

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

**Rôle de PP2A dans l'activation constitutive de MEK1/2 de cellules MDCK  
transformées par le virus du sarcome de Moloney**

par

Karl-Philippe Guérard

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

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

Décembre 2007

© Karl-Philippe Guérard 2007

Université de Montréal



Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Rôle de PP2A dans l'activation constitutive de MEK1/2 de cellules MDCK  
transformées par le virus du sarcome de Moloney**

présenté par :

Karl-Philippe Guérard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Madhu Anand-Srivastava

Président-rapporteur

Dr Josette Noël

Directeur de recherche

Dr Angelo Calderone

Membre du jury



## Résumé

Les cellules MDCK transformées par le virus MSV et sélectionnées pour leur propriété d'invasion, les cellules INV, présentent plusieurs caractéristiques des cellules tumorales et invasives. L'utilisation de deux inhibiteurs spécifiques, inhibant la voie Ras-ERK à différents niveaux, a permis de mettre en évidence une activation constitutive de la voie ras-ERK dans les lignées MSV et INV, au niveau de MEK1/2 plutôt que ERK1/2 ou Raf-1. Ce projet a consisté à déterminer la cause et le mécanisme d'action de l'activation constitutive de MEK1/2 dans ces cellules transformées.

Nous avons entrepris le séquençage de MEK1 et MEK2 dans les cellules MSV et INV pour vérifier la présence de mutation(s) activatrice(s). Le séquençage complet des deux isoformes de MEK n'en a révélé aucune. Toutefois, cet exercice nous a permis de rendre accessibles dans *GenBank* les séquences canines de MEK1 et MEK2.

L'activité de la phosphatase responsable de la déphosphorylation et inactivation de MEK1/2, PP2A, fut alors investiguée *in situ* dans les cellules en migration puis *in vitro* sur un immunoprécipitat de PP2A. Des essais de réparation de plaies ont révélé une activité migratoire de base plus élevée chez les cellules MSV et INV, et cette activité est insensible à l'acide okadaïque (AO), un inhibiteur spécifique de PP2A. La présence d'AO 50 nM augmente toutefois la réparation de plaies des cellules MDCK. Ces observations corrént parfaitement avec l'augmentation du degré de phosphorylation de MEK1/2 des cellules MDCK parentales à la suite de l'inhibition de PP2A par l'AO, et l'absence d'effet chez les cellules MSV et INV. L'activité phosphatase de PP2A mesurée *in vitro* est aussi plus modeste chez les cellules MSV et INV, et n'est pas modulable par un activateur de la voie des MAPK, lorsque comparée aux cellules MDCK.

Cette étude procure des éléments clés à la compréhension du rôle de PP2A dans l'activation constitutive de MEK1/2 dans des lignées de cellules MDCK transformées par le virus du sarcome de Moloney, utilisées comme modèle de cellule tumorale.

**Mots-clés:** invasion, motilité, cancer, MEK1/2, PP2A, acide okadaïque

## Abstract

Moloney sarcoma virus-transformed MDCK cells, MSV-MDCK, selected for their invasive capacity (INV cells), share multiple characteristics with cancer and metastatic cells. We recently showed a ras-ERK constitutive activation in both MSV and INV cell lines using two specific inhibitors, inhibiting the Ras-ERK pathway at different levels. These results shed light on a constitutive activation of MEK1/2 rather than ras, Raf-1 or ERK1/2. This project consisted in determining the cause and the mechanism of this constitutive activation in transformed cells.

We investigated for possible activating mutation(s) in MEK1 and 2 in MSV and INV cells, to find that none of them was bearing mutations, when compared with the sequence from MDCK cells. Because it never had been done, the sequences for canine MEK1 and 2 are now available for the first time in *GenBank*.

Therefore, we investigated the phosphatase, which activity is responsible for dephosphorylation and inactivation of MEK1/2, PP2A, *in situ* in migrating cells, then *in vitro* on immunoprecipitated-PP2A. Wound healing assays revealed a higher basal motility activity in MSV and INV cells, which were insensible to okadaic acid (OA), a specific inhibitor of PP2A. 50 nM OA treatment oppositely increased motility in MDCK cells. These observations perfectly correlate with the increased phosphorylation level of MEK1/2 in parental MDCK cells following inhibition of PP2A by OA, and the absence of this effect in MSV and INV cells. *In vitro* PP2A phosphatase activity is lower in MSV and INV cells and can not be modulated by a MAPK modulator, when compared to MDCK cells. Finally, western blots discriminating MEK1 and MEK2 showed that MEK, as well as subunit /A of PP2A, were expressed at a lesser extent in MSV and INV cells. The relationship between these phenomena and MEK1/2 constitutive activation and motility remains to be explained.

The current investigations have helped to determine the role of PP2A in the constitutive activation of the ras-ERK pathway induced by the Moloney Sarcoma Virus in MDCK cell lines, a current model for tumor cells.

**Key words** : invasion, motility, cancer, MEK1/2, PP2A, okadaic acid

## Table des matières

<i>Résumé</i> .....	<i>iii</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>iv</i>
<i>Table des matières</i> .....	<i>v</i>
<i>Liste des figures</i> .....	<i>ix</i>
<i>Liste des abréviations</i> .....	<i>xi</i>
<i>Remerciements</i> .....	<i>xv</i>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Cancer</b> .....	<b>2</b>
1.1.1 Impact .....	2
1.1.2 Définition .....	2
1.1.3 Processus de transformation oncogénique .....	3
1.1.4 Invasion .....	3
1.1.4.1 La migration cellulaire .....	4
<b>1.2 La transformation cellulaire comme modèle d'étude</b> .....	<b>5</b>
1.2.1 L'intérêt de ces modèles .....	5
1.2.1.1 L'immortalisation de lignées cellulaires .....	6
1.2.2 Exemple de modèles de cellules transformées par un virus .....	7
1.2.2.1 Virus SV40 .....	7
1.2.2.2 MSV .....	7
<b>1.3 Récepteurs à activité tyrosine kinase des facteurs de croissance</b> .....	<b>8</b>
1.3.1 Structure des RTK .....	8
1.3.2 Activation des RTK .....	9
<b>1.4 Voie des MAPK</b> .....	<b>11</b>
1.4.1 Rôle général .....	11
1.4.2 Rôles de la voie Ras/Raf/MEK/ERK .....	12
1.4.3 Régulation de la voie Ras-ERK .....	13
1.4.3.1 Régulation de Raf-1 .....	14
1.4.3.2 Régulation de MEK .....	15
1.4.3.3 MAP Kinase Phosphatases (MKP) au niveau de ERK1/2 .....	16
<b>1.5 La voie MAPK Ras-ERK dans le cancer</b> .....	<b>17</b>
1.5.1 Mutations de <i>ras</i> .....	18
1.5.2 Mutations de <i>raf</i> .....	19
1.5.3 Importance des MAPK dans la progression tumorale et l'invasion .....	20
<b>1.6 PP2A</b> .....	<b>21</b>
1.6.1 Famille des sérines/thréonines phosphatases .....	21
1.6.2 Structure de PP2A .....	22
1.6.3 Rôles connus .....	23
1.6.3.1 Modulation du cycle cellulaire .....	23
1.6.3.2 Régulation de facteurs de transcription .....	24
1.6.3.2.1 Modulation de voies de signalisation .....	24
1.6.4 Régulation de PP2A .....	24
<b>1.7 PP2A dans le cancer</b> .....	<b>25</b>

1.7.1 Mutations de la sous-unité /A dans certains cancers .....	25
1.7.2 Mutation de la sous-unité /B .....	25
1.7.3 Usurpation de la sous-unité /B' par le STAg .....	26
<b>1.8 Modèle cellulaire .....</b>	<b>27</b>
1.8.1 Pertinence du modèle canin .....	27
1.8.2 Caractéristiques des MDCK, MSV et INV .....	28
1.8.2.1 MDCK.....	28
1.8.2.2 MSV-MDCK.....	28
1.8.2.3 MSV-MDCK-INV .....	29
1.8.2.3.1 Propriétés .....	31
<b>1.9 Hypothèse et objectifs de l'étude .....</b>	<b>32</b>
<b>2. Matériel et méthodes.....</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Réactifs de culture cellulaire.....</b>	<b>34</b>
2.1.1 Autres réactifs .....	34
<b>2.2 Anticorps.....</b>	<b>34</b>
2.2.1 Anticorps primaires.....	34
2.2.2 Anticorps secondaires .....	35
<b>2.3 Culture cellulaire .....</b>	<b>35</b>
<b>2.4 Préparation des lysats cellulaires totaux.....</b>	<b>35</b>
2.4.1 Dosage des protéines.....	36
<b>2.5 Immunobuvardage de type Western (IB).....</b>	<b>36</b>
2.5.1 Séparation des protéines sur un gel de polyacrylamide .....	37
2.5.2 Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose.....	37
2.5.3 Révélation des protéines au colorant Rouge Ponceau .....	37
2.5.4 Immunobuvardage de type Western avec les anticorps phospho-spécifiques .....	38
2.5.5 Immunobuvardage de type Western des protéines non-phosphorylées.....	38
2.5.6 Immunobuvardage de type Western des protéines phosphorylées sur tyrosine .....	38
<b>2.6 Décapage des anticorps.....</b>	<b>39</b>
<b>2.7 Immunoprécipitation.....</b>	<b>39</b>
<b>2.8 Technique de réparation de plaies.....</b>	<b>40</b>
<b>2.9 PCR .....</b>	<b>40</b>
2.9.1 Isolation de l'ARN total.....	40
2.9.2 RT-PCR.....	41
2.9.3 Construction des amorces .....	42
2.9.4 PCR de séquençage.....	43
<b>2.10 Essais d'activité phosphatase .....</b>	<b>43</b>
2.10.1 Lyse des cellules .....	44
2.10.2 Mesure de l'activité phosphatase .....	44
<b>2.11 Statistiques.....</b>	<b>45</b>
<b>3. Résultats .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1 Résultats préliminaires ayant mené au présent projet.....</b>	<b>47</b>
3.1.1 Activation constitutive de MEK et ERK chez les cellules MSV et INV.....	47
3.1.2 Les inhibiteurs PD98059 et U0126 agissent différemment sur le degré de phosphorylation de ERK1/2.....	47

3.1.3 La neutralisation de la boucle d'activation autocrine de c-Met chez les INV n'a pas d'effet sur l'activation constitutive de ERK1/2.....	49
<b>3.2 Rôle de MEK1/2 dans l'activation constitutive de ERK1/2</b> .....	51
3.2.1 Expression différentielle de MEK1 et de MEK2 dans les cellules MSV et INV. ....	51
3.2.2 Phosphorylation basale plus élevée de MEK1 chez les cellules MSV et INV .....	53
3.2.3 Le degré de phosphorylation des sérines en position 338 et 259 de Raf-1 est similaire dans les trois lignées .....	54
<b>3.3 Mutations dans MEK1 et/ou MEK2</b> .....	56
3.3.1 Séquençage de MEK1 et de MEK2 dans les cellules MDCK, MSV et INV .....	56
3.3.2 Comparaison des séquences obtenues avec celle de MEK1 prédite.....	57
<b>3.4 Implication de PP2A dans la modulation du degré de phosphorylation de MEK1/2</b> .....	59
3.4.1 Expression de PP2A/A et /C dans les cellules MDCK, MSV et INV .....	59
3.4.2 Co-immunoprécipitation de PP2A/A avec PP2A/C, MEK1, et MEK2.....	60
3.4.3 Réciproque des co-immunoprécipitations.....	62
<b>3.5 Inhibition de l'activité phosphatase de PP2A par l'AO chez les cellules MDCK</b> .....	63
3.5.1 Effet de l'AO sur la phosphorylation de MEK1/2 chez les cellules MDCK, MSV et INV .....	64
3.5.2 Effet de l'AO sur la réparation de plaies dans les cellules MDCK, MSV et INV .....	65
3.5.2.1 Détermination de la concentration d'AO à utiliser pour la réparation de plaies des MDCK.....	65
3.5.2.2 Effet de l'AO sur les trois lignées cellulaires .....	66
<b>3.6 Comparaison de l'activité phosphatase de PP2A entre les cellules MDCK, MSV et INV</b> .....	69
3.6.1 Dosage de l'activité phosphatase totale des MDCK.....	69
3.6.2 Suivi en fonction du temps de l'effet du TPA sur la phosphorylation de ERK1/2 .....	70
3.6.3 Efficacité du tampon imidazole à immunoprécipiter PP2A .....	71
3.6.4 Dosage de l'activité phosphatase de PP2A.....	71
<b>4. Discussion</b> .....	73
<b>4.1 Implication de MEK1/2 dans l'activation constitutive des MAPK chez les cellules MSV et INV</b> .....	74
4.1.1 Le PD98059 et le U0126 incriminent MEK1/2.....	74
4.1.2 La boucle d'activation autocrine des INV n'est pas impliquée .....	75
<b>4.2 Rôle de MEK1/2 dans l'activation constitutive de la voie Ras-ERK chez les cellules MSV et INV</b> .....	76
4.2.1 Les isoformes MEK1 et MEK2 .....	76
4.2.2 Raf-1 n'est pas responsable .....	77
4.2.3 L'activation constitutive de MEK1/2 n'est pas due à une ou des mutations activatrices .....	78
<b>4.3 Rôle de PP2A dans l'activation constitutive de la voie Ras-ERK chez les cellules MSV et INV</b> .....	79



4.3.1 La sous-unité /A de PP2A est moins exprimée chez les MSV et INV .....	80
<b>4.4 L'activité phosphatase déficiente de PP2A comme cause de l'activation constitutive de MEK1/2 chez les MSV et INV .....</b>	<b>82</b>
4.4.1 Incapacité de l'AO à inhiber PP2A chez les cellules MSV et INV .....	82
4.4.2 L'AO augmente la réparation de plaies des cellules MDCK, mais non des MSV et INV .....	83
4.4.3 L'activité phosphatase totale des cellules MDCK .....	85
4.4.4 L'activité phosphatase de PP2A est diminuée chez les cellules MSV et INV .....	86
<b>5. Conclusions et perspectives .....</b>	<b>89</b>
<b>6. Références .....</b>	<b>92</b>

## Liste des figures

Figure 1.1 : La migration cellulaire représentée au niveau de la cellule.....	4
Figure 1.2 : Étapes générales de la tumorigenèse menant à la dissémination de cellules cancéreuses.....	5
Figure 1.3 : Représentation schématique de la liaison d'un ligand à son récepteur, induisant la dimérisation de celui-ci et son activation.....	9
Figure 1.4 : Schéma de l'activation de la voie des MAPK par un stimulus mitogénique se liant à un RTK.....	11
Figure 1.5 : Les différents rôles et les différentes composantes signalétiques des MAPK.....	12
Figure 1.6 : Étapes de l'activation de Raf-1 par phosphorylation.....	15
Figure 1.7 : Régulation de l'expression des MKP, responsables de la désactivation des MAPK ERK1/2.....	17
Figure 1.8 : Principaux rôles de la voie MAPK ERK dans le processus de cancérogenèse.....	18
Figure 1.9 : Schéma représentant les formes active et inactive de Ras.....	19
Figure 1.10 : Implication de la voie des MAPK dans la migration cellulaire.....	21
Figure 1.11 : Représentation schématique des différentes sous-unités de PP2A, ainsi que de leurs isoformes.....	23
Figure 1.12 : Les différentes perturbations de l'intégrité des sous-unités de PP2A peuvent avoir des conséquences importantes dans la tumorigenèse.....	27
Figure 1.13 : Caractéristiques moléculaires et phénotypiques des cellules MDCK, MSV et INV.....	30
Figure 3. 1 : Résultats présentant l'activation de la voie des MAPK Ras-ERK telle que rapportée par le degré de phosphorylation de ERK1/2.....	49
Figure 3. 2: Expression différentielle de MEK1 et de MEK2 chez les MSV et INV....	52
Figure 3. 3: Degré basal de phosphorylation de MEK1 plus élevé chez les cellules MSV et INV.....	53

Figure 3. 4: Phosphorylation des sérines 338 et 259 de Raf-1 chez les cellules MDCK, MSV et INV avec ou sans stimulation au TPA ou au FBS.....	55
Figure 3.5: Comparaison de la séquence prédite de MEK1 de <i>Canis familiaris</i> avec celle obtenue du séquençage de l'ADNc codant pour MEK1 des cellules MDCK.....	58
Figure 3.6 : Expression différentielle de deux sous-unités de PP2A (/A et /C) chez les cellules MSV et INV lorsque comparée aux cellules MDCK.....	60
Figure 3.7 : Immunoprécipitation du complexe PP2A-MEK1.....	62
Figure 3.8 : Réciproques des immunoprécipitations de PP2A : les anticorps $\alpha$ -MEK1 et $\alpha$ -MEK2 sont aussi capables de co-immunoprécipiter les sous-unités /A et /C de PP2A.....	63
Figure 3. 9 : Effet de l'AO sur le degré de phosphorylation de MEK1/2 chez les cellules MDCK, MSV et INV.....	64
Figure 3.10 : Réparation de plaie par des cellules MDCK en présence de concentrations croissantes d'AO.....	67
Figure 3.11 : Effet de l'AO sur la réparation de plaies chez les trois lignées cellulaires.....	68
Figure 3.12 : Activité phosphatase totale des cellules MDCK.....	70
Figure 3.13 : Variation du degré de phosphorylation de ERK1/2 en fonction du temps, suite à une stimulation au TPA.....	71
Figure 3.14 : Activité phosphatase de PP2A immunoprécipitée.....	72

## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Akt	Voir PKB
AMPc	Adénosine mono-phosphate cyclique
AO	Acide okadaïque
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BCA	Acide bicinchoninique ( <i>bicinchoninic acid</i> )
BSA	Albumine sérique bovine ( <i>bovine serum albumin</i> )
Ca <sup>2+</sup>	ion calcium
CREB	Élément-ligand de réponse à l'AMPc ( <i>c-AMP response element-binding</i> )
c-Mos	Protéine Mos cellulaire
Cu <sup>1+</sup>	ion cuivre sous forme 1 charge
Cu <sup>2+</sup>	ion cuivre sous forme 2 charge
DSPP	Protéine phosphatase à spécificité double ( <i>Dual specificity protein phosphatase</i> )
DMEM	Milieu essentiel minimal de Dulbecco ( <i>Dulbecco's minimum essential medium</i> )
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
ECL	Chemiluminescence augmentée ( <i>enhanced chemiluminescence</i> )
ECM	Matrice extracellulaire ( <i>extracellular matrix</i> )
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGF	Facteur de croissance épidermique ( <i>epidermal growth factor</i> )
ERK	Kinase régulée par un signal extracellulaire ( <i>Extracellular-regulated kinase</i> )
FAK	Voir p125 <sup>FAK</sup>
FBS	Sérum de bovin fœtal ( <i>fœtal bovine serum</i> )

FGF	Facteur de croissance des fibroblastes ( <i>Fibroblast growth factor</i> )
GAP	Protéine activatrice de GTPase ( <i>GTPase-activating protein</i> )
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
GEF	Facteur d'échange de guanine ( <i>guanine exchange factor</i> )
Grb2	Protéine de liaison 2 aux récepteurs des facteurs de croissance ( <i>growth factor receptor binding protein-2</i> )
HEAT	Motif répété de leucine
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazinéthanesulfonique
HGF	Facteur de croissance hépatocytaire ( <i>hepatocyte growth factor</i> )
HRP	Peroxydase du raifort ( <i>Horseradish peroxidase</i> )
hTERT	Téломérase de transcriptase inverse humaine ( <i>Human Telomerase reverse transcriptase</i> )
IGF	Facteur de croissance ressemblant à l'insuline ( <i>Insuline-like growth factor</i> )
IgG	Immunoglobuline
JNK	Janus kinase
LTA <sub>g</sub>	Grand antigène T ( <i>Large T antigen</i> )
MAPK	Protéine kinase activée par les agents mitogènes ( <i>Mitogen activated protein kinase</i> )
MBD	Domaine de liaison aux MAPK ( <i>MAPK binding domain</i> )
MDCK	Lignée cellulaire de tubules proximaux de rein de chien isolée par les chercheurs Madin et Darby ( <i>Madin-Darby canine kidney cells</i> )
MEK	Kinase activée par les agents mitogènes et qui active la kinase ERK ( <i>MAPK ERK-activating kinase</i> )
Mg <sup>2+</sup>	ion magnésium
MLC	Chaîne légère de la myosine ( <i>Myosin light chain</i> )
MLCK	Kinase de la chaîne légère de la myosine ( <i>Myosin light chain kinase</i> )
MMP	Métalloprotéase matricielle ( <i>matrix metalloprotease</i> )

MP1	Partenaire 1 de MEK
MSV	Virus du sarcome de Moloney ( <i>Moloney sarcoma virus</i> )
MSV-MDCK	Cellules MDCK transformées par le virus du sarcome de Moloney ( <i>MSV</i> )
MSV-MDCK-INV	Variant de cellules aux propriétés invasives sélectionnées à partir des cellules MDCK transformées par le virus du sarcome de Moloney
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Orthovanadate de sodium
p125 <sup>FAK</sup>	Kinase présente dans les points focaux d'adhésion ( <i>focal adhesion kinase</i> )
PAK1	Kinase activée par p21 ( <i>p21-activated kinase</i> )
PBS	Tampon salin à base de phosphate ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PBS-CM	PBS contenant du calcium et du magnésium
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes sanguines ( <i>Platelet-derived growth factor</i> )
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol (3,4,5) phosphate
PI3-kinase	Phosphoinositide-3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PLC $\gamma$	Phospholipase C- $\gamma$
PMSF	Phénylméthanesulfonyl fluorure
PP1	Protéine phosphatase 1
PP2A	Protéine phosphatase de type 2-A
pRB	Protéine du rétinoblastome
PRS	Séquence riche en proline
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
RTK	Récepteur tyrosine kinase
RT-PCR	Transcription réverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne ( <i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i> )
SAPK	Protéine kinase activée par le stress ( <i>stress-activated protein kinase</i> )
SDS	Sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS ( <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> )

SF	Facteur d'étalement ( <i>Scatter Factor</i> )
SH	Domaine homologue de Src ( <i>Src-homology domain</i> )
SH2	Domaine homologue 2 de Src ( <i>Src-homology domain 2</i> )
SH3	Domaine homologue 3 de Src ( <i>Src-homology domain 3</i> )
Sos	GEF de Ras ( <i>Son of sevenless</i> )
STAg	Petit antigène T ( <i>small T antigen</i> )
SV40	Virus simien 40 ( <i>simian virus 40</i> )
TBS	Tampon salin à base de Tris ( <i>Tris buffered saline</i> )
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
TGF- $\beta$	Facteur de croissance transformant $\beta$ ( <i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i> )
TPA	12- <i>O</i> -tétradécanoïl phorbol 13-acétate
TR	Rouge de texan ( <i>Texas Red</i> )
Tris	Tris (Hydroxyméthyl) Aminométhane
v-Mos	Protéine Mos virale

## Remerciements

J'aimerais d'abord et avant tout remercier le Dr. Josette Noël. C'est par son esprit critique, par sa chaleur et par son amour envers la science qu'a été rendue possible la réalisation de ce projet de maîtrise. Sans votre motivation, rien n'aurait été possible, et je vous en serai éternellement reconnaissant. Je ne peux passer sous silence la contribution d'Eugénie Goupil et de Mohammad Amrei, mes collègues de travail pendant les deux années que j'ai passées au département de physiologie de l'Université de Montréal. Le travail de Julie Vadnais a aussi été déterminant dans l'élaboration de mon projet, et je les remercie tous et toutes très sincèrement.

Je remercie aussi Dr. Madhu Anand-Srivastava et Dr. Angelo Calderone d'avoir accepté d'effectuer la révision de ce mémoire de maîtrise, et surtout d'avoir contribué, par leurs judicieux conseils et commentaires, à l'amélioration de ce mémoire.

Gabrielle, sans ton soutien constant, je n'en aurais pas vu la fin. Merci d'être dans ma vie.



## **1. Introduction**

## **1.1 Cancer**

### **1.1.1 Impact**

De nos jours, le cancer cause plus de mortalité chez les hommes et les femmes que tous les autres problèmes de santé, devançant même les causes accidentelles comme les accidents de voiture. Les cancers les plus fréquents sont ceux du poumon, de la prostate et du tube digestif (Statistiques Canada, 2006, tableau 103-0523 et catalogue 84-601-XIE). Les mécanismes moléculaires régissant l'établissement d'une tumeur maligne étant très similaires dans tous les types de cancers, l'étude fondamentale des causes de son établissement et de la progression de la maladie est essentielle.

### **1.1.2 Définition**

Le cancer se définit comme l'apparition d'une tumeur composée de cellules atypiques, caractérisée par un pouvoir d'accroissement autonome, une délimitation imprécise, une capacité d'envahissement des tissus et vaisseaux voisins et une tendance à se disséminer par la production de métastases.

La prolifération des cellules normales de l'organisme (somatiques et sexuelles) est régie par plusieurs mécanismes cellulaires assurant l'homéostasie des tissus environnants. Ainsi, au début du développement de l'organisme (embryogenèse), les cellules prolifèrent, se divisent et migrent énormément, tandis que lorsque l'individu a atteint le stade adulte, la majorité des cellules de l'organisme deviennent quiescentes. Certains types de cellules conservent un taux de renouvellement rapide, telles les cellules du tube digestif et du système immunitaire, tandis que certaines autres ont un taux de renouvellement quasi inexistant, comme les cellules du muscle cardiaque. Ce sont donc les cellules à haut taux de renouvellement qui présentent un risque de transformation oncogénique; les cellules se divisant rapidement ayant plus de chances d'acquérir des mutations et de les propager.

### 1.1.3 Processus de transformation oncogénique

L'initiation de la transformation oncogénique met en cause différentes mutations se produisant dans certains gènes spécifiques, ayant un rôle dans le maintien de la prolifération et de la division normale d'une cellule ainsi que dans la réparation ou la réplication de l'ADN (46, 104). Ces gènes sont appelés suppresseurs de tumeurs. Ces mutations peuvent être héréditaires ou avoir comme origine une infection virale ou une exposition à certaines radiations. Lorsque plusieurs mutations sont accumulées dans le génome de la cellule, et que plusieurs d'entre elles se produisent dans lesdits gènes suppresseurs de tumeurs, les conditions sont rassemblées pour que cette cellule acquière la possibilité de se diviser anormalement (46). Ces caractéristiques génétiques seront transmises à sa descendance, aux cellules-filles.

Les caractéristiques phénotypiques de ces cellules sont la perte de l'inhibition de contact, l'immortalité, la croissance indépendante de l'ancrage, l'indépendance face aux facteurs de croissance et l'apparition de changements morphologiques (tels l'apparition de pseudopodes, la déformation du noyau, l'augmentation du nombre de nucléoles). De plus, l'isolation et la transplantation de ces cellules dans un autre organisme causent l'apparition d'une tumeur.

La transformation oncogénique mène initialement à une tumeur bénigne, qui prolifère anormalement, mais qui a une croissance lente et n'envahit pas les tissus avoisinants. La tumeur peut rester dans cet état latent pour une durée indéterminée. Lorsque la tumeur bénigne se disperse jusqu'à un autre tissu, elle devient maligne. À ce stade, la tumeur a généralement une croissance rapide et a acquis un pouvoir de dissémination (par invasion, provoquant la formation de métastases). Si elle n'est pas traitée, le pronostic est mauvais et elle entraîne la mort.

### 1.1.4 Invasion

### 1.1.4.1 La migration cellulaire

La migration cellulaire est un processus cellulaire normal permettant aux cellules migratoires d'accomplir leur fonction. L'extravasation des lymphocytes d'un vaisseau sanguin jusqu'à un site d'infection ou la migration des cellules de la crête neurale lors de l'embryogenèse (103) sont des phénomènes physiologiques. Ce processus se fait en plusieurs étapes, impliquant la polarisation de la cellule en une queue à l'arrière et un front de migration à l'avant (« tail » et « leading-edge »), l'avancement du front-dirigeant, le mouvement de la cellule vers l'avant et le détachement de la partie postérieure. Les principales étapes de ce mouvement sont illustrées dans la figure 1.1 (84).

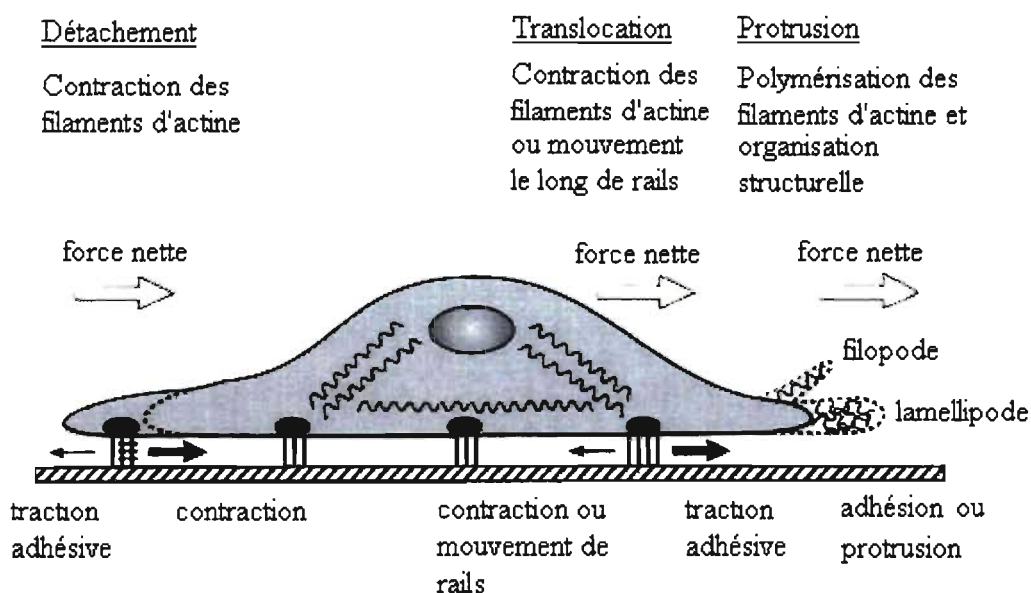
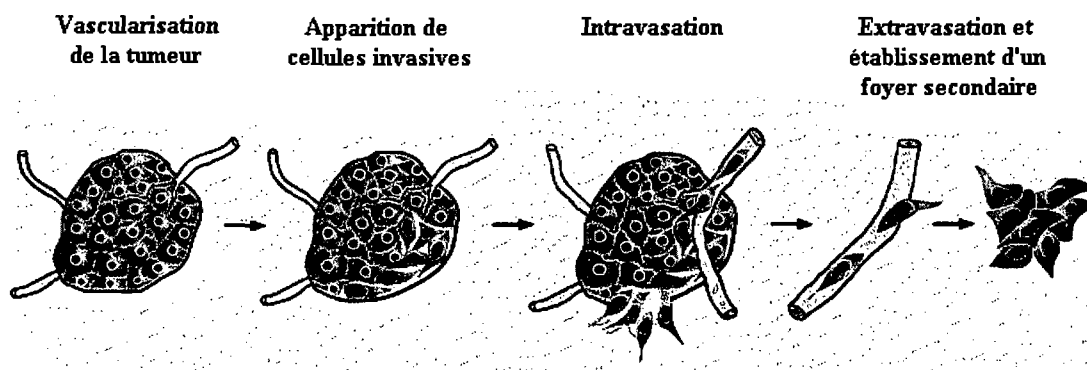


Figure 1.1 : La migration cellulaire représentée au niveau de la cellule. Adaptée de (84).

Lorsque des cellules malignes acquièrent la capacité de migration, la formation de métastases est imminente. Pour que les cellules tumorales atteignent la paroi d'un vaisseau sanguin et à la traversent (schématisé à la figure 1.2), celles-ci doivent faire appel aux mêmes mécanismes impliqués dans la migration cellulaire. La dégradation de la matrice extracellulaire (ECM pour *Extracellular Matrix*) par les cellules tumorales est un élément clé de la dissémination de la tumeur. L'ECM est composée de plusieurs

protéines et macromolécules interagissant avec des récepteurs et protéines à la surface de la cellule. En effet, les intégrines qui y sont exposées interagissent avec certains composants de l'ECM, ce qui a pour effet de modifier le cytosquelette et de promouvoir la migration (119). Certaines protéines exprimées à la surface cellulaire ont pour rôle de dégrader l'ECM afin de permettre l'avancement de la cellule. Les métalloprotéases matricielles (MMP), entre autres, jouent ce rôle et sont donc exprimées en grande quantité dans les cellules tumorales en migration.

La formation de métastases implique la migration des cellules tumorales jusqu'à un vaisseau sanguin avoisinant, l'intravasation dans le vaisseau, une période passive de séjour dans la circulation sanguine, l'attachement des cellules tumorales à la paroi interne du vaisseau, l'extravasation vers les tissus environnants du vaisseau et enfin l'établissement d'un foyer secondaire tumoral (25). Ces étapes sont résumées à la figure 1.2



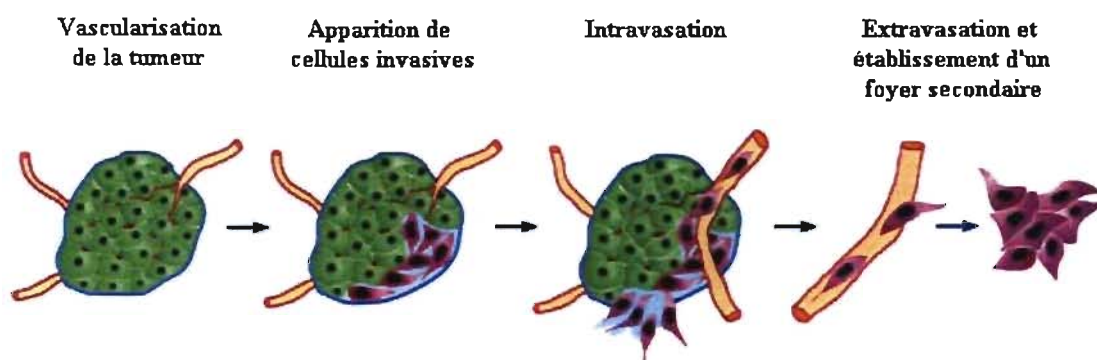
**Figure 1.2 : Étapes générales de la tumorigenèse menant à la dissémination de cellules cancéreuses.**  
Adaptée de (25).

