

La phosphorylation des protéines de la famille Elmo
par les récepteurs Tyro3, Axl et Mer :

Un mécanisme potentiel pour l'activation de la GTPase Rac
et la promotion de la migration cellulaire

Mémoire de Maîtrise

Par Rosemarie Gauthier

Division de Médecine Expérimentale, Faculté de Médecine

Université McGill, Montréal

Août 2009

Le présent mémoire de maîtrise est soumis à l'Université McGill en réponse aux exigences du programme de Maîtrise en Médecine Expérimentale avec mémoire.

Table des matières

Table des matières.....	i
Liste des figures	vii
Liste des tableaux.....	ix
Abrégé.....	x
Abstract.....	xi
Introduction.....	1
1 Revue de la littérature	2
1.1 Migration cellulaire.....	2
1.1.1 Aspects généraux	2
1.1.1.1 La migration cellulaire en deux dimensions	2
1.1.1.2 La migration cellulaire en trois dimensions.....	3
1.1.2 Composantes du cytosquelette.....	5
1.1.2.1 Les filaments intermédiaires	5
1.1.2.2 Les microtubules.....	5
1.1.2.3 Les filaments d'actine	6
1.1.2.4 Les structures cellulaires soutenues par le cytosquelette d'actine ..	9
1.1.3 Les GTPases de la famille Rho et la migration cellulaire.....	11
1.1.3.1 Les GEFs.....	12
1.1.3.1.1 Les GEFs de la famille de Dbp.....	12
1.1.3.1.2 Les GEFs de la famille de Dock180	13
1.1.3.2 Les GAPs	15
1.1.3.3 Les effecteurs	16
1.1.3.3.1 Rho et p160Rock.....	16
1.1.3.3.2 Rac et WAVE	16
1.1.3.3.3 Les GTPases Rac/Cdc42 et les protéines PAK.....	17
1.1.3.3.4 Les GTPases de la famille Rho en lien avec les MAPKs et NFκB.....	18
1.2 Les protéines Elmo	19
1.2.1 Structure des protéines de la famille Elmo	19
1.2.2 Les fonctions biologiques du complexe protéique Dock/Elmo	22

1.2.3 Les protéines Elmo et l'intégration de signaux extracellulaires	24
1.2.3.1 Les récepteurs de phosphatidylsérine	24
1.2.3.2 Les nétrines	25
1.2.3.3 Les intégrines	25
1.2.3.4 Les récepteurs de fusion.....	26
1.2.3.5 Les récepteurs kinases à tyrosine	27
1.2.4 La phosphorylation des protéines de la famille Elmo.....	27
1.2.4.1 Hck phosphoryle Elmo	27
1.2.4.2 Autres sites de phosphorylation rapportés concernant Elmo	28
1.2.5 Les protéines des familles Elmo, les GEFs de la famille de Dock180 et le cancer	29
1.2.5.1 Dock180 et Elmo sont associés au potentiel invasif des tumeurs. 29	
1.2.5.2 Dock3 et Dock10 sont impliqués dans la régulation de la transition mésenchymale/amiboïde.....	30
1.2.5.3 Dock4 est potentiellement un suppresseur de tumeurs	30
1.3 Les RTKs et les GEFs activant les GTPases de la famille Rho.....	31
1.4 Les récepteurs de la famille TAM	33
1.4.1 Structure et activation	33
1.4.1.1 Domaines protéiques et nomenclature des récepteurs TAM	33
1.4.1.2 Activation des TAM par liaison d'un ligand	34
1.4.1.3 Activation indépendante du ligand	35
1.4.2 Profils d'expression des récepteurs TAM.....	35
1.4.2.1 Tyro3.....	36
1.4.2.2 Axl.....	36
1.4.2.3 Mer	36
1.4.3 Fonctions biologiques des récepteurs TAM.....	36
1.4.3.1 Les récepteurs TAM et le système nerveux central	36
1.4.3.2 Le récepteur Mer et la phagocytose	37
1.4.3.3 Les récepteurs TAM et l'homéostasie du système immunitaire... 38	
1.4.3.4 Autres fonctions biologiques des récepteur TAM	39
1.4.4 Les récepteurs de la famille TAM et la migration cellulaire	39

1.4.5 Les récepteurs de la famille TAM et le cancer	40
2 Hypothèse de recherche	45
2.1 Approche expérimentale	45
2.2 Pourquoi étudier la relation TAM/Elmo?	45
3 Résultats	46
3.1 Les kinases TAM phosphorylent les protéines de la famille Elmo.....	46
Un balayage pour identifier des kinases pouvant phosphoryler Elmo1	46
3.1.1 Les kinases TAM phosphorylent Elmo in vitro	48
3.1.1.1 Tyro3, Axl et Mer phosphorylent Elmo1 in vitro	48
3.1.1.2 Les kinases TAM phosphorylent Elmo1, Elmo2 et Elmo3 in vitro	51
3.1.2 La surexpression des kinases TAM induit la phosphorylation des protéines de la famille Elmo dans les cellules HEK 293T.....	52
3.1.2.1 Tyro3, Axl et Mer phosphorylent Elmo1 dans les cellules HEK 293T	53
3.1.2.2 Tyro3 phosphoryle tous les membres de la famille Elmo dans les cellules HEK 293T.....	54
3.1.3 Recherche des sites de phosphorylation sur Elmo1 ciblés par les TAM	56
3.1.3.1 Identification des tyrosines phosphorylées sur Elmo1 par Tyro3. 56	
3.1.3.2 Identification du principal site de phosphorylation sur Elmo1 ciblé par les kinases TAM	58
3.2 Les récepteurs Axl et Tyro3 se retrouvent en complexe avec Elmo et Dock180.....	61
3.2.1 Les récepteurs Tyro3 et Axl se retrouvent en complexe avec les protéines Elmo et cette interaction est dépendante de l'activité kinase des récepteurs	61
3.2.2 Tyro3 et Axl interagissent avec la portion N-terminale d'Elmo1	64
3.2.3 Tyro3, Elmo1 et Dock180 se retrouvent dans le même complexe protéique	64

3.3 Les protéines Axl et Elmo2 sont associées à des lignées cellulaires du cancer du sein hautement métastatiques	65
3.3.1 Profils d'expression des récepteurs TAM et des protéines de la famille Elmo dans les lignées cellulaires MDA-MB-231 et Hs578T	65
3.3.2 Les protéines endogènes Axl et Elmo2 se retrouvent au sein du même complexe dans les lignées cellulaires MDA-MB-231 et Hs578T	67
3.3.3 La stimulation de la lignée cellulaire MDA-MB-231 avec du Gas6 induit l'activation de Rac	68
3.3.4 Les lignées stables de MDA-MB-231 shElmo2 présentent un potentiel de migration diminué	70
4 Discussion et Conclusion	74
4.1 Discussion	74
4.1.1 Les kinases TAM phosphorylent les protéines de la famille Elmo.....	74
4.1.1.1 Le balayage du kinome	74
4.1.1.2 Les kinases TAM phosphorylent Elmo1, 2 et 3 in vivo et in vitro	74
4.1.1.3 La tyrosine 720 est le site majeur de phosphorylation sur Elmo1 ciblé par les TAM	75
4.1.1.4 La phosphorylation des protéines de la famille Elmo au niveau endogène	78
4.1.1.5 Conséquences possibles de la phosphorylation d'Elmo	80
4.1.1.6 La phosphorylation d'Elmo et le cancer	80
4.1.1.7 Autres aspects concernant la phosphorylation.....	81
4.1.2 Les récepteurs Tyro3 et Axl se retrouvent en complexe avec les protéines de la famille Elmo	81
4.1.2.1 Tyro3 et Axl, mais pas Mer, se retrouvent en complexe avec les protéines de la famille Elmo	81
4.1.2.2 La portion <i>N</i> -terminale d'Elmo1 est nécessaire pour l'interaction avec Tyro3 et Axl.....	82
4.1.2.3 L'activité kinase des récepteurs Tyro3 et Axl est nécessaire pour permettre l'interaction avec les protéines de la famille Elmo.....	82

4.1.2.4	Autres protéines impliquées dans le complexe protéique incluant les protéines de la famille Elmo et les récepteurs TAM (Tyro3 et Axl)...	83
4.1.2.5	L'interaction entre les protéines de la famille Elmo et les récepteurs TAM (Tyro3 et Axl) au niveau endogène	84
4.1.3	La relation TAM/Elmo et la migration cellulaire	85
4.1.4	La relation TAM/Elmo et la phagocytose.....	88
4.2	Conclusion	89
5	Matériel et méthodes.....	90
5.1	Culture cellulaire.....	90
5.1.1	Transfection calcium/phosphate	90
5.1.2	Génération de lignées stables shRNA.....	90
5.1.3	Essais de migration cellulaire	90
5.2	Essais de phosphorylation in vitro	92
5.2.1	Balayage du kinome humain par essai de phosphorylation in vitro	92
5.2.2	Essai de phosphorylation in vitro.....	92
5.3	Spectrométrie de masse – préparation des échantillons.....	93
5.3.1	Échantillon in vitro	93
5.3.2	Échantillon in vivo.....	93
5.3.3	Migration sur gel et coloration.....	93
5.4	Biologie moléculaire.....	93
5.4.1	Plasmides pour la transfection des cellules de mammifères	93
5.4.2	Plasmides pour la production de protéines dans les bactéries	95
5.4.3	RT-PCR.....	96
5.5	Purification de protéines recombinantes avec un tag GST	97
5.5.1	Précipitation d'affinité à l'aide de billes recouverte de glutathionne ..	97
5.5.1.1	Précipitation à partir de lysats bactériens.....	97
5.5.1.2	Précipitation à partir de lysats cellulaires de HEK 293T	97
5.5.2	Purification de protéines avec tag GST via l'ÄKTAprime plus	98
5.6	Précipitations d'affinité (autre que pour le glutathionne)	98
5.6.1	Immunoprécipitation.....	99
5.6.2	Précipitation d'affinité pour une protéine avec un tag GST	99

Liste des anticorps.....	100
6 Remerciements.....	101
7 Abréviations.....	103
8 Liste des références.....	106

Liste des figures

Figure 1 : Le modèle classique représentant les étapes de la migration cellulaire en deux dimensions.....	3
Figure 2 : Schématisation des morphologies cellulaires observées lors de la migration de cellules tumorales	4
Figure 3 : La polymérisation de l'actine et les facteurs d'assemblage qui y sont associés	8
Figure 4 : Les structures cellulaires soutenues par le cytosquelette d'actine.....	10
Figure 5 : Le cycle des GTPases de la famille Rho	12
Figure 6 : Les 11 membres de la famille de Dock180 classés en 4 sous-groupes	14
Figure 7 : Régulation du complexe protéique incluant WAVE par la GTPase Rac activée	17
Figure 8 : Activation des kinases PAK par la GTPase Cdc42 active	18
Figure 9 : Les protéines de la famille Elmo : Structure et Séquences	21
Figure 10 : Présentation des orthologues des protéines de mammifère c-Crk, Dock180, Elmo et Rac1 chez la drosophile et le vers <i>C. elegans</i> et des fonctions biologiques qui y sont associées	23
Figure 11 : Les 20 sous-groupes humains de récepteurs kinases à tyrosine et les GTPases de la famille Rho qu'ils activent.....	32
Figure 12 : Les récepteurs de la famille TAM : structure, activation et fonction biologique	34
Figure 13 : Les interactions permettant aux cellules phagocytaires de reconnaître les corps apoptotiques via les récepteurs TAM	38
Figure 14 : Corrélation entre l'expression de la protéine Axl et le potentiel invasif de lignées cellulaires provenant de différents types de cancer	43
Figure 15 : Phosphorylation d'Elmo1 par les récepteurs TAM <i>in vitro</i>	49
Figure 16 : Phosphorylation d'Elmo1, Elmo2 et Elmo3 par les kinases TAM purifiées.....	51
Figure 17 : Les kinases de la famille TAM phosphorylent Elmo1 au sein des cellules HEK 293T	53

