression des cadhérines sont diminués dans les cellules de mélanome primaire présentant de hauts niveaux de Nck2 (Figure 18, p. 51). Une étude effectuée chez *Xenopus* au stade de blastula a déjà démontré que Nck2 pouvait être impliqué dans la régulation des contacts cellule-cellule¹³⁸. Dans ce modèle d'étude, l'expression ectopique de Nck2 est requise pour induire la perte d'adhésion intercellulaire observée suite à l'activation du récepteur à activité tyrosine kinase EphA4. Une récente étude a révélé que la cortactine est impliquée dans la régulation des contacts cellule-cellule établis par l'engagement des E-cadhérines à la surface des cellules adjacentes¹⁰⁸. L'interaction des E-cadhérine dans les jonctions adhérentes induit l'activation de kinases de la famille de Src qui phosphorylent ensuite la cortactine. Une fois phosphorylée, cette dernière favorise l'activation du complexe Arp2/3 et stimule ainsi la polymérisation d'actine qui stabilise les complexes d'adhésion formés par les E-cadhérines¹⁰⁸. Puisque Nck couple la phosphocortactine à N-WASP et WIP⁷², il est possible que la surexpression de Nck2 déstabilise les contacts intercellulaires entre autres en interférant avec cette voie de signalisation initiée par les E-cadhérines. Les molécules d'adhésions exprimées en surface sont synthétisées dans le RE, comme toutes les protéines membranaires. Il a été rapporté que Nck participe à la réponse UPR du RE en conditions de stress^{33, 56, 103} et peut donc indirectement affecter la capacité de synthèse protéique du RE. Ainsi, la surexpression de Nck2 dans les mélanomes primaires pourrait altérer l'expression des cadhérines et des intégrines à la membrane plasmique en modulant leur synthèse par le RE. L'altération des contacts cellule-cellule par les mécanismes proposés soutient les résultats observés lors de la culture des sphéroïdes et suggère que l'expression de hauts niveaux de Nck2 dans le mélanome pourrait faciliter le détachement de cellules invasives de la tumeur primaire.

Selon les analyses préliminaires d'adhésion, les observations faites lors de la culture cellulaire et les essais de migration, les contacts cellule-matrice semblent aussi altérés dans les cellules de mélanome métastatiques et dans les cellules surexprimant Nck2 en comparaison aux cellules primaires. L'adhésion cellulaire au substrat dépend de l'interaction des intégrines avec la matrice extracellulaire et de l'échafaudage de complexes d'adhésion focaux (FAs)⁸¹. Les résultats d'immunobuvardage montrent que, comme pour les cadhérines, les niveaux d'expression des intégrines sont diminués dans les cellules de mélanome métastatique et les clones surexprimant Nck2 (Figure 18, p. 51), supportant l'hypothèse que la capacité d'adhésion au substrat est diminuée dans ces cellules. La diminution du nombre de complexes d'adhésion focaux (FAs) observée par immunofluorescence (Figure 20, p. 54) peut aussi expliquer la diminution d'adhésion au substrat dans les cellules de mélanome métastatique ou les cellules de mélanome primaire surexprimant Nck2.

4.2.5 Effets *in vivo* de la surexpression de Nck2 dans le mélanome

Les résultats obtenus *in vivo* suggèrent que les effets de Nck2 sur la prolifération et la migration des cellules de mélanome observés *in vitro* se traduisent par une légère augmentation de la tumorigenèse. Jusqu'à présent, peu d'études se sont penchées sur le potentiel oncogénique de Nck et aucune ne s'est intéressée spécifiquement à Nck2. Les premières études ayant identifié Nck comme un oncogène ont toutefois révélé que l'injection de fibroblastes surexprimant Nck1 résultait en la formation de tumeurs chez des souris BALB/c nues¹⁰⁶. Les analyses effectuées jusqu'à maintenant ne permettent pas de conclure avec certitude quant à l'importance de Nck2 dans la progression métastatique *in vivo*. L'apparition plus hâtive d'une masse au niveau des ganglions lymphatiques des souris injectées avec les cellules N14 suggère toutefois que la surexpression de Nck2 serait favorable à la dissémination métastatique, mais les analyses histologiques sont nécessaires avant d'avancer une conclusion définitive à ce sujet. Finalement, la nécrose observée chez les tumeurs engendrées par l'injection de mélanomes primaires surexprimant Nck2 pourrait être due à une mauvaise irrigation sanguine de la masse tumorale. Pak et Dok1, deux partenaires

d'interaction de Nck2, ont été impliquées au niveau de l'angiogenèse puisqu'ils stimulent la migration des cellules endothéliales vasculaires¹³⁹. La surexpression de Nck2 dans le mélanome primaire pourrait inhiber l'angiogenèse en altérant ces voies de signalisation. Dans l'ensemble, les résultats obtenus *in vivo* suggèrent que la surexpression de Nck2 favorise la tumorigenèse (apparition de tumeurs) et possiblement la formation de métastases. La surexpression de Nck2 semble aussi favoriser la croissance tumorale dans les premiers moments suivant l'établissement de la tumeur, mais elle pourrait par la suite limiter cette croissance en affectant l'angiogenèse.

4.3 Modèle

À la lumière des résultats obtenus, il est possible d'élaborer un modèle, tel que présenté à la figure 23 (p. 72), dans lequel Nck2 joue un rôle dans la progression métastatique du mélanome. Selon le modèle proposé, les niveaux d'expression de Nck2 se trouvent augmentés dans les cellules de mélanome en phase de croissance verticale (VGP; ii) au cours de la progression de ce type de cancer. Les cellules surexprimant Nck2 se multiplient plus rapidement, mais surtout, elles se détachent plus facilement de la tumeur primaire, parce que les contacts intercellulaires sont fragilisés et les interactions avec la matrice environnantes sont altérées (iii). Les cellules isolées migrent ensuite vers les vaisseaux sanguins ou lymphatiques à proximité pour éventuellement établir de nouvelles colonies dans une niche distante (iv; Figure 23, p. 72).

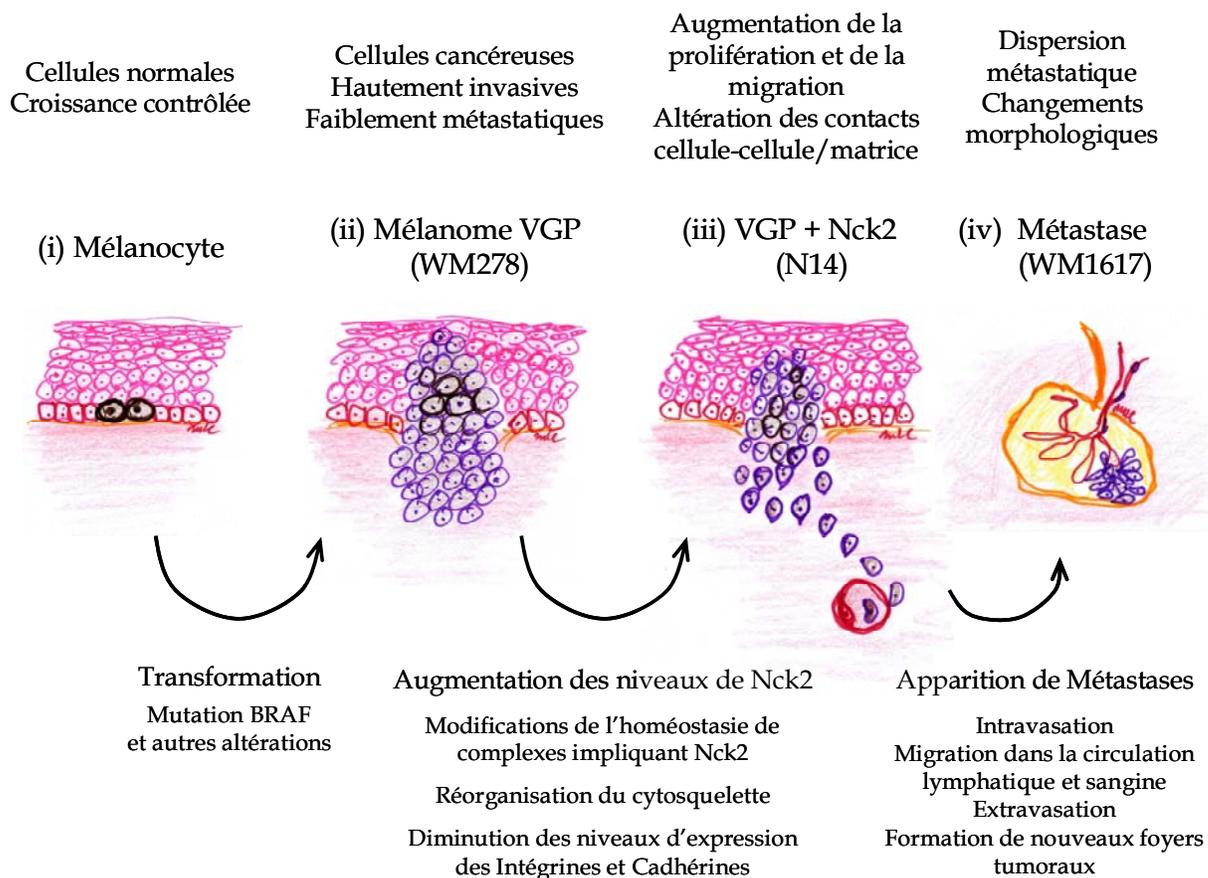


Figure 23 : Modèle décrivant l'implication de Nck2 dans la progression métastatique du mélanome humain © Mélissa Labelle-Côté, 2009

