

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LES ASSOCIATIONS DE LA MT1-MMP
AVEC DES PROTÉINES DES
COMPLEXES D'ADHÉSION FOCALE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR
GENEVIÈVE DI TOMASSO

MARS 2007

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué, de quelque façon que ce soit, à la réalisation de ce projet de maîtrise. Tout d'abord, j'aimerais remercier Richard Béliveau, mon directeur de recherche, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, ainsi que pour son enthousiasme et son dynamisme. Mes sincères remerciements vont également à Denis Gingras pour son encadrement, ses nombreux conseils, ses encouragements et son positivisme. Je tiens aussi à remercier particulièrement Carine Nyalendo et Stéphanie Langlois pour avoir répondu avec patience à mes innombrables questions techniques.

Je veux remercier également tous ceux et celles qui m'ont permis de passer deux années merveilleuses au Laboratoire de médecine moléculaire : Mathieu Provençal, Marisol Michaud, Xavier Vanier, Valérie Bédard, Éric Béliveau, René Lafleur, Samira Mihoubi, Jessica Jackson, Dominique Boivin, Koula Kaloméris, Édith Beaulieu, Sylvie Lamy ainsi que Gigi, l'inoubliable mascotte du laboratoire. Merci à tous ces gens pour l'amitié, le appui tant technique que moral et tous les bons moments passés ensemble.

J'aimerais aussi remercier la fondation de l'UQAM, BIOMED et le GEIRSO pour leur soutien financier.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES, ACRONYMES	vi
LISTE DES SYMBOLES.....	ix
RÉSUMÉ	x

CHAPITRE I

INTRODUCTION	1
1.1 Le cancer	1
1.2 L'angiogenèse	2
1.2.1 L'angiogenèse tumorale	2
1.2.2 Structure et fonctions du VEGF	5
1.3 Les métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMPs).....	6
1.3.1 Structure	7
1.3.2 Fonctions	7
1.3.3 Régulation des MMPs	8
1.3.4 Les MMPs : une cible thérapeutique potentielle ?.....	8
1.4 La MT1-MMP (MMP-14).....	9
1.4.1 Les multiples fonctions de la MT1-MMP	9
1.4.2 Relations structure-fonction	11
1.4.3 Régulation de la MT1-MMP	13
1.4.4 Localisation de la MT1-MMP	14
1.5 Les adhésions focales	14
1.5.1 Structure et fonctions des complexes d'adhésion focale	15
1.5.2 Les <i>intégrines</i>	16
1.5.3 La kinase FAK.....	17
1.5.4 La protéine p130 ^{CAS}	19

1.5.5 La Paxilline.....	21
1.5.6 La kinase Src	22
1.6 Les cavéoles	23
1.6.1 Propriétés morphologiques et biochimiques des cavéoles.....	23
1.6.2 Structure et fonctions des cavéolines.....	24
1.7 Hémostase et cancer.....	26
1.7.1 Relation entre le système de coagulation et le cancer.....	26
1.7.2 Le rôle de la sphingosine 1-phosphate pour la progression du cancer.....	27
1.8 Buts de la recherche	28
 CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	37
2.1 Matériel.....	37
2.1.1 Général	37
2.1.2 Anticorps	37
2.1.3 Plasmides.....	38
2.2 Méthodes.....	38
2.2.1 Culture cellulaire	38
2.2.2 Transfections cellulaires.....	39
2.2.3 Stimulations des cellules endothéliales avec la S1P ou le VEGF.....	41
2.2.4 Lyse cellulaire	41
2.2.5 Dosage des protéines	42
2.2.6 Immunoprécipitation	42
2.2.7 Séparation des protéines par électrophorèse SDS-PAGE.....	42
2.2.8 Immunobuvardage.....	43
2.2.9 Immunodétection.....	43
2.2.10 Zymographie gélatine.....	44
 CHAPITRE III	
RÉSULTATS.....	45
3.1 Associations entre la MT1-MMP et des protéines des complexes d'adhésion.....	45
3.1.1 Validation du plasmide MT1-MMP-myc	45
3.1.2 La MT1-MMP s'associe à la protéine FAK	46
3.1.3 La MT1-MMP s'associe à d'autres protéines des complexes focaux.....	47

3.2 La modulation des associations entre la MT1-MMP et les protéines des complexes d'adhésion focale.....	48
3.2.1 La modulation par la sphingosine 1-phosphate	48
3.2.2 La modulation par le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire	49
3.3 Domaines de la MT1-MMP impliqués dans les associations de cette protéine avec celles des adhésions focales.....	49
3.3.1 Le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP est nécessaire pour les associations stimulées par la surexpression de la kinase Src en présence de sérum	50
3.3.2 Le domaine catalytique de la MT1-MMP est nécessaire pour les associations stimulées par la SIP	50
3.4 La cavéoline-1 module négativement les associations entre la MT1-MMP et les protéines des complexes d'adhésion focale.....	51
 CHAPITRE IV	
DISCUSSION	61
4.1 Importance de la MT1-MMP pour l'angiogenèse	61
4.2 Liens entre les adhésions focales et l'angiogenèse.....	62
4.3 Interactions entre les protéines des adhésions focales et la MT1-MMP.....	63
4.4 La modulation des interactions MT1-MMP/protéines des complexes d'adhésion.....	65
4.5 Implication des domaines de la MT1-MMP.....	66
4.6 Rôle de la cavéoline-1	68
 CHAPITRE V	
CONCLUSION.....	72
5.1 Implications possibles de la MT1-MMP dans les adhésions focales.....	72
5.2 Perspectives.....	73
 RÉFÉRENCES	 74

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure	Page
1.1 – Les six caractéristiques acquises des cellules cancéreuses.....	30
1.2 – L’angiogenèse tumorale.....	31
1.3 – Représentation schématique de la MT1-MMP.....	33
1.4 – Les composantes des complexes d’adhésion cellule-matrice.....	34
1.5 – Structure de quelques protéines des complexes d’adhésion focale.....	35
1.6 – Représentation schématique des cavéoles.....	36
3.1 – Validation du plasmide MT1-MMP-myc.....	53
3.2– Association entre la MT1-MMP et FAK.....	54
3.3– Associations entre la MT1-MMP et des protéines des complexes d’adhésion...	55
3.4– Cinétique de stimulation à la S1P.....	56
3.5– Cinétique de stimulation au VEGF.....	57
3.6– Domaines de la MT1-MMP nécessaires aux associations stimulées par Src.....	58
3.7– Domaines de la MT1-MMP nécessaires aux associations stimulées par la S1P..	59
3.8– La cavéoline-1 comme régulateur négatif des associations de la MT1-MMP....	60
TABLEAU I – Représentation schématique des domaines structuraux des MMPs	32

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES, ACRONYMES

293T	cellules rénales embryonnaires humaines transformées par l'antigène T
5-FU	5-fluorouracil
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
APS	persulfate d'ammonium
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
BAEC	cellules endothéliales d'aorte bovine
BCS	sérum de veau
bFGF	facteur de croissance fibroblastique basique
BSA	albumine de sérum bovin
COS-7	cellules épithéliales rénales de singe transformées par le virus SV-40
Csk	kinase C-terminale de Src
DMEM	milieu de Eagle modifié par Dulbecco
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
Edg	gène de différenciation endothéliale (récepteur du S1P)
EGF	facteur de croissance épithélial
EGTA	acide éthylèneglycol-bis-(-aminoéthyléther) tétraacétique
EG-VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire dérivé des glandes endocrines
eNOS	synthase d'oxyde nitrique endothéliale
ERK	kinase modulée par les signaux extracellulaires
FAK	kinase des adhésions focales
FAT	domaine de ciblage aux adhésions focales sur FAK
FBS	sérum de foetus bovin
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FERN	domaine d'homologie aux protéines 4.1, ezrine, radixine et myosine
FGF	facteur de croissance fibroblastique

FRET	fluorescence à résonnance par transfert d'énergie
FRNK	protéine non-kinase reliée à FAK
GPI	glycosylphosphatidylinositol
Grb2	protéine 2 liant les récepteurs de facteurs de croissance
Grb7	protéine 7 liant les récepteurs de facteurs de croissance
HGF	facteur de croissance des hépatocytes
HIF	facteur inductible par l'hypoxie
HUVEC	cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine
IL	interleukine
LD	domaine contenant des répétitions de leucine-acide aspartique sur la paxilline
MAPK	protéines kinases activées par les mitogènes
MEC	matrice extracellulaire
MEK	kinase de MAPK/ERK
MMP	métalloprotéase de la matrice extracellulaire
MMPI	inhibiteur des MMPs
MT-MMP	métalloprotéase de la matrice extracellulaire de type membranaire
NaCl	chlorure de sodium
p130 ^{cas}	substrat associé à Crk de 130 kDa
PIGF	facteur de croissance placentaire
PAK	kinases de la protéine p21 activée
PBS	tampon bi-phosphate salin
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes
PLC- γ	phospholipase C gamma
PVDF	difluorure de polyvinylidène
S1P	sphingosine 1-phosphate
SAPK	protéines kinases activées par le stress
SDS	dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
SFK	kinases de la famille de Src
SH2	domaine 2 d'homologie à Src
SH3	domaine 3 d'homologie à Src
siRNA	petit ARN interférent
sphK1	kinase 1 de la sphingosine
SV40	virus vacuolant simien

TBS	tampon tris-salin
TEMED	N, N, N', N'-tétraméthylènediamine
TGF	facteur de croissance transformant
TIMP	inhibiteur tissulaire des métalloprotéases de la matrice extracellulaire
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
tTG	transglutaminase tissulaire
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR	récepteur pour le VEGF

LISTE DES SYMBOLES

%	pourcentage
α	alpha
β	bêta
Δ	delta
γ	gamma
°C	degré Celcius
kDa	kilodalton
M	molaire
min.	minute
ml	millilitre
mM	millimolaire
nm	nanomètre
μm	micromètre
(ρ/v)	(poids/volume)
μg	microgramme
$\mu\text{g/ml}$	microgramme/millilitre
(v/v)	(volume/volume)

RÉSUMÉ

L'implication des métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMPs) lors de plusieurs étapes de la progression tumorale, telles que l'angiogenèse, l'invasion et la prolifération des cellules tumorales est clairement établie. Une MMP de forme membranaire, la MT1-MMP, est reconnue pour jouer un rôle clé dans ces processus. Elle est responsable de l'activation de la proMMP-2, dégrade plusieurs composantes de la matrice extracellulaire, induit la formation de réseaux de type capillaires, augmente le potentiel migratoire des cellules endothéliales et tumorales et joue un rôle dans la signalisation cellulaire. La surexpression de la MT1-MMP, fréquente chez les cellules cancéreuses, induit des changements dans la morphogenèse, l'adhésion et la migration des cellules, mais le mécanisme impliqué demeure encore mal compris. La kinase d'adhésion focale (FAK), principale protéine responsable de la régénération des complexes d'adhésion focale, est aussi impliquée dans la formation et la progression tumorale. L'objectif de cette étude était de déterminer si la MT1-MMP s'associe à FAK ainsi qu'à d'autres protéines des complexes d'adhésion et de déterminer le rôle que jouent ces associations, particulièrement lors du phénomène de l'angiogenèse. L'approche expérimentale utilise des immunoprécipitations sur des lysats de protéines isolées de lignées cellulaires endothéliales (HUVEC et BAEC). Les données obtenues démontrent une forte association de la MT1-MMP avec FAK, p130^{cas}, Src et vinculine, mais pas avec les protéines actine et paxilline. Ces interactions sont dépendantes de stimulations à la sphingosine-1-phosphate (S1P) et au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Les domaines structuraux de la MT1-MMP nécessaires aux associations dépendent du temps de stimulation des cellules. En effet, la portion catalytique a été trouvée essentielle aux associations décrites lors de stimulations de courtes durées (5 minutes) à la S1P, alors que la portion cytoplasmique semble jouer un rôle prédominant lors de stimulations de 48 heures en présence de sérum et avec surexpression de Src. Il a également été observé que la cavéoline-1 agit comme régulateur négatif de ces associations. En bref, la MT1-MMP s'associe avec plusieurs composantes des complexes d'adhésion focale, ce qui suggère qu'elle permet la régénération de ces structures cellulaires. Le résultat global obtenu, au niveau de la cellule, est une migration cellulaire accrue et une induction de l'angiogenèse chez les cellules endothéliales. En perspective, des études de colocalisation en microscopie sont également envisagées.

Mots clés : cancer, angiogenèse, MT1-MMP, complexes d'adhésion focale, cavéoline-1

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer

Le cancer est la principale cause de décès au Canada, avec 149 000 nouveaux cas et 69 500 décès causés par cette maladie survenus en 2005 (Société canadienne du cancer et Institut du cancer du Canada, 2006). La recherche se fait donc activement pour trouver rapidement un moyen de prévenir, contrôler et/ou guérir cette terrible maladie.

Le cancer est un processus complexe à plusieurs étapes au cours desquelles la transformation d'une cellule normale en une tumeur maligne implique des changements génétiques qui mènent à plusieurs altérations phénotypiques ainsi qu'à l'acquisition de l'habileté à se disperser et à coloniser des sites distants (Nelson et al, 2000 ;Zucker et Vacirca, 2004). Cette maladie génétique est due à l'accumulation de plusieurs mutations qui rendent la tumeur insensible au contrôle par l'environnement cellulaire local et par l'organisme entier. Des analyses de la fréquence des apparitions des cancers humains en fonction de l'âge montrent que la mutation d'environ quatre à sept gènes clés est normalement nécessaire pour produire la plupart des cancers humains (Sarasin, 2003). Il n'y a que quelques gènes stratégiques qui peuvent induire la formation des tumeurs, les plus importants étant ceux qui activent les proto-oncogènes et ceux qui inactivent les gènes suppresseurs des tumeurs (Jakobisiak et al, 2003). Les mutations induisant le cancer produisent des oncogènes avec des gains de fonctions dominants et des gènes suppresseurs de tumeurs avec des pertes de fonctions récessives (Hanahan et Weinberg, 2000).

Il y a plus de 100 types distincts de cancers. Ce vaste catalogue de génotypes des cellules cancéreuses est la manifestation de six altérations essentielles de la physiologie cellulaire qui dictent collectivement la croissance tumorale (figure 1.1), soit l'auto-suffisance en facteurs de croissance,

l'insensibilité aux signaux d'arrêt de croissance, l'évasion de l'apoptose (mort cellulaire programmée), le potentiel réplicatif illimité, l'angiogenèse soutenue ainsi que l'invasion tissulaire et les métastases. Chacun de ces changements physiologiques représente une cible thérapeutique potentielle pour contrer le cancer (Hanahan et Weinberg, 2000; Zucker et Vacirca, 2004).

1.2 L'angiogenèse

L'angiogenèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux pré-existants (Hanahan et Folkman, 1996). C'est le principal mécanisme de vascularisation durant le développement embryonnaire, la croissance, la formation du corpus luteum et la régénération de l'endomètre ainsi que lors de la guérison des tissus endommagés (Bergers et Benjamin, 2003 ;Carmeliet, 2005 ;Muñoz-Chàpuli et al, 2004). L'angiogenèse normale est un processus complexe qui implique l'organisation de cellules endothéliales qui prolifèrent et migrent en un réseau vasculaire bien ordonné et hautement fonctionnel. Au cours de l'angiogenèse pathologique, les vaisseaux sont caractérisés par une « angioarchitecture » aberrante et une fonction barrière compromise (Dvorak, 2005 ;Nagy et Senger, 2006). La vasculature est normalement quiescente chez l'adulte et les cellules endothéliales sont parmi les cellules ayant la plus longue longévité. Elles entrent par contre activement dans un état de prolifération intense en réponse à un stimulus angiogénique (Carmeliet, 2005 ;Hanahan et Folkman, 1996 ;Hobson et Denekamp, 1984). Un déséquilibre de la croissance des vaisseaux sanguins contribue à de nombreux désordres. La croissance insuffisante et la régression des vaisseaux cause l'ischémie cardiaque et cérébrale et peut mener à la neurodégénérescence, l'hypertension, la pré-éclampsie, la détresse respiratoire, l'ostéoporose et d'autres désordres (Carmeliet, 2003). Pour ces maladies comportant un déficit angiogénique, il y a une dysfonction des cellules endothéliales, la malformation ou la régression des vaisseaux ou encore la prévention de la revascularisation, de la guérison et de la régénération (Carmeliet, 2005). Une longue liste de maladies est aussi caractérisée ou causée par de l'angiogenèse excessive. Les mieux connues sont le cancer, le psoriasis, l'arthrite et la perte de la vue, mais il y en a de nombreuses autres tel l'obésité, l'asthme, l'athérosclérose et les infections et la liste s'allonge encore (Carmeliet, 2003).

1.2.1 L'angiogenèse tumorale

Comme les tissus normaux, les tumeurs ont besoin d'un apport adéquat en oxygène et en nutriments et d'un moyen efficace de se débarrasser de leurs déchets métaboliques. Une tumeur ne

peut pas se développer au-delà de 1-2 mm³ sans l'induction de l'angiogenèse (Berger et Benjamin, 2002 ;Jakobisiak et al, 2003). L'oxygène et les nutriments fournis par le système vasculaire sont en effet cruciaux pour la fonction cellulaire et la survie, obligeant virtuellement toutes les cellules d'un tissu à résider à moins de 100 µm d'un capillaire (Bergers et Benjamin, 2003 ;Ferrera et Kerbel, 2005 ;Hanahan et Weinberg, 2000) (figure 1.2). Les tissus se trouvant dans un environnement hypoxique sont connus pour sécréter des facteurs angiogéniques qui induisent la croissance de nouveaux capillaires. Les néoplasmes requièrent le même processus pour leur croissance et, si la tumeur est maligne, l'angiogenèse peut aussi faciliter les métastases (Nash et al, 2001). L'hypoxie est un stimulus important pour l'expansion du lit vasculaire. Le facteur inductible de l'hypoxie (HIF) régule à la hausse plusieurs gènes angiogéniques, mais l'induction du VEGF est la plus remarquable – jusqu'à 30 fois plus de transcrits en moins d'une minute (Carmélie, 2003).

L'activation des cellules endothéliales (*angiogenic switch*), implique soit une induction des régulateurs positifs ou encore une perte des régulateurs négatifs de l'angiogenèse (Pepper, 2001). Les activateurs de l'angiogenèse comprennent les VEGFs (*vascular endothelial growth factor*) A, B, C et D, le PIGF (*placental growth factor*), les FGFs (*fibroblast growth factor*) 1 et 2, le HGF (*hepatocyte growth factor*), le PDGF (*platelet-derived growth factor*), les angiopoïétines 1 et 2, les TGFs (*transforming growth factor*) α et β, l'interleukine-8, l'EG-VEGF, la leptine, les prostaglandines, de nombreux lipides, etc... L'expression du VEGF induite par l'hypoxie reste cependant le principal mécanisme qui induit la réponse angiogénique (Carmélie, 2003 ;Dvorak, 2005 ;Muñoz-Chàpuli et al, 2004). Les signaux angiogéniques favorisent la prolifération des cellules endothéliales, leur plus grande résistance à l'apoptose, des changements dans la balance protéolytique, la réorganisation du cytosquelette, la migration et finalement la différenciation et la formation de nouvelles lumières vasculaires (Muñoz-Chàpuli et al, 2004). Parmi les régulateurs négatifs de l'angiogenèse, notons la thrombospondine, l'endostatine, la tumstatine, la vasostatine et la vasohibine (Ferrera et Kerbel, 2005).

Le remodelage de la matrice extracellulaire durant le bourgeonnement vasculaire requiert sa destruction par des protéases, dont les activateurs du plasminogène, les métalloprotéases, les héparinases, les chymases, les tryptases et les cathepsines. Les protéases facilitent également le bourgeonnement des cellules endothéliales en libérant des activateurs angiogéniques liés à la matrice (FGF, VEGF, TGF-β, IL-1B) (Carmélie, 2003 ;Langlois et al, 2004). Depuis les débuts de la recherche sur les processus cellulaires requis pour l'angiogenèse, la protéolyse a été reconnue comme une des activités les plus précoces et les plus soutenues impliquées dans ce phénomène (Roy et al, 2006). Il a également été clairement établi que les MMPs (métalloprotéases de la matrice

extracellulaire) sont requises pour l'angiogenèse, la meilleure preuve étant que l'angiogenèse peut être inhibée par des inhibiteurs des MMPs (Pepper, 2001).

Les tumeurs semblent activer la néovascularisation en changeant la balance entre les inducteurs de l'angiogenèse et ses inhibiteurs (Hanahan et Weinberg, 2000). En fait, l'angiogenèse n'initie pas le cancer, mais elle promouvoit la progression tumorale et les métastases (Carmeliet, 2005). L'angiogenèse tumorale s'effectue en deux phases, l'initiation et la résolution (figure 1.2). La première décrit une phase avasculaire qui correspond à de petites lésions occultes de moins de 1-2 mm de diamètre. Ces lésions demeurent en dormance en atteignant un équilibre entre la prolifération et l'apoptose. Des tumeurs en dormance ont été trouvées lors d'autopsies d'individus décédés de causes autres que le cancer. Heureusement, seulement une petite partie des ces tumeurs entrent en deuxième phase, où il y a croissance tumorale exponentielle (Bergers et Benjamin, 2003). Durant la phase d'initiation, il y a une augmentation de la perméabilité vasculaire et dépôt de fibrine extracellulaire, un désassemblage des murs des vaisseaux, une dégradation de la membrane basale, la migration cellulaire et l'invasion de la matrice extracellulaire (MEC), la prolifération des cellules endothéliales et la formation de la lumière capillaire. Quant à la phase de résolution, elle consiste en l'établissement du flux sanguin dans le nouveau vaisseau formé (Chae et al, 2004 ;Pepper, 2001 ;Roy et al, 2006). Les cellules endothéliales angiogéniques doivent donc proliférer, produire des molécules capables de dégrader la matrice extracellulaire, changer leurs propriétés d'adhésion, migrer, éviter l'apoptose et, finalement, se différencier en nouveaux tubes vasculaires (Muñoz-Chàpuli et al, 2004).

Les principaux récepteurs membranaires qui transmettent les signaux angiogéniques sont les récepteurs à activité tyrosine kinase, les récepteurs couplés aux protéines G et les récepteurs à activité sérine/thréonine kinase. Il n'y a cependant pas de voie de signalisation ou facteur de transcription spécifiques qui régulent le processus angiogénique entier ou même aucune de ses étapes. Cela signifie que la régulation du comportement endothélial durant l'angiogenèse est le résultat d'un réseau très complexe de systèmes de signalisation intracellulaires qui induisent, contrôlent et terminent ce processus (Muñoz-Chàpuli et al, 2004).

Vu la grande signification de la formation des vaisseaux sanguins pour plusieurs maladies humaines, tels les malformations cardiovasculaires et le cancer, la compréhension des mécanismes moléculaires de l'angiogenèse suscite beaucoup d'intérêt (Serini et al, 2006). Les thérapies anti-angiogéniques sont particulièrement prometteuses pour le traitement du cancer, car l'angiogenèse tumorale est présente chez toutes les tumeurs humaines et elles offrent une nouvelle modalité pour le

traitement des tumeurs résistantes aux thérapies conventionnelles (Hanahan et Weinberg, 2000 ;Ng et al, 2006). Les études pré-cliniques indiquent que la combinaison d'agents antiangiogéniques avec les agents cytotoxiques conventionnels ou la thérapie de radiation provoque des effets anti-tumoraux additifs et même synergiques. Il y a même maintenant des preuves que l'approche antiangiogénique, lorsque combinée à la chimiothérapie, résulte en une survie accrue des patients souffrant de cancers avancés (Ferrera et Kerbel, 2005).

1.2.2 Structure et fonctions du VEGF

Le VEGF a de multiples isoformes (VEGF-A, -B, -C et -D) dont les propriétés distinctes affectent la biodisponibilité et les fonctions signalitiques de ce facteur angiogénique. Les isoformes associées à la surface cellulaire ou dans le milieu extracellulaire constituent un réservoir de facteurs de croissance qui peuvent être relargués comme protéines actives sans l'initiation de la transcription du gène (Lee et al, 2005 ;Ng et al, 2006). L'expression du VEGF-A est régulée par de nombreux facteurs dont l'hypoxie (via le HIF-1), des cytokines et des facteurs de croissance (tel le TGF- β), diverses hormones (tels l'œstrogène et la progestérone) et, chez les tumeurs, par des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs (Dvorak, 2005 ;Ferrera et Kerbel, 2005 ;Weis et Cheresh, 2005). Les plaquettes activées ont aussi de hauts niveaux de VEGF (Weis et Cheresh, 2005). Il a également été trouvé que la biodisponibilité du VEGF peut être régulée au niveau extracellulaire par les MMPs 3, 7, 9 et 19 par traitement intramoléculaire (Lee et al, 2005).

Le VEGF-A possède des activités distinctes, incluant la survie cellulaire, la prolifération, la migration, la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse (Langlois et al, 2004 ;Lee et al, 2005 ;Shibuya et Claesson-Welsh, 2006 ;Weis et Cheresh, 2005). Lors du processus de cancérisation, la destruction de la barrière vasculaire médiée par le VEGF peut potentialiser l'extravasation des cellules tumorales, ce qui mène à une maladie avec des métastases étendues (Weis et Cheresh, 2005). Une stimulation au VEGF induit aussi spécifiquement la kinase Src, ce qui accroît la phosphorylation des composants des complexes focaux tels la paxilline, FAK et p130^{cas} (Avraham et al, 2003 ;Munshi et al, 2000). Il n'est donc pas surprenant que la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF soit médiée par un taux accéléré d'assemblage/désassemblage des complexes d'adhésion focale (Avraham et al, 2003). Il est à noter que la surexpression du VEGF-A résulte en la formation d'une néovasculature qui est caractérisée par de sérieux défauts structuraux et fonctionnels, avec une perte de l'intégrité structurelle, comme le démontrent l'hyperperméabilité, l'œdème interstitiel, la fuite de protéines plasmatiques, et la

déposition de fibrine. Il y a également un recouvrement imparfait par les péricytes (Nagy et Senger, 2006).

Le principal récepteur de signalisation du VEGF, qui médie la plupart de ses activités biologiques chez les cellules endothéliales, est le VEGFR2. Suite à son activation, l'autophosphorylation de ses tyrosines crée un site d'ancrage SH2 qui permet la liaison de PLC- γ ou Grb2, qui sont alors phosphorylées à leur tour. Ce mécanisme est impliqué dans l'activation de la cascade Raf-1/MEK/ERK, une voie de signalisation cruciale qui résulte en la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse (Ng et al, 2006). La signalisation en aval du VEGFR2 reste toutefois fort variée et inclut d'autres molécules de transduction telles PI(3)K/Akt, Src et PLC- γ /eNOS (Weis et Chersesh, 2005). L'inactivation du gène *VEGFR2* résulte en la mort embryonnaire des souris due à un manque de vasculogenèse et un très pauvre développement hématopoïétique. Comme les souris déficientes en VEGFR1 sont caractérisées au contraire par une surcroissance des vaisseaux, la signalisation des deux récepteurs doit être coordonnée pour obtenir une expression équilibrée de l'expansion et de la différenciation des précurseurs endothéliaux durant l'embryogenèse (Shibuya et Claesson-Welsh, 2006).

Des niveaux élevés en VEGF circulant est une mesure prédictive de la progression du cancer et des métastases chez certains types de cancers (Ferrera et Kerbel, 2005 ;Weis et Chersesh, 2005). Au début de 2004, la FDA (*US Food and Drug Administration*) a approuvé l'utilisation du bevacizumab (Avastin), un anticorps neutralisant anti-VEGF humanisé en combinaison avec la chimiothérapie au 5-fluorouracil pour le traitement du cancer colorectal métastatique (Ferrera et Kerbel, 2005 ;Shibuya et Claesson-Welsh, 2006). Cependant, l'inhibition du VEGF semble être nécessaire, mais non suffisante pour arrêter de façon permanente le processus d'angiogenèse dans plusieurs désordres. Par exemple, le PDGF-B est requis pour le recrutement des péricytes et la maturation de la microvasculature. La combinaison des inhibiteurs du VEGF et du PDGF pourrait donc constituer une stratégie anti-vasculaire et anti-tumorale plus attrayante (Carmeliet, 2005 ;Ferrera et Kerbel, 2005).

1.3 Les métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMPs)

Les métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMPs) sont un groupe d'endopeptidases dépendantes du zinc qui dégradent la matrice extracellulaire. La famille des MMPs comprend plus de 25 enzymes (23 identifiées chez l'humain) qui partagent des domaines fonctionnels communs (tableau I) (Visse et Nagase, 2003 ;Zucker et Vacirca, 2004).

1.3.1 Structure

La structure de base des MMPs consiste en plusieurs domaines homologues: 1) un peptide signal qui dirige les MMPs vers la voie sécrétoire, 2) un prodomaine qui confère une latence à l'enzyme en occupant le site actif, ce qui rend le site catalytique inaccessible au substrat, 3) un site catalytique comprenant une région liant le Zn^{2+} (HE_xGH_xgXXHS/T) et qui est responsable de l'activité protéolytique de la protéine, 4) un domaine hémapexine qui effectue les interactions avec le substrat et confère la spécificité du substrat et 5) une petite région charnière qui relie le domaine catalytique au domaine hémapexine. Des domaines structuraux additionnels ou encore la spécificité envers les substrats ont mené à la division des MMPs en sous-groupes : les collagénases, les stromélysines, les gélatinases, les matrilysines et les autres MMPs (Nabeshima et al, 2002 ;Roy et al, 2006 ;Visse et Nagase, 2003 ;Zucker et Vacirca, 2004). La famille des MMPs peut également être subdivisée en deux groupes distincts, les MMPs solubles et les MMP ancrées à la membrane, les MT-MMPs. Des six MT-MMPs, quatre sont ancrées à la membrane plasmique par un domaine transmembranaire de 20 acides aminés suivi d'une courte séquence cytoplasmique alors que les deux autres y sont associées via une ancre glycosylphosphatidylinositol (Nisato et al, 2005).