## 1.2 La transformation cellulaire comme modèle d'étude

### 1.2.1 L'intérêt de ces modèles

protéines et macromolécules interagissant avec des récepteurs et protéines à la surface de la cellule. En effet, les intégrines qui y sont exposées interagissent avec certains composants de l'ECM, ce qui a pour effet de modifier le cytosquelette et de promouvoir la migration (119). Certaines protéines exprimées à la surface cellulaire ont pour rôle de dégrader l'ECM afin de permettre l'avancement de la cellule. Les métalloprotéases matricielles (MMP), entre autres, jouent ce rôle et sont donc exprimées en grande quantité dans les cellules tumorales en migration.

La formation de métastases implique la migration des cellules tumorales jusqu'à un vaisseau sanguin avoisinant, l'intravasation dans le vaisseau, une période passive de séjour dans la circulation sanguine, l'attachement des cellules tumorales à la paroi interne du vaisseau, l'extravasation vers les tissus environnants du vaisseau et enfin l'établissement d'un foyer secondaire tumoral (25). Ces étapes sont résumées à la figure 1.2



**Figure 1.2 : Étapes générales de la tumorigenèse menant à la dissémination de cellules cancéreuses.**  
Adaptée de (25).

## 1.2 La transformation cellulaire comme modèle d'étude

### 1.2.1 L'intérêt de ces modèles

ces gènes viraux séquestrent des protéines telles pRb ou p53 (37, 66), permettant aux cellules de se cultiver pour moult autres passages. Ces cellules vont tout de même éventuellement devenir sénéscentes mais parfois, si la chance vous sourit, il se peut qu'une de ces cellules infectées acquière les mutations nécessaires pour la rendre immortelle et tumorigénique. De ce fait, le processus d'immortalisation et la carcinogénèse sont tout-à-fait similaires.

## 1.2.2 Exemple de modèles de cellules transformées par un virus

### 1.2.2.1 Virus SV40

L'intérêt des études de l'infection du SV40 vient du fait que des séquences d'ADN de ce virus ont été retrouvées dans plusieurs tumeurs humaines (15, 86). Dans les systèmes de cellules humaines et de rongeurs, le grand antigène T du virus SV40 (LTA<sub>g</sub> pour *large T antigen*) joue un grand rôle dans le processus de transformation en ciblant des protéines comme p53 et Rb, de puissants suppresseurs de tumeurs puisqu'ils promouvoient la sénescence et préviennent la transition G<sub>1</sub>-S du cycle cellulaire (5, 35). Le petit antigène T du virus SV40 joue aussi plusieurs rôles dans le processus de transformation. Ce dernier a été impliqué dans la formation d'une boucle autocrine d'activation du récepteur au HGF (20), et aussi dans l'activation de la voie des MAPK par séquestration de la protéine phosphatase 2A (PP2A) (118). Ces deux derniers éléments confèrent au STA<sub>g</sub> un rôle important dans l'induction dans l'activation de la croissance cellulaire.

### 1.2.2.2 MSV

Un autre modèle de cellules transformées par un virus utilisé est celui de cellules immortalisées par le virus du sarcome de Moloney (MSV). Le virus menant à la transformation de lignées cellulaires provient en fait de la combinaison d'une partie défective du virus MSV complété avec des particules infectieuses de leucémie murine (63), mais qui porte toujours le nom de MSV. Les cellules infectées par le MSV

transportent un gène modifié codant pour une protéine très semblable à celle du gène *c-mos* de cellules normales, appelé *v-mos* (18, 23). C'est véritablement le produit de ce gène *v-mos* qui est responsable du potentiel de transformation du virus MSV, et non le gène cellulaire *c-mos* (48). La protéine venant du gène *v-mos*, appelée  $p37^{v-mos}$ , possède une activité protéine sérine/thréonine kinase lorsqu'elle est hyperphosphorylée; cette dernière caractéristique ayant pour effet de changer son poids moléculaire apparent à 43 kDa ( $p43^{v-mos}$ ) (55). Outre le rôle de la protéine endogène c-Mos dans la progression normale du cycle cellulaire (24), la protéine virale v-Mos a la capacité d'arrêter le cycle en phase M1 (107). Ce n'est que plusieurs années après son identification, que cet effet a été expliqué par l'action de  $p37^{v-mos}$  sur la protéine p53 (44).

Un autre rôle proposé pour c-Mos est l'activation de MEK1/2 durant la maturation des ovocytes, concomitante à l'inhibition d'une phosphatase désactivant les MAPK (126). Ces deux actions parallèles conduisent à une suractivation de la voie MEK1/2-ERK1/2. C'est donc pourquoi nous avons posé l'hypothèse que la protéine virale v-Mos, amenée par le virus MSV, contribuerait via une action similaire au potentiel de transformation cellulaire.

Ainsi, les virus SV40 et MSV, par leurs interactions similaires avec plusieurs protéines de la cellule-hôte, miment de manière très convaincante le processus oncogénique menant à la formation de tumeurs, et c'est pourquoi des modèles comme ceux-ci permettent d'étudier ces phénomènes sans avoir recourt à des cultures primaires de cellules tumorales.

### **1.3 Récepteurs à activité tyrosine kinase des facteurs de croissance**

#### **1.3.1 Structure des RTK**

Les facteurs de croissance médient leurs réponses biologiques par leur attachement à la surface cellulaire et l'activation de récepteurs possédant une activité tyrosine kinase intrinsèque (101). Il y a environ 16 familles de récepteurs à activité



tyrosine kinase (RTK) comprenant près de 60 récepteurs spécifiques (récepteur à l'EGF, PDGF, HGF, insuline, etc.). Leur structure est très conservée (124). Celle-ci se compose d'un domaine extracellulaire glycosylé qui lie un ligand spécifique, d'une région transmembranaire, d'une région juxta-membranaire et d'une queue cytoplasmique contenant le domaine tyrosine kinase et finalement, de la portion C-terminale qui lie différents effecteurs responsables de l'activation des différentes voies de signalisation dépendantes de ces récepteurs (figure 1.3). Des exemples de RTK mutés, comme EGFR et ErbB, ayant acquis une activité kinase constitutive par dimérisation constitutive sont connus pour avoir un rôle dans certains cancers (95, 106).

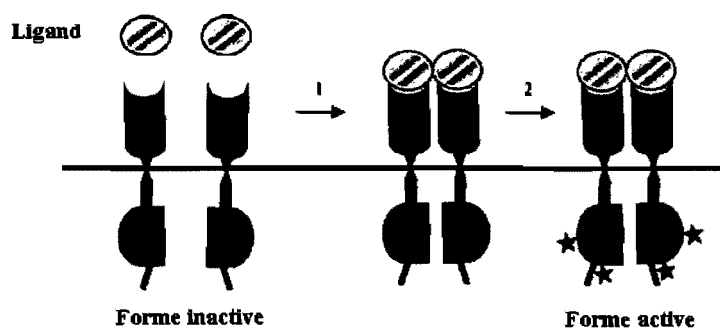


Figure 1.3 : Représentation schématique de la liaison d'un ligand à son récepteur, induisant la dimérisation de celui-ci et son activation. Adaptée de (14).

### 1.3.2 Activation des RTK

Avant la liaison du ligand au récepteur, celui-ci est sous forme monomérique (sauf le récepteur à l'insuline). Suivant la liaison avec son ligand, il y a dimérisation du récepteur, ce qui entraîne l'autophosphorylation du domaine cytoplasmique à activité tyrosine kinase (30, 88, 137). Cette autophosphorylation serait due au fait que la dimérisation rapproche les domaines protéiques possédant une activité tyrosine kinase de chaque monomère et provoque la transphosphorylation des résidus tyrosine de la boucle d'activation (*activation loop*) du domaine catalytique (61). L'autophosphorylation fait adopter à la boucle d'activation une conformation « ouverte » qui permet à l'ATP et au substrat d'y accéder, ce qui permet ensuite le transfert d'un phosphate du récepteur au substrat. Cette étape se fait grâce

à l'intervention d'une protéine adaptatrice impliquée dans la transmission du signal. Par exemple, l'activation de tous les RTK stimulent l'échange du GDP pour le GTP de la protéine Ras. Celle-ci est activée par le facteur d'échange de nucléotide guanine Sos (*Son of sevenless*), et la protéine adaptatrice Grb2 (*Growth factor receptor binding protein-2*) y joue un rôle important en liant Sos via son domaine SH3 (pour *Src Homology Domain 3*). Le complexe Grb2/Sos est recruté au RTK activé par l'attachement de son domaine SH2 (pour *Src Homology Domain 2*) à certaines tyrosines phosphorylées spécifiques du récepteur. Cette liaison a pour effet de diriger Sos à la membrane plasmique et lui permettre d'entrer en contact avec la protéine Ras et d'échanger son GDP pour un GTP (voir la figure 1.4). S'ensuivra alors l'activation de la cascade des MAPK et la régulation de l'expression de gènes d'intérêt.

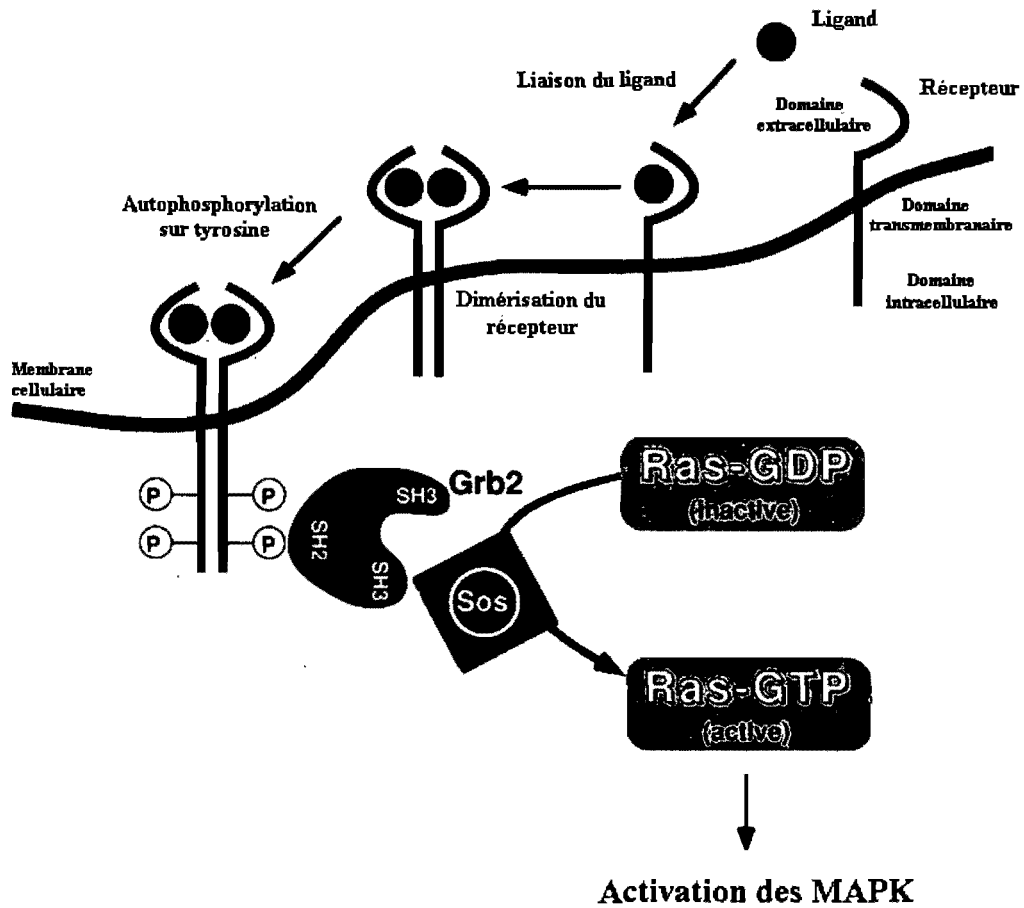


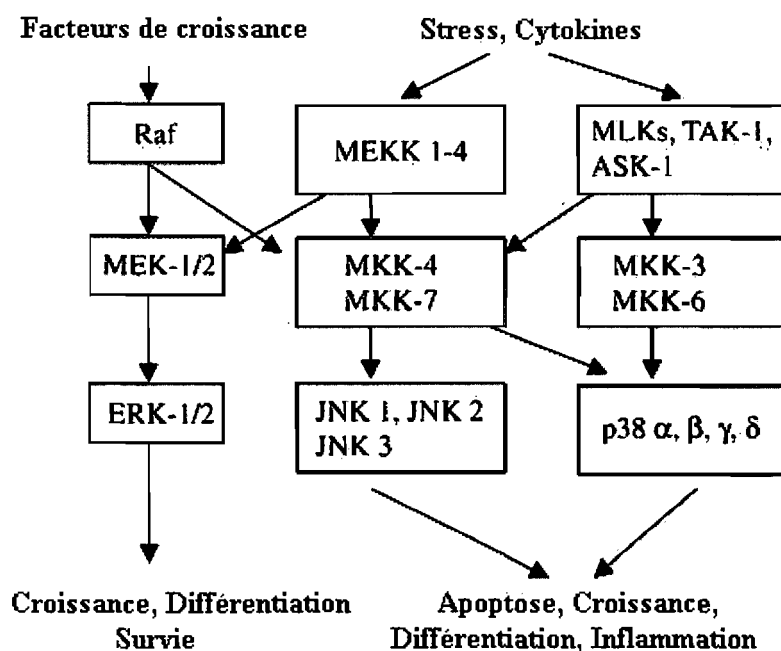
Figure 1.4 : Schéma de l'activation de la voie des MAPK par un stimulus mitogénique se liant à un RTK. Adaptée de (52).

## 1.4 Voie des MAPK

### 1.4.1 Rôle général

La voie de signalisation des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) joue un rôle majeur dans la régulation de l'expression des gènes chez les cellules eucaryotes. Le mécanisme principal selon lequel les MAPK affectent l'expression de certains gènes est par l'altération de l'activité de facteurs de transcription ainsi que de leurs gènes cibles. Trois voies distinctes des MAPK ont été identifiées et caractérisées : la voie ERK1/2

(*Extracellular signal-Regulated Kinase 1 and 2*), la voie JNK/SAPK (*c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase*) et la voie p38 (voir le schéma à la figure 1.5). La voie Ras-ERK est stimulée principalement par des stimuli mitogéniques comme les facteurs de croissance et les hormones (47), tandis que les voies JNK/SAPK et p38 sont plutôt activées par des stimuli de stress (83). De façon générale, les trois voies ont pour but principal de relayer un signal extracellulaire jusqu'au noyau, en vue d'assurer une réponse adéquate aux stimuli mitogéniques.



**Figure 1.5 :** Les différents rôles et les différentes composantes signalétiques des MAPK. Adaptée de (104).

#### 1.4.2 Rôles de la voie Ras/Raf/MEK/ERK

Un stimulus mitogénique, généré par l'interaction d'un facteur de croissance avec son récepteur tyrosine kinase spécifique, est convoyé à l'intérieur de la cellule par l'activation du récepteur. Celui-ci induira l'autophosphorylation de sa portion cytoplasmique, qui elle-même provoquera l'activation du facteur d'échange de guanoside Sos, qui deviendra lié au GTP. Sous cette forme activée, Ras ira activer une

série de cascades de signalisation conditionnant la croissance cellulaire. Une de ces cascades est constituée de plusieurs kinases à sérine/thréonine, la voie Raf/MEK/ERK (80), et sa stimulation commence par l'activation de la protéine Raf-1 par Ras. Lorsque phosphorylée sur sa sérine 338 (phosphorylation rendue possible par la liaison de Raf-1 avec Ras lié au GTP), Raf-1 se trouve dans un état apte à phosphoryler son unique substrat, MEK1/2 (pour *MAPK ERK Kinase 1 and 2*) sur les sérines 218 et 222 (4, 141).

Les trois isoformes de Raf; A-Raf, B-Raf et C-Raf (appelé aussi Raf-1) ont toutes comme substrat MEK1/2, toutefois c'est sur l'interaction Raf-1/MEK que l'étude de l'activation des MAPK s'est le plus concentrée (59). MEK1/2 font partie d'un rare groupe de kinase à spécificité double, capable de phosphoryler les résidus tyrosines et thréonine (*dual specificity kinases*) (36). Quoiqu'existant sous deux isoformes, MEK1 et MEK2 ont le même rôle et la même efficacité *in vitro* (110). Ils activent ERK1/2 en phosphorylant le motif Thréonine-Glutamine-Tyrosine. ERK est une kinase à sérine/thréonine qui a une panoplie de substrats, parmi lesquels se trouvent des régulateurs de la prolifération cellulaire, la différenciation, le développement, l'angiogenèse, la réponse inflammatoire et l'apoptose (56). Ces réponses cellulaires sont des conséquences soit de l'altération directe de l'expression de gènes spécifiques, soit de la phosphorylation de protéines régulatrices comme p90Rsk ou p16<sup>INK4a</sup> (116).

#### 1.4.3 Régulation de la voie Ras-ERK

La régulation de la voie des MAPK Ras-ERK, pour que son activation soit transitoire, est très complexe et se produit à plusieurs niveaux. Premièrement, nous savons depuis quelques années que des protéines d'échafaudage régulent la spécificité des réponses des MAPK, et ce, en contrôlant les composants en amont et en aval avec lesquels ils interagissent. Le rôle des protéines d'échafaudage est de rassembler les composantes spécifiques du module MAPK, et ce rôle a très bien été décrit chez les levures (133). Chez les mammifères, la protéine d'échafaudage Partenaire 1 de MEK (MP1, pour *MEK Partner 1*) lie spécifiquement MEK1 et ERK1, ce qui permet une meilleure capacité de MEK1 à activer ERK1 (109). Une autre protéine d'échafaudage,

KSR (pour *Kinase Suppressor of Ras*), a récemment été identifiée et pourrait coopérer avec Ras pour potentialiser la transformation oncogénique de fibroblastes, de même que la maturation des ovocytes de xénopes, en accélérant l'activation de MEK et ERK (138). Il a en effet été démontré que KSR lie MEK et ERK et joue le même rôle que MP1.

Ceci étant dit, pour les besoins de cette introduction, nous aborderons la régulation exercée au niveau de Raf-1 et de MEK1/2 par la protéine phosphatase 2A (PP2A), et effleurerons celle de ERK1/2 par différentes phosphatases.

#### 1.4.3.1 Régulation de Raf-1

La régulation de Raf-1 est complexe puisqu'elle fait intervenir la déphosphorylation et phosphorylation de certains résidus de différents domaines de la protéine. Comme nous l'avons mentionné précédemment, Raf-1 est activé par Ras lorsque celui-ci est lié au GTP. Ras-GTP se lie à Raf-1 via son site d'ancrage spécifique dans la partie N-terminale de Raf-1, au RBD (pour *Ras Binding Domain*, acides aminés 55-131) (19). Cette liaison de Ras a pour effet de libérer la partie C-terminale, contenant le domaine catalytique, de l'effet inhibiteur exercé par la partie N-terminale. Raf-1 possède 4 sites de phosphorylation activatrice (sérines 338 et 494, tyrosine 341 et thréonine 491), cependant seule la phosphorylation de la sérine 338 est critique pour son activation, celle-ci étant placée immédiatement avant le domaine kinase (76).

La phosphorylation de certains résidus de Raf-1 a par contre un effet inhibiteur. C'est le cas des sérines 43 et 259, phosphorylées par la protéine kinase A (PKA). Il a fallu un certain temps pour comprendre que la phosphorylation de la sérine 43 n'avait pour effet que de limiter *in vivo* la liaison de Ras à la partie N-terminale de Raf-1 (112), limitant ainsi son activation. La sérine 259 a un effet direct et prédominant sur l'inhibition de Raf-1. En combinaison avec la phosphorylation de la sérine 621, Raf-1 est maintenu dans un état inhibé, par la liaison de la protéine adaptatrice 14-3-3, liant la partie N- à la partie C-terminale (se référer à la figure 1.6) (1, 96).

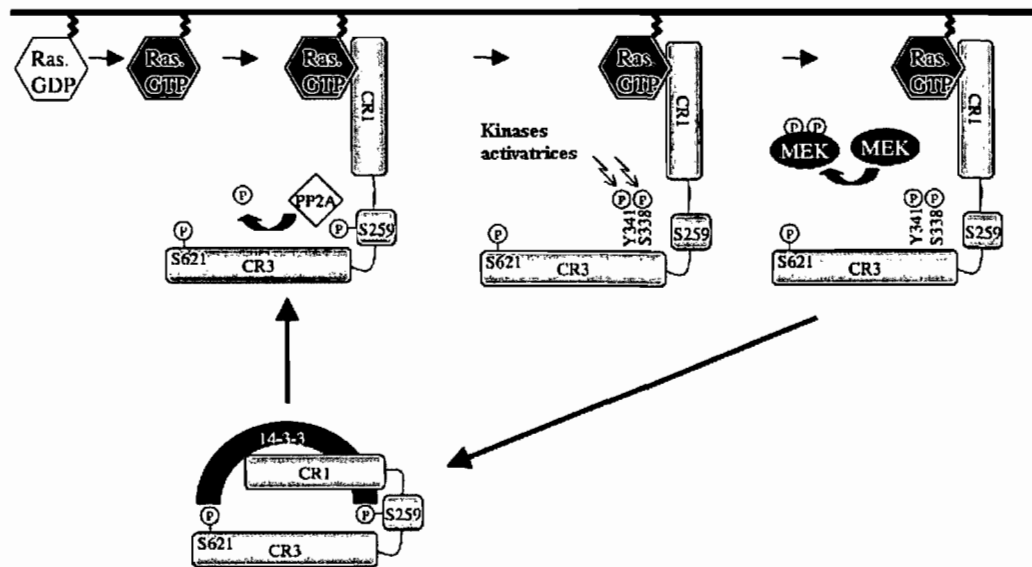


Figure 1.6 : Étapes de l'activation de Raf-1 par phosphorylation. Adaptée de (93).

PP2A, et la protéine phosphatase 1 (PP1) à un moindre degré cependant, a le rôle de lever l'inhibition de Raf-1 en venant déphosphoryler la sérine 259, ce qui a pour effet de permettre par la suite l'activation de Raf-1 (70).

#### 1.4.3.2 Régulation de MEK

La régulation de MEK1/2 est une étape cruciale de la voie MAPK Ras-ERK. En effet, plusieurs activateurs (Raf-1, B-Raf, mos, MEKK-1 et Tpl-2 (110)) peuvent activer MEK1/2 mais cette dernière n'a qu'un seul substrat, ERK1/2, ce qui fait que MEK1/2 se retrouve au bout d'un entonnoir de signaux et est le premier initiateur d'une multitude d'autres. Tout comme Raf-1, MEK1/2 a aussi plusieurs sites de phosphorylation, comme la thréonine 292 (45) et la sérine 298 (32) situées dans la séquence riche en proline (PRS pour *Proline-Rich Sequence*), en plus des sérines 218 et 222. La phosphorylation de la thréonine 292 ou de la sérine 298 dans la PRS a des effets régulateurs, c'est-à-dire qu'elle n'active pas MEK1/2, mais module plutôt la phosphorylation des résidus sérine 218 et 222 par Raf-1. Lorsque la thréonine 292 et la

sérine 298 sont mutées en alanine (abolition des fonctions), MEK perd toute possibilité d'association avec Raf-1 et donc d'activation (39). En effet, c'est PAK1 (pour *p21-activated kinase*) qui est apte à phosphoryler MEK1 sur la sérine 298 (43). Cette phosphorylation se produit lorsque les petites protéines G de la famille Rho sont activées lors d'une réorganisation du cytosquelette (43, 74). La phosphorylation de la thréonine 292 par ERK1/2 est par contre inhibitrice. Celle-ci est aussi initiée à la suite de la cascade d'activation menant à l'adhésion cellulaire (39)

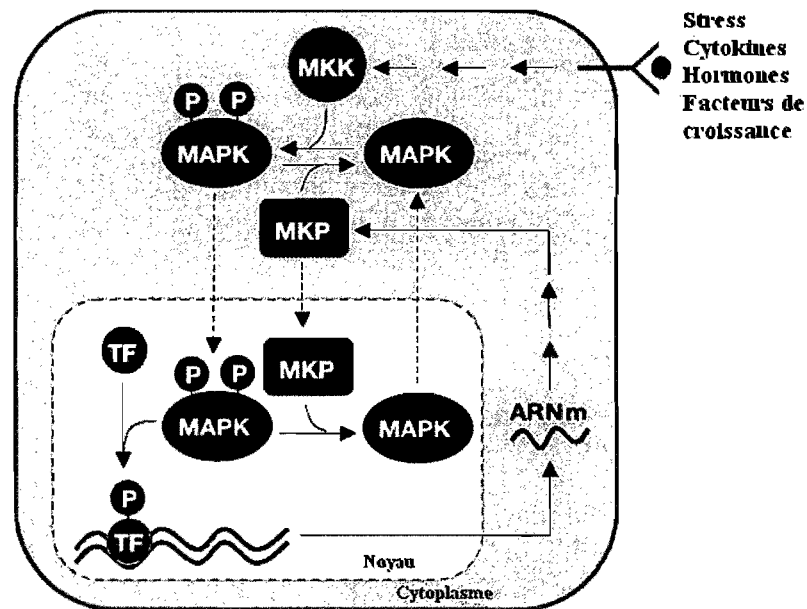
C'est aussi PP2A qui est responsable de la désactivation de MEK1/2, par déphosphorylation (hydrolyse) des résidus sérine en position 218 et 222. Plusieurs groupes ont démontré que PP2A peut déphosphoryler et donc inactiver MEK1/2 (et conséquemment ERK1/2) (6, 50). Un des faits majeurs ayant démontré l'effet inhibiteur de PP2A sur MEK est l'observation que le petit antigène T du virus SV40 (STAg pour *Small T Antigen*) a la capacité de se nicher dans la sous-unité catalytique de PP2A pour l'empêcher d'inactiver MEK1/2 (136). En effet, Pallas *et al.* ont été les premiers à trouver une association entre le STAg du SV40 et les sous-unités /A et /C de PP2A (100).

#### 1.4.3.3 MAP Kinase Phosphatases (MKP) au niveau de ERK1/2

Une régulation négative se doit d'être exercée sur la phosphorylation activatrice de la thréonine 202 et la tyrosine 204 (motif T-E-Y) de ERK1/2 lorsque celle-ci est activée. Récemment, une famille de protéines phosphatases à spécificité double (*Dual-Specificity Protein Phosphatases*) qui déphosphorylent les thréonines et les tyrosines des motifs T-E-Y a été identifiée et appelée MKP (pour *MAP Kinase Phosphatase*). À ce jour, environ dix MKP ont été identifiées, la première ayant été nommée MKP-1 par le groupe de Tonks en 1993 (120), qui avait isolé une protéine avec une activité tyrosine phosphatase sensible au vanadate (inhibiteur non-spécifique des tyrosines phosphatases) et qui était très semblable génétiquement à VH1 (pour *Variable heavy chain 1*), une protéine phosphatase à double spécificité. De façon simplifiée, les MKP exercent la désactivation des MAPK (p38, JNK/SAPK et ERK) en déphosphorylant en premier lieu la phosphotyrosine par une attaque nucléophile de leur domaine -



HCXXXXXR-, dans la MKP, et par la suite le même travail sur la phosphothréonine sera effectué, mais par une autre MKP (bien qu'identique à la première) (40). Comme illustré à la figure 1.7, les gènes des MKP sont exprimés lorsque les MAPKs sont activées, puisque l'expression des MKP est sous le contrôle direct de promoteurs activés par les MAPK (16, 120). En plus de réguler l'expression des MKP, les MAPK les activent directement, par liaison au domaine d'attachement des MAPK (MBD pour *MAPK Binding Domain*) sur MKP, laquelle induirait un changement de conformation favorisant l'activité des MKP (40). Ce processus assure un rétro-contrôle négatif sur les MAPK.

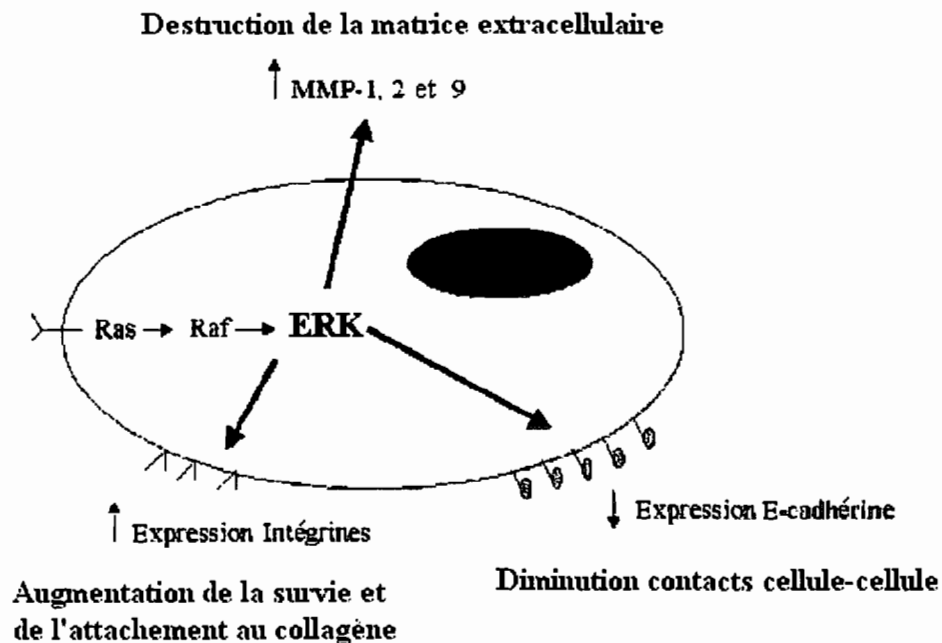


**Figure 1.7 : Régulation de l'expression des MKP, responsables de la désactivation des MAPK ERK1/2.** Adaptée de (40).

### 1.5 La voie MAPK Ras-ERK dans le cancer

L'expression ou l'activation aberrante des protéines impliquées dans la transduction de signaux ont été liées au cancer. Ce dérèglement peut survenir à tous les niveaux de la voie de signalisation. Comme par exemple, la sur-expression du gène de certains récepteurs tyrosine kinase comme *c-erb B-1* est observée dans près du tiers des

carcinomes prostatiques (82), menant au phénomène de « résistance multiple aux médicaments ». Puisque la voie des MAPK Ras-ERK joue un rôle central dans plusieurs mécanismes cellulaires reliés au cancer (figure 1.8), il n'est pas étonnant de constater qu'il y a activation constitutive de ERK1/2 dans un minimum de 50 lignées tumorales humaines, particulièrement dans les lignées issues de tumeurs du pancréas, du colon, du poumon, des ovaires et du rein (56).



**Figure 1.8 : Principaux rôles de la voie MAPK ERK dans le processus de cancérogenèse.** Adaptée de (116).

### 1.5.1 Mutations de *ras*

Des mutations dans les proto-oncogènes de la famille Ras (H-Ras, N-Ras et K-Ras) sont présentes dans 20 à 30% des cancers (17). Lorsque Ras est activée, l'activité GTPasique intrinsèque à Ras ou stimulée par des protéines appelées GAP (pour *GTPase-activating proteins*), provoque son inactivation rapide de même que celle des cascades de signalisation en aval (figure 1.9). Les mutations présentes dans les gènes de

Ras abolissent cette fonction GTPase ou empêchent l'activation de cette fonction, rendant Ras constitutivement active (123).

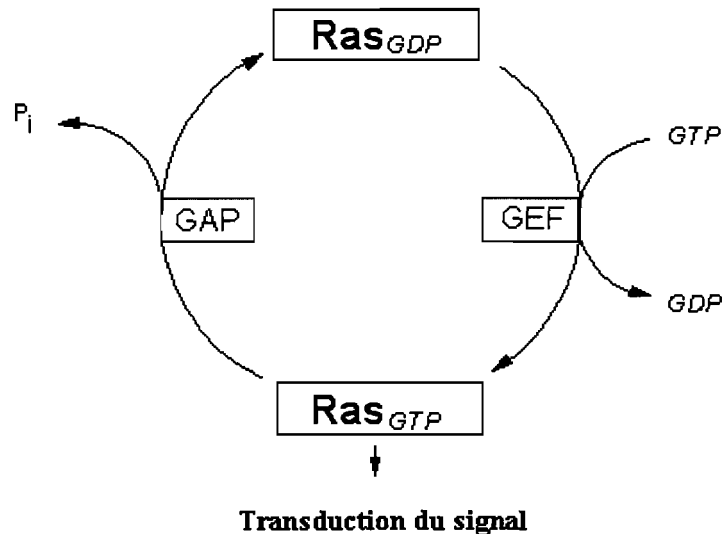


Figure 1.9 : Schéma représentant les formes active et inactive de Ras.