Au niveau moléculaire, l'homéostasie de nombreux complexes protéiques semble être altérée par l'action des adaptateurs protéiques et plus particulièrement lors de la progression du cancer^{14, 28, 140}. Il est possible que, durant la progression métastatique, Nck soit recruté dans un compartiment cellulaire en particulier, altérant ou prévenant complètement la formation des complexes dont Nck fait normalement partie dans les autres compartiments cellulaires. Un exemple de ce phénomène a déjà été décrit par Kremer et ses collègues³⁴ lorsqu'ils ont montré que le recrutement de Nck au noyau cellulaire par son interaction avec SOCS7 était indirectement responsable, par la diminution de sa concentration dans le cytosol, de la réorganisation du cytosquelette observée suite à une exposition aux rayons UV. Dans le modèle présenté ici, Nck2

pourrait être intensément mobilisé au niveau des invadopodes où il induirait la formation de complexes moléculaires favorisant l'invasion cellulaire (Figure 24, p. 73). En contrepartie, les complexes d'adhésion focaux (contacts cellule-matrice) et les jonctions adhérentes (contacts cellule-cellule) se trouveraient dépourvus de Nck2. La stabilité ou le nombre de ces complexes seraient alors diminués, entraînant une diminution des contacts cellule-matrice ou cellule-cellule. De façon générale, ce processus favorise une motilité accrue des cellules de mélanome qui, de concert avec d'autres modifications simultanées, pousserait la progression du mélanome vers la métastase.

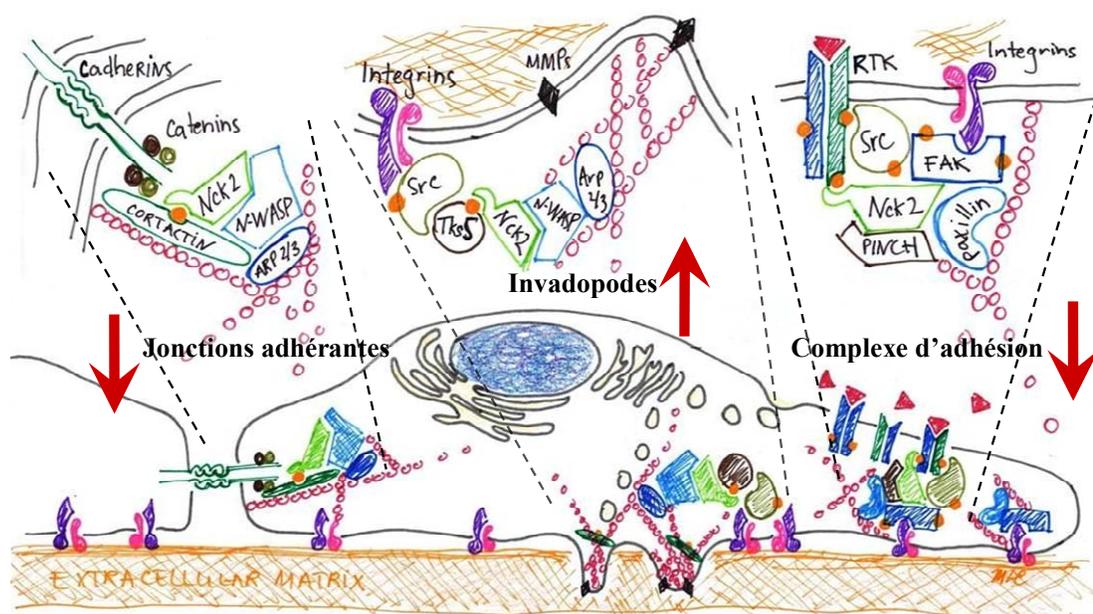


Figure 24 : Modèle moléculaire décrivant un rôle pour Nck2 dans la progression métastatique du mélanome humain © Mélissa Labelle-Côté, 2009

4.4 Pertinence des résultats

Lorsque l'on isole des clones cellulaires comme il a été fait dans cette étude pour établir les lignées de WM278 surexprimant Nck2, il y a toujours une chance d'isoler un clone ayant acquis des propriétés autres qui ne sont pas spécifiquement attribuables à la molécule surexprimée. C'est pour cette raison que les études ont été effectuées avec trois clones exprimant différents niveaux de Nck2. Le fait que la majorité des changements induits par la surexpression de Nck2 aient été observés

dans les différents clones de façon dose dépendante montre qu'il s'agit probablement d'un effet attribuable à Nck2 et non d'un artéfact clonal.

Dans les essais de prolifération, d'invasion et de migration, ainsi que dans l'étude *in vivo* et l'analyse du nombre de complexes d'adhésion focaux, les résultats observés pour les cellules N14 tendant vers ceux observés pour les cellules métastatiques WM1617 sans toutefois atteindre les mêmes niveaux de réponse. Puisque les cellules N14 présentent des niveaux d'expression de Nck2 comparables à ceux des cellules WM1617, ces résultats montrent que Nck2 n'est pas le seul facteur impliqué, mais qu'il contribue assurément à la progression métastatique du mélanome humain. En effet, une récente étude a démontré que l'expression de l'adaptateur Gab2 est aussi augmentée au cours de la progression métastatique du mélanome et que cette augmentation des niveaux de Gab2 stimule l'invasion et la migration *in vitro* en plus de favoriser la croissance tumorale et la formation de métastases *in vivo*¹⁴¹. Dans l'ensemble, cela suggère que différents adaptateurs, et autres protéines, coopèrent pour favoriser la progression métastatique.

CONCLUSION

Cette étude a démontré, par l'entremise d'analyses réalisées *in vitro*, que la surexpression de Nck2 dans des cellules de mélanome humain primaire favorise différents processus cellulaires associés à la progression métastatique, telles la migration et la prolifération. L'étude pilote réalisée *in vivo* suggère que la surexpression de Nck2 augmente tumorigenèse et croissance tumorale des cellules de mélanome. Cependant, l'analyse histologique des organes prélevés au cours de cette étude devra être effectuée avant de pouvoir conclure définitivement au sujet du rôle de Nck2 dans la progression métastatique. Des analyses *in vitro* supplémentaires seront aussi nécessaires pour confirmer si Nck2 modifie les capacités d'adhésion et d'invasion des cellules de mélanome. Dans un second temps, l'implication de Nck2 dans la progression métastatique pourra être confirmée en inhibant l'expression de Nck2 dans des cellules de mélanome métastatiques WM1617 et WM164 au moyen d'ARN antisens. Une telle étude permettrait de déterminer s'il est possible de renverser ou d'atténuer le processus de métastase par l'inhibition de l'expression de Nck2.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus suggèrent que Nck2 pourrait effectivement jouer un rôle dans la progression métastatique du mélanome en favorisant la prolifération des cellules tumorales et en facilitant leur détachement de la tumeur primaire. Les cellules de mélanome surexprimant Nck2 seraient donc plus aptes à se disperser dans l'organisme et à établir de nouvelles colonies métastatiques. Au niveau moléculaire, nous suggérons que Nck2 est recruté dans les invadopodes pour favoriser la formation de complexes protéiques qui stimulent l'invasion. La mobilisation de Nck2 dans ces structures membranaires diminuerait sa disponibilité pour l'établissement d'autres complexes protéiques, entre autres dans les complexes d'adhésion focaux (FAs) et dans les jonctions adhérentes, diminuant ainsi les contacts des cellules cancéreuses avec la matrice extracellulaire et les cellules avoisinantes.

Étant donné que les niveaux d'expression de Nck2 sont aussi augmentés au cours de la progression métastatique d'autres cancers (Figure 8, p. 32), les effets de la surexpression de Nck2 observés dans le mélanome humain pourraient s'avérer

généralisés. De façon générale, ces travaux aident à la compréhension du processus métastatique et ces nouvelles connaissances pourraient éventuellement contribuer au développement de nouvelles approches thérapeutiques dans le but de contrer l'effarante maladie qu'est le cancer.