1.3.2 Fonctions

Collectivement, les MMPs sont capables de dégrader toutes les composantes de la matrice extracellulaire. Toutefois, il est dorénavant reconnu que les actions des MMPs ne se réduisent pas à la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC), mais incluent aussi l'exposition de sites cryptiques sur des molécules de la MEC cachés dans les replis ou les structures des protéines assemblées (Cao et al, 2004 ;Roy et al, 2006 ;Zucker et Vacirca, 2004). Des centaines de publications ont démontré que la progression de l'invasion et des métastases dans les modèles animaux expérimentaux corrèlent avec une augmentation de la sécrétion de MMPs par les cellules tumorales ou les cellules stromales (Seiki, 2003 ;Zucker et Vacirca, 2004). Bien que les protéases à sérine, à cystéine, aspartiques et les métalloprotéases soient toutes impliquées dans le processus invasif, les MMPs semblent exercer un rôle prédominant (Zucker et Vacirca, 2004). Les MMPs jouent un rôle important dans une grande variété d'étapes de la tumorigenèse, incluant les événements de carcinogenèse précoce, la croissance et l'invasion tumorale, et les métastases (Nabeshima et al, 2002 ;Stramenkovic, 2000). L'activation des MMPs au front migratoire des cellules augmente la protéolyse de la matrice, ce qui permet le relâchement des contacts intégrine-matrice et facilite donc la régénération des complexes d'adhésion focale (Mitra et al, 2005). En plus de leur rôle essentiel dans la migration des cellules tumorales et

endothéliales, les MMPs promeuvent aussi l'angiogenèse en relâchant des facteurs angiogéniques emprisonnés dans la MEC, tels le VEGF et le bFGF, en régulant leur biodisponibilité, fonctionnalité et leur interaction avec des récepteurs de surface cellulaire. Il est reconnu que ces protéines liées à la matrice constituent une réserve potentielle de facteurs de croissance qui permettent d'augmenter rapidement la biodisponibilité de stimulateurs de l'angiogenèse sans augmenter leur expression génique (Roy et al, 2006).

Les MMPs ont longtemps été perçues comme des « bulldozers », détruisant la matrice extracellulaire pour permettre le remodelage normal et contribuant à la destruction des tissus pathologiques et l'induction de l'invasion des cellules tumorales. Plus récemment, l'identification de substrats spécifiques de la matrice ou non-matriciels pour les MMPs et l'élucidation des conséquences biologiques de ces clivages indiquent que les MMPs devraient plutôt être vues comme des enzymes jouant des rôles sophistiqués dans la modulation du comportement cellulaire normal, dans la communication cellule-cellule et dans la progression tumorale (McCawley et Matrisian, 2001).

1.3.3 Régulation des MMPs

Les MMPs sont toutes synthétisées sous forme de pré-proenzymes. Les MMPs solubles sont sécrétées inactives et les MMPs ancrées à la membrane sont activées intracellulairement par des protéines convertases. La plupart des MT-MMPs sont exprimées actives à la surface membranaire (Nabeshima et al, 2002). L'activation des MMPs solubles suite à leur sécrétion des cellules dépend de la dissociation de l'interaction du prodomaine avec le domaine catalytique, qui peut se produire par changement conformationnel ou par retrait protéolytique du prodomaine (Roy et al, 2006 ;Zucker et Vacirca, 2004). Une fois activées, les MMPs peuvent encore réguler par des inhibiteurs endogènes spécifiques (les TIMPs 1-4), l'autodégradation, l'endocytose sélective et l'interaction avec des composants spécifiques de la MEC (Nabeshima et al, 2002 ;Visse et Nagase, 2003 ;Zucker et Vacirca, 2004).

1.3.4 Les MMPs : une cible thérapeutique potentielle ?

Une corrélation générale entre les niveaux d'expression des MMPs et la progression tumorale a été observée à plusieurs reprises. Le rôle crucial des MMPs dans l'invasion tumorale et la formation des métastases a encouragé le développement d'agents thérapeutiques pouvant inhiber la synthèse ou l'activité de ces enzymes afin de prévenir ou diminuer la progression des cancers (Nelson et al, 2000).

Malgré l'enthousiasme envers ces inhibiteurs (MMPI), les études cliniques en phase III n'ont pas réussi à démontrer une amélioration significative de la survie des patients. De plus, les effets secondaires produits restent encore trop importants (Sato et al, 2005). Avant de lancer la serviette, il est toutefois important de mieux comprendre comment agissent les MMPs, en s'attardant non seulement à leur activité, mais aussi à leur impact sur les cellules. Dans cette optique, il est aussi intéressant de revoir plus particulièrement les MMPs ancrées à la membrane. En effet, la présence du domaine cytoplasmique de cette classe de MMP, pouvant avoir des impacts sur des voies de signalisation menant à la malignité, est très attrayante.

1.4 La MT1-MMP (MMP-14)

L'expression de la MT1-MMP et l'activation de la proMMP-2 ont été observées et corrélées chez plusieurs types de tumeurs, dont le poumon, l'estomac, le côlon, le foie, le sein, la vessie, la tête et le cou, la thyroïde, les ovaires, le cervelet et le cerveau. Des transcrits de cette protéase ont été trouvés dans les cellules tumorales et les cellules stromales les entourant (Osenkowski et al, 2004 ;Seiki, 2003 ;Zucker et Vacirca, 2004). En fait, le niveau d'expression de la MT1-MMP est directement lié avec le taux d'invasion et l'agressivité des tumeurs (Sato et al, 2005). Jusqu'à présent, la MT1-MMP est la seule MMP qui a été trouvée comme étant essentielle pour la survie (Osenkowski et al, 2004).

1.4.1 Les multiples fonctions de la MT1-MMP

La MT1-MMP peut activer la proMMP-2, la proMMP-13 et, indirectement, la proMMP-9 (Itoh et Seiki, 2006 ;Osenkowski et al, 2004). La MT1-MMP active la proMMP-2 à la surface des cellules tumorales en induisant l'assemblage d'un triplet unique avec TIMP-2 et la proMMP-2. Une seconde molécule de MT1-MMP vient alors cliver le propeptide de la proMMP-2, ce qui active l'enzyme à la surface cellulaire (Cao et al, 2004). La MT1-MMP initialise donc la cascade d'activation des MMPs zymogènes (Osenkowski et al, 2004).

Bien que la MT1-MMP ait tout d'abord été identifiée comme un récepteur cellulaire et un activateur de la proMMP-2, cette enzyme protéolyse un large spectre de protéines de la MEC. Elle dégrade le collagène de type I, II et III, la gélatine, la fibronectine, les laminines 1 et 5, la vitronectine, la fibrine, le lumican et l'aggrecan (Itoh et Seiki, 2006 ;Langlois et al, 2004 ;Osenkowski et al, 2004). L'activité collagénolytique de la MT1-MMP est critique durant le développement puisque des souris

déficientes en MT1-MMP souffrent de complications sévères dans le remodelage du squelette et des tissus conjonctifs extrasquelettiques qui résulte en une mort précoce. Puisque les souris mutantes en MMP-2 ne présentent pas ces deux anomalies, ces observations illustrent l'importance de l'activité catalytique de cette enzyme (Hotary et al, 2000 ;Osenkowski et al, 2004).

La MT1-MMP possède non seulement la capacité de dégrader une grande variété de molécules de la MEC, mais elle clive aussi d'autres protéines qui peuvent affecter la migration cellulaire (Cao et al, 2004). Elle régule les interactions cellule-MEC en dégradant des molécules telles le CD44, la transglutaminase tissulaire (tTG), la chaîne α v de l'intégrine, la syndécan-1, la protéine reliée au récepteur des lipoprotéines de faible densité et la β -glycane (Annabi et al, 2004;Belkin et al, 2001 ;Deryugina et al, 2002 ;Itoh et Seiki, 2006 ;Kajita et al, 2001 ;Remacle et al, 2005 ;Seiki, 2003 ;Sounni et al, 2004). De plus, en clivant des gros composants de la matrice extracellulaire et des molécules associées à celle-ci, la MT1-MMP libère des fragments bioactifs et des facteurs de croissance, en plus de changer l'architecture de la MEC, ce qui influence le comportement cellulaire (Mott et Werb, 2004).

La MT1-MMP est un puissant modulateur de l'environnement péricellulaire et elle promeut l'invasion des cellules tumorales et la prolifération de plusieurs types de tumeurs (Nonaka et al, 2005). L'expression de la MT1-MMP chez les cellules du muscle lisse induit des changements dans la morphologie, l'adhésion et la migration cellulaire (Shofuda et al, 2004). La MT1-MMP confère aux cellules tumorales un avantage distinct pour la croissance en 3D autant *in vitro* que *in vivo*, ainsi que pour les métastases (Hotary et al, 2003 ;Soulié et al, 2004). L'expression conditionnelle de la MT1-MMP chez les cellules non-tumorigènes est suffisante pour stimuler la migration cellulaire, activer la kinase ERK et même induire la formation de tumeurs chez les souris nues (Labrecque et al, 2004 ;Seiki, 2003 ;Soulié et al, 2004 ;Uekita et al, 2001). Les cellules tumorales qui expriment la MT1-MMP croissent plus rapidement et forment des tumeurs hautement vascularisées, probablement grâce à l'augmentation de l'activation de ERK par la MT1-MMP (Gingras et al, 2001 ;Seiki et Yana, 2003).

Chez les cellules endothéliales, la surexpression de la MT1-MMP stimule la migration, l'invasion et la formation de structures capillaires, en plus d'une activation accrue de la proMMP-2 (Langlois et al, 2004 ;Roy et al, 2006). La MT1-MMP est d'ailleurs exprimée chez les cellules endothéliales formant de nouveaux vaisseaux durant l'angiogenèse (Seiki, 2003). En fait, cette protéase augmente la production de VEGF autant au niveau de l'ARNm qu'au niveau protéique. Cet effet est évidemment

associé à une croissance tumorale et une angiogenèse accélérée (Soulié et al, 2004 ;Sounni et al, 2004). Le rôle primordial de la MT1-MMP au niveau de l'angiogenèse est supporté par l'observation que les souris déficientes en MT1-MMP ne réussissent pas à avoir une réponse angiogénique adéquate dans une étude *in vivo* (Zhou et al, 2000). De plus, l'expression de la MT1-MMP est augmentée par des facteurs angiogéniques tel le VEGF et le bFGF, et cette enzyme coopère avec la SIP et le VEGF pour induire la migration et la différenciation morphogénique en structures de types capillaires (Langlois et al, 2004).

La MT1-MMP a également un rôle de protéase dans des événements intracellulaires en plus de son rôle dans la protéolyse péricellulaire. En effet, la MT1-MMP dégrade la péricentrine, une protéine intégrale des centrosomes, menant à l'instabilité des chromosomes, un prédicteur précoce de la carcinogenèse (Golubkov et al, 2005). Il a également été trouvé que la MT1-MMP sensibilise les cellules endothéliales à l'apoptose puisque la réduction de l'expression de cette enzyme abolit la fragmentation de la vimentine et sa surexpression induit l'activation de la caspase-3 (Langlois et al, 2005).

Face à ces nombreuses fonctions de la MT1-MMP, plusieurs modèles non-exclusifs peuvent être proposés pour expliquer la contribution de l'enzyme à la croissance tumorale : 1. La MT1-MMP peut faciliter l'invasion et la colonisation des tissus conjonctifs près du site d'inoculation, ce qui accroît les chances que les cellules injectées survivent et prolifèrent dans l'environnement de l'hôte, 2. La MT1-MMP peut exercer un effet pro-invasif en dégradant les structures composant la matrice extracellulaire, en clivant des récepteurs de la surface cellulaire tel l'intégrine $\alpha v \beta 3$, CD44 ou la transglutaminase tissulaire (tTG), et en libérant des sites cryptiques à l'intérieur des protéines de la MEC qui favorisent la motilité cellulaire, et 3. la MT1-MMP induit l'angiogenèse, ce qui permet à la tumeur de croître sans limitation (Soulié et al, 2004).

1.4.2 Relations structure-fonction

Chaque domaine de la MT1-MMP, représenté schématiquement à la figure 1.3, joue un rôle distinct (Cao et al, 2004). Des études structure-fonctions effectuées par l'utilisation de mutants de délétion ou encore inactifs ont permis de déterminer le rôle de chacun des domaines de la MT1-MMP.

1.4.2.1 Domaine hémopexine

Une fonction importante de la région hémapexine de la MT1-MMP implique la formation d'un complexe homophilique qui associe deux MT1-MMP ensemble lors de l'activation de la proMMP-2. Le domaine hémapexine est aussi essentiel pour la migration cellulaire médiée par la MT1-MMP (Cao et al, 2004).

1.4.2.2 Domaine cytoplasmique

Le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP joue un rôle critique pour la signalisation externe-interne lors de la migration cellulaire dépendante de la MT1-MMP (Cao et al, 2004 ;Langlois et al, 2004). Le domaine cytoplasmique, et plus précisément la portion centrale de ce domaine, a un rôle important dans l'invasion cellulaire en contrôlant la localisation au front migratoire et la dégradation/régénération de la MT1-MMP (Lehti et al, 2000). Le domaine cytoplasmique est aussi important pour l'internalisation de l'enzyme puisque, contrairement à l'enzyme native qui est rapidement internalisée, des mutants de l'enzyme sans ce domaine demeurent localisés à la surface cellulaire, provoquant l'accumulation de celle-ci à la membrane plasmique, le motif LLY⁵⁷³ étant particulièrement important pour ce phénomène (Cao et al, 2004 ;Jiang et al, 2001 ;Osenkowski et al, 2004 ;Uekita et al, 2001). En plus de l'internalisation, la portion cytoplasmique est reconnue pour jouer un rôle dans la formation d'oligomères et la localisation de l'enzyme aux protusions cellulaires protéolytiquement actives (invadopodes) (Seiki, 2003). La présence du domaine cytoplasmique de la MT1-MMP est également importante pour induire la formation de réseaux de type capillaire bien définis chez les cellules endothéliales (Langlois et al, 2004 ;Sounni et al, 2004). Il est bon de mentionner que la MT1-MMP est palmitoylée à sa cystéine 574, au sein du domaine cytoplasmique, et que cette modification lipidique est critique pour la promotion de la migration cellulaire et l'internalisation médiée par la clathrine (Anilkumar et al, 2005).

1.4.2.3 Domaine catalytique

La fonction enzymatique de la MT1-MMP est requise pour la dégradation des composantes de la MEC, la migration cellulaire et l'augmentation de l'activation de ERK (Annabi et al, 2004 ;Cao et al, 2004 ;Gingras et al, 2001, Langlois et al, 2004). Un mutant de la MT1-MMP sans portion catalytique a également démontré l'importance de ce domaine pour l'activation de la proMMP-2, la croissance cellulaire en matrice de collagène et l'invasion sur Matrigel, autant *in vitro* que *in vivo* (Nonaka et al, 2005). L'action angiogénique de la MT1-MMP est aussi inhibée par l'inactivation du domaine catalytique de la MT1-MMP, comme le démontre l'incapacité du mutant à effectuer la formation de structures de type capillaires (Langlois et al, 2004).

1.4.2.4 Domaine transmembranaire

L'effet immobilisant à la surface cellulaire du domaine transmembranaire de la MT1-MMP est nécessaire pour la dégradation du substrat et la migration dépendante de la MT1-MMP. Par exemple, seules la MT1-MMP et la MT2-MMP sont capables de conférer l'habileté à pénétrer des matrices de collagène de type 1 à des cellules incompetentes pour l'invasion. Cette compétence, indépendante de l'activation de la proMMP-2, requiert l'ancrage de l'enzyme à la membrane (Cao et al, 2004 ;Hotary et al, 2000). Le domaine transmembranaire de la MT1-MMP est également nécessaire pour le trafic de celle-ci à travers les vésicules microtubulaires. Comme l'expression de la MT1-MMP augmente la migration et l'invasion des cellules et que les mutants incapables d'internalisation échouent à ces deux activités, la régénération dynamique de la MT1-MMP par internalisation au front migratoire est importante pour les fonctions de l'enzyme durant la migration et l'invasion (Remacle et al, 2005 ;Uekita et al, 2001).

1.4.3 Régulation de la MT1-MMP

La MT1-MMP est produite sous forme de zymogène inactif de 60 kDa qui est activé intracellulairement par des convertases qui clivent au motif Arg¹⁰⁸-Lys-Arg localisé entre le propeptide et le domaine catalytique, générant la forme activée de 57 kDa (Osenkowski et al, 2004 ;Seiki et Yana, 2003). Comme la MT1-MMP est exprimée sous sa forme active à la surface cellulaire, son inhibition catalytique est une des étapes critique pour la régulation de son activité (Seiki, 2003).

En plus de la régulation transcriptionnelle, l'activité pro-invasive de la MT1-MMP est strictement contrôlée au niveau post-transcriptionnel (Seiki, 2003). Comme toutes les MT-MMPs, la MT1-MMP est inhibée par les inhibiteurs endogènes TIMP-2, -3 et -4, mais non par TIMP-1 (Itoh et Seiki, 2006 ;Osenkowski et al, 2004). La modulation de l'activité de la MT1-MMP à la surface cellulaire peut aussi s'effectuer par des mécanismes aussi divers que le clivage autocatalytique, le relargage de l'ectodomaine, l'homodimérisation et l'internalisation (Osenkowski et al, 2004 ;Toth et al, 2005). Au niveau de l'inactivation par dégradation protéolytique, la modulation par relargage de la MT1-MMP est un évènement autocatalytique qui mène à la génération d'un produit majeur inactif de 44 kDa ancré à la membrane sans domaine catalytique, ainsi que d'un fragment soluble de 18 kDa qui est relâché dans l'espace extracellulaire. Le relargage non-autocatalytique de la MT1-MMP produit une forme soluble majeure de 50-52 kDa, composée de l'ectodomaine entier, encore fonctionnel, et une forme mineure de 25-32 kDa (Osenkowski et al, 2004 ;Seiki, 2003 ;Toth et al, 2005). Les mécanismes de transport intracellulaires régulent aussi la présentation de la MT1-MMP à la surface cellulaire

(Remacle et al, 2005). L'enzyme internalisée peut subir subséquemment une dégradation ou encore être recyclée à la surface cellulaire. L'internalisation ne peut cependant pas être considérée uniquement comme un mécanisme de régulation à la baisse de l'activité enzymatique à la surface cellulaire, car, tel que mentionné plus tôt, cette internalisation constitue également un important mécanisme de la régénération de la MT1-MMP au front migratoire (Cao et al, 2004 ;Jiang et al, 2001 ;Lehti et al, 2000 ;Osenkowski et al, 2004 ;Seiki, 2003). L'internalisation pourrait en effet être un mécanisme qui prévient l'accumulation de MT1-MMP inactivée (par TIMP-2 ou partiellement dégradée) à la surface cellulaire, pour permettre leur substitution par des enzymes fraîchement synthétisées (Uekita et al, 2001). Les cavéoles ont été identifiées comme la voie d'endocytose principale de la MT1-MMP chez les cellules endothéliales (Gálvez et al, 2004). Le trafic cavéolaire représente donc un nouveau mécanisme pour la régulation de la MT1-MMP chez les cellules endothéliales durant l'angiogenèse.

1.4.4 Localisation de la MT1-MMP

La MT1-MMP se localise au front migratoire (lamellipodes) des cellules en mouvement et cette localisation aide à la dégradation de la barrière de la MEC pour faciliter l'invasion (Kajita et al, 2001 ;Nabeshima et al, 2002 ;Seiki, 2003). De plus, chez les cellules cancéreuses et endothéliales, la MT1-MMP est préférentiellement compartimentée et protéolysée dans les cavéoles (Annabi et al, 2001 ;Annabi et al, 2004 ;Navarro et al, 2004). Comme la MT1-MMP a récemment été trouvée associée aux cavéoles, cela soulève la possibilité intéressante qu'elle interagisse avec d'autres protéines de signalisation également associées aux cavéoles pour induire la stimulation de la migration des cellules endothéliales et cancéreuses. Cette localisation pourrait aussi avoir une fonction importante pour le contrôle de son activité enzymatique (Annabi et al, 2001 ;Gingras et al, 2001 ;Labrecque et al, 2004).

1.5 Les adhésions focales

En plus d'avoir un rôle central dans la migration cellulaire et la morphogenèse, les complexes d'adhésion focale sont aussi à l'origine de signaux qui modulent des processus cellulaires tels l'assemblage de la matrice extracellulaire, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Geiger et al, 2001 ;Muñoz-Chàpuli et al, 2004). Dans les sections qui suivent, une description des rôles joués par les adhésions focales, et plus particulièrement par certaines protéines clés de ces complexes est présentée.

1.5.1 Structure et fonctions des complexes d'adhésion focale

Les complexes d'adhésion focale sont des organelles spécialisées de liaison et de signalisation de la membrane extracellulaire, mesurant normalement quelques microns carrés, situés le long de la membrane plasmique ventrale des cellules adhérentes. Ce sont des sites d'ancrages transmembranaires où la MEC est indirectement reliée au cytosquelette d'actine via un réseau de protéines d'ancrage submembranaires. Ils jouent un rôle important dans la régulation de l'organisation de l'actine, ce qui affecte l'étalement, la morphogenèse et la migration cellulaire. La signalisation par les complexes d'adhésion focale régule aussi une grande variété de processus incluant la croissance cellulaire et l'apoptose (Avraham et al, 2003 ;Turner, 2000b ;Zamir et Geiger, 2001a ;2001b). L'adhésion des cellules à la MEC survient suite au regroupement d'intégrines et initie le recrutement de nombreuses protéines cytoplasmiques au complexe d'adhésion focale (Avraham et al, 2003 ;Subauste et al, 2004). Les interactions dynamiques entre les intégrines, les protéines de liaison et les éléments du cytosquelette contrôlent l'assemblage et la distribution des adhésions focales et donc de la morphologie et la motilité cellulaire (Wu et al, 2003).

Les complexes d'adhésion sont des structures dynamiques et hétérogènes qui varient en taille et en organisation (Parsons et al, 2000). Plus de 50 protéines ont été rapportées comme étant associées aux contacts focaux et reliées à l'adhésion à la MEC. Les sites d'adhésion focale sont composés d'intégrines, de protéoglycans, de récepteurs à glycosaminoglycans et de molécules de signalisation. Les protéines comprennent des protéines du cytosquelette (tensine, vinculine, paxilline, α -actinine, parvine/actoplasmine, taline), des tyrosine kinases (Src, FAK, PYK2, Csk, ABL), des sérine/thréonines kinases (ILK, PKC, PAK), des modulateurs des petites protéines G (ASAP1, Graf, PSGAP), des tyrosine phosphatases (SHP-2, LAP, PTP) et d'autres enzymes (PI3K, calpaïne II) (Zamir et Geiger, 2001b). Ces protéines incluent donc autant des protéines structurales que des protéines de signalisation catalytiquement actives (Avraham et al, 2003). La plupart d'entre elles ont de multiples domaines par lesquels elles peuvent interagir avec différents partenaires moléculaires, ce qui crée un réseau protéique hétérogène très dense à la face cytoplasmique des sites d'adhésion et, théoriquement, ces complexes moléculaires peuvent s'assembler en un nombre incalculable de combinaisons (figure 1.4). La diversité moléculaire et structurale de cette plaque submembranaire est régulée par une grande variété de mécanismes, dont la compétition entre les différents partenaires protéiques pour le même site de liaison, les interactions modulées par la phosphorylation des résidus tyrosines, et des changements conformationnels chez certaines protéines, ce qui affecte leur réactivité (Zamir et Geiger, 2001b ;Cornillon et al, 2003).

La compréhension des composantes des complexes d'adhésion focale et leur organisation précise est importante pour déterminer leur fonction dans l'interaction mécanique avec la matrice ainsi que dans la génération et la transduction des signaux médiés par l'adhésion (Zamir et Geiger, 2001a). La coordination ou l'intégration des signaux de l'adhésion ou des facteurs de croissance est facilitée par la proximité physique de molécules clés de la cascade de signalisation (Turner, 2000a). Les contacts focaux, médiés par la liaison des intégrines aux protéines de la matrice, doivent être régulés pour générer une force de traction à l'avant de la cellule migrante et initier le mouvement directionnel. Ce sont les kinases et les molécules adaptatrices, incluant FAK, Src, p130^{cas}, paxilline, ERK et MLCK (myosin light-chain kinase) qui sont critiques pour le renouvellement des complexes d'adhésion focale à l'avant des cellules (Hauck et al, 2001 ;Webb et al, 2004). La signalisation par l'adhésion déclenche la phosphorylation d'une multitude de protéines, incluant la paxilline, la tensine, et FAK (Katz et al, 2003). Cette phosphorylation des protéines des complexes d'adhésion fournit un mécanisme pour le remodelage des adhésions focales (Panetti, 2002). Les changements du cytoquelette associés à la formation des complexes moléculaires intracellulaires aux sites d'adhésion impliquent le développement de fibres de stress, de lamellipodes et de filipodes. Ces changements sont principalement régulés par la superfamille Ras des petites GTPases RhoA, Rac et Cdc42 (Geiger et al, 2001 ;Muñoz-Chàpuli et al, 2004).

1.5.2 Les intégrines

Les intégrines sont des hétérodimères qui contiennent une unité α et une unité β , chaque sous-unité ayant un grand domaine extracellulaire, une région transmembranaire traversant une seule fois la membrane et, dans la plupart des cas, un petit domaine cytoplasmique. Aux complexes d'adhésion focale, des regroupements d'intégrines se lient extérieurement aux protéines de la matrice extracellulaire et intérieurement à plusieurs protéines cytoplasmiques spécialisées qui se lient à leur tour aux filaments d'actine (Aplin et al, 1998). Étant donné l'absence d'activité catalytique chez les intégrines, la force mécanique et les signaux chimiques sont transmis via un réseau de protéines associées aux intégrines (Wu et al, 2003). Les adhésions cellulaires médiées par les intégrines fournissent donc des liens dynamiques et bidirectionnels entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette (Geiger et al, 2001).

En plus de servir de molécules d'adhésion de la MEC, les intégrines peuvent aussi transmettre des signaux biochimiques à la cellule pour affecter de nombreuses protéines et seconds messagers, tels les

tyrosine kinases, les sérine/thréonine kinases, les médiateurs lipidiques, les petites protéines G et les flux de calcium. Ces voies de signalisation régulent une grande variété de fonctions cellulaires, comme l'étalement, la prolifération, la sécrétion des MMPs, l'apoptose, la migration et la progression du cycle cellulaire (Cary et Guan, 1999 ; Nasertorabi et al, 2004). L'activation des intégrines par les forces de cisaillement mène à la phosphorylation des protéines des complexes d'adhésion focale, tel la paxilline et FAK, ce qui facilite le remodelage des adhésions focales. Des protéines cytosoliques comme Fyn et Shc sont aussi recrutées aux sites d'intégrines, ce qui initie une cascade de transduction de signaux qui résulte ultimement à des transcriptions géniques en aval (Radel et Rizzo, 2005). Les signaux médiés par les intégrines ou les cytokines sont connus pour réguler la régénération des contacts focaux, la polymérisation de l'actine et la contraction cellulaire (Cho et Klemke, 2000).

1.5.3 La kinase FAK

FAK (*focal adhesion kinase*) est une protéine cytoplasmique ubiquitaire de 125 kDa qui est retrouvée au sein des complexes d'adhésion (figure 1.5). De nombreuses études *in vitro* et de récentes évaluations de souris avec des délétions ciblées ont permis d'identifier FAK et les kinases de la famille de Src comme des médiateurs clés de la signalisation des intégrines (Wei et al, 1999). FAK est une composante de signalisation cruciale qui fonctionne comme biosenseur et intégrateur pour contrôler plusieurs comportements cellulaires (Mitra et al, 2005). Plusieurs rapports ont relié l'expression de FAK aux cancers du sein, du colon, de la prostate, de la thyroïde, des ovaires et du mésenchyme. L'augmentation de l'expression de FAK et de son activité est en effet fréquemment corrélée avec des maladies malignes ou métastatiques et des mauvais pronostics (Cornillon et al, 2003 ; Hauck et al, 2001 ; 2002 ; McLean et al, 2005 ; Tremblay et al, 1996 ; Wu et al, 2005).

L'activation de FAK par les intégrines, les différents facteurs de croissance, les cytokines ou certaines hormones se traduit par l'autophosphorylation de son résidu tyrosine 397, qui déclenche la phosphorylation en cascade de ses autres résidus tyrosines. La phosphorylation de Y³⁹⁷ libère un site de liaison de forte affinité pour les protéines contenant un domaine SH2, comme Src, qui est recrutée et activée à ce site. Cela résulte en un complexe signalitique doublement activé FAK/Src, qui permet à Src de phosphoryler les autres résidus tyrosines (Tyr⁴⁰⁷, Tyr⁵⁷⁶, Tyr⁵⁷⁷, Tyr⁸⁶¹ et Tyr⁹²⁵) de FAK. Les phosphorylations des tyrosines 576 et 577 augmentent l'activité enzymatique de FAK et permettent la création de nouveaux sites de liaison pour d'autres effecteurs (Aplin et al, 1998 ; Cornillon et al, 2003 ; Hamadi et al, 2005 ; Mitra et al, 2005 ; McLean et al, 2005). Après son activation, FAK phosphorylée libère plusieurs sites de fixation pour des protéines contenant des domaines SH2. Ces sites vont

permettre le recrutement successif des protéines du complexe d'adhésion. Dans un second temps, ces différentes protéines vont subir à leur tour une activation entraînant la mise en route de cascades de voies régulatrices importantes comme ERK/MAPK, PI3-kinase et les réarrangements du cytosquelette (Cornillon et al, 2003 ;Teixeira et al, 1999).