### 1.5.2 Mutations de *raf*

La protéine Raf, aussi, se retrouve altérée dans certains cancers. Le premier gène de *raf* à avoir été identifié est *v-raf*, le gène transformant du virus du sarcome de souris. Par la suite, le gène homologue humain qui a été trouvé a été nommé *raf-1*. Par la suite, les gènes *A-raf* et *B-raf* ont été séquencés (62, 65). C'est particulièrement dans le gène de l'isoforme B-Raf que se trouvent les mutations reliées au cancer, notamment ceux du colon et de la peau (34). Une mutation du nucléotide en position 1796 résultant en la conversion de la valine 599 en acide glutamique (dans la région activatrice) est la mutation la plus fréquente causant l'activation constitutive de B-Raf (93).

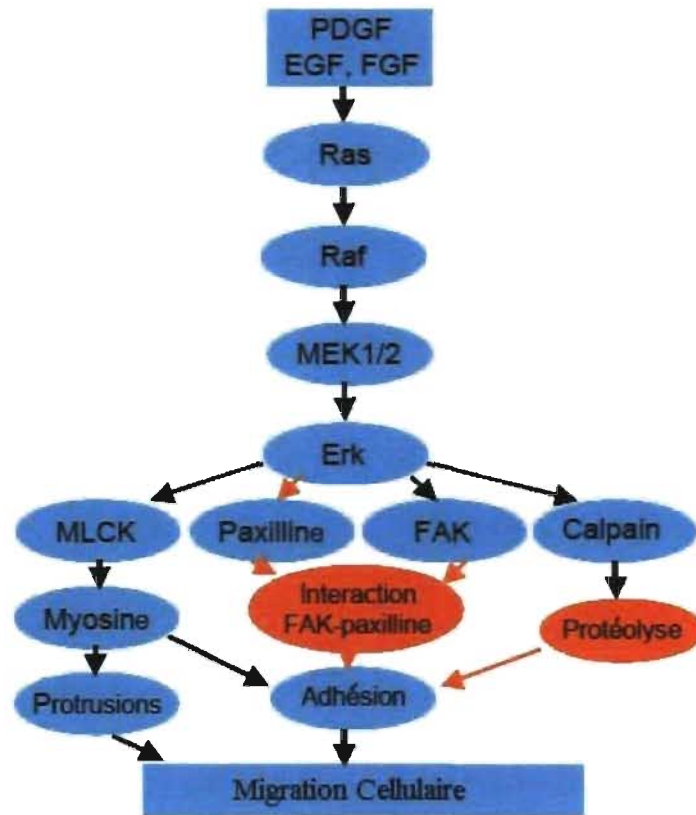
Jusqu'à maintenant, il n'y a aucun cancer où une mutation dans les gènes codant pour MEK1/2 ou ERK1/2 a été rapportée. Par contre, une activation constitutive de MEK1/2 et ERK1/2 est généralement observée dans les lignées où la protéine Ras ou

Raf est constitutivement active (64). De ce fait, les études *in vitro* sur l'implication des MAPK dans le cancer sont souvent réalisées en transfectant une version constitutivement active de MEK1/2 ou de ERK1/2 dans un modèle cellulaire. Par exemple, nous savons que la mutation des sérines 218 et 222 de MEK1 en aspartate augmente de 6000 fois son activité (60).

### 1.5.3 Importance des MAPK dans la progression tumorale et l'invasion

Dans les cellules tumorales métastatiques, l'activité de ERK1/2 est plus élevée lorsque comparée à des cellules tumorales non-métastatiques (33). La voie Ras-ERK est impliquée dans la régulation des enzymes qui dégradent la membrane basale et l'ECM en régulant plusieurs facteurs de transcription comme Elk-1 (28), qui contrôlent l'expression d'enzymes comme MMP-1 et -9. Ces dernières enzymes et plusieurs autres dégradent l'ECM, et jouent donc un rôle important dans la progression du cancer et l'invasion.

Plusieurs récepteurs à activité tyrosine kinase stimulent la migration cellulaire par l'activation de la voie Ras-ERK (57, 84). Ceux-ci, en activant ERK1/2, provoquent la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine kinase (MLCK pour *Myosin light chain kinase*). Celle-ci phosphorylera à son tour la MLC, augmentant ainsi la migration. D'une autre manière, l'activation de la calpaïne ou la kinase d'adhésion focale (FAK pour *Focal adhesion kinase*), qui régulent la dynamique de l'adhésion focale, peuvent avoir le même effet (58). Voir la figure 1.10.



**Figure 1.10 : Implication de la voie des MAPK dans la migration cellulaire.** Adaptée de (58).

Il y a bien sûr plusieurs autres voies de signalisation activant la migration cellulaire, comme celle de la protéine kinase C (PKC) et la protéine Rho (105). Toutefois, la voie Ras-ERK, par sa capacité à activer la MLCK, demeure un des éléments clés de la migration cellulaire médiée par les récepteurs tyrosine kinase comme les récepteurs au EGF, PDGF ou HGF.

## 1.6 PP2A

### 1.6.1 Famille des sérines/thréonines phosphatases

Un des mécanismes de régulation de l'activité enzymatique les plus répandus dans les cellules eucaryotes est la phosphorylation réversible, catalysée par des

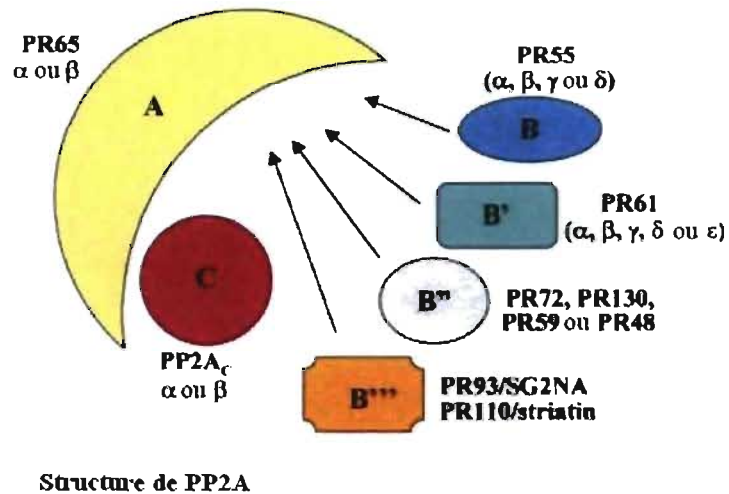
protéines kinases et les protéines phosphatases. En effet, environ le tiers de toutes les protéines d'une cellule eucaryote est soumis à ce mode de régulation. Toutes les protéines kinases proviennent d'un même gène ancestral tandis que les protéines phosphatases ont été réparties en trois familles, basées sur l'identité des séquences d'acides aminés reconnues et la similarité de leur structure tridimensionnelle. Celles-ci incluent une famille spécifique aux résidus phospho-tyrosine (PTP, pour *Protein Tyrosine Phosphatases*) et deux familles spécifiques aux résidus phospho-sérine et phospho-thréonine (PPP, pour *Phosphoserine/Phosphothreonine Phosphatases*). Dans la famille des PTP, il existe aussi des phosphatases à spécificité double, qui sont aptes à déphosphoryler les trois types de résidus (DSPP, pour *Dual Specificity Protein Phosphatases*) (31). La protéine phosphatase de type 2A (PP2A) fait partie du groupe des PPP, avec aussi entre autres PP1, PP2B, PP4, PP5, PP6 et PP7 (12).

#### 1.6.2 Structure de PP2A

PP2A est une phosphatase à sérine/thréonine majeure dans les cellules eucaryotes. Elle peut exister *in vivo* sous la forme d'un dimère appelé PP2A<sub>D</sub> ou d'un trimère, appelé PP2A<sub>T</sub>. PP2A<sub>D</sub> est composée d'une sous-unité catalytique de 36 kDa (PP2A/C) très fortement liée à la sous-unité structurelle (de soutien) constante de 65 kDa (PP2A/A). Ces deux sous-unités associées forment le dimère central (*core dimer*) qui sera capable de s'associer avec une troisième sous-unité (PP2A/B) très variable, qui a un rôle de régulateur, tel qu'illustré à la figure 1.11.

La sous-unité catalytique /C a deux isoformes,  $\alpha$  et  $\beta$ , qui sont encodés par deux gènes qui partagent 97% d'identité (73). La sous-unité structurelle /A possède aussi deux isoformes ( $\alpha$  et  $\beta$ ), qui servent d'échafaud (*scaffold*) à l'holoenzyme PP2A, de par ses motifs HEAT répétés (longues répétitions de leucines) formant une boucle hydrophobique réceptive à l'attachement d'autres sous-unités (51). La sous-unité B très variable se compose de 4 familles de protéines; la famille PR55/B qui se présente sous 4 isoformes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), la famille PR/61/B' encodée par 5 gènes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) et dont certains possèdent jusqu'à 11 variants transcriptionnels, la famille PR72/130/59/48/B''

qui provient de l'épissage alternatif d'un seul et même gène et finalement la famille PR93/SG2NA/110/Striatin/B''', qui elle est issue de 2 gènes relativement différents (8, 31, 131).



**Figure 1.11 :** Représentation schématique des différentes sous-unités de PP2A, ainsi que de leurs isoformes. Adaptée de (68).

### 1.6.3 Rôles connus

#### 1.6.3.1 Modulation du cycle cellulaire

La progression du cycle cellulaire est régulée par des kinases dépendantes de cyclines (CDK, pour *Cyclin-Dependant Kinases*) dont l'activité est contrôlée par phosphorylation réversible. Plusieurs évidences génétiques nous portent à croire que PP2A joue un rôle important dans la progression du cycle cellulaire. Par exemple, chez la drosophile, l'absence de la sous-unité PR55/B de PP2A résulte en une séparation anormale des chromatides sœurs durant l'anaphase (91). D'autres études montrent un rôle de modulateur négatif pour PP2A dans la transition G2-M, laquelle est contrôlée par le complexe cycline B-CDC2. Ce dernier doit être phosphorylé sur la thréonine 161 de CDC2 pour être actif. PP2A déphosphoryle cette thréonine (87). Plusieurs isoformes

de la sous-unité /B ont des cibles différentes qui dirigent une certaine holoenzyme de PP2A vers une cible donnée. Par exemple, la sous-unité PR59 (ou /B'') se joint à PP2A<sub>D</sub> et l'amène vers la protéine p107, associée à pRb dans la partie tardive de la phase G1 (127).

#### 1.6.3.2 Régulation de facteurs de transcription

Nous en savons toujours très peu sur la déphosphorylation des facteurs de transcription, mais c'est au milieu des années '90, par des expériences avec des inhibiteurs et l'utilisation du STAg du SV40, qu'il a pu être démontré que PP2A inactive CREB, un des facteurs de transcription les plus connus (132). PP2A régule aussi l'activité de c-Jun, mais positivement cette fois. En effet, la déphosphorylation de c-Jun induit sa liaison avec c-Fos pour former le complexe actif AP-1 (2).

##### 1.6.3.2.1 Modulation de voies de signalisation

PP2A peut moduler l'activité de plusieurs kinases *in vivo* et *in vitro*, comme la PKA, les kinases dépendantes de la calmoduline, PKB, PKC et bien sûr, ERK (94). Pour ce mémoire, l'accent a été mis sur le rôle que joue PP2A dans la modulation de la voie de signalisation des MAPK. En effet, nous savons que la PKB est inactivée *in vitro* par PP2A et que celle-ci est activée suite à un traitement à l'acide okadaïque (AO), un inhibiteur spécifique de PP2A (7). PP2A régule la voie des MAPK de plusieurs façons. Dans une étude sur la maladie d'Alzheimer dans un modèle murin, un dominant à activité négative de PP2A/C induit une augmentation de l'activité de JNK et ERK, démontrant que PP2A exerce une régulation négative sur ces deux modules des MAPK (77). Les autres effets répertoriés de PP2A sur la voie Ras-ERK ont été décrits dans la section 1.4.3 intitulée Régulation de la voie Ras-ERK. Il est intéressant de noter que la PP4, dont certains croyaient qu'elle jouait le même rôle que PP2A, n'est pas impliquée dans la régulation de la voie des MAPK (113).

#### 1.6.4 Régulation de PP2A



Nous savons très peu de choses sur la régulation de PP2A. Toutefois, PP2A peut subir au moins deux modifications post-traductionnelles qui affectent son activité. Il a été observé que la phosphorylation de la tyrosine 307 de la sous-unité /C inhibe son activité phosphatase (26, 29). Les protéines pp60<sup>v-src</sup> et pp56<sup>lck</sup> et les récepteurs au EGF et à l'insuline peuvent induire cette phosphorylation (117). L'AO semble augmenter la phosphorylation de la tyrosine 307 par inhibition de l'activité phosphatase intrinsèque de PP2A. Ce mécanisme pourrait expliquer l'effet inhibiteur de l'AO sur PP2A (68). D'autre part, la leucine en position 309 peut subir une carboxyméthylation, dépendante selon toute vraisemblance de la progression du cycle cellulaire (53).

## 1.7 PP2A dans le cancer

### 1.7.1 Mutations de la sous-unité /A dans certains cancers

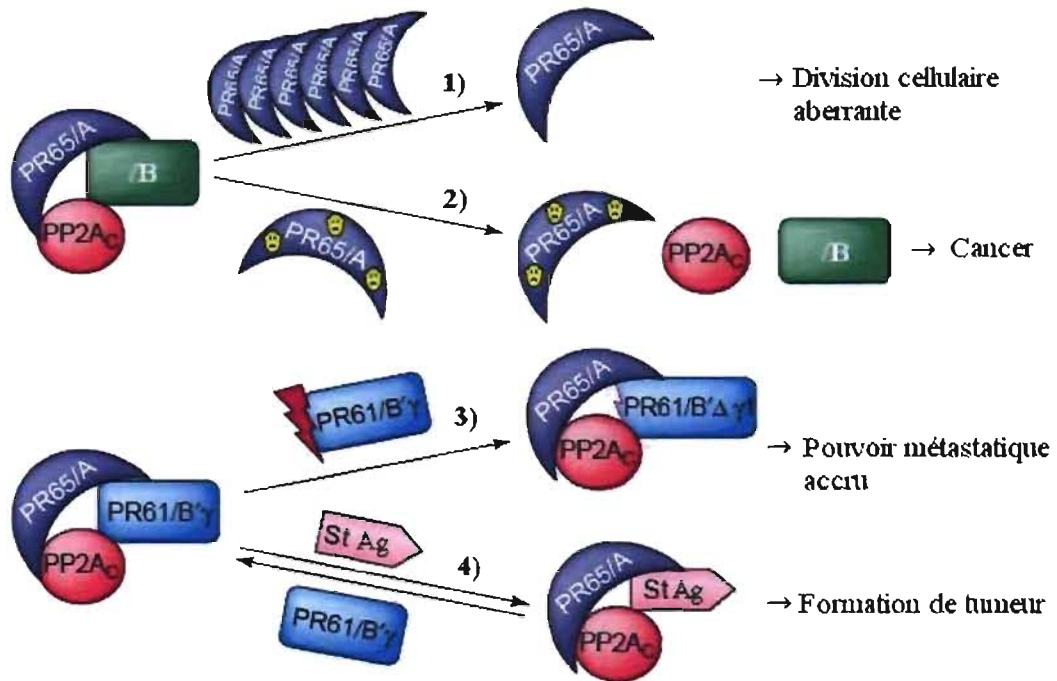
De par son important rôle dans le progression du cycle cellulaire, dans l'activation ou l'inactivation de facteurs de transcription et dans la régulation de voies de signalisation contrôlant la croissance cellulaire (94), PP2A est maintenant considérée comme un suppresseur de tumeur (129). En effet, Wang et al. ont identifié des mutations dans les deux isoformes ( $\alpha$  et  $\beta$ ) de la sous-unité /A de PP2A, et ont observé que les mutations de l'isoforme  $\beta$  se trouvaient dans 15% des lignées primaires de tumeurs de poumon, 6% des lignées cellulaires dérivant de tumeurs du poumon et dans 15% des carcinomes colorectaux. Les gènes codant pour ces deux isoformes sont aussi mutés dans plusieurs autres tumeurs primaires humaines, mais à un taux beaucoup moins élevé (21). En plus de ces effets, des mutations dans cette sous-unité régulatrice causent une division cellulaire aberrante (130). La sous-unité /A ayant pour tâche de servir d'échafaud aux sous-unités /B et /C, il n'est pas étonnant de constater qu'une ou des mutations dans PP2A/A se retrouvent liées au cancer.

### 1.7.2 Mutation de la sous-unité /B

D'autres études ont révélé qu'une surexpression de la sous-unité  $\beta\gamma$  était souvent observée dans les cellules de mélanomes métastatiques, comparées aux mélanomes non-métastatiques (41), comme illustré à la figure 1.12. De plus, l'expression d'une forme tronquée de  $\beta\gamma$  dans les mélanomes corrèle avec un pouvoir métastatique plus élevé (67) (figure 1.12). Effectivement, cette sous-unité  $\beta\gamma$  tronquée interagit spécifiquement avec la paxilline pour orienter PP2A aux points focaux d'adhésion, où elle stimule la déphosphorylation de la paxilline (67, 111), entraînant une motilité accrue de ces cellules cancéreuses.

### 1.7.3 Usurpation de la sous-unité $\beta\gamma$ par le STAg

Tel qu'expliqué brièvement à la section 1.2.2.1, c'est grâce à l'étude de l'interaction du STAg du virus SV40 avec PP2A que le rôle joué par PP2A dans le cancer a été caractérisé (54, 98). Ainsi, l'interaction du STAg de SV40 avec PP2A, conduisant à son inactivation, perturbe les voies de signalisation de MEK-ERK et de PI3K-Akt (140). En 2004, Chen et ses collaborateurs ont démontré que la suppression de l'expression de la sous-unité  $\beta\gamma$  (dans des cellules HEK exprimant hTERT, LTag du SV40 et H-RAS) inhibe complètement l'activité de PP2A. La surexpression de cette même sous-unité dans des cellules HEK exprimant le STAg renverse la tumorigénicité de ces cellules (27). Le STAg prend littéralement la place de la sous-unité  $\beta$  et  $\beta\gamma$  de PP2A, l'empêchant alors de déphosphoryler ses substrats. La figure 1.12 résume de manière concise l'implication de PP2A dans le cancer.



**Figure 1.12 :** Les différentes perturbations de l'intégrité des sous-unités de PP2A peuvent avoir des conséquences importantes dans la tumorigénèse. 1) Une augmentation de l'expression de la sous-unité /A de PP2A mène à une perturbation de la division cellulaire, tandis que 2) des mutations dans cette sous-unité ont été rapportées dans certains types de cancers. Une modification dans l'attachement aux sous-unités A/ et /C de la sous-unité /B, comme une troncation 3) ou l'usurpation par le STAg 4) mènent respectivement à un pouvoir métastatique accru et à la formation de tumeurs. Adaptée de (69).

## 1.8 Modèle cellulaire

### 1.8.1 Pertinence du modèle canin

La pertinence du modèle cellulaire utilisé dans l'étude des mécanismes impliqués dans la progression du cancer est d'une importance capitale. Les lignées cellulaires canines, venant de *Canis familiaris*, sont particulièrement propices à ce champ d'étude puisque le cancer fait partie des 10 maladies ayant le plus d'incidence chez cet animal (121) et ce, chez plus de 30 espèces canines. Avec le génome canin récemment disponible, le chien est plus que jamais le meilleur ami de l'homme.

## 1.8.2 Caractéristiques des MDCK, MSV et INV

Dans le laboratoire du Dr Josette Noël, trois lignées cellulaires sont principalement utilisées; les cellules MDCK (pour *Madin-Darby Canine Kidney*) (49), les cellules MSV-MDCK (*MSV-transformed MDCK*) (114) et les cellules MSV-MDCK-INV (pour *Invasive variant of MSV-MDCK*) (85). La figure 1.13 présente un aperçu de leur morphologie, grâce à un marquage de l'actine à la phalloïdine-TR (pour *Texas Red*) ainsi qu'une synthèse des caractéristiques moléculaires et phénotypiques de ces trois lignées cellulaires.

### 1.8.2.1 MDCK

Les cellules MDCK sont des cellules épithéliales polarisées dérivées du rein d'un épagneul (49). Lorsqu'elles sont cultivées en laboratoire dans des conditions propices, elles forment une monocouche polarisée (115). En plus d'être largement utilisées pour des études de transport transépithélial d'ions (89), les cellules MDCK servent de modèle *in vitro* pour l'étude des mécanismes complexes impliqués dans le mouvement des cellules épithéliales tels l'étalement (cellules cultivées à faible densité sur du plastique), la tubulogenèse (cellules cultivées sur un gel de collagène) et la différenciation (cellules cultivées sur un filtre perméable) (11) (9). Les cellules MDCK ont ainsi été les premières à être utilisées pour démontrer l'effet du HGF dans l'étalement des cellules (10). En effet, ces cellules répondent très bien au HGF, particulièrement la souche I, de forte résistance transépithéliale (observations du laboratoire Noël).

### 1.8.2.2 MSV-MDCK

La lignée MDCK a été transformée par le virus du sarcome de Moloney (MSV), virus dont il a été question à la section 1.2.2.2., et cette lignée porte aussi le nom de DoC11 (nom officiel dans la banque de cellules ATCC ou *American Type Cell Culture*).

Les cellules MSV-MDCK ont une morphologie fibroblastoïde, elles ne forment pas de contacts intercellulaires serrés et elles ont perdu leur forme cuboïdale et leur capacité à se polariser. En comparaison aux cellules MDCK, qui possèdent des fibres d'actine corticales et des fibres de stress, les cellules MSV-MDCK ont un cytosquelette d'actine désorganisé, possèdent moins de fibres de stress en plus d'avoir une distribution différente de certaines protéines telles que la cadhérine-E, la desmoplakine (desmosomes) et ZO-1 (pour protéine *Zona occludens 1*, une protéine des jonctions serrées) (114).

Dans les cellules MDCK, ces protéines (cadhérine-E, desmoplakine et ZO-1) sont localisées aux membranes latérales, alors que dans les cellules MSV, il y a une perte ou une expression désorganisée de ces protéines, d'où le phénotype fibroblastoïde. Une perturbation et/ou une diminution de l'expression de ces protéines dans les cellules MSV suggère qu'elles jouent un rôle crucial dans le maintien du phénotype épithélial des cellules MDCK et inversement, dans l'acquisition du phénotype invasif des cellules MSV. Ces cellules MSV sont d'ailleurs plus motiles et invasives que les cellules MDCK et le mouvement des cellules MSV est plus directionnel (125). Il est également important de mentionner que la lignée cellulaire MSV est hétérogène et que certains clones ont une motilité accrue (114), d'où la pertinence d'avoir sélectionné des sous-populations de cellules de cette population totale de cellules transformées.

### 1.8.2.3 MSV-MDCK-INV

Les cellules INV ont été isolées de la lignée de cellules MSV par le laboratoire du Dr I.R. Nabi (125). Elles sont particulièrement intéressantes du fait qu'elles possèdent des caractéristiques de cellules épithéliales transformées et de cellules invasives. Les chambres d'invasion, composées d'une chambre supérieure et d'une chambre inférieure séparées par un filtre poreux, ont été utilisées pour sélectionner ces cellules. Ainsi, les cellules MSV ont étéensemencées dans la chambre supérieure en contact avec le filtre recouvert de Matrigel® (78) qui mime la matrice extracellulaire et après 24h d'incubation, les cellules ayant réussi à traverser les pores de 8 µm ont été

récoltées dans la chambre inférieure (85). Cette procédure, mimant l'invasion cellulaire, a été répétée trois fois et la lignée cellulaire homogène INV a été obtenue, ce nom ayant été inspiré du phénomène d'invasion indispensable à leur sélection. Les cellules INV possèdent un phénotype stable pendant plusieurs passages lorsque maintenues dans des conditions de culture évitant le surpeuplement (inférieur à 70% confluence) et distinct des lignées parentales MDCK et MSV.

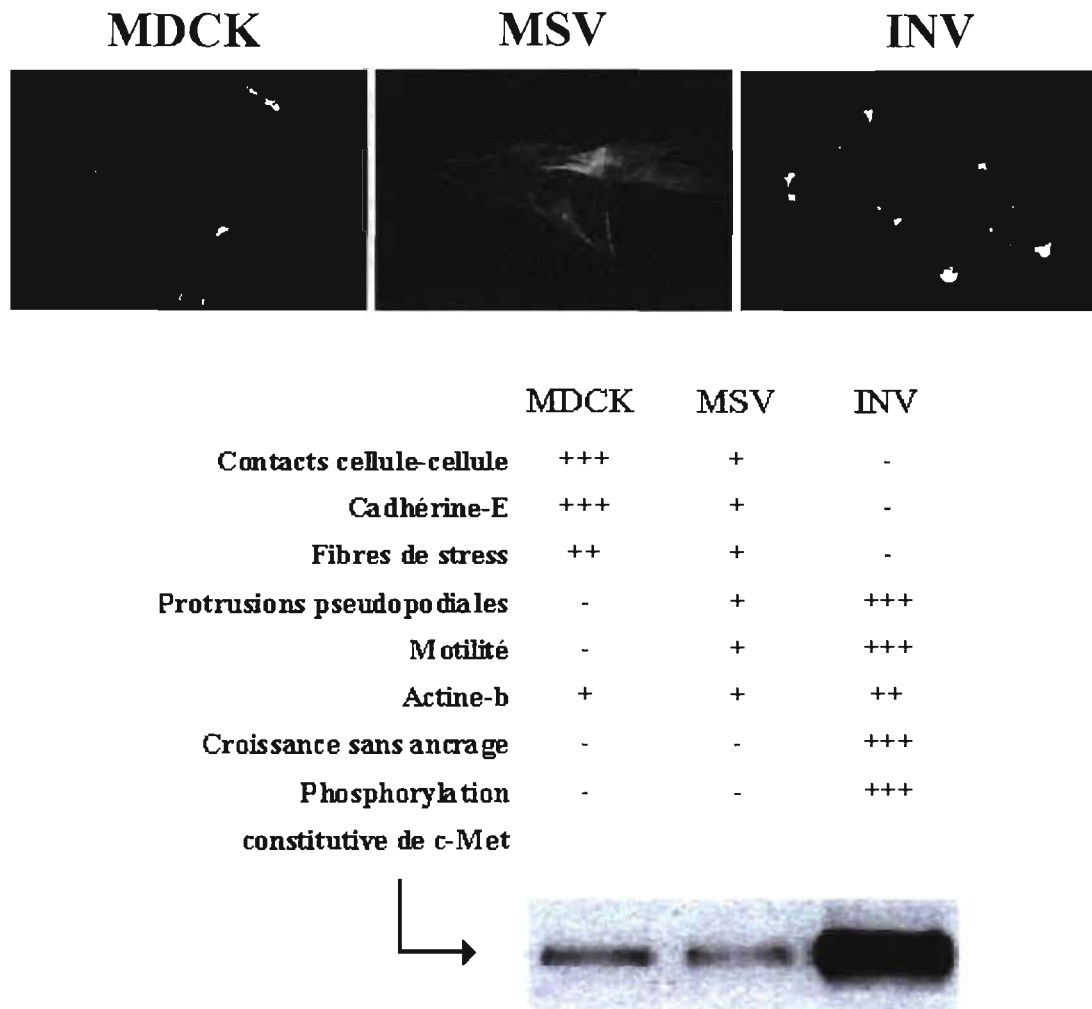


Figure 1.13 : Caractéristiques moléculaires et phénotypiques des cellules MDCK, MSV et INV. Dans la partie supérieure, l'actine est marquée à la phalloïdine-TR. Adaptée de (125).

### 1.8.2.3.1 Propriétés

Les cellules INV sont principalement caractérisées par de multiples pseudopodes, riches en actine  $\beta$ . Elles n'ont pas de fibres de stress et font moins de contacts intercellulaires. De plus, les actines  $\alpha$ ,  $\gamma$ , G et F sont distribuées à travers tout le cytoplasme et aussi en périphérie dans les cellules MDCK et MSV, tandis que dans la lignée INV, ces protéines sont plus concentrées dans les pseudopodes, mais en étant tout de même présentes à travers le cytoplasme (85).

Il a également été démontré que les multiples protrusions pseudopodiales riches en actine- $\beta$  sont également concentrées en protéines phosphorylées (72, 125). De nombreuses protéines sont hautement phosphorylées sur les résidus tyrosine dans les cellules INV en comparaison aux cellules MDCK et MSV. Initialement, la découverte d'une protéine hautement phosphorylée ayant le poids moléculaire d'un récepteur membranaire a poussé l'équipe du Dr Noël à déterminer si cette protéine était liée au phénotype particulier de ces cellules, ainsi qu'à l'identifier. L'immunoprécipitation des protéines phosphorylées sur les résidus tyrosine suivie d'un séquençage des acides aminés à l'extrémité N-terminale a permis d'associer cette protéine de poids moléculaire approximatif à 160 kDa au récepteur du facteur de croissance hépatique (HGF-R), aussi communément appelé protooncogène c-Met. La caractérisation moléculaire de cette protéine a permis de déterminer que son expression est constante dans les trois lignées cellulaires, ce qui suggère que le récepteur HGF est constitutivement phosphorylé et activé dans les cellules INV(125). Il a également été démontré que cette activation constitutive du récepteur est due à une boucle autocrine et que la sécrétion de HGF par ces cellules, suivie de l'activation de leurs récepteurs c-Met, est directement responsable de la formation des pseudopodes et de ce fait, du potentiel motile des cellules INV (125). Une étude récente a aussi démontré que les protéines Rho, ROCK (Rho Kinase) et la MAPK p38 sont présentes dans les protrusions pseudopodiales de ces cellules (72), et est en partie responsable de la régulation de la formation des pseudopodes et de bourgeonnements membranaires (*membrane blebbing*).

## 1.9 Hypothèse et objectifs de l'étude

Lors de l'étude de plusieurs voies de signalisation des cellules utilisées par le Dr. Josette Noël, une activation constitutive de la voie des MAPK Ras-ERK a été observée, par le degré de phosphorylation très élevé de ERK1/2 dans les cellules MSV et INV non-stimulées. Le présent projet avait pour but l'identification de la cause de cette activation constitutive de ERK1/2 observée chez les cellules MSV et les cellules INV.

Cette étude veut déterminer premièrement à quel niveau de la voie de signalisation Ras-ERK l'activation constitutive se trouve. Suite à l'identification de la portion de la voie de signalisation responsable, la possibilité de mutations activatrices dans le (ou les) gène(s) codant(s) pour le responsable est évaluée par leur séquençage dans les trois lignées cellulaires, en se servant des séquences obtenues dans la lignée cellulaire contrôle MDCK.

Si aucune mutation n'est trouvée, l'hypothèse d'un défaut de régulation sera mise à l'examen. Les interactions entre le module de la voie des MAPK fautif et la protéine responsable de sa régulation seront alors examinées. Ceci sera réalisé en vérifiant si un défaut dans l'activité de cette protéine régulatrice peut expliquer l'activation constitutive de la voie Ras-ERK.



## **2. Matériel et méthodes**

## 2.1 Réactifs de culture cellulaire

Le DMEM (pour *Dulbecco's Minimum Essential Medium*), le FBS (pour *Fœtal Bovine Serum*) la glutamine, les acides aminés non-essentiels, les vitamines, la pénicilline, la streptomycine et la trypsine ont été achetés chez Gibco Life Technologies (Burlington, ON).

### 2.1.1 Autres réactifs

Le réactif ECL (enhanced chemiluminescence) a été obtenu de Mandel (St-Laurent, QC). Le réactif BCA (bicinchoninic acid) de Pierce Biotechnology Inc (Rockford, IL). L'acide okadaïque, la fostriecine, le U0126 et le PD98059 proviennent de Cedarlane Laboratories Limited (Hornby, ON). Le sodium orthovanadate, le NaF, le TPA, le PMSF et les inhibiteurs de protéases viennent de Sigma Chemical (St-Louis, MI). L'HGF recombinant d'origine humaine provient de R&D Systems (Minneapolis, MN). La membrane de nitrocellulose Hybond-C Extra (pores de de 45 microns) provient de Amersham Life Science (Arlington Heights, IL). La SuperScriptIII, la RNaseH, la RNaseOUT, le TRIzol et les dNTPs sont de la compagnie Invitrogen (Burlington, ON). La polymérase Phusion est de la compagnie New England Biolabs (Mississauga, ON). Le pNPP provient de la compagnie Sigma-Aldrich (Oakville, ON).

## 2.2 Anticorps

### 2.2.1 Anticorps primaires

Les anticorps polyclonaux  $\alpha$ -HGF, l' $\alpha$ -MEK1, l' $\alpha$ -MEK2 et l' $\alpha$ -phosphotyrosine (95-J) sont de la compagnie Santa Cruz (Santa Cruz, CA). L' $\alpha$ -phospho-c-Met (Y1230,1234,1235), l' $\alpha$ -CT-c-Met et l' $\alpha$ -c-Raf-1 sont de Biosource International (distribué par Medicorp Inc, Montréal, Qc). L' $\alpha$ -phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), l' $\alpha$ -ERK1/2, l' $\alpha$ -MEK2, l' $\alpha$ -phospho-MEK1/2, l' $\alpha$ -phospho-Raf-1-S338 et l' $\alpha$ -phospho-Raf-1-S259 sont de la compagnie Cell Signalling (distribué par New England Biolabs LTD., Mississauga, ON). Les anticorps respectivement de lapin et de mouton dirigés contre les séquences des sous-unités /A et /C de PP2A ont été achetés chez Exalpha (Maynard, MA).