RÉFÉRENCES

1. American Cancer Society, 2009. *Cancer Facts & Figures 2009*. American Cancer Society: Atlanta.
2. Comité directeur de la Société canadienne du cancer, 2009. *Statistiques canadiennes sur le cancer*. Société canadienne du cancer: Toronto.
3. Bogenrieder, T. et Herlyn, M. 2002. *Cell-surface proteolysis, growth factor activation and intercellular communication in the progression of melanoma*. Crit Rev Oncol Hematol, **44**(1): p. 1-15.
4. Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C. et Marais, R. 2007. *Melanoma biology and new targeted therapy*. Nature, **445**(7130): p. 851-7.
5. Miller, A.J. et Mihm, M.C., Jr. 2006. *Melanoma*. N Engl J Med, **355**(1): p. 51-65.
6. Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., *et al.* 2002. *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature, **417**(6892): p. 949-954.
7. Satyamoorthy, K., Li, G., Gerrero, M.R., Brose, M.S., Volpe, P., *et al.* 2003. *Constitutive Mitogen-activated Protein Kinase Activation in Melanoma Is Mediated by Both BRAF Mutations and Autocrine Growth Factor Stimulation*. Cancer Res, **63**(4): p. 756-759.
8. Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., *et al.* 2005. *BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi*. Nature, **436**(7051): p. 720-724.
9. Wellbrock, C., Rana, S., Paterson, H., Pickersgill, H., Brummelkamp, T., *et al.* 2008. *Oncogenic BRAF Regulates Melanoma Proliferation through the Lineage Specific Factor MITF*. PLoS ONE, **3**(7): p. e2734.
10. Li, G. et Herlyn, M. 2000. *Dynamics of intercellular communication during melanoma development*. Mol Med Today, **6**(4): p. 163-9.
11. Halbleib, J.M. et Nelson, W.J. 2006. *Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis*. Genes & Development, **20**(23): p. 3199-3214.
12. Meighan, C.M. et Schwarzbauer, J.E. 2008. *Temporal and spatial regulation of integrins during development*. Current Opinion in Cell Biology, **20**(5): p. 520-524.
13. Foulds, L. 1954. *The Experimental Study of Tumor Progression: A Review*. Cancer Res, **14**(5): p. 327-339.

14. Hanahan, D. et Weinberg, R.A. 2000. *The hallmarks of cancer*. Cell, **100**(1): p. 57-70.
15. Takeichi, M. 1988. *The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis*. Development, **102**(4): p. 639-655.
16. Chambers, A.F., Groom, A.C. et MacDonald, I.C. 2002. *Metastasis: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nat Rev Cancer, **2**(8): p. 563-572.
17. McGee, S.F., Lanigan, F., Gilligan, E. et Groner, B. 2006. *Mammary gland biology and breast cancer. Conference on Common Molecular Mechanisms of Mammary Gland Development and Breast Cancer Progression*. EMBO Rep, **7**(11): p. 1084-8.
18. Gimona, M. et Buccione, R. 2006. *Adhesions that mediate invasion*. Int J Biochem Cell Biol, **38**(11): p. 1875-92.
19. Worth, D.C. et Parsons, M. 2008. *Adhesion dynamics: mechanisms and measurements*. Int J Biochem Cell Biol, **40**(11): p. 2397-409.
20. Yamaguchi, H. et Condeelis, J. 2007. *Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion*. Biochim Biophys Acta, **1773**(5): p. 642-52.
21. McCarty, J.H. 1998. *The Nck SH2/SH3 adaptor protein: a regulator of multiple intracellular signal transduction events*. Bioessays, **20**(11): p. 913-21.
22. Pawson, T. 1995. *Protein modules and signalling networks*. Nature, **373**(6515): p. 573-80.
23. Pawson, T. et Saxton, T.M. 1999. *Signaling networks--do all roads lead to the same genes?* Cell, **97**(6): p. 675-8.
24. Stein, A., Pache, R.A., Bernado, P., Pons, M. et Aloy, P. 2009. *Dynamic interactions of proteins in complex networks: a more structured view*. FEBS J, **276**(19): p. 5390-405.
25. Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., et al. 1993. *SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences*. Cell, **72**(5): p. 767-78.
26. Larose, L., Gish, G. et Pawson, T. 1995. *Construction of an SH2 domain-binding site with mixed specificity*. J Biol Chem, **270**(8): p. 3858-62.
27. Li, W., Fan, J. et Woodley, D.T. 2001. *Nck/Dock: an adapter between cell surface receptors and the actin cytoskeleton*. Oncogene, **20**(44): p. 6403-17.

28. Buday, L. 1999. *Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins*. Biochim Biophys Acta, **1422**(2): p. 187-204.
29. Buday, L., Wunderlich, L. et Tamas, P. 2002. *The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton*. Cell Signal, **14**(9): p. 723-31.
30. Pawson, T. 1995. *Protein-tyrosine kinases. Getting down to specifics*. Nature, **373**(6514): p. 477-8 FAU - Pawson, T.
31. Pawson, T. 2007. *Dynamic control of signaling by modular adaptor proteins*. Curr Opin Cell Biol, **19**(2): p. 112-6.
32. Lehmann, J.M., Riethmuller, G. et Johnson, J.P. 1990. *Nck, a melanoma cDNA encoding a cytoplasmic protein consisting of the src homology units SH2 and SH3*. Nucleic Acids Res, **18**(4): p. 1048.
33. Nguyen, D.T., Kebache, S., Fazel, A., Wong, H.N., Jenna, S., et al. 2004. *Nck-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase-1 and regulation of cell survival during endoplasmic reticulum stress*. Mol Biol Cell, **15**(9): p. 4248-60.
34. Kremer, B.E., Adang, L.A. et Macara, I.G. 2007. *Septins regulate actin organization and cell-cycle arrest through nuclear accumulation of NCK mediated by SOCS7*. Cell, **130**(5): p. 837-50.
35. Lawe, D.C., Hahn, C. et Wong, A.J. 1997. *The Nck SH2/SH3 adaptor protein is present in the nucleus and associates with the nuclear protein SAM68*. Oncogene, **14**(2): p. 223-31.
36. Margolis, B., Silvennoinen, O., Comoglio, F., Roonprapunt, C., Skolnik, E., et al. 1992. *High-efficiency expression/cloning of epidermal growth factor-receptor-binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, **89**(19): p. 8894-8.
37. Chen, M., She, H., Davis, E.M., Spicer, C.M., Kim, L., et al. 1998. *Identification of Nck family genes, chromosomal localization, expression, and signaling specificity*. J Biol Chem, **273**(39): p. 25171-8.
38. Huebner, K., Kastury, K., Druck, T., Salcini, A.E., Lanfrancone, L., et al. 1994. *Chromosome locations of genes encoding human signal transduction adapter proteins, Nck (NCK), Shc (SHC1), and Grb2 (GRB2)*. Genomics, **22**(2): p. 281-7.
39. Vorobieva, N., Protopopov, A., Protopopova, M., Kashuba, V., Allikmets, R.L., et al. 1995. *Localization of human ARF2 and NCK genes and 13 other NotI-linking clones to chromosome 3 by fluorescence in situ hybridization*. Cytogenet Cell Genet, **68**(1-2): p. 91-4.

40. Braverman, L.E. et Quilliam, L.A. 1999. *Identification of Grb4/Nckbeta, a src homology 2 and 3 domain-containing adapter protein having similar binding and biological properties to Nck*. J Biol Chem, **274**(9): p. 5542-9.
41. Bladt, F., Aippersbach, E., Gekkop, S., Strasser, G.A., Nash, P., et al. 2003. *The murine Nck SH2/SH3 adaptors are important for the development of mesoderm-derived embryonic structures and for regulating the cellular actin network*. Mol Cell Biol, **23**(13): p. 4586-97.
42. Chen, M., She, H., Kim, A., Woodley, D.T. et Li, W. 2000. *Nckbeta adapter regulates actin polymerization in NIH 3T3 fibroblasts in response to platelet-derived growth factor bb*. Mol Cell Biol, **20**(21): p. 7867-80.
43. Latreille, M., Laberge, M.K. et Larose, L., Manuscrit en préparation.
44. Li, W., Hu, P., Skolnik, E.Y., Ullrich, A. et Schlessinger, J. 1992. *The SH2 and SH3 domain-containing Nck protein is oncogenic and a common target for phosphorylation by different surface receptors*. Mol Cell Biol, **12**(12): p. 5824-33.
45. Nishimura, R., Li, W., Kashishian, A., Mondino, A., Zhou, M., et al. 1993. *Two signaling molecules share a phosphotyrosine-containing binding site in the platelet-derived growth factor receptor*. Mol Cell Biol, **13**(11): p. 6889-96.
46. Park, D. et Rhee, S.G. 1992. *Phosphorylation of Nck in response to a variety of receptors, phorbol myristate acetate, and cyclic AMP*. Mol Cell Biol, **12**(12): p. 5816-23.
47. Goicoechea, S.M., Tu, Y., Hua, Y., Chen, K., Shen, T.L., et al. 2002. *Nck-2 interacts with focal adhesion kinase and modulates cell motility*. Int J Biochem Cell Biol, **34**(7): p. 791-805.
48. Lee, C.H., Li, W., Nishimura, R., Zhou, M., Batzer, A.G., et al. 1993. *Nck associates with the SH2 domain-docking protein IRS-1 in insulin-stimulated cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, **90**(24): p. 11713-7.
49. Bagrodia, S., Taylor, S.J., Creasy, C.L., Chernoff, J. et Cerione, R.A. 1995. *Identification of a Mouse p21Cdc42/Rac Activated Kinase*. Journal of Biological Chemistry, **270**(39): p. 22731-22737.
50. Chou, M.M. et Hanafusa, H. 1995. *A novel ligand for SH3 domains. The Nck adaptor protein binds to a serine/threonine kinase via an SH3 domain*. J Biol Chem, **270**(13): p. 7359-64.
51. Lussier, G. et Larose, L. 1997. *A casein kinase I activity is constitutively associated with Nck*. J Biol Chem, **272**(5): p. 2688-94.