Les multiples sites d'interaction protéine-protéine de FAK lui permettent de s'associer à des protéines structurales et adaptatrices permettant la modulation des kinases MAP (*mitogen-activated protein*), des kinases SAP (*stress-activated protein*) et de l'activité des petites GTPases (Hauck et al, 2002 ;McLean et al, 2005 ;Mitra et al, 2005). Parmi ses associations connues, FAK interagit avec p130^{cas}, Gbr2, Shc, la taline, ASAP1, GRAF, la paxilline et la kinase Src. Les connections moléculaires uniques de FAK permettent à cette tyrosine kinase de fonctionner comme un régulateur important de la morphologie, de l'adhésion et de la motilité cellulaire. En effet, autant chez les cellules normales que chez les cellules transformées, la signalisation de FAK peut promouvoir une augmentation de la motilité cellulaire (Mitra et al, 2005). En fait, il y a une prépondérance de preuves montrant que FAK joue un rôle critique dans la motilité cellulaire. Par contre, bien que l'activation de FAK a d'abord été postulée comme étant responsable de l'établissement de complexes d'adhésion focale, des découvertes récentes suggèrent que FAK régule plutôt le désassemblage de ces structures afin de permettre le mouvement de la cellule (Aplin et al, 1998 ;Wu et al, 2003). En effet, les cellules transformées par v-src exhibent des complexes d'adhésion focale réduits, qui coïncident avec la perte d'adhérence. De plus, la localisation de FAK aux adhésions focales augmente lorsque Src ou une combinaison de Src, Yes et Fyn sont absents. L'hyperphosphorylation de FAK aurait donc un effet délétère sur les cellules (Aplin et al, 1998; Avizienyte et Frame, 2005 ;Katz et al, 2003). La signalisation de FAK/Src interrompt la maturation des sites d'adhésion en provoquant leur désassemblage (par la modulation de la contractibilité de l'actomyosine à travers ERK et MLCK) et permet donc une régénération continue des sites d'adhésions alors que la cellule avance (Webb et al, 2004).

L'inactivation spécifique du gène de FAK au niveau des cellules endothéliales mène à des défauts du développement vasculaire et de l'angiogenèse, responsables d'hémorragies, d'œdèmes et de la mort chez les embryons. Cela indique que l'expression de FAK est nécessaire pour le développement vasculaire lors de l'embryogenèse tardive (Shen et al, 2005). Dans le même sens, une stimulation par le VEGF produit une augmentation marquée de la phosphorylation des tyrosines de FAK et de la paxilline, de façon rapide et dose-dépendante dans les deux cas (Abedi et Zachary, 1997 ;Le Bœuf et al, 2004 ;Wu et al, 2003). FAK promeut également la motilité et le remodelage des contacts focaux en

partie par l'expression élevée et la sécrétion de MMPs (MMP-9) associées à un phénotype cellulaire de tumeur métastatique (Hauck et al, 2001 ;Mitra et al, 2005). De plus, FAK est aussi indirectement une protéine anti-apoptotique car elle potentialise la prolifération et la survie cellulaire (Cho et Klemke, 2000 ;Cornillon et al, 2003 ;McLean et al, 2005).

L'activité de FAK est principalement régulée par sa phosphorylation (Wu et al, 2003). La phosphorylation des tyrosines de FAK (dont Y³⁹⁷) est en effet un déterminant clé pour le contrôle de la régénération des complexes d'adhésion focale par FAK (Hamadi et al, 2005). La phosphorylation est élevée en réponse à des stimuli cellulaires distincts, tels l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines, les neuropeptides mitogéniques, l'acide lysophosphatidique, les facteurs de croissance dérivés des plaquettes, Rho activé et la transformation par v-Src et v-Crk (Polte et Hanks, 1997). Les fonctions de FAK sont contrôlées par la phosphorylation, mais aussi par clivage. Par exemple, le collagène dégradé peut induire le clivage de FAK en activant des protéases intracellulaires semblables à la calpaïne. Le clivage de FAK peut perturber ses fonctions et altérer ses associations avec d'autres protéines des complexes d'adhésion focale. FAK est aussi clivée chez les cellules surexprimant les MT-MMPs (Cornillon et al, 2003 ;Shofuda et al, 2004). L'inhibition de FAK peut aussi être obtenue par l'intervention de la FRNK (*FAK-related non-kinase*). Cette protéine endogène contient la séquence qui dirige FAK vers les adhésions focales, mais n'a pas d'activité kinase. La FRNK est exprimée de façon autonome chez plusieurs types cellulaires et régule négativement l'activité de FAK (Wu et al, 2003).

Comme FAK est surexprimée chez plusieurs types de tumeurs et qu'elle est associée à de mauvais pronostics, cette protéine pourrait devenir une cible thérapeutique intéressante. Des études préliminaires montrent que l'administration systémique de siRNA de FAK à des souris résulte en l'inhibition des métastases dans un modèle de cancer du pancréas. La modulation des niveaux protéiques de FAK influence aussi la sensibilité des cellules tumorales à divers agents de chimiothérapie, ce qui est encourageant pour la suite... (McLean et al, 2005).

1.5.4 La protéine p130^{cas}

p130^{cas}, une protéine de 130 kDa associée à Crk, a d'abord été identifiée comme une protéine avec des tyrosines hyperphosphorylées chez des cellules transformées par v-Src et v-Crk (Cary et Guan, 1999 ;Cornillon et al, 2003 ;Polte et Hanks, 1997). Bien que p130^{cas} n'ait pas d'activité kinase intrinsèque, elle possède de nombreux domaines avec des sites de phosphorylation pour médier des

interactions protéine-protéine (figure 1.5) (Nasertorabi et al, 2004). Elle possède un seul domaine SH3 et de multiples résidus tyrosines qui sont potentiellement des sites de liaison pour des domaines SH2. La portion C-terminale de p130^{cas} a aussi un site de liaison pour les kinases de la famille de Src via leurs domaines SH2 et SH3 (Cary et Guan, 1999 ;Nojima et al, 1996). p130^{cas} fait partie de la grande famille des protéines adaptatrices.

p130^{cas} se lie à la protéine Crk par une liaison via les domaines SH2/SH3. Ce complexe, auquel s'ajoute la paxilline, transmet un signal activateur pour une autre protéine de la famille Ras, Rac1, aboutissant à une activation de PAK, puis de ERK. p130^{cas} est aussi impliquée dans l'activation de la voie JNK (Cornillon et al, 2003). Autant le niveau de p130^{cas} phosphorylée que le niveau d'interaction p130^{cas}/Crk sont directement corrélés avec le niveau de transformation des cellules malignes (Nasertorabi et al, 2004). Les cellules transfectées transitoirement par p130^{cas} et Crk montrent des accroissements de leur migration et de leur survie, mais non de leur prolifération. De plus, des cellules d'adénocarcinomes FG-M, qui forment de 4 à 5 fois plus de métastases chez le modèle animal, montrent un plus grand nombre de complexes p130^{cas}/Crk que les cellules non-invasives FG (Cho et Klemke, 2000).

La protéine p130^{cas} se colocalise aux complexes d'adhésion focale et une élévation de son contenu en tyrosines phosphorylées se produit sous des circonstances connues pour activer FAK, tels la transformation oncogénique, l'adhésion cellulaire, le traitement avec des mitogènes, l'acide lysophosphatidique, et les facteurs de croissance dérivés des plaquettes (Nasertorabi et al, 2004 ;Polte et Hanks, 1997). La phosphorylation des tyrosines de p130^{cas} régule son association avec les kinases de la famille de Src, et le site principal pour cette phosphorylation est la tyrosine 762 située dans son domaine de liaison à Src (Nasertorabi et al, 2006). La liaison de p130^{cas} à FAK est aussi liée à une augmentation de la phosphorylation de p130^{cas} à plusieurs sites, ce qui accroît la liaison SH2 de la protéine adaptatrice Crk à p130^{cas}. La signalisation en aval résulte en une augmentation de l'activité de Ras, un accroissement de la formation de lamellipodes et la promotion de la motilité cellulaire et de l'invasion (Mitra et al, 2005). C'est la région riche en prolines de FAK, entre les acides aminés 712 et 718, qui est le site de liaison du domaine SH3 de p130^{cas}. Il y a un second site de liaison riche en prolines, les acides aminés 875-884, qui peut aussi lier p130^{cas} à FAK (Cary et al, 1998). p130^{cas} est un médiateur de la migration dépendante de FAK et le complexe FAK/p130^{cas} promeut la migration cellulaire (Cary et al, 1998). La p130^{cas} déphosphorylée a aussi été rapportée pour se dissocier des complexes d'adhésion focale (Zaidel-Bar et al, 2005). Il est intéressant de noter également que la délétion du gène de p130^{cas} chez les souris provoque la mort embryonnaire due à la déformation du

cœur et des vaisseaux sanguins, ce qui suggère que cette protéine aurait un rôle également lors de l'angiogenèse (Panetti, 2002).

1.5.5 La Paxilline

La paxilline est une protéine adaptatrice à plusieurs domaines trouvée à l'interface entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine (figure 1.5) (Turner, 2000a). Sa fonction principale est d'être un adaptateur moléculaire qui fournit des sites d'ancrage à la membrane plasmique pour une variété de protéines structurales et signalétiques (Aplin et al, 1998 ;Turner, 2000b). Bien qu'elle soit de petite taille, 68 kDa, la paxilline contient plusieurs modules de liaisons de protéines qui lui permettent de lier une grande variété de molécules de structure et de signalisation qui sont impliquées dans les changements de l'organisation du cytosquelette d'actine et qui sont donc nécessaires à la motilité cellulaire (Turner, 2000a ;2000b). Dans plusieurs essais de liaison *in vitro* et *in vivo*, il a été trouvé que la paxilline se lie à la vinculine, la sous-unité β des intégrines, les kinases de la famille de Src, FAK, Csk (*C-terminal kinase*), Crk et la phosphatase PTP-PEST. Par contre, puisqu'elle n'a pas d'activité enzymatique, la paxilline est surtout vue comme une protéine d'échafaudage des complexes d'adhésion focale qui permet les interactions avec les autres protéines de signalisation ou du cytosquelette (Ballestrem et al, 2006 ;Cary et Guan, 1999). L'espacement entre les motifs LD (répétitions leucine-acide aspartique) sur la paxilline permet la liaison simultanée de plusieurs protéines, facilitant ainsi l'interaction physique et la transmission du signal entre elles (Turner, 2000a).

La phosphorylation des tyrosines de FAK est associée chez plusieurs types cellulaires à la phosphorylation de la paxilline. Cette dernière s'associe avec FAK et en est un substrat (Abedi et Zachary, 1997). Le complexe FAK/Src phosphoryle la paxilline à deux sites principaux, la tyrosine 31 et la tyrosine 118, ce qui augmente la liaison SH2 de Crk à la paxilline et mène à une augmentation de la régénération des complexes d'adhésion focale (Mitra et al, 2005 ;Panetti, 2002 ;Turner, 2000a). La phosphorylation de la paxilline est une étape précoce et prérequise à l'étalement cellulaire, puisque la paxilline précède FAK aux complexes d'adhésion focale (Panetti, 2002). Selon certaines études, ce serait la paxilline qui recruterait FAK aux complexes d'adhésion focale pour réguler l'organisation du cytosquelette d'actine (Cary et Guan, 1999 ;Webb et al, 2004). La phosphorylation des tyrosines de la paxilline pourrait aussi moduler l'activité de Src en amenant Csk, un régulateur négatif de la kinase Src, à proximité (Ren et al, 2004).

Comme de nombreuses autres protéines des complexes d'adhésion focale, la paxilline est régulée à la hausse chez plusieurs types de tumeurs, comme les cancers du rein, des poumons et du sein (Turner, 2000a).

1.5.6 La kinase Src

Les SFK (*Src Family Kinases*), comprenant la kinase Src ainsi que Yes, Fyn, Fgr et Hck, partagent les mêmes caractéristiques structurales : une myristylation et une localisation membranaire en N-terminal, un domaine SH2, un domaine SH3, un domaine catalytique ainsi qu'une petite région C-terminale (Aplin et al, 1998). c-Src peut être activée par plusieurs stimuli extracellulaire, incluant la MEC à travers les intégrines, les facteurs de croissance à travers leurs récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinases, les agonistes des récepteurs couplés aux protéines G, des signaux impliqués dans l'activation des lymphocytes B et T et l'irradiation aux U.V. (Aplin et al, 1998).

Les tyrosine kinases de la famille de Src sont des protéines cytosoliques qui fonctionnent intimement avec FAK au cours de la signalisation provenant des intégrines (Cary et Guan, 1999 ;Wei et al, 1999). Src a un rôle dans les voies de signalisation menant à l'activation et à la stabilisation des complexes FAK/p130^{cas} avec le cytosquelette. L'activation et la redistribution de Src aux contacts focaux surviennent lors de l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines, qui se produit en parallèle avec la localisation de FAK et de p130^{cas} à ces mêmes structures (Polte et Hanks, 1997). En fait, la kinase Src est, la plupart du temps, pratiquement inactive due à son auto-inhibition par des interactions intramoléculaires entre son domaine SH2 et sa phosphotyrosine 530 et entre son domaine SH3 et une séquence riche en proline. Il est bon de mentionner que l'action inhibitrice de Csk provient justement de sa capacité à phosphoryler la tyrosine 530 de Src, bloquant ainsi l'accès du domaine catalytique aux substrats (Ren et al, 2004). Une augmentation de l'activité de Src est souvent associée à la réorganisation du système d'adhésion épithélial qui mène à un phénotype migratoire. Les kinases de la famille de Src sont en effet requises pour l'intégrité de l'architecture des tissus épithéliaux, mais une trop forte activité kinase joue un rôle négatif dans l'assemblage et la maintenance des adhésions intercellulaires (Avizienyte et Frame, 2005).

1.6 Les cavéoles

1.6.1 Propriétés morphologiques et biochimiques des cavéoles

Les cavéoles, ou vésicules plasmalemmales, apparaissent typiquement comme des invaginations rondes de la membrane plasmique de 50-80 nm de diamètre (figure 1.6). Leur composition, apparence et fonction sont dépendantes du type cellulaire (Pelkmans et Helenius, 2002 ;Razani et Lisanti, 2001b ;Razani et al, 2002). Elles sont normalement très riches en cholestérol, en sphingomyéline, en glycosphingolipides et en une famille de protéines membranaires de 22 kDa appelées cavéolines (Pelkmans et Helenius, 2002 ;Teixeira et al, 1999). La forte concentration des cavéoles en cholestérol et phospholipides contribue à la faible densité et à l'insolubilité de ces microstructures dans les détergents non-ioniques comme le Triton X-100 à 4°C (Annabi et al, 2001 ;Labrecque et al, 2003 ;Razani et Lisanti, 2001b). Bien que la plupart des cellules différenciées contiennent des cavéoles, celles-ci sont particulièrement abondantes chez les cellules endothéliales, les adipocytes, les fibroblastes, les pneumocytes de type 1 et les cellules des muscles lisse et strié (Gálvez et al, 2004 ;Razani et al, 2002 ;Teixeira et al, 1999).

Initialement identifiées comme compartiments de transcytose chez les cellules endothéliales, les cavéoles semblent posséder un grand nombre de fonctions (Teixeira et al, 1999). Les cavéoles sont importantes pour le transport vésiculaire, l'hémostase du cholestérol, la transmission des signaux cellulaires et la suppression des tumeurs (Pelkmans et al, 2005 ;Razani et Lisanti, 2001b ;Razani et al, 2002). Des observations récentes montrent en effet que les cavéoles de la plupart des types cellulaires différenciés sont riches en protéines G et autres molécules de signalisation, certaines à des concentrations pouvant atteindre plusieurs fois celles de la membrane plasmique normale, ce qui suggère un rôle de ces structures dans la transduction du signal (Razani et Lisanti, 2001b ;Teixeira et al, 1999 ;Wei et al, 1999). Une activité tyrosine kinase a d'ailleurs été observée dans ces microdomaines spécialisés, ce qui supporte l'implication des cavéoles dans les événements de signalisation transmembranaires. De plus, chez les cellules neuronales, les cavéoles sont activement impliquées dans la réorganisation du cytosquelette, ce qui mène à la formation des fibres de stress et des complexes d'adhésion focale (Teixeira et al, 1999). Comme les cavéoles et la cavéoline-1 sont polarisées chez les cellules endothéliales migrantes, un rôle dans la motilité cellulaire est également suggéré (Navarro et al, 2004).

Il est à noter que les cavéoles sont les hôtes des MMPs, dont la MT1-MMP, ce qui soulève la possibilité intéressante que cette protéase interagisse avec d'autres protéines de signalisation associées aux cavéoles pour induire la stimulation des fonctions des cellules endothéliales (Annabi et al, 2001 ;Labrecque et al, 2004 ;Navarro et al, 2004).

1.6.2 Structure et fonctions des cavéolines

Les cavéolines sont des protéines intégrales de la membrane plasmique, de 22 kDa, qui lient le cholestérol et un certain nombre de molécules de signalisation (Cho et al, 2004). La famille comprends trois isoformes, la cavéoline-1, -2 et -3. Les cavéolines-1 et -2 sont hautement exprimées dans les adipocytes, les cellules endothéliales, les pneumocytes et les fibroblastes alors que l'expression de la cavéoline-3 est limitée aux cellules de type musculaire (Razani et Lisanti, 2001b ;Wei et al, 1999). Les cavéolines existent principalement sous forme de complexes oligomériques hautement organisés de 14 à 16 monomères (Razani et al, 2002). Les gènes des cavéolines sont conservés structurellement et fonctionnellement depuis les nématodes (*Caenorhabditis elegans*) jusqu'à l'homme, ce qui supporte l'idée que les fonctions des cavéolines ont joué un rôle crucial tout au cours de l'évolution (Okamoto et al, 1998).

Les cavéolines sont essentielles pour la formation et la stabilité des cavéoles. En leur absence, il n'y a pas de cavéoles et si elles sont surexprimées chez des cellules ne possédant pas ces structures, elles induisent la formation de cavéoles (Pelkmans et Helenius, 2002). Les complexes oligomériques de la cavéoline-1 confèrent aussi une stabilité structurale permanente aux vésicules cavéolaires qui interagissent transitoirement avec des endosomes pour former des sous-domaines et relâcher leur cargo sélectivement (Pelkmans et al, 2004). Les cavéolines provoquent la formation des cavéoles et des cavéosomes, elles modulent les interactions cellulaires avec la MEC, elles rassemblent et régulent des molécules de signalisation et elles effectuent le transport du cholestérol (Navarro et al, 2004 ;Razani et al, 2002).

La cavéoline-1 est concentrée à l'arrière des cellules migrantes. Suite à une stimulation à la fibronectine chez des cellules endothéliales, la forme phosphorylée à la tyrosine 14 de cet isoforme s'associe aux complexes d'adhésion focale au niveau des lamellipodes des cellules migrantes. La cavéoline-1 se distribue donc différemment selon son degré d'activation par phosphorylation. La perte de la polarité de la cavéoline-1 par délétion ciblée de la protéine empêche la polarisation de la cellule endothéliale et empêche par le fait même le mouvement dirigé (Beardsley et al, 2005).

La cavéoline-1 phosphorylée interagit spécifiquement avec Csk, un régulateur négatif des SFK, ce qui suggère qu'elle est impliquée dans la régulation négative de l'activité des kinases de la famille de Src (Labrecque et al, 2004). En fait, la cavéoline-1 a comme fonction de séquestrer les kinases de la famille de Src en une configuration inactive à des sites proximaux des intégrines, ce qui permet leur présentation aux intégrines et leur activation durant le regroupement des intégrines induit par les ligands (Radel et Rizzo, 2005 ;Wei et al, 1999). Src activée phosphoryle alors p190RhoGAP, ce qui résulte à la régulation à la baisse de l'activité de RhoA, ainsi qu'au désassemblage des fibres de stress d'actine et des complexes d'adhésion focale (Navarro et al, 2004 ;Wei et al, 1999). La cavéoline-1 forme des complexes avec l'intégrine $\beta 1$. Il a été démontré que la déplétion de cavéoline-1 détruit les associations entre la kinase Src et l'intégrine $\beta 1$, ce qui résulte en pertes des sites d'adhésion focale, de la phosphorylation de la protéine FAK induite par les ligands et de l'adhésion (Wei et al, 1999). La cavéoline-1 joue donc un rôle important dans la formation des complexes focaux et participe à la cascade de signalisation de l'adhésion (Cho et al, 2004 ;Wei et al, 1999).

Au niveau des cellules endothéliales, le récepteur VEGFR-2 est localisé dans les cavéoles et est associé à la cavéoline-1. Ce complexe est rapidement dissocié suite à une stimulation par le VEGF, ce qui mène à la phosphorylation de la cavéoline-1 par les kinases de la famille de Src. En fait, la cavéoline-1 est phosphorylée sur son résidu Tyr¹⁴ en réponse à un certain nombre de facteurs de croissance, tels le VEGF, l'EGF et le PDGF, et plusieurs preuves indiquent que les kinases de la famille de Src jouent un rôle dans ce processus. De ces résultats, il est suspecté que la cavéoline-1 agit comme régulateur négatif de l'activité du VEGFR-2 et qu'une stimulation du récepteur par le VEGF provoque l'activation de cette voie de signalisation en induisant la dissociation du récepteur de l'action inhibitrice de la cavéoline-1 (Labrecque et al, 2003 ;2004). La cavéoline-1 est impliquée dans la régulation négative d'activités de signalisation via une interaction directe de son domaine d'échafaudage, des acides aminés 82 à 101, avec une séquence consensus présente chez plusieurs protéines, dont les récepteurs à l'EGF et au PDGF, les kinases Src et Fyn et les protéines G hétérotrimériques. De façon intéressante, l'interaction de la cavéoline-1 avec ces protéines de transduction inhibe l'activité de ces protéines. Vu l'importance de ces protéines dans la croissance cellulaire et dans la mitogenèse, l'activité de régulation négative de la cavéoline-1 suggère qu'elle agit comme suppresseur de tumeur potentiel (Annabi et al, 2001 ;del Pozo et al, 2005 ;Labrecque et al, 2003 ;Razani et Lisanti, 2001b). De plus, le gène de la cavéoline-1 est situé à un locus suspecté agir comme suppresseur de tumeur (7q31.1) et qui est délété chez plusieurs cancers humains (Galbiati et al, 1998 ;Labrecque et al, 2003 ;Razani et al, 2001a). Dans le même sens, la perturbation de la cavéoline-

Il résulte en une prolifération incontrôlée des cellules endothéliales *in vivo* (Razani et Lisanti, 2001b) et la réduction des niveaux de cavéoline-1 à l'aide d'oligonucléotides antisens provoque une inhibition de l'angiogenèse *in vitro* (Griffoni et al, 2000). De plus, la régulation à la baisse de la cavéoline-1 est suffisante pour provoquer la transformation des cellules et l'hyperactivation de la cascade de la kinase ERK (Cho et al, 2004).

Il est à noter également que les cellules COS-7 transfectées avec la MT1-MMP ont des accroissements notables de leur potentiel migratoire, mais que l'expression simultanée de la cavéoline-1 antagonise complètement cet effet. Cela signifie que la cavéoline-1 interagit physiquement avec la MT1-MMP ou encore qu'elle module les événements de transductions impliqués dans la migration cellulaire qui sont dépendants de la MT1-MMP (Annabi et al, 2001).

1.7 Hémostase et cancer

1.7.1 Relation entre le système de coagulation et le cancer

Le système de coagulation est activé chez la plupart des patients cancéreux et il semble jouer un rôle important dans la biologie du cancer. En fait, des coagulopathies surviennent chez 80% des patients atteints de cancers disséminés et elles comptent pour un pourcentage significatif de la morbidité et de la mortalité associées à ces pathologies (Nash et al, 2001 ;Rickles et al, 2001). Les premiers stades du développement du cancer prédisposent en effet l'organisme à l'hypercoagulation du sang par des mécanismes indépendants de ceux des stades avancés du cancer, où des dommages tissulaires massifs peuvent provoquer des catastrophes hémostatiques. Le clinicien Armand Trousseau, en 1865, a été le premier à décrire une association clinique entre les cancers et les troubles de la coagulation (Boccaccio et Comoglio, 2005 ;Rickles et al, 2001). Des dysfonctions de la coagulation de différentes natures et magnitudes, allant des anomalies subtiles de laboratoire aux thromboembolies, thrombophlébites et dissémination intravasculaire de la coagulation, sont fréquemment observés chez les patients cancéreux (Wojtukiewicz et al, 2001). D'une certaine façon, le cancer peut être comparé à une blessure qui ne guérit pas (Boccaccio et Comoglio, 2005).

1.7.2 Le rôle de la sphingosine 1-phosphate pour la progression du cancer

La sphingosine 1-phosphate (S1P) est un lipide bioactif du sérum abondamment entreposé dans les plaquettes et qui est sécrété suite à leur stimulation (Liu et al, 2000 ;Osaki et al, 2003). Les cellules tumorales activent les plaquettes sanguines (Rickles et al, 2001). Il est intéressant de noter que des agents anti-plaquettaires sont effectifs pour la réduction des métastases chez plusieurs modèles expérimentaux, ce qui suggère que les plaquettes ont bel et bien un rôle dans la promotion des métastases tumorales (Nash et al, 2001). D'autres cellules sanguines produisent et sécrètent aussi la S1P constitutivement, dont les érythrocytes, les neutrophiles et les cellules mononucléaires, ce qui résulte à un taux significatif de S1P dans le sang (Liu et al, 2000). De plus, divers stimuli externes, incluant le PDGF, le VEGF et le TNF- α , stimulent la SphK1 (sphingosine kinase), générant de la S1P au niveau intracellulaire (Chalfant et Spiegel, 2005 ;Shu et al, 2002). La S1P est une molécule unique car elle peut fonctionner autant comme molécule de signalisation extracellulaire que comme second messenger intracellulaire. Les récepteurs de la surface cellulaire pour la S1P sont des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques de la famille Edg. Pour ce qui est des cibles intracellulaires, elles restent équivoques, mais affectent les voies de signalisation contrôlant la prolifération et la survie cellulaire (Shu et al, 2002).

La S1P régule une grande variété de réponses cellulaires, dont la survie cellulaire, le remodelage du cytosquelette, la chimiotaxie, la réponse angiogénique, la vasculogénèse, la prolifération, l'agrégation des plaquettes, la formation des fibres de stress, la synthèse de NO, la rétraction des neurites, les fonctions immunes et la migration des cellules tumorales. Des études *in vitro* montrent clairement que c'est l'un des plus puissants inducteurs de la migration des cellules endothéliales. De plus, le nombre de rapports sur la signalisation cellulaire médiée par la S1P a explosé au cours des dernières années (Chae et al, 2004 ;Chalfant et Spiegel, 2005 ;Gonzalez et al, 2006 ;Liu et al, 2000 ;Osaki et al, 2003). La S1P potentialise grandement la réponse angiogénique induite par le VEGF et le FGF (Chae et al, 2004 ;Osaki et al, 2003 ;Rosenfeldt et al, 2001). Elle induit fortement l'activation des cellules endothéliales, ce qui résulte en un accroissement de la motilité cellulaire, de la maturation vasculaire et de l'angiogénèse (McVerry et Garcia, 2005). La S1P commence donc à être reconnue comme un médiateur critique de la croissance et de la maintenance du système vasculaire. L'expression du récepteur Edg-1 (*endothelial differentiation gene-1*), le principal récepteur de la S1P, est d'ailleurs fortement induite dans les vaisseaux tumoraux (Osaki et al, 2003). Tel qu'illustré par la mort précoce des souris Edg-1^{-/-}, le récepteur est requis pour la stabilisation des nouveaux vaisseaux sanguins durant le développement embryonnaire (Chae et al, 2004 ;Liu et al, 2000). La S1P agit à

travers ses récepteurs membranaires, mais elle peut également avoir des cibles intracellulaires directes. Par exemple, l'activation des voies de signalisation de Ras et ERK par le VEGF nécessite la SphK1 et est indépendante des récepteurs à la S1P, contrairement aux réarrangements du cytosquelette et la motilité cellulaire (Chalfant et Spiegel, 2005).

Une étude de notre laboratoire a démontré que la S1P induit l'expression de l'ARN messager et de la protéine de MT1-MMP (Annabi et al, 2003). Chez les cellules stromales dérivées de la moelle osseuse (MSC), la migration et la formation de structures de type capillaire *in vitro* sont induites par ce lipide bioactif, des événements qui sont antagonisés par l'ilomastat, un inhibiteur à large spectre des MMPs (Annabi et al, 2003). De plus, la S1P est le facteur sérique essentiel dont l'action sur la migration et la différenciation morphogénique dépendante de la MT1-MMP est prédominante. Ces deux processus impliquent la coopération de l'enzyme avec la S1P, à travers l'activation des récepteurs Edg-1 et Edg 3 couplés à la protéine $G_{\alpha i}$ (Langlois et al, 2004). Étant donné l'importance de la contribution des plaquettes pour l'angiogenèse tumorale, la stimulation des fonctions de la MT1-MMP endothéliale par la S1P constitue un événement moléculaire important permettant de relier l'hémostase au processus angiogénique.

1.8 Buts de la recherche

L'implication des métalloprotéases de la matrice extracellulaire a été clairement établie pour la promotion de la migration, l'invasion, l'angiogenèse et la prolifération des cellules tumorales. La MMP membranaire de type 1 est reconnue pour jouer un rôle clé lors de ces processus. Toutefois, beaucoup de questions restent encore en suspens en ce qui concerne les mécanismes responsables de ces actions. Récemment, il a été proposé que la MT1-MMP interagit avec les complexes d'adhésion focale et qu'elle favorise leur régénération (Takano et al, 2006).

Les objectifs de notre étude sont multiples. Tout d'abord, nous allons déterminer s'il y a bel et bien interaction entre la MT1-MMP et la kinase FAK, l'un des principaux régulateurs des adhésions focales, en utilisant comme approche des immunoprécipitations. Par la suite, la vérification des associations entre la MT1-MMP et d'autres protéines résidant dans les complexes d'adhésion, telles p130^{cas}, la paxilline, l'actine, Src et la vinculine est nécessaires afin de confirmer la spécificité de l'interaction MT1-MMP/FAK. Une fois toutes ces interactions observées, il est intéressant de connaître les éléments qui en effectuent la régulation. Le rôle de deux puissants modulateurs de la migration, de l'angiogenèse et de la morphogénèse, la sphingosine 1-phosphate (S1P) et le facteur de

croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), seront alors examinés dans des essais de cinétique d'association. Par la suite, nous analyseront les domaines structuraux de la MT1-MMP impliqués dans ces associations. La fonction des domaines catalytique et cytoplasmique, deux portions reconnues pour être essentielles lors de la migration cellulaire et l'angiogenèse induites par la MT1-MMP, seront évaluées. Finalement, comme la MT1-MMP est localisée dans les cavéoles et que ces dernières, et particulièrement la cavéoline-1 au sein de ces microstructures, peuvent moduler la régénération des complexes d'adhésion, le rôle de la cavéoline-1 lors de la formation des associations de la MT1-MMP avec les protéines des adhésions focales sera déterminé par l'utilisation de la technologie de l'ARN interférent. Toute cette étude met l'emphase sur ces phénomènes au cours du processus de l'angiogenèse par l'utilisation de cellules de type endothéliales lors de l'évaluation des associations formées entre la MT1-MMP et les protéines des complexes d'adhésion focale.