Figure 18 : La surexpression de Tyro3 dans les cellules HEK 293T induit la phosphorylation d'Elmo1, d'Elmo2 et d'Elmo3.....	55
Figure 19 : Phosphorylation des mutants Y-F d'Elmo1 par les domaines kinase de Tyro3, d'Axl et de Mer	60
Figure 20 : Axl et Tyro3 se retrouvent en complexe avec Elmo1 et Dock180.....	63
Figure 21 : Expression des récepteurs TAM et des protéines de la famille Elmo dans les lignées cellulaires Hs578T et MDA-MB-231	66
Figure 22 : Le récepteur Axl et la protéine Elmo2 se retrouvent au sein du même complexe dans les lignées cellulaires Hs578T et MDA-MB-231	67
Figure 23 : Activation de Rac par stimulation avec du Gas6 dans les lignées cellulaires MDA-MB-231 et NLT GnRH.....	69
Figure 24 : Elmo2 joue un rôle important dans la migration des cellules MDA-MB-231	72
Figure 25 : Schématisation de l'hypothèse selon laquelle le complexe protéique TAM/Elmo induit le recrutement d'une GEF de la famille de Dock180, l'activation de Rac et la migration cellulaire	85
Figure 26 : Les différentes étapes du balayage effectué pour identifier des kinases pouvant phosphoryler Elmo1	92

Liste des tableaux

Tableau 1 : Nomenclature des récepteurs TAM	33
Tableau 2 : Expression des récepteurs de la famille TAM dans les cancers humains	41
Tableau 3 : Résultats du balayage : présentation des kinases capables de phosphoryler Elmo1	47
Tableau 4 : Rôles biologiques connus des différentes kinases associées à la phosphorylation d'Elmo1 dans le balayage du kinome	48
Tableau 5 : Acides aminés sur Elmo1 phosphorylés directement et indirectement par Tyro3 détectés en spectrométrie de masse (N=1)	57
Tableau 6 : Mutants Y/F d'Elmo1 générés par mutagenèse	58
Tableau 7 : Présentation des ARNi générés par les plasmides shRNA contre Elmo2 humain et leur validation dans les lignées cellulaires MDA-MB-231 et Hs578T	71
Tableau 8 : Tableau des protéines à domaines SH2 ou PTB pouvant reconnaître la tyrosine 720 d'Elmo1 phosphorylée	77
Tableau 9 : Séquences des amorces utilisées pour introduire des mutations par mutagenèse dirigée	95
Tableau 10 : Séquences des amorces spécifiques pour amplifier les ADNc codant pour l'actine, Elmo1, Elmo2 et Elmo3	96
Tableau 11 : Tableau des anticorps commerciaux utilisés pour effectuer les immunoprécipitations et les immunobuvardages	100
Tableau 12 : Tableau des abréviations	103

Abrégé

Les protéines de la famille Elmo agissent de concert avec la GEF Dock180 pour médier l'activation de la GTPase Rac. Fonctionnellement, le complexe Elmo/Dock180 est impliqué dans la migration cellulaire, la phagocytose et la fusion cellulaire. Les mécanismes moléculaires permettant l'activation de la signalisation via Elmo/Dock180 sont peu connus.

Nous avons démontré que les récepteurs kinases à tyrosine de la famille TAM (Tyro3/Axl/Mer) phosphorylent Elmo. Les kinases TAM régulent la migration cellulaire, la phagocytose et elles sont impliquées dans les processus métastatiques des tumeurs.

Nous avons déterminé les tyrosines phosphorylées sur Elmo par les kinases TAM. De plus, nous avons démontré une interaction physique entre les TAM (Tyro3 et Axl), Elmo et Dock180.

Notre étude dévoile la relation TAM/Elmo/Dock180 pouvant expliquer, en partie, l'activation de Rac, la réorganisation du cytosquelette, la migration cellulaire et le potentiel invasif des tumeurs associés à la signalisation par les récepteurs TAM.

Abstract

Elmo proteins act with Dock180 to mediate evolutionarily conserved Rac activation during cell migration, cell-cell fusion and phagocytosis. Molecular events leading to the activation of the Elmo/Dock180 pathway are poorly understood.

In our study, we demonstrate that Elmo proteins are substrates of the TAM (Tyro3/Axl/Mer) kinases family. The TAM kinases have been previously described as regulators of cell migration and phagocytosis. They are also believed to be central mediator of cell invasion in various types of tumors.

Using mass spectrometry, we identified tyrosine residues phosphorylated on Elmo1 protein by Tyro3. We also uncovered that Elmo1 physically interacts with Tyro3 and Axl, but not with Mer. We demonstrate the formation of a trimolecular complex including the receptor Tyro3, the Elmo1 protein and the GEF Dock180. This complex may control Rac activation during cell migration and invasion.

Our study uncovered a novel pathway that may explain how TAM kinases mediate cell invasion.

Introduction

L'ouvrage suivant établit, pour la première fois, un lien entre deux familles de protéines : les récepteurs kinases à tyrosine de la famille TAM (Tyro3, Axl et Mer) et les protéines de la famille Elmo (Elmo1, Elmo2 et Elmo3). Les récepteurs de la famille TAM sont associés à plusieurs processus biologiques tels que la migration des cellules neuronales au cours du développement¹⁻³. Ces récepteurs jouent aussi un rôle dans la cancérogenèse. La surexpression des récepteurs de la famille TAM par des tumeurs est associée à un faible pronostic chez les patients atteints d'un cancer⁴. Bien que beaucoup de recherches soient encore requises pour comprendre de quelle façon ces protéines participent à la progression de la maladie, il a été démontré que l'activation des récepteurs TAM par leur ligand Gas6 induit l'activation de la petite GTPase Rac¹⁻³ favorisant la migration cellulaire et par conséquent le développement de métastases. La propagation d'une tumeur primaire à l'intérieur de l'organisme est la principale cause de décès chez les patients atteints d'un cancer^{5, 6}. Ainsi, un des principaux défis de la recherche en matière de traitement du cancer est de mieux comprendre et, ultimement, d'influencer les mécanismes menant à la migration des cellules tumorales. La relation entre les protéines de la famille Elmo qui font partie d'un complexe ayant la capacité d'activer Rac^{7, 8} et les récepteurs kinases à tyrosine TAM peut expliquer pourquoi les récepteurs TAM sont associés au potentiel de migration des cellules induit via la GTPase Rac.

Les objectifs de mon projet de recherche sont de déterminer le/les sites de phosphorylation ciblés par les kinases TAM sur les protéines de la famille Elmo et d'évaluer l'implication fonctionnelle de ces événements de phosphorylation. De plus, nous souhaitons comprendre les interactions protéine-protéine présentes entre les membres de ces deux familles. Globalement, nous souhaitons déterminer de quelle façon la collaboration entre les récepteurs TAM et les protéines de la famille Elmo influence la migration cellulaire.

1 Revue de la littérature

1.1 Migration cellulaire

1.1.1 Aspects généraux

Chez les mammifères, la migration cellulaire est essentielle au cours du développement. Par exemple, la formation des muscles des membres nécessite la migration de précurseurs au cours du développement de l'embryon. Les précurseurs migrent du dermomyotome, un dérivé du somite, vers les différents bourgeons de membres afin de les coloniser et de générer les muscles squelettiques⁹. Chez l'adulte, le maintien de l'homéostasie nécessite aussi des mouvements cellulaires. La migration des neutrophiles du sang vers les tissus afin de combattre une infection ainsi que la migration des cellules afin de refermer une plaie pour cicatriser un tissu en sont des exemples. La migration cellulaire est aussi associée à certains états pathologiques. Lors de la progression d'un cancer, il est fréquent d'observer la distribution de cellules issues d'une première tumeur à plusieurs endroits dans l'organisme. Pour ce faire, les cellules de la tumeur initiale doivent acquérir le potentiel de se mouvoir et de pénétrer à l'intérieur des vaisseaux sanguins. Elles doivent ensuite résister au stress de la pression sanguine et réussir à sortir du système sanguin pour coloniser un second site. La prolifération de ces cellules induit de nouveaux foyers tumoraux ou métastases. Les métastases sont la principale cause de mort de patients atteints d'un cancer d'où la nécessité de mieux comprendre les processus contrôlant la migration des cellules tumorales^{5,6}.

1.1.1.1 La migration cellulaire en deux dimensions

La migration cellulaire a beaucoup été étudiée en deux dimensions. Le modèle classique de la migration cellulaire en deux dimensions est présenté à la Figure 1. On y observe l'extension de la membrane plasmique poussée par la polymérisation de l'actine au front de migration de la cellule.

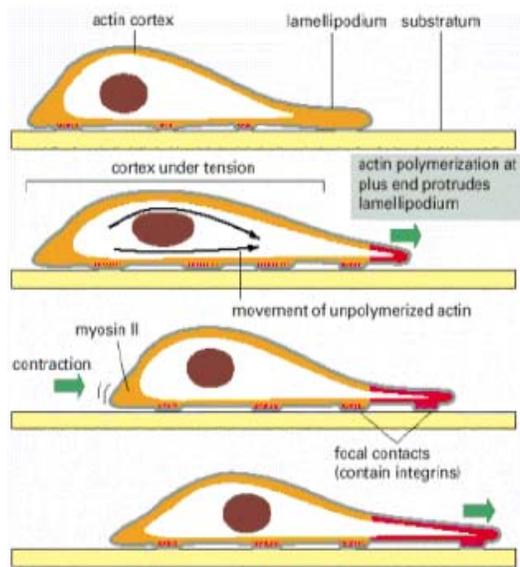


Figure 1 : Le modèle classique représentant les étapes de la migration cellulaire en deux dimensions

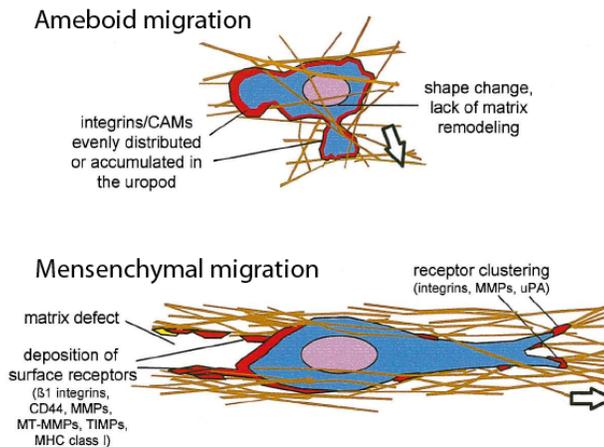
Illustration issue du livre publié par Alberts *et al*¹⁰. Premièrement, la membrane plasmique avance au front de migration. Deuxièmement, la cellule s'attache au substrat par la formation de complexes d'adhésion focale. Finalement, l'arrière de la cellule se rétracte.