52. Su, Y.-C., Han, J., Xu, S., Cobb, M. et Skolnik, E.Y. 1997. *NIK is a new Ste20-related kinase that binds NCK and MEKK1 and activates the SAPK/JNK cascade via a conserved regulatory domain.* EMBO J, **16**(6): p. 1279-1290.
53. Choudhury, G.G., Marra, F. et Abboud, H.E. 1996. *Thrombin stimulates association of src homology domain containing adaptor protein Nck with pp125FAK.* Am J Physiol, **270**(2 Pt 2): p. F295-300.
54. Hu, Q., Milfay, D. et Williams, L.T. 1995. *Binding of NCK to SOS and activation of ras-dependent gene expression.* Mol Cell Biol, **15**(3): p. 1169-74.
55. Tu, Y., Kucik, D.F. et Wu, C. 2001. *Identification and kinetic analysis of the interaction between Nck-2 and DOCK180.* FEBS Lett, **491**(3): p. 193-9.
56. Latreille, M. et Larose, L. 2006. *Nck in a complex containing the catalytic subunit of protein phosphatase 1 regulates eukaryotic initiation factor 2alpha signaling and cell survival to endoplasmic reticulum stress.* J Biol Chem, **281**(36): p. 26633-44.
57. Zhao, Z.S., Manser, E. et Lim, L. 2000. *Interaction between PAK and nck: a template for Nck targets and role of PAK autophosphorylation.* Mol Cell Biol, **20**(11): p. 3906-17.
58. Lim, C.S., Park, E.S., Kim, D.J., Song, Y.H., Eom, S.H., et al. 2001. *SPIN90 (SH3 protein interacting with Nck, 90 kDa), an adaptor protein that is developmentally regulated during cardiac myocyte differentiation.* J Biol Chem, **276**(16): p. 12871-8.
59. Rivero-Lezcano, O.M., Sameshima, J.H., Marcilla, A. et Robbins, K.C. 1994. *Physical association between Src homology 3 elements and the protein product of the c-cbl proto-oncogene.* Journal of Biological Chemistry, **269**(26): p. 17363-17366.
60. Bokoch, G.M., Wang, Y., Bohl, B.P., Sells, M.A., Quilliam, L.A., et al. 1996. *Interaction of the Nck adapter protein with p21-activated kinase (PAK1).* J Biol Chem, **271**(42): p. 25746-9.
61. Rivero-Lezcano, O.M., Marcilla, A., Sameshima, J.H. et Robbins, K.C. 1995. *Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains.* Mol Cell Biol, **15**(10): p. 5725-31.
62. Wunderlich, L., Goher, A., Farago, A., Downward, J. et Buday, L. 1999. *Requirement of multiple SH3 domains of Nck for ligand binding.* Cell Signal, **11**(4): p. 253-62.
63. Tu, Y., Li, F. et Wu, C. 1998. *Nck-2, a novel Src homology2/3-containing adaptor protein that interacts with the LIM-only protein PINCH and*

- components of growth factor receptor kinase-signaling pathways. Mol Biol Cell, 9(12): p. 3367-82.*
64. Rohatgi, R., Nollau, P., Ho, H.Y., Kirschner, M.W. et Mayer, B.J. 2001. *Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. J Biol Chem, 276(28): p. 26448-52.*
 65. Anton, I.M., Lu, W., Mayer, B.J., Ramesh, N. et Geha, R.S. 1998. *The Wiskott-Aldrich syndrome protein-interacting protein (WIP) binds to the adaptor protein Nck. J Biol Chem, 273(33): p. 20992-5.*
 66. Bompard, G. et Caron, E. 2004. *Regulation of WASP/WAVE proteins: making a long story short. J Cell Biol, 166(7): p. 957-62.*
 67. Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A.V., Mann, M. et Kirschner, M.W. 2002. *Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. Nature, 418(6899): p. 790-3.*
 68. Kitamura, T., Kitamura, Y., Yonezawa, K., Totty, N.F., Gout, I., et al. 1996. *Molecular cloning of p125Nap1, a protein that associates with an SH3 domain of Nck. Biochem Biophys Res Commun, 219(2): p. 509-14.*
 69. Takenawa, T. et Suetsugu, S. 2007. *The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. Nat Rev Mol Cell Biol, 8(1): p. 37-48.*
 70. Disanza, A., Steffen, A., Hertzog, M., Frittoli, E., Rottner, K., et al. 2005. *Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. Cell Mol Life Sci, 62(9): p. 955-70.*
 71. Ridley, A.J. 2006. *Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. Trends Cell Biol, 16(10): p. 522-9.*
 72. Tehrani, S., Tomasevic, N., Weed, S., Sakowicz, R. et Cooper, J.A. 2007. *Src phosphorylation of cortactin enhances actin assembly. Proc Natl Acad Sci U S A, 104(29): p. 11933-8.*
 73. Bershadsky, A. 2004. *Magic touch: how does cell-cell adhesion trigger actin assembly? Trends Cell Biol, 14(11): p. 589-93.*
 74. Cote, J.F. et Vuori, K. 2002. *Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. J Cell Sci, 115(Pt 24): p. 4901-13.*
 75. Wunderlich, L., Farago, A. et Buday, L. 1999. *Characterization of interactions of Nck with Sos and dynamin. Cell Signal, 11(1): p. 25-9.*

76. Frischknecht, F., Moreau, V., Rottger, S., Gonfloni, S., Reckmann, I., *et al.* 1999. *Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signalling.* Nature, **401**(6756): p. 926-9.
77. Gruenheid, S., DeVinney, R., Bladt, F., Goosney, D., Gelkop, S., *et al.* 2001. *Enteropathogenic E. coli Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells.* Nat Cell Biol, **3**(9): p. 856-9.
78. Rivera, G.M., Briceno, C.A., Takeshima, F., Snapper, S.B. et Mayer, B.J. 2004. *Inducible clustering of membrane-targeted SH3 domains of the adaptor protein Nck triggers localized actin polymerization.* Curr Biol, **14**(1): p. 11-22.
79. Ruusala, A., Pawson, T., Heldin, C.H. et Aspenstrom, P. 2008. *Nck adapters are involved in the formation of dorsal ruffles, cell migration, and Rho signaling downstream of the platelet-derived growth factor beta receptor.* J Biol Chem, **283**(44): p. 30034-44.
80. Vaynberg, J., Fukuda, T., Chen, K., Vinogradova, O., Velyvis, A., *et al.* 2005. *Structure of an ultraweak protein-protein complex and its crucial role in regulation of cell morphology and motility.* Mol Cell, **17**(4): p. 513-23.
81. Guan, J.L. 1997. *Focal adhesion kinase in integrin signaling.* Matrix Biol, **16**(4): p. 195-200.
82. Stoletov, K.V., Gong, C. et Terman, B.I. 2004. *Nck and Crk mediate distinct VEGF-induced signaling pathways that serve overlapping functions in focal adhesion turnover and integrin activation.* Exp Cell Res, **295**(1): p. 258-68.
83. Antoku, S., Saksela, K., Rivera, G.M. et Mayer, B.J. 2008. *A crucial role in cell spreading for the interaction of Abl PxxP motifs with Crk and Nck adaptors.* J Cell Sci, **121**(Pt 18): p. 3071-82.
84. Garrity, P.A., Rao, Y., Salecker, I., McGlade, J., Pawson, T., *et al.* 1996. *Drosophila photoreceptor axon guidance and targeting requires the dreadlocks SH2/SH3 adapter protein.* Cell, **85**(5): p. 639-50.
85. Hummel, T., Leifker, K. et Klambt, C. 2000. *The Drosophila HEM-2/NAP1 homolog KETTE controls axonal pathfinding and cytoskeletal organization.* Genes Dev, **14**(7): p. 863-73.
86. Schmucker, D., Clemens, J.C., Shu, H., Worby, C.A., Xiao, J., *et al.* 2000. *Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity.* Cell, **101**(6): p. 671-84.
87. Rao, Y. et Zipursky, S.L. 1998. *Domain requirements for the Dock adapter protein in growth- cone signaling.* Proc Natl Acad Sci U S A, **95**(5): p. 2077-82.