Cette étude est effectuée dans le but de mieux comprendre les événements impliqués dans la régénération des complexes d'adhésion focaux et particulièrement le rôle de la MT1-MMP lors de ce processus. L'analyse des interactions effectuées par la MT1-MMP est cruciale, et laisse entrevoir la possibilité d'inhiber la migration tumorale et l'angiogenèse en perturbant l'activité de cette enzyme.

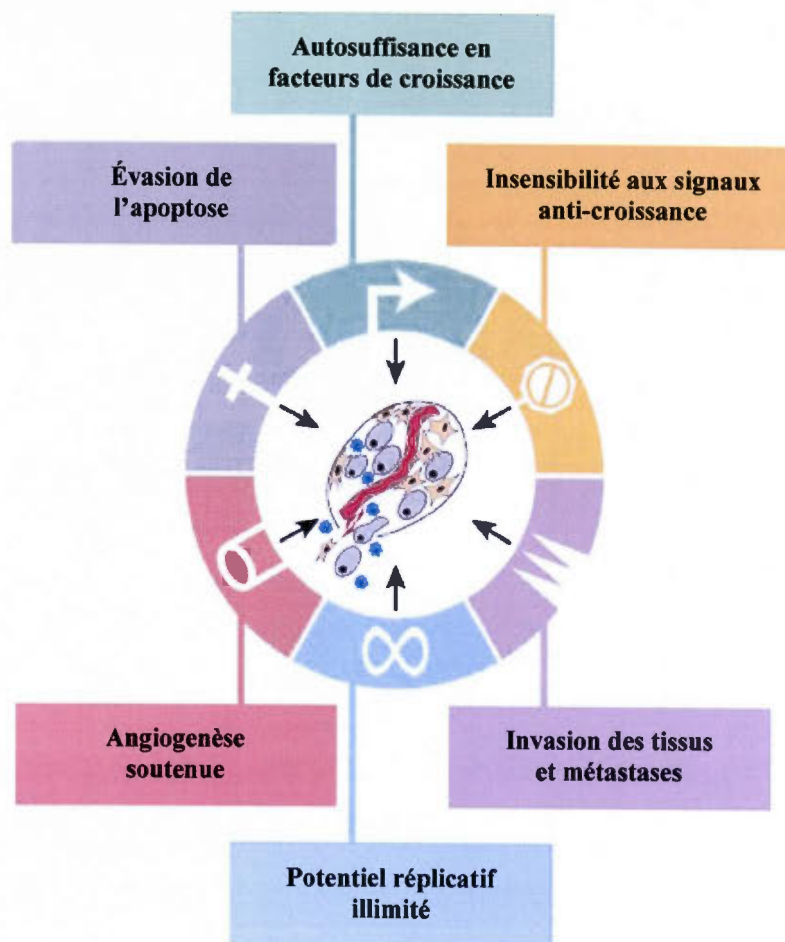


Figure 1.1. Les six caractéristiques acquises des cellules cancéreuses

La plupart sinon toutes les cellules cancéreuses acquièrent les mêmes capacités fonctionnelles durant leur développement, à travers différentes stratégies et différents ordres d'acquisition (modifié de Hanahan et Weinberg, 2000).

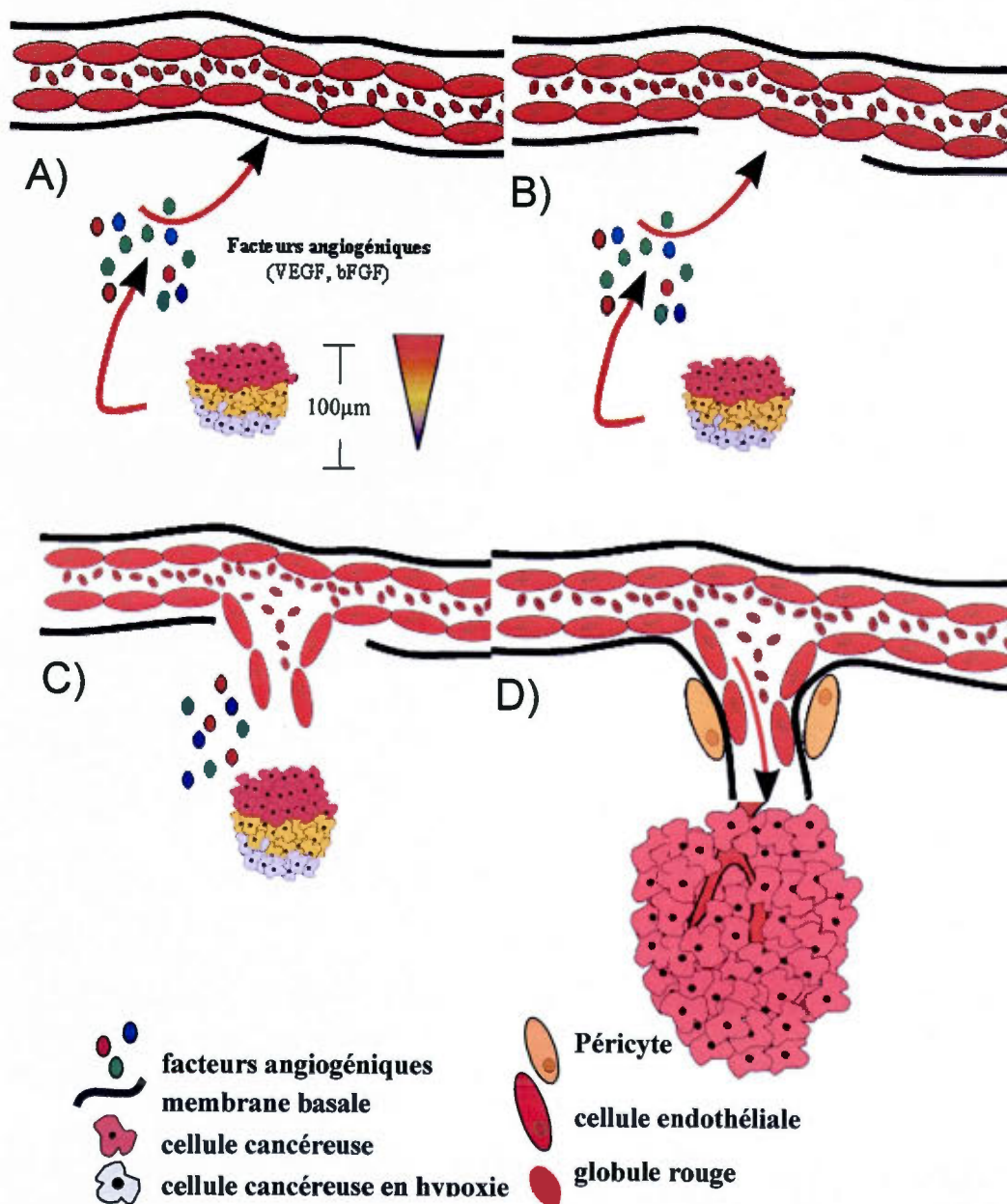
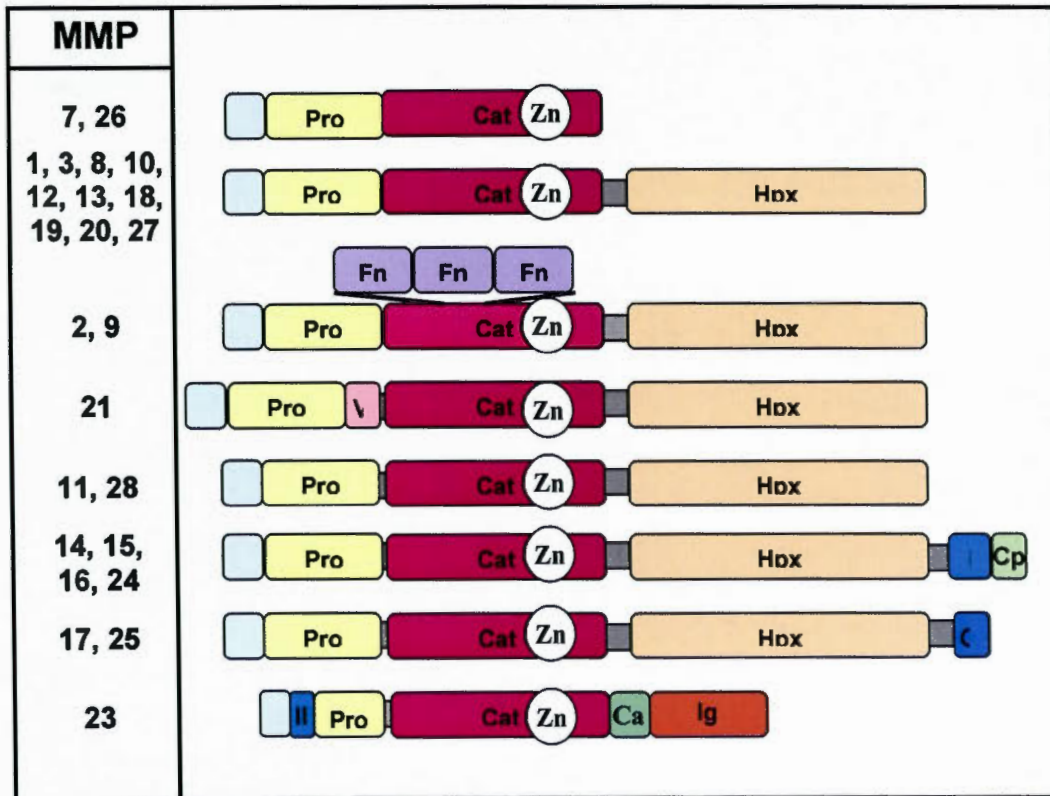


Figure 1.2. L'angiogenèse tumorale

A) Les cellules tumorales situées à plus de 100 μm d'un vaisseau sanguin sont en hypoxie et sécrètent des facteurs angiogéniques, tels le VEGF et le bFGF. B) En réponse aux signaux angiogéniques, les cellules endothéliales dégradent la membrane basale et la matrice extracellulaire. C) Les cellules endothéliales prolifèrent et migrent vers la tumeur. D) Il y a différenciation des cellules en structures de type capillaires et restructuration de la membrane basale. Des péricytes viennent aussi stabiliser les vaisseaux nouvellement formés. Suite à la réalisation avec succès de toutes ces étapes, des cellules cancéreuses peuvent se détacher de la tumeur et passer dans la circulation sanguine pour former des métastases (modifié de Béliveau, 2005).

TABLEAU I – Représentation schématique des domaines structuraux des MMPs



Les MMPs sont composées d'un peptide signal (S), d'un prodomaine (Pro), d'un site catalytique (Cat) comprenant une région liant le Zn^{2+} , d'un domaine hémopexine (Hpx) et d'une petite région charnière qui relie le domaine catalytique au domaine hémopexine. Des domaines structuraux additionnels et une spécificité de substrat ont mené à la division des MMPs en sous-groupes. Fn, le domaine fibronectine ; V, l'insert vitronectine ; I, le domaine transmembranaire de type I ; II, le domaine transmembranaire de type II ; G, l'ancre GPI ; Cp, le domaine cytoplasmique ; Ca, la région cystéine ; et Ig, le domaine semblable aux immunoglobulines (modifié de Visse et Nagase, 2003).

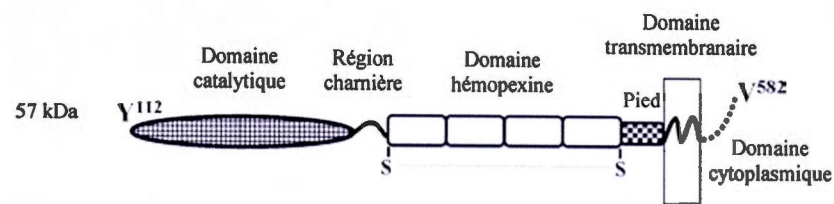


Figure 1.3. Représentation schématique de la MT1-MMP

La forme active de la métalloprotéase membranaire MT1-MMP, sans le propeptide, a 57 kDa et s'étend de la tyrosine 112 à la valine 582. Comme toutes les autres MMPs, elle est composée d'un domaine catalytique liant le zinc, d'une région charnière et d'un domaine hémopexine. Elle comprend aussi, comme les autres MMPs ancrées à la membrane plasmique, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique. Chacun de ces domaines a un rôle propre afin de permettre la multitude de fonctions effectuées par la MT1-MMP (modifié de Toth et al, 2005).

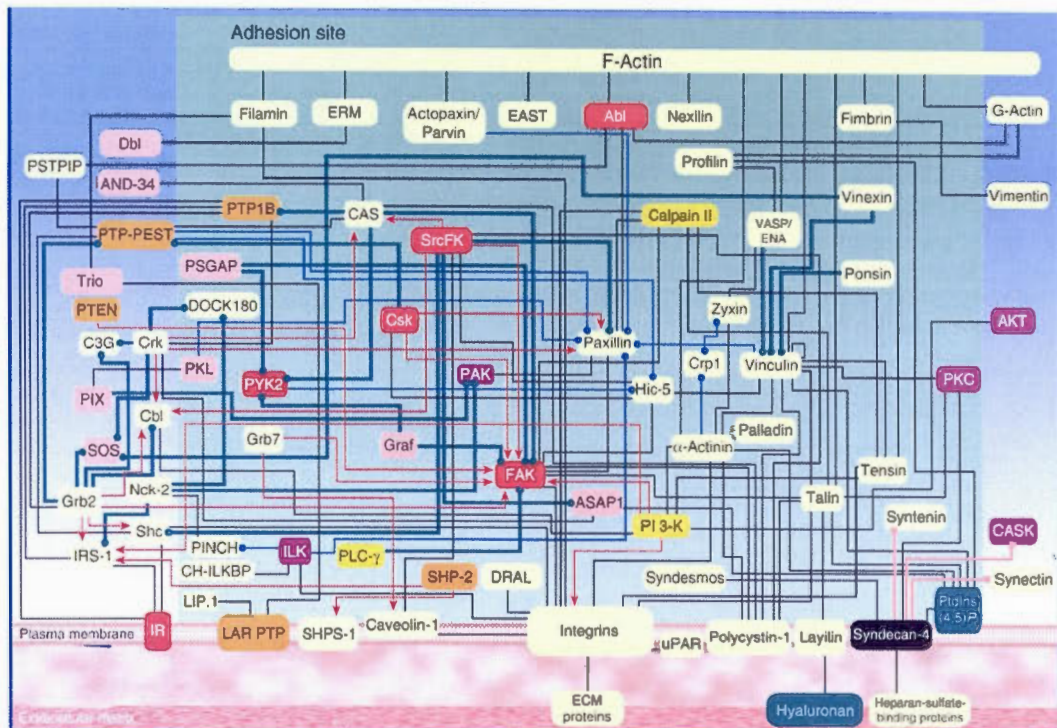


Figure 1.4 Les composants des complexes d'adhésion cellule-matrice

Représentation de toutes les interactions possibles entre les diverses composantes des complexes d'adhésion. Le tout forme un réseau hétérogène très dense qui est dynamique. Les types de composants sont divisés en tyrosine kinases (rouge), sérine/thréonine kinases (violet), phosphatases (orange), modulateurs de GTPases (rose), autres enzymes (jaune-orangé), protéines non-enzymatiques (jaune pâle), protéoglycans de sulfate d'héparan (noir) et lipides ou glucides (vert) (Zamir et Geiger, 2001b).

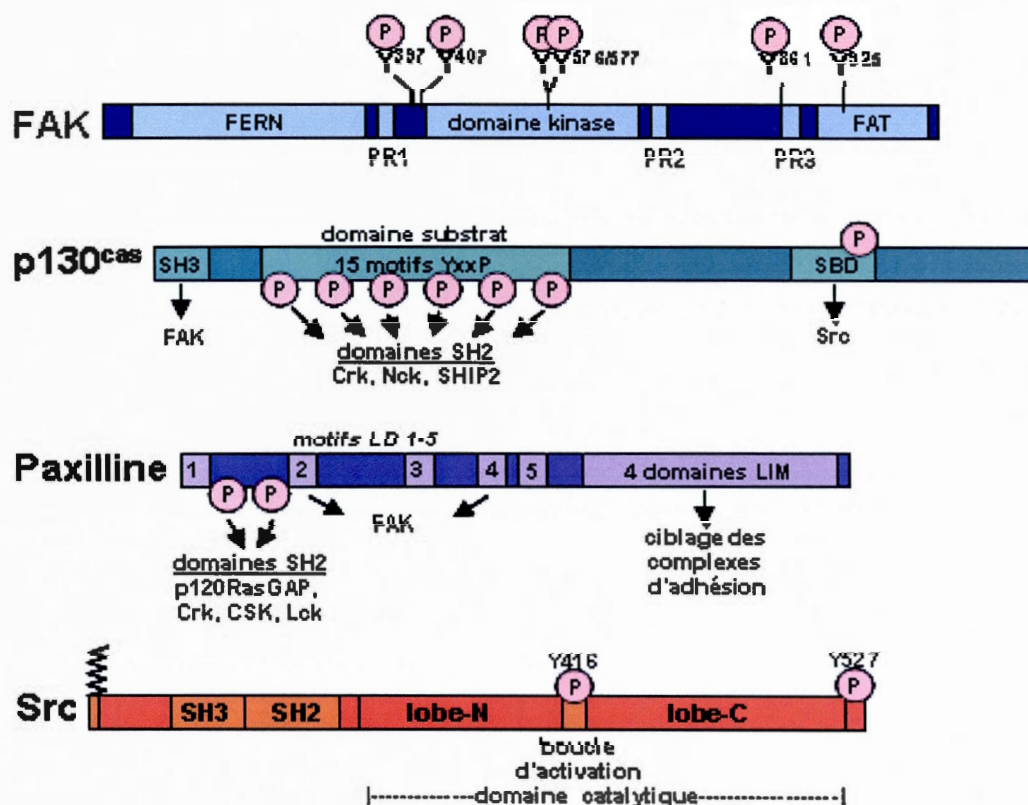


Figure 1.5 Structure de quelques protéines des complexes d'adhésion focale

Structures schématisées des protéines FAK, p130cas, paxilline et Src, quatre composantes des complexes d'adhésion qui sont impliquées dans des interactions protéine-protéine en tant que protéines adaptatrices. Chez la kinase FAK, le domaine FERN permet plusieurs interactions, entre autres, avec les récepteurs à l'EGF et au PDGF. Son domaine FAT recrute FAK aux complexes d'adhésion en s'associant avec les protéines liées aux intégrines taline et paxilline. FAK contient aussi trois domaines riches en prolines (PR1-3) qui lient les protéines contenant des domaines SH3, tel que p130^{cas} et GRAF. FAK est phosphorylée sur plusieurs résidus. La phosphorylation de Y³⁹⁷ permet la liaison de protéines avec des domaines SH2, telles Src, Grb7 et Shc. La phosphorylation des tyrosines 576-577 est requise pour l'activité catalytique maximale de FAK. p130cas possède un domaine SH3 qui permet son association avec FAK et un domaine de liaison à Src. De plus, les nombreuses phosphorylations de son domaine substrat permettent sa liaison à les protéines contenant des domaines SH2. La paxilline se lie aussi aux protéines avec des domaines SH2 suite à la phosphorylation de ses tyrosines. Elle a comme caractéristique structurale cinq motifs LD (répétitions lysine-acide aspartique) qui permettent l'association à FAK, ainsi que quatre domaines LIM qui ciblent la paxilline aux complexes d'adhésion. Pour ce qui est de Src, cette kinase est myristylée en N-terminal et elle comprend un domaine SH2, un domaine SH3 et un grand domaine catalytique. Src doit être phosphorylée pour être pleinement active (modifié de Hanks et al, 2003).

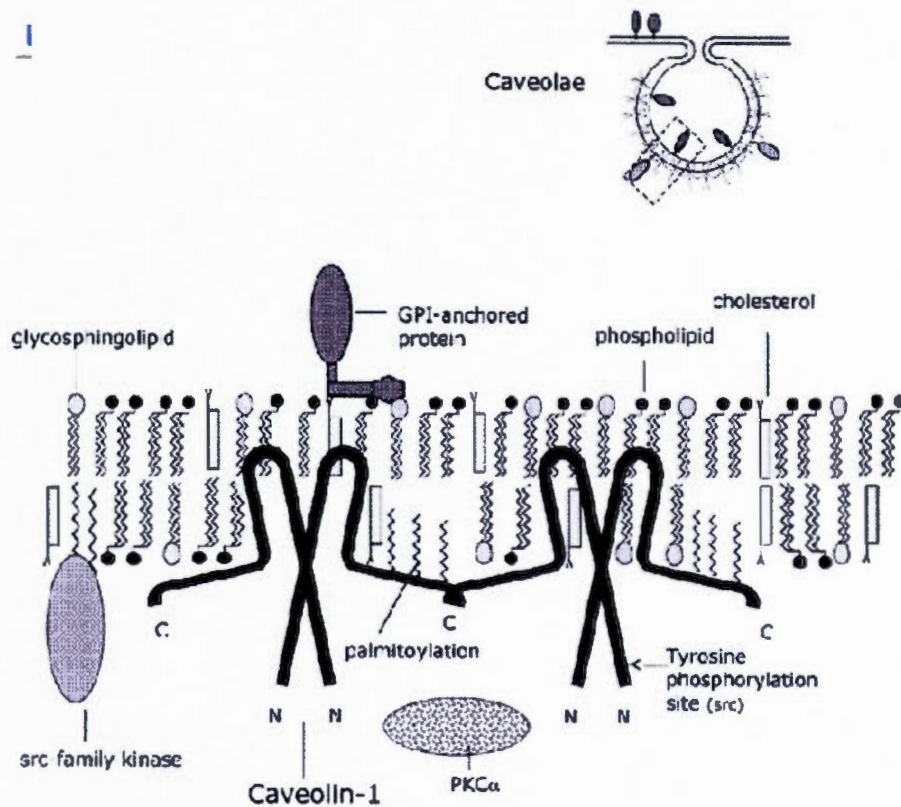


Figure 1.6 Représentation schématique des cavéoles

Les cavéoles sont de petites invaginations de la membrane plasmique en forme de vase de 50-80 nm de diamètre (dessin en haut à droite). Elles sont très riches en cholestérol, en sphingomyéline, en glycosphingolipides et en protéines intégrées à la membrane de 22 kDa appelées cavéolines. Les cavéoles sont également un lieu de regroupement pour plusieurs molécules de signalisation. Leur forte concentration en cholestérol contribue à leur caractéristique d'être de faible densité et insolubles dans les détergents non-ioniques comme le Triton X-100 à 4°C (modifié de Bender et al, 2002).

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel

2.1.1 Général

Les milieux de culture, le pyruvate de sodium, la pénicilline, la streptomycine, la trypsine et le bicarbonate de sodium ont été obtenus de GibcoBRL Life Technologies (Burlington, ON) et les sérums de Hyclone Laboratories (Logan, UT). Le VEGF (isoforme 165) nous a été gracieusement fourni par le Dr Yves Durocher (IRB, Montréal, QC). L'ensemble des solutions nécessaires pour le dosage des protéines selon la méthode du μ BCA ont été achetés chez Pierce (Rockford, IL). L'ensemble des appareils et réactifs pour l'électrophorèse SDS-PAGE et le transfert des protéines a été acheté de Bio-Rad (Mississauga, ON). Le réactif de chimioluminescence (ECL) provient de PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). Tous les autres produits qui n'ont pas été spécifiquement nommés proviennent de Sigma (St-Louis, MO).

2.1.2 Anticorps

L'anticorps polyclonal anti-MT1-MMP (AB815) provient de Chemicon International (Temecula, CA). L'anticorps polyclonal dirigé contre la cavéoline-1 (610059) et les anticorps monoclonaux dirigés contre la paxilline (610051), la phospho-cavéoline (Tyr(P)-14) (611338) et p130cas (610271) sont de BD Transduction Laboratories PharMingen (Mississauga, ON). Les anticorps monoclonaux contre la kinase Src (GD11) et contre FAK (clone 447) sont de Upstate Biotechnologies Inc. (Lake Placid, NY). Les anticorps monoclonaux anti- β -actine (AC-74), anti-vinculine (VIN-11-5) et anti-HA (HA-7) sont de Sigma (St-Louis, MO). L'anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope c-myc (9E10)

provient de Santacruz Biotechnologies (Santacruz, CA). Les anticorps secondaires anti-lapin et anti-souris couplés à la peroxydase de raifort proviennent de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA).

2.1.3 Plasmides

Les ADN codant pour la MT1-MMP et ses mutants C Δ 20 et E240A, ainsi que celui de la MT1-MMP étiqueté avec l'épitope de myc sont insérés dans le plasmide pcDNA3.1 TOPO et ont été fournis par le Dr. Christian Roghi (Cambridge Institute for Medical Research, Cambridge). Le plasmide pcDNA3.1 codant pour la kinase Src nous a été fourni par la Dr. Isabelle Royal (Université de Montréal, Québec). Un ADNc encodant pour la cavéoline-1, inséré dans le plasmide pcDNA3.1 nous a été gracieusement fourni par le Dr. Sung-Soo Yoon (Université Sung Kyon Kwan, Corée). Le mutant de la cavéoline-1 Y14F a été construit par mutagenèse dirigée par PCR en utilisant l'ADNc complet de la cavéoline-1 comme matrice et une amorce sens contenant la mutation désirée. Les plasmides pcDNA3.1 codant pour la kinase FAK, forme sauvage et ses mutants des tyrosines Y397F, Y407F et Y861F, tous étiquetés avec l'épitope HA, ont été fournis par le Dr. Jacques Huot (Université Laval, Québec).

2.2 Méthodes

2.2.1 Culture cellulaire

Quatre types de lignées cellulaires ont été utilisés lors de ce projet. Deux lignées de cellules rénales transformées (les COS-7 et les 293T) et deux lignées endothéliales (les BAEC et les HUVEC).

2.2.1.1 Cellules COS-7

Les cellules rénales de singe transformées par le virus SV-40 COS-7 ont été achetées chez ATCC (*American Tissue Culture Collection*) (Manassas, VA). Elles ont été maintenues dans du milieu DMEM (Dubelco modified Eagle's medium) contenant 4,5 g/L de glucose, 10% (v/v) de sérum de veau, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 1mM de pyruvate de sodium. Les cellules ont été incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂.

2.2.1.2 Cellules 293T

Les cellules rénales humaines 293T, transformées par l'antigène T, ont été gracieusement fournies par le Dr. Morag Park (Université McGill, Québec). Elles ont été maintenues dans du milieu DMEM (Dubelco modified Eagle's medium) contenant 4,5 g/L de glucose, 10% (v/v) de sérum de veau, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Les cellules ont été incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂.

2.2.1.3 Cellules BAEC

Les cellules endothéliales d'aorte bovine (BAEC) ont été achetées chez Cambrex BioScience (Walkerville, MD). Elles ont été maintenues dans du milieu DMEM (Dubelco modified Eagle's medium) contenant 1g/L de glucose, 10% (v/v) de sérum de veau foetal, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 100 µg/ml de bFGF (basic fibroblastic growth factor). Les cellules ont été incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂. Les cellules ont été utilisées jusqu'à un maximum de 12 passages.

2.2.1.4 Cellules HUVEC

Les cellules endothéliales de veines ombélicales humaines (HUVEC) ont été achetées chez Cambrex BioScience (Walkerville, MD). Elles ont été maintenues dans du milieu EBM-2 contenant le kit Singlequots EGM-2 de Cambrex BioScience (Walkerville, MD). Les cellules ont été incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂. Les cellules ont été utilisées jusqu'à un maximum de 6 passages.

2.2.2 Transfections cellulaires

Afin d'obtenir l'expression optimale des protéines recombinantes et siRNA transfectés, différentes méthodes de transfections transitoires ont été utilisées selon le type cellulaire visé.

2.2.2.1 Cellules COS-7

Les cellules COS-7 ont été transfectées transitoirement avec l'agent de transfection Polyfect (Qiagen, Mississauga, ON), constitué de dendrimères qui facilitent la pénétration de l'ADN dans la cellule, en suivant les directives du fabricant. Brièvement, les cellules sont ensemencées dans des pétris de 100 mm de diamètre et transfectées lorsqu'elles ont atteint une confluence entre 50 à 70%. Pour chacune des conditions, 4 µg de chacun des ADN nécessaires ont été dilués dans 300 µl du milieu DMEM (HG) sans sérum et 25 µl du réactif Polyfect. Suite à une incubation de 5 minutes à la température de la pièce, 1 ml de milieu DMEM (HG) avec 10% (v/v) de BCS, 4 mM de L-glutamine,

100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 1,5 g de bicarbonate de sodium ont été ajoutés à chacune des conditions. Le mélange résultant a été ajouté aux cellules qui sont dans 7 ml de ce dernier milieu DMEM (HG) complet. Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée contrôlée à 5% CO₂ et ont été utilisées après deux jours de récupération.

2.2.2.2 Cellules 293T

Les cellules 293T ont été transfectées transitoirement par l'agent de transfection lipidique FuGENE 6 (Roche Molecular Biochemical, Laval, QC). Les directives du fabricant ont été suivies. Brièvement, les cellules ont étéensemencées dans des pétris de 100 mm de diamètre et transfectées lorsqu'elles ont atteint une confluence entre 50 à 80%. Pour chacune des conditions, 4 µg de chacun des ADN plasmidiques nécessaires ont été déposés dans un tube stérile. Un mélange constitué de 830 µl du milieu DMEM (HG) sans sérum et 25 µl du réactif FuGENE 6 a été incubé 5 minutes à la température de la pièce avant d'être ajouté au complet, goutte à goutte à l'ADN. Ce complexe milieu nu/FuGENE 6/ADN a ensuite été agité doucement, puis incubé 15 minutes à la température de la pièce. Le mélange a par la suite été ajouté aux cellules qui ont été préalablement lavées avec du milieu DMEM (HG) sans sérum et remises en présence de 7 ml de ce dernier. Une incubation de 4 à 6 heures à 37°C dans une atmosphère humidifiée contrôlée à 5% CO₂ a ensuite été nécessaire afin de permettre à l'ADN de pénétrer à l'intérieur des cellules. Le milieu a ensuite été remplacé par 8 ml de DMEM (HG) complet et les cellules ont été remises à incuber à 37°C dans une atmosphère humidifiée contrôlée à 5% CO₂ et ont été utilisées après deux jours de récupération.