1.1.1.2 La migration cellulaire en trois dimensions

De plus en plus, les études sur la migration cellulaire s'intéressent à la migration des cellules en trois dimensions. La migration des cellules en trois dimensions représente davantage les conditions physiologiques à l'intérieur de l'organisme. Deux principaux types de déplacement ont été observés dans les cellules par des observations histologiques et des études *in vitro*. Ces types de déplacement sont la migration individuelle des cellules et la migration en groupe des cellules¹¹⁻¹³. La migration individuelle des cellules se divise en deux différents types de morphologie/mouvements, amiboïde et mésenchymale^{11, 14}. La Figure 2 illustre ces différents types de morphologie observés chez les cellules en mouvement. La migration de type mésenchymale est caractérisée par une structure cellulaire plutôt allongée, la présence d'interactions intégrines/matrice extracellulaire au front de migration de la cellule et la production de MMPs nécessaires pour ouvrir un chemin à travers le tissu. La migration de type amiboïde est utilisée par les leucocytes et certaines cellules tumorales. Elle est caractérisée par des interactions faibles et de courte durée avec la matrice

extracellulaire, une diminution de la présence des adhésions focales, des fibres de stress et de l'activation des intégrines favorisant un mouvement cellulaire rapide^{15, 16}. Les deux types de migration individuelle ont aussi été décrits comme les migrations dépendantes (mésenchymale) et indépendantes (amiboïde) des protéases. Toutefois, une étude récente a sérieusement mis en doute cette classification en démontrant que les MMPs sont également nécessaires à la migration de type amiboïde *in vivo*¹⁷. De plus, certaines cellules ont le potentiel de varier leur type de migration d'amiboïde à mésenchymale et vice versa¹⁸. La capacité des cellules à effectuer ce type de transition leur permet de conserver leur potentiel migratoire malgré une variation du micro-environnement auquel elles font face. La compréhension moléculaire de ces types de mouvements est donc importante pour élaborer de nouvelles stratégies pouvant limiter la migration des cellules *in vivo*.

a) Individually migrating cells



b) Migrating cell cluster

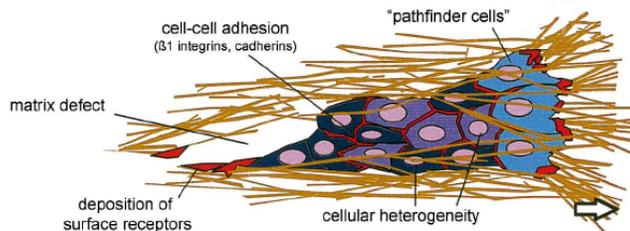


Figure 2 : Schématisation des morphologies cellulaires observées lors de la migration de cellules tumorales

On y observe la distribution des récepteurs et les interactions avec les fibres de la matrice extracellulaire. Illustration adaptée de la revue publiée par Friedl *et al*¹¹.

1.1.2 Composantes du cytosquelette

La migration cellulaire met invariablement en cause des changements morphologiques de la cellule. Celle-ci doit réorganiser ses composantes internes pour se mouvoir. Le cytosquelette, composé de filaments intermédiaires, de microtubules et de filaments d'actine, constitue la charpente de la cellule et son remodelage permet les changements morphologiques.

1.1.2.1 Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont composés d'une variété de protéines, codées par plus de 70 gènes chez l'humain, qui partagent plusieurs caractéristiques structurales. Ces protéines forment des filaments dont la taille de 10-12nm est intermédiaire entre celle des filaments d'actine et celle des microtubules d'où leur appellation de filaments intermédiaires. Le réseau de filaments intermédiaires s'étend dans tout le cytoplasme, de la membrane plasmique jusqu'au noyau. Ces filaments forment un réseau continu le long duquel des signaux peuvent voyager de la membrane plasmique au noyau. Ce réseau est en contact avec des structures de la membrane plasmique comme les desmosomes, les hémidesmosomes et les complexes d'adhésion focale. Les filaments intermédiaires sont aussi en contact avec des organelles du cytoplasme comme les mitochondries, l'appareil de Golgi et les vésicules ainsi qu'avec les autres structures du cytosquelette (les filaments d'actine et les microtubules) et les protéines motrices qui y sont associées¹⁹.

1.1.2.2 Les microtubules

Les microtubules se présentent sous forme de nanotubes polarisés. Ils sont la résultante de l'assemblage d'hétérodimères de tubuline constitués d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Les microtubules sont souvent constitués de plusieurs tubules émergeant du centrosome, situé près du noyau, et s'allongeant pour rejoindre le pourtour de la cellule¹⁰. Dans cette situation, l'extrémité (-) se retrouve au centrosome alors que l'extrémité (+) est orientée vers la membrane plasmique. Les microtubules sont impliqués dans plusieurs fonctions biologiques comme le transport intracellulaire d'organelles incluant les vésicules et ils jouent un rôle essentiel de soutien aux faisceaux mitotiques lors de la mitose. Les

microtubules contribuent, de façon importante, au maintien de la polarité cellulaire et ils supportent aussi la structure cellulaire lors de la migration^{20, 21}.

1.1.2.3 Les filaments d'actine

Le cytosquelette d'actine joue un rôle central dans le mouvement cellulaire. Le remodelage de ce réseau est nécessaire à la migration cellulaire. L'actine peut se retrouver dans la cellule sous forme de monomère ou de filaments. Les monomères d'actine s'assemblent d'eux-mêmes en filaments hélicoïdaux. La formation de dimères et de trimères d'actine n'est pas très favorisée d'un point de vue enthalpique et c'est, par conséquent, une étape très lente^{22, 23}. L'ajout de monomères d'actine subséquents est une étape beaucoup plus rapide et permet la formation de filaments. Ces filaments sont polarisés et se présentent sous forme linéaire ou ramifiée. Dans la cellule, la polymérisation de l'actine est amorcée par des facteurs d'assemblage, aussi appelés facteurs de nucléation. Ces derniers agissent en tant que catalyseur rendant énergétiquement favorable l'assemblage des premiers monomères d'actine. Les facteurs d'assemblage sont présentés à la Figure 3.

Le complexe protéique Arp2/3 est le premier facteur d'assemblage à avoir été identifié. Il est composé de sept polypeptides : ARPC 1-5, Arp2 et Arp3. Le complexe Arp2/3 est un facteur d'assemblage qui permet la polymérisation d'un second brin d'actine sur un filament existant avec un angle de 78° pour former des réseaux ramifiés. Cette dernière caractéristique est importante, puisque la formation de réseaux ramifiés a un impact sur la membrane plasmique. La formation de réseaux ramifiés génère la force nécessaire pour faire avancer la membrane au front de migration des cellules en mouvement²³. Les protéines Arp2 et Arp3 ressemblent à l'actine et forment, à l'intérieur du complexe, un dimère qui mime l'extrémité d'un brin d'actine favorisant l'ajout de monomères d'actine et l'élongation du nouveau filament^{24, 25}. Le complexe Arp2/3 doit être activé par des facteurs de promotion de la nucléation afin d'induire la polymérisation d'actine. Chez les mammifères, ces facteurs de promotion de la nucléation sont WASP, N-WASP, WAVE1, WAVE2 et WAVE3²⁶.

Les facteurs d'assemblage de type Formine, pour leur part, se spécialisent dans l'élongation des filaments pour former des réseaux linéaires. Les Formines agissent en dimères pour favoriser l'élongation d'un filament et leur action est accrue lorsque la profiline est attachée au dimère. Jusqu'à maintenant, le mécanisme le mieux connu d'activation des Formines est l'activation directe par des GTPases de la famille Rho²⁷.

Les facteurs d'assemblage Spire et Cobl forment une famille de protéines qui favorise la formation de filaments d'actine linéaires et permet aussi une interaction entre les filaments d'actine et les microtubules^{26, 28, 29}. Spire et Cobl contiennent des répétitions de domaines protéiques de type WH2 (WASP homology 2). Ces petits domaines protéiques, 20-50 acides aminés, ont la propriété de lier l'actine. Les quatre domaines WH2 de Spire lui confèrent plusieurs activités régulatrices du cytosquelette d'actine comme la nucléation des filaments d'actine, la séquestration des monomères d'actine et la régulation de l'extrémité (+) des filaments³⁰. L'identification des facteurs d'assemblage par des tests de nucléation *in vitro* ne reproduit pas toutes les conditions qui se retrouvent à l'intérieur de la cellule. C'est de cette façon que Spire a été identifié comme facteur d'assemblage³¹. Toutefois, Spire est impliqué dans des processus de motilité où la principale forme d'actine monomérique est l'actine-profiline. Spire bloque la croissance de l'extrémité positive à partir d'actine-profiline et ce phénomène remet sérieusement en question le rôle de Spire comme facteur d'assemblage *in vivo*³². Spire est manifestement un joueur important dans la modulation du cytosquelette d'actine, mais son rôle exact demeure à définir.

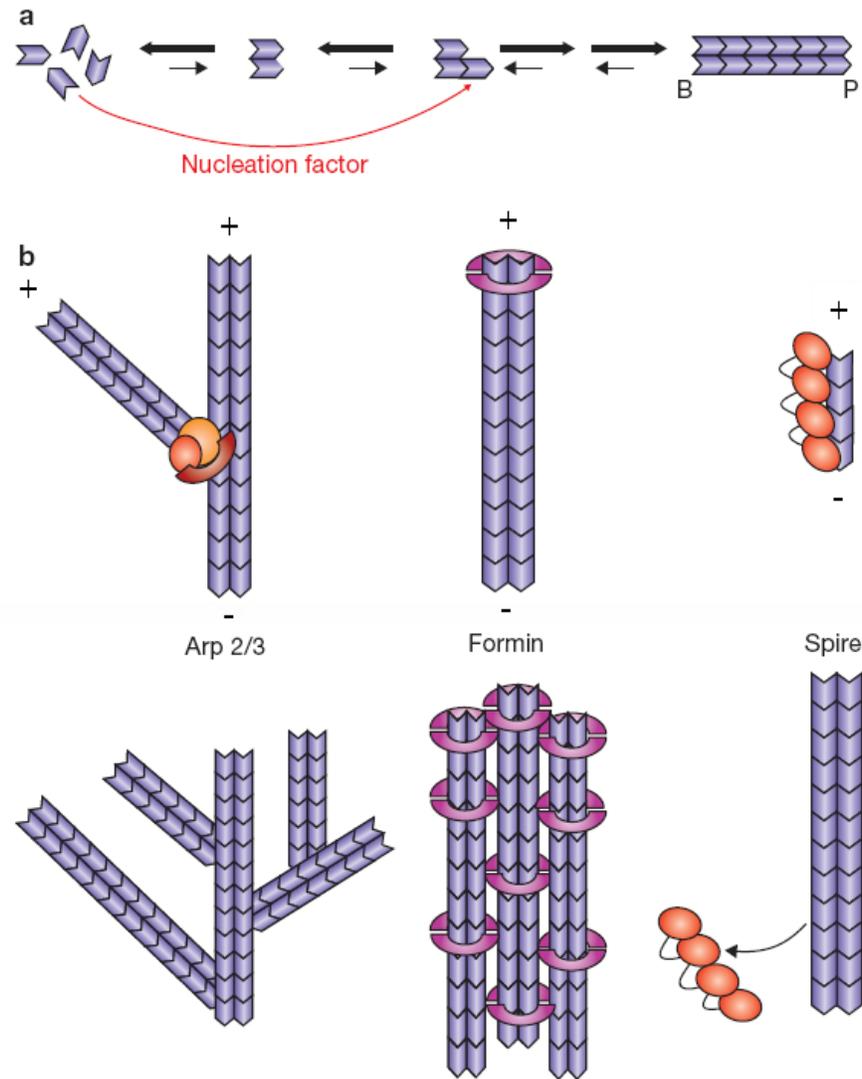


Figure 3 : La polymérisation de l'actine et les facteurs d'assemblage qui y sont associés

Illustration adaptée de la revue publiée par Chhabra *et al*²⁶. (a) L'assemblage des monomères d'actine, en dimère et trimère, n'est pas favorisé et nécessite la présence de facteurs d'assemblage. L'ajout des monomères subséquents est ainsi favorisé et l'élongation du filament se produit spontanément lorsque les monomères d'actine sont en concentration suffisante. (b) Schématisation des différents facteurs d'assemblage et des filaments d'actine qu'ils induisent.