88. Li, X., Meriane, M., Triki, I., Shekarabi, M., Kennedy, T.E., *et al.* 2002. *The adaptor protein Nck-1 couples the netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) to the activation of the small GTPase Rac1 through an atypical mechanism.* J Biol Chem, **277**(40): p. 37788-97.
89. Fawcett, J.P., Georgiou, J., Ruston, J., Bladt, F., Sherman, A., *et al.* 2007. *Nck adaptor proteins control the organization of neuronal circuits important for walking.* Proc Natl Acad Sci U S A, **104**(52): p. 20973-8.
90. Benzing, T. 2004. *Signaling at the slit diaphragm.* J Am Soc Nephrol, **15**(6): p. 1382-91.
91. Jones, N., Blasutig, I.M., Eremina, V., Ruston, J.M., Bladt, F., *et al.* 2006. *Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes.* Nature, **440**(7085): p. 818-23.
92. Blasutig, I.M., New, L.A., Thanabalasuriar, A., Dayarathna, T.K., Goudreault, M., *et al.* 2008. *Phosphorylated YDXV motifs and Nck SH2/SH3 adaptors act cooperatively to induce actin reorganization.* Mol Cell Biol, **28**(6): p. 2035-46.
93. Lettau, M., Pieper, J. et Janssen, O. 2009. *Nck adapter proteins: functional versatility in T cells.* Cell Commun Signal, **7**: p. 1.
94. Bubeck Wardenburg, J., Pappu, R., Bu, J.Y., Mayer, B., Chernoff, J., *et al.* 1998. *Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76.* Immunity, **9**(5): p. 607-16.
95. Gil, D., Schamel, W.W., Montoya, M., Sanchez-Madrid, F. et Alarcon, B. 2002. *Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation.* Cell, **109**(7): p. 901-12.
96. Szymczak, A.L., Workman, C.J., Gil, D., Dilioglou, S., Vignali, K.M., *et al.* 2005. *The CD3epsilon proline-rich sequence, and its interaction with Nck, is not required for T cell development and function.* J Immunol, **175**(1): p. 270-5.
97. Lettau, M., Qian, J., Linkermann, A., Latreille, M., Larose, L., *et al.* 2006. *The adaptor protein Nck interacts with Fas ligand: Guiding the death factor to the cytotoxic immunological synapse.* Proc Natl Acad Sci U S A, **103**(15): p. 5911-6.
98. Gupta, R.W. et Mayer, B.J. 1998. *Dominant-negative mutants of the SH2/SH3 adaptors Nck and Grb2 inhibit MAP kinase activation and mesoderm-specific gene induction by eFGF in Xenopus.* Oncogene, **17**(17): p. 2155-65.
99. Bagrodia, S., Derijard, B., Davis, R.J. et Cerione, R.A. 1995. *Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation.* J Biol Chem, **270**(47): p. 27995-8.

100. Kebache, S., Zuo, D., Chevet, E. et Larose, L. 2002. *Modulation of protein translation by Nck-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, **99**(8): p. 5406-11.
101. Cardin, E., Latreille, M., Khoury, C., Greenwood, M.T. et Larose, L. 2007. *Nck-1 selectively modulates eIF2alphaSer51 phosphorylation by a subset of eIF2alpha-kinases*. FEBS J, **274**(22): p. 5865-75.
102. Hebert, D.N. et Molinari, M. 2007. *In and Out of the ER: Protein Folding, Quality Control, Degradation, and Related Human Diseases*. Physiol. Rev., **87**(4): p. 1377-1408.
103. Kebache, S., Cardin, E., Nguyen, D.T., Chevet, E. et Larose, L. 2004. *Nck-1 antagonizes the endoplasmic reticulum stress-induced inhibition of translation*. J Biol Chem, **279**(10): p. 9662-71.
104. Yamasaki, S. et Anderson, P. 2008. *Reprogramming mRNA translation during stress*. Current Opinion in Cell Biology, **20**(2): p. 222-226.
105. Cardin, E. et Larose, L. 2008. *Nck-1 interacts with PKR and modulates its activation by dsRNA*. Biochem Biophys Res Commun, **377**(1): p. 231-5.
106. Chou, M.M., Fajardo, J.E. et Hanafusa, H. 1992. *The SH2- and SH3-containing Nck protein transforms mammalian fibroblasts in the absence of elevated phosphotyrosine levels*. Mol Cell Biol, **12**(12): p. 5834-42.
107. Larose, L., Données non publiées.
108. Ren, G., Helwani, F.M., Verma, S., McLachlan, R.W., Weed, S.A., et al. 2009. *Cortactin is a functional target of E-cadherin-activated Src family kinases in MCF7 epithelial monolayers*. J Biol Chem, **284**(28): p. 18913-22.
109. Stylli, S.S., Stacey, T.T., Verhagen, A.M., Xu, S.S., Pass, I., et al. 2009. *Nck adaptor proteins link Tks5 to invadopodia actin regulation and ECM degradation*. J Cell Sci, **122**(Pt 15): p. 2727-40.
110. de Wit, N.J., Rijntjes, J., Diepstra, J.H., van Kuppevelt, T.H., Weidle, U.H., et al. 2005. *Analysis of differential gene expression in human melanocytic tumour lesions by custom made oligonucleotide arrays*. Br J Cancer, **92**(12): p. 2249-61.
111. Labelle-Côté, M., Ismail, S., Rousseau, C., Siegel, P., Dusseault, J., et Larose, L. Manuscrit en préparation. *Regulation of melanoma progression by signaling through the adaptor protein Nck2*.
112. Hsu, M.Y., Elder, D.E. et Herlyn, M. 1999. *Melanoma: The Wistar Melanoma (WM) Cell Lines*. Dans: *Human Cell Culture*, J.R.W. Master et B. Palsson, Édts. Kluwer Academic Publishers: London. p. 259-274. Données disponibles sur <http://www.wistar.org/herlyn/melanoma.htm>

113. Fu, H., Hu, Y., McNelis, T. et Hollinger, J.O. 2005. *A calcium phosphate-based gene delivery system*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, **74A**(1): p. 40-48.
114. Bradford, M.M. 1976. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, **72**: p. 248-54.
115. Friedrich, J., Ebner, R. et Kunz-Schughart, L.A. 2007. *Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids - old hat or new challenge?* International Journal of Radiation Biology, **83**(11-12): p. 849-871.
116. Smalley, K.S.M., Contractor, R., Haass, N.K., Lee, J.T., Nathanson, K.L., et al. 2007. *Ki67 expression levels are a better marker of reduced melanoma growth following MEK inhibitor treatment than phospho-ERK levels*. Br J Cancer, **96**(3): p. 445-449.
117. Wang, Y., Chang, J., Chen, K.-D., Li, S., Li, J.Y.-S., et al. 2007. *Selective adapter recruitment and differential signaling networks by VEGF vs. shear stress*. Proceedings of the National Academy of Sciences, **104**(21): p. 8875-8879.
118. Tu, Y., Liang, L., Frank, S.J. et Wu, C. 2001. *Src homology 3 domain-dependent interaction of Nck-2 with insulin receptor substrate-1*. Biochem J, **354**(Pt 2): p. 315-22.
119. Brodeur, J.F., Li, S., Martins, M.d.S., Larose, L. et Dave, V.P. 2009. *Critical and multiple roles for the CD3epsilon intracytoplasmic tail in double negative to double positive thymocyte differentiation*. J Immunol, **182**(8): p. 4844-53.
120. Li, C., Schibli, D. et Li, S.S.-C. 2009. *The XLP syndrome protein SAP interacts with SH3 proteins to regulate T cell signaling and proliferation*. Cellular Signalling, **21**(1): p. 111-119.
121. Rockow, S., Tang, J., Xiong, W. et Li, W. 1996. *Nck inhibits NGF and basic FGF induced PC12 cell differentiation via mitogen-activated protein kinase-independent pathway*. Oncogene, **12**(11): p. 2351-9.
122. Liu, J.F., Chevet, E., Kebache, S., Lemaitre, G., Barritault, D., et al. 1999. *Functional Rac-1 and Nck signaling networks are required for FGF-2-induced DNA synthesis in MCF-7 cells*. Oncogene, **18**(47): p. 6425-33.
123. Mizuno, K., Tagawa, Y., Mitomo, K., Watanabe, N., Katagiri, T., et al. 2002. *Src Homology Region 2 Domain-Containing Phosphatase 1 Positively Regulates B Cell Receptor-Induced Apoptosis by Modulating Association of B Cell Linker Protein with Nck and Activation of c-Jun NH2-Terminal Kinase*. J Immunol, **169**(2): p. 778-786.