### 2.2.2 Anticorps secondaires

Les anticorps secondaires dirigés contre les immunoglobulines de souris et de lapin couplés à la peroxidase du raifort (HRP pour *horseradish peroxidase*) ont été obtenus de Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, PA). Les anticorps secondaires dirigés contre les immunoglobulines de chèvre et de mouton proviennent de chez Abnova (Taipei City, Taiwan).

### 2.3 Culture cellulaire

Les cellules MDCK, MSV et INV sont mises en culture dans du milieu DMEM contenant du NaHCO<sub>3</sub> 25 mM (DMEM-NaHCO<sub>3</sub>) supplémenté de FBS à une concentration de 10% (DMEM-FBS), d'acides aminés non-essentiels 10 mM, de glutamine 1 mM, de vitamines 10 mM, de pénicilline et de streptomycine sous une atmosphère de 5% CO<sub>2</sub>, à 37°C. Les cellules INV ne doivent pas atteindre une confluence de plus de 70% pour conserver leur phénotype. Lors de la division 3 fois par semaine, les cellules MSV et INV sont rincées au PBS (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,7 mM) contenant du CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM et du MgCl<sub>2</sub> 1.0 mM (PBS-CM) pour éviter le décollement trop rapide des cellules et incubées ensuite 40 secondes avec la trypsine 0,05%. Les cellules MDCK sont rincées au PBS et incubées pendant 20 minutes avec de la trypsine 0,25%.

Pour la préparation de lysats cellulaires totaux, les cellules sontensemencées à une densité de 1 x 10<sup>6</sup>, 6 x 10<sup>5</sup> et 5 x 10<sup>5</sup> cellules par plat de 100 mm pour les cellules MDCK, MSV et INV respectivement, et gardées en culture pendant 48 heures dans du milieu DMEM-FBS. Les conditions d'ensemencement spécifiques à certaines techniques sont mentionnées dans la section appropriée.

### 2.4 Préparation des lysats cellulaires totaux

Après une culture d'une durée variable (tel que spécifié par la suite), la monocouche de cellules MDCK, MSV et INV,ensemencées initialement à 1 000 000, 800 000 et 800 000 de cellules, est lavée deux fois sur glace avec du PBS-CM froid et 500 µl/plat (MDCK) ou 300 µl/2 plats (MSV et INV) de tampon de lyse (PBS

comprenant du Triton 1%, Igepal 0,5%, les inhibiteurs de phosphatases EDTA 5 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  0,2 mM, glycérophosphate 40 mM et les inhibiteurs de protéases PMSF 0,1 mM, phénanthroline 0,1 mM, pepstatine 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , leupeptine 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , aprotinine 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) sont ajoutés. Les cellules sont ensuite grattées, récupérées et grossièrement dissociées par quelques aller-retours dans une pipette. Une incubation de 30 min à 4°C sous agitation rotative assure une lyse membranaire complète puis l'ADN est brisé par deux rondes de sonication de 10 secondes, au moyen d'un sonicateur Branson 450 (Danbury, CT), en maintenant le tube dans la glace pour éviter un réchauffement de l'échantillon. Les débris membranaires non solubilisés sont éliminés au moyen d'une centrifugation de 20 minutes à 13200 RPM à 4°C et les protéines solubles se retrouvent dans le surnageant

#### 2.4.1 Dosage des protéines

La détermination de la concentration en protéines dans les lysats cellulaires est effectuée par colorimétrie avec le réactif à base d'acide bicinchoninique (BCA ; bicinchoninic acid) de chez Pierce (Rockford, IL), selon le protocole de la compagnie. . Le  $\text{Cu}^{2+}$  est réduit en  $\text{Cu}^{1+}$  par les protéines en milieu alcalin. Le réactif BCA possède une haute sensibilité et affinité pour le  $\text{Cu}^{1+}$ . Ainsi, la détection colorimétrique est le produit de la chélation de deux molécules de BCA et d'un ion  $\text{Cu}^{1+}$ . Ce complexe soluble dans l'eau absorbe à une longueur d'onde de 562 nm de façon linéaire en fonction de la concentration en protéines. La concentration des protéines est toujours déterminée en référence à une courbe-étalon préparée en parallèle en utilisant différentes quantités d'albumine de sérum bovin (BSA) (0, 2, 4, 6, 16 et 32  $\mu\text{g}$ ), qui permettra de déterminer la concentration inconnue des échantillons à doser. Deux volumes différents (3 et 5  $\mu\text{L}$ ) des échantillons à doser sont utilisés. Par la suite, 1 ml de réactif BCA est ajouté dans chaque tube et ceux-ci sont incubés 30 minutes à 37°C puis 15 minutes à la température de la pièce pour ralentir au minimum le développement de la réaction. L'absorbance est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre de type DU-70, à une longueur d'onde de 562 nm.

#### 2.5 Immunobuvardage de type Western (IB)

### 2.5.1 Séparation des protéines sur un gel de polyacrylamide

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl phosphate (SDS) permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire. Une concentration de 10% d'acrylamide a été utilisée pour favoriser la séparation des protéines de faible poids moléculaire. Le gel de séparation (Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1 %, acrylamide 10%, TEMED 0,1%, ammonium persulfate 0,1%) est coulé et après sa polymérisation, le gel de concentration (Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1 %, acrylamide 4%, TEMED 0,1%, ammonium persulfate 0,05%) est ajouté. Les échantillons de protéines (50 µg) doivent être mélangés dans un ratio 2:1 à du tampon Laemmli 3X (β-mercaptoéthanol 15%, SDS 7,5%, glycérol 30%, Tris-HCl 300 mM pH 6,8 et bleu de bromophénol) pour dénaturer les protéines. Le tampon d'électrophorèse (Tris-base 25,2 mM, glycine 218,5 mM, SDS 0,1%) permet la migration des protéines vers la cathode en fonction de leur poids moléculaire uniquement, les autres facteurs pouvant influencer la migration (charge, structures secondaires, tertiaires, quaternaires) ayant été annulés par le traitement préalable. Les temps de migration et les voltages varient selon la grosseur et le nombre de gels était de 100 Volts pendant 2h pour les petits gels, et de 40 à 60 mA pour 2 gros gels durant 4h.

### 2.5.2 Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose

Suite à la migration des protéines sur gel d'acrylamide, la membrane de nitrocellulose Hybond-C Extra® ayant des pores de 45 µm est conditionnée dans du tampon de transfert (glycine 120 mM, Tris-base 15,7 mM, pH 8,3). Un courant électrique (100 Volts) généré entre deux bornes permet de transférer, pendant 1h pour les petits gels ou à 400 mA pendant 4h pour les gros gels, les protéines chargées négativement du gel vers la membrane de nitrocellulose.

### 2.5.3 Révélation des protéines au colorant Rouge Ponceau

Le Rouge Ponceau est un colorant qui interagit avec les protéines de façon réversible permettant de distinguer toutes les bandes de protéines sur la membrane de nitrocellulose, afin d'évaluer la qualité du transfert et l'homogénéité du chargement en

protéines dans les différents puits. La membrane est recouverte avec la solution de Rouge Ponceau (Rouge Ponceau 0,5%, acide acétique glacial 1%) pendant environ 1 ou 2 minutes puis rincée avec de l'eau présentant une résistance électrique aux ions de 18.2 mega ohms afin de retirer le colorant n'ayant pas interagit avec les protéines.

#### 2.5.4 Immunobuvardage de type Western avec les anticorps phospho-spécifiques

La membrane de nitrocellulose est d'abord incubée 1 heure à 37°C dans du tampon de blocage (TBS (Tris 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) , BSA 4%, Tween-20 0,05%). Par la suite, la membrane est incubée toute la nuit (O/N pour *overnight*) à 4°C ou pendant 1h à la température de la pièce (TP) avec l'anticorps primaire (p-c-Met<sup>1230,1234,1235</sup>, dilution de 1/20000; p-ERK1/2, dilution de 1/1000; p-MEK1/2, dilution de 1/1000, p-Raf<sup>S338</sup> dilution de 1/1000, p-Raf<sup>S259</sup>, dilution de 1/1000) dilué dans le tampon de blocage (TBS, BSA 2%, Tween-20 0,05%). À la température de la pièce, la membrane est rincée 6 fois pendant 5 minutes avec du tampon TBS contenant du Tween-20 0,1%. L'anticorps secondaire est incubé pendant 1 heure (anti-IgG-HRP de lapin 1/5000) dilué dans le tampon de blocage. À la fin de l'incubation, la membrane est lavée de la même manière qu'après l'anticorps primaire.

#### 2.5.5 Immunobuvardage de type Western des protéines non-phosphorylées

La membrane de nitrocellulose est d'abord incubée pendant 1 heure à TP dans du tampon de blocage (TBS, lait 5%, Tween-20 0,05%). Par la suite, elle est incubée O/N à 4°C ou pendant 1h à TP avec l'anticorps primaire (CT-c-Met, MEK1/2, MEK1, MEK2, p42/p44<sup>MAPK</sup>, PP2A subunit A, PP2A subunit C, 1/1000; Raf-1, 1/2000) dilué dans le tampon de blocage. À la température de la pièce, la membrane est rincée 6 fois pendant 5 minutes avec du tampon TBS contenant du Tween-20 0,1%. L'anticorps secondaire est incubé pendant 1 heure (anti-IgG-HRP de lapin 1/5000, anti-IgG-HRP de souris 1/3000, anti-IgG-HRP de chèvre 1/20000) dilué dans le tampon de blocage. À la fin de l'incubation, la membrane est lavée de la même manière qu'après l'anticorps primaire.

#### 2.5.6 Immunobuvardage de type Western des protéines phosphorylées sur tyrosine

La révélation des résidus tyrosine phosphorylé est délicate, c'est pourquoi un protocole légèrement différent de celui utilisé pour révéler les sites phosphorylés spécifiques a été utilisé. La membrane est incubée pendant 1 heure à 37°C ou toute la nuit à 4°C dans du tampon de blocage (TBS, BSA 2%, Tween 20 0,1%), filtré et par la suite, elle est incubée 1 heure à la température de la pièce ou toute la nuit à 4°C avec l'anticorps  $\alpha$ -phosphotyrosine (1/2000) dilué dans le tampon de blocage. À la température de la pièce, la membrane est rincée 4 fois pendant 10 minutes avec du tampon B (Tris 25 mM pH 8,0, NaCl 150 mM), incubée ensuite pendant 30 minutes avec du tampon de blocage, puis incubée 1 heure avec l'anticorps anti-IgG de souris-HRP (1/3000) dilué dans du tampon de blocage, lavée 4 fois pendant 10 minutes avec du tampon B et pour terminer, 2 lavages de 10 minutes sont effectués avec du tampon D (Tris 100 mM pH 8,0).

## **2.6 Décapage des anticorps**

L'enlèvement complet des anticorps primaires et secondaires de la membrane, en vue d'une deuxième incubation avec des anticorps différents, est réalisé en mettant la membrane de nitrocellulose en présence de la solution de décapage ( $\beta$ -mercaptoéthanol 100 mM, Tween-20 0,05% et Glycine-HCl 0,2 M pH 2,5) sous agitation pendant deux fois 30 min à 60°C. Par la suite, la membrane est lavée deux fois avec le tampon de lavage TBS + Tween 0.1%. Elle peut être utilisée immédiatement ou conservée à 4C pour une utilisation ultérieure.

## **2.7 Immunoprécipitation**

Le principe de l'immunoprécipitation repose sur la création d'un réseau protéique en utilisant un anticorps spécifique comme agent de liaison. Cet anticorps se lie aux protéines à précipiter. Par la suite, l'ajout de billes de sépharose couplées à la protéine A (qui a de l'affinité pour tous les anticorps) permettra l'attachement de ce réseau à ces billes. Le réseau ainsi lié sera facilement récupérable par centrifugation. Environ 1 mg de protéines totales de lysats de cellules MDCK, MSV ou INV a été utilisé pour les études d'immunoprécipitation (IP) classique des protéines MEK, et 250  $\mu$ g pour les essais d'IP de PP2A suivie de la mesure de son activité phosphatase.

Premièrement, les lysats sont pré-nettoyés par une pré-incubation avec 30  $\mu$ l de billes de sépharose couplées à la protéine A (mélangées avec le tampon de lyse dans un rapport 1:1) pendant 1h à 4°C, sous agitation rotative. Après centrifugation, les lysats sont incubés avec les anticorps (1  $\mu$ g par 1 mg de protéines) toute la nuit à 4°C, sous agitation. Les immunoprécipitats sont recueillis par une incubation d'une heure à 4 °C en présence de 40 $\mu$ L de billes de sépharose-protéine A. Après 6 lavages avec le tampon de lyse, les protéines du complexe Antigène-Anticorps-Protéine A-billes sont séparées en ajoutant du tampon Laemmli 3X et sont migrés sur un gel SDS-PAGE de 10% puis transférées sur une membrane de nitrocellulose tel que décrit précédemment.

## **2.8 Technique de réparation de plaies**

Cette technique est basée sur la capacité des cellules motiles à envahir une plaie pour permettre sa fermeture, i.e sa réparation. Les cellules MDCK, MSV et INV sontensemencées dans des Pétris de culture cellulaire de 35 mm (66 000, 50 000 et 50 000 cellules/plats respectivement) dans du milieu DMEM-FBS pendant 24 heures. Puisque les études de vidéomicroscopie permettant d'enregistrer en temps réel le mouvement des cellules sont effectuées en absence quasi complète de CO<sub>2</sub>, un milieu DMEM contenant seulement 8 mM NaHCO<sub>3</sub> et 25 mM HEPES est essentiel pour tamponner le pH du milieu de culture. Du FBS (milieu DMEM-HEPES-FBS) à une concentration de 10% est ajoutée. Les cellules sont incubées dans ce milieu pendant 2 heures, afin de permettre aux cellules de s'équilibrer dans ce milieu..Trois rayures sont effectuées (pour s'assurer d'obtenir au moins une portion droite) sur la monocouche de cellules à l'aide d'un embout de pipette de 10  $\mu$ l. Par la suite, les cellules sont mises en présence du milieu DMEM-HEPES sans FBS, avec ou sans acide okadaïque (AO). La capacité des cellules à envahir la plaie en fonction du temps a été suivie au moyen d'un microscope Olympus IX81 à platine motorisée. L'aire de la plaie a pu être calculée par la suite avec le logiciel Image Pro Plus 5.0.

## **2.9 PCR**

### **2.9.1 Isolation de l'ARN total**



Le réactif TRIzol™ a été utilisé pour lyser les cellules et conserver intactes les acides nucléiques, et l'extraction de l'ARN total se fait selon la description du protocole proposé par la compagnie. Le réactif TRIzol™ est une solution monophasique de phénol et de guanidine isothiocyanate. Pendant l'homogénéisation ou la lyse de l'échantillon, le TRIzol™ maintient l'intégrité de l'ARN, tout en lysant les cellules et leurs composants. Après la lyse dans le TRIzol, l'addition de chloroforme, suivie d'une centrifugation (15 minutes à 10 000g), sépare la solution en une phase aqueuse et une phase organique. L'ARN se retrouve dans la phase aqueuse. Après le transfert de la phase aqueuse, l'ARN est récupéré par sa précipitation au moyen de l'alcool isopropylique. L'ARN est conservé pour la transcription inverse (RT pour *reverse transcription*), à -30°C.

### 2.9.2 RT-PCR

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

Pour cette étude, nous avons utilisé l'ARN total, isolé de nos différentes lignées cellulaires, pour effectuer la réaction de RT. La quantité des oligonucléotides aléatoires (hexamères) utilisée était de 250ng. La réaction de RT, qui produit le premier brin d'ADNc (*first strand cDNA synthesis*), est mis en présence des oligonucléotides, des dNTPs (10mM final) et de 2,5µg d'ARN total, dans un volume final de 26µl. Le mélange est chauffé à 65°C pendant 5 minutes, puis refroidit dans la glace pendant 2 minutes. Par la suite, le tampon (*First strand buffer*, 1X final) fourni avec l'enzyme, le DTT (0,1M final, un agent réducteur), la RNaseOUT (80 unités, protéine utilisée pour inhiber les ribonucléases présentes en solution) sont ajoutés au mélange et celui-ci est

incubé à 42°C pour 2 minutes. L'enzyme Superscript III<sup>®</sup> est ajoutée et la synthèse de l'ADNc a lieu à 42°C pendant 50 minutes, puis le mélange est chauffé à 70°C pour 15 minutes afin d'inactiver les enzymes. Finalement, 8 unités de RNaseH (une endonucléase qui peut hydrolyser spécifiquement les liens phosphodiester de l'ARN hybridé à l'ADN) sont ajoutées au mélange pendant 20 minutes à 37°C. La réaction de RT, qui a lieu dans un volume final de 50µl, est conservée à -30°C jusqu'à son utilisation.

### 2.9.3 Construction des amorces

Pour la réaction de PCR, 2µl de la réaction de RT ont été utilisés comme source d'ADN, en présence de dNTPs (10mM final), MgCl<sub>2</sub> (10mM final), des oligonucléotides (10µM final), du tampon (Phusion HF Buffer, 1X final) et de la polymérase Phusion HF (0,8 unité, HF pour *High Fidelity*). La réaction a lieu dans un volume final de 50µl. Les oligonucléotides (de la compagnie AlphaDNA, Montréal, Qc) ont été conçus, pour MEK1 : à partir de la séquence *Canis familiaris* prédite parue le 10 mai 2005 (GeneBank, numéro d'accèsion NW\_876294), des séquences *Homo sapiens* (L11284.1), *Mus musculus* (NM\_008927.1) et *Rattus norvegicus* (NM\_031643.3) et pour MEK2 : à partir des séquences *Homo sapiens* (L11285.1), *Mus musculus* (NM\_023138.3) et *Rattus norvegicus* (NM\_133283.1). Les amorces ont été conçues à partir de séquences qui diffèrent entre les deux isoformes, mais conservées entre espèces. Cette précaution était nécessaire, afin qu'elles soient spécifiques à MEK1 ou à MEK2 (pour s'assurer de n'amplifier qu'une isoforme à la fois), et de s'assurer en même temps que les amorces synthétisées s'accrochent à l'ADNc d'origine canine. Au moment de la conception de ces oligonucléotides, la séquence prédite de MEK2 d'origine canine n'était pas connue.

Les paires d'amorces utilisées pour la synthèse complète de MEK1 et de MEK2 sont les suivantes: MEK1S 5'-GTTACCCGGGTCCAAAATG-3' et MEK1AS 5'-CAAACACTTAGACGCCAGC-3' pour MEK1 ainsi que MEK2S : 5'-GATGCTGGCCCGGAGGAAG-3' et MEK2AS : 5'-CACTGTCACACGGCGGTGC-3' pour MEK2. La température d'hybridation était de 52°C pour la combinaison des

amorces MEK1S et MEK1AS et de 58°C pour la combinaison des amorces MEK2S et MEK2AS. Dans chaque cas, la durée des étapes de dénaturation et d'hybridation fut de 30 secondes. De même, l'élongation fut réalisée à 72°C pour une durée de 60 secondes pour les 2 combinaisons, et ce, pour 35 cycles d'élongation/dénaturation.

#### 2.9.4 PCR de séquençage

La production de brins d'ADN d'environ 600 paires de bases, destinés au séquençage des ARNm de MEK1 et MEK2 dans nos trois lignées, s'est fait essentiellement de la même manière que l'amplification des ARNm de MEK1 et MEK2. Pour chaque lignée (MDCK, MSV et INV) et pour les deux isoformes (MEK1 et MEK2), 3 amorces en sens 5'-3' et 3 amorces en sens 3'-5' ont été utilisées. Pour s'assurer de la bonne qualité des séquences obtenues du service de séquençage, l'amplification de brins de longueur raisonnable (600 paires de bases) était nécessaire. C'est la raison pour laquelle trois amorces ont été conçues pour chaque ADNc. De plus, pour éviter toute possibilité d'erreurs lors du séquençage, trois autres amorces ont été créées pour effectuer le séquençage dans le sens inverse de la séquence. Donc, les séquences obtenues et publiées sont le résultat de l'assemblage de toutes ces séquences « intermédiaires ». Pour le séquençage de MEK1, les amorces SMEK1S1 : 5'-CCAGAAGCAGAAGGTC-3', SMEK1S2 : 5'-GATGTCAAGCCTCCAAC-3', SMEK1S3 : 5'-AGCCTCCAAAAGT-3', SMEK1AS1 : 5'-CAGTTTTGGAGGCT-3', SMEK1AS2 : 5'-GTTGGAGGCTTGACATC-3' et SMEK1AS3 : 5'-GACCTTCTGCTTCTGG-3' ont été utilisés. Pour MEK2, les amorces SMEK2S1 : 5'-GACGATGACTTCGAAAG-3', SMEK2S2 : 5'-GAGATGTGAAGCCCTCC-3', SMEK2S3 : 5'-CCGACTTCCAGGAGTTTG-3', SMEK2AS1 : 5'-CAAACCTCCTGGAAGTCGG-3', SMEK2AS2 : 5'-GGAGGGCTTCACATCTC-3', SMEK2AS3 : 5'-CTTTCGAAGTCATCGTC-3' ont servi à l'amplification de régions destinées au séquençage. Les ADN ainsi amplifiés ont par la suite été envoyés au service de séquençage du CHUM, au centre de recherche de l'hôpital Notre-Dame (Montréal, QC).

#### 2.10 Essais d'activité phosphatase

### 2.10.1 Lyse des cellules

Trois plats de cellules ont été utilisés pour chacune des conditions suivantes : i) témoin, ii) traitement au TPA (12-0-tétradécanoïl phorbol 13-acétate) 160 nM pour une durée de 10 minutes et iii) pré-traitement à l'AO 50 nM pendant 3 heures suivi d'une incubation au TPA 160 nM pendant 10 minutes. Après les traitements, les cellules sont rincées deux fois au PBS-CM et lysées tel que décrit précédemment en utilisant 500  $\mu$ l d'un tampon de lyse spécialement conçu pour l'essai phosphatase i.e sans détergent puisque la PP2A active existe sous forme d'un trimère (imidazole-HCl 20mM, EDTA 2mM, EGTA 2mM, pH 7.0, avec aprotinine 10 $\mu$ g/ml, leupeptine 10 $\mu$ g/ml et PMSF 1mM, avec ou sans sodium orthovanadate 1 mM). Par la suite, les cellules subissent deux rondes de sonication de 10 secondes à force 4 et l'extrait total est centrifugé à 10 000 g pendant 5 minutes. Les surnageants sont utilisés pour l'essai directement (homogénat total, 250  $\mu$ g de protéines) ou pour l'immunoprécipitation (750  $\mu$ g) précédant l'essai où PP2A est immunoprécipitée avec les anticorps  $\alpha$ -PP2A/A et  $\alpha$ -PP2A/C pour s'assurer de capturer le complexe (comme recommandé par le protocole de mesure de l'activité phosphatase « Ser/Thr Phosphatase Assay Kit 1 (K-R-pT-I-R-R),# 17-127 de la compagnie Upstate Signaling).

### 2.10.2 Mesure de l'activité phosphatase

Les 250  $\mu$ g de protéines de lysat total ou les billes de sépharose-protéine A complexées à PP2A (le même protocole utilisé pour une immunoprécipitation (section 2.7) est suivi, mais avec le tampon de lyse imidazole conçu spécifiquement pour cet essai) sont mises en présence de 5  $\mu$ l de BSA 5 mg/ml et 5  $\mu$ l de NiCl<sub>2</sub> 40 mM. Le volume est ajusté à 80  $\mu$ l à l'aide d'un tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 contenant du CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, puis le milieu réactionnel est incubé à 37°C pendant 15 minutes (cette étape accélère grandement la réaction subséquente). 120  $\mu$ l de pNPP à 1,5 mg/ml dans un tampon Tris-HCl pH 7,0 fraîchement préparé est ajouté au mélange. Le substrat en excès (le pNPP, de couleur légèrement jaune en solution) sera hydrolysé en phosphate libre et en NPP, et ce dernier prendra une coloration jaune prononcée proportionnellement à la quantité d'enzyme ayant une activité phosphatase. Dans les

échantillons de lysats totaux, toutes les phosphatases, phosphatase à tyrosine et à sérine/thréonine participent à la dégradation du pNPP, tandis que lorsque PP2A est immunoprécipitée, cette dernière seule contribue à la dégradation du substrat. Après 0, 30 ou 60 minutes, la réaction est arrêtée par l'ajout de 20  $\mu\text{l}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  à 13% dans l'eau. Le point au temps 0 servira de « blanc » pour les points à 30 et 60 minutes de la même condition. La mesure de l'activité phosphatase se fait par la lecture spectrophotométrique de la production de NPP, absorbant à 405 nm.

### **2.11 Statistiques**

Les barres d'erreurs des histogrammes illustrant la quantification de bandes provenant d'immunobuvardage représentent la déviation standard. Lorsque l'expérience le permet, un t-test de Student, de type 1 et de distribution « one-tailed », est effectué pour montrer sa reproductibilité et sa valeur scientifique.

### **3. Résultats**

### 3.1 Résultats préliminaires ayant mené au présent projet

Les observations suivantes (section 3.1 uniquement) proviennent d'expériences réalisées en 2002 par Julie Vadnais, dans le laboratoire du Dr. Josette Noël. À ce moment, l'activation de plusieurs voies de signalisation dépendantes de l'activation de c-Met a été investiguée dans les trois lignées à l'étude. Ce sont les résultats présentés dans cette section qui sont à la base du projet exposé dans le présent mémoire.

#### 3.1.1 Activation constitutive de MEK et ERK chez les cellules MSV et INV

Les cellules MDCK, lorsque cultivées pendant 48 heures en présence de sérum (FBS) et par la suite privées de sérum pendant 24 heures, ne montrent aucune phosphorylation (donc aucune activation) de MEK1/2, ni de ERK1/2. Ce n'est que lorsqu'elles sont stimulées pendant une courte période de temps (ici, 10 minutes) avec du sérum qu'il y a apparition d'un signal pour phospho-MEK1/2 et phospho-ERK1/2, pour des niveaux de protéines totales équivalentes (figure 3.1 A, partie de gauche). Les cellules MDCK présentent donc un profil normal d'activation de la voie Ras-ERK.

Par contre, les profils de phospho-MEK1/2 et phospho-ERK1/2, chez les cellules MSV comme chez les cellules INV, reflètent une activation de la voie en absence de FBS (figure 3.1 A, parties centrale et de droite). Donc, même lorsque les cellules sont privées de FBS pendant 24 heures, MEK1/2 et ERK1/2 sont activés, et aucune activation supplémentaire n'est observée après addition de FBS. Nous observons donc qu'il y a activation constitutive de MEK et ERK chez les cellules MSV et INV.

#### 3.1.2 Les inhibiteurs PD98059 et U0126 agissent différemment sur le degré de phosphorylation de ERK1/2

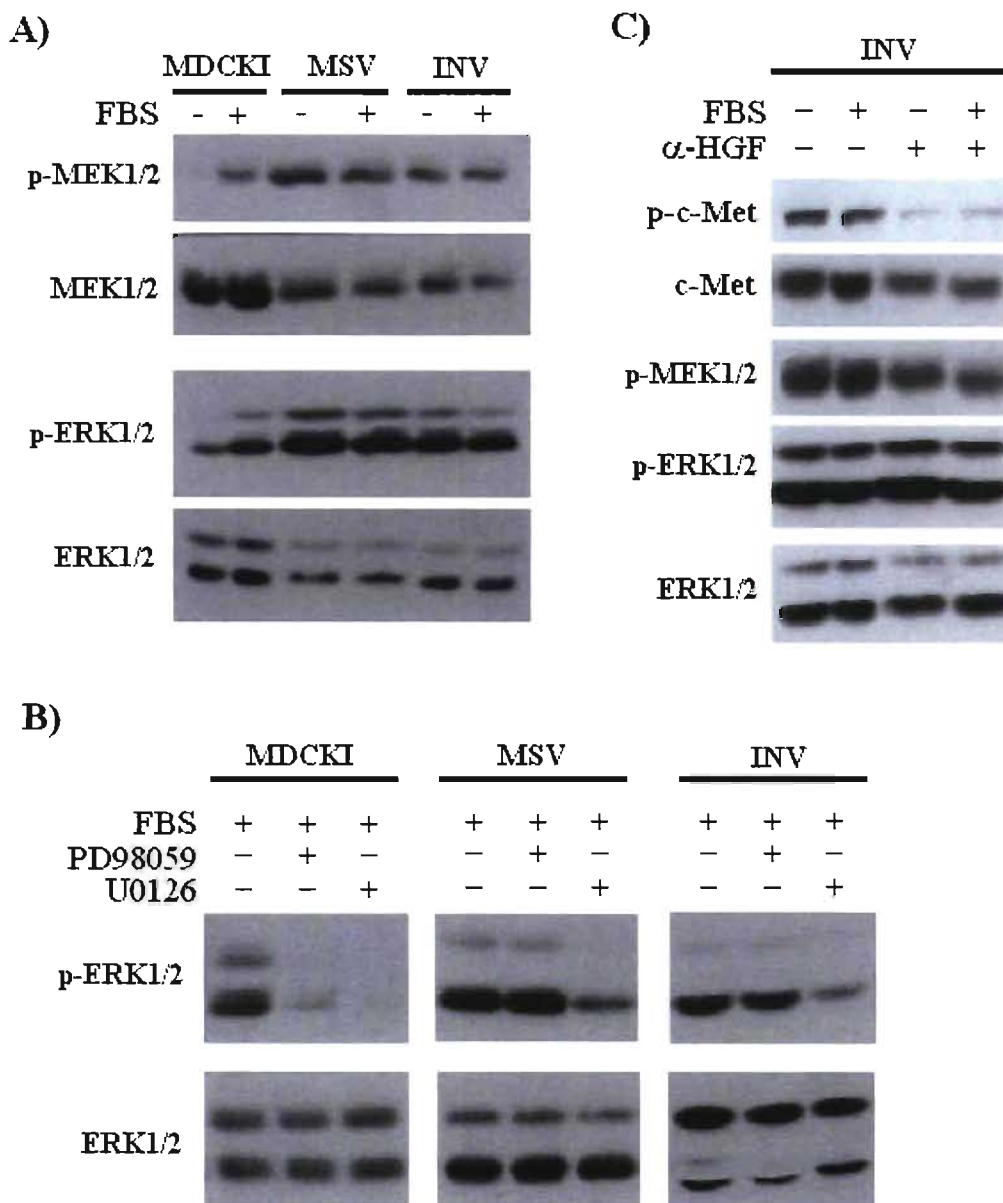
Deux inhibiteurs spécifiques de la voie des MAPK Ras-ERK, le PD98059 et le U0126 ont été utilisés sur les cellules en culture dans le but d'identifier le module de

cette cascade où l'activation constitutive avait lieu. En effet, nous savons que ces deux inhibiteurs spécifiques n'agissent pas au même niveau de la voie. Les deux inhibiteurs sont spécifiques pour MEK1/2 et entraînent donc l'inhibition de ERK1/2 au final, mais inhibent MEK1/2 de manière différente (voir figure 3.1 B). Le mode d'action du PD98059 est de prévenir l'activation de MEK1/2 en empêchant celles-ci de se faire phosphoryler par Raf-1 suite à une stimulation (4), tandis que le U0126 lie les protéines MEK1/2 phosphorylées (donc déjà actives), et diminue l'activité de ERK1/2 (38). Cette nuance est très importante pour saisir l'interprétation des résultats qui sera avancée plus loin dans la section discussion. C'est le degré de phosphorylation de ERK1/2 qui est utilisé pour rendre compte de l'effet des inhibiteurs, et non celui de MEK1/2 puisque le composé U0126 n'affecte pas ce dernier bien qu'il inhibe son activité.

La figure 3.1 montre que lorsque les cellules MDCK sont privées de sérum pendant 24 heures et ensuite stimulées au FBS, il y a activation de ERK1/2. Par contre, lorsque les cellules MDCK sont pré-traitées pour 90 minutes avec le PD98059, il y a une forte diminution du signal phospho-ERK1/2, reflétant une inhibition de l'activité de MEK1/2. La même perte d'activation de ERK1/2 est observée lorsque les cellules MDCK sont pré-traitées 90 minutes avec le U0126, reflétant aussi une inhibition de l'activité de MEK1/2. Les cellules MDCK répondent donc de manière normale à ces deux inhibiteurs (figure 3.1 B, partie de gauche).

La figure 3.1 B montre que lorsque le même traitement est appliqué aux cellules MSV et INV, le PD98059 n'a aucun effet d'inhibition sur ERK1/2 tandis que le U0126 est apte à abolir le degré de phosphorylation de ERK1/2. Puisqu'il est établi que le PD98059 empêche MEK1/2 de se faire activer par Raf-1, le fait que cet inhibiteur n'affecte pas le degré d'activation de ERK1/2 des cellules MSV et INV signifie que l'activation constitutive de la voie ne provient pas des modules Ras ou Raf. De plus, le fait que le U0126 empêche l'activation de ERK1/2 indique que ce n'est pas ERK1/2 lui-même qui est constitutivement actif. Cette activation constitutive de ERK1/2 semble donc provenir du module MEK1/2.