1.1.2.4 Les structures cellulaires soutenues par le cytosquelette d'actine

Plusieurs structures cellulaires sont soutenues par le cytosquelette d'actine et leurs fonctions biologiques respectives sont variables. Par exemple, lors de la migration cellulaire, la densité des fibres de stress diminue alors que la formation de lamellipodes est en augmentation. Les structures cellulaires soutenues par le cytosquelette d'actine sont présentées à la Figure 4. Les fibres de stress se définissent comme des paquets de plusieurs filaments d'actine dont la polarité alterne. On y retrouve également de l' α -actinine. Les fibres de stress sont souvent reliées entre elles par des molécules de la famille des myosines, principalement la myosine II, leur permettant de déployer une force de contraction à l'échelle cellulaire³³. Les adhésions focales sont des complexes multiprotéiques attachés à la surface cytoplasmique de la membrane plasmique. La liaison des intégrines, des protéines transmembranaires, à la matrice extracellulaire induit la formation d'un complexe où s'attachent des filaments d'actine. Les adhésions focales jouent un rôle structurel pour la cellule et sont également impliquées dans plusieurs voies de signalisation intracellulaire. Les filopodes sont de minces avancées de la membrane plasmique qui peuvent être composées de filaments linéaires d'actine, comme présenté à la Figure 3, ou de filaments d'actine ramifiés²⁶. Les lamellipodes se définissent comme de larges avancées de la membrane faiblement attachées au substrat. Les lamellipodes sont observés lorsque les cellules rampent afin de se déplacer ou lorsqu'elles s'étalent sur une surface. Les ondulations de la membrane se définissent comme des extensions de membranes en forme de feuilles qui ne sont pas attachées à un substrat comme la matrice extracellulaire. Les ondulations de la membrane à la périphérie de la cellule sont formées au front de migration des cellules motrices. Les lamellipodes et les ondulations de la membrane souvent présents au front de migration des cellules en mouvement sont constitués de filaments d'actine branchés²⁶.

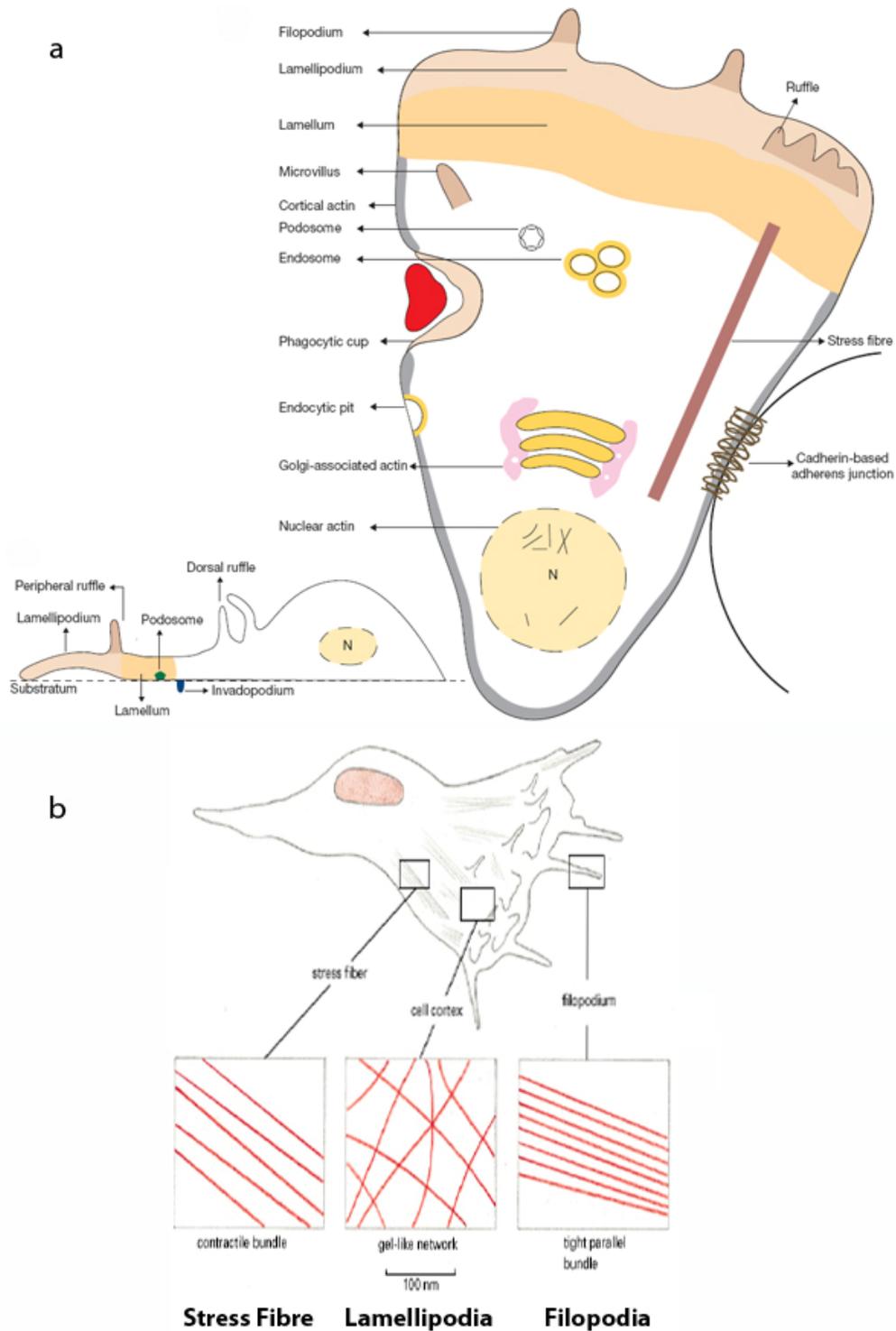


Figure 4 : Les structures cellulaires soutenues par le cytosquelette d'actine

(a) Vue des différentes structures connues ou fortement suspectées d'être composées d'actine en coupe transversale et latérale. Illustration issue de la revue publiée par Chhabra *et al*²⁶. (b) Structure de réseau d'actine typique de certaines structures cellulaires. Illustration issue du livre publié par Alberts *et al*¹⁰.

1.1.3 Les GTPases de la famille Rho et la migration cellulaire

Les GTPases sont de petites protéines possédant la propriété enzymatique d'hydrolyser une molécule de GTP en GDP. Les GTPases de la famille Rho sont encodées par 20 gènes chez l'humain³⁴. Parmi ceux-ci, on retrouve RhoA, Rac1 et Cdc42. Les GTPases de la famille Rho possèdent une séquence CAAX dans leur portion C-terminale permettant l'attachement d'un groupement lipidique qui s'insère à l'intérieur de la bicouche lipidique membranaire localisant ainsi les GTPases à la surface cytoplasmique de la membrane cellulaire. Les GTPases sont activées par des facteurs d'échanges nucléotidiques (Guanine nucleotide Exchange Factors, GEFs) qui permettent l'échange du GDP lié à la GTPase par un GTP. Lorsque la GTPase est liée au GTP, elle se lie à des effecteurs qui enclenchent une réponse cellulaire. Plusieurs réponses cellulaires sont modulées par les GTPases de la famille Rho : l'assemblage des filaments d'actine, la dynamique des microtubules, le transport vésiculaire, l'activité enzymatique, la polarité cellulaire, la migration, l'adhésion à la matrice extracellulaire, la phagocytose, l'apoptose, la transcription génique et la progression du cycle cellulaire^{35, 36}. La signalisation induite se termine lorsque la GTPase hydrolyse le GTP en GDP. Cette hydrolyse est favorisée par la présence de protéines activatrices (GTPase activating proteins, GAPs). Un autre type de régulateurs semble empêcher l'activation spontanée des GTPases, ce sont les inhibiteurs de dissociation nucléotidique (guanine nucleotide dissociation inhibitors, GDIs). Pour ce faire, ils séquestrent, dans le cytosol, les GTPases sous leur forme liée au GDP²¹. Le cycle des GTPases de la famille Rho est présenté à la Figure 5.

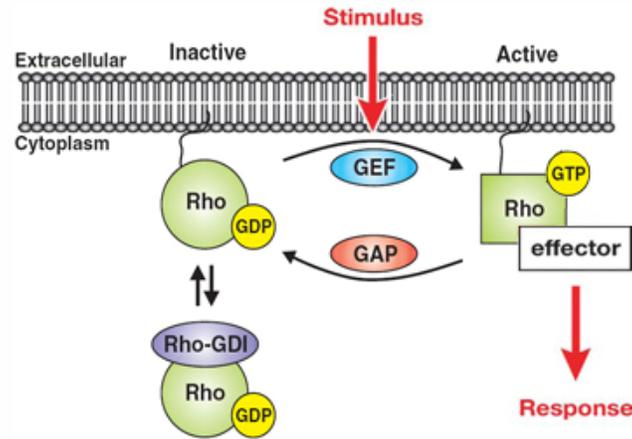


Figure 5 : Le cycle des GTPases de la famille Rho

Cette figure illustre la localisation intracellulaire des GTPases, attachées à la surface cytosolique de la membrane plasmique, lors de leur activation. On y observe aussi l'intrant au cycle, la stimulation de la GEF, et l'extrait du cycle, l'émission de signaux induisant la réponse biologique, soit la liaison de la GTPase active à un effecteur. Illustration inspirée des revues publiées par Jaffe *et al*²¹ et par Huveneers *et al*³⁷.

Rho, Rac et Cdc42 sont impliqués dans la transduction de signaux provenant, entre autres, de récepteurs membranaires afin de stimuler l'assemblage et le désassemblage du cytosquelette d'actine et le contrôle des complexes d'adhésion. Rho régule les fibres de stress et les adhésions focales. Cdc42 induit l'extension de filopodes au pourtour de la cellule. Rac, pour sa part, est associé à la formation de lamellipodes et d'ondulations de la membrane³⁶. Au niveau des cellules épithéliales de la glande mammaire, l'activation de la GTPase Rac permet le désassemblage des contacts cellule-cellule et induit la migration cellulaire dans une matrice de collagène³⁸.