124. Poitras, L., Jean, S., Islam, N. et Moss, T. 2003. *PAK interacts with NCK and MLK2 to regulate the activation of jun N-terminal kinase*. FEBS Lett, **543**(1-3): p. 129-35.
125. Schmitz, U., Thommes, K., Beier, I., Dusing, R. et Vetter, H. 2004. *Identification of Nck interacting proteins in vascular smooth muscle cells*. Clin Exp Hypertens, **26**(3): p. 267-75.
126. Wagner, E.F. et Nebreda, A.R. 2009. *Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development*. Nat Rev Cancer, **9**(8): p. 537-549.
127. Kobayashi, T., Inoue, T., Shimizu, Y., Terada, N., Maeno, A., et al. 2010. *Activation of Rac1 Is Closely Related to Androgen-Independent Cell Proliferation of Prostate Cancer Cells Both in Vitro and in Vivo*. Mol Endocrinol, **24**(4): p. 722-734.
128. Bauer, N.N., Chen, Y.W., Samant, R.S., Shevde, L.A. et Fodstad, O. 2007. *Rac1 activity regulates proliferation of aggressive metastatic melanoma*. Exp Cell Res, **313**(18): p. 3832-9.
129. Wang, H., Linghu, H., Wang, J., Che, Y.L., Xiang, T.X., et al. 2010. *The role of Crk/Dock180/Rac1 pathway in the malignant behavior of human ovarian cancer cell SKOV3*. Tumour Biol, **31**(1): p. 59-67.
130. Normandin, K., 2008. *Caractérisation de la SERPINA1, une antiprotéase différemment exprimée dans le cancer épithélial de l'ovaire*. Mémoire de Maîtrise, Programme de biologie moléculaire, Faculté de Médecine. Université de Montréal.
131. Wolf, K., Wu, Y.I., Liu, Y., Geiger, J., Tam, E., et al. 2007. *Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion*. Nat Cell Biol, **9**(8): p. 893-904.
132. Sodek, K.L., Brown, T.J. et Ringuette, M.J. 2008. *Collagen I but not Matrigel matrices provide an MMP-dependent barrier to ovarian cancer cell penetration*. BMC Cancer, **8**: p. 223.
133. Sodek, K.L., Ringuette, M.J. et Brown, T.J. 2009. *Compact spheroid formation by ovarian cancer cells is associated with contractile behavior and an invasive phenotype*. Int J Cancer, **124**(9): p. 2060-70.
134. Winters, B.S., Shepard, S.R. et Foty, R.A. 2005. *Biophysical measurement of brain tumor cohesion*. Int J Cancer, **114**(3): p. 371-9.
135. Yilmaz, M. et Christofori, G. 2009. *EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion*. Cancer Metastasis Rev, **28**(1-2): p. 15-33.

136. Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., *et al.* 2008. *Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement.* Cell, **135**(3): p. 510-23.
137. Ramos-Morales, F., Druker, B.J. et Fischer, S. 1994. *Vav binds to several SH2/SH3 containing proteins in activated lymphocytes.* Oncogene, **9**(7): p. 1917-23.
138. Bisson, N., Poitras, L., Mikryukov, A., Tremblay, M. et Moss, T. 2007. *EphA4 Signaling Regulates Blastomere Adhesion in the Xenopus Embryo by Recruiting Pak1 to Suppress Cdc42 Function.* Mol. Biol. Cell, **18**(3): p. 1030-1043.
139. Kiosses, W.B., Hood, J., Yang, S., Gerritsen, M.E., Cheresh, D.A., *et al.* 2002. *A dominant-negative p65 PAK peptide inhibits angiogenesis.* Circ Res, **90**(6): p. 697-702.
140. Fathers, K.E., Rodrigues, S., Zuo, D., Murthy, I.V., Hallett, M., *et al.* 2010. *CrkII Transgene Induces Atypical Mammary Gland Development and Tumorigenesis.* Am J Pathol, **176**(1): p. 446-460.
141. Horst, B., Gruvberger-Saal, S.K., Hopkins, B.D., Bordone, L., Yang, Y., *et al.* 2009. *Gab2-mediated signaling promotes melanoma metastasis.* Am J Pathol, **174**(4): p. 1524-33.
142. Xu, Y., Benlimame, N., Su, J., He, Q. et Alaoui-Jamali, M.A. 2009. *Regulation of focal adhesion turnover by ErbB signalling in invasive breast cancer cells.* Br J Cancer, **100**(4): p. 633-43.

ANNEXE 1 : RÉSULTATS BRUTS DES ANALYSES *IN VIVO*

Tableau II : Taille des tumeurs et présence de renflements au niveau des ganglions lymphatiques inguinaux suite à l'injection sous-cutanée de cellules de mélanome sur le flanc droit de souris immunodéficientes.

Lignées	No. Souris	14 Aout ^a		Semaine 1			Jour 8		21 Aout			Semaine 2			Jour 15		28 Aout			Semaine 3			Jour 22		3 Sept.			Semaine 4			Jour 28				
		Tumeur ^b			Ganglions ^d			Tumeur			Ganglions			Tumeur			Ganglions			Tumeur			Ganglions			Tumeur			Ganglions						
		Longueur	Largeur	Volume ^c	Gauche	Droit	Longueur	Largeur	Volume	Gauche	Droit	Longueur	Largeur	Volume	Gauche	Droit	Longueur	Largeur	Volume	Gauche	Droit	Longueur	Largeur	Volume	Gauche	Droit	Longueur	Largeur	Volume	Gauche	Droit				
WM278	2120	2,2	2,1	5,19	-	-	2,6	2,1	6,00	-	-	2	1,7	3,03	-	-	1,2	1	0,63	-	-														
WM278	2121	2,1	1,8	3,56	-	-	1,9	1,5	2,24	-	-	1,5	1	0,79	-	-	1,3	1,2	0,98	-	-														
WM278	2122	1,7/1,9 ^e	1,6/1,4	4,23	-	-	2,2/1,8	1,7/1,8	6,38	-	-	1,5	1,3	0,79	-	-	1	0,9	0,34	-	-														
WM278	2123	2,3	2,1	5,31	-	-	1,8	1,8	3,05	-	-	1,5	1,5	1,77	-	-	1,2	1	0,63	-	-														
WM278	2124	1,8	1,2	1,36	-	-	1,6	1	0,84	-	-	0	0	0,00	-	-	0	0	0,00	-	-														
WM1617	2125	2,7	1,7	4,09	-	-	2,3	2,1	5,31	-	-	2	2	4,19	-	-	2	1,5	2,36	-	-														
WM1617	2126	4,1	2,6	14,51	-	-	5,5	4,6	60,94	-	-	8,4	8	281,49	-	-	9,2	9,2	407,72	-	-														
WM1617	2127	2,2/2,4	1,9/2,3	10,81	-	-	8	3,5	51,31	-	-	12,1	5,2	171,31	-	-	15,2	6,3	315,88	-	-														
WM1617	2128	0	0	0,00	-	-	0	0	0,00	-	-	3,5	2	7,33	-	-	4	3	18,85	-	-														
WM1617	2129	2,1	1,2	1,58	-	-	0	0	0,00	-	-	6	4,5	63,62	-	-	7	6,5	154,85	-	-														
C2	2130	2	1,8	3,39	-	-	2,2	2,1	5,08	-	-	1,2	1	0,63	-	-	0	0	0,00	-	-														
C2	2131	2,3	1,3	2,04	-	-	2,1	1,5	2,47	-	-	1,2	1	0,63	-	-	0,9	0,9	0,38	-	-														
C2	2132	1,7/1,7	1,2/q,3	2,79	-	-	3,9	2	8,17	-	-	2,8	1,8	4,75	-	-	3	1,3	2,65	-	-														
C2	2133	3,8	1,8	6,45	-	-	3	1,3	2,65	-	-	1,2	1	0,63	-	-	1,9	0,9	0,81	-	-														
C2	2134	3,7	1,1	2,34	-	-	3,2	1,6	4,29	-	-	2	2	4,19	-	-	1,3	1,3	1,15	-	-														
N7	2135	2,8	1,8	4,75	-	-	2,4	1,9	4,54	-	-				-	-	0	0	0,00	-	-														
N7	2136	2,5	1,6	3,35	-	-	2,4	2,1	5,54	-	-				-	-	1	1	0,52	-	-														
N7	2137	2,5	1,7	3,78	-	-	1,7	1,3	1,50	-	-				-	-	1,6	1	0,84	-	-														
N7	2138	3,3	1,2	2,49	-	-	1,9	1,9	3,59	-	-				-	-	1	0,9	0,42	-	-														
N7	2139	3,8	1,4	3,90	-	-	2,9	1,6	3,89	-	-				-	-	1,5	1,2	1,13	-	-														
N14	2140	2,1	1,3	1,86	-	-	3,2	1,8	5,43	-	-	2,5	2	5,24	-	-	2	1,8	3,39	-	-														
N14	2141	3,2	1,4	3,28	-	-	3	1,8	5,09	-	-	2	1,5	2,36	-	-	1,2	1,2	0,90	-	-														
N14	2142	4,7	1,6	6,30	-	-	3,5	1,7	5,30	-	-	2,7	2,6	9,56	-	-	2	1,8	3,39	-	-														
N14	2143	7,5	1,8	12,72	-	-	6,8	2,5	22,25	-	-	6	2,5	19,63	-	-	2,5	2,2	6,34	-	-														
N14	2144	2,2	2	4,61	-	-	2,7	2,3	7,48	-	-	1,7	1,5	2,00	-	-	2,2	2,2	5,58	-	-														