**Figure 3. 1 : Résultats présentant l'activation de la voie des MAPK Ras-ERK telle que rapportée par le degré de phosphorylation de ERK1/2. A)** Degré de phosphorylation de MEK1/2 et de ERK1/2 dans les cellules MDCK, MSV et INV avec ou sans stimulation au FBS 5% 10 minutes. n = 2 **B)** Effets de deux inhibiteurs spécifiques, le PD98059 (50  $\mu$ M) et le U0126 (10  $\mu$ M), sur le degré de phosphorylation de ERK1/2 chez les cellules MDCK, MSV et INV. n = 2 **C)** Effet de l'anticorps  $\alpha$ -HGF (5  $\mu$ g/ml) sur la phosphorylation de c-Met, MEK1/2 et ERK1/2 chez les cellules INV. n = 2

3.1.3 La neutralisation de la boucle d'activation autocrine de c-Met chez les INV n'a pas d'effet sur l'activation constitutive de ERK1/2.

Dans le cas particulier des cellules INV, la boucle d'activation autocrine du récepteur c-Met par sécrétion de HGF aurait pu être la cause de l'activation constitutive de la voie Ras-ERK (125).

Pour évaluer le rôle que celle-ci pouvait jouer dans le degré de phosphorylation de base élevé chez les INV, l'expérience suivante a été mise en oeuvre.

Les cellules INV ont été incubées pendant 24h en présence d'un anticorps  $\alpha$ -HGF (5  $\mu$ g/ml) après qu'elles aient été d'abord cultivées pendant 24 h en présence de sérum. Le rôle de cet anticorps est de séquestrer, au fur et à mesure qu'il est sécrété, le HGF produit par les cellules, empêchant ainsi l'activation de son récepteur c-Met. Les conséquences phénotypiques de ce traitement ont été démontrées par Vadnais *et al* (125). La concentration de l'anticorps utilisée est celle déterminée pour obtenir une perte du phénotype invasif des cellules MDCK-MSV-INV et une forte diminution du signal de phospho-c-Met. On ne peut, effectivement, savoir si l' $\alpha$ -HGF a titré tout le HGF sécrété puisqu'en effet, c-Met présente toujours un faible degré d'activation. Il est donc probable qu'une petite partie du HGF sécrété active toujours c-Met. Pour ces expériences, nous avons ajouté jusqu'à 20  $\mu$ g/ml d'anti-HGF, ce qui est une quantité considérable. Il est fort probable qu'une plus grande concentration d'anti-HGF ait la capacité de titrer (neutraliser) plus rapidement le HGF et donc d'inhiber plus rapidement l'activation de c-Met, mais nous n'avons pas expérimenté des concentrations supérieures. Le phénotype observé à l'ajout d'anti-HGF était déterminant pour nous indiquer que la voie HGF/c-Met était significativement bloquée. Une inhibition complète n'est pas obtenue, mais elle est suffisante pour supprimer le phénotype invasif.

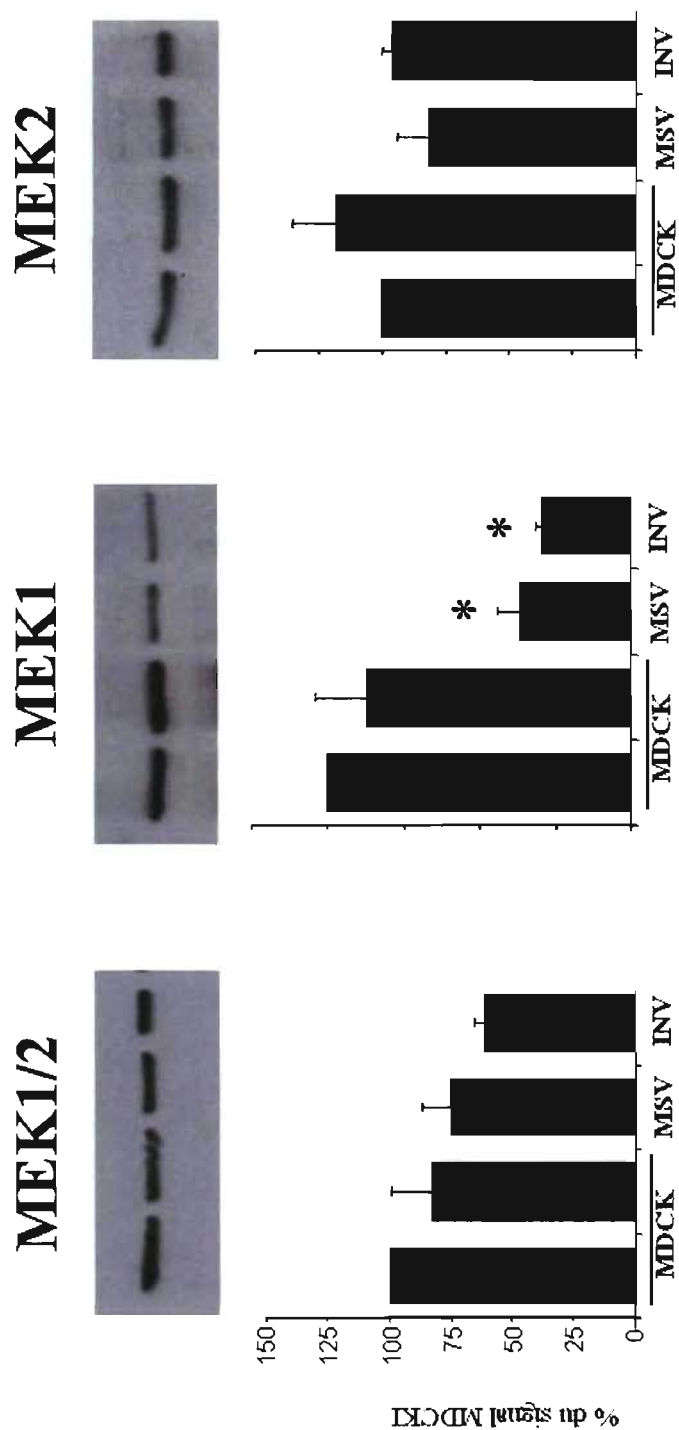
Premièrement, il est aisé de constater que le récepteur c-Met présente un niveau basal de phosphorylation élevé, en présence ou non de sérum (figure 3.1 C, partie de gauche). La présence d'anticorps  $\alpha$ -HGF dans le milieu de culture diminue ce fort degré de phosphorylation basal de c-Met. Par contre, la présence de cet anticorps

n'induit pas de manière subséquente la diminution du signal de phospho-MEK1/2 ni de phospho-ERK1/2. Autrement dit, la boucle d'activation autocrine du récepteur c-Met n'est pas responsable, chez les INV, de l'activation constitutive de MEK1/2 et ERK1/2.

### **3.2 Rôle de MEK1/2 dans l'activation constitutive de ERK1/2**

#### **3.2.1 Expression différentielle de MEK1 et de MEK2 dans les cellules MSV et INV.**

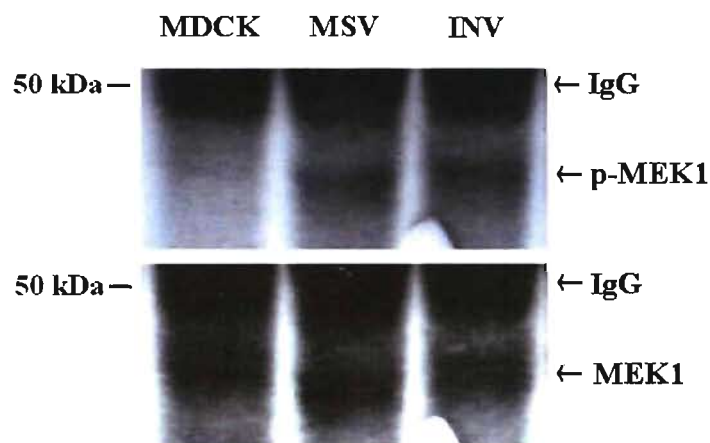
Bien que leur utilisation est très fréquente, les anticorps dirigés contre MEK1/2 ou phospho-MEK1/2, lesquels ne discriminent pas les deux isoformes de MEK (MEK1 et MEK2), ne donne aucun indice à savoir si l'une des isoformes serait plus impliquée que l'autre dans l'activation constitutive de ERK1/2. En effet, lorsque les niveaux d'expression de MEK dans les trois lignées sont révélés par un anticorps reconnaissant les deux isoformes en même temps, nous constatons que ces niveaux sont égaux, qu'il n'y a pas de différence significative entre les trois lignées (figure 3.2, partie de gauche). Par contre, lorsqu'un anticorps spécifique à MEK1 est utilisé, celui-ci révèle alors une expression de MEK1 significativement diminuée chez les cellules MSV et INV, lorsque comparée aux cellules MDCK (figure 3.2, partie centrale). L'expression de MEK2 est cependant équivalente dans toutes les lignées (figure 3.2, partie de gauche). Ces détails passaient auparavant inaperçus avec l'anticorps non-discriminant  $\alpha$ -MEK1/2. Puisque c'est l'expression de MEK1 qui est différente chez les cellules MSV et INV comparativement aux cellules MDCK, c'est sur cette isoforme que nous nous sommes concentrés. Une étude a par ailleurs démontré que c'est l'isoforme MEK1 qui est préférentiellement activée par Ras et Raf (71).



**Figure 3. 2: Expression différentielle de MEK1 et de MEK2 chez les MSV et INV.** Trois anticorps différents ont été utilisés, respectivement un anticorps  $\alpha$ -MEK1/2 (partie de gauche),  $\alpha$ -MEK1 (partie centrale) et  $\alpha$ -MEK2 (partie de droite),  $n = 3$ . Deux lignées de cellules MDCK parentales ont été utilisées pour cette expérience, les cellules MDCKI et II. Pour MEK1, t-test type I \* =  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ , moy  $\pm$  STDEV.

### 3.2.2 Phosphorylation basale plus élevée de MEK1 chez les cellules MSV et INV

Pour démontrer clairement que MEK1 est effectivement activé à l'état basal chez les cellules MSV et INV, il fallait vérifier le degré de phosphorylation de cette isoforme seulement. N'ayant pas accès à des anticorps conçus pour reconnaître spécifiquement l'isoforme MEK1 phosphorylée (pas disponible sur le marché à ce moment), une immunoprécipitation de MEK1 a été effectuée pour la révéler ensuite en immunobuvardage avec un anticorps anti-phospho-MEK1/2. Puisque ce n'est que MEK1 qui est recueillie lors de l'immunoprécipitation, la bande révélée par l' $\alpha$ -phospho-MEK1/2 ne peut être que celle de phospho-MEK1. La proximité des protéines MEK de poids moléculaire 43 kDa à celle des immunoglobulines, de 50 kDa, rend cette visualisation un peu délicate mais la révélation subséquente des protéines avec un anticorps anti-MEK1 témoigne de la spécificité de la bande révélée.



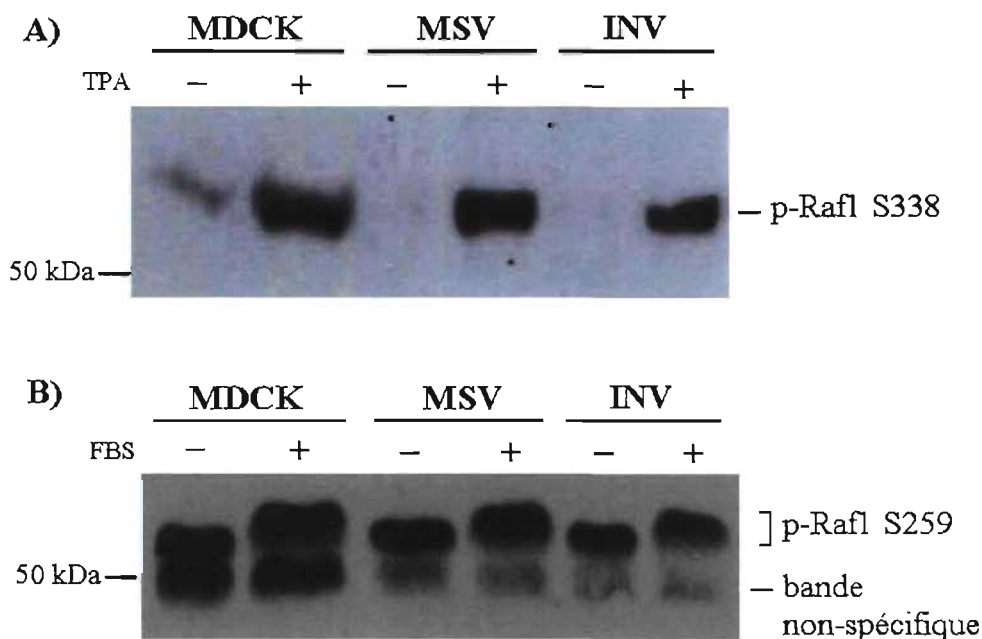
**Figure 3. 3: Degré basal de phosphorylation de MEK1 plus élevé chez les cellules MSV et INV.** Révélation du degré de phosphorylation de MEK1 (p-MEK1) par un immunobuvardage en utilisant un anticorps  $\alpha$ -phospho-MEK1/2 sur un immunoprécipitat obtenu avec un anticorps spécifique à MEK1 (première partie). Le décapage de la précédente membrane et l'hybridation avec un anticorps dirigé contre MEK1 non-phosphorylé révèle une quantité égale de MEK1 dans les trois conditions (deuxième partie). n = 3

La figure 3.3 présente le degré de phosphorylation de MEK1 dans les trois lignées cellulaires; MDCK, MSV et INV. Il y a présence d'une bande pour phospho-MEK1 seulement chez les cellules MSV et INV. La partie du bas de la figure est un immunobuvardage  $\alpha$ -MEK1 suivant un décapage des anticorps phospho-MEK1 de la

même membrane de nitrocellulose, révélant la quantité totale de MEK1. MEK1 est présente dans les trois lignées cellulaires et en même quantité. MEK1 est donc, pour une quantité de protéine MEK1 équivalente, phosphorylée chez les cellules MSV et INV uniquement. Ces résultats ont permis de raffiner les conclusions tirées en utilisant un anticorps non-sélectif  $\alpha$ -phospho-MEK1/2, tels que démontrés à la figure 3.1. Le même patron est observé pour MEK2 (résultat non montré).

3.2.3 Le degré de phosphorylation des sérines en position 338 et 259 de Raf-1 est similaire dans les trois lignées

Pour s'assurer d'une manière complémentaire que l'activation constitutive de MEK1/2 n'était pas due à une activation constitutive de Raf-1, il a fallu vérifier que les niveaux d'activation de Raf-1 étaient les mêmes dans les trois lignées cellulaires. Premièrement, nous pouvons constater que la phosphorylation de la sérine 338 de Raf-1, qui reflète son degré d'activation (4), est le même dans les trois lignées et qu'il répond de la même manière à la stimulation au FBS (figure 3.4 A).



**Figure 3. 4: Phosphorylation des sérines 338 et 259 de Raf-1 chez les cellules MDCK, MSV et INV avec ou sans stimulation au TPA ou au FBS.** A) Traitement de 10 minutes au TPA 160 nM sur les cellules en culture des trois lignées, après privation de sérum pendant 24 h, et révélation avec un anticorps phospho-spécifique  $\alpha$ -p-Raf-1<sup>S338</sup>. B) Traitement de 10 minutes au FBS 5% sur les cellules en culture des trois lignées après privation de sérum pendant 24 h, et révélation avec un anticorps phospho-spécifique  $\alpha$ -p-Raf-1<sup>S259</sup>.

La phosphorylation de la sérine 259 reflète l'inactivation de Raf-1 (81, 92). Dans la figure 3.4 B, le profil de phosphorylation dans les trois lignées est le même, profil de phosphorylation produit suite à une stimulation rapporté dans la littérature (fiche technique de l'anticorps #9421S de Cell Signaling Technology). En effet, la phosphorylation de Raf-1 sur la sérine en position 259 fait augmenter de manière apparente le poids moléculaire. L'anticorps utilisé révèle aussi une bande non-spécifique de poids moléculaire constant (50 kDa).

Ces résultats montrent clairement que Raf-1 n'est pas activé lorsque les cellules sont privées de sérum, et que Raf-1 réagit normalement à la stimulation au TPA, ce qui exclut définitivement la possibilité que ce soit Raf-1, et par le fait même son activateur en amont Ras, le responsable de l'activation constitutive de MEK et ERK chez les cellules MSV et INV.

### 3.3 Mutations dans MEK1 et/ou MEK2

Dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, il a été montré que certaines composantes de la voie des MAPK Ras-ERK ont des mutations activatrices (34, 123). Afin de déterminer si une telle mutation pouvait être responsable de l'activation de MEK1 dans les cellules transformées MSV et INV, nous avons entrepris de séquencer l'ARN messager de MEK1 et de MEK2 et ce, dans les trois lignées cellulaires d'origine canine. Ceci a permis de vérifier si l'activation constitutive de MEK1/2 était due à une ou des mutations activatrices dans une des deux isoformes. Comme les séquences de MEK1 et de MEK2 canines n'étaient pas connues (seule une séquence prédite pour MEK1 existait à l'été 2005), l'identification de possibles mutations a été réalisée en comparant les séquences obtenues du séquençage de MEK1 et de MEK2 des cellules MSV et INV à celles obtenues de MEK1 et de MEK2 chez les cellules MDCK parentales, considérées être de type sauvage. Même si c'est surtout l'isoforme MEK1 qui semblait être impliquée dans l'activation constitutive, le fait que la séquence de MEK2 était parfaitement inconnue, son séquençage a aussi été entrepris pour fins de publication.

#### 3.3.1 Séquençage de MEK1 et de MEK2 dans les cellules MDCK, MSV et INV

La conception des amorces pour l'amplification spécifiquement de MEK1 ou de MEK2 étant expliquée en détail dans la section 2.9.3 « Matériel et Méthodes », rappelons simplement que la séquence d'ADNc de MEK1 a été obtenue par l'utilisation de plusieurs amorces, dans chaque lignée, de façon à ce que les séquences des fragments obtenus se chevauchent au moins deux fois. De plus, de deux à trois ADNc différents (MDCK = trois, MSV et INV = deux), obtenus de deux à trois réactions de transcription inverse (idem), réalisées à partir de 2-3 populations d'ARNm différentes (idem) furent utilisés pour l'amplification dédiée au séquençage, et ce, pour les lignées MDCK, MSV et INV, afin de rejeter toute possibilité d'omission. Comme double témoin, nous avons aussi séquencé MEK1 dans la lignée MDCK II, une lignée de cellules présentant une moindre résistance ionique transépithéliale et qui présente un



phénotype un peu différent des cellules MDCK de souche I. Les séquences de MEK1 des deux lignées témoin de cellules MDCK étaient identiques; cette information était primordiale à l'analyse des séquences pour amorcer la comparaison des séquences MDCK et MSV de même que MDCK et INV. En alignant les séquences obtenues (avec le programme BioEdit Sequence Alignment Editor©), aucune différence dans la séquence de MEK1 parmi les trois lignées n'a été observée. Il en fut de même pour MEK2. La possibilité de mutation(s) activatrice(s) a donc été écartée.

### 3.3.2 Comparaison des séquences obtenues avec celle de MEK1 prédite

En comparant la séquence obtenue de MEK1 (identique à travers les cellules MDCK et ses deux lignées « filles » MSV et INV) à celle disponible sur PubMed sous le nom de « *Canis familiaris* chromosome 30 genomic contig, whole genome shotgun sequence », numéro d'accèsion NW\_139907, force a été de constater qu'il y avait beaucoup de différences entre la séquence prédite pour MEK1 de *Canis familiaris* et la véritable séquence (voir figure 3.5) En effet, les deux séquences sont tout d'abord différentes quant à leur nombre de paires de bases (1305 pour la prédite vs. 1257 pour la séquencée). Les 140 premières paires de bases des deux séquences diffèrent, et la séquence prédite contient une longue insertion de 62 paires de bases en milieu de séquence. Puisque de plus en plus de chercheurs optent pour les cellules MDCK canines pour effectuer des études de signalisation et que le génome canin présente de plus en plus d'intérêt, nous avons cru qu'il y avait un grand intérêt à publier ces séquences. La publication de cette séquence s'est donc avérée nécessaire. La séquence de MEK1, de même que celle de MEK2 des cellules MDCK de type sauvage furent enregistrées dans le *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* sous les numéros DQ489530 et DQ489531 (MEK1 et MEK2 respectivement). Ce long travail aura donc permis d'écartier la possibilité de mutations activatrices dans MEK1 pouvant expliquer l'activation constitutive de MEK et ERK1/2 chez les cellules MSV et INV et permet maintenant, par la publication de ces séquences, aux chercheurs du monde entier d'avoir accès à la séquence nucléotidique de l'ARN messager de MEK1 et MEK2 pour l'organisme *Canis familiaris*.

**Figure 3. 5: Comparaison de la séquence prédite de MEK1 de *Canis familiaris* avec celle obtenue du séquençage de l'ADNc codant pour MEK1 des cellules MDCK . Plusieurs différences ont été répertoriées entre la séquence « prédite » et « vérifiable » grâce au séquençage. Les encadrés rouges illustrent les différences de séquence nucléotidique, l'insertion de 62 paires de bases de la séquence prédite ainsi que la portion manquante de cette dernière à la toute fin de la séquence.**

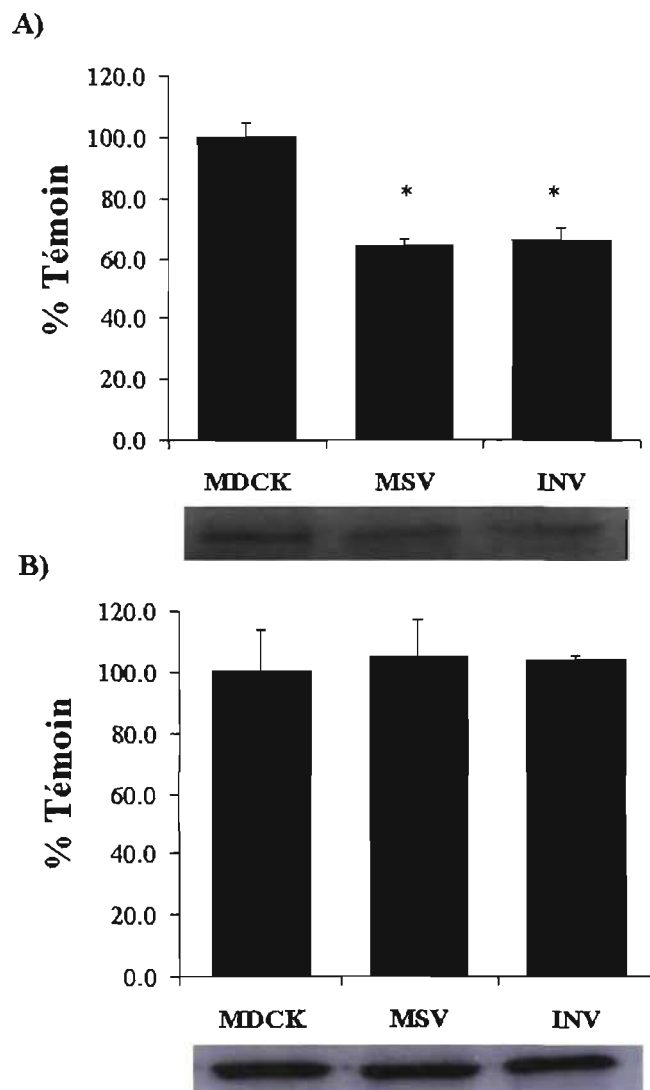
Prédite	ATGGGCACCTGTGGCTTGCCTCCATGCTTTGAGGAAAGCAGGACTTGTACTCTTTT	60	AACTCCGTGGGGAGATCAAGCTCTGTGACTTTGGGTACAGGGGACAGTTCATTGACTCC	777
Séquencée	--GGAGAGCGAGACACGGCCGGCTTCCGCTCGGAGCCGGACGGCCTTCCCGCTCCAA	58	AACTCCGTGGGGAGATCAAGCTCTGTGACTTTGGGTACAGGGGACAGTTCATTGACTCC	713
	* * * * *		*****	
Prédite	GACAGAAGAGAAAAACAGATGT--GTCAAAATTAATGAGTAGTCAGTCTG-TGGCCGCC	117	ATGGCCAACTCCTTGTGGGCACAAGGTCTACATGTGCCAGAAAAGACTCCAGGGGACT	837
Séquencée	AATGC CCAAGAAAGAGCCGACGCCATCCAGCTGAACCCGGCCCGGACGGCTCGCGGT	118	ATGGCCAACTCCTTGTGGGCACAAGGTCTACATGTGCCAGAAAAGACTCCAGGGGACT	773
	* * * * *		*****	
Prédite	CAGCTAGTGTGACTATTAAAGGACCAACCTGGAGGCCCTTGCAAGAAGCTGGAGAG	177	CATTACTCCGTGCAGTCCGACATCTGGAGCATGGGGCTCTCTCTGGTGAGATGGCAGTT	897
Séquencée	GAACGGG--ACCAGCTCGCGGAGACCAACCTGGAGGCCCTTGCAAGAAGCTGGAGAG	176	CATTACTCCGTGCAGTCCGACATCTGGAGCATGGGGCTCTCTCTGGTGAGATGGCAGTT	833
	* * * * *		*****	
Prédite	CTGGAGCTTGTGAGCAGCAGCGGAAAGCGCCTTGAGGCCCTTCTCACCAGAAGCAGAAG	237	GGGAGGTATCCCATCCCTCTCCGGATGCCAAGGAGCTGGAGCTGATGTTGGGTGCCAA	957
Séquencée	CTGGAGCTTGTGAGCAGCAGCGGAAAGCGCCTTGAGGCCCTTCTCACCAGAAGCAGAAG	236	GGGAGGTATCCCATCCCTCTCCGGATGCCAAGGAGCTGGAGCTGATGTTGGGTGCCAA	893
	*****		*****	
Prédite	GTGGGGAACTCAAGGATCAGGACTTCCAGAAGATCAGTCACTGGGTGCTGGCAACGGT	297	GTGGAGGGAGAGTGGCTGAGACCCACCCAGACCAAGGACCCCGGAAAGACCCCTTAGC	1017
Séquencée	GTGGGGAACTCAAGGATCAGGACTTCCAGAAGATCAGTCACTGGGTGCTGGCAACGGT	296	GTGGAGGGAGAGTGGCTGAGACCCACCCAGACCAAGGACCCCGGAAAGACCCCTTAGC	953
	*****		*****	
Prédite	GGCGTGTGTTCAGGTTCTCCACAAGCCGTCGGCCTAGTCAATGGCCAGAAAAGCTAATT	357	TCTTATGGAATGGACAGCCGACCCCATGGCAAATTTTGGAGCTGTGGATTACATAGTC	1077
Séquencée	GGCGTGTGTTCAGGTTCTCCACAAGCCGTCGGCCTAGTCAATGGCCAGAAAAGCTAATT	356	TCTTATGGAATGGACAGCCGACCCCATGGCAAATTTTGGAGCTGTGGATTACATAGTC	1013
	*****		*****	
Prédite	CACCTGGAGATCAAACTGCAATCCGGAAACAGATCATAAAGGAGCTACAGTTCTACAT	417	AACGAGCCCCCTCCAAAAC TGCCAGTGGAGTATTCAGTCTGGAATTTCAAGATTTTGTG	1137
Séquencée	CACCTGGAGATCAAACTGCAATCCGGAAACAGATCATAAAGGAGCTACAGTTCTACAT	416	AACGAGCCCCCTCCAAAAC TGCCAGTGGAGTATTCAGTCTGGAATTTCAAGATTTTGTG	1073
	*****		*****	
Prédite	GAGTCAACTCCCCTACATCGTGGGCTTCTATGTTGCAATTTACAGCGATGGCGAGATC	477	AATAAATGCTTAATAAAAAACCCAGCAGAGAGCAGATCTGAAGCAATCATGGTTTCAT	1197
Séquencée	GAGTCAACTCCCCTACATCGTGGGCTTCTATGTTGCAATTTACAGCGATGGCGAGATC	476	AATAAATGCTTAATAAAAAACCCAGCAGAGAGCAGATCTGAAGCAATCATGGTTTCAT	1133
	*****		*****	
Prédite	AGTATCTGCATGGAGCACATGCTGCTGGTTTTCACTGAAAGCAGGACGCTGGATTCC	537	GCCTTCATCAAGAGATCTGACGGTGAAGAAAGTGGATTTGACAGTTGGCTCTGCTCCACC	1257
Séquencée	AGTATCTGCATGGAGCACATGCTGCTGGTTTTCACTGAAAGCAGGACGCTGGATTCC	497	GCCTTCATCAAGAGATCTGACGGTGAAGAAAGTGGATTTGACAGTTGGCTCTGCTCCACC	1193
	*****		*****	
Prédite	TTGCC TTTCTCTCATCAAAAGATGGGGTTCTTGGATCAAGTCTGAAGAAAGCT	597	-ATTGGCCTTAACCAGCCCAGCAGCCGACCCACGCAGCTGGGCTCAA-----	1305
Séquencée	-----GATGGGGTTCTTGGATCAAGTCTGAAGAAAGCT	533	CATTGGCCTTAACCAGCCCAGCAGCCGACCCACGCAGCTGGGCTCAA-----	1253
	*****		*****	
Prédite	GGAGAATTCTGAACAAATTCAGGAAAAGTTAGCATCGCTGTAATAAAGGTTGACA	657	-----	
Séquencée	GGAGAATTCTGAACAAATTCAGGAAAAGTTAGCATCGCTGTAATAAAGGTTGACA	593	AGAT 1257	
	*****			
Prédite	TACCTGAGAGAGAAGCACAAGATTATGCACAGAGATGTCAAGCCTTCCAAATCTCTGTG	717		
Séquencée	TACCTGAGAGAGAAGCACAAGATTATGCACAGAGATGTCAAGCCTTCCAAATCTCTGTG	653		
	*****			

### 3.4 Implication de PP2A dans la modulation du degré de phosphorylation de MEK1/2

Les résultats précédents indiquent clairement que l'activation constitutive de la voie MAPK est due à une dérégulation au niveau de MEK1/2. Puisqu'aucune mutation activatrice n'a été détectée dans les cellules MSV et INV, l'hypothèse selon laquelle le problème se situe au niveau de la régulation de MEK1/2 gagnait en force. Puisque c'est PP2A qui a le rôle de déphosphoryler MEK1/2, la détermination de son expression et de son activité a été entreprise, afin d'y relever toute différence entre les cellules MDCK et les MSV et INV.

#### 3.4.1 Expression de PP2A/A et /C dans les cellules MDCK, MSV et INV

En premier lieu, la vérification du niveau d'expression de PP2A, pour une même quantité de protéines provenant de lysats cellulaires totaux de cellules MDCK, MSV et INV, a été réalisée en utilisant un anticorps dirigé contre la sous-unité /A structurelle de PP2A. Rappelons que la sous-unité /A sert en quelque sorte d'échafaudage pour l'holoenzyme PP2A complète formée des trois sous-unités /A, /B et /C. En comparant les niveaux d'expression de PP2A/A des cellules MSV et des INV à celui des cellules MDCK, nous pouvons constater qu'il y a une diminution de 40% de l'expression de PP2A/A dans les deux lignées transformées par le virus du sarcome de Moloney (figure 3.6 A). En comparant les niveaux d'expression de la sous-unité catalytique /C dans les trois lignées, aucune différence d'expression n'a été observée (figure 3.6 B). Comme il sera discuté plus loin dans la section 4.3.1 de la discussion, il aurait évidemment été probant de vérifier l'expression de la sous-unité /B dans nos trois lignées cellulaires. Malheureusement, la très grande quantité d'isoformes de cette sous-unité (plus d'une dizaine d'anticorps pour autant d'isoformes), de même que le fait que l'isoforme /B responsable de la localisation cellulaire de PP2A à MEK1 n'est pas connue, nous a empêché d'y parvenir. Nous avons tout de même tenté l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la sous-unité /B $\gamma$ 1, qui a été impliqué dans certains cancers (69), sans succès (résultat non-montré).