1.1.3.1 Les GEFs

1.1.3.1.1 Les GEFs de la famille de Dbl

Dbl fut la première GEF activant les GTPases de la famille Rho à être découverte chez les mammifères. Elle fut identifiée comme un agent transformant des lymphomes³⁹. Dbl fut ensuite associée à la GTPase Cdc42 comme GEF⁴⁰. On dénombre aujourd'hui 69 GEFs de la famille de Dbl chez l'humain. Tous les membres de la famille ont en commun les deux domaines protéiques DH (Dbl Homology) et PH (Pleckstrin Homology).

D'un point de vue structurel, les GTPases possèdent une pochette à nucléotide et un ion Mg^{2+} où le magnésium lié au nucléotide est requis pour la liaison de haute affinité entre la GTPase et le nucléotide. Le domaine DH des GEFs est responsable de l'échange du GDP pour un GTP en favorisant le détachement du Mg^{2+} du GDP. Ceci entraîne une diminution de l'affinité entre le GDP et la GTPase favorisant la création d'un intermédiaire où la pochette des GTPases est dépourvue de Mg^{2+} et de nucléotide. C'est l'intermédiaire GEF-GTPase sans nucléotide. Dans un contexte cellulaire, le GTP est préférentiellement chargé sur les GTPases, puisqu'il se retrouve en concentration plus élevée que le GDP. Lorsque le GTP se lie à la GTPase, il la libère de la GEF⁴¹.

Le domaine PH de ces GEFs a la caractéristique de lier les phosphoinositides membranaires et il est considéré jouer un rôle de recrutement des GEFs à la membrane plasmique⁴¹. À l'extérieur des domaines DH et PH, les membres de cette famille de GEFs possèdent des domaines protéiques très divergents en nature, en taille et en nombre. Conséquemment, les membres de cette famille peuvent jouer des rôles biologiques très différents⁴².

1.1.3.1.2 Les GEFs de la famille de Dock180

Plus récemment, une nouvelle famille de GEFs activant les GTPases de la famille Rho a été découverte. C'est la famille de Dock180 dont l'activité GEF a été démontrée depuis 2002 dans trois publications⁴³⁻⁴⁵. Dock180, aussi nommé Dock1, est une GEF qui active la GTPase Rac et fait partie d'une famille de protéines comprenant onze membres chez les mammifères (Figure 6). Tous les membres de la famille ont en commun deux domaines protéiques, le DHR-1 et le DHR-2. Ces deux domaines possèdent une fonction biologique bien distincte.

Le domaine DHR-1 de Dock180 interagit spécifiquement avec les molécules de phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP_3). L'ablation du domaine DHR-1 de Dock180 n'influence pas l'activation de la GTPase Rac, mais empêche cependant l'élongation de la cellule et la migration cellulaire⁴⁶. L'interaction entre le domaine DHR-1 des protéines de la famille de Dock180 avec PIP_3 a aussi été démontrée avec Dock2 et Dock4^{47, 48}. La portion C-terminale de Dock180, Dock2 et Dock5 interagit aussi avec un autre phospholipide membranaire, l'acide

phosphatidique. Cette interaction semble raffiner le recrutement de la GEF à la membrane plasmique et elle est nécessaire pour l'induction d'une réponse chimiotactique adéquate chez les neutrophiles via Dock2^{47, 49}. Dock9 a récemment été associé à la formation de dendrites dans les neurones. Les domaines PH et DHR-1 de cette GEF sont nécessaires pour sa localisation à la membrane, l'activation de la GTPase Cdc42 et la croissance des dendrites⁵⁰.

Le domaine DHR-2 est, pour sa part, lié à l'activité GEF. Le domaine DHR-2 est nécessaire et suffisant pour la conversion du Rac-GDP en Rac-GTP par Dock180^{7, 44}. L'activité GEF du domaine DHR-2 de Dock180, Dock3 et Dock7 est spécifique à la GTPase Rac, puisque ces GEFs sont incapables d'induire le chargement du GTP sur RhoA et Cdc42^{44, 51}. Le chargement du GTP sur Rac1 et Rap1 peut être induit par Dock4^{52, 53}. Dock6 présente une double spécificité parmi les GTPases de la famille de Rho, puisqu'il est capable d'effectuer l'échange du GDP pour un GTP sur les GTPases Rac1 et Cdc42⁵⁴. L'activité GEF de Dock9, Dock10 et Dock11, aussi nommés Zizimin1, Zizimin2 et Zizimin3, a été démontrée envers la GTPase Cdc42^{45, 55, 56}.

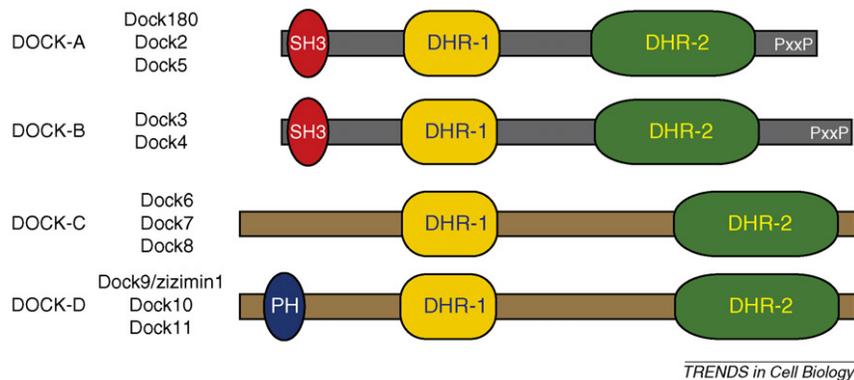


Figure 6 : Les 11 membres de la famille de Dock180 classés en 4 sous-groupes
Illustration issue de la revue publiée par Côté *et al*⁷.

Plusieurs membres de la famille de Dock180 interagissent avec les protéines Elmo. Des interactions physiques entre Elmo1 ou Elmo2 et les GEFs Dock180, Dock2, Dock3 et Dock4 ont été rapportées dans la littérature^{7, 52, 57}.

Un modèle intéressant pour expliquer le rôle d'Elmo face à Dock180 est celui de l'inhibition stérique. Il a été démontré que le domaine SH3 de Dock180 peut se lier à son domaine DHR-2 et bloquer l'accès à la GTPase Rac. La liaison d'Elmo

pourrait rendre accessible le domaine DHR-2 et ainsi libérer l'activité GEF⁵⁸. Cependant, la liaison entre Elmo1 et Dock180 semble plutôt être constitutive^{46, 59}. Il fut postulé que Dock180/Elmo forment ensemble une GEF à deux sous-unités^{60, 61}. Cependant, une récente étude appuie plutôt la théorie selon laquelle Dock180 est seul responsable de l'activité GEF, bien qu'Elmo ait un rôle très important pour l'activité biologique de la GEF. Cette étude démontre que la présence d'Elmo lié à Dock180 n'influence pas l'activité GEF de Dock180, mais semble plutôt être une protéine d'échafaudage⁸. Cependant, la présence d'Elmo en complexe avec Dock180 est nécessaire à la fonction biologique de la GEF comme l'élongation des cellules et la phagocytose. Il a donc été postulé qu'Elmo puisse être nécessaire à l'intégration de signaux menant à l'activation de Rac et/ou au recrutement d'effecteurs pour la GTPase⁸.

Il a aussi été démontré que la présence d'Elmo1 prévient l'ubiquitylation de Dock180 et sa dégradation par le protéasome. L'utilisation d'ARN interférence dirigé contre Elmo1 réduit considérablement la quantité de Dock180 dans les cellules HEK 293T⁶².

1.1.3.2 Les GAPs

Les GAPs pour les GTPases de la famille Rho se reconnaissent par la présence d'un domaine conservé, le domaine RhoGAP, qui est constitué d'environ 150 acides aminés dont 20 % de la séquence est conservée entre les membres de la famille. Le domaine RhoGAP est différent des autres domaines protéiques responsables de l'activité GAP sur les autres classes de GTPases⁶³. Des analyses, à travers le génome humain, estiment à 70 le nombre de GAP spécifiques pour les GTPases Rho⁶⁴. Par conséquent, le nombre de GAP est largement plus élevé que le nombre de GTPases de la famille Rho tout comme le nombre de GEFs. Comment expliquer cette disproportion? Bien qu'il reste encore beaucoup de recherche à faire pour bien comprendre le rôle des GAPs, il semble que leur abondance permet de contrôler finement les processus biologiques selon le tissu ou la stimulation qui engendre une réponse cellulaire spécifique. Les GAPs, comme les GEFs, contiennent plusieurs domaines protéiques favorisant les interactions protéine/protéine ou protéine/lipide qui peuvent expliquer leur

spécificité. Les GAPs jouent un rôle dans la médiation de signaux en provenance de récepteurs à la surface cellulaire. En réponse aux facteurs de croissance, les GAPs sont régulées par plusieurs mécanismes incluant la phosphorylation, la modification de leur localisation intracellulaire et de leurs interactions protéine-protéine. Les GAPs sont aussi influencées par les phospholipides générés en réponse à la stimulation de récepteurs pouvant recruter des kinases à lipide ou des phospholipases⁶⁴.

1.1.3.3 Les effecteurs

Cette section comprend quelques exemples bien caractérisés d'effecteurs associés aux GTPases de la famille Rho.

1.1.3.3.1 Rho et p160Rock

Un effecteur bien caractérisé de Rho est la kinase p160Rock. Rho lié au GTP interagit avec la portion C-terminale de p160Rock ce qui l'active. La kinase p160Rock favorise l'interaction actine/myosine et la contraction induite par l'activité motrice de la myosine de deux façons. La kinase p160Rock phosphoryle la myosine phosphatase ce qui l'inactive. Conséquemment, il y a une levée de l'inhibition de la myosine par la myosine phosphatase. La kinase p160Rock phosphoryle aussi la chaîne légère de la myosine ce qui favorise l'interaction actine/myosine et la contraction⁶⁵.

1.1.3.3.2 Rac et WAVE

Une interaction indirecte entre Rac et WAVE a été mise en évidence⁶⁶⁻⁶⁸. Chez les mammifères, il y a trois isoformes identifiés de WAVE 1, 2 et 3. Ils font partie de la famille de facteurs de promotion de la nucléation, les protéines WASP, qui compte 5 membres : WASP, N-WASP et WAVE 1-3. Les protéines WASP sont des protéines pouvant activer le complexe protéique Arp2/3 et conséquemment la polymérisation de l'actine en réseaux ramifiés. Deux modèles ont été proposés pour expliquer de quelle façon la GTPase Rac active WAVE (Figure 7). Dans les deux cas, Rac-GTP se lie au complexe protéique par une interaction directe avec PIR121. Le premier modèle suggère que cette liaison permet le détachement de

l'unité active WAVE/HSPC300 ce qui supprime l'inhibition de WAVE par PIR121^{66, 69}. Le second modèle suggère que le complexe protéique demeure suite à l'activation par Rac, mais qu'il subit une réorganisation structurale permettant l'activation de WAVE et le recrutement du complexe à la membrane plasmique^{70, 71}. Il est fort probable que ces deux modèles existent et que Rac active WAVE selon l'un ou l'autre de ces mécanismes selon l'organisme, le type cellulaire, les isoformes de WAVE exprimés et la stimulation menant à la polymérisation de l'actine. Le fait que Rac-GTP puisse activer WAVE concorde avec les structures cellulaires induites par l'activation de Rac qui sont composées de filaments d'actine ramifiés. De plus, le complexe protéique Arp2/3 est considéré comme le principal facteur d'assemblage de l'actine au front de migration des cellules en mouvement²⁶.