Tableau II (Suite)

Tableau II (Suite)

Lignées	No. Souris	15 Oct. ^a		Semaine 10			Jour 70		23 Oct.			Semaine 11			Jour 78		29 Oct.			Semaine 12			Jour 84		5 Nov.			Semaine 13			Jour 91	
		Tumeur ^b			Ganglions ^d		Tumeur			Ganglions		Tumeur			Ganglions		Tumeur			Ganglions		Tumeur			Ganglions							
		Longueur	Largeur	Volume ^c	Gauche	Droit	Longueur	Largeur	Volume	Gauche	Droit	Longueur	Largeur	Volume	Gauche	Droit	Longueur	Largeur	Volume	Gauche	Droit	Longueur	Largeur	Volume	Gauche	Droit						
WM278	2120	0	0	Mini	X	X	0	0	Mini	X	X	0	0	Petite ^f	X	X	0	0	Petite	X	X	0	0	Petite	X	X						
WM278	2121	0	0	Mini	X	X	0	0	Mini	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
WM278	2122	0	0	Mini	X	X	0	0	Mini	X	X	0	0	Mini	X	X	0	0	Petite	X	X	0	0	Petite	X	X						
WM278	2123	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
WM278	2124	2,7	2,5	8,84	X	X	4,2	3,2	22,52	X	X	5,6	4	46,91	X	X	6,4	5,1	87,16	X	X											
WM1617	2125	14	9,2	620,44	–	X	15,8	14	1621,5	–	X	15,3	12,3	1211,9	–	X																
WM1617	2126																															
WM1617	2127																															
WM1617	2128	13	11	823,62	–	X	14	11,3	936,02	–	X	13,7	12,2	1067,7	–	X	13,2	10,5	761,99	–	X											
WM1617	2129																															
C2	2130	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
C2	2131	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	Mini	X	X	0	0	Petite	X	X	0	0	Petite	X	X						
C2	2132	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
C2	2133	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
C2	2134	0	0	0,00	–	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
N7	2135	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
N7	2136	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
N7	2137	0	0	Mini	–	X	0	0	Mini	X	X	0	0	Petite	X	X	0	0	Petite	X	X	0	0	Petite	X	X						
N7	2138	0	0	Mini	–	X	2	1,5	2,36	–	X	2	2	4,19	X	X	4,2	3,5	26,94	X	X	0	0	0,00	X	X						
N7	2139	0	0	0,00	–	–	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
N14	2140	0	0	Petite	X	X	2,3	2	4,82	X	X	4,1	3,9	32,65	X	X	5,6	4,5	59,38	X	X	0	0	0,00	X	X						
N14	2141	0	0	0,00	–	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
N14	2142	2,2	1,6	2,95	X	X	1,5	1,5	1,77	X	X	0	0	Petite	X	X	3	2	6,28	X	X	0	0	0,00	X	X						
N14	2143	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
N14	2144	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						

Tableau II (Suite)

Lignées	No. Souris	12 Nov. ^a		Semaine 14			Jour 98		19 Nov.			Semaine 15			Jour 105		28 Nov.			Semaine 16			Jour 112		3 Déc.			Semaine 17			Jour 119	
		Tumeur ^b			Ganglions ^d		Tumeur			Ganglions		Tumeur			Ganglions		Tumeur			Ganglions		Tumeur			Ganglions							
		Longueur	Largeur	Volume ^c	Gauche	Droit	Longueur	Largeur	Volume	Gauche	Droit	Longueur	Largeur	Volume	Gauche	Droit	Longueur	Largeur	Volume	Gauche	Droit	Longueur	Largeur	Volume	Gauche	Droit						
WM278	2120	0	0	Petite	X	X	0	0	Petite	X	X	0	0	Petite	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
WM278	2121	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
WM278	2122	0	0	Petite	X	X	2,1	2,1	4,85	X	X	0	0	Petite	X	X	0	0	Petite	X	X	0	0	Petite	X	X						
WM278	2123	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
WM278	2124	7,3	5,7	124,19	X	X	8,6	6,6	196,15	X	X	9	6,7	211,54	X	X	8,4	5,5	133,05	X	X											
WM1617	2125																															
WM1617	2126																															
WM1617	2127																															
WM1617	2128	13,2	10,1	699,70	X	X	12,5	8,2	440,08	X	X	11,9	8	398,77	X	X	10,8	8	361,91	X	X											
WM1617	2129																															
C2	2130	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
C2	2131	3	3	14,14	X	X	4,8	3,5	30,79	X	X	5,7	4,3	55,18	X	X	7,3	5,9	133,05	X	X											
C2	2132	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
C2	2133	0	0	0,00	X	X	0	0	Mini	X	X	0	0	Mini	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
C2	2134	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
N7	2135	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
N7	2136	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
N7	2137	0	0	Petite	X	X	2,2	2,2	5,58	X	X	4,2	4,1	36,97	X	X	4,9	3,7	35,12	X	X											
N7	2138	5	4,5	53,01	X	X	5,3	5,3	77,95	X	X	8	6,7	188,03	X	X	10	8,5	378,30	X	X											
N7	2139	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
N14	2140	6,2	6	116,87	X	X	9,8	8,1	336,66	X	X	10,5	10	549,78	X	X																
N14	2141	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
N14	2142	3,4	3,2	18,23	X	X	4,2	4,2	38,79	X	X	5,5	5	71,99	X	X	7,4	6,9	184,47	X	X											
N14	2143	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						
N14	2144	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X						

Tableau II (Suite et fin)

Lignées	No. Souris	10 Déc. ^a		Semaine 18		Jour 126		17 Déc.		Semaine 19		Jour 133		21 Déc.		Semaine 20		Jour 137	
		Tumeur ^b			Ganglions ^d		Tumeur			Ganglions		Tumeur			Ganglions				
		Longueur	Largeur	Volume ^c	Gauche	Droit	Longueur	Largeur	Volume	Gauche	Droit	Longueur	Largeur	Volume	Gauche	Droit			
WM278	2120	0	0	Mini	X	X	0	0	Mini	X	X	0	0	Petite	X	X			
WM278	2121	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X			
WM278	2122	0	0	Petite	X	X	0	0	Petite	X	X	0	0	Petite	X	X			
WM278	2123	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X			
WM278	2124	10	7,5	294,52	X	X	10,1	7	259,13	X	X	8,6	7,8	273,96	X	X			
WM1617	2125																		
WM1617	2126																		
WM1617	2127																		
WM1617	2128	10,3	6,7	242,09	X	X	9,5	6,5	210,16	X	X	9	6	169,65	X	X			
WM1617	2129																		
C2	2130	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X			
C2	2131	8,3	6,7	195,09	X	X	10,5	6,7	246,80	X	X	10,8	6,7	253,85	X	X			
C2	2132	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X			
C2	2133	0	0	Mini	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	Mini	X	X			
C2	2134	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X			
N7	2135	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X			
N7	2136	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X			
N7	2137	7,1	6	133,83	X	X	8	7,2	217,15	X	X	8,3	6,9	206,91	X	X			
N7	2138	11,2	10	586,43	X	X													
N7	2139	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X			
N14	2140																		
N14	2141	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X			
N14	2142	9,4	8,2	330,94	X	X													
N14	2143	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X			
N14	2144	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X	0	0	0,00	X	X			

^a Les cellules ont été injectées le 6 Août 2009, jour 1, à raison de 5×10^6 cellules par souris ; ^b La masse au site d'injection a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse muni d'un vernier ; ^c Le volume a été calculé selon l'équation suivante : $V = (\text{Longueur} \times \text{Largeur}^2) \times \pi / 6$ et est exprimé en mm^3 ; ^d X = présence d'une masse au niveau du ganglion lymphatique inguinal d'un renflement ; ^e Représente deux tumeurs côte à côte ; ^f Mini : moins de 1 mm x 1 mm; Petite : environ 2 mm x 2 mm; volume $\leq 5 \text{ mm}^3$