2.2.2.3 Cellules BAEC

Les cellules BAEC ont été transfectées transitoirement par l'agent de transfection polymère cationique non-lipidique TransPass D2 (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA). Les directives du fabricant ont été suivies. Brièvement, les cellules ont étéensemencées dans des pétris de 100 mm de diamètre et transfectées lorsqu'elles ont atteint une confluence entre 60 à 90%. Pour chacune des conditions, 4 µg de chacun des ADN nécessaires ont été dilués dans 4 ml de milieu DMEM (LG) nu. 12 µl du réactif TransPass D2 légèrement brassé a ensuite été ajouté à l'ADN et le tout a été incubé 25 minutes à la température de la pièce. Le mélange a par la suite été ajouté aux cellules préalablement lavées avec du milieu DMEM (LG) nu. Une incubation de 2 à 3 heures à 37°C dans une atmosphère humidifiée contrôlée à 5% CO₂ a ensuite été nécessaire afin de permettre à l'ADN de pénétrer à l'intérieur des cellules. Le milieu a ensuite été remplacé par 8 ml de DMEM (LG) complet et les cellules ont été remises à incuber à 37°C dans une atmosphère humidifiée contrôlée à 5% CO₂ et ont été utilisées après deux jours de récupération.

2.2.2.4 Transfection de siRNA cavéoline-1 chez les HUVEC

Les siRNA, contrôle et cavéoline-1 (les séquences validées par Qiagen ne sont pas disponibles), ont été transfectés transitoirement chez les cellules HUVECs avec l'agent de transfection HiPerfect (Qiagen, Mississauga, ON). Les directives du fabricant ont été suivies. Brièvement, les cellules ont étéensemencées dans des pétris de 100 mm de diamètre et ont été transfectées lorsqu'elles ont atteint une confluence entre 50 à 80%. Pour chacune des conditions, 4,75 μg de siRNA a été dilué dans 400 μl de milieu EBM-2 nu. 48 μl de réactif HiPerfect ont ensuite été ajoutés et le tout a été vortexé. Une incubation du mélange 10 minutes à la température de la pièce a suivi pour permettre la formation du complexe de transfection. Le complexe a été ajouté goutte à goutte aux cellules sans changer le milieu. Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée contrôlée à 5% CO_2 et ont été utilisées après deux jours de récupération.

2.2.3 Stimulations des cellules endothéliales avec la S1P ou le VEGF

Les pétris de 100 mm de diamètre ont d'abord été recouverts d'une couche de fibronectine (Roche Diagnostics, Laval, QC) à 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, puisensemencés avec les cellules BAEC ou HUVEC. Ensuite, les cellules endothéliales, transfectées ou non, sont laissées à croître jusqu'à une confluence de 90-95%, puis elles sont sevrées 18 heures dans le milieu DMEM (LG) sans sérum pour les BAEC ou le milieu EBM2 avec 1% FBS pour les HUVEC. Des stimulations de 0 à 30 minutes, à 37°C, ont ensuite été effectuées avec la S1P (Sigma, St-Louis, MO) à 1 μM ou avec le VEGF à 100 ng/ml , toujours dans les milieux nus. La procédure de lyse cellulaire était ensuite effectuée.

2.2.4 Lyse cellulaire

Les cellules ont été lavées deux fois sur glace avec 4 ml de tampon PBS (150 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,3 mM KH_2PO_4 et 8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, le tout à pH 7.4) froid contenant 1 mM d'orthovanadate de sodium. Le tampon de lavage est ensuite remplacé par 600 μl d'un tampon de lyse au SDS (1% SDS et 1 mM d'orthovanadate de sodium dans un tampon de Tris-HCl 10 mM à pH 7.4) préalablement chauffé 5 minutes à 100°C. Les cellules ont ensuite été recueillies à l'aide d'un grattoir et transférées dans un eppendorf, qui est chauffé 5 minutes à 100°C. Finalement, les lysats ont été homogénéisés par deux passages successifs des cellules à travers une seringue d'un diamètre de 20G ($1^{1/2}$), puis deux passages successifs à travers une seringue d'un diamètre de 26G ($1/2$). Les lysats cellulaires ont ensuite été conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

2.2.5 Dosage des protéines

Les concentrations des protéines totales des échantillons ont été évaluées selon la technique du microBCA (Pierce Biotechnologies, Rockford, IL) en utilisant l'albumine sérique bovine comme protéine standard. Brièvement, 4 μ l des échantillons ont été dilués dans l'eau distillée pour un volume final de 1 ml. Par la suite, 1 ml de réactif, préparé selon les directives du fabricant (25 réactif A :24 réactif B :1 réactif C), a été ajouté aux échantillons dilués ainsi qu'aux échantillons standards. Suite à une courte agitation, le mélange a été chauffé à 60°C pour une durée de 1 heure. Après une autre agitation, 200 μ l de chaque tube ont été mis sur une microplaque 96 puits et la densité optique a été lue au spectrophotomètre Thermomax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) à 562 nm.

2.2.6 Immunoprécipitation

Pour les études d'associations protéine-protéine, un volume de lysat cellulaire contenant 200 μ g de protéines a été dilué dans une solution de lyse (150 mM NaCl, 1 mM Tris-HCl pH7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,5% Nonidet P-40, 1% TritonX-100, 60 mM n-octylglucoside) contenant 1 mM d'orthovanadate de sodium et dont le volume final est de 1 ml. 1 μ g d'anticorps spécifique a ensuite été ajouté à cet échantillon, et le tout a été mis sous agitation douce pendant une nuit à 4°C. Afin de récupérer les complexes immuns, 20 μ l de billes (50% d'une solution de Sépharose couplée à la protéine G :50% PBS) ont été ajoutés à chacun des échantillons et le tout a été mis de nouveau sous agitation douce à 4°C pour une durée de 2 heures. Les complexes ont ensuite été récoltés par centrifugation de 2 minutes à 4500 rpm. Les protéines non-liées spécifiquement ont été éliminées par deux lavages successifs avec 1 ml de solution de lyse tel que décrit ci-haut, contenant 1 mM d'orthovanadate de sodium. Finalement, 20 μ l de tampon d'échantillon d'électrophorèse 2X de Laemmli (Laemmli, 1970) a été ajouté aux billes liées aux protéines d'intérêt et le tout a été chauffé 5 minutes à 100°C, puis centrifugé 3 minutes à 4500 rpm. Les échantillons ont été ensuite prêts à être séparés selon leur taille par électrophorèse.

2.2.7 Séparation des protéines par électrophorèse SDS-PAGE

Les échantillons de lysats cellulaires totaux ont été préparés pour avoir 5 μ g de protéines dans le tampon d'échantillon de Laemmli (Laemmli, 1970) (62,5 mM Tris-HCl pH6.8, 10% (v/v) glycérol, 2% (p/v) de SDS, 5% (v/v) de β -mercaptoéthanol et 0,00625 (p/v) de bleu de bromophénol). Les échantillons d'immunoprécipitation ont été préparés tel que décrit précédemment. Différents

pourcentages d'acrylamide ont été utilisés pour former des gels de séparation de 1,5 mm d'épaisseur. Ils contiennent soit 10% (P/v) et 0,27% (P/v) de N,N-méthylène-bisacrylamide ou soit 12,5% (P/v) et 0,34% (P/v) de N,N-méthylène-bisacrylamide, avec 0,375 M de Tris-HCl pH8.8, 0,1% (P/v) de SDS, 0,05% (P/v) de persulfate d'ammonium (APS) et 0,5 µl/ml de N,N,N',N'-tétraméthylènediamine (TEMED). Les gels d'entassement contiennent 3,8% et 0,1% de N,N-méthylène-bisacrylamide, 0,125 M de Tris-HCl pH6.8, 0,1% (P/v) de SDS, 0,05% (P/v) d'APS et 1,0 µl/ml de TEMED. La séparation des protéines s'est faite avec les systèmes d'électrophorèse Mini-Protean III (Bio-Rad, Mississauga, ON). La migration a été effectuée à 110 volts (voltage constant) dans un tampon d'électrophorèse contenant 19,2 mM de glycine, 2 mM de Tris et 0,01% de SDS (P/v) jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne la limite inférieure du gel.

2.2.8 Immunobuvardage

Après l'électrophorèse SDS-PAGE des protéines, ces dernières ont été transférées sur des membranes de fluorure de polyvinylidène (PVDF) de 0,45 µm de porosité. Brièvement, les membranes ont été hydratées 1 minute dans le méthanol, puis activées 5 minutes dans l'eau distillée, pour enfin être mises dans le tampon de transfert (9,6 mM glycine, 1,5 mM Tris, 20% méthanol et 0,01% SDS). Lors du transfert de type «western», un sandwich a été formé, de l'anode à la cathode, d'une éponge, deux papiers buvards, le gel d'électrophorèse, la membrane bien hydratée, deux papiers buvards et une seconde éponge. Le transfert a été effectué avec le système Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, Mississauga, Ontario) durant 90 minutes à 100 V (voltage constant). Les membranes ont ensuite été transférées dans la solution de blocage décrite ci-dessous à la rubrique immunodétection.

2.2.9 Immunodétection

Les membranes du transfert ont été mises dans une solution de TBS-Tween (7,5 mM NaCl, 1 mM Tris pH7.5 et 0,01% de Tween20) contenant 3% d'albumine de sérum bovin (BSA) (US Biological, Swampscott, MA) pour toute une nuit afin de bloquer les sites de liaisons non-spécifiques. La membrane a alors été incubée pendant une 1 heure à la température de la pièce avec légère agitation avec l'anticorps primaire spécifique dilué dans une solution TBS-Tween contenant 3% BSA et 0,05% de NaN₃. Une série de quatre lavages avec 15 ml de TBS-Tween ont suivi cette étape. Ensuite, l'anticorps secondaire de l'espèce appropriée (lapin, souris) et couplé à la peroxydase de raifort dilué dans une solution TBS-Tween a été incubé pendant 1 heure à la température de la pièce avec légère agitation. Suite à cinq lavages supplémentaires avec 15 ml de TBS-Tween, les protéines sur les

membranes ont été prêtes à être détectées. Pour détecter les protéines immunoréactives immobilisées sur les membranes, ces dernières ont été placées en présence du substrat ECL (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) pour une durée de 1 minute, puis elles ont été mises dans des cassettes avec des films radiologiques Fuji pour des expositions de 10 secondes et de 1 minute. Les films ont ensuite été développés avec un processeur de films à rayons X AFP Imaging mini-med/90. Les films ont par la suite été numérisés. Enfin, les masses moléculaires ont été évaluées selon la migration de protéines standards de la compagnie Bio-Rad (Mississauga, ON).

2.2.10 Zymographie gélatine

Suite aux transfections, les cellules ont été incubées dans du milieu complet pendant 48 heures, puis les milieux conditionnés ont été récoltés pour mesurer l'activité des MMPs sécrétées. Les échantillons ont été préparés avec une quantité constante de milieu conditionné (15 µl) et du tampon d'échantillon de Laemmli sans β-mercaptoéthanol, puis ils ont été agités pendant 15 minutes. Les échantillons ont ensuite été déposés sur des gels de polyacrylamide de 7,5% contenant 0,1% (P/v) de gélatine. La migration a été effectuée à 90 volts (voltage constant) dans un tampon d'électrophorèse contenant 19,2 mM de glycine, 2 mM de Tris et 0,01% de SDS (P/v) jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne la limite inférieure du gel.

Après l'électrophorèse, les gels ont été incubés deux fois pendant 30 minutes à la température de la pièce dans un tampon 2,5% (V/v) Triton X-100, puis rincés cinq fois avec de l'eau nanopure. Les enzymes (MMPs) ont ensuite été renaturées par une incubation de 20 heures à 37°C avec un tampon de zymographie (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 0,2 M NaCl, 5 mM CaCl₂ et 0,02% (V/v) Brij-58). Les gels ont par la suite été colorés pendant une heure avec une solution 0,1% (P/v) de bleu de Coomassie, 30% (V/v) de méthanol et 19% (V/v) d'acide acétique, puis décolorés dans un mélange 30% (V/v) de méthanol et 7,5% (V/v) d'acide acétique. L'activité gélatinolytique correspond aux bandes non-colorées (zones où les MMPs ont digérés la gélatine) sur fond bleu.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Associations entre la MT1-MMP et des protéines des complexes d'adhésion

Une grande série d'immunoprécipitations a été effectuée afin de déterminer quels partenaires des complexes d'adhésion focale s'associent avec la MT1-MMP.

3.1.1 Validation du plasmide MT1-MMP-myc

L'anticorps dirigé contre la MT1-MMP (épitope AB815) détecte bien la protéine, mais ne parvient toutefois pas à immunoprécipiter correctement cette protéase, des stratégies alternatives ont donc été explorées. Un plasmide contenant l'ADNc de la MT1-MMP étiqueté avec l'épitope de myc, inséré dans la région charnière de l'enzyme (entre les acides aminés P³¹² et T³¹³), a été fourni à notre laboratoire par le Dr. Christian Roghi (Cambridge Institute for Medical Research, Cambridge). Des tests préalables à son utilisation ont été effectués afin de vérifier si la présence de l'épitope empêche les associations effectuées par la MT1-MMP et si la protéine est toujours biologiquement active. Tout d'abord, les cellules COS-7 ont été transfectées avec les plasmides contenant les ADNc de la MT1-MMP sauvage ou la MT1-MMP étiqueté par l'épitope myc, avec ou sans l'ADNc de Src. Une immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitope myc, suivie par la détection de ce même épitope montre que la MT1-MMP ainsi étiquetée est bien immunoprécipitée et que la détection est ensuite claire et spécifique (figure 3.1A, puits 3 et 6). Par la suite, les associations reconnues de la MT1-MMP ont été vérifiées. L'association à Src est obtenue avec la même intensité avec le plasmide de MT1-MMP sauvage (puits 5) que celui contenant l'épitope myc (puits 6). Pour ce qui est de l'association de la MT1-MMP à la phosphocavéoline récemment identifiée par notre laboratoire (Labrecque et al, 2004), elle est bien mise en évidence suite à une immunoprécipitation de myc (puits 6). Ces deux résultats suggèrent que la présence de l'épitope myc sur la MT1-MMP n'affecte pas les associations principales de cette protéine. Il serait intéressant dans une étude future de vérifier les associations de MT1-MMP-myc à la cavéoline-1, pour vérifier si les résultats de l'étude de Labrecque

et al sont reproduits ainsi que pour mieux valider l'emploi de l'épitope myc. Par la suite, la capacité de la MT1-MMP à activer le proMMP-2 a été vérifiée par zymographie gélatine (figure 3.1B). L'activité de la MT1-MMP est environ de la même intensité avec (puits 3 et 6) ou sans l'épitope myc (puits 2 et 5). Ces deux séries de résultats confirment que la MT1-MMP reste fonctionnelle suite à l'ajout d'un épitope myc et ils permettent d'envisager l'utilisation de ce plasmide afin de vérifier les interactions de la MT1-MMP avec les protéines des complexes d'adhésion par immunoprécipitation.

3.1.2 La MT1-MMP s'associe à la protéine FAK

FAK est une protéine majeure des complexes d'adhésion focale. Elle est une composante de signalisation cruciale qui fonctionne comme biosenseur et intégrateur de façon à contrôler plusieurs comportements cellulaires (Mitra et al, 2005). L'association entre la MT1-MMP et la kinase FAK a été vérifiée par immunoprécipitation et est présentée dans la figure 3.2 (figure représentative de trois expériences distinctes). Les cellules COS-7 ont été utilisées lors de cette expérience puisqu'elles contiennent peu de MT1-MMP et de Src endogène (tel que montré au puits 1 de la fig. 3.1) et qu'elles induisent une forte expression des gènes étrangers transfectés. FAK sauvage et ses mutants avec les tyrosines Y397F, Y407F et Y861F non-phosphorylables sont étiquetés avec l'hémagglutinine du virus influenza A (HA) et la MT1-MMP est étiquetée avec l'épitope myc. Les résultats obtenus montrent que la MT1-MMP s'associe à la protéine des complexes d'adhésion FAK, mais que l'association est beaucoup plus intense lorsque les cellules sont également transfectées avec la kinase Src (figure 3.2, puit 1 versus 2). Il est également bon de signaler que le niveau de FAK endogène augmente sensiblement suite à la stimulation de Src sur la figure 3.2. Cette kinase semble être responsable d'une régulation à la hausse de l'expression de FAK. Lorsque les cellules COS-7 sont transfectées avec les mutants de FAK contenant des tyrosines non-phosphorylables, l'association semble moins forte qu'en présence de FAK sauvage, surtout dans le cas de FAK Y397F, mais aussi dans les cas de FAK Y407F et FAK Y861F lors de l'immunoprécipitation de HA. Par contre, il faut tenir compte du plus faible niveau d'expression de la protéase MT1-MMP lors de ces conditions (puits 3, 4 et 5). Il est à noter également que les résultats des immunoprécipitations réciproques HA (pour FAK) et myc (pour la MT1-MMP) diffèrent quelque peu, mais dans les deux cas, il y a clairement une association entre les deux protéines en présence de Src, et le niveau d'association semble plus faible avec les mutants de FAK testés. La tyrosine 397 est celle qui permet la liaison SH2 de Src à FAK, et c'est la liaison de Src et la formation du complexe FAK/Src qui permettent la phosphorylation des autres tyrosines de FAK, dont Y⁴⁰⁷ et Y⁸⁶¹ (Cornillon et al, 2003 ; Mitra et al, 2005 ; McLean et al, 2005). La mutation sur la tyrosine 397 est donc celle qui affecte le plus l'état de phosphorylation, et donc l'état d'activation de

FAK. Bien que les résultats obtenus ne permettent pas de conclure avec certitude que la mutation de cet acide aminé diminue l'interaction entre la MT1-MMP et FAK, ils montrent une tendance. En bref, l'ensemble des résultats de la figure 3.2 montrent que la kinase Src est requise pour l'associations entre la MT1-MMP et FAK et suggèrent, sans prouver rigoureusement, que l'état de phosphorylation de FAK joue un rôle dans l'association de cette kinase avec la MT1-MMP.

3.1.3 La MT1-MMP s'associe à d'autres protéines des complexes focaux

Suite à ces résultats, nous nous sommes intéressés à déterminer si d'autres protéines des complexes d'adhésion s'associaient également avec la MT1-MMP. Une méthode un peu différente a été utilisée pour cet essai. Au lieu de transfecter des cellules avec les protéines dont nous voulons étudier les interactions, les niveaux d'associations endogènes ont été étudiés chez des cellules endothéliales. Plusieurs différentes immunoprécipitations de protéines résidant dans les complexes d'adhésion (FAK, p130^{cas}, actine, paxilline, Src et vinculine) ont été effectuées sur des cellules HUVEC, mais les immunoprécipitations réciproques avec MT1-MMP ne peuvent plus être effectuées, puisque, tel que déjà mentionné, l'anticorps dirigé contre cette protéase est inefficace pour l'immunoprécipitation. L'utilisation de ces cellules endothéliales qui expriment constitutivement la MT1-MMP permet de simuler une expérience plus près de la réalité et permet également le rapprochement avec le phénomène de l'angiogenèse. Pour remplacer l'activation des cellules par la kinase Src, nous les avons stimulées avec la S1P pour des durées de 0 ou 5 minutes. Les associations observées sont donc celles qui se forment normalement, sans surexpression. De plus, elles sont davantage ponctuelles que suite à 48 heures en présence de sérum, dont la composition est variable. En bref, cette expérience, illustrée à la figure 3.3 (figure représentative de quatre expériences distinctes), montre une forte association entre la MT1-MMP et FAK (puits 1 et 2), Src (puits 9 et 10), la vinculine (puits 11 et 12) et p130^{cas}(puits 3 et 4). Ces interactions semblent spécifiques puisque les niveaux de complexes entre la MT1-MMP et d'autres protéines des complexes d'adhésion, comme l'actine (puits 5 et 6), sont restés stable suite à la stimulation de 5 minutes à la S1P. Il est à noter que la paxilline, au lieu de s'associer avec la MT1-MMP, semble plutôt se dissocier de celle-ci suite à la modulation par la S1P (puits 7 et 8). La MT1-MMP s'associe donc spécifiquement à certaines protéines des complexes d'adhésion, dont FAK, p130^{cas}, Src et la vinculine, et ces associations sont modulées par la S1P. Il est important de rester conscient que la S1P induit l'ARN messager ainsi que l'expression de la protéine MT1-MMP, comme décrit par l'équipe de Annabi en 2003. Les niveaux de MT1-MMP détectés sont donc nécessairement plus élevés lors de la stimulation avec la S1P, mais ce qui est démontré par la figure

3.3 est la comparaison des niveaux d'associations de la MT1-MMP avec différentes protéines constituant les complexes d'adhésion focale suite à une stimulation avec la S1P.

3.2 La modulation des associations entre la MT1-MMP et les protéines des complexes d'adhésion focale

D'après les résultats obtenus jusqu'ici, les complexes formés de la MT1-MMP et FAK peuvent être détectés sans surexprimer Src, mais ils sont favorisés par sa surexpression. Ceux-ci, de même que ceux formés de Src, vinculine et p130^{cas}, sont détectés à des niveaux faibles dans les cellules HUVEC, et sont augmentés lorsque les cellules sont stimulées avec 1 μ M de S1P pendant 5 minutes. La S1P régule une grande variété de réponses cellulaires, dont le remodelage du cytosquelette, la réponse angiogénique et la migration des cellules tumorales. De plus, le nombre de rapports sur la signalisation cellulaire médiée par la S1P a explosé dans les dernières années (Chae et al, 2004 ;Chalfant et Spiegel, 2005 ;Gonzalez et al, 2006 ;Liu et al, 2000 ;Osaki et al, 2003). Comme toutes ces fonctions dépendent des complexes d'adhésion, la S1P joue évidemment un rôle crucial sur la régénération des adhésions focales. La figure 3.3 a déjà démontré que la S1P stimule les associations de la MT1-MMP avec les protéines des complexes d'adhésions, l'étape suivante est la détermination de la cinétique d'association par la S1P. Un autre facteur sérique qui a un effet sur l'assemblage/désassemblage des complexes d'adhésion focale chez les cellules endothéliales (Avraham et al, 2003), le VEGF, a aussi été évalué.

3.2.1 La modulation par la sphingosine 1-phosphate

Nous avons donc observé une modulation de l'association entre les protéines des complexes d'adhésion focale suite à une stimulation à la S1P. Nous avons ensuite voulu connaître la cinétique de ces associations. Les interactions de deux protéines types des complexes d'adhésion, FAK et p130^{cas}, avec la MT1-MMP ont été suivies suite à différents temps de stimulation avec la S1P. Comme le montre la figure 3.4 (figure représentative de trois expériences distinctes), dans le cas de la kinase FAK, l'association avec la MT1-MMP se produit fortement dès 2 minutes de stimulation avec 1 μ M de S1P, est maximale à 5 minutes de stimulation et il y a dissociation par la suite. La diminution des associations après des plus longues périodes peut être expliquée par l'internalisation et la régulation à la baisse des récepteurs de la S1P, les récepteurs Edg. Pour ce qui est de la protéine p130^{cas}, son association avec la MT1-MMP est plus prolongée. Elle débute dès 2 minutes de stimulation au S1P, est maximale elle aussi à 5 minutes, mais elle atteint alors un plateau et commence à se dissocier

légèrement uniquement à partir de 30 minutes. Il est intéressant de noter que les associations obtenues par la stimulation avec la S1P sont aussi fortes sinon plus que celle obtenue en gardant les cellules en présence de sérum (puits S), ce qui démontre que la S1P est un puissant médiateur des associations observées.

3.2.2 La modulation par le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Un autre facteur qui a été reconnu pour accélérer le taux de régénération des complexes d'adhésion focale, le VEGF, a aussi été évalué pour savoir s'il favorisait l'association entre la MT1-MMP et les protéines de complexes d'adhésion (figure 3.5) (figure représentative de quatre expériences distinctes). Une cinétique d'association semblable à celle obtenue avec la stimulation à la S1P a été observée pour la kinase FAK. Une interaction entre FAK et la MT1-MMP est observée dès deux minutes de stimulation au VEGF à 100ng/ml, un maximum est atteint à 5 minutes et une dissociation du complexe s'effectue à partir de 15 minutes. Encore une fois, la diminution des associations aux temps plus longs peut être expliquées par l'internalisation et la régulation à la baisse des récepteurs du VEGF. Pour p130^{cas}, la stimulation au VEGF est moins rapide que celle à la S1P. L'association avec la MT1-MMP est retrouvée seulement à 5 minutes, est conservée à 15 minutes et est disparue à 30 minutes. Encore une fois, les taux d'associations trouvés suite aux stimulations au VEGF sont presque aussi forts que ceux des cellules maintenues dans milieu avec sérum (puits S). Il est donc intéressant de constater que le VEGF est un autre inducteur des associations entre la MT1-MMP et les protéines des complexes d'adhésion focale.

3.3 Domaines de la MT1-MMP impliqués dans les associations de cette protéine avec celles des adhésions focales

Chacun des domaines de la MT1-MMP a été impliqué dans différentes fonctions de cette protéine. L'importance du domaine catalytique et du domaine cytoplasmique de la MT1-MMP a été démontrée pour plusieurs processus cellulaires. Les deux régions sont nécessaires pour la migration et l'angiogenèse induite par la MT1-MMP. De plus, le domaine cytoplasmique est particulièrement important pour l'internalisation de cette protéase et sa localisation au front migratoire (Cao et al, 2004 ;Jiang et al, 2001 ;Langlois et al, 2004 ;Osenkowski et al, 2004 ;Uekita et al, 2001). La nécessité de leur présence pour les associations entre la MT1-MMP et les protéines des complexes d'adhésion a été évaluée suite au traitement des cellules par la surexpression de Src en présence de sérum ou encore par la stimulation au S1P suite à un sevrage de sérum. Pour évaluer quels domaines de la protéine

MT1-MMP sont nécessaires pour les associations observées, nous avons utilisé les lignées de cellules BAEC et COS-7, car ces types de cellules se transfecte mieux que les HUVECs et des transfections doubles sont requises.

3.3.1 Le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP est nécessaire pour les associations stimulées par la surexpression de la kinase Src en présence de sérum

Des expériences en présence de sérum (10%) ont été effectuées chez les cellules COS-7 pour déterminer le rôle des domaines catalytique et cytoplasmique de la MT1-MMP pour les associations observées. Les ADNc de la MT1-MMP et de ses mutants, soit E240A, qui est catalytiquement inactif, et CA20, dont la portion cytoplasmique est tronquée, ont été transfectés avec ou sans la co-surexpression de la kinase Src. Il est possible de voir, comme pour la figure 3.2, que la surexpression de Src induit une association significative entre FAK ou p130^{cas} et la MT1-MMP (figure 3.6, puits 4 à 6). Le mutant constitutivement inactif E240A, dont le résidu acide glutamique 240 du centre catalytique a été converti en alanine par mutation, n'empêche pas ces associations ; au contraire, l'inactivation catalytique de la MT1-MMP semble même favoriser les interactions de celle-ci avec FAK et p130^{cas} (puits 5). L'inverse se produit avec le mutant CA20. La perte du domaine cytoplasmique empêche les associations médiées par Src entre la MT1-MMP et les deux protéines des sites d'adhésion évaluées (puits 6). En bref, il semble que la stimulation des associations entre la MT1-MMP et les protéines des adhésions focales par la surexpression de Src nécessite la présence du domaine cytoplasmique de l'enzyme. Pour ce qui est de l'activité de sa portion catalytique, elle semble réguler négativement les interactions évaluées. Il est à noter que le poids moléculaire de la MT1-MMP mutante E240A est légèrement inférieur à celui de la MT1-MMP sauvage (ID-MT1-MMP). Bien que cette différence ne s'explique pas par l'échange d'un acide aminé, c'est un résultat constant qui a déjà été publié (voir Langlois et al, 2004). Évidemment, dans le cas de la MT1-MMP mutante CA20, la différence de poids moléculaire s'explique par la délétion de 20 acides aminés.

3.3.2 Le domaine catalytique de la MT1-MMP est nécessaire pour les associations stimulées par la S1P

Pour évaluer quels domaines de la protéine MT1-MMP sont nécessaires pour les associations observées, nous avons utilisé la lignée de cellules BAEC, car ce type de cellules, tout en restant de type endothélial, se transfecte mieux que les HUVECs et des transfections doubles sont requises. Nous n'obtenons pas le même patron d'association lorsque les cellules BAEC sont stimulées par la S1P suite

à un sevrage de 18 heures (figure 3.7) que lorsque les cellules COS-7 sont cultivées en présence de sérum (figure 3.6). En effet, c'est le mutant catalytiquement inactif (E240A) qui réduit fortement ici l'association entre la MT1-MMP et les protéines FAK et p130^{cas} (puits 5), et le mutant sans domaine cytoplasmique (CΔ20) qui favorise ces associations chez les cellules BAECs stimulées 5 minutes à la S1P (puits 6). Il est donc possible de proposer que la stimulation par la S1P des associations entre la MT1-MMP et les protéines des adhésions focales nécessite l'activité du domaine catalytique de l'enzyme, mais est indépendante de sa portion cytoplasmique. C'est totalement l'inverse des résultats obtenus lors de la surexpression de Src. Les conditions expérimentales sont évidemment très différentes. Deux types cellulaires différents ont été utilisés, ce qui peut faire varier bien des processus cellulaires. Une autre grande divergence reste le sevrage des cellules pour la stimulation à la S1P. En effet, le sérum est un mélange de bien des composantes, dont certaines inconnues, qui se trouvent dans des proportions variables. Il contient de nombreux facteurs de croissance et autres médiateurs qui peuvent activer une grande variété de voies de signalisation. De plus, sans sevrage, les cellules restent en présence du sérum pour une période de 48 heures, ce qui laisse le temps à la régulation de plusieurs processus. La stimulation à la S1P suite à un sevrage de 18 heures, qui remet les processus cellulaires à zéro, est beaucoup plus ponctuelle. Tous ces points peuvent expliquer la divergence des résultats obtenus. Pour limiter les généralisations à priori, il serait intéressant de refaire l'expérience en présence de sérum avec les BAECs et comparer avec les résultats obtenus avec ceux de la figure 3.6 avec les COS-7.