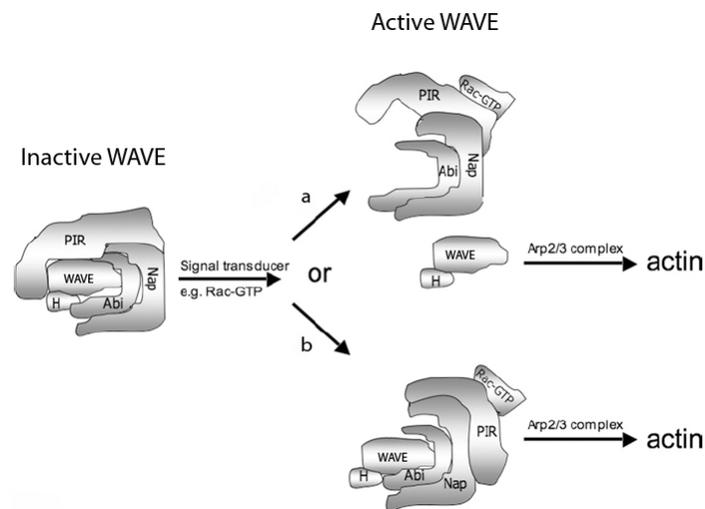


Figure 7 : Régulation du complexe protéique incluant WAVE par la GTPase Rac activée
 La protéine Rac active se lie au complexe et permet (a) le détachement de l'unité WAVE/HSPC300 du complexe ou (b) le remodelage du complexe permettant l'activation de WAVE et le recrutement du complexe à la membrane plasmique. Illustration adaptée de la revue publiée par Ibarra *et al*⁶⁸.

1.1.3.3.3 Les GTPases Rac/Cdc42 et les protéines PAK

Les protéines de la famille PAK sont un exemple bien caractérisé d'effecteurs pour les GTPases Rac et Cdc42. PAK 1-3 sont des sérine/thréonine kinases dont l'activité est amplifiée de façon importante en présence des GTPases (Rac ou Cdc42) sous leur forme active liée au GTP. De point de vue structural, les protéines PAK sont composées d'une portion *N*-terminale qui est le domaine

régulateur et d'une portion C-terminale très conservée qui contient le domaine catalytique de la phosphotransférase. Lorsqu'elles sont inactives, les protéines PAK se retrouvent en homodimères où le domaine régulateur d'une molécule de PAK se lie et inhibe le domaine catalytique de l'autre molécule de PAK. Le modèle qui fait actuellement consensus, décrit la liaison de la GTPase-GTP à une molécule de PAK comme l'élément qui induit la séparation du dimère de PAK et la libération du domaine catalytique et augmentation de l'activité kinase (Figure 8). Les effets de l'activation de PAK sont nombreux et comprennent la modulation de la morphologie cellulaire, un impact sur la dynamique des filaments d'actine et des microtubules et une influence sur la mobilité cellulaire⁷².

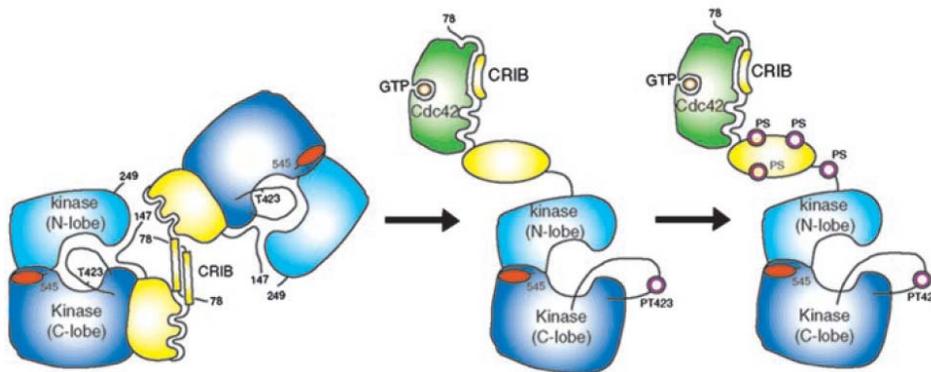


Figure 8 : Activation des kinases PAK par la GTPase Cdc42 active
Illustration issue de la revue publiée par Bokock, G.M.⁷².

1.1.3.3.4 Les GTPases de la famille Rho en lien avec les MAPKs et NFκB

Les GTPases de la famille Rho présentent aussi des effets biologiques indépendants du cytosquelette d'actine. Ils induisent, en autres, la transcription de gènes par le biais de l'activation des MAP Kinases. Rho, Rac et Cdc42 sont capables d'activer les voies de signalisation de JNK et p38MAPK. Cependant, cette faculté est variable en fonction du modèle cellulaire. Ces trois GTPases de la famille Rho sont aussi capables d'activer NFκB, bien que le débat persiste à savoir si cette activation est directe ou indirecte²¹.

1.2 Les protéines Elmo

1.2.1 Structure des protéines de la famille Elmo

La famille des protéines Elmo est composée de trois membres chez les mammifères : Elmo1, Elmo2 et Elmo3. Les protéines Elmo1 et Elmo2 sont exprimées dans plusieurs différents types de tissus chez les mammifères^{59, 73}. Ces protéines d'environ 83 kDa sont constituées de plusieurs domaines protéiques. La portion *N*-terminale de ces protéines est composée de répétitions de type Armadillo suivies d'un domaine très conservé entre les membres de la famille nommé le domaine Elmo. La portion *C*-terminale présente un domaine PH atypique, qui ne lie pas les phospholipides, et un domaine riche en proline. Ces protéines sont considérées comme des protéines d'échafaudage puisqu'aucune activité catalytique ne leur est associée jusqu'à maintenant. Les protéines Elmo présentent une grande affinité pour certaines GEFs de la famille de Dock180. La zone d'interaction avec Dock180 est principalement localisée à l'extrémité *N*-terminale du domaine PH d'Elmo. Elle est stabilisée par une seconde interaction entre les deux protéines par le domaine riche en proline d'Elmo et un domaine SH3 localisé dans la portion *N*-terminale de Dock180⁸. Les domaines protéiques d'Elmo1 et l'alignement des séquences protéiques d'Elmo1-3 humaines et de souris sont présentés à la Figure 9.

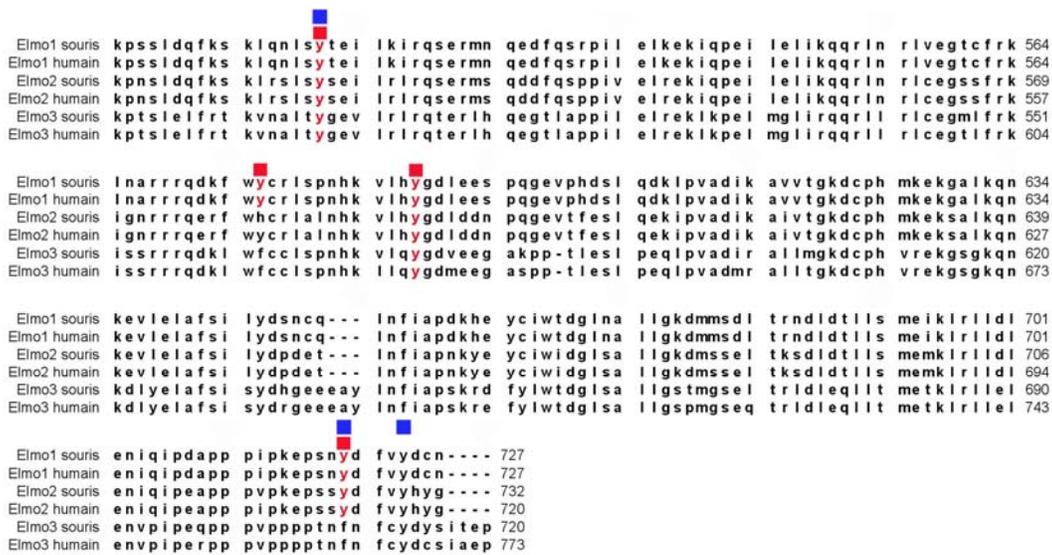


Figure 9 : Les protéines de la famille Elmo : Structure et Séquences

(a) Illustration des domaines protéiques de la protéine Elmo1 issue de l'article publié par Komander *et al*⁸. (b) Alignement de séquences des protéines de la famille Elmo. Ces séquences proviennent du site internet NCBI Elmo1 humain : NP_055615.8 , Elmo1 souris : NP_525027.1 , Elmo2 humain : NP_573403.1 , Elmo2 souris : NP_525026.2 , Elmo3 souris : NP_766348.2 . Les tyrosines que nous avons détectées phosphorylées via l'activité tyrosine kinase de Tyro3 sont identifiées avec des carrés rouges (voir section résultats : Tableau 5). Les tyrosines qui ont été documentées pour être phosphorylées dans la littérature sont identifiées avec des carrés bleus.

Une liaison entre les protéines de la famille Elmo (Elmo1 et Elmo2) et la GTPase RhoG a été démontrée⁷⁴⁻⁷⁷. Cette interaction est possible seulement si la GTPase RhoG est chargée d'un GTP^{74, 76}. Dans la première étude caractérisant cette interaction, un mutant constitutivement actif de la GTPase RhoG (RhoG-V12) a été utilisé pour évaluer l'impact biologique de RhoG. En utilisant un double mutant incapable de lier les protéines de la famille Elmo (RhoG-V12A37), cette étude démontre que RhoG est nécessaire pour l'élongation des cellules induite par les intégrines⁷⁴. La seconde étude, par l'utilisation d'ARN interférence a démontré l'importance de RhoG dans la migration cellulaire⁷⁷. Cependant, les souris KO pour RhoG ne présentent pas de phénotype évident de problèmes de développement ou d'anomalies fonctionnelles⁷⁸. Il y a donc une incompatibilité entre les études *in vitro*, qui suggère un rôle important pour RhoG dans la signalisation par les intégrines, et les résultats *in vivo* où RhoG ne semble pas jouer un rôle très important dans la physiologie des souris. Selon une étude publiée en 2008, cette incompatibilité s'explique, en partie, par le fait que

l'utilisation de dominants négatifs de GTPases de la famille Rho a souvent un effet plus important que l'ablation de l'expression de la même GTPase. Ce phénomène s'explique probablement parce que l'utilisation de dominants négatifs affecte aussi la signalisation d'autres GTPases⁷⁹. D'un point de vue mécanistique, la présence de dominants négatifs peut séquestrer les GEFs diminuant leur disponibilité pour activer les GTPases. Les auteurs ont donc cherché à clarifier le rôle de RhoG dans la signalisation via les intégrines et la migration cellulaire. En utilisant des cellules Rac1 -/-, cette étude démontre que RhoG constitutivement actif permet la formation d'ondulations de la membrane par des mécanismes dépendant et indépendant de Rac. De plus, la GTPase RhoG endogène est importante pour la migration cellulaire indépendante de Rac. Toutefois, selon ces auteurs, RhoG ne contribue pas significativement à l'étalement des cellules⁷⁹.