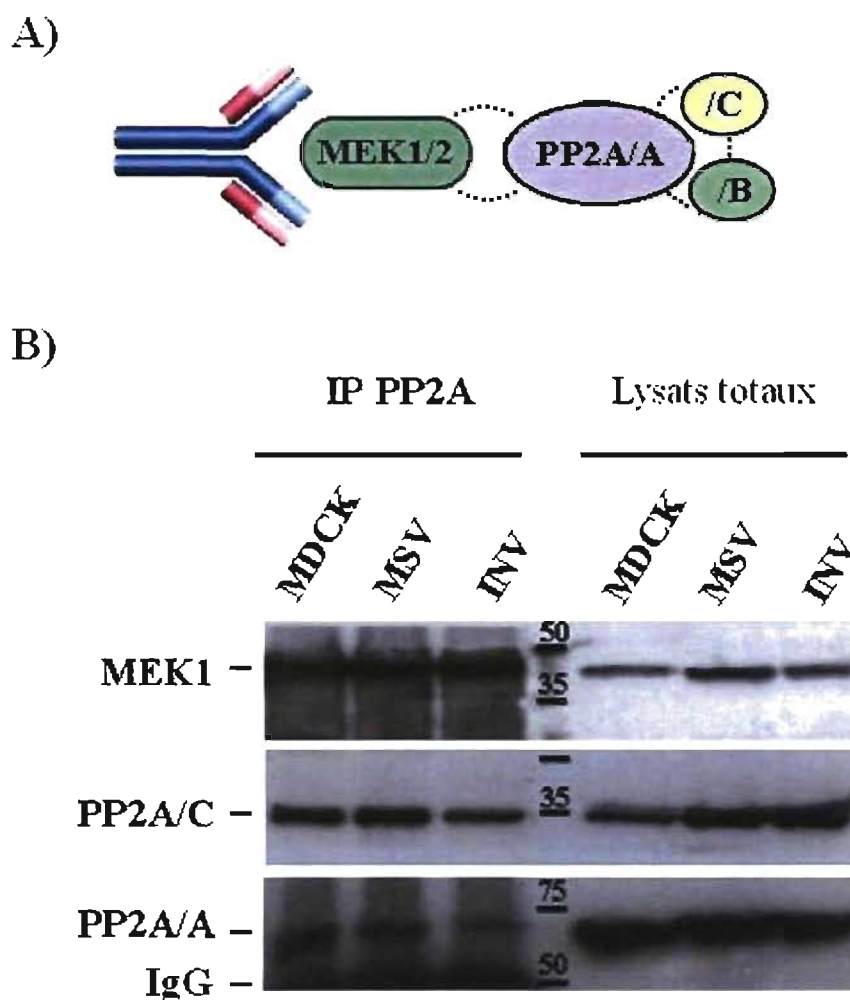
**Figure 3.6 Expression différentielle de deux sous-unités de PP2A (/A et /C) chez les cellules MSV et INV lorsque comparée aux cellules MDCK. A) Un anticorps spécifique à la sous-unité /A de PP2A a été utilisé sur des lysats cellulaires totaux des trois lignées cellulaires.  $n = 4$ , t-test type I  $* = p < 0.01$ . B) Le niveau d'expression basal de la sous-unité /C de PP2A révélé par un anticorps spécifique à cette sous-unité. Un immunobuvardage typique est montré pour chacune des expériences. Les histogrammes sont exprimés en pourcentage de la valeur des cellules MDCKI.  $n = 3$ , moy  $\pm$  STDEV.**

### 3.4.2 Co-immunoprécipitation de PP2A/A avec PP2A/C, MEK1, et MEK2

Afin de vérifier si de manière endogène (i.e. sans surexpression) PP2A forme un complexe avec MEK1 et MEK2 dans les trois lignées étudiées, et ce, de façon comparable, une co-immunoprécipitation a été effectuée. En bref, un anticorps dirigé contre la sous-unité /A de PP2A est utilisé pour capturer en conditions non-

dénaturantes cette sous-unité, de même que d'autres protéines avec lesquelles elle forme un complexe (voir schéma 3.7 A). Après dénaturation de l'immunoprécipitat de PP2A/A, séparation, en conditions dénaturantes, des protéines selon leur poids moléculaire suivi d'un transfert sur une membrane de nitrocellulose, il est possible de révéler la présence d'autres protéines qui forment un complexe avec PP2A. On dit de ces autres protéines qu'elles sont donc *co-immunoprécipitées*.

À la figure 3.7 B, il est possible de constater que par cette technique la sous-unité catalytique /C de PP2A (tout comme évidemment la sous-unité /A) est co-immunoprécipitée, ce qui assure la validité de l'expérimentation puisque ces deux sous-unités forment normalement un complexe. De même, la présence de la sous-unité /B aurait pu être détectée, mais de par les raisons mentionnées plus haut, il a été impossible de le vérifier. De plus MEK1, tout comme MEK2 (non-montré), est révélé par cette immunoprécipitation de PP2A/A, ce qui indique que dans les trois lignées cellulaires, PP2A forme bien un complexe de manière endogène avec MEK1 et MEK2. Il a été surprenant de constater qu'il y avait de la variation quant à l'intensité des bandes des sous-unités /A et /C lors de la répétition de l'expérience. En effet, l'intensité observée dans cette figure n'est pas la même que celle dans la figure 3.6. De plus, dans cette co-immunoprécipitation, il est impossible de retrouver la différence de niveau d'expression de MEK1 dans les trois lignées cellulaires, comme à la figure 3.2. Ceci est probablement dû au fait que la quantité de PP2A disponible pour le complexe PP2A-MEK1 est limitante. Ainsi, l'intensité des bandes correspondantes à MEK1, PP2A/A et PP2A/C sont plutôt qualitatives que quantitatives.

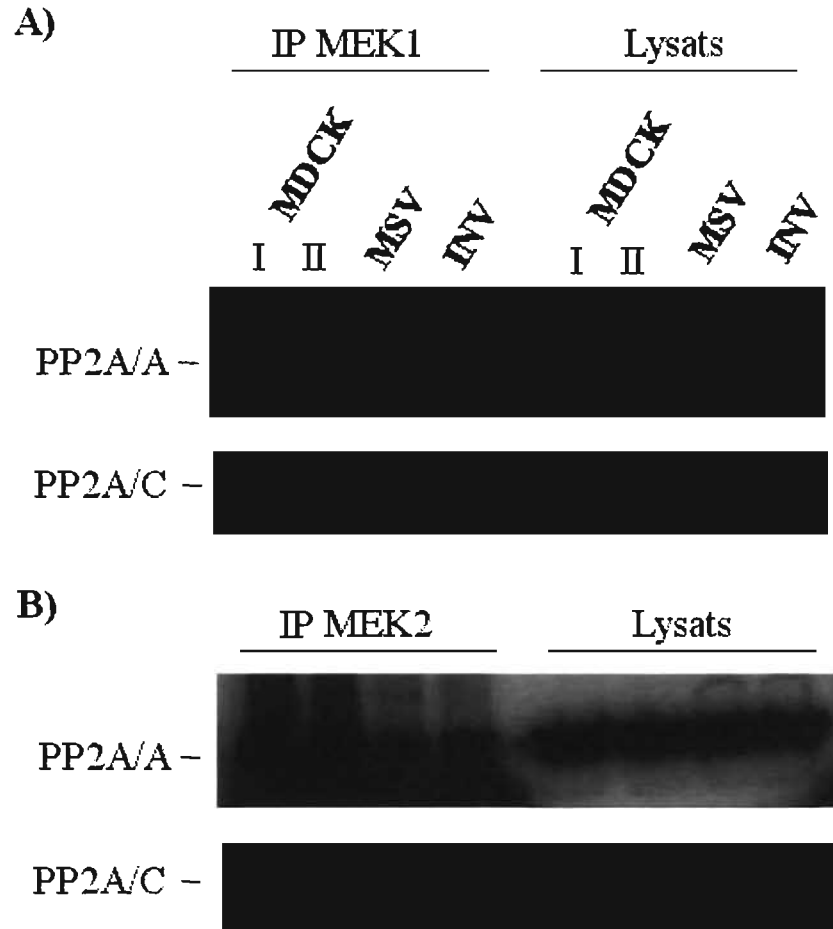


**Figure 3. 7 : Immunoprécipitation du complexe PP2A-MEK1.** A) Schéma représentatif du complexe protéique attendu lors de la co-immunoprécipitation avec l'anticorps anti-PP2A/A. B) Co-immunoprécipitation des sous-unités /A et /C de PP2A et de MEK1 avec un anticorps dirigé contre la sous-unité /A.  $n = 2$ , une seule est montrée.

### 3.4.3 Réciproque des co-immunoprécipitations

Pour s'assurer de la validité de ces résultats, la réciproque de l'immunoprécipitation a été effectuée, c'est-à-dire que cette fois, les anticorps  $\alpha$ -MEK1 et  $\alpha$ -MEK2 ont été utilisés pour faire l'immunoprécipitation, et que l'immunobuvardage a été révélé avec les anticorps  $\alpha$ -PP2A/A et  $\alpha$ -PP2A/C. Les mêmes résultats sont observés (figure 3.8), soit une co-immunoprécipitation inverse, ce

qui confirme hors de tout doute que dans les trois lignées à l'étude, PP2A forme un complexe avec MEK1 et avec MEK2.



**Figure 3. 8: Réciproques des immunoprécipitations de PP2A : les anticorps  $\alpha$ -MEK1 et  $\alpha$ -MEK2 sont aussi capables de co-immunoprécipiter les sous-unités /A et /C de PP2A. A) Co-immunoprécipitation de PP2A/A et /C par un anticorps  $\alpha$ -MEK1. B) Co-immunoprécipitation de PP2A/A et /C par un anticorps  $\alpha$ -MEK2. La proximité des immunoglobulines et de PP2A/A (anticorps de lapin) rendent difficile l'obtention de bandes claires pour PP2A/A, qui sont toutefois visibles.**

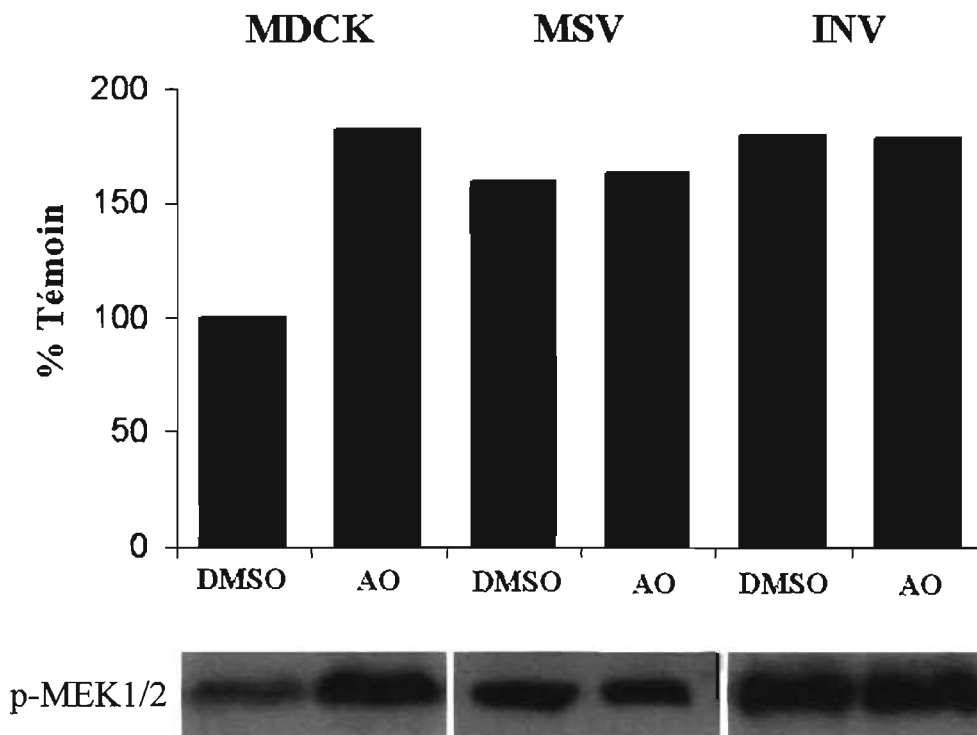
### 3.5 Inhibition de l'activité phosphatase de PP2A par l'AO chez les cellules MDCK

L'AO est un inhibiteur spécifique de PP2A et à un moindre degré, de PP1. Les cellules MDCK, MSV et INV ont été traitées à l'AO, et les possibles changements moléculaires et phénotypiques ont été observés en fonction du temps. Plus

spécifiquement, le degré de phosphorylation de MEK1/2 et la motilité des trois lignées cellulaires ont été analysés suite au traitement à l'AO.

### 3.5.1 Effet de l'AO sur la phosphorylation de MEK1/2 chez les cellules MDCK, MSV et INV

À la figure 3.9, il est tout d'abord possible de constater qu'en condition témoin (DMSO), le degré de phosphorylation de MEK1/2 chez les cellules MDCK est plus faible que pour les cellules MSV et INV, ce qui a été démontré à la section 3.1. Par ailleurs, nous constatons qu'un court traitement des cellules à l'AO augmente significativement (de près du double) le degré de phosphorylation de MEK1/2 chez les cellules MDCK, comparativement à la condition témoin. Par contre, le traitement à l'AO n'entraîne pas d'augmentation du degré de phosphorylation de MEK1/2 chez les MSV et INV.



**Figure 3. 9 : Effet de l'AO sur le degré de phosphorylation de MEK1/2 chez les cellules MDCK, MSV et INV.** Représentation en histogramme de l'intensité des bandes révélée par immunobuvardage. La bande des MDCK en condition DMSO est considérée comme 100% et sert de référence pour les suivantes. La concentration d'AO utilisée est de 50 nM. *n* = 1



Par la suite, un traitement au NaF, un inhibiteur non-spécifique des sérine/thréonine phosphatases, a été effectué afin de soutenir ces observations. Les mêmes résultats ont été observés, c'est-à-dire qu'il y a une augmentation du degré de phosphorylation de MEK1/2 chez les cellules MDCK, mais non chez les MSV et INV (résultats non illustrés).

### 3.5.2 Effet de l'AO sur la réparation de plaies dans les cellules MDCK, MSV et INV

Il a souvent été démontré que la voie des MAPK est impliquée dans la migration et la motilité cellulaire (74). Pour faire suite aux résultats précédents qui démontraient une augmentation du degré de phosphorylation de MEK1/2 par un traitement à l'AO, les effets de ce traitement sur la motilité des MDCK, MSV et INV ont été analysés par la technique de réparation de plaies.

#### 3.5.2.1 Détermination de la concentration d'AO à utiliser pour la réparation de plaies des MDCK

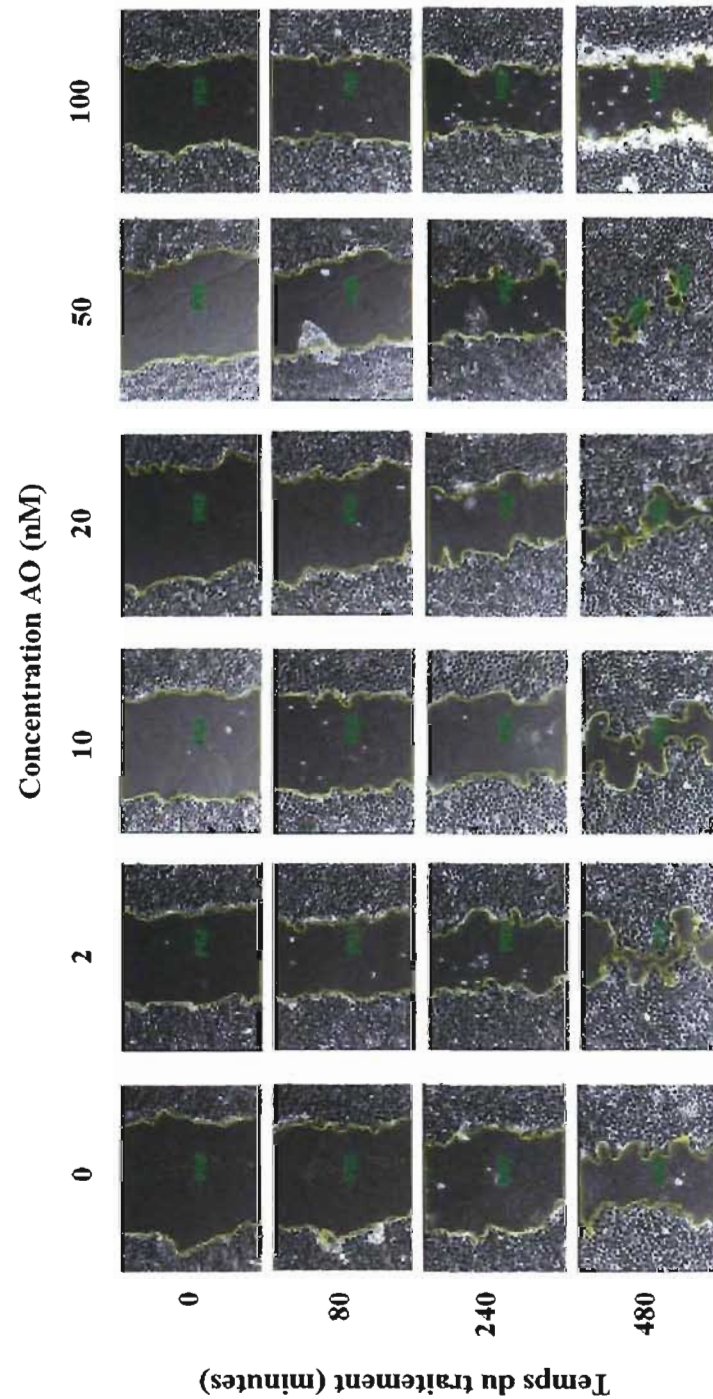
Puisque l'AO est cytotoxique à certaines concentrations et que la technique de réparation de plaies s'effectue sur plusieurs heures, il a tout d'abord fallu déterminer quelle concentration utiliser sur les cellules en culture. Pour ce faire, différentes concentrations d'AO (2, 10, 20, 50 et 100 nM) ont été appliquées sur des cellules MDCK en culture qui avaient subi une plaie. La fermeture de la plaie, en fonction du temps, est suivie par visionnement sous microscope optique. La concentration recherchée est celle qui donne les meilleurs résultats sans provoquer de mortalité cellulaire, tout en s'approchant des doses utilisées dans la littérature.

Comme illustré à la figure 3.10, les effets de l'AO apparaissent dès 80 minutes, et se poursuivent jusqu'à la fermeture de la plaie, à 480 minutes. La concentration d'AO qui provoque le plus d'effet le plus rapidement est celle de 50 nM. C'est donc cette concentration qui sera utilisée pour comparer la vitesse de fermeture de plaie de

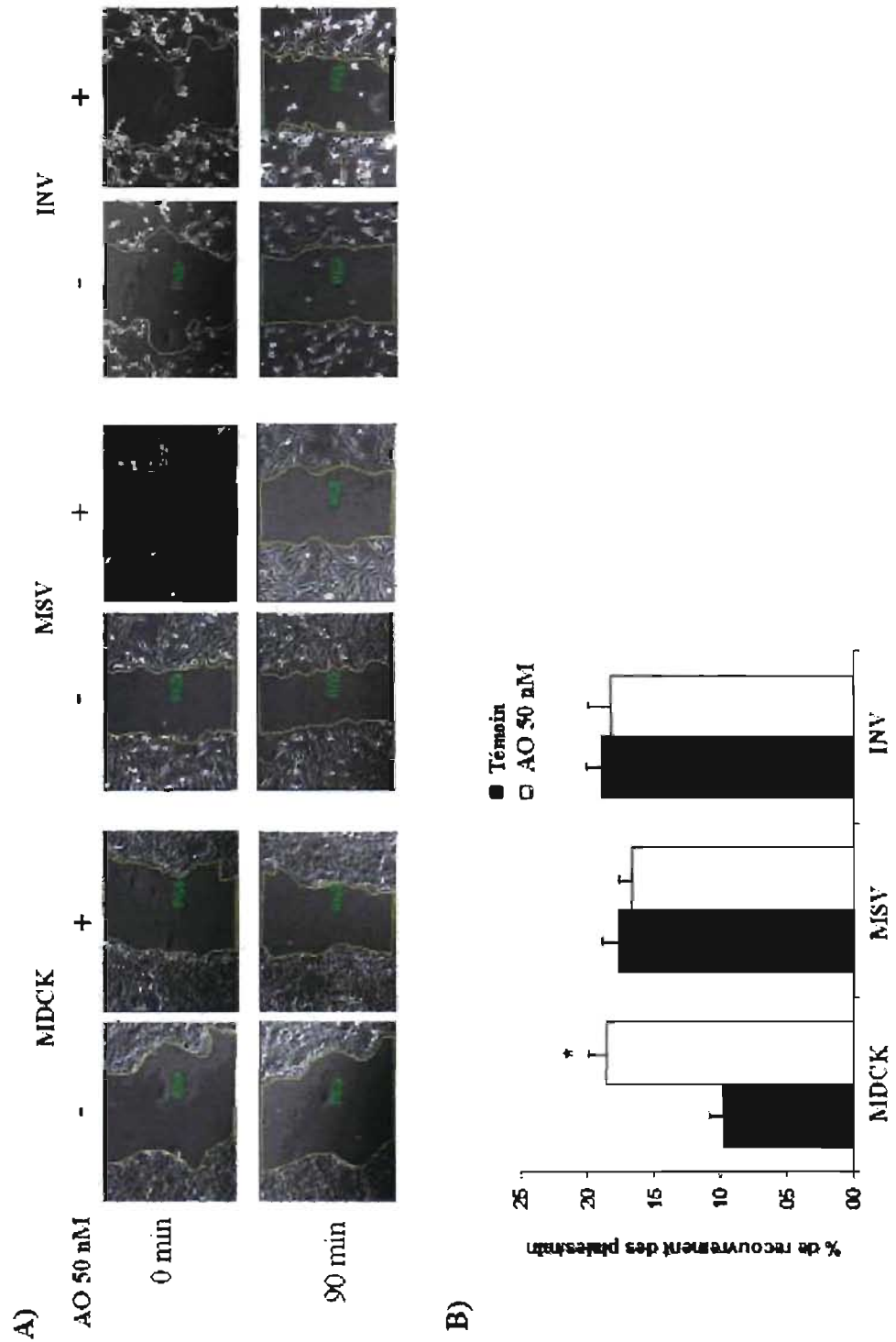
chaque lignée. La concentration de 100 nM est une dose cytotoxique puisque les cellules meurent avant de pouvoir refermer la plaie.

### 3.5.2.2 Effet de l'AO sur les trois lignées cellulaires

Les cellules MDCK, MSV et INV ont séparément été incubées 90 minutes avec ou sans AO à une concentration de 50 nM. À la figure 3.11 A), l'AO augmente la surface de plaie réparée uniquement pour les MDCK. En B) se trouve la représentation graphique des images en microscopie optique, en pourcentage de plaie recouverte par minute. Il est possible d'y constater que la vitesse (% de recouvrement de la plaie/minute) est augmentée par l'AO chez les cellules MDCK, égalant ainsi les vitesses des deux autres lignées, avec ou sans AO.



**Figure 3. 10 : Réparation de plaie par des cellules MDCK en présence de concentrations croissantes d'AO.** Pour chaque concentration d'AO (0, 2, 10, 20, 50 et 100 nM) dans le milieu DMEM-Hepes-FBS, une photo en microscopie optique de la plaie a été prise au temps 0, et ensuite après 80, 240 et 480 minutes d'incubation. Des repères sur la surface externe du Pétri permettent de photographier la même plaie, au même endroit.



**Figure 3. 11 : Effet de l'AO sur la réparation de plaies chez les trois lignées cellulaires.** A) Les trois lignées cellulaires ont été incubées en absence ou en présence d'AO 50 nM. Une photographie de la plaie a été prise au temps 0 et après 90 minutes d'incubation en absence de CO<sub>2</sub> (milieu DMEM-HEPES-FBS). B) Représentation graphique de la réparation de plaie, exprimée en pourcentage de plaie recouverte par minute. n = 3, \* p = 0.001.

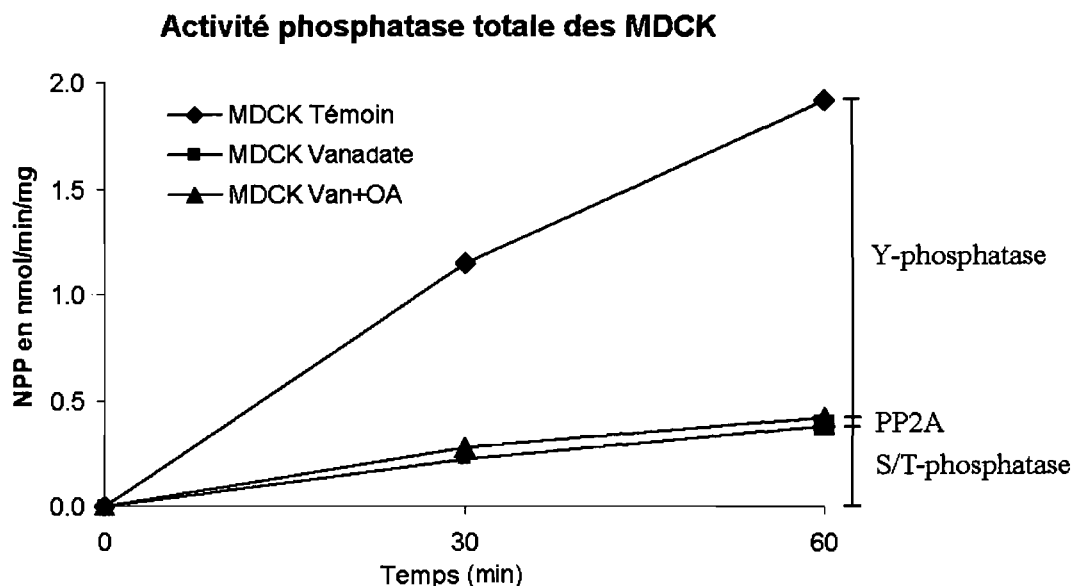
### 3.6 Comparaison de l'activité phosphatase de PP2A entre les cellules MDCK, MSV et INV

Afin de déterminer si PP2A présente une activité phosphatase perturbée ou réduite chez les cellules MSV et INV, qui de ce fait pourrait expliquer l'activation constitutive de MEK1/2, nous avons entrepris de la mesurer dans les trois lignées.

#### 3.6.1 Dosage de l'activité phosphatase totale des MDCK

En premier lieu, l'activité phosphatase totale des cellules MDCK a été mesurée, c'est-à-dire en nous servant d'homogénats totaux comme source d'enzymes. L'utilisation d'un inhibiteur non-spécifique des phosphatases à tyrosines (sodium orthovanadate,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ : vanadate) nous permet d'évaluer la contribution de toutes les phosphatases à tyrosines dans l'activité phosphatase totale des MDCK, puisque seule subsiste la portion due aux phosphatases à sérine/thréonine. Comme observé dans la littérature, les phosphatases à tyrosines sont responsables d'environ 80% de l'activité phosphatase totale (13) (trait avec carrés à la figure 3.12).

Par la suite, une combinaison de vanadate et d'un inhibiteur spécifique de PP2A, l'AO, permet d'observer quel est l'apport de PP2A dans l'activité sérine/thréonine phosphatase. L'inhibition de cette seule phosphatase (PP2A) par l'AO ne donne pas de différence significative (trait avec triangle), étant donné que cet essai est réalisé sur des homogénats totaux. En effet, l'activité phosphatase de PP2A seule passe inaperçue parmi toutes les autres sérine/thréonine-phosphatases.



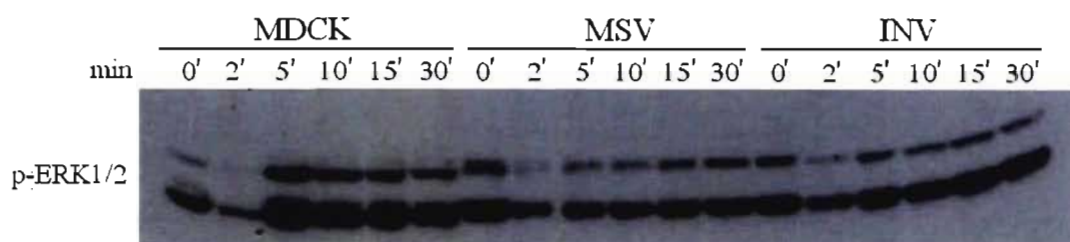
**Figure 3. 12 : Activité phosphatase totale des cellules MDCK.** L'activité phosphatase est mesurée par l'apparition du NPP après la déphosphorylation du substrat non-spécifique pNPP. En condition témoin (losanges), l'activité des phosphatases est maximale. Celle-ci diminue avec une incubation préalable de 30 min au sodium orthovanadate 10  $\mu$ M (carrés), et au sodium orthovanadate 10  $\mu$ M + AO 50 nM (triangles).

### 3.6.2 Suivi en fonction du temps de l'effet du TPA sur la phosphorylation de ERK1/2

Avant de procéder aux essais d'activité phosphatase sur PP2A purifiée (immunoprécipitée à partir de nos homogénats totaux), il fallait tout d'abord déterminer les conditions optimales dans lesquelles PP2A présenterait une forte activité. En effet, pour permettre la mesure de l'activité phosphatase de PP2A suite à une immunoprécipitation, l'obtention de conditions où l'enzyme demeure active est essentielle.

Pour ce faire, des incubations de différentes durées avec le TPA ont été effectuées sur les trois lignées. En vérifiant par la suite à quel moment le degré de phosphorylation de ERK1/2 commence à diminuer, il sera possible de déterminer le temps idéal de stimulation au TPA pour obtenir une activité mesurable de PP2A. En effet, la diminution du signal de p-ERK1/2 nous indique que PP2A est activée et déphosphoryle (donc désactive) la voie Ras-ERK.

La figure 3.13 montre que chez les MDCK, le signal de p-ERK1/2 est maximal à 5 minutes, et commence à diminuer à 10 minutes. Le signal demeure constant chez les MSV et INV, excluant la piste de 2 minutes (artéfact). Cette condition de deux minutes de traitement, pour les trois lignées cellulaires, semble ne pas avoir fonctionné.



**Figure 3. 13 : Variation du degré de phosphorylation de ERK1/2 en fonction du temps, suite à une stimulation au TPA.** Les trois lignées cellulaires ont été traitées au TPA 160 nM pendant 0, 2, 5, 10, 15 et 30 minutes avant la lyse cellulaire.

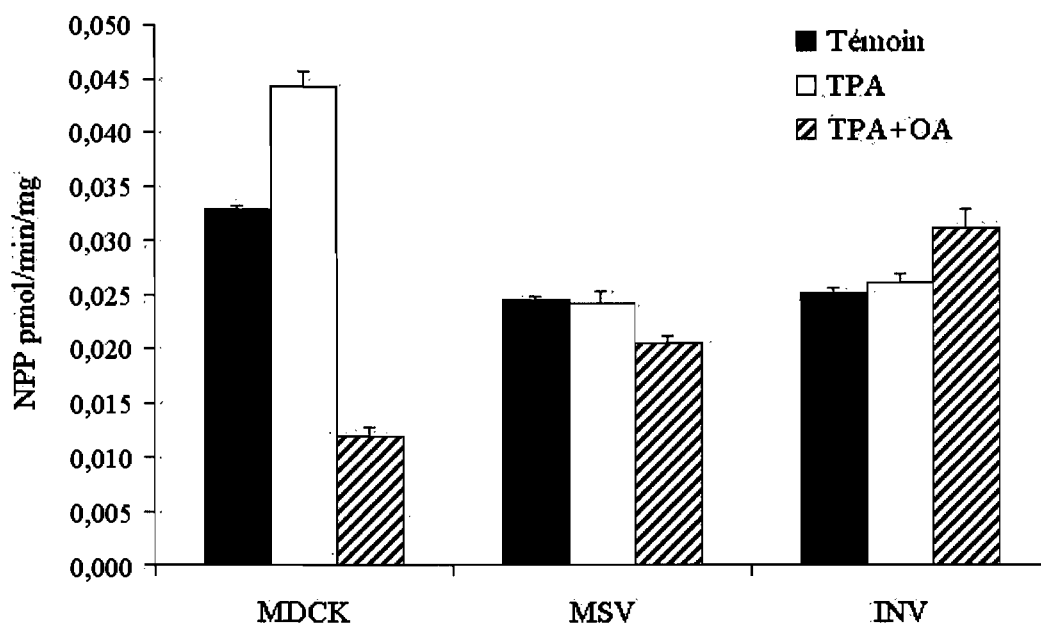
### 3.6.3 Efficacité du tampon imidazole à immunoprécipiter PP2A

Puisque le tampon de lyse imidazole utilisé (pour lyser les cellules et immunoprécipiter PP2A) en vue de l'essai phosphatase est différent de celui utilisé normalement, il a fallu vérifier l'efficacité de ce tampon à immunoprécipiter PP2A. En faisant une immunoprécipitation en parallèle avec les deux tampons, le tampon imidazole est apte à immunoprécipiter PP2A, aussi efficacement que le tampon d'immunoprécipitation normalement utilisé (figure non-montrée).

### 3.6.4 Dosage de l'activité phosphatase de PP2A

L'immunoprécipitation de PP2A, précédant l'essai enzymatique, nous permet d'observer spécifiquement son activité phosphatase. Cet essai est inspiré du protocole de Upstate® Ser/Thr Phosphatase Assay Kit 1 #17-127 (se référer à la section Matériels et Méthodes pour les modifications).

En comparant l'activité phosphatase basale de PP2A (en conditions de jeûne cellulaire) dans les trois lignées, nous constatons que cette activité chez les cellules MDCK est plus forte que chez les MSV et INV (figure 3.14, bandes noires). C'est cette activité de base de PP2A chez les cellules MDCK qui maintient MEK1/2 sous sa forme déphosphorylée. Lorsque les cellules sont stimulées pendant 10 minutes avec un activateur de la PKC, le TPA (qui stimule ensuite Raf-1, MEK et ERK), nous voyons que l'activité phosphatase de PP2A augmente considérablement chez les cellules MDCK, ce qui a pour effet de freiner et de moduler l'activation de MEK1/2 provoquée par le TPA. Au contraire, chez les cellules MSV et INV, la stimulation au TPA n'a pas d'effet sur l'activité de PP2A (bandes claires). Le traitement des cellules à l'AO pendant 30 minutes avant la stimulation de 15 minutes au TPA, inhibe fortement l'activité de PP2A chez les cellules MDCK, ainsi que son activation par le TPA. Cette forte inhibition n'est pas observée chez les cellules MSV et INV (bandes rayées).



**Figure 3. 14 : Activité phosphatase de PP2A immunoprécipitée.** Immunoprécipitats par un anticorps  $\alpha$ -PP2A à partir de cellules MDCK, MSV et INV incubées 15 minutes en présence de DMSO (témoin), de TPA 160 nM ou d'un mélange de TPA + AO 50 nM (30 minutes de prétraitement). L'activité est mesurée par l'apparition du NPP, exprimée en pmol par minute par mg de protéines (pmol/min/mg).  $n = 2$ , Les histogrammes représentent la moyenne des deux expériences et afin de donner un aperçu de la variation expérimentale, les barres d'erreur représentent le pourcentage de la variation par rapport à la moyenne.