3.4 La cavéoline-1 module négativement les associations entre la MT1-MMP et les protéines des complexes d'adhésion focale

Comme la cavéoline-1 agit souvent comme un régulateur négatif de l'activité de protéines de signalisation (Annabi et al, 2001 ;del Pozo et al, 2005 ;Labrecque et al, 2003 ;Razani et Lisanti, 2001b) et que la MT1-MMP est préférentiellement compartimentée et protéolysée dans les cavéoles chez les cellules endothéliales (Navarro et al, 2004), il est intéressant de connaître l'effet de la cavéoline-1 sur les associations étudiées. La technologie des ARN interférents (RNAi), qui inhibent l'expression de gènes par petits ARN non-codants de 21-23 nucléotides (Eckstein, 2005), a été utilisée à cette fin. L'inhibition de l'expression de la cavéoline-1 (~75%) par siRNA chez les HUVECs (figure 3.8A, puits 2) favorise l'association entre la MT1-MMP et les deux protéines des complexes d'adhésion focale testées, FAK et p130^{cas}, suite à une stimulation de 5 minutes avec la S1P à 1 μM. La cavéoline-1 peut donc être considérée comme un inhibiteur de ces associations. Il est à noter qu'un contrôle sans l'induction de la S1P devrait également être fourni pour la figure 3.8A, mais n'as pas été effectué du à

la quantité limitée de réactif. Cette expérience doit donc être répétée et complétée avant publication dans un article scientifique.

La cavéoline-1 est concentrée à l'arrière des cellules migrantes, et c'est la forme phosphorylée sur la tyrosine 14 de la cavéoline qui est associée aux complexes d'adhésion focale, localisés aux lamellipodes des cellules migrantes suite à une stimulation à la fibronectine. La perte de la polarité de la cavéoline-1 par délétion ciblée de la protéine empêche la polarisation de la cellule endothéliale et empêche le mouvement dirigé (Beardsley et al. 2005). De plus, c'est la cavéoline phosphorylée qui a été trouvée à s'associer à la MT1-MMP (Labrecque et al, 2004). Nous nous sommes donc intéressés à déterminer si c'est la présence de la cavéoline elle-même qui a l'effet négatif sur les associations ou si c'est la forme phosphorylée de cette protéine qui antagonise les interactions. Des transfections avec la cavéoline-1 sauvage ou avec un mutant non-phosphorylable de la cavéoline-1 (Y14F) ont été effectuées. Les cellules 293T ont été choisies pour cette expérience puisqu'elles expriment très peu de cavéoline-1 endogène. L'immunoprécipitation de FAK montrent dans les deux cas que la surexpression de la cavéoline sauvage, en cotransfection avec Src, diminue significativement leurs associations avec la MT1-MMP (figure 3.8B, puits 6). Le cas de la surexpression de la cavéoline mutante Y14F suit un patron semblable (puits 7). L'état de phosphorylation de la cavéoline-1 ne semble donc pas avoir d'effet sur les associations de la MT1-MMP avec les protéines des complexes d'adhésion focale. En résumé, la cavéoline-1 est un régulateur négatif des associations de la MT1-MMP étudiées, et l'état de phosphorylation de cette protéine n'affecte pas l'ampleur des interactions.

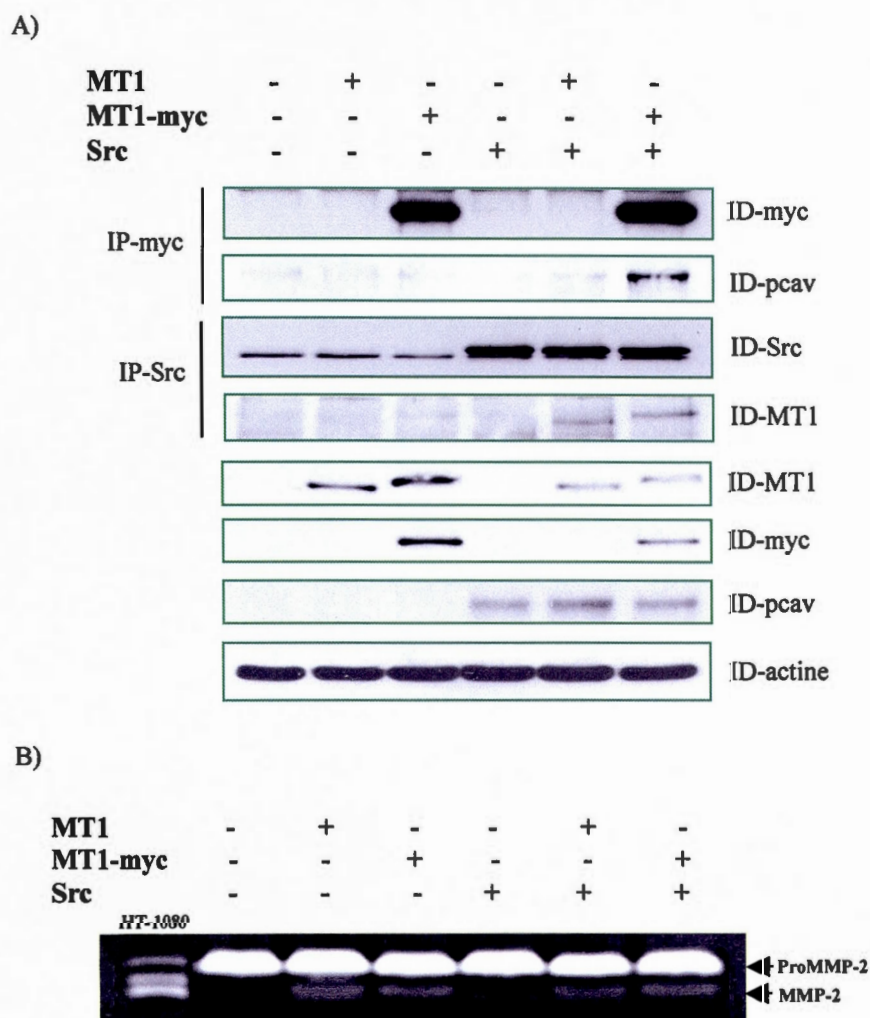


Figure 3.1
Validation du plasmide MT1-MMP-myc

Les cellules COS-7 ont été cotransfectées avec les plasmides contenant les ADNc de la MT1-MMP sauvage, la MT1-MMP étiqueté avec l'épitote myc et Src selon les + et - indiqués. A) Après 48 heures d'incubation en présence de sérum, les cellules ont été récoltées, puis lysées avec un tampon de lyse au SDS chaud. Les immunoprécipitations (IP) indiquées à la gauche de la figure ont alors été effectuées avec des anticorps spécifiques. Suite à une électrophorèse et un transfert de type «western», les protéines associées ont été immunodéctées (ID) par les anticorps spécifiques indiqués à la droite de la figure. B) Après 48 heures d'incubation en présence de sérum, le milieu conditionné des cellules a été récolté et une zymographie gélatine a été effectuée (15 μ l de chaque échantillon par puits). Ces deux figures sont représentatives de 2 expériences distinctes.

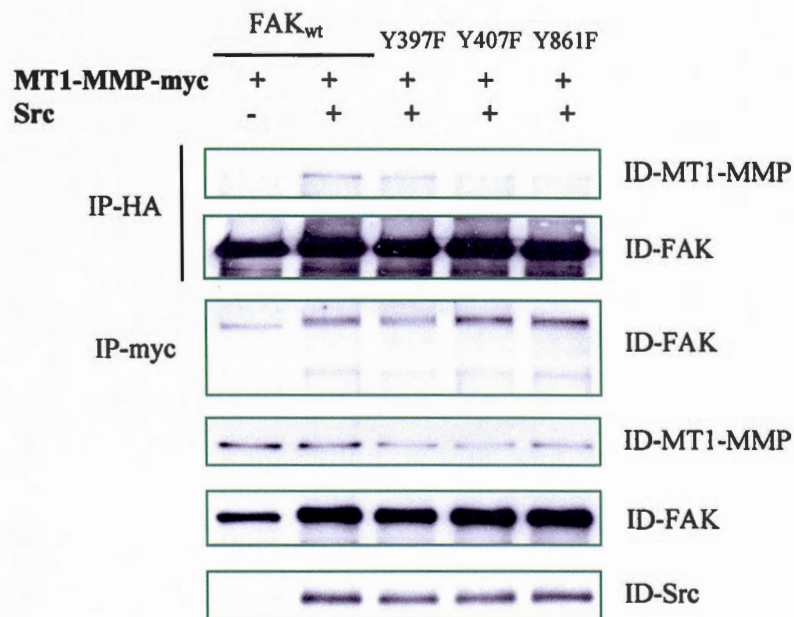


Figure 3.2
Association entre la MT1-MMP et FAK

Les cellules COS-7 ont été cotransfectées avec les plasmides contenant les ADNc de la MT1-MMP, de Src et des différents mutants de HA-FAK selon les + et - indiqués. Après 48 heures d'incubation en présence de sérum, les cellules ont été récoltées, puis lysées avec un tampon de lyse au SDS chaud. Les immunoprécipitations (IP) indiquées à la gauche de la figure ont alors été effectuées avec des anticorps spécifiques. Suite à une électrophorèse et un transfert de type «western», les protéines associées ont été immunodétectées (ID) par les anticorps spécifiques indiqués à la droite de la figure. Cette figure est représentative de 3 expériences distinctes.

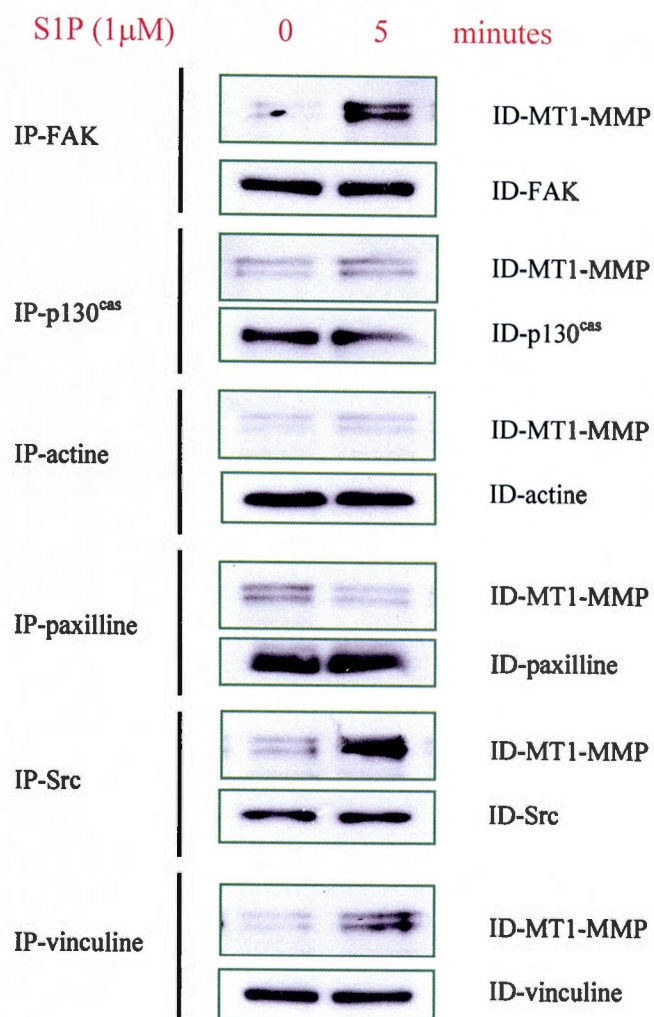


Figure 3.3
Associations entre la MT1-MMP et des protéines des complexes d'adhésion

Les cellules HUVEC ont été ensemencées en milieu complet. Lorsqu'elles ont atteint 90-95% de confluence, les cellules ont été sevrées avec 1% de FBS. Après 18 heures d'incubation, les cellules ont été stimulées 0 ou 5 minutes avec 1 μ M de S1P, puis elles ont été récoltées et lysées avec un tampon de lyse au SDS chaud. Les immunoprécipitations (IP) indiquées à gauche de la figure ont alors été effectuées avec des anticorps spécifiques. Suite à une électrophorèse et un transfert de type «western», les protéines associées ont été immunodétectées (ID) par les anticorps spécifiques indiqués à droite de la figure. Cette figure est représentative de quatre expériences distinctes.

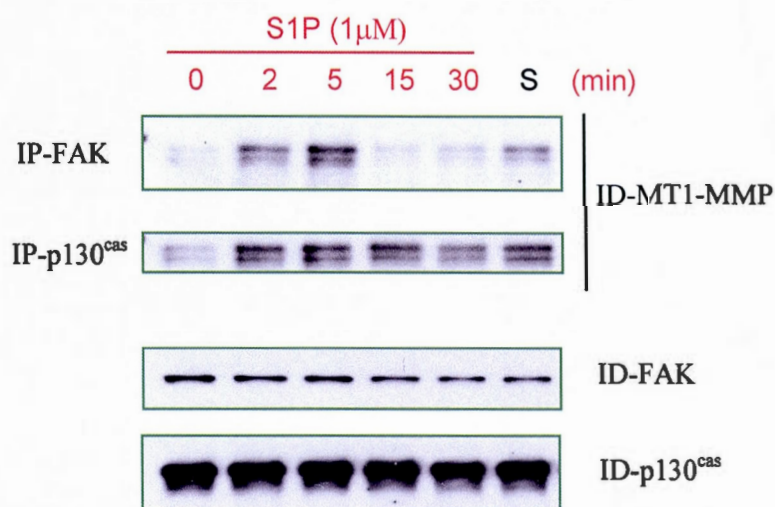


Figure 3.4
Cinétique de stimulation à la S1P

Les cellules HUVEC ont été ensemencées en milieu complet. Lorsqu'elles ont atteint 90-95% de confluence, les cellules ont été sevrées avec 1% de FBS (sauf celles du puits S). Après 18 heures d'incubation, les cellules ont été stimulées 0, 2, 5, 15 ou 30 minutes avec 1 μ M de la S1P (les cellules du puits S sont restées en milieu complet), puis elles ont été récoltées et lysées avec un tampon de lyse au SDS chaud. Les immunoprécipitations (IP) indiquées à la gauche de la figure ont alors été effectuées avec des anticorps spécifiques. Suite à une électrophorèse et un transfert de type «western», les protéines associées ont été immunodétectées (ID) par les anticorps spécifiques indiqués à la droite de la figure. Cette figure est représentative de trois expériences distinctes.

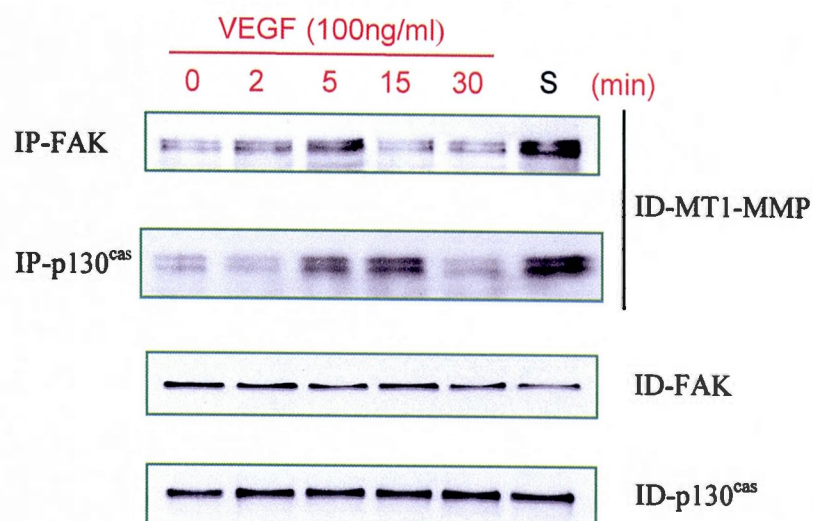


Figure 3.5
Cinétique de stimulation au VEGF

Les cellules HUVEC ont étéensemencées en milieu complet. Lorsqu'elles ont atteint 90-95% de confluence, les cellules ont été sevrées avec 1% de FBS (sauf celles du puits S). Après 18 heures d'incubation, les cellules ont été stimulées 0, 2, 5, 15 ou 30 minutes avec 100 ng/ml de VEGF (les cellules du puits S sont restées en milieu complet), puis elles ont été récoltées et lysées avec un tampon de lyse au SDS chaud. Les immunoprécipitations (IP) indiquées à la gauche de la figure ont alors été effectuées avec des anticorps spécifiques. Suite à une électrophorèse et un transfert de type «western», les protéines associées ont été immunodétectées (ID) par les anticorps spécifiques indiqués à la droite de la figure. Cette figure est représentative de quatre expériences distinctes.

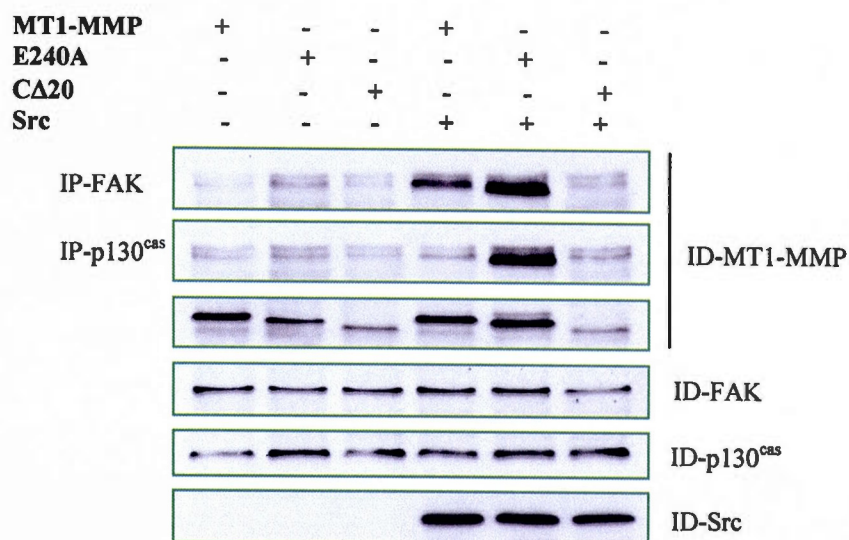


Figure 3.6

Domaines de la MT1-MMP nécessaires aux associations stimulées par Src

Les cellules COS-7 ont été transfectées par les plasmides contenant les ADNc de la forme sauvage de la MT1-MMP, de ses mutants E240A ou CΔ20 et Src selon les + et - indiqués. Après 48 heures d'incubation en présence de sérum, les cellules ont été récoltées, puis lysées avec un tampon de lyse au SDS chaud. Les immunoprécipitations (IP) indiquées à la gauche de la figure ont alors été effectuées avec des anticorps spécifiques. Suite à une électrophorèse et un transfert de type «western», les protéines associées ont été immunodétectées (ID) par les anticorps spécifiques indiqués à la droite de la figure. Cette figure est représentative de trois expériences distinctes.

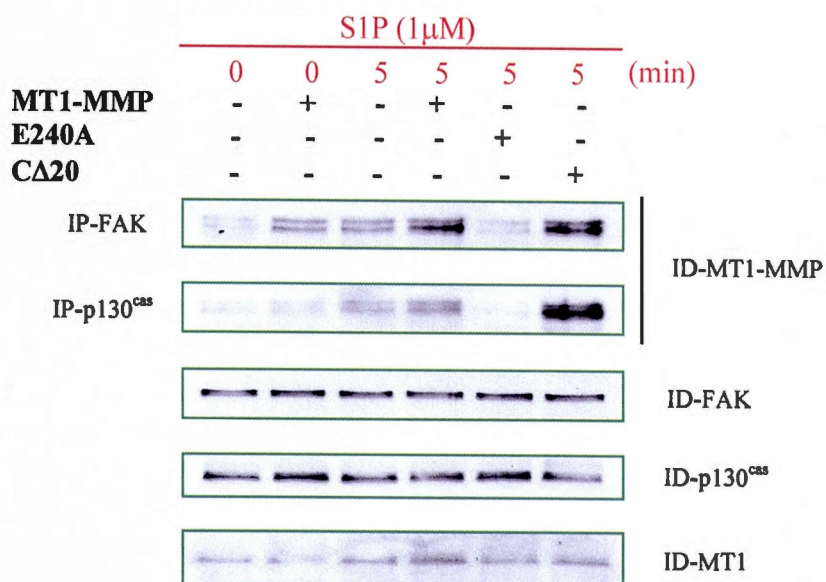


Figure 3.7

Domaines de la MT1-MMP nécessaires lors des associations stimulées par la S1P

Les cellules BAEC ont été transfectées par les plasmides contenant les ADNc de la forme sauvage de la MT1-MMP, de ses mutants E240A ou C Δ 20 selon les + et - indiqués. Après 48 heures d'incubation en présence de sérum, les cellules ont été sevrées sans sérum. Après 18 heures d'incubation, les cellules ont été stimulées 0 ou 5 minutes avec 1 μ M de la S1P, puis elles ont été récoltées et lysées avec un tampon de lyse au SDS chaud. Les immunoprécipitations (IP) indiquées à gauche de la figure ont alors été effectuées avec des anticorps spécifiques. Suite à une électrophorèse et un transfert de type «western», les protéines associées ont été immunodétectées (ID) par les anticorps spécifiques indiqués à droite de la figure. Cette figure est représentative de trois expériences distinctes.

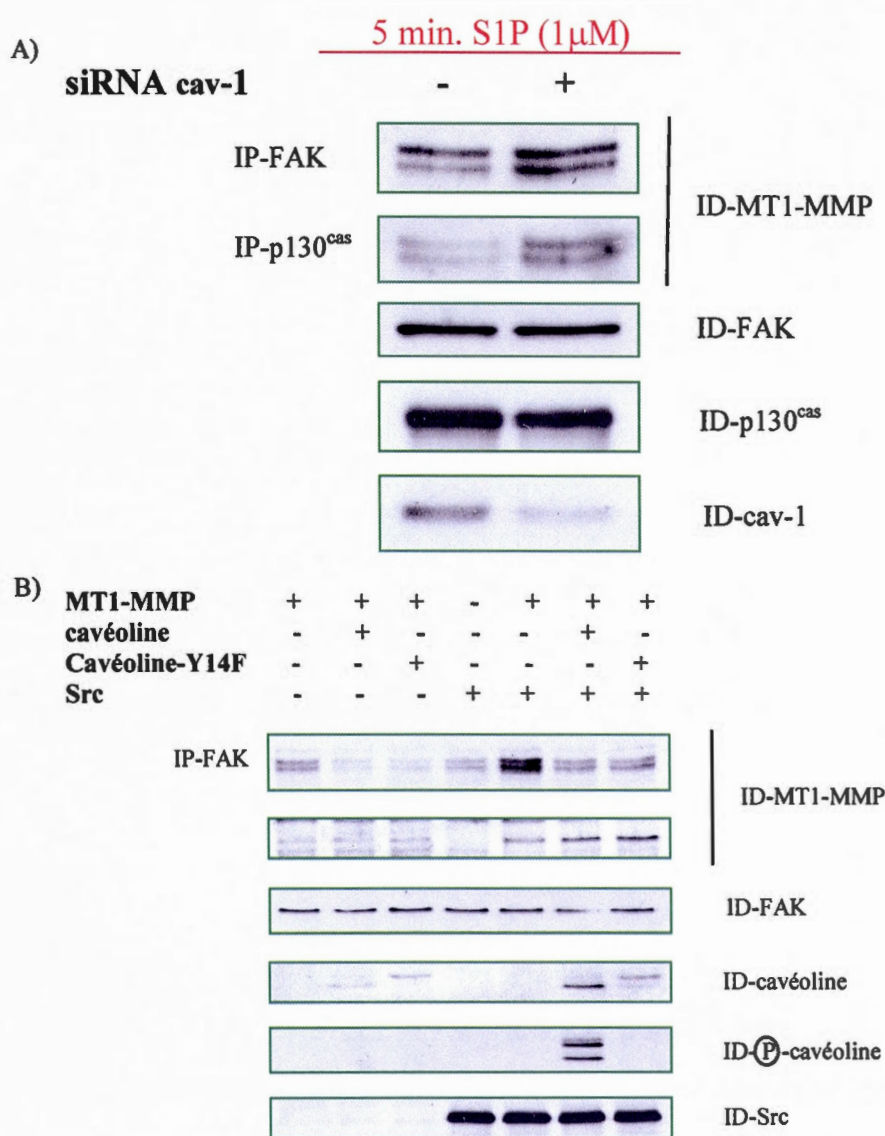


Figure 3.8
La cavéoline-1 comme régulateur négatif

A) Les cellules HUVECs ont été transfectées par le siRNA de la cavéoline-1 ou le siRNA contrôle selon les + et - indiqués. Après 48 heures d'incubation en présence de sérum, les cellules ont été sevrées avec 1% de FBS. Après 18 heures d'incubation, les cellules ont été stimulées 5 minutes avec 1 μ M de la SIP, puis elles ont été récoltées et lysées avec un tampon de lyse au SDS chaud. Les immunoprécipitations (IP) indiquées à la gauche de la figure ont alors été effectuées avec des anticorps spécifiques. Suite à une électrophorèse et un transfert de type «western», les protéines associées ont été immunodétectées (ID) par les anticorps spécifiques indiqués à la droite de la figure. B) Les cellules 293T ont été transfectées par les plasmides contenant les ADNc de la MT1-MMP, de la cavéoline-1, de la cavéoline-1 mutante Y14F et Src selon les + et - indiqués. Après 48 heures d'incubation en présence de sérum, les cellules ont été récoltées et lysées avec un tampon de lyse au SDS chaud. Les immunoprécipitations (IP) indiquées à la gauche de la figure ont alors été effectuées avec des anticorps spécifiques. Suite à une électrophorèse et un transfert de type «western», les protéines associées ont été immunodétectées (ID) par les anticorps spécifiques indiqués à la droite de la figure. Ces deux figures sont chacune représentatives de deux expériences distinctes.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 Importance de la MT1-MMP pour l'angiogenèse

Dans cette étude, nous avons tenté de mieux comprendre les mécanismes de régulation de complexes de signalisation postulés pour expliqués le potentiel migratoire et invasif des cellules endothéliales au cours de l'angiogenèse. En effet, il est connu que les métalloprotéases de la matrice extracellulaire jouent un rôle critique dans la dégradation de la matrice basale, le remodelage de la MEC et la migration des cellules endothéliales lors du processus de néovascularisation. La MT1-MMP est particulièrement importante pour ces événements puisque plusieurs études confirment que sa surexpression est suffisante pour induire le phénotype cancéreux.

Depuis les débuts de la recherche sur les processus cellulaires requis pour l'angiogenèse, la protéolyse a été reconnue comme une des activités les plus précoces et les plus soutenues impliquée dans ce phénomène. Le remodelage de la matrice extracellulaire durant le bourgeonnement vasculaire requiert en effet sa destruction par des protéases, dont les activateurs du plasminogène, les métalloprotéases, les héparinases, les chymases, les tryptases et les cathepsines. Parmi ces protéases, le rôle des MMPs semble être essentiel. Cela est démontré, entre autre, par l'effet dévastateur des inhibiteurs des MMPs sur l'angiogenèse tumorale (Carmeliet, 2003 ;Pepper, 2001 ;Roy et al, 2006). Il est important de mentionner que les MMPs facilitent le bourgeonnement des cellules endothéliales, non seulement en dégradant et remodelant la matrice extracellulaire, mais également en libérant des activateurs angiogéniques liés à la matrice (bFGF, VEGF, TGF- β , IL-1B) (Carmeliet, 2003 ;Langlois et al, 2004).

Parmi les MMPs, la MT1-MMP a été trouvée comme une des enzymes les plus déterminantes pour l'angiogenèse. Chez les cellules endothéliales, la surexpression de la MT1-MMP stimule la migration, l'invasion et la formation de structures capillaires, en plus d'une activation accrue de la proMMP-2 (Langlois et al, 2004 ;Roy et al, 2006). La MT1-MMP est d'ailleurs exprimée abondamment chez les cellules endothéliales formant de nouveaux vaisseaux durant l'angiogenèse.

Comme la MT1-MMP se localise au front migratoire (lamellipodes) des cellules motiles, la protéolyse péricellulaire dirigée doit être responsable de ce phénomène (Kajita et al, 2001 ;Nabeshima et al, 2002 ;Seiki, 2003). Il a également été rapporté que cette protéase augmente la production de VEGF autant au niveau de l'ARNm qu'au niveau protéique. Cet effet est évidemment associé à une croissance tumorale et une angiogenèse accélérée (Soulié et al, 2004 ;Sounni et al, 2004). Le rôle primordial de la MT1-MMP pour l'angiogenèse est aussi supporté par l'observation que, dans une étude *in vivo*, les souris déficientes en MT1-MMP ont une diminution marquée de leur néovascularisation (Zhou et al, 2000). Au niveau des cellules endothéliales, l'expression de la MT1-MMP est augmentée par des facteurs angiogéniques tel le VEGF et le FGF-2, et elle coopère avec la SIP et le VEGF pour induire la migration et la différenciation morphogénique des cellules endothéliales en structures de types capillaires (Langlois et al, 2004).

Toutes ces études démontrent l'importance de la MT1-MMP pour une réponse angiogénique adéquate autant au niveau des cellules endothéliales qu'au niveau des tumeurs. Ce sont principalement des cellules endothéliales qui ont été utilisées lors de cette étude puisque c'est le rôle des associations effectuées par la MT1-MMP lors du processus de l'angiogenèse que nous voulions caractériser.