Elmo1 a aussi été démontré en complexe avec des protéines de la famille ERM (Ezrin/Radixin/Moesin). Ces protéines sont associées à la mobilité cellulaire, la formation des microvillosités, des ondulations de la membrane et des sites d'adhésion entre deux cellules ou entre une cellule et la matrice extracellulaire. Ces fonctions sont permises par l'habileté des protéines ERM à lier le cytosquelette d'actine et la membrane plasmique⁸⁰⁻⁸². Les protéines ERM s'associent directement avec Elmo1 *in vitro*. Les protéines endogènes Elmo1/ERM se retrouvent aussi au sein d'un même complexe à l'intérieur des cellules. La liaison ERM/Elmo1 est médiée par la portion N-terminale d'Elmo1. Elmo1 peut lier Radixin, une protéine ERM, et la GEF Dock180 en même temps. La liaison à Radixin n'affecte pas l'activation de Rac en aval du complexe Elmo1/Dock180. De plus, la liaison Radixin/Elmo1 n'abolit pas l'interaction RhoG/Elmo1, bien que leurs sites d'interaction sur Elmo1 se superposent, puisqu'un complexe RhoG/Elmo1/Radixin peut être détecté. Ces trois protéines colocalisent à la membrane plasmique⁷⁵.

1.2.2 Les fonctions biologiques du complexe protéique Dock/Elmo

Le complexe protéique Dock180/Elmo est une association qui a été maintenue au cours de l'évolution. La Figure 10 présente les orthologues du complexe ainsi

que les protéines agissant en aval et en amont du complexe qui ont aussi été conservées au cours de l'évolution. Il est particulièrement intéressant de noter la conservation des fonctions biologiques associées à cette voie de signalisation comme la phagocytose, la migration cellulaire et la fusion cellulaire⁷.

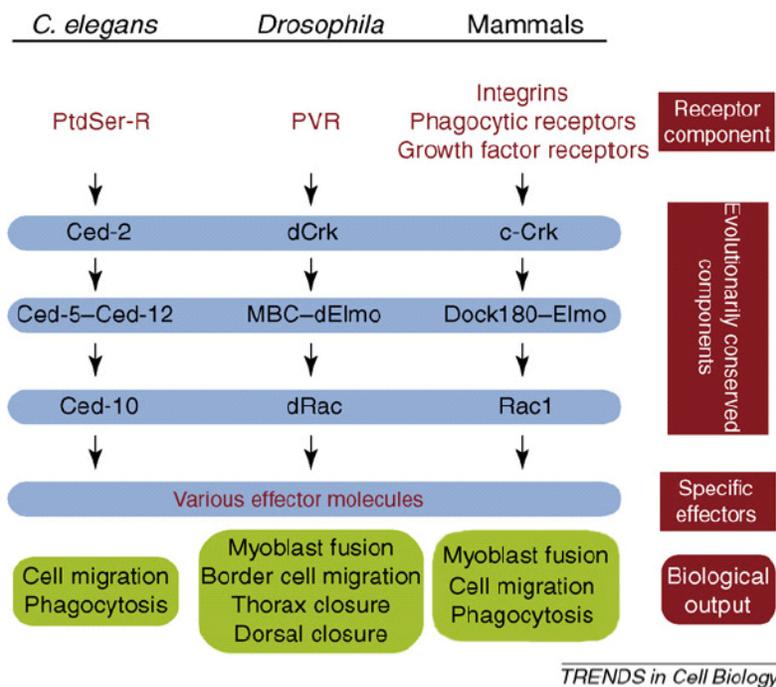


Figure 10 : Présentation des orthologues des protéines de mammifère c-Crk, Dock180, Elmo et Rac1 chez la drosophile et le vers *C. elegans* et des fonctions biologiques qui y sont associées

Illustration adaptée de la revue publiée par Côté *et al*⁷.

Historiquement, bien que les gènes n'étaient pas encore identifiés, la relation entre Dock180, Elmo et Rac a été soulignée, pour la première fois, lors d'études sur l'apoptose faites chez *C. elegans*^{83, 84}. Par la suite, toujours chez *C. elegans*, ces gènes ont été caractérisés pour leur participation à la phagocytose des cellules apoptotiques et leur implication dans la migration cellulaire^{59, 85, 86}. C'est en 1998 que l'homologie entre Ced5 et la protéine Dock180 humaine a été mise en lumière⁸⁷.

Chez la drosophile, l'orthologue de Dock180, Myoblast city (MBC) a été identifié initialement pour son rôle dans le processus de fusion des myoblastes^{88, 89}. La protéine dElmo, l'orthologue d'Elmo, est aussi essentielle au processus de fusion des myoblastes⁹⁰. Chez la mouche, cette voie de signalisation a aussi été

démontrée comme importante dans d'autres phénomènes biologiques comme la migration collective de cellules¹².

Chez les mammifères, Dock180 et Elmo sont d'importants joueurs pour la migration cellulaire et la phagocytose⁵⁹. Récemment, le rôle de MBC dans la fusion cellule-cellule chez la drosophile a été démontré comme étant conservé chez les mammifères, puisque les souris KO pour Dock180 présentent de sévères défauts de fusion des myoblastes⁹¹.

1.2.3 Les protéines Elmo et l'intégration de signaux extracellulaires

Les rôles que jouent les protéines de la famille Elmo ne sont pas encore tout à fait élucidés. Elmo est nécessaire à la signalisation par la GEF Dock180, mais n'est pas requis pour le chargement du GTP sur la GTPase Rac⁸. Plusieurs études rapportent que les protéines de la famille Elmo peuvent agir comme intégrateur de signaux provenant de l'environnement de la cellule et potentiellement agir de médiateur afin de favoriser la réponse biologique adéquate. Parmi ces signaux, nous retrouvons la composition de la matrice extracellulaire, la présence de facteurs de croissance et les contacts cellule-cellule.

1.2.3.1 Les récepteurs de phosphatidylsérine

Les protéines Dock180 et Elmo ont été identifiées comme d'importants joueurs pour la phagocytose des cellules apoptotiques⁹². Deux études démontrent que Dock180 et/ou Elmo interagissent avec des récepteurs membranaires caractérisés par leur potentiel à lier les molécules de phosphatidylsérine (PS). Les cellules saines maintiennent les molécules de PS au niveau de la surface interne de la membrane plasmique uniquement. Par contre, dans les cellules apoptotiques, le mécanisme qui maintient cette ségrégation est rompu et les molécules de PS se retrouvent alors exposées à la surface externe des corps apoptotiques. Ces molécules de PS servent de signaux favorisant la phagocytose de ces cellules par des cellules voisines. Chez les mammifères, BAI1, un récepteur liant de façon spécifique les molécules de PS, joue un rôle dans la reconnaissance et l'internalisation des cellules apoptotiques. Cette protéine à sept domaines transmembranaires interagit directement avec Elmo par sa queue cytoplasmique.

La formation d'un complexe trimoléculaire incluant BAI1, Elmo et Dock180 a aussi été démontrée. Des essais fonctionnels suggèrent que BAI1 coopère avec Elmo, Dock180 et Rac pour promouvoir la phagocytose des cellules apoptotiques⁹³. PSR est un autre récepteur qui reconnaît les molécules de PS exposées à la surface des corps apoptotiques⁹⁴. Chez *Caenorhabditis elegans*, l'homologue de PSR, psr-1, participe à la même voie de signalisation que CED-2(CrkII), CED-5(Dock180), CED-10(Rac) et CED-12(Elmo) possiblement par une interaction directe avec CED-5 et CED-12⁸⁶.

1.2.3.2 Les nétrines

Dock180 est impliqué dans la signalisation par les nétrines dans le système nerveux. Le récepteur de nétrines DCC activé par une stimulation avec son ligand induit la formation d'un complexe protéique incluant Dock180 et l'activation de la GTPase Rac. L'ablation de l'expression du gène de Dock180 dans les neurones induit la perte de la croissance axonale et de l'attraction normalement induite par la présence des nétrines⁹⁵. Le rôle des protéines de la famille Elmo n'est pas encore démontré dans la signalisation induite via les nétrines, mais paraît une avenue de recherche intéressante.

1.2.3.3 Les intégrines

Elmo et Dock180 sont importants pour la signalisation en aval des intégrines. Les intégrines sont des protéines transmembranaires pouvant lier les composantes de la matrice extracellulaire comme le collagène et la laminine⁹⁶. On les retrouve sous forme d'hétérodimères composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Les intégrines font partie des adhésions focales, une sorte de point d'ancrage, où le cytosquelette d'actine est attaché à la matrice extracellulaire via les intégrines et d'autres protéines structurelles. La kinase des adhésions focales, FAK, est une tyrosine kinase qui est activée en réponse à la stimulation des intégrines. FAK, en collaboration avec d'autres kinases de la famille Src, phosphoryle p130Cas. La protéine p130Cas phosphorylée interagit avec Crk qui lie Dock180/Elmo menant à l'activation de Rac⁹⁷.

Une récente étude associe Elmo2 à la signalisation induite par les intégrines. Cette étude est la première à suggérer une différence fonctionnelle entre Elmo1 et Elmo2. Elle démontre une liaison entre Elmo2 (et non Elmo1) et ILK. La protéine ILK s'attache directement aux intégrines par la sous-unité β et joue un rôle de protéine d'échafaudage. ILK se lie à plusieurs joueurs comme PINCH-1, PINCH-2, α - β -, γ -parvin, paxillin et PIP₃. L'interaction avec PINCH associe les intégrines à la signalisation par les facteurs de croissance alors que l'interaction avec les parvins associe la matrice extracellulaire aux acteurs du cytosquelette⁹⁸.⁹⁹. Elmo2 interagit avec ILK par sa portion N-terminale et l'activité kinase d'ILK n'est pas nécessaire pour cette interaction. La GTPase RhoG peut aussi être impliquée dans ce complexe, puisqu'elle lie Elmo2 uniquement lorsqu'elle est chargée d'une molécule de GTP. Le complexe RhoG-GTP/Elmo2/ILK a été démontré *in vitro* et en colocalisation par immunofluorescence dans des kératinocytes transfectés. Au niveau fonctionnel, ce complexe trimoléculaire semble agir de concert pour favoriser la polarisation et la migration cellulaire⁷⁶. Le rôle des protéines de la famille de Dock180 n'a pas été étudié, dans ce contexte, mais il est plausible que Dock/Rac se retrouvent en aval du complexe ILK/Elmo2.

Le récepteur uPAR favorise l'extension de la membrane plasmique et la mobilité cellulaire via Rac¹⁰⁰. Une récente étude démontre une collaboration, par la formation d'un complexe incluant uPAR et l'intégrine β 3, permettant la formation du complexe signalétique p130Cas/CrkII/Dock180 et l'activation de Rac. Dans ce contexte, l'activation de Rac induit la migration et l'invasion¹⁰¹. Malheureusement, la présence de protéines de la famille Elmo au sein de ce complexe n'a toujours pas été évaluée.