## **4. Discussion**

Le projet discuté dans ce mémoire de maîtrise avait pour but d'expliquer l'activation constitutive de la voie des MAPK dans les cellules MSV et INV, de même que de proposer une explication pour ce phénomène.

#### **4.1 Implication de MEK1/2 dans l'activation constitutive des MAPK chez les cellules MSV et INV.**

##### *4.1.1 Le PD98059 et le U0126 incriminent MEK1/2*

Quelques années avant mon arrivée dans le laboratoire du Dr. Josette Noël, en 2000-2002, des expériences ont été menées sur l'activation de différentes voies de signalisation dans les trois lignées cellulaires utilisées, les cellules MDCK, MSV et INV. Ces observations ont mené à l'élaboration du présent projet de recherche.

Les résultats présentés à la section 3.1 indiquent que la voie des MAPK Ras-ERK est activée de façon constitutive chez les cellules MSV et les INV, mais non chez les cellules MDCK (figure 3.1 A). En effet, il était étonnant de constater que MEK1/2 et ERK1/2 sont phosphorylées (donc activées) chez les cellules MSV et INV en absence de facteurs de croissance. Par contre, le profil d'activation de cette cascade de signalisation chez les cellules MDCK est tout-à-fait normal, c'est-à-dire que l'activation est dépendante de l'ajout de sérum.

Pour poursuivre l'investigation, deux inhibiteurs spécifiques de la voie Ras-ERK, le PD98059 et le U0126, ont été utilisés. Le choix de ces deux inhibiteurs s'est imposé puisqu'ils agissent tous deux sur MEK1/2, membres de la voie Ras-ERK, mais diffèrent quand à leur mode d'inhibition. Le PD98059 empêche MEK1/2 de se faire activer par Raf-1, tandis que le U0126 empêche MEK1/2, une fois activée, d'activer son substrat ERK1/2 par phosphorylation. Le PD98059 agit sur MEK1/2 en bloquant l'activation en amont, et le U0126 agit sur MEK1/2 en bloquant l'activation en aval. Autrement dit, en ciblant MEK1/2 avec l'utilisation séparée de ces deux inhibiteurs, nous croyons qu'il serait immédiatement possible de déterminer si le problème des cellules MSV et INV (activation constitutive de ERK1/2) est dû à MEK1/2. En effet, si

le PD98059 ainsi que le U0126 sont capables d'inhiber la phosphorylation de ERK1/2, cela veut dire que l'activation constitutive provient d'une molécule en amont de MEK1/2. Si à l'inverse aucun des deux n'est apte à empêcher la phosphorylation de ERK1/2, cela correspond à une activation constitutive de ERK1/2 elle-même. Le résultat de cette expérience est des plus intéressants; chez les cellules MSV et INV, le PD98059 est incapable d'inhiber la phosphorylation de ERK1/2, tandis que le U0126 l'inhibe. Chez les cellules MDCK, les deux inhibiteurs réussissent à empêcher la phosphorylation de ERK1/2 (figure 3.1 B).

Puisque le PD98059 n'inhibe pas ERK1/2 chez les cellules MSV et INV, ces résultats peuvent être expliqués de deux façons : soit MEK1/2 est constitutivement active, soit c'est ERK1/2 qui l'est. En effet, en empêchant MEK1/2 de se faire activer en amont et en constatant tout de même une activation de ERK1/2, nous pouvons rayer de la liste des suspects tous ceux qui se trouvent en amont de MEK1/2, c'est-à-dire Ras, Raf-1 et les récepteurs des facteurs de croissance. Si l'un d'eux était responsable, cet inhibiteur serait capable d'empêcher la phosphorylation de ERK1/2. L'utilisation du U0126 chez les cellules MSV et INV entraîne une inhibition de la phosphorylation de ERK1/2. Comme mentionné plus haut, cet inhibiteur empêche MEK1/2 d'activer ERK1/2. Comme il y a inhibition, le problème n'est pas dû à ERK1/2. Donc, l'activation constitutive de la voie Ras-ERK chez les cellules MSV et INV provient de MEK1/2.

#### *4.1.2 La boucle d'activation autocrine des INV n'est pas impliquée*

Le récepteur c-Met des cellules INV étant activé de façon constitutive par une boucle autocrine (sécrétion de HGF) (125), il fallait vérifier si l'activation constitutive des MAPK ne pouvait pas être due, du moins pour cette lignée, à celle-ci puisque la voie ras-ERK est activée par l'activation de c-Met (102). La culture des cellules INV avec un anticorps  $\alpha$ -HGF présent dans le milieu de culture séquestre le HGF au fur et à mesure de sa sécrétion, l'empêchant ainsi d'activer subséquemment son récepteur, c-Met. La figure 3.1 C montre cet effet. La phosphorylation de c-Met (première bande) est diminuée lorsque les cellules sont cultivées en présence d' $\alpha$ -HGF. Par contre,

MEK1/2 et ERK1/2 demeurent phosphorylées, et au même degré. Cette boucle autocrine d'activation du récepteur c-Met chez les cellules INV ne peut donc pas expliquer l'activation constitutive de ERK1/2.

## **4.2 Rôle de MEK1/2 dans l'activation constitutive de la voie Ras-ERK chez les cellules MSV et INV**

### *4.2.1 Les isoformes MEK1 et MEK2*

La protéine MEK a deux isoformes, MEK1 et MEK2, qui sont à 85% identiques quant à leurs séquences d'ARN messager, et peuvent être régulées d'une manière différente dans certains types cellulaires (135). Il fallait donc vérifier le degré d'expression des deux isoformes dans les trois lignées cellulaires; MDCK, MSV et INV.

L'utilisation d'un anticorps non-discriminant, qui reconnaît MEK1 et MEK2 (peu importe l'isoforme) fournit indistinctement de l'information sur MEK. Quoiqu'utiles selon le protocole choisi, pour déterminer l'implication d'une isoforme plutôt que l'autre dans l'activation constitutive de MEK chez les cellules MSV et INV, des anticorps spécifiques à chaque isoforme ont été utilisés. Ainsi, les cellules MSV et les INV présentent une expression plus faible de MEK1, tandis que l'expression de MEK2 demeure relativement constante dans toutes les lignées, avec quelques variations non significatives. Pour augmenter la validité des résultats, une deuxième souche de MDCK a été utilisée pour cette expérience, la souche MDCKII. Ces variations d'expression basale de MEK1 à travers nos lignées jettent le doute sur une implication plus importante de cette isoforme. La figure 3.2 montre clairement que MEK1 est exprimée plus faiblement chez les cellules MSV et INV. Pour vérifier si de même, l'activation de MEK1 était diminuée dans ces deux lignées, une immunoprécipitation avec l'anticorps  $\alpha$ -MEK1 a été effectuée dans les trois lignées cellulaires, suivie d'un immunobuvardage avec un anticorps phospho-spécifique pour MEK1/2. L'impossibilité de se procurer un anticorps directement dirigé sur la forme phosphorylée de MEK1 ( $\alpha$ -p-MEK1) a imposé cette façon de faire. De cette manière, l'utilisation de l' $\alpha$ -MEK1/2 ne révèle que MEK1 phosphorylée puisque seule cette

isoforme est immunoprécipitée. La figure 3.3 montre que dans les lignées MSV et INV, MEK1 est phosphorylée sans que les cellules aient été stimulées, tandis que les cellules MDCK ne présentent pas de phosphorylation pour MEK1 en conditions non stimulantes. Ce résultat confirme que MEK1, dans les cellules MSV et les INV, est phosphorylée en absence de facteurs de croissance : MEK1 peut donc être considérée comme étant constitutivement activée.

#### 4.2.2 *Raf-1 n'est pas responsable*

Pour s'assurer du fait que l'activateur de MEK1/2, Raf-1, ne soit pas impliqué dans l'activation constitutive de ERK1/2, il a fallu compléter les résultats dégagés des expériences d'inhibition en vérifiant sa capacité à être activé et inhibé. En fait, il fallait s'assurer du bon fonctionnement de Raf-1 dans les trois lignées cellulaires à l'étude. Pour ce faire, les niveaux de phosphorylation de deux résidus sérines, l'une activatrice et l'autre inhibitrice, ont été observés avec ou sans stimulation au TPA ou au FBS. Le but de la figure 3.4 étant de montrer l'effet d'un activateur de la voie Ras-ERK sur la phosphorylation de Raf-1, l'utilisation du TPA ou du FBS est appropriée. En effet, le TPA est un activateur direct de la PKC qui elle-même active directement la voie Ras-ERK, tandis que le FBS active nombre de voies de signalisation via les RTK et les récepteurs couplés aux protéines G, qui mènent tous deux à l'activation de la voie Ras-ERK. La phosphorylation de la sérine en position 338 de Raf-1, dont le rôle est détaillé dans la section 1.4.3.1 de l'introduction, reflète le degré d'activation de Raf-1. À la figure 3.4 A, en absence de stimulation (par l'activateur des MAPK, TPA), l'immunobuvardage Western ne révèle aucune phosphorylation de la sérine 338 pour les cellules MSV et INV, mais révèle une légère bande chez les cellules MDCK, mais qui demeure insignifiante. Par contre, avec une stimulation de 10 minutes au TPA dans le milieu de culture, l'apparition d'une bande de forte intensité, dans les trois lignées cellulaires, démontre clairement l'habileté de Raf-1 à se faire activer par un stimulant connu des MAPK *via* la voie PLC- $\gamma$ -PKC $\alpha$  (90). De la même manière mais à l'inverse, la phosphorylation de la sérine 259 reflète l'inhibition de Raf-1. L'anticorps utilisé révèle premièrement une bande (vers 50 kDa) non-spécifique dans toutes les lignées

(prévue par le fabricant), tandis que la bande correspondant à Raf-1 est révélée à 65 kDa. C'est la raison pour laquelle deux bandes apparaissent pour toutes les lignées. Lorsque Raf-1 est phosphorylé sur la sérine 259, la bande de 65 kDa se décale vers le haut, à un poids moléculaire apparent plus élevé. C'est cette différence de poids moléculaire qui rend compte de la phosphorylation de la sérine 259. Pour les cellules MDCK, MSV et INV, le même patron de bandes est observé; une bande à 65 kDa pour la condition témoin et une bande de même intensité mais un peu plus élevée dans la condition avec stimulation. Puisque les trois lignées cellulaires présentent le même patron de phosphorylation, nous concluons que Raf-1 réagit de la même façon suite à une stimulation, c'est-à-dire en s'inhibant (par la PKA) par une phosphorylation à la sérine en position 259 de façon à freiner la stimulation de la voie ras-ERK.

Ces résultats sur la phosphorylation de Raf-1 sur deux résidus sérine régulateurs de son activité, les résidus sérine 259 et 338, démontrent par leurs patrons identiques qu'à travers les trois lignées cellulaires à l'étude, ce membre de la voie des MAPK n'est pas responsable de l'activation constitutive de MEK1/2 chez les cellules INV.

#### *4.2.3 L'activation constitutive de MEK1/2 n'est pas due à une ou des mutations activatrices*

De nombreux cancers (25%) (17) originent d'une mutation dans la protéine Ras, la rendant inapte à se désactiver, et activent ainsi constitutivement la voie Ras-ERK. Par contre, aucune mutation sur MEK1/2 n'a été identifiée à ce jour parmi les lignées cellulaires tumorales autant établies que primaires, humaines ou autres. Bien que peu probable, la possibilité de mutations activatrices sur MEK1 ou MEK2 n'a pas été écartée et a été vérifiée.

La plus grande difficulté de cette expérience s'est présentée lors de la construction des oligonucléotides nous permettant d'amplifier séparément les isoformes MEK1 et MEK2 en vue du séquençage subséquent. En effet, MEK1 et MEK2 partagent pratiquement la même séquence nucléotidique. Il fallait donc choisir les régions d'appariement des oligonucléotides aux séquences d'ARNm publiées dans les régions différentes entre les deux isoformes, tout en permettant d'englober toute la séquence

codante. De plus, la séquence de *Canis familiaris* étant inconnue au moment de l'expérience, il a fallu aussi se fier aux régions communes entre mammifères (d'après les séquences de *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* et *Homo sapiens*) pour s'assurer de l'attachement des oligonucléotides à la séquence canine. Le séquençage complet de l'ARN messager de MEK1, et par la suite de MEK2, a été fait dans chacune des 3 lignées étudiées; MDCK I et II, MSV et INV. Comme les séquences nucléotidiques dites « normales » de MEK1 et de MEK2 n'étaient pas connues, les séquences obtenues des lignées MDCK I et II ont été considérées de type sauvage, puisqu'il n'y a pas d'activation constitutive de MEK1/2 dans ces lignées. Donc, en comparant les séquences de MEK1 et MEK2 issues des cellules MDCK avec celles des cellules MSV et INV, il devenait possible de déceler l'apparition d'une mutation de quelque ordre que ce soit dans ces deux dernières lignées.

Après avoir aligné toutes les séquences (par le programme BioEdit) obtenues du séquençage de MEK1 et MEK2, aucune mutation n'a été décelée ni chez les cellules MSV, ni chez les cellules INV. La possibilité d'une mutation activatrice dans la séquence de MEK1 et/ou de MEK2 a alors été écartée. Par contre, au moment de la complétion de cette portion du projet, une séquence « prédite » pour MEK1 de *Canis familiaris* a été publiée, sous le numéro de référence NW\_139907. Une comparaison de séquences détaillée nous a permis de mettre à jour d'importantes différences dans la séquence dite « prédite » et celle que nous avons obtenue : une insertion de 62 et une délétion de 15 nucléotides dans la région 5' de la séquence prédite par rapport à la nôtre (telles qu'illustrées à la figure 3.5). Le séquençage intégral de l'ADN complémentaire de ces deux isoformes chez *Canis familiaris* n'ayant jamais été fait, nous avons pu publier ces séquences dans la base de données de NCBI, sous les numéros de références DQ489530 et DQ489531, respectivement pour MEK1 et MEK2. Ceci a permis de corriger les erreurs de la séquence « prédite » de MEK1, et de rendre disponible la séquence canine de MEK2 et de contribuer à l'identification de l'emplacement des différents domaines de ces protéines.

#### **4.3 Rôle de PP2A dans l'activation constitutive de la voie Ras-ERK chez les cellules MSV et INV**

#### *4.3.1 La sous-unité /A de PP2A est moins exprimée chez les MSV et INV*

Les résultats précédents mettent en lumière plusieurs faits importants; a) l'activation constitutive de la voie Ras-ERK est observée chez les cellules MSV et les cellules INV, b) celle-ci n'est pas causée par une boucle d'activation autocrine chez les cellules INV, c) les expériences avec les inhibiteurs nous proposent MEK1/2 comme étant responsables, et d) le module Raf-1 répond normalement à une activation dans les trois lignées. Par contre, e) aucune mutation activatrice n'a été décelée dans la séquence de MEK1 et/ou de MEK2. L'hypothèse d'un défaut de régulation sur MEK1/2 fut alors énoncée.

Comme expliqué dans la section 1.5 de l'introduction, un des rôles majeurs de la sérine/thréonine phosphatase PP2A est de déphosphoryler les résidus sérines en position 218 et 222 de MEK1/2, en vue d'empêcher la pérennité de son activation. En effet, MEK1/2 n'est activée que transitoirement (environ cinq minutes (3)) avant d'être déphosphorylée par PP2A. Il a déjà été démontré que des mutations présentes dans une ou plusieurs des trois sous-unités de PP2A étaient aptes à elles seules à provoquer la transformation de multiples types cellulaires, proposant PP2A comme suppresseur de tumeur (97), comme ce pourrait d'ailleurs être le cas pour les cellules MSV et INV. La vérification du niveau d'expression des différentes sous-unités de PP2A s'est avérée être le point de départ de l'investigation de cette nouvelle hypothèse. La figure 3.6 montre qu'il y a une différence significative d'expression de la sous-unité /A, mais non de la sous-unité /C, de PP2A chez les deux lignées transformées, MSV et INV. Malheureusement, la sous-unité /B responsable de la localisation cellulaire de MEK1/2 n'étant pas connue, couplée à la quantité faramineuse de variants transcriptionnels de cette isoforme, il nous a été impossible de choisir parmi la panoplie de sous-unité /B un anticorps approprié.

Une expression plus faible de la sous-unité structurale de PP2A, la sous-unité /A, qui est essentielle au bon fonctionnement de celle-ci porte à croire qu'il y aurait effectivement un défaut, ou à tout le moins une perturbation de ses fonctions. En effet, même si l'expression de la sous-unité catalytique /C reste inchangée à travers les trois



lignées, le fait qu'il y ait moins de sous-unité /A disponible pour s'y associer aura comme conséquence de diminuer la quantité totale nette d'holoenzyme complète et fonctionnelle. Cette observation alimente le plaidoyer selon lequel PP2A pourrait avoir un rôle majeur dans le défaut de régulation de MEK1/2 chez les cellules MSV et INV. Bien sûr, une autre cause pourrait être responsable de la diminution de la quantité de PP2A fonctionnelle, comme la mutation dans une des ses sous-unités, comme mentionné plus haut, de même que la séquestration d'une de ses sous-unités par une protéine provenant de la transformation virale (voir la section 1.6 de l'introduction).

Par ailleurs, la figure 3.7 B indique pour la première fois qu'il y a interaction entre PP2A et MEK1/MEK2 dans les cellules MDCK, MSV et INV. Il nous fallait faire cette démonstration avant de poursuivre nos investigations puisqu'aucune expérience de la sorte n'avait été réalisée chez les cellules MDCK. Auparavant, l'association PP2A-MEK1/2 était connue (42), mais aucune preuve d'une interaction n'avait jamais été faite. Une immunoprécipitation réalisée avec un anticorps dirigé contre PP2A/A est apte à capturer MEK1 (et MEK2), la preuve d'une interaction étroite entre PP2A et MEK1 (et MEK2) est donc établie. Il est d'ailleurs depuis tout récemment connu que PP2A s'associe directement à MEK dans un contexte de déphosphorylation (avec ERK et p90RSK) dans des cellules de cortex cérébral chez le rat (75). Dans cet article, il est de plus démontré que l'augmentation du niveau de phosphorylation de MEK, ERK et p90RSK s'accompagne d'une diminution de l'activité de PP2A. Tout comme nous, ces auteurs utilisent des co-immunoprécipitations et démontrent que l'augmentation de l'activité de ERK1/2 suite à l'inhibition de PP2A n'était pas due à une augmentation de l'activité de Raf-1. Le fait que nous immunoprécipitions aussi la sous-unité /C confirme la validité de ces résultats. Il a également été possible de mettre en lumière l'interaction entre PP2A et MEK1/MEK2 en faisant l'immunoprécipitation inverse, c'est-à-dire en utilisant un anticorps dirigé contre MEK1 spécifiquement, et en constatant que PP2A/A et PP2A/C étaient co-immunoprécipitées. Il en est allé de même avec MEK2. Cette réciproque des immunoprécipitations, montrée à la figure 3.8, confirme hors de tout doute qu'il existe un complexe MEK1/2-PP2A dans les cellules MDCK, MSV et INV.

Il aurait bien sûr été intéressant de pouvoir déterminer laquelle (ou lesquelles) des multiples isoformes de la sous-unité /B est présente dans ce complexe MEK1/2-

PP2A, surtout lorsque nous savons que des mutations dans cette sous-unité ont été détectées dans certains cancers (67, 111, 117, 129). Comme exposé à la section 1.5.1, la sous-unité régulatrice /B est responsable de la localisation cellulaire de l'holoenzyme PP2A, mais l'isoforme responsable de l'interaction avec MEK1/2 reste à ce jour malheureusement inconnue.

En plus de ce rôle que PP2A exerce sur MEK1/2, il sera intéressant dans des études ultérieures de considérer l'effet d'une diminution de l'expression de la sous-unité /A de PP2A sur ses autres cibles cellulaires. Dans les expériences que nous avons réalisées, l'état d'activation de Raf-1, une autre cible de PP2A dans la voie Ras-ERK, demeure le même dans les trois lignées cellulaires étudiées. La diminution de la sous-unité /A de PP2A ne semble donc pas avoir d'influence sur cette cible. Par contre, ce qu'il advient des interactions entre PP2A et ses cibles dans le cycle cellulaire, et donc de leur régulation, demeure inconnu.

#### **4.4 L'activité phosphatase déficiente de PP2A comme cause de l'activation constitutive de MEK1/2 chez les MSV et INV**

##### *4.4.1 Incapacité de l'AO à inhiber PP2A chez les cellules MSV et INV*

La section précédente a mis en lumière le fait que la sous-unité /A de PP2A est moins présente chez les MSV et INV en comparaison avec les MDCK (figure 3.6 A). Il a donc fallu répondre à une importante question: à savoir si cette diminution d'expression de PP2A/A entraîne une diminution de l'activité de PP2A. Cette question a été abordée de plusieurs manières. Premièrement, il fallait vérifier l'effet qu'avait l'AO sur PP2A. L'AO, utilisé à une concentration précise, est un inhibiteur spécifique de PP2A principalement, de même que faiblement de PP1. Par contre, ce n'est que PP2A qui est responsable de la déphosphorylation de PP2A, PP1 étant associé à la régulation du cycle cellulaire (108). En utilisant cet inhibiteur dans les trois lignées, il devenait possible de vérifier si chez les MDCK une inhibition de PP2A entraîne une augmentation de la phosphorylation de MEK1/2, et si chez les cellules MSV et INV cette inhibition augmente encore plus cette phosphorylation. En effet, en enlevant la

répression qu'exerce PP2A sur la phosphorylation de MEK1/2, une augmentation significative de ce niveau de phosphorylation devrait être observé. La figure 3.9 montre les résultats obtenus suite au traitement à l'AO sur les cellules MDCK, MSV et INV. Bien sûr, quoique convaincante, l'interprétation de ces résultats doit se faire de façon prudente, l'expérience n'ayant été réalisée qu'une seule fois. Chez les MDCK, une augmentation du niveau de phosphorylation de MEK1/2 de près du double est observée suite au traitement à l'AO. Cela signifie que lorsque l'on inhibe l'activité phosphatase de PP2A, il y a plus de protéines MEK1/2 qui sont phosphorylées. À l'opposé, le traitement à l'AO des cellules MSV et INV n'a aucun effet sur la phosphorylation de MEK1/2. Autrement dit, l'inhibition de PP2A ne permet pas d'augmenter le niveau déjà élevé de phosphorylation de MEK1/2 chez ces deux lignées. Donc, l'inhibition de PP2A chez les cellules MDCK augmente le degré de phosphorylation de MEK1/2 au même niveau que le niveau de base chez les cellules MSV et INV, niveau qui reste inchangé dans ces deux lignées suite au traitement à l'AO.

Nous savons qu'il est possible d'augmenter la phosphorylation de MEK1/2 en inhibant PP2A, c'est ce qui arrive chez les MDCK, et puisque la phosphorylation (déjà élevée) chez les cellules MSV et INV n'augmente pas encore plus, il est raisonnable de penser que c'est parce que l'activité de PP2A dans ces deux lignées est diminuée. En effet, si l'activité de PP2A avait été normale chez les MSV et INV, et que le niveau de phosphorylation élevé de MEK1/2 avait une cause toute autre, son inhibition par l'AO aurait inévitablement augmenté la phosphorylation de MEK1/2.

De plus, nous savons que l'AO se lie sur la sous-unité /C de PP2A (139) pour inhiber son activité, et que puisque l'expression de cette sous-unité est diminuée dans les cellules MSV et INV par rapport aux cellules MDCK, cela pourrait expliquer, du moins en partie, l'insensibilité des cellules MSV et INV à l'AO.

#### *4.4.2 L'AO augmente la réparation de plaies des cellules MDCK, mais non des MSV et INV*

Il est depuis longtemps connu que la voie des MAPK est impliquée dans la motilité et la migration cellulaire (58, 79, 104). Dans les trois lignées cellulaires

utilisées au laboratoire, le niveau de motilité est faible pour les cellules MDCK, moyennement élevé pour les cellules MSV, et très important pour les cellules INV (125). En effet, les cellules MSV et particulièrement les INV sont spontanément motiles. Il est alors intéressant d'observer ce qu'un traitement à l'AO aurait comme effet sur la motilité des trois lignées. L'expérience de réparation de plaie (*wound healing assay*) permet d'évaluer le potentiel de migration de cellules données en observant la vitesse à laquelle les cellules vont venir refermer une « plaie » produite par un embout de pipette dans un plat de culture cellulaire (voir section 2.8 de la section Matériel et Méthodes pour plus de plus amples détails sur cette technique). À la figure 3.10, une dose croissante d'AO, de 0 à 100 nM, a été appliquée à des cellules MDCK, et la réparation de la plaie est observée à différents temps, de 0 à 480 minutes. La colonne de 0 nM d'AO (véhicule = DMSO) correspond à la condition contrôle. Après 480 minutes, 53% de la plaie initiale est recouverte de cellules. Les cellules MDCK sont donc aptes, sans stimulation, à migrer suite à la formation d'une plaie.

Il fallait par la suite déterminer si un traitement à l'AO allait augmenter cette capacité naturelle de migration. Par le fait même, il fallait déterminer quelle concentration d'AO utiliser pour avoir le maximum d'effet sans provoquer de cytotoxicité. Des doses croissantes d'AO ont donc été appliquées. Avec une concentration d'AO de 50 nM, la plaie est pratiquement refermée après 480 minutes, et cet effet d'augmentation de migration est observable dès 80 minutes. Les cellules MDCK présentent donc, suite à l'inhibition de PP2A par l'AO, une migration cellulaire accrue. Ce même traitement a par la suite été appliqué aux cellules MSV et INV, en comparaison aux MDCK. La figure 3.11 montre les résultats obtenus suite à ces traitements. La représentation graphique des captures visuelles est exprimée en pourcentage de recouvrement de la plaie par minute de traitement, à la section B) de cette même figure. Nous pouvons voir que le traitement à l'AO des cellules MDCK induit une augmentation de la vitesse de réparation de la plaie jusqu'à atteindre la vitesse des cellules MSV et INV non-traitées. De plus, le traitement à l'AO des MSV et INV ne permet pas d'augmenter encore plus cette vitesse; il n'y a aucune différence significative entre les conditions traitées et non-traitées de ces deux lignées.

L'AO, en inhibant PP2A, permet à la voie des MAPK de demeurer activée plus longtemps, permettant ainsi l'augmentation de la motilité cellulaire. Il a en effet été démontré qu'une activation soutenue de cette voie de signalisation menait à une motilité accrue (122). Ces résultats démontrent clairement qu'il est possible d'augmenter la motilité des cellules MDCK en inhibant PP2A (une diminution de l'activité de PP2A entraîne une augmentation de l'activité de MEK1/2), et mettent en lumière l'impossibilité de l'AO d'augmenter la motilité des cellules MSV et INV. À ce jour, nous savons que PP2A agit sur le cycle cellulaire et sur la voie Ras-ERK. PP2A a encore beaucoup de secrets à révéler et toutes ses cibles cellulaires ne sont pas encore connues, c'est pourquoi ces résultats portent à croire qu'il est possible d'influencer la motilité cellulaire par modulation de l'activité de PP2A. En effet, une étude a déjà démontré que l'AO pouvait induire une augmentation de la motilité (en réparation de plaie) et que celle-ci était concomitante à une élévation de l'activité de la voie Ras-ERK, sans toutefois faire mention de PP2A (99). L'hypothèse d'un défaut d'activité de PP2A chez les MSV et INV pour expliquer l'activation constitutive de MEK1/2 fait de plus en plus de sens. En effet, l'augmentation au même niveau que celui des MSV et INV de la phosphorylation de MEK1/2 chez les MDCK suite au traitement à l'AO, de même que l'augmentation de la motilité cellulaire sont autant d'indices solides nous faisant croire à un défaut d'activité de PP2A chez les MSV et INV. Pour raffiner ces interprétations, le traitement des cellules MDCK, MSV et INV avec les inhibiteurs de la voie Ras-ERK PD98058 et U0126 viendrait ajouter du poids à notre hypothèse. En effet, Wang *et al.* ont démontré que la voie Ras-ERK est effectivement impliquée dans la réparation de plaies en utilisant le U0126 (128). Par contre, ces expériences ont été réalisées dans un modèle cellulaire différent du nôtre.

#### 4.4.3 L'activité phosphatase totale des cellules MDCK

Les résultats précédents indiquent que PP2A a un défaut d'activité chez les cellules MSV et INV. Il fallait donc proposer une expérience pouvant mesurer l'activité phosphatase de PP2A. En s'inspirant de protocoles commerciaux établis (particulièrement du *Ser/Thr Phosphatase Assay Kit 1* de la compagnie Upstate®), un

protocole simplifié a été conçu en utilisant le substrat non-spécifique p-NPP (section 2.10.1 des « Matériel et Méthodes »). Deux inhibiteurs ont été utilisés, le  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  et l'AO. Le  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  est un inhibiteur non-spécifique des tyrosines phosphatases et l'AO, un inhibiteur spécifique de PP2A. Le vanadate fait chuter de près de 80% l'activité phosphatase totale du lysat, ceci nous indiquant donc que les autres types de phosphatases (sérine/thréonine, à spécificité double) contribuent ensemble pour seulement 20% de l'activité phosphatase totale mesurée. Le faible effet de l'AO, en présence de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , indique que la contribution de PP2A parmi toutes celles présentes dans le lysat total est indétectable. Cette dernière observation nous a obligé à immunoprécipiter PP2A, de façon à avoir une PP2A « pure », puis à mesurer l'activité phosphatase de celle-ci.

#### *4.4.4 L'activité phosphatase de PP2A est diminuée chez les cellules MSV et INV*

En vue de s'assurer d'avoir une activité maximale de PP2A lors de l'essai enzymatique avec PP2A immunoprécipitée, il fallait déterminer à quel moment suivant une activation de la voie des MAPK par le TPA l'activité phosphatase de PP2A était maximale. La figure 3.13 montre que chez les cellules MDCK, l'intensité du signal de p-ERK1/2 est à son maximum cinq minutes après stimulation au TPA, ce qui est en accord avec la littérature (142). Une diminution progressive du signal est observée à partir de dix minutes suivant la stimulation, ce qui correspond à une augmentation d'activité de PP2A. Pour les cellules MSV et INV, nous pouvons constater qu'il n'y a pas de variations significatives du signal de p-ERK1/2 à travers les différents temps de stimulation (sauf pour le  $t =$  deux minutes; artéfact probablement dû à une mauvaise manipulation des plats de cellules dédiés au  $t =$  deux minutes puisque les trois lignées présentent une faible intensité de signal). Alors, pour s'assurer d'avoir une activité phosphatase adéquatement mesurable lors de l'essai, le temps de stimulation au TPA de 15 minutes avant la lyse et l'immunoprécipitation a été choisi.

Par la suite, il a aussi fallu s'assurer de la capacité du tampon d'essai phosphatase à servir de tampon d'immunoprécipitation, puisque le même tampon imidazole devait être utilisé lors de l'immunoprécipitation et de l'essai enzymatique. Ce

dernier est tout aussi apte à servir de tampon d'immunoprécipitation que le tampon conventionnel.

Pour mesurer l'activité phosphatase de PP2A uniquement, cette dernière a donc été immunoprécipitée à partir de lysats cellulaires totaux des 3 lignées cellulaires, suite à un traitement de 15 minutes au TPA (se référer à la section « Matériel et Méthodes »). L'histogramme de la figure 3.14 montre les résultats du dosage de l'activité phosphatase PP2A immunoprécipitée (pure) à partir des cellules MDCK, MSV et INV, sans stimulation au TPA, stimulées au TPA, et finalement stimulées au TPA mais dont les cellules avaient été pré-traitées à l'AO. La condition témoin sans stimulation au TPA (barres noires) révèle en premier lieu l'existence d'une différence marquée entre les cellules MDCK et les cellules MSV/INV. En effet, l'activité basale de PP2A chez les cellules MDCK est plus élevée que chez les cellules MSV et INV, bien que celle-ci ne puisse être confirmée par une analyse statistique. Ceci révèle tout de même clairement une déficience de l'activité phosphatase de PP2A chez les cellules MSV et INV. De plus, en stimulant les cellules MDCK au TPA pendant 10 minutes avant la lyse et l'immunoprécipitation de PP2A, nous pouvons constater qu'il y a une augmentation marquée de l'activité de PP2A, alors que cette activité demeure inchangée chez les cellules MSV et INV (barres claires). Ceci démontre en plus l'impossibilité de stimuler cette activité basale déficiente des cellules MSV et INV par un activateur de la PKC (et conséquemment de la voie Raf-ERK). En pré-traitant les cellules avec de l'AO (barres rayées), l'activité phosphatase de PP2A chez les cellules MDCK chute en deçà du niveau basal (environ au tiers de la valeur de base), et ce même en ayant eu une stimulation au TPA, suggérant par ce fait qu'il est également possible d'empêcher PP2A de se faire activer. Par contre, chez les cellules MSV et INV, la présence d'AO n'a pas d'effet inhibiteur concluant sur l'activité de PP2A. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le domaine de liaison de l'AO sur la sous-unité /C est modifié d'une façon quelconque (rendu inaccessible ou ayant subi un changement de conformation par la liaison d'une protéine à cet endroit) dans ces deux lignées.