4.2 Liens entre les adhésions focales et l'angiogenèse

La découverte d'une relation entre les complexes focaux et l'angiogenèse est assez récente. Cette connexion est principalement illustrée par l'effet des agents angiogéniques sur les protéines composant les complexes d'adhésion focale. Par exemple, plusieurs études ont démontré que le VEGF, le plus puissant agent angiogénique trouvé jusqu'à présent, induit une augmentation marquée de la phosphorylation des protéines FAK, p130^{cas} et paxilline, ce qui mène à la régénération des complexes focaux (Abedi et Zachary, 1997 ;Avraham et al, 2003 ;Le Bœuf et al, 2004 ;Wu et al, 2003). Il y a aussi une coopération étroite entre les intégrines et le récepteur VEGFR-2, le tout passant par l'intermédiaire de FAK (Cornillon et al, 2003). Dans les cellules endothéliales, l'inactivation du gène de FAK, un composant majeur des adhésions focales, mène à des défauts du développement vasculaire et de l'angiogenèse et provoque des hémorragies, des œdèmes et la mort des embryons au jour E8.5. En accord avec ces phénotypes, la perte de FAK chez les cellules endothéliales isolées des souris «knock-out» mène à une tubulogenèse, survie cellulaire, prolifération et migration réduites *in vitro* (Shen et al, 2005). Cela suggère fortement que l'expression de cette kinase est nécessaire pour le développement vasculaire normal lors de l'embryogenèse tardive due à ses fonctions essentielles dans

la régulation des multiples activités des cellules endothéliales. Il y a donc clairement une coopération entre l'adhésion et l'angiogenèse au niveau des cellules endothéliales.

4.3 Interactions entre les protéines des adhésions focales et la MT1-MMP

Jusqu'à présent, l'importance de la MT1-MMP et des complexes d'adhésion dans la néovascularisation a été démontrée séparément. Certaines données récentes laissent entrevoir que l'action de la MT1-MMP pourrait être reliée plus spécifiquement à celle des protéines des adhésions focales. Nos résultats supportent les hypothèses suggérées récemment quant au rôle de cette protéase dans la régénération des complexes d'adhésion focale.

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent clairement que la MT1-MMP s'associe à plusieurs protéines des adhésions focales, dont FAK, p130^{cas}, Src et vinculine suite à une activation par la surexpression de Src en présence de sérum ou par la stimulation avec la S1P et le VEGF. Dans le cas de la kinase FAK, l'utilisation de différents mutants avec leurs tyrosines 397, 407 et 861 mutées en des phénylalanines non-phosphorylables a permis de suggérer, sans prouver de façon rigoureuse que l'état de phosphorylation de FAK est important pour les associations trouvées. L'interaction entre la MT1-MMP et FAK semble particulièrement affectée par la perte de la phosphorylation à la Tyr³⁹⁷. Cela n'est pas véritablement étonnant puisque c'est le site d'autophosphorylation de FAK qui permet la liaison de Src par son domaine SH2. Les phosphorylations subséquentes sur les autres tyrosines de FAK sont dépendantes du complexe FAK/Src formé. La phosphorylation de la tyrosine 397 de FAK est cruciale pour de nombreux rôles biologiques établis de FAK, comme la migration cellulaire, la progression du cycle cellulaire et la prévention de l'anoïkis. C'est aussi un déterminant clé pour le contrôle de la régénération des complexes d'adhésion focale par FAK. En fait, il est reconnu que l'activité de FAK est principalement régulée par sa phosphorylation (Cary et al, 1998 ;Cary et Guan, 1999 ;Hamadi et al, 2005 ;Wu et al, 2003). Il est possible de déduire de toutes ces informations que l'état de phosphorylation de FAK révèle aussi son état d'activation. Les résultats obtenus semblent donc suggérer que la MT1-MMP s'associe davantage à la kinase FAK lorsque celle-ci est activée. Pour renforcer cette hypothèse, l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre les phosphotyrosines spécifiques de FAK est envisagé.

Pour ce qui est des associations de la MT1-MMP avec les autres protéines formant les complexes d'adhésion, p130^{cas} et Src, ces interactions sont en accord avec cette hypothèse. En effet, la protéine adaptatrice p130^{cas} et la kinase Src sont toutes deux associées à la kinase FAK suite à la

phosphorylation de cette dernière. L'ensemble de ces protéines, MT1-MMP, FAK, p130^{cas} et Src, pourrait représenter un complexe qui est formé suite à la phosphorylation de FAK. Il a d'ailleurs été trouvé par microscopie FRET que les protéines FAK et p130^{cas} sont phosphorylées au niveau de leurs tyrosines de façon précoce (Ballestrem, 2006). Le complexe formé par FAK, p130^{cas} et Src est bien caractérisé et plusieurs études ont démontré qu'il était responsable de la régénération des complexes focaux. L'innovation apportée par cette étude est l'arrivée d'une nouvelle constituante, la MT1-MMP, au sein de ce complexe. La paxilline est normalement associée à FAK, p130^{cas} et la vinculine. Elle ne s'associe pourtant pas à la MT1-MMP, ou plutôt elle se dissocie de cette protéine suite à la stimulation de 5 minutes à la S1P. Il se peut que l'association de la MT1-MMP avec la paxilline existe, que ce soit même la paxilline qui dirige la protéase au sein des complexes d'adhésion, mais que ces événements soient plus précoces et déjà terminés en 5 minutes. Cette hypothèse nous semble probable et une cinétique d'association avec des temps plus courts permettrait de répondre à ces interrogations.

Évidemment, les résultats d'immunoprécipitations obtenus lors de cette étude ne permettent pas de déterminer si les associations entre la MT1-MMP avec les différentes protéines d'adhésion évaluées s'effectuent directement ou via une molécule adaptatrice (ou encore des partenaires trouvés dans les complexes) encore non-identifiée. Le risque d'associations non-spécifiques est toutefois réduit par l'utilisation d'une technique de lyse assez drastique des cellules. La lyse au SDS est déjà plus rigoureuse que celle au détergent Nonidet P-40, car les échantillons sont chauffés 5 minutes à 100°C en présence du tampon de lyse au SDS. Les associations restantes sont donc considérées comme spécifiques. De plus, l'hypothèse que la MT1-MMP est seulement «collée» à un ensemble de protéines des complexes d'adhésion non-solubilisées est peu probable puisque la protéase ne s'associe point à l'actine, qui fait pourtant partie intégrante des adhésions focales.

L'activation des MMPs au front migratoire des cellules motiles augmente la protéolyse de la matrice, ce qui permet le relâchement des contacts intégrine-matrice et facilite donc la régénération des complexes d'adhésion focale (Mitra et al, 2005). L'organisation des complexes d'adhésion focale et des filaments d'actine est particulièrement réduite chez les cellules surexprimant la MT1-MMP et la MT3-MMP (Shofuda et al, 2004). De plus, la réduction de la formation de complexes d'adhésion stables par l'expression de la MT1-MMP est associée avec une augmentation de la motilité cellulaire (Takino et al, 2006). Ces trois études mettent à l'avant le rôle des MMPs, et celui de la MMP membranaire de type 1, pour la régénération des complexes focaux, en empêchant la formation d'adhésions focales stables qui limitent la migration cellulaire. Une étude très récente démontre même que la lyse de la matrice extracellulaire, et plus particulièrement la dégradation protéolytique de la

fibronectine, par la MT1-MMP promeut la régénération des complexes d'adhésion focale en les désassemblant, ce qui stimule la migration cellulaire (Takino et al, 2006). Lors de nos expériences de stimulation par la S1P ou le VEGF, les cellules endothéliales ont toujours été ensemencées sur des couches de fibronectine, un élément de la matrice extracellulaire qui aide à l'adhésion des cellules. Il est possible que ce détail expérimental nous ait permis de mieux visualiser les interactions de la MT1-MMP avec les protéines composant les adhésions focales. Comme le mentionne l'équipe de Takino (2006), il est concevable qu'une augmentation de la protéolyse péricellulaire peut affecter la phosphorylation de FAK et la régénération des complexes d'adhésion en dégradant les ligands des intégrines présents dans la MEC (Takino et al, 2006). Dans le même ordre d'idée, il a été démontré que FAK promeut la présentation de MT1-MMP à la surface cellulaire en inhibant son endocytose dépendante de l'endophiline A2 (Wu et al, 2005). Il y aurait donc une boucle de régulation permettant une augmentation marquée de la migration cellulaire allant de la MT1-MMP aux complexes d'adhésion focale, et de FAK à la MT1-MMP.

Les fonctions de FAK sont contrôlées par phosphorylation, mais aussi par clivage. Par exemple, le collagène dégradé peut induire le clivage de FAK en activant des protéases intracellulaires semblables à la calpaïne. Le clivage de FAK peut perturber ses fonctions et altérer ses associations à d'autres protéines des complexes d'adhésion focale. Il semblerait que la kinase FAK est aussi clivée chez les cellules surexprimant les MT-MMPs (Cornillon et al, 2003 ;Shofuda et al, 2004). Il serait donc imprudent d'éliminer l'hypothèse que la MT1-MMP provoque la régénération des adhésions focales suite à un clivage de FAK. Il est possible que l'association de la MT1-MMP avec FAK provoque le clivage et l'inactivation de cette dernière, ce qui mènerait à la dissociation des complexes d'adhésion focaux, permettrait la régénération de ces structures dynamiques et mènerait ultimement à une augmentation de la migration cellulaire.

4.4 La modulation des interactions MT1-MMP/protéines des complexes d'adhésion

Les interactions entre la MT1-MMP et les protéines composant les complexes d'adhésion peuvent être modulées par au moins deux cytokines retrouvées dans la circulation sanguine, la S1P et le VEGF. Il est à noter que la S1P s'est révélée un très puissant modulateur de ces associations, car cette cytokine seule a plus d'impact que le sérum entier. Pour ce qui est du VEGF, sa stimulation est bien visible, mais est un peu moins impressionnante que celle provoquée par la S1P. Il est important de rester conscient que la S1P induit l'ARN messager ainsi que l'expression de la protéine MT1-MMP, comme

décrit par l'équipe de Annabi en 2003. Les niveaux de MT1-MMP détectés sont donc nécessairement plus élevés lors de la stimulation avec la S1P, mais ce qui est démontré dans cette étude est la comparaison des niveaux d'associations de la MT1-MMP avec différentes protéines constituant les complexes d'adhésion focale suite à une stimulation avec la S1P.

Des études ont démontré que la S1P induit une augmentation rapide de la phosphorylation de FAK, ce qui est responsable du remodelage, de la translocation périphérique et du désassemblage des adhésions focales (Lee et al, 2000 ;Shikata et al, 2003a ;2003b). La stimulation par cette cytokine activerait donc la kinase FAK en permettant sa phosphorylation. Cette nouvelle donnée renforce l'hypothèse possible, mais non-démontrée, que l'état d'activation de FAK est importante pour son interaction avec la MT1-MMP. De plus, l'association se produit dès deux minutes de stimulation par la S1P, ce qui est très rapide et correspond au temps que prend la phosphorylation de FAK par ce modulateur selon l'étude de Lee et al (2000). Pour ce est qui du VEGF, plusieurs études ont aussi démontré qu'une stimulation par ce facteur de croissance provoque la phosphorylation des tyrosines de FAK, p130^{cas} et paxilline (Avraham et al, 2003 ;Le Bœuf et al, 2004 ;Wu et al, 2003). Cette activation de FAK par le VEGF supporte aussi l'hypothèse que la MT1-MMP s'associe à la kinase FAK activée. Le temps de réponse pour l'association des deux protéines correspond encore au temps que prend le VEGF à phosphoryler FAK. Il a été noté que la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF est une étape clé dans la réponse angiogénique et est médiée par un taux accéléré d'assemblage/désassemblage des complexes d'adhésion focale (Avraham et al, 2003).

Nos résultats, combinés avec les données d'autres études de la littérature permettent de suggérer l'hypothèse que ces deux modulateurs des associations entre la MT1-MMP et les protéines de adhésions focales auraient un effet indirect. La S1P et le VEGF permettraient la formation des associations observées en induisant une signalisation menant à la phosphorylation de FAK, et probablement aussi celle de la protéine p130^{cas}. La MT1-MMP viendrait par la suite se lier à ces protéines activées. Des expériences avec des anticorps dirigés contre les phosphotyrosines de FAK pourraient permettre d'évaluer cette hypothèse.

4.5 Implication des domaines de la MT1-MMP

Nous avons aussi effectué une étude de la relation structure-fonction de la MT1-MMP pour son rôle dans les interactions avec les protéines des adhésions focales. Deux domaines majeurs ont été

particulièrement étudiés, la région catalytique et la région cytoplasmique, par l'utilisation de mutants de la MT1-MMP.

La fonction enzymatique de la MT1-MMP est requise pour la dégradation de la MEC, la migration cellulaire et l'augmentation de l'activation de ERK (Cao et al, 2004 ;Gingras et al, 2001 ;Langlois et al, 2004). Un mutant de la MT1-MMP sans portion catalytique a également démontré l'importance de ce domaine pour l'activation de la proMMP-2, la croissance cellulaire en matrice de collagène et l'invasion sur Matrigel, autant *in vitro* que *in vivo* (Nonaka et al, 2005). L'action angiogénique de la MT1-MMP est aussi inhibée par l'inactivation du domaine catalytique de la MT1-MMP, comme le démontre l'incapacité du mutant à provoquer la formation de structures de type capillaires (Langlois et al, 2004). De notre côté, nous avons démontré que l'activité enzymatique de la MT1-MMP est essentielle à l'association de cette protéine avec les protéines des complexes d'adhésion en réponse à la SIP. Cette observation est en accord avec les découvertes de l'équipe de Takino (2006), selon laquelle la protéolyse de la fibronectine par la MT1-MMP est responsable de la régénération des complexes d'adhésion en affectant la phosphorylation de FAK. Il est possible en effet que la dégradation de ligands des intégrines présents dans la MEC puisse induire la signalisation médiée par les intégrines à travers FAK, ERK et Akt. Il est intéressant de noter que lorsque les cellules COS-7 sont stimulées par la cotransfection de Src au lieu d'une stimulation à la SIP, l'inactivation du domaine catalytique de la MT1-MMP n'empêche pas les associations de cette protéine avec FAK et p130^{cas}, mais au contraire les stimule. Ce résultat, qui peut sembler contradictoire, peut s'expliquer par le fait que le sérum contient plusieurs facteurs de croissance et autres stimulateurs qui sont capables de réguler les complexes d'adhésion focale. Après 48 heures en présence de sérum, la signalisation entraînée par ce dernier est très avancée et l'activité de la MT1-MMP au niveau des complexes formés avec les protéines des complexes d'adhésion peut avoir changé.

Malgré sa petite taille, 20 acides aminés, la portion cytoplasmique de la MT1-MMP remplit plusieurs fonctions. Elle contribue à l'induction de la migration cellulaire, à l'endocytose, au trafic adéquat de l'enzyme et à son interaction avec la cavéoline-1 phosphorylée (Labrecque et al, 2004). Le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP joue un rôle critique pour la signalisation externe-interne lors de la migration cellulaire dépendante de la MT1-MMP (Cao et al, 2004 ;Langlois et al, 2004). De plus, la portion centrale de ce domaine a un rôle important dans l'invasion cellulaire en contrôlant la localisation au front migratoire et la dégradation/régénération de la MT1-MMP (Lehti et al, 2000). La présence du domaine cytoplasmique de la MT1-MMP est également importante pour induire la formation de réseaux de type capillaire bien définis chez les cellules endothéliales (Langlois et al,

2004 ;Sunni et al, 2004). Au niveau des associations entre la MT1-MMP et les protéines des complexes d'adhésion, la portion cytoplasmique de la MT1-MMP agirait comme régulateur négatif suite à une stimulation à la S1P. Cela pourrait avoir un lien avec le rôle de ce domaine pour l'internalisation de la MT1-MMP. Étonnamment, la portion cytoplasmique semble importante pour les associations entre la MT1-MMP et les protéines des adhésions focales lorsqu'elles sont induites par la surexpression de Src en présence de sérum dans les cellules COS-7. Ce résultat inverse provient sûrement du fait que la signalisation est enclenchée depuis 48 heures au lieu de 5 minutes, ce qui implique nécessairement des divergences au niveau de la nature des complexes formés.

Il est étonnant que la MT1-MMP, une protéine transmembranaire, ait des interactions aussi nombreuses avec les protéines cytosoliques formant les complexes d'adhésion focale. Nous avons d'abord spéculé que les associations s'effectuaient au niveau du domaine cytoplasmique de la protéase. Cette hypothèse semblait être confirmée par la nécessité de la présence de cette région lors de la stimulation des cellules endothéliales par le sérum en présence d'une surexpression de Src, mais le domaine cytoplasmique a plutôt été trouvé comme un régulateur négatif suite à la stimulation plus fine par la S1P. L'hypothèse que la protéolyse péricellulaire de la MT1-MMP libère des fragments cryptiques qui sont responsables des effets trouvés, tel que proposé par l'équipe de Takano (2006), est attrayante, mais encore une fois, notre étude structure-fonction va à l'encontre de cette idée. Bien que le domaine catalytique de la MT1-MMP soit essentiel à la formation des associations suite à la stimulation par la S1P, il les régule à la baisse lors de la surexpression de Src. De plus, ce que cette étude démontre, ce sont des interactions et non pas des effets distants. Par ailleurs, nous ne sommes pas la première équipe à trouver un rôle intracellulaire à la MT1-MMP. En effet, elle dégrade la péricentrine, une protéine intégrale des centrosomes, et cela cause l'instabilité des chromosomes, un prédicteur précoce de la carcinogenèse (Golubkov et al, 2005). Comme mentionné plus haut, il a aussi été trouvé que la MT1-MMP clive la kinase FAK, une protéine intracellulaire (Shofuda et al, 2004).

4.6 Rôle de la cavéoline-1

Les études antérieures indiquent que la MT1-MMP est concentrée dans les cavéoles des cellules endothéliales. Les effets de la cavéoline-1, la principale composante protéique de ces microstructures, sur les fonctions de la MT1-MMP sont donc intrigants.

Les ARN interférents (RNAi) sont de petits ARN non-codants de 21-23 nucléotides qui inhibent l'expression de gènes. Les siRNA peuvent interférer avec l'expression des gènes de plusieurs façons :

en clivant les ARNm de manière séquence-spécifique, en prévenant la traduction des ARNm ou encore en les inhibant transcriptionnellement (Eckstein, 2005). Il est intéressant de noter que la technologie de l'ARN interférent a été découverte récemment comme étant un mécanisme d'inhibition post-transcriptionnelle de gène se produisant naturellement (Chae et al, 2004). Cette technologie a été utilisée lors de notre étude afin de déterminer l'effet de l'inhibition de l'expression de la cavéoline-1 sur la formation des associations entre la MT1-MMP et les protéines des adhésions focales. Il a été trouvé qu'une inhibition de l'expression de la cavéoline-1 conduit à une augmentation des interactions de la MT1-MMP avec les protéines composant les complexes d'adhésions. La cavéoline-1 ressort donc comme un modulateur négatif de ces associations. Ce résultat n'est pas particulièrement surprenant puisque plusieurs études supportent l'hypothèse que la cavéoline fournit un moyen direct permettant aux protéines résidant dans les cavéoles d'être séquestrées et inhibées à l'intérieur de ces microdomaines. Il est à noter qu'un contrôle sans l'induction de la S1P devrait également être fourni pour la figure 3.8A, mais n'as pas été effectué du à la quantité limitée de réactif. Cette expérience doit donc être répétée et complétée avant publication dans un article scientifique.

Les principales protéines trouvées interagissant avec la cavéoline-1 incluent les sous-unités α des protéines G, Ha-Ras, les kinases de la famille de Src, eNOS, l'EGFR et certains récepteurs à tyrosine kinases ainsi que les isoformes des protéines kinases C (Bender et al, 2002 ; Couet et al, 1997a ; Labrecque et al, 2003 ; Okamoto et al, 1998 ; Wiechen et al, 2001). La cavéoline-1 interagit directement avec ces protéines et elle maintient la majorité d'entre elles dans une conformation inactive, ce qui suggère qu'elle joue un rôle de régulation négative dans la transmission des signaux cellulaires. Elle semble en effet agir comme protéine d'échafaudage capable de réguler l'activité des autres molécules en s'y liant et les relâchant au moment voulu (Couet et al, 1997b ; Okamoto et al, 1998 ; Razani et al, 2001a). Une petite région cytosolique de 19 acides aminés (82-101) près du domaine N-terminal de la cavéoline, nommé le domaine d'échafaudage, a été reconnue comme suffisante pour permettre ces associations et supprimer les activités (Couet et al, 1997a ; 1997b ; Labrecque et al, 2003 ; Okamoto et al, 1998). Il semblerait que la MT1-MMP fait aussi partie des protéines régulées par la cavéoline-1. En effet, des cellules COS-7 transfectées avec la MT1-MMP ont des accroissements notables de leur potentiel migratoire, mais l'expression simultanée de la cavéoline-1 antagonise complètement cet effet. Évidemment, il y a aussi les résultats de la présente étude qui vont dans le même sens. La cavéoline-1 interagirait donc physiquement avec la MT1-MMP, ou encore elle modulerait les événements de transmission du signal qui sont impliqués dans la migration cellulaire qui sont dépendants de la MT1-MMP (Annabi et al, 2001).

Des interactions directes des molécules de signalisation avec la cavéoline-1 mènent à leurs inactivations. Comme plusieurs de ces molécules peuvent induire la transformation cellulaire lorsqu'elles sont constitutivement actives, il est raisonnable de spéculer que la cavéoline-1 possède une activité de suppression de transformation. Il a été observé que les cellules NIH3T3, en présence de la cavéoline-1 antisens, acquièrent la capacité de croître sans ancrage (avec perte d'inhibition de contact), de former des tumeurs chez les souris immunodéficientes et montrent une hyperactivité de la cascade des kinases MAP p42/44. Ces observations suggèrent que la régulation à la baisse de la cavéoline-1 est suffisante pour induire la transformation oncogénique (Bender et al, 2002 ;Galbiati et al, 1998). Les ARNm et l'expression de la cavéoline-1 sont d'ailleurs perdus ou réduits au cours de la transformation des cellules par des oncogènes activés. Les cavéoles sont également absentes de ces cellules transformées (Galbiati et al, 1998). Des études cliniques ont aussi démontré que bien que la cavéoline-1 soit hautement exprimée chez le tissu mésenchymal normal et chez les tumeurs mésenchymales bénignes, son niveau est fortement réduit chez la majorité des sarcomes de types histologiques variés (Wiechem et al, 2001). De façon intéressante, le gène de la cavéoline-1 humain est localisé à un locus suspecté d'être suppresseur de tumeurs (7q31.1) (Galbiati et al, 1998 ;Razani et al, 2001a). Tous ces résultats ont mené à l'idée que la cavéoline-1 est en fait un gène suppresseur de tumeurs, dont la réduction ou suppression chez les cellules offre des avantages de croissance et facilite la tumorigenèse (Razani et al, 2001a).

La cavéoline-1 est concentrée à l'arrière des cellules migrantes, et c'est la forme phosphorylée à la tyrosine 14 de la cavéoline qui est associée aux complexes d'adhésion focale aux lamellipodes des cellules migrantes suite à une stimulation à la fibronectine. Il est supposé qu'une simple polarisation de la cavéoline, sans changement substantiel dans son expression, pourrait renforcer son effet inhibiteur à l'arrière de la cellule migrante et relâcher son activité inhibitrice au front migratoire (Beardsley et al. 2005). Comme la MT1-MMP est localisée au front migratoire des cellules motiles et que c'est aussi à cet endroit que la régénération des complexes d'adhésion est la plus importante, il serait probable que la phosphocavéoline-1 empêche la dissociation des complexes MT1-MMP/FAK pour une régénération efficace des complexes d'adhésion. Les résultats obtenus vont cependant à l'encontre de cette idée puisque l'état de phosphorylation de la cavéoline-1 n'a pas d'effet sur les interactions observées. La surexpression de la cavéoline de type sauvage empêche autant les associations que celle de la cavéoline mutante non-phosphorylable.

En ce qui a trait au rôle de la cavéoline-1 lors du processus de néovascularisation, cette protéine semble être encore responsable d'une régulation à la baisse. En effet, la perturbation de la cavéoline-1

résulte en la prolifération incontrôlée des cellules endothéliales *in vivo* (Razani et Lisanti, 2001b) et la réduction des niveaux de cavéoline-1 par des oligonucléotides antisens inhibe l'angiogénèse *in vitro* (Griffoni et al, 2000). Ces observations supportent l'idée que l'association de la MT1-MMP avec les protéines des adhésions focales, probablement responsable de la régénération des complexes d'adhésion et de la migration des cellules endothéliales, est aussi importante lors du processus de l'angiogénèse.

CHAPITRE V

CONCLUSION

5.1 Implications possibles de la MT1-MMP dans les adhésions focales

La MT1-MMP interagit avec les complexes d'adhésion focale, comme l'indique son association avec les protéines FAK, p130^{CAS}, Src et vinculine et cette présence témoigne de l'importance de cette enzyme dans le contrôle de la motilité cellulaire. L'action de cette protéine pluripotente s'étend dorénavant clairement sur le milieu extracellulaire et intracellulaire à la fois.

FAK et Src sont tous les deux requis pour la régénération efficace des complexes d'adhésion focale à l'avant de la cellule et ils favorisent le désassemblage des sites d'adhésion à la queue des cellules motiles (Panetti, 2002 ;McLean et al, 2005 ;Webb et al, 2004). Il y aurait donc un cycle régulateur où l'activation du complexe FAK/Src et la signalisation par ERK fonctionnerait premièrement pour augmenter la dissociation de FAK des contacts focaux préexistants, puis à une augmentation de la réassociation de FAK et à son activation à un nouveau contact focal dans une cellule migratoire (Mitra et al, 2005). En fait, durant la migration cellulaire, les nouveaux complexes d'adhésion sont soit changés ou ils mûrissent en des structures plus organisées. La signalisation FAK/Src interrompt cette maturation en induisant le désassemblage des complexes d'adhésion, ce qui cause une régénération continue de l'adhésion (Takino et al, 2006). Nous croyons que la MT1-MMP fait partie de ce complexe et qu'elle permet une régénération des complexes focaux. Nous émettons l'hypothèse que la phosphorylation de la protéine FAK serait importante à ses associations avec la MT1-MMP puisque des mutants non-phosphorylables de cette kinase semblent avoir des niveaux d'association moindres avec la MT1-MMP. De plus, la sphingosine 1-phosphate et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, deux molécules qui ont parmi leurs fonctions de phosphoryler FAK, sont des médiateurs efficaces des associations entre la MT1-MMP et les protéines des adhésions focales. Nous avons également trouvé un régulateur de ces interactions : la cavéoline-1. Selon son habitude, cette protéine joue encore une fois un rôle de régulateur négatif. En empêchant l'association

de la MT1-MMP avec les protéines des complexes d'adhésion, la cavéoline-1 prévient la régénération de ces structures et limite le potentiel migratoire des cellules. Comme une des composantes fondamentales pour l'angiogenèse et pour la promotion de l'invasion cellulaire est une augmentation de la migration cellulaire (Hauck et al, 2001), elle n'est pas proposée comme gène supresseur de tumeur pour rien !

En bref, la MT1-MMP interagit avec les complexes d'adhésion focale, comme l'indique son association avec les protéines FAK, p130^{cas}, Src et vinculine. L'implication de sa présence aux adhésions focales témoigne de l'importance de cette enzyme dans le contrôle de la motilité cellulaire.

5.2 Perspectives

L'étude du phénomène d'associations de la MT1-MMP avec les protéines des adhésions focales n'est pas encore complétée. Des études d'immunocytochromies sont prévues afin de vérifier la localisation de la MT1-MMP dans les structures dynamiques que sont les complexes d'adhésion focale. La colocalisation de cette protéase avec des protéines marqueurs, telles la FAK et la vinculine sera donc effectuée grâce à la technologie de la microscopie confocale. Des études futures sont également prévues afin de vérifier l'effet de la stimulation à la SIP et du VEGF dans le temps par microscopie. La MT1-MMP est-elle vraiment relocalisée dans les complexes d'adhésions suite à ces stimuli ? Il serait aussi intéressant d'effectuer des cinétiques d'association avec les autres protéines des complexes d'adhésion interagissant avec la MT1-MMP, c'est à dire Src, la vinculine et la paxilline. Cela pourrait aider à la conception de la séquence d'arrivée des protéines, qui mène ultimement à la migration cellulaire. Des inconnues importantes demeurent pour la compréhension des événements séquentiels qui se produisent entre l'assemblage du complexe d'adhésion et la migration cellulaire. Le recrutement des protéines, les interactions et la régulation de la phosphorylation sont étudiés séparément, mais des trous demeurent pour la synthèse de ces informations et pour une image cohésive de la formation et le désassemblage des complexes d'adhésion focale, qui sont critiques pour le mouvement cellulaire (Panetti, 2002). Les résultats rapportés ont un impact potentiel sur notre compréhension de nouvelles fonctions de la MT1-MMP dans l'angiogenèse et de sa régulation par des facteurs plaquettaires (SIP) et par le VEGF. Ces résultats pourraient éventuellement conduire à l'élaboration de molécules anti-cancéreuses ciblant les fonctions en amont et en aval de la MT1-MMP.