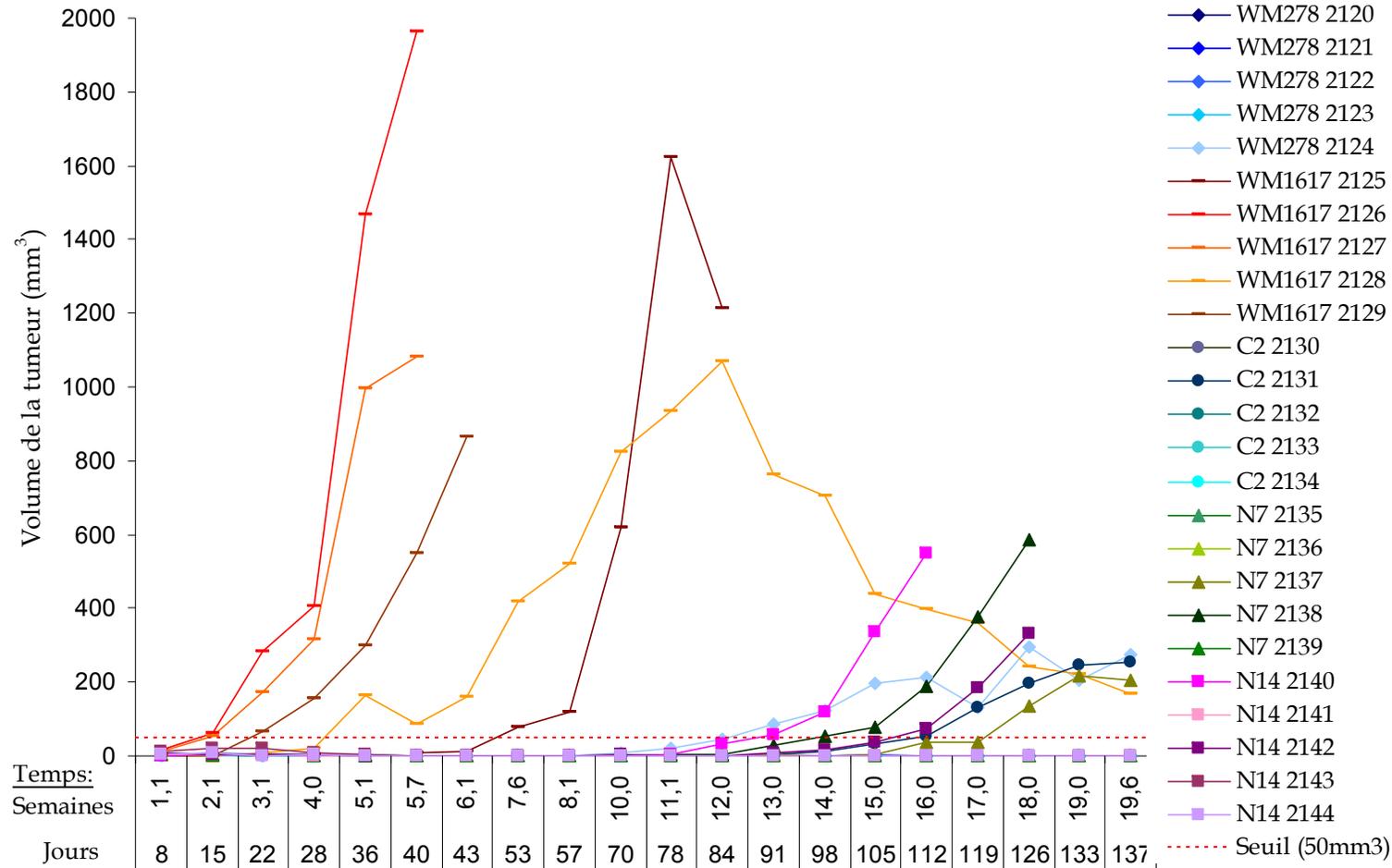


Figure 25 : Courbes de croissance des tumeurs suite à l'injection sous-cutanée de cellules de mélanome sur le flanc droit de souris immunodéficientes.

Des cellules de mélanome humain primaire (WM278) ou métastatique (WM1617) ou des cellules WM278 exprimant la protéine contrôle GFP (C2) ou la protéine de fusion GFP-Nck2 (N7 et N14) ont été injectées sous la peau du flanc droit de 5 souris CD-1 nues par lignée (5×10^6 cellules). La taille de la tumeur a été mesurée chaque semaine et le volume calculé selon l'équation $V = (\text{Longueur} \times \text{Largeur}^2) \times \pi / 6$. Chaque courbe représente la croissance tumorale chez une seule souris.

ANNEXE 2 : DROITS DE REPRODUCTION DES FIGURES

The Publishing Division

of the Massachusetts Medical Society

Publishers of

*The New England Journal of Medicine, Journal Watch Newsletters,
& AIDS Clinical Care*

MMS Reference Number: PS - 2010 - 1830

MMS Invoice Number: RY - 2010 - 1830

ITEMS COVERED BY GRANT OF PERMISSION

Source Information

Source : The New England Journal of Medicine
Volume : 355
Pages : 51-65
Pub Date : 7/6/2006
Authors(s) : Miller, Mihm
Article Title : Melanoma
Type : Figure
Item : F2

Further Conditions

Format : On-line & Print
Language : French

The following information has been provided for us in your letter of request.

End Use: Figure for use in Master Thesis
User: academic use
Sponsor: University of Montreal
Date of Use: 2010
Number of Copies:

BASIC PROVISIONS of GRANT OF PERMISSION

This permission applies only to copyrighted material that the Massachusetts Medical Society ("MMS") owns, and not to copyrighted text or illustrations from other sources. If material appears in our work with credit to another source, you must also obtain permission from the original source cited in our work.

All content reproduced from copyrighted material owned by the MMS remains the sole and exclusive property of the MMS. The right to grant permission to a third party is reserved solely by the MMS.

MMS' copyrighted content may not be used in any manner that implies endorsement, sponsorship, or promotion of any entity, product or service by the MMS or its publications. MMS cannot and does not authorize the use of any author's name on promotional materials; such approval must be obtained directly from the author.

CREDIT LINE: This permission requires a full credit line either in close proximity to where MMS text or illustration appears, or on the copyright page of any publication that incorporates the MMS' content. This credit line must include reference to the original article in standard citation format, together with a notice of copyright

ownership, as follows: Copyright © [year of publication] *Massachusetts Medical Society*. All rights reserved.

- This permission is a one-time, non-exclusive grant limited only to the specific use, format(s), language(s) and edition(s) specified on the "Items Covered by Grant of Permission" page. It is not a "blanket" permission allowing unrestricted use of this material in future reproductions, editions, revisions, ancillary products, or other derivative works.

- This permission gives distribution rights throughout the world.

This grant of permission is issued for the material to be used as originally published by MMS. MMS does not approve adaptations or modifications. •

- Formatting and stylistic changes and any explanatory material or figure legends used by the requester must accurately reflect the material as originally published by MMS.

- Unless fees have been waived, this permission is contingent on payment in a timely manner of any fees associated with this use. **IMPORTANT:** Please reference MMS' original invoice number to ensure proper credit.

Publishing Division of the Massachusetts Medical Society

Department of Permissions & Licensing

860 Winter Street, Waltham, Massachusetts 02451-1413 USA

Tel: (781) 434 7382 · Fax: (781) 434 7633 · permissions@nejm.org

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Nov 23, 2009

This is a License Agreement between Melissa Labelle-Cote (“You”) and Elsevier (“Elsevier”) provided by Copyright Clearance Center (“CCC”). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Melissa Labelle-Cote
Customer address	
License Number	2314920527794
License date	Nov 23, 2009
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Cell
Licensed content title	The Hallmarks of Cancer
Licensed content author	Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg
Licensed content date	7 January 2000
Volume number	100
Issue number	1
Pages	14
Type of Use	Thesis / Dissertation
Portion	Figures/table/illustration/abstracts
Portion Quantity	1
Format	Both print and electronic
You are an author of the article	No
Are you translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	
Order Reference Number	
Expected publication date	Jan 2010
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 USD
Value added tax 0.0%	0.00 USD

Total 0.00 USD

**TERMS AND CONDITIONS
INTRODUCTION**

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking “accept” in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following

terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. (“CCC”), at the time that you opened your Rights link account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.
4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.
5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com)
7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC’s Billing and Payment terms and conditions.
11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher’s written permission.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world English rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article. If this license is to re-use 1 or 2 figures then permission is granted for non-exclusive world rights in all languages.
20. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Nov 23, 2009

This is a License Agreement between Melissa Labelle-Cote (“You”) and Nature Publishing Group (“Nature Publishing Group”) provided by Copyright Clearance Center (“CCC”). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

License Number	2314921261044
License date	Nov 23, 2009
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	EMBO reports
Licensed content title	Mammary gland biology and breast cancer. Conference on Common Molecular Mechanisms of Mammary Gland Development and Breast Cancer Progression
Licensed content author	Sharon F McGee, Fiona Lanigan, Emer Gilligan and Bernd Groner
Volume number	
Issue number	
Pages	
Year of publication	2006
Portion used	Figures / tables
Number of figures / tables	1
Requestor type	Student
Type of Use	Thesis / Dissertation
Billing Type Invoice	
Company	Melissa Labelle-Cote

Customer reference info	
Total 0.00	USD

TERMS AND CONDITIONS FOR PERMISSIONS

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit one or any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the

work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.

4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.

5. The credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]
(reference citation), copyright (year of publication)

For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME],
advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL
ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]
(reference citation), copyright (year of publication)