Du fait que toutes les différences observées sont entre les cellules MDCK d'un côté et les cellules MSV et INV de l'autre, nous pouvons présumer que ces différences (d'activation constitutive de MEK1/2, d'activité de PP2A, etc.) sont dues aux

conséquences du processus de transformation oncogénique que les cellules MDCK ont subies suite à leur immortalisation en cellules MSV; les cellules INV ayant subi initialement les mêmes changements, il est normal d'observer les mêmes différences lorsque comparées aux cellules MDCK. Nous proposons donc l'interprétation suivante : la transformation des cellules MDCK en cellules MSV par le virus du sarcome de Moloney a entraîné d'une façon certaine et irrévocable une déficience dans l'activité phosphatase de PP2A, menant à l'activation constitutive de la voie des MAPK. Cette activation constitutive est due à l'impossibilité de PP2A de procéder à la désactivation de MEK1/2 par déphosphorylation. Le mécanisme précis définissant cette perte d'activité demeure cependant à être identifié. Il demeure toutefois plausible que la diminution de l'expression de la sous-unité /A de PP2A contribue à la perte globale de l'activité PP2A.



## **5. Conclusions et perspectives**

Dans le projet discuté dans ce mémoire de maîtrise, nous avons démontré qu'il existait une activation constitutive de la voie des MAPK Ras-ERK dans les cellules MDCK transformées par le virus du sarcome de Moloney, MSV et INV, et que cette activation n'était pas due à la boucle d'activation autocrine de c-Met dans le cas des cellules INV. L'activation constitutive se situe au niveau de MEK1/2, comme l'ont montré les résultats des expériences employant deux différents inhibiteurs de la voie ras-ERK. Nous avons aussi observé qu'il y avait une différence dans l'expression d'une des deux isoformes de MEK (MEK1) chez les cellules MSV et INV lorsque comparées aux cellules MDCK, et qu'elle était phosphorylée sans stimulation préalable.

Pour s'assurer qu'il n'y avait pas d'activation constitutive en amont de MEK1/2, nous avons montré que le profil d'activation et d'inhibition de Raf-1 était identique dans les trois lignées. Nous avons même procédé au séquençage des 2 isoformes de MEK dans les trois lignées et n'avons révélé aucune mutation pouvant expliquer cette activation constitutive. Néanmoins, ces efforts ont permis la publication des séquences canines (MDCK parentales) de l'ADNc de MEK1 et MEK2 dans la base de données de NCBI.

Ces éléments nous ont menés à émettre l'hypothèse selon laquelle PP2A, responsable de la régulation de MEK1/2 (75), serait à l'origine de l'activation constitutive de la voie Ras-ERK chez les cellules MSV et INV. Après avoir confirmé qu'il y avait bien interaction entre PP2A et MEK1 (de même que de MEK2, et de façon endogène) dans nos trois lignées, nous avons mis en lumière le fait qu'un inhibiteur spécifique de PP2A avait des effets différents dans les cellules MDCK comparativement aux deux lignées transformées, les cellules MSV et INV. En effet, l'impossibilité d'augmenter la phosphorylation de MEK1/2 via l'inhibition de PP2A par l'AO chez les cellules MSV et INV, de même que la vitesse de réparation de plaies, nous a incités à croire que PP2A présentait une activité phosphatase diminuée dans ces deux lignées.

Par les essais d'activité phosphatase sur PP2A immunoprécipitée, nous avons pu montrer qu'effectivement, cette enzyme responsable de la déphosphorylation de MEK1/2 avait significativement moins d'activité phosphatase chez les cellules MSV et INV. Ce défaut semble selon toute vraisemblance être responsable de l'activation constitutive de MEK1/2 observée dans ces deux lignées transformées. Cette étude établit clairement pour la première fois que le processus de transformation des cellules MDCK en cellules MSV, et sa lignée « fille » INV, induit une diminution de l'activité phosphatase de PP2A, ce qui conséquemment mènerait à l'activation constitutive de MEK1/2 observée dans ces lignées.

Il serait très intéressant dans des études ultérieures de vérifier si d'autres fonctions de PP2A, comme par exemple la régulation du cycle cellulaire, sont altérées dans les cellules MSV et INV. De même, il serait très utile de déterminer quelle isoforme de la sous-unité B' de PP2A est associée à MEK1/2, pour pouvoir vérifier si l'expression de celle-ci diffère entre les cellules MDCK et les cellules MSV et INV. De plus, il existe peut-être d'autres cibles de PP2A inconnues à ce jour et qui pourraient être impliquées dans le processus de transformation. Aussi, pour mieux établir la relation entre le processus de transformation par le virus du sarcome de Moloney et les changements observés dans les cellules MSV et INV, il est primordial d'examiner l'interaction, avec MEK1/2 et PP2A, des protéines virales comme v-Mos exprimées dans ces cellules transformées. Malheureusement, à notre connaissance, aucun anticorps spécifique à v-mos n'était disponible sur le marché. Les anticorps dirigés contre c-Mos humain n'ont révélé, dans ces cellules canines, aucun signal spécifique.

L'altération des mécanismes de régulation des voies de signalisation est un phénomène fréquent dans les cancers humains. Les études s'efforçant à expliquer ces phénomènes, et à comprendre leurs causes, sont de la plus haute importance. En offrant une meilleure compréhension des mécanismes impliqués, elles permettent de trouver de nouvelles approches au traitement de cette maladie. Le modèle canin, de par ses grandes ressemblances avec l'humain, permet ce genre d'étude, et nous espérons qu'il sera davantage mis à profit dans l'avenir.

## **6. Références**

1. **Abraham, D., K. Podar, M. Pacher, M. Kubicek, N. Welzel, B. A. Hemmings, S. M. Dilworth, H. Mischak, W. Kolch, and M. Baccarini.** 2000. Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation. *J Biol Chem* **275**:22300-4.
2. **Al-Murrani, S. W., J. R. Woodgett, and Z. Damuni.** 1999. Expression of I2PP2A, an inhibitor of protein phosphatase 2A, induces c-Jun and AP-1 activity. *Biochem J* **341 ( Pt 2)**:293-8.
3. **Alessandrini, A., C. M. Crews, and R. L. Erikson.** 1992. Phorbol ester stimulates a protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:8200-4.
4. **Alessi, D. R., Y. Saito, D. G. Campbell, P. Cohen, G. Sithanandam, U. Rapp, A. Ashworth, C. J. Marshall, and S. Cowley.** 1994. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *Embo J* **13**:1610-9.
5. **Ali, S. H., and J. A. DeCaprio.** 2001. Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Semin Cancer Biol* **11**:15-23.
6. **Anderson, N. G., J. L. Maller, N. K. Tonks, and T. W. Sturgill.** 1990. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* **343**:651-3.
7. **Andjelkovic, M., T. Jakubowicz, P. Cron, X. F. Ming, J. W. Han, and B. A. Hemmings.** 1996. Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:5699-704.
8. **Andjelkovic, N., S. Zolnierowicz, C. Van Hoof, J. Goris, and B. A. Hemmings.** 1996. The catalytic subunit of protein phosphatase 2A associates with the translation termination factor eRF1. *Embo J* **15**:7156-67.
9. **Balkovetz, D. F.** 1998. Hepatocyte growth factor and Madin-Darby canine kidney cells: in vitro models of epithelial cell movement and morphogenesis. *Microsc Res Tech* **43**:456-63.
10. **Balkovetz, D. F., and J. H. Lipschutz.** 1999. Hepatocyte growth factor and the kidney: it is not just for the liver. *Int Rev Cytol* **186**:225-60.
11. **Balkovetz, D. F., and V. Sambandam.** 1999. Dynamics of E-cadherin and gamma-catenin complexes during dedifferentiation of polarized MDCK cells. *Kidney Int* **56**:910-21.
12. **Barford, D.** 1996. Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem Sci* **21**:407-12.
13. **Barford, D., Z. Jia, and N. K. Tonks.** 1995. Protein tyrosine phosphatases take off. *Nat Struct Biol* **2**:1043-53.
14. **Bennasroune, A., A. Gardin, D. Aunis, G. Cremel, and P. Hubert.** 2004. Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* **50**:23-38.
15. **Bergsagel, D. J., M. J. Finegold, J. S. Butel, W. J. Kupsky, and R. L. Garcea.** 1992. DNA sequences similar to those of simian virus 40 in ependymomas and choroid plexus tumors of childhood. *N Engl J Med* **326**:988-93.

16. **Bokemeyer, D., A. Sorokin, M. Yan, N. G. Ahn, D. J. Templeton, and M. J. Dunn.** 1996. Induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 by the stress-activated protein kinase signaling pathway but not by extracellular signal-regulated kinase in fibroblasts. *J Biol Chem* **271**:639-42.
17. **Bos, J. L.** 1989. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* **49**:4682-9.
18. **Brow, M. A., A. Sen, and J. G. Sutcliffe.** 1984. Nucleotide sequence of the transforming gene of m1 murine sarcoma virus. *J Virol* **49**:579-82.
19. **Brtva, T. R., J. K. Drugan, S. Ghosh, R. S. Terrell, S. Campbell-Burk, R. M. Bell, and C. J. Der.** 1995. Two distinct Raf domains mediate interaction with Ras. *J Biol Chem* **270**:9809-12.
20. **Cacciotti, P., R. Libener, P. Betta, F. Martini, C. Porta, A. Procopio, L. Strizzi, L. Penengo, M. Tognon, L. Mutti, and G. Gaudino.** 2001. SV40 replication in human mesothelial cells induces HGF/Met receptor activation: a model for viral-related carcinogenesis of human malignant mesothelioma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:12032-7.
21. **Calin, G. A., M. G. di Iasio, E. Caprini, I. Vorechovsky, P. G. Natali, G. Sozzi, C. M. Croce, G. Barbanti-Brodano, G. Russo, and M. Negrini.** 2000. Low frequency of alterations of the alpha (PPP2R1A) and beta (PPP2R1B) isoforms of the subunit A of the serine-threonine phosphatase 2A in human neoplasms. *Oncogene* **19**:1191-5.
22. **Campisi, J., S. H. Kim, C. S. Lim, and M. Rubio.** 2001. Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. *Exp Gerontol* **36**:1619-37.
23. **Canaani, E., K. C. Robbins, and S. A. Aaronson.** 1979. The transforming gene of Moloney murine sarcoma virus. *Nature* **282**:378-83.
24. **Castro, A., M. Peter, T. Lorca, and E. Mandart.** 2001. c-Mos and cyclin B/cdc2 connections during *Xenopus* oocyte maturation. *Biol Cell* **93**:15-25.
25. **Cavallaro, U., and G. Christofori.** 2001. Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochim Biophys Acta* **1552**:39-45.
26. **Chen, J., B. L. Martin, and D. L. Brautigan.** 1992. Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science* **257**:1261-4.
27. **Chen, W., R. Possemato, K. T. Campbell, C. A. Plattner, D. C. Pallas, and W. C. Hahn.** 2004. Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation. *Cancer Cell* **5**:127-36.
28. **Chuang, C. F., and S. Y. Ng.** 1994. Functional divergence of the MAP kinase pathway. ERK1 and ERK2 activate specific transcription factors. *FEBS Lett* **346**:229-34.
29. **Chung, H., A. C. Nairn, K. Murata, and D. L. Brautigan.** 1999. Mutation of Tyr307 and Leu309 in the protein phosphatase 2A catalytic subunit favors association with the alpha 4 subunit which promotes dephosphorylation of elongation factor-2. *Biochemistry* **38**:10371-6.
30. **Cochet, C., O. Kashles, E. M. Chambaz, I. Borrello, C. R. King, and J. Schlessinger.** 1988. Demonstration of epidermal growth factor-induced receptor dimerization in living cells using a chemical covalent cross-linking agent. *J Biol Chem* **263**:3290-5.

31. **Cohen, P. T.** 1997. Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci* **22**:245-51.
32. **Coles, L. C., and P. E. Shaw.** 2002. PAK1 primes MEK1 for phosphorylation by Raf-1 kinase during cross-cascade activation of the ERK pathway. *Oncogene* **21**:2236-44.
33. **Coutts, A. S., and L. C. Murphy.** 1998. Elevated mitogen-activated protein kinase activity in estrogen-nonresponsive human breast cancer cells. *Cancer Res* **58**:4071-4.
34. **Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton, and P. A. Futreal.** 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**:949-54.
35. **DeCaprio, J. A., J. W. Ludlow, J. Figge, J. Y. Shew, C. M. Huang, W. H. Lee, E. Marsilio, E. Paucha, and D. M. Livingston.** 1988. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* **54**:275-83.
36. **Dhanasekaran, N., and E. Premkumar Reddy.** 1998. Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* **17**:1447-55.
37. **Drexler, H. G., S. Fombonne, Y. Matsuo, Z. B. Hu, H. Hamaguchi, and C. C. Uphoff.** 2000. p53 alterations in human leukemia-lymphoma cell lines: in vitro artifact or prerequisite for cell immortalization? *Leukemia* **14**:198-206.
38. **Duncia, J. V., J. B. Santella, 3rd, C. A. Higley, W. J. Pitts, J. Wityak, W. E. Frieze, F. W. Rankin, J. H. Sun, R. A. Earl, A. C. Tabaka, C. A. Teleha, K. F. Blom, M. F. Favata, E. J. Manos, A. J. Daulerio, D. A. Stradley, K. Horiuchi, R. A. Copeland, P. A. Scherle, J. M. Trzaskos, R. L. Magolda, G. L. Trainor, R. R. Wexler, F. W. Hobbs, and R. E. Olson.** 1998. MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorg Med Chem Lett* **8**:2839-44.
39. **Eblen, S. T., J. K. Slack, M. J. Weber, and A. D. Catling.** 2002. Rac-PAK signaling stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation by regulating formation of MEK1-ERK complexes. *Mol Cell Biol* **22**:6023-33.
40. **Farooq, A., and M. M. Zhou.** 2004. Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal* **16**:769-79.
41. **Francia, G., R. Poulson, A. M. Hanby, S. D. Mitchell, G. Williams, P. McKee, and I. R. Hart.** 1999. Identification by differential display of a protein phosphatase-2A regulatory subunit preferentially expressed in malignant melanoma cells. *Int J Cancer* **82**:709-13.
42. **Frost, J. A., A. S. Alberts, E. Sontag, K. Guan, M. C. Mumby, and J. R. Feramisco.** 1994. Simian virus 40 small t antigen cooperates with mitogen-activated kinases to stimulate AP-1 activity. *Mol Cell Biol* **14**:6244-52.

43. **Frost, J. A., H. Steen, P. Shapiro, T. Lewis, N. Ahn, P. E. Shaw, and M. H. Cobb.** 1997. Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins. *Embo J* **16**:6426-38.
44. **Fukasawa, K., and G. F. Vande Woude.** 1997. Synergy between the Mos/mitogen-activated protein kinase pathway and loss of p53 function in transformation and chromosome instability. *Mol Cell Biol* **17**:506-18.
45. **Gardner, A. M., R. R. Vaillancourt, C. A. Lange-Carter, and G. L. Johnson.** 1994. MEK-1 phosphorylation by MEK kinase, Raf, and mitogen-activated protein kinase: analysis of phosphopeptides and regulation of activity. *Mol Biol Cell* **5**:193-201.
46. **Garnis, C., T. P. Buys, and W. L. Lam.** 2004. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. *Mol Cancer* **3**:9.
47. **Garrington, T. P., and G. L. Johnson.** 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* **11**:211-8.
48. **Gattoni, S., P. Kirschmeier, I. B. Weinstein, J. Escobedo, and D. Dina.** 1982. Cellular Moloney murine sarcoma (c-mos) sequences are hypermethylated and transcriptionally silent in normal and transformed rodent cells. *Mol Cell Biol* **2**:42-51.
49. **Gaush, C. R., W. L. Hard, and T. F. Smith.** 1966. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc Soc Exp Biol Med* **122**:931-5.
50. **Gomez, N., and P. Cohen.** 1991. Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. *Nature* **353**:170-3.
51. **Groves, M. R., N. Hanlon, P. Turowski, B. A. Hemmings, and D. Barford.** 1999. The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell* **96**:99-110.
52. **Guha, A.** 1998. Ras activation in astrocytomas and neurofibromas. *Can J Neurol Sci* **25**:267-81.
53. **Guo, H., and Z. Damuni.** 1993. Autophosphorylation-activated protein kinase phosphorylates and inactivates protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:2500-4.
54. **Hahn, W. C., S. K. Dessain, M. W. Brooks, J. E. King, B. Elenbaas, D. M. Sabatini, J. A. DeCaprio, and R. A. Weinberg.** 2002. Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. *Mol Cell Biol* **22**:2111-23.
55. **Herzog, N. K., M. Nash, L. S. Ramagli, and R. B. Arlinghaus.** 1990. v-mos protein produced by in vitro translation has protein kinase activity. *J Virol* **64**:3093-6.
56. **Hoshino, R., Y. Chatani, T. Yamori, T. Tsuruo, H. Oka, O. Yoshida, Y. Shimada, S. Ari-i, H. Wada, J. Fujimoto, and M. Kohno.** 1999. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* **18**:813-22.
57. **Howe, A. K., and R. L. Juliano.** 1998. Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of integrin-mediated activation of the Raf/MEK/mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem* **273**:27268-74.



58. **Huang, C., K. Jacobson, and M. D. Schaller.** 2004. MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* **117**:4619-28.
59. **Huang, W., A. Alessandrini, C. M. Crews, and R. L. Erikson.** 1993. Raf-1 forms a stable complex with Mek1 and activates Mek1 by serine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:10947-51.
60. **Huang, W., D. S. Kessler, and R. L. Erikson.** 1995. Biochemical and biological analysis of Mek1 phosphorylation site mutants. *Mol Biol Cell* **6**:237-45.
61. **Hubbard, S. R., M. Mohammadi, and J. Schlessinger.** 1998. Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* **273**:11987-90.
62. **Huebner, K., A. ar-Rushdi, C. A. Griffin, M. Isobe, C. Kozak, B. S. Emanuel, L. Nagarajan, J. L. Cleveland, T. I. Bonner, M. D. Goldsborough, and et al.** 1986. Actively transcribed genes in the raf oncogene group, located on the X chromosome in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:3934-8.
63. **Huebner, R. J., J. W. Hartley, W. P. Rowe, W. T. Lane, and W. I. Capps.** 1966. Rescue of the defective genome of Moloney sarcoma virus from a noninfectious hamster tumor and the production of pseudotype sarcoma viruses with various murine leukemia viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **56**:1164-9.
64. **Huynh, H., T. T. Nguyen, K. H. Chow, P. H. Tan, K. C. Soo, and E. Tran.** 2003. Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma: its role in tumor progression and apoptosis. *BMC Gastroenterol* **3**:19.
65. **Ikawa, S., M. Fukui, Y. Ueyama, N. Tamaoki, T. Yamamoto, and K. Toyoshima.** 1988. B-raf, a new member of the raf family, is activated by DNA rearrangement. *Mol Cell Biol* **8**:2651-4.
66. **Itahana, K., G. Dimri, and J. Campisi.** 2001. Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem* **268**:2784-91.
67. **Ito, A., T. R. Kataoka, M. Watanabe, K. Nishiyama, Y. Mazaki, H. Sabe, Y. Kitamura, and H. Nojima.** 2000. A truncated isoform of the PP2A B56 subunit promotes cell motility through paxillin phosphorylation. *Embo J* **19**:562-71.
68. **Janssens, V., and J. Goris.** 2001. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* **353**:417-39.
69. **Janssens, V., J. Goris, and C. Van Hoof.** 2005. PP2A: the expected tumor suppressor. *Curr Opin Genet Dev* **15**:34-41.
70. **Jaumot, M., and J. F. Hancock.** 2001. Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene* **20**:3949-58.
71. **Jelinek, T., A. D. Catling, C. W. Reuter, S. A. Moodie, A. Wolfman, and M. J. Weber.** 1994. RAS and RAF-1 form a signalling complex with MEK-1 but not MEK-2. *Mol Cell Biol* **14**:8212-8.
72. **Jia, Z., L. Barbier, H. Stuart, M. Amraei, S. Pelech, J. W. Dennis, P. Metalnikov, P. O'Donnell, and I. R. Nabi.** 2005. Tumor cell pseudopodial protrusions. Localized signaling domains coordinating cytoskeleton remodeling,

- cell adhesion, glycolysis, RNA translocation, and protein translation. *J Biol Chem* **280**:30564-73.
73. **Khew-Goodall, Y., R. E. Mayer, F. Maurer, S. R. Stone, and B. A. Hemmings.** 1991. Structure and transcriptional regulation of protein phosphatase 2A catalytic subunit genes. *Biochemistry* **30**:89-97.
  74. **Khosravi-Far, R., P. A. Solski, G. J. Clark, M. S. Kinch, and C. J. Der.** 1995. Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Mol Cell Biol* **15**:6443-53.
  75. **Kim, S. H., M. S. Seo, W. J. Jeon, H. S. Yu, H. G. Park, G. A. Jung, H. Y. Lee, U. G. Kang, and Y. S. Kim.** 2008. Haloperidol regulates the phosphorylation level of the MEK-ERK-p90RSK signal pathway via protein phosphatase 2A in the rat frontal cortex. *Int J Neuropsychopharmacol*:1-9.
  76. **King, A. J., H. Sun, B. Diaz, D. Barnard, W. Miao, S. Bagrodia, and M. S. Marshall.** 1998. The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature* **396**:180-3.
  77. **Kins, S., P. Kurosinski, R. M. Nitsch, and J. Gotz.** 2003. Activation of the ERK and JNK signaling pathways caused by neuron-specific inhibition of PP2A in transgenic mice. *Am J Pathol* **163**:833-43.
  78. **Kleinman, H. K., M. L. McGarvey, J. R. Hassell, V. L. Star, F. B. Cannon, G. W. Laurie, and G. R. Martin.** 1986. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* **25**:312-8.
  79. **Klemke, R. L., S. Cai, A. L. Giannini, P. J. Gallagher, P. de Lanerolle, and D. A. Cheresh.** 1997. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* **137**:481-92.
  80. **Kolch, W.** 2000. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochemical Journal* **351 Pt 2**:289-305.
  81. **Kubicek, M., M. Pacher, D. Abraham, K. Podar, M. Eulitz, and M. Baccarini.** 2002. Dephosphorylation of Ser-259 regulates Raf-1 membrane association. *J Biol Chem* **277**:7913-9.
  82. **Kuhn, E. J., R. A. Kurnot, I. A. Sesterhenn, E. H. Chang, and J. W. Moul.** 1993. Expression of the c-erbB-2 (HER-2/neu) oncoprotein in human prostatic carcinoma. *J Urol* **150**:1427-33.
  83. **Kyriakis, J. M., and J. Avruch.** 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**:807-69.
  84. **Lauffenburger, D. A., and A. F. Horwitz.** 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**:359-69.
  85. **Le, P. U., T. N. Nguyen, P. Drolet-Savoie, N. Leclerc, and I. R. Nabi.** 1998. Increased beta-actin expression in an invasive moloney sarcoma virus-transformed MDCK cell variant concentrates to the tips of multiple pseudopodia. *Cancer Res* **58**:1631-5.
  86. **Lednický, J. A., R. L. Garcea, D. J. Bergsagel, and J. S. Butel.** 1995. Natural simian virus 40 strains are present in human choroid plexus and ependymoma tumors. *Virology* **212**:710-7.

87. **Lee, T. H., M. J. Solomon, M. C. Mumby, and M. W. Kirschner.** 1991. INH, a negative regulator of MPF, is a form of protein phosphatase 2A. *Cell* **64**:415-23.
88. **Lemmon, M. A., and J. Schlessinger.** 1994. Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci* **19**:459-63.
89. **Lever, J. E.** 1986. Expression of differentiated functions in kidney epithelial cell lines. *Miner Electrolyte Metab* **12**:14-9.
90. **Marquardt, B., D. Frith, and S. Stabel.** 1994. Signalling from TPA to MAP kinase requires protein kinase C, raf and MEK: reconstitution of the signalling pathway in vitro. *Oncogene* **9**:3213-8.
91. **Mayer-Jaekel, R. E., H. Ohkura, R. Gomes, C. E. Sunkel, S. Baumgartner, B. A. Hemmings, and D. M. Glover.** 1993. The 55 kd regulatory subunit of Drosophila protein phosphatase 2A is required for anaphase. *Cell* **72**:621-33.
92. **McGrew, B. R., D. W. Nichols, V. P. Stanton, Jr., H. Cai, R. C. Whorf, V. Patel, G. M. Cooper, and A. P. Laudano.** 1992. Phosphorylation occurs in the amino terminus of the Raf-1 protein. *Oncogene* **7**:33-42.
93. **Mercer, K. E., and C. A. Pritchard.** 2003. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta* **1653**:25-40.
94. **Millward, T. A., S. Zolnierowicz, and B. A. Hemmings.** 1999. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem Sci* **24**:186-91.
95. **Mitsudomi, T., and Y. Yatabe.** 2007. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. *Cancer Sci* **98**:1817-24.
96. **Morrison, D. K., G. Heidecker, U. R. Rapp, and T. D. Copeland.** 1993. Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *J Biol Chem* **268**:17309-16.
97. **Mumby, M.** 2007. PP2A: unveiling a reluctant tumor suppressor. *Cell* **130**:21-4.
98. **Mumby, M.** 1995. Regulation by tumour antigens defines a role for PP2A in signal transduction. *Semin Cancer Biol* **6**:229-37.
99. **Osmanagic-Myers, S., M. Gregor, G. Walko, G. Burgstaller, S. Reipert, and G. Wiche.** 2006. Plectin-controlled keratin cytoarchitecture affects MAP kinases involved in cellular stress response and migration. *J Cell Biol* **174**:557-68.
100. **Pallas, D. C., L. K. Shahrik, B. L. Martin, S. Jaspers, T. B. Miller, D. L. Brautigan, and T. M. Roberts.** 1990. Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell* **60**:167-76.
101. **Perona, R.** 2006. Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin Transl Oncol* **8**:77-82.
102. **Peschard, P., T. M. Fournier, L. Lamorte, M. A. Naujokas, H. Band, W. Y. Langdon, and M. Park.** 2001. Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol Cell* **8**:995-1004.

103. **Poliakov, A., M. Cotrina, and D. G. Wilkinson.** 2004. Diverse roles of eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. *Dev Cell* **7**:465-80.
104. **Reddy, K. B., S. M. Nabha, and N. Atanaskova.** 2003. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer & Metastasis Reviews* **22**:395-403.
105. **Ridley, A. J.** 2001. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* **114**:2713-22.
106. **Riese, D. J., 2nd, R. M. Gallo, and J. Settleman.** 2007. Mutational activation of ErbB family receptor tyrosine kinases: insights into mechanisms of signal transduction and tumorigenesis. *Bioessays* **29**:558-65.
107. **Rosenberg, M. P., C. R. Aversa, R. Wallace, and F. Propst.** 1995. Expression of the v-Mos oncogene in male meiotic germ cells of transgenic mice results in metaphase arrest. *Cell Growth Differ* **6**:325-36.
108. **Rubin, E., S. Tamrakar, and J. W. Ludlow.** 1998. Protein phosphatase type 1, the product of the retinoblastoma susceptibility gene, and cell cycle control. *Front Biosci* **3**:D1209-19.
109. **Schaeffer, H. J., A. D. Catling, S. T. Eblen, L. S. Collier, A. Krauss, and M. J. Weber.** 1998. MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* **281**:1668-71.
110. **Schaeffer, H. J., and M. J. Weber.** 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* **19**:2435-44.
111. **Schonthal, A. H.** 2001. Role of serine/threonine protein phosphatase 2A in cancer. *Cancer Lett* **170**:1-13.
112. **Schramm, K., M. Niehof, G. Radziwill, C. Rommel, and K. Moelling.** 1994. Phosphorylation of c-Raf-1 by protein kinase A interferes with activation. *Biochem Biophys Res Commun* **201**:740-7.
113. **Silverstein, A. M., C. A. Barrow, A. J. Davis, and M. C. Mumby.** 2002. Actions of PP2A on the MAP kinase pathway and apoptosis are mediated by distinct regulatory subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:4221-6.
114. **Simard, D., and I. R. Nabi.** 1996. Inverse relation of autocrine motility factor receptor and E-cadherin expression following MDCK epithelial cell transformation. *Biochem Biophys Res Commun* **219**:122-7.
115. **Simmons, N. L.** 1982. Cultured monolayers of MDCK cells: a novel model system for the study of epithelial development and function. *Gen Pharmacol* **13**:287-91.
116. **Smalley, K. S.** 2003. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *International Journal of Cancer* **104**:527-32.
117. **Sontag, E.** 2001. Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling. *Cell Signal* **13**:7-16.
118. **Sontag, E., S. Fedorov, C. Kamibayashi, D. Robbins, M. Cobb, and M. Mumby.** 1993. The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation. *Cell* **75**:887-97.
119. **Stefanidakis, M., and E. Koivunen.** 2006. Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression. *Blood* **108**:1441-50.

120. **Sun, H., C. H. Charles, L. F. Lau, and N. K. Tonks.** 1993. MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* **75**:487-93.
121. **Sutter, N. B., and E. A. Ostrander.** 2004. Dog star rising: the canine genetic system. *Nat Rev Genet* **5**:900-10.
122. **Tian, Y. C., Y. C. Chen, C. T. Chang, C. C. Hung, M. S. Wu, A. Phillips, and C. W. Yang.** 2007. Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 enhance HK-2 cell migration through a synergistic increase of matrix metalloproteinase and sustained activation of ERK signaling pathway. *Exp Cell Res* **313**:2367-77.
123. **Trahey, M., R. J. Milley, G. E. Cole, M. Innis, H. Paterson, C. J. Marshall, A. Hall, and F. McCormick.** 1987. Biochemical and biological properties of the human N-ras p21 protein. *Mol Cell Biol* **7**:541-4.
124. **Traxler, P.** 2003. Tyrosine kinases as targets in cancer therapy - successes and failures. *Expert Opin Ther Targets* **7**:215-34.
125. **Vadnais, J., G. Nault, Z. Daher, M. Amraei, Y. Dodier, I. R. Nabi, and J. Noel.** 2002. Autocrine activation of the hepatocyte growth factor receptor/met tyrosine kinase induces tumor cell motility by regulating pseudopodial protrusion. *J Biol Chem* **277**:48342-50.
126. **Verlhac, M. H., C. Lefebvre, J. Z. Kubiak, M. Umbhauer, P. Rassinier, W. Colledge, and B. Maro.** 2000. Mos activates MAP kinase in mouse oocytes through two opposite pathways. *Embo J* **19**:6065-74.
127. **Voorhoeve, P. M., E. M. Hijmans, and R. Bernards.** 1999. Functional interaction between a novel protein phosphatase 2A regulatory subunit, PR59, and the retinoblastoma-related p107 protein. *Oncogene* **18**:515-24.
128. **Wang, E., M. Zhao, J. V. Forrester, and C. D. McCaig.** 2003. Electric fields and MAP kinase signaling can regulate early wound healing in lens epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**:244-9.
129. **Wang, S. S., E. D. Esplin, J. L. Li, L. Huang, A. Gazdar, J. Minna, and G. A. Evans.** 1998. Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer. *Science* **282**:284-7.
130. **Wera, S., A. Fernandez, N. J. Lamb, P. Turowski, M. Hemmings-Mieszczak, R. E. Mayer-Jaekel, and B. A. Hemmings.** 1995. Deregulation of translational control of the 65-kDa regulatory subunit (PR65 alpha) of protein phosphatase 2A leads to multinucleated cells. *J Biol Chem* **270**:21374-81.
131. **Wera, S., and B. A. Hemmings.** 1995. Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J* **311** ( Pt 1):17-29.
132. **Wheat, W. H., W. J. Roesler, and D. J. Klemm.** 1994. Simian virus 40 small tumor antigen inhibits dephosphorylation of protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Mol Cell Biol* **14**:5881-90.
133. **Widmann, C., S. Gibson, M. B. Jarpe, and G. L. Johnson.** 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**:143-80.
134. **Wistuba, II, D. Bryant, C. Behrens, S. Milchgrub, A. K. Virmani, R. Ashfaq, J. D. Minna, and A. F. Gazdar.** 1999. Comparison of features of

- human lung cancer cell lines and their corresponding tumors. *Clin Cancer Res* **5**:991-1000.
135. **Xu, S., S. Khoo, A. Dang, S. Witt, V. Do, E. Zhen, E. M. Schaefer, and M. H. Cobb.** 1997. Differential regulation of mitogen-activated protein/ERK kinase (MEK)1 and MEK2 and activation by a Ras-independent mechanism. *Mol Endocrinol* **11**:1618-25.
  136. **Yang, S. I., R. L. Lickteig, R. Estes, K. Rundell, G. Walter, and M. C. Mumby.** 1991. Control of protein phosphatase 2A by simian virus 40 small-t antigen. *Mol Cell Biol* **11**:1988-95.
  137. **Yarden, Y., and J. Schlessinger.** 1987. Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* **26**:1443-51.
  138. **Yu, W., W. J. Fantl, G. Harrowe, and L. T. Williams.** 1998. Regulation of the MAP kinase pathway by mammalian Ksr through direct interaction with MEK and ERK. *Curr Biol* **8**:56-64.
  139. **Zhang, Z., S. Zhao, F. Long, L. Zhang, G. Bai, H. Shima, M. Nagao, and E. Y. Lee.** 1994. A mutant of protein phosphatase-1 that exhibits altered toxin sensitivity. *J Biol Chem* **269**:16997-7000.
  140. **Zhao, J. J., O. V. Gjoerup, R. R. Subramanian, Y. Cheng, W. Chen, T. M. Roberts, and W. C. Hahn.** 2003. Human mammary epithelial cell transformation through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cancer Cell* **3**:483-95.
  141. **Zheng, C. F., and K. L. Guan.** 1994. Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *Embo J* **13**:1123-31.
  142. **Zheng, C. F., and K. L. Guan.** 1993. Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2. *J Biol Chem* **268**:11435-9.