RÉFÉRENCES

- Abedi, H. et I. Zachary. 1997. «Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxilline in endothelial cells». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no 24, p. 15442-15451.
- Anilkumar, N., T. Uekita, J.R. Couchman, H. Nagase, M. Seiki et Y. Itoh. 2005. «Palmytoylation at Cys⁵⁷⁴ is essential for MT1-MMP to promote cell migration». *The FASEB Journal*, vol. 19, no 10, p. 1326-1328
- Annabi, B., M.-P. Lachambre, N. Bousquet-Gagnon, M. Pagé, D. Gingras et R. Béliveau. 2001. «Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains». *The Biochemical Journal*, vol. 353, p. 547-553.
- Annabi, B., S. Thibeault, Y.-T. Lee, N. Bousquet-Gagnon, N. Eliopoulos, S. Barette, J. Galipeau et R. Béliveau. 2003. «Matrix metalloproteinase regulation of sphingosine-1-phosphate induced angiogenic properties of bone marrow stromal cells». *Experimental Hematology*. Vol. 31, p. 640-649.
- Annabi, B., S. Thibeault, R. Moundjian et R. Béliveau. 2004. «Hyaluronan cell surface binding is induced by type I collagen and regulated by caveolae in glioma cells». *The Journal of Biological Chemistry*, vol 279, no 21, p. 21888-21896.
- Aplin, A.E., A. Howe, S.K. Alahari et R.L. Juliano. 1998. «Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrin, cadherins, immunoglobulins-cell adhesion molecules, and selectins». *Pharmacological Reviews*, vol. 50, no 2, p. 197-263.
- Avizienyte, E. et M.C. Frame. 2005. «Src and FAK signaling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition». *Current Opinions in Cell Biology*, vol. 17, p. 1-6.
- Avraham, H.K., T.-H. Lee, Y. Koh, T.-A. Kim, S. Jiang, M. Sussman, A.M. Samarel et S. Avraham. 2003. «Vascular endothelial growth factor regulates focal adhesion assembly in human brain microvascular endothelial cells through activation of the focal adhesion kinase and related adhesion focal tyrosine kinase». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no 38, p. 36661-36668.
- Ballestrem, C., N. Erez, J. Kirchner, Z. Kam, A. Bershadsky et B. Geiger. 2006. «Molecular mapping of tyrosine-phosphorylated proteins in focal adhesions using fluorescence resonance energy transfert». *Journal of Cell Science*, vol. 119, p. 866-875.
- Beardsley, A., K. Fang, H. Mertz, V. Castranova, S. Friend et J. Liu. 2005. «Loss of caveolin-1 polarity impedes endothelial cells polarization and directional movement». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no 5, p. 3541-3547.

- Béliveau, É. 2005. «La MT1-MMP participe à la formation de complexes multimoléculaires incluant des protéines de transduction des signaux intracellulaires». Mémoire de Maîtrise, Montréal, Université du Québec à Montréal, 81 p.
- Belkin, A.M., S.S. Akimov, L.S. Zaritskaya, B. Ratnikov, E.I. Deryugina et A.Y. Strongin. 2001. «Matrix-dependant proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no 21, p. 18415-18422.
- Bender, F., M. Montoya, V. Monardes, L. Leyton et A.F.G. Quest. 2002. «Caveolae and caveolae-like membrane domains in cellular signaling and disease : identification of downstream targets for the tumor suppressor protein caveolin-1». *Biological Research*, vol.35, no 2, p.151-167.
- Bergers, G., et L.E. Benjamin. 2003. «Tumorigenesis and the angiogenic switch». *Nature Review Cancer*, vol. 3, p. 401-410.
- Boccaccio, C. et P.M. Comoglio. 2005. «A functional role for hemostasis in early cancer development». *Cancer Research*, vol. 65, no 19, p. 8579-8582.
- Cao, J., P. Kozarekar, M. Pavlaki, C. Chiarelli, W.F. Bahou et S. Zucker. 2004. «Distinct roles for the catalytic and hemopexin domains of membrane type 1-matrix metalloproteinase in substrate degradation and cell migration». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no 14, p. 14129-14139.
- Carmeliet, P. 2003. «Angiogenesis in health and disease». *Nature Medecine*, vol. 9, no 6, p. 653-660.
- Carmeliet, P. 2005. «Angiogenesis in life, disease and medicine». *Nature*, vol. 438, p. 932-936.
- Cary, L.A., D.C. Han, T.R. Polte, S.K. Hanks et J-L. Guan. 1998. «Identification of p130^{CAS} as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration». *The Journal of Cell Biology*, vol. 140, no 1, p. 211-221.
- Cary, L.A. et J-L. Guan. 1999. «Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling». *Frontiers in Bioscience*, vol. 4, p. d102-d113.
- Chae, S.-S., J.-H. Paik, H. Furneaux et T. Hla. 2004. «Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference». *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 114, no 8, p. 1082-1089.
- Chalfant, C.E., et S. Spiegel. 2005. «Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate : expanding roles in cell signaling». *Journal of Cell Science*, vol. 118, p.4605-4612.
- Cho, K.A., S.J. Ryu, Y.S. Oh, J.H. Park, J.W. Lee, H-P. Kim, K.T. Kim, I.S. Jang et S.C. Park. 2004. «Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status». *The Journal of Biological Chemistry*, vol 279, no 40, p. 42270-42278.
- Cho, S.Y., R.L. Klemke. 2000. «Extracellular-regulated kinase activation and CAS/Crk coupling regulate cell migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular matrix». *The Journal of Cell Biology*, vol 149, no 1, p. 223-236.

- Cornillon, J., L. Campos et D. Guyotat. 2003. «Focal adhesion kinase (FAK), une protéine aux fonctions multiples». *Médecine Sciences*, vol. 19, no 6-7, p. 743-752.
- Couet, J., S. Li, T. Okamoto, T. Ikezu et M.P. Lisanti. 1997a. «Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain ; implication for the interaction of caveolin with caveolin-associated proteins». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no 10, p. 6525-6533.
- Couet, J., M. Sargiacomo et M.P. Lisanti. 1997b. «Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins ; caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities». *The Journal of Biological Chemistry*, vol 272, no 48, p. 30429-30438.
- del Pozo, M.A., N. Balasubramanian, N.B. Alderson, W.B. Kiosses, A. Grande-Garcia, R.G.W. Anderson et M.A. Schwartz. 2005. «Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization». *Nature Cell Biology*, vol. 7, no 9, p. 901-908.
- Deryugina, E.I., B.I. Ratnikov, T.I. Postnova, D.V. Rozanov et A.Y. Strongin. 2002. «Processing of integrin α_v subunit by membrane type 1 matrix metalloproteinase stimulates migration of breast carcinoma cells on vitronectin and enhances tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no 12, p. 9749-9756.
- Dvorak, H.F. 2005. «Angiogenesis : update 2005». *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 3, p. 1835-1842.
- Eckstein, F. 2005. «Small non-coding RNAs as magic bullets». *TRENDS in Biochemical Sciences*, vol. 30, no 8, p. 445-452.
- Ferrera, N. et R.S. Kerbel. 2005. «Angiogenesis as a therapeutic target». *Nature*, vol. 438, p. 967-974.
- Galbiati, F., D. Volonté, J.A. Engelman, G. Watanabe, R. Burk, R.G. Pestell et M.P. Lisanti. 1998. «Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade». *The EMBO Journal*, vol. 17, no 22, p. 6633-6648.
- Gálvez, B.G., S. Matías-Román, M. Yáñez-Mó, M. Vicente-Manzanares, F. Sánchez-Madrid et A.G. Arroyo. 2004. «Caveolae are a novel pathway for membrane-type 1 matrix metalloproteinase traffic in human endothelial cells». *Molecular Biology of the Cell*, vol. 15, p. 678-687.
- Geiger, B., A. Bershadsky, R. Pankov et K.M. Yamada. 2001. «Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton». *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 2, p. 793-805.
- Gingras, D., N. Bousquet-Gagnon, S. Langlois, M.-P. Lachambre, B. Annabi et R. Béliveau. 2001. «Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)». *FEBS Letters*, vol. 507, p. 231-236.
- Golubkov, V.S., S. Boyd, A.Y. Savinov, A.V. Chekanov, A.L. Osterman, A. Remacle, D.V. Rozanov, S.J. Doxsey et A.Y. Strongin. 2005. «Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)

- exhibits an important intracellular cleavage function and causes chromosome instability». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no 26, p. 25079-25086.
- Gonzalez, E., R. Kou et T. Michel. 2006. «Rac1 modulates sphingosine 1-phosphate-mediated activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathways in vascular endothelial cells». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no 6, p. 3210-3216.
- Griffoni, C., E. Spisni, S. Santi, M. Riccio, T. Guarnieri et V Tomasi. 2000. «Knockdown of caveolin-1 by antisense oligonucleotides impairs angiogenesis in vitro and in vivo». *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 276, no 2, p. 756-761.
- Hamadi, A., M. Bouali, M. Dontenwill, H. Stoeckel, K. Tekeda et P. Rondé. 2005. «Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397». *Journal of Cell Science*, vol 118, p. 4415-4425.
- Hanahan, D. et J. Folkman, 1996. «Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis» *Cell*, vol. 86, p. 353-364.
- Hanahan, D. et R.A. Weinberg. 2000. «The hallmarks of cancer». *Cell*, vol. 100, p. 57-70.
- Hanks, S.K., L. Ryzhova, N.-Y. Shin et J. Brábek. 2003. «Focal adhesion kinase signaling activities and, their implications in the control of cell survival and motility». *Frontiers in Bioscience*, vol. 8, p. d982-d996.
- Hauck, C.R., D.A. Hsia et D.D. Schlaepfer. 2002. «The focal adhesion kinase-a regulator of cell migration and invasion». *IUBMB Life*, vol. 53, no 2, p. 115-119.
- Hauck, C.R., D.J. Sieg, D.A. Hsia, J.C. Loftus, W.A. Gaarde, B.P. Monia et D.D. Schlaepfer. 2001. «Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupts epidermal growth factor-stimulated signaling promoting the migration of invasive human carcinoma cells». *Cancer Research*, Vol. 61, p. 7079-7090.
- Hobson, B. et J. Denekamp. 1984. «Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies». *British Journal of Cancer*, vol. 49, no 4, p. 405-413.
- Hotary, K., E. Allen, A. Punturieri, I. Yana et S.J. Weiss. 2000. «Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type 1 collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3». *The Journal of Cell Biology*, vol. 149, no 6, p. 1309-1323.
- Hotary, K.B., E.D. Allen, P.C. Brooks, N.S. Datta, M.W. Long et S.J. Weiss. 2003. «Membrane type 1 matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix». *Cell*, vol. 114, p. 33-45.
- Itoh, Y. et M. Seiki. 2006. «MT1-MMP : A potent modifier of pericellular microenvironment». *Journal of Cellular Physiology*, vol. 206, p. 1-8.
- Jacobisiak, M., W. Lasek et J. Golab. 2003. «Natural mechanisms protecting against cancer». *Immunological Letters*, vol. 90, no 2-3, p. 103-122.

- Jiang, A., K. Lehti, X. Wang, S.J. Weiss, J. Keski-Oja et D. Pei. 2001. «Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis». *PNAS*, vol. 98, no 24, p. 13693-13698.
- Kajita, M., Y. Itoh, T. Chiba, H. Mori, A. Okada, H. Kinoh et M. Seiki. 2001. «Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration». *The Journal of Cell Biology*, vol. 153, no 5, p. 893-904.
- Katz, B.-Z., L. Romer, S. Miyamoto, T. Volberg, K. Matsumoto, E. Cukierman, B. Geiger et K.M. Yamada. 2003. «Targeting membrane-localised focal adhesion kinase to focal adhesions». *The Journal of Biological Chemistry*, vol.278, no 31, p. 29115-29120.
- Labrecque, L., I. Royal, D.S. Surprenant, C. Patterson, Gingras et R. Béliveau. 2003. «Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol». *Molecular Biology of the Cell*, vol 14, p. 334-347.
- Labrecque, L., C. Nyalendo, S. Langlois, Y. Durocher, C. Roghi, M. Murphy, D. Gingras et R. Béliveau. 2004. «Src-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 induces its association with membrane type 1 matrix metalloproteinase». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no 50, p. 52132-52140.
- Langlois, S., D. Gingras et R. Béliveau. 2004. «Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cooperates with sphingosine 1-phosphate to induce endothelial cell migration and morphogenic differentiation». *Blood*, vol. 103, no 8, p. 3020-3028.
- Langlois, S., G. Di Tomasso, D. Boivin, C. Rhoghi, G. Murphy, D. Gingras et R. Béliveau. 2005. «Membrane type 1-matrix metalloproteinase induces endothelial cell morphogenic differentiation by a caspase-dependent mechanism». *Experimental Cell Research*, vol. 307, p. 452-464.
- Langlois, S., C. Nyalendo, L. Labrecque, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras et R. Béliveau. «EGFR-dependent induction of cell migration by membrane-type 1 matrix metalloproteinase». Manuscrit en rédaction.
- Le Bœuf, F., F. Houle et J. Huot. 2004. «Regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase by heat shock protein 90 and Src kinase activities». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no 37, p. 39175-39185.
- Lee, O.H., D.J. Lee, Y.M. Kim, Y.S. Kim, H.J. Kwon, K.W. Kim et Y.G. 2000. «Sphingosine 1-phosphate stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and chemotactic motility of endothelial cells via the G(i) protein-linked phospholipase C pathway». *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 268, no 1, p. 47-53.
- Lee, S., S.M. Jilani, G.V. Nikolova, D. Carpizo et M.L. Iruela-Arispe. 2005. «Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors». *The Journal of Cell Biology*, vol. 169, no 4, p. 681-691.

- Lehti, K., H. Valtanen, S. Wickström, J. Lohi et J. Keski-Oja. 2000. «Regulation of membrane-type-1 matrix metalloproteinase activity by its cytoplasmic domain». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no 20, p. 15006-15013.
- Levkau, B., R.D. Kanagy, A. Karsan, B. Weitkamp, A.W. Clowes, R. Ross et E.W. Raines. 2002. «Activation of metalloproteinases and their association with integrins : an auxiliary apoptotic pathway in human endothelial cells». *Cell Death and Differentiation*, vol. 9, p. 1360-1367.
- Liu, Y., R. Wada, T. Yamashita, Y. Mi, C.-X. Deng, J.P. Hobson, H.M. Rosenfeldt, V.E. Nava, S.-S. Chae, M.-J. Lee, C.H. Liu, T. Hla, S. Spiegel et R.L. Proia. 2000. «Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation». *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 106, no 8, p. 951-961.
- McCawley, L.J. et L.M. Matrisian. 2001. «Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!». *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 13, p. 534-540.
- McLean, G.W., N.O. Carragher, E. Avizienyte, J. Evans, V.G. Brunton et M.C. Frame. 2005. «The role of focal adhesion kinase in cancer – a new therapeutic opportunity». *Nature Reviews Cancer*, vol. 5, p. 505-515.
- McVerry, B.J. et J.G. Garcia. 2005. «In vitro and in vivo modulation of vascular barrier integrity by sphingosine 1-phosphate: mechanistic insights». *Cell Signaling*, vol. 17, no 2, p. 131-139.
- Mitra, S.K., D.A. Hanson et D.D. Schlaepfer. 2005. «Focal adhesion kinase : in command and control of cell motility». *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 6, p.56-68.
- Mott, J.D. et Z. Werb. 2004. «Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases». *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 16, p. 558-564.
- Muñoz-Chápuli, R., A.R. Quesada et M. Àngel Medina. 2004. «Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells». *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 61, p. 2224-2243.
- Munshi, N., J.A. Groopman, P.S. Gill et R.K. Ganju. 2000. «c-Src mediates mitogenic signals and associates with cytoskeletal proteins upon vascular endothelial growth factor stimulation in Kaposi's sarcoma cells». *The Journal of Immunology*, vol. 164, p. 1169-1174.
- Nabeshima, K., T. Inoue, Y. Shimao et T. Sameshima. 2002. «Matrix metalloproteinases in tumor invasion : Role for cell migration». *Pathology International*, vol. 52, p. 255-264.
- Nagy, J. et D.R. Senger. 2006. «VEGF-A, cytoskeletal dynamics, and the pathological vascular phenotype». *Experimental Cell Research*, vol. 312, p. 538-548.
- Nasertorabi, F., M. Garcia-Guzman, K. Briknarová, E. Larsen, M.L. Havert, K. Vuori et K.R. Ely. 2004. «Organisation of functional domains in the docking protein p130^{CAS}». *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 324, p. 993-998.
- Nasertorabi, F., K. Tars, K. Becherer, R. Kodandapani, L. Liljas, K. Vuori et K.R. Ely. 2006. «Molecular basis for regulation of Src by the docking protein p130^{CAS}». *Journal of Molecular Recognition*, vol. 19, p. 30-38.

- Nash, G.F., D.C. Walsh et AK Kakkar. 2001. «The role of the coagulation system in tumour angiogenesis». *Lancet*, vol. 2, p. 608-613.
- Navarro, A., B. Anand-Apte et M.-O. Parat. 2004. «A role for caveolae in cell migration». *The FASEB Journal*, vol. 18, p. 1801-1811.
- Nelson, A.R., B. Fingleton, M.L. Rothenberg et M.L. Matrisian. 2000. «Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications». *Journal of Clinical Oncology*, vol. 18, no 5, p. 1135-1149.
- Ng, Y-S., D. Krilleke et D.T. Shima. 2006. «VEGF function in vascular pathogenesis». *Experimental Cell Research*, vol. 312, p. 527-537.
- Nisato, R.E., G. Hosseini, C. Sirrenberg, G.S. Butler, T. Crabbe, A.J.-P. Dorcherty, M. Wiesner, G. Murphy, C.M. Overall, S.L. Goodman et M.S. Pepper. 2005. «Dissecting the role of matrix metalloproteinase (MMP) and integrin $\alpha_v\beta_3$ in angiogenesis *in vitro* : absence of hemopexine C domain bioactivity, but membrane-type 1-MMP and $\alpha_v\beta_3$ are critical». *Cancer Research*, vol. 65, no 20, p. 9377-9387.
- Nojima, Y., T. Mimura, N. Morino, K. Hamasaki, H. Furuya, R. Sakai, T. Nakamoto, Y. Yazaki et H. Hirai. 1996. «Tyrosine phosphorylation of p130^{cas} in cell adhesion and transformation». *Human Cell*, vol. 9, no 3, p. 169-174.
- Nonaka, T., K. Nishibashi, Y. Itoh, I. Yana et M. Seiki. 2005. «Competitive disruption of the tumor-promoting function of membrane type 1 matrix metalloproteinase/matrix metalloproteinase-14 *in vivo*». *Molecular Cancer Therapeutics*, vol 4, no 8, p. 1157-1166.
- Okamoto, T., A. Schlegel, P.E. Scherer et M.P. Lisanti. 1998. «Caveolins, a family of scaffolding proteins for organising 'preassembled signaling complexes' at the plasma membrane». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no 10, p. 5419-5422.
- Osaki, H., T. Hla et M.-J. Lee. 2003. «Sphingosine-1-phosphate signaling in endothelial activation». *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, vol. 10, p. 125-131.
- Osenkowski, P., M. Toth et R. Fridman. 2004. «Processing, shedding, and endocytosis of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP)». *Journal of cellular Physiology*, vol. 200, p. 2-10.
- Panetti, T.S. 2002. «Tyrosine phosphorylation of paxillin, FAK, and p130cas : effects on cell spreading and migration». *Frontiers in Bioscience*, vol. 7, p. d143-d150.
- Parsons, J.T., K.H. Martin, J.K. Slack, J.M. Taylor et S.A. Weed. 2000. «Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement». *Oncogene*, vol. 19, no 49, p. 5606-5613.
- Pelkmans, L. et A. Helenius, 2002. «Endocytosis vis caveolae». *Traffic*, vol. 3, p. 311-320.

- Pelkmans, L., T. Bűrli, M. Zerial et A. Helenius. 2004. «Caveolin-stabilized membrane domain as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic». *Cell*, vol. 118, no 6, p. 767-780.
- Pelkmans, L., E. Fava, H. Grabner, M. Hannus, B. Habermann, E. Krausz et M. Zerial. 2005. «Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis». *Nature*, vol. 436, no 7047, p. 78-86.
- Pepper, M.S. 2001. «Extracellular proteolysis and angiogenesis». *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 86, p. 346-55.
- Polte, T.R. et S.K. Hanks. 1997. «Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crk-associated substrate (p130^{cas}) are elevated in cytoskeleton-associated fractions following adhesion and Src transformation; requirements for Src kinase and FAK proline-rich motifs». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no 9, p. 5501-5509.
- Radel, C et V. Rizzo. 2005. «Integrin mechanotransduction stimulates caveolin-1 phosphorylation and recruitment of Csk to mediate actin reorganisation». *American Journal of Heart and Circulatory Physiology*, vol. 288, p. H936-H945.
- Razani, B., J.A. Engleman, X.B. Wang, W. Schubert, X.L. Zhang, C.B. Marks, F. Macaluso, R.G. Russell, M. Li, R.G. Pestell, D. Di Visio, H. Hou, Jr, B. Kneitz, G. Lagaud, G.J. Christ, W. Edelmann et M.P. Lisanti. 2001a. «Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no 41, p. 38121-38138.
- Razani, B. et M.P. Lisanti. 2001b. «Caveolins and caveolae: molecular and functional relationships». *Experimental Cell Research*, Vol 271, p. 36-44.
- Razani, B., S.E. Woodman et M.P. Lisanti. 2002. «Caveolae: from cell biology to animal physiology». *Pharmacological Reviews*, vol. 54, no 3, p. 431-467.
- Remacle, A.G., D.V. Rozanov, P.C. Baciou, A.V. Chekanov, V.S. Golubkov et A.Y. Strongin. 2005. «The transmembrane domain is essential for the microtubular trafficking of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)». *Journal of Cell Science*, vol. 118, p. 4975-4984.
- Ren, Y., S. Meng, L. Mei, Z.J. Zhao, R. Jove et J. Wu. 2004. «Roles of Gab1 and SHP2 in paxillin tyrosine dephosphorylation and Src activation in response to epidermal growth factor». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no 9, p. 8497-8505.
- Rickles, F.R., M. Shoji et K. Abe. 2001. «The role of the hemostatic system in tumor growth, metastasis, and angiogenesis: tissue factor is a bifunctional molecule capable of inducing both fibrin deposition and angiogenesis in cancer». *International Journal of Hematology*, vol. 73, p. 145-150.
- Rosenfeldt, H.M., J.B. Hobson, S. Milstien et S. Spiegel. 2001. «The sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 is essential for platelet-derived growth factor-induced cell motility». *Biochemical Society Transactions*, vol. 29, Pt 6, p. 936-839.
- Roy, R., B. Zhang et M.A. Moses. 2006. «Making the cut: protease-mediated regulation of angiogenesis». *Experimental Cell Research*, vol 312, p. 608-622.

- Sarasin, A. 2003. «An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis». *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, vol. 544, no 2-3, 99-106.
- Sato, H., T. Takino et H. Miyamori. 2005. «Roles of membrane-type metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis». *Cancer Science*, vol. 96, no 4, p. 212-217.
- Seiki, M. et I. Yana. 2003. «Roles of pericellular proteolysis by membrane type-1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis». *Cancer Science*, vol. 94, no 7, p. 569-574.
- Seiki, M. 2004. «Membrane-type 1 matrix metalloproteinase : a key enzyme for tumor invasion». *Cancer Letters*, vol. 194, p. 1-11.
- Serini, G., D. Valdembri et F. Bussolino. 2006. «Integrins and angiogenesis : a sticky business». *Experimental Cell Research*, vol 312, p. 651-658.
- Shajahan, A.N., C. Tirupathi, A.V. Smrcka, A.B. Malik et R.D. Minshall. 2004. «G β γ activation of Src induces caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no 46, p. 48055-48062.
- Shen, T.-L., A.Y.-J. Park, A. Alcaraz, X. Peng, I. Jang, P. Koni, R.A. Flavell, H. Gu et J.-L. Guan. 2005. «Conditional knockout of focal adhesion kinase in endothelial cells reveals its role in angiogenesis and vascular development in late embryogenesis». *The Journal of Cell Biology*, vol. 169, no 6, p. 941-952.
- Shibuya, M. et L. Claesson-Welsh. 2006. «Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis». *Experimental Cell Research*, vol 312, p. 549-560.
- Shikata, Y., K.G. Birukov, A.A. Birukov, A. Verin et J.G. Garcia. 2003a. «Involvement of site-specific FAK phosphorylation in sphingosine-1 phosphate- and thrombin-induced focal adhesion remodeling: role of Src and GIT». *FASEB Journal*, vol. 17, no 15, p. 2240-2249.
- Shikata, Y., K.G. Birukov et J.G. Garcia. 2003b. «S1P induces FA remodeling in human pulmonary endothelial cells: role of Rac, GIT1, FAK, and paxillin». *Journal of Applied Physiology*, vol. 94, no 3, p. 1193-1203.
- Shofuda, T., K.-I. Shofuda, N. Ferri, R.D. Kenagy, E.W. Raines et A.W. Clowes. 2004. «Cleavage of focal adhesion kinase in vascular smooth muscle cells overexpressing membrane-type matrix metalloproteinases». *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, vol. 24, no 5, p. 839-844.
- Shu, X., W. Wu, R.D. Mosteller et D. Broek. 2002. «Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras and mitogen-activated protein kinases». *Molecular and Cellular Biology*, vol. 22, no 22, p. 7758-7768.
- Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada. *Statistiques canadiennes sur le cancer 2006*, Toronto 2006, 124 p.

- Soulié, P., F. Carrozzino, M.S. Pepper, A.Y. Strongin, M-F. Poupon et R. Montesano. 2004. «Membrane-type-1 matrix metalloproteinase confers tumorigenicity on nonmalignant epithelial cells». *Oncogene*, vol. 24, no 10, p. 1689-1697.
- Sounni, N.E., C. Roghi, V. Chabottaux, M. Janssen, C. Munaut, E. Maquoi, B.G. Galvez, C. Gilles, F. Frankenne, G. Murphy, J.-M. Foidart et A. Noel. 2004. «Up-regulation of vascular endothelial growth factor-A by active membrane-type 1 matrix metalloproteinase through activation of Src-tyrosine kinases». *The Journal of Biological Chemistry*, vol 279, no 14, p. 13564-13574.
- Stramenkovic, I. 2000. «Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis». *Seminars in Cancer Biology*, vol. 10, no 6, p. 415-433.
- Subauste, M.C., O. Pertz, E.D. Adamson, C.E. Turner, S. Junger et K.M. Hahn. 2004. «Vinculin modulation of paxillin-FAK interactions regulates ERK to control survival and motility». *The Journal of Cell Biology*, vol. 165, no 3, p. 371-381.
- Takino, T., Y. Watanabe, M. Matsui, H. Miyamori, T. Kudo, M. Seiki et H. Sato. 2006. «Membrane-type 1 matrix metalloproteinase modulates focal adhesion stability and cell migration». *Experimental Cell Research*, vol. 312, no 8, p. 1381-1389.
- Teixeira, A., N. Chaverot, C. Schröder, A.D. Strosberg, P-O. Couraud et S. Cazaubon. 1999. «Requirement of caveolae microdomains in extracellular signal-regulated kinase and focal adhesion kinase activation induced by endothelin-1 in primary astrocytes». *Journal of Neurochemistry*, vol. 72, no 1, p. 120-128.
- Toth, M., P. Osenkowski, D. Heseck, S. Brown, S. Meroueh, W. Sakr, S. Mobashery et R. Fridman. 2005. «Cleavage at the stem region release an active ectodomain of the membrane type 1 matrix metalloproteinase». *Biochemical Journal*, vol. 387, p. 497-506.
- Tremblay, L., W. Hauck, A.G. Aprikian, L.R. Begin, A. Chapdelaine et S. Chevalier. 1996. «Focal adhesion kinase (pp125FAK) expression, activation and association with paxillin and p50SK in human prostate carcinoma». *International Journal of Cancer*, vol. 68, no 2, p. 164-171.
- Turner, C.E. 2000a. «Paxillin and focal adhesion signaling». *Nature Cell Biology*, vol. 2, p. E231-E236.
- Turner, C.E. 2000b. «Paxillin Interactions». *Journal of Cell Science*, vol. 113, p. 4139-4140.
- Uekita, T., Y. Itoh, I. Yana, H. Ohno et M. Seiki. 2001. «Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity». *The Journal of Cell Biology*, vol 155, no 7, p. 1345-1356.
- Visse, R. et H. Nagase. 2003. «Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases : structure, function, and biochemistry». *Circulation Research*, vol. 92, p. 827-839.
- Wary, K.K., A. Mariotti, C. Zurzolo et F.G. Giancotti. 1998. «A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependant cell growth». *Cell*, vol. 94, p. 625-634.

- Webb, D.J., K. Donais, L.A. Whitmore, S.M. Thomas, C.E. Turner, J.T. Parsons et A.F. Horwitz. 2004. «FAK-Src signaling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly». *Nature Cell Biology*, vol. 6, no 2, p. 154-161.
- Wei, Y., X. Yang, Q. Liu, J.A. Wilkins et H.A. Chapman. 1999. «A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling». *The Journal of Cell Biology*, vol 144, no 6, p. 1285-1294.
- Weis, S.M. et D.A. Cheresh. 2005. «Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability». *Nature*, vol. 437, p. 497-504.
- Wiechen, K., C. Sers, A. Agoulnik, K. Arlt, M. Dietel, P.M. Schlag et U. Schneider. 2001. «Down-regulation of caveolin-1, a candidate tumor suppressor gene, in sarcomas». *American Journal of Pathology*, vol. 158, no 3, p. 833-839.
- Wojtukiewicz, M.Z., E. Sierko, P. Klement et J. Rak. 2001. «The hemostatic system and angiogenesis in malignancy». *Néoplasia*, vol. 3, no 5, p. 371-384.
- Wu, M.H., M. Guo, S.Y. Yuan et H.J. Granger. 2003. «Focal adhesion kinase mediates porcine venular hyperpermeability elicited by vascular endothelial growth factor». *Journal of Physiology*, vol. 552, no 3, p. 691-699.
- Wu, X., B. Gan, Y. Yoo et J.-L. Guan. 2005. «FAK-mediated Src phosphorylation of endophilin A2 inhibits endocytosis of MT1-MMP and promotes ECM degradation». *Developmental Cell*, vol. 9, p. 185-196.
- Zaidel-Bar, R., Z. Kam et B. Geiger. 2005. «Polarized downregulation of the paxillin-p130^{cas}-Rac1 pathway induced by shear flow». *Journal of Cell Science*, vol. 118, p. 3997-4007.
- Zamir, E. et B. Geiger. 2001a. «Components of cell-matrix adhesions». *Journal of Cell Science*, vol. 114, p. 3577-3579.
- Zamir, E. et B. Geiger. 2001b. «Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions». *Journal of Cell Science*, vol. 114, p. 3583-3590.
- Zhou, Z., S.S. Apte, R. Soininen, R. Cao, G.Y. Baaklini, R.W. Rauser, J. Wang, Y. Cao et K. Tryggvason. 2000. «Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase 1». *PNAS*, vol. 97, no 8, p. 4052-4057.
- Zucker, S., J. Cao et W.T. Chen. 2000. «Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment». *Oncogene*, vol. 19, no 56, p. 6642-6650.
- Zucker, S. et J. Vacirca. 2004. «Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer». *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 23, p. 101-117.