1.2.3.4 Les récepteurs de fusion

Chez la drosophile, la protéine dElmo est aussi essentielle pour la fusion des myoblastes. Lors de la fusion des myoblastes MBC (Dock180) agit en aval des récepteurs de fusion cellulaire SNS et Duf. Ces récepteurs se retrouvent de part et d'autre des cellules à fusionner. SNS et Duf se lient ensemble et, dans chaque cas, induisent une signalisation intracellulaire via MBC pour permettre la

réorganisation du cytosquelette d'actine nécessaire à la fusion cellulaire^{102, 103}. Les mouches mutantes pour la protéine dElmo présentent des défauts de fusion des myoblastes suggérant une collaboration entre dElmo et MBC pour permettre l'activation de Rac à l'endroit et au moment nécessaire pour permettre la fusion cellule-cellule menant à la formation des fibres musculaires⁹⁰.

1.2.3.5 Les récepteurs kinases à tyrosine

La voie de signalisation Dock180/Elmo se retrouve aussi en aval de récepteurs kinases à tyrosine. Chez la drosophile, la migration en groupe des « border cells » nécessite le récepteur PVR qui signale par MBC/dElmo lors de la première phase de la migration¹².

1.2.4 La phosphorylation des protéines de la famille Elmo

1.2.4.1 Hck phosphoryle Elmo

La phosphorylation des protéines de la famille Elmo a été relativement peu étudiée. Deux articles scientifiques, publiés par l'équipe du Dr. Miller, ont démontrés que la kinase Hck, membre de la famille Src, peut induire la phosphorylation d'Elmo1 lorsque les deux protéines sont surexprimées dans les cellules CHO. De plus, ils ont démontré que les deux protéines se retrouvent au sein du même complexe dans les cellules et que cette interaction nécessite le domaine SH3 de Hck¹⁰⁴. Une analyse en spectrométrie de masse leur a permis de déterminer que les tyrosines 18, 216, 395, 511 et 720 d'Elmo1 sont phosphorylées par Hck lors d'un essai de phosphorylation *in vitro*. L'utilisation de mutants d'Elmo1, pour lesquels des tyrosines ont été mutées en phénylalanine, dans des essais de liaison suggère que l'interaction avec Dock180 et CrkII ne dépend pas de la phosphorylation d'Elmo. Des essais fonctionnels de migration et de phagocytose ont suggéré que la phosphorylation d'Elmo sur des tyrosines est importante pour l'activité des protéines de la famille Elmo. Cependant, le rôle de Hck dans ces essais fonctionnels n'a pas été évalué directement¹⁰⁵.

1.2.4.2 Autres sites de phosphorylation rapportés concernant Elmo

La littérature nous renseigne aussi sur la phosphorylation des protéines de la famille Elmo à des niveaux d'expression plus physiologiques lors de l'analyse de phosphoprotéomes de cellules ou de tissus dans différents contextes. Il a été démontré que la protéine Elmo1 humaine est phosphorylée sur les tyrosines 720 et 724 dans des cellules Jurkat (lymphoblastes) traitées au pervanadate et à la calyculine A afin d'inhiber l'activité des phosphatases¹⁰⁶. Toujours dans les cellules Jurkat, mais cette fois-ci lorsque le récepteur TCR est activé, la protéine Elmo1 est phosphorylée sur les sérines 342 et 344¹⁰⁷. La protéine Elmo2 est retrouvée phosphorylée dans plusieurs études sur la tyrosine 48 dans des cellules humaines et des cellules de souris. Par exemple, Elmo2 phospho-Y48 se retrouve dans des cellules épithéliales humaines de glande mammaire stimulées avec de l'EGF ou de l'HRG¹⁰⁸⁻¹¹⁰. La tyrosine 48 d'Elmo2 est phosphorylée dans des extraits tissulaires de cerveau murin adulte¹¹¹. Elmo2 se retrouve aussi phosphorylé sur la tyrosine 48 dans des fibroblastes d'embryon de souris transformés avec l'oncogène Src alors que cette phosphorylation n'est pas détectée chez les mêmes cellules non transformées^{106, 112}. La phosphorylation de la tyrosine 48 se retrouve aussi dans une lignée de glioblastome où la présence de cette tyrosine phosphorylée augmente avec la concentration en EGFRvIII à la surface des cellules¹¹³. Elmo2 a été détecté phosphorylé sur deux tyrosines 48 et 717 dans les mastocytes de souris. Lorsque les mastocytes sont activés avec du FcεRI la phosphorylation sur la tyrosine 717 est accrue¹¹⁴. Elmo2 phospho-48 a aussi été détecté chez des lignées cellulaires du cancer du poumon de type NSCLC^{115, 116}. Dans ces dernières, on observe aussi la phosphorylation de Elmo2 sur la tyrosine 717 et la phosphorylation de Elmo3 sur la tyrosine 551 (identifié comme Y385 dans l'article)¹¹⁶. Jusqu'à maintenant, les protéines de la famille Elmo ont été reportées phosphorylées uniquement sur des résidus tyrosines et plusieurs de ces résidus sont conservés à travers la famille des protéines Elmo (Figure 9).

Dans plusieurs exemples, les événements de phosphorylation observés sur les protéines de la famille Elmo ont été détectés dans des lignées cancéreuses ou en

réponse à des stimulations favorisant la cancérogenèse. Ces informations nous portent à croire que la phosphorylation d'Elmo joue un rôle dans le développement du cancer. Cependant, beaucoup de recherches sont encore nécessaires pour démontrer la participation de ces événements de phosphorylation dans les processus de cancérogenèse.

1.2.5 Les protéines des familles Elmo, les GEFs de la famille de Dock180 et le cancer

Cette section présente les études associant le cancer et les protéines de la famille Elmo et/ou les membres de la famille de Dock180 qui ont été démontrés en complexe avec Elmo (Dock180, 2, 3 et 4).

1.2.5.1 Dock180 et Elmo sont associés au potentiel invasif des tumeurs

L'expression du complexe Dock180/Elmo1 a été associée au potentiel invasif des glioblastomes. L'expression de Dock180 et d'Elmo1 a été observée par immunohistochimie chez des tumeurs primaires humaines. Les deux protéines sont exprimées dans les tumeurs primaires, mais aussi dans les cellules métastatiques qui envahissent le tissu environnant. Les niveaux d'expression de Dock180 et d'Elmo1 sont élevés dans les lignées cellulaires de glioblastome en comparaison avec ceux des astrocytes humains normaux. Par conséquent, la surexpression de Dock180/Elmo1 dans des lignées gliales faiblement invasive augmente leur potentiel de migration et d'invasion¹¹⁷. L'inhibition de l'expression de Dock180 et d'Elmo1 endogène par la technique de l'ARN interférence diminue le potentiel de migration de lignées de glioblastomes *in vitro* et *ex vivo* sur des coupes de cerveau.

Une autre étude démontre l'implication de Dock180 dans le potentiel invasif de lignées cellulaires de cancer du côlon, du sein et du cerveau. L'utilisation de l'ARN interférence dirigé contre Dock180 réduit le potentiel invasif de ces cellules *in vitro* à travers une matrice de collagène¹⁰¹. Malheureusement, la contribution d'Elmo n'a pas été mesurée lors de cette étude.

L'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ est associée avec le potentiel invasif et les métastases lors de la progression des carcinomes. La comparaison des profils d'expression génique

de cellules exprimant de façon stable l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ avec la lignée parentale permet d'observer une régulation de plusieurs gènes pro-métastatiques dont Elmo1. L'expression d'Elmo1 est accrue dans la lignée stable exprimant l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ ¹¹⁸.

1.2.5.2 Dock3 et Dock10 sont impliqués dans la régulation de la transition mésenchymale/amiboïde

Dock3, pour sa part, a été impliqué dans la transition entre les types de migration mésenchymale et amiboïde. La capacité des cellules à effectuer ce type de transition leur permet de conserver leur potentiel migratoire malgré une variation du micro-environnement. Cette étude, faite principalement dans la lignée cellulaire de mélanomes humains A375M2, démontre que la migration de type mésenchymale est pilotée par la GTPase Rac. Rac est activée par un complexe protéique incluant la GEF Dock3 et NEDD9 (un membre de la famille de la protéine p130Cas). Rac signale alors par WAVE2 pour diriger le mouvement mésenchymal et supprimer les mouvements amiboïdes par la diminution de la contraction actine/myosine. À l'inverse, lors de la migration amiboïde, la GTPase Rho prend le contrôle. Rho active ROCK qui stimule une GAP pour la GTPase Rac, ARHGAP22, qui neutralise la migration de type mésenchymale en inactivant Rac¹⁸. Une autre étude a présenté Dock10, une GEF pour Cdc42, comme une protéine favorisant la migration de type amiboïde. L'abolition de l'expression de Dock10 favorise la conversion à un type de migration mésenchymale¹¹⁹.

1.2.5.3 Dock4 est potentiellement un suppresseur de tumeurs

Deux études suggèrent que Dock4 puisse être un suppresseur de tumeur. La première identifie Dock4 comme un gène cible pour les délétions génétiques homozygotes, lors de la cancérogenèse, dans un modèle murin. De plus, plusieurs mutations sur le gène codant pour Dock4 ont été détectées dans des lignées cellulaires humaines de cancer des ovaires, de la prostate, du côlon et du système nerveux central. L'expression de Dock4 de souche sauvage, dans des cellules d'ostéosarcome de souris avec une délétion du gène de Dock4, supprime la croissance de ces cellules dans l'agar mou et diminue leur potentiel invasif *in*

*vivo*⁵³. La seconde étude met en lumière, dans des tumeurs de cancer des ovaires, quelle région chromosomique est supprimée de façon homozygote. Ils ont déterminé que le gène de Dock4 est supprimé du bagage génétique des cellules dans 4,3 % des cas¹²⁰.

1.3 Les RTKs et les GEFs activant les GTPases de la famille Rho

Plusieurs études démontrent un lien très clair entre les récepteurs kinases à tyrosine, RTK, et les GEFs pour les GTPases de la famille Rho. Plus de la moitié des 58 RTKs humains induisent l'activation d'au moins une GTPase de la famille Rho. Les RTKs peuvent être divisés en 20 sous-groupes et au moins un membre de chaque sous-groupe peut induire l'activation d'une ou plusieurs GTPases de la famille Rho. Les sous-groupes PTK7, RYK, ROR, AAATYK et DDR n'ont pas encore été associés à l'activation des GTPases¹²¹. Une schématisation de ces sous-groupes et des GTPases qu'ils sont connus pour activer est présentée plus bas (Figure 11). La GTPase Rac1 est associée à toutes les familles de RTK pour lesquelles l'activation d'une GTPase de la famille Rho a été démontrée. Il est fort probable que les recherches à venir nous apporteront de nouvelles connections entre les RTK et les GTPases de la famille Rho. Depuis la publication, en 2006, de la revue de la littérature par Schiller *et al*¹²¹ le RTK ALK a été associé à l'activation de Rac1 et Cdc42^{122, 123}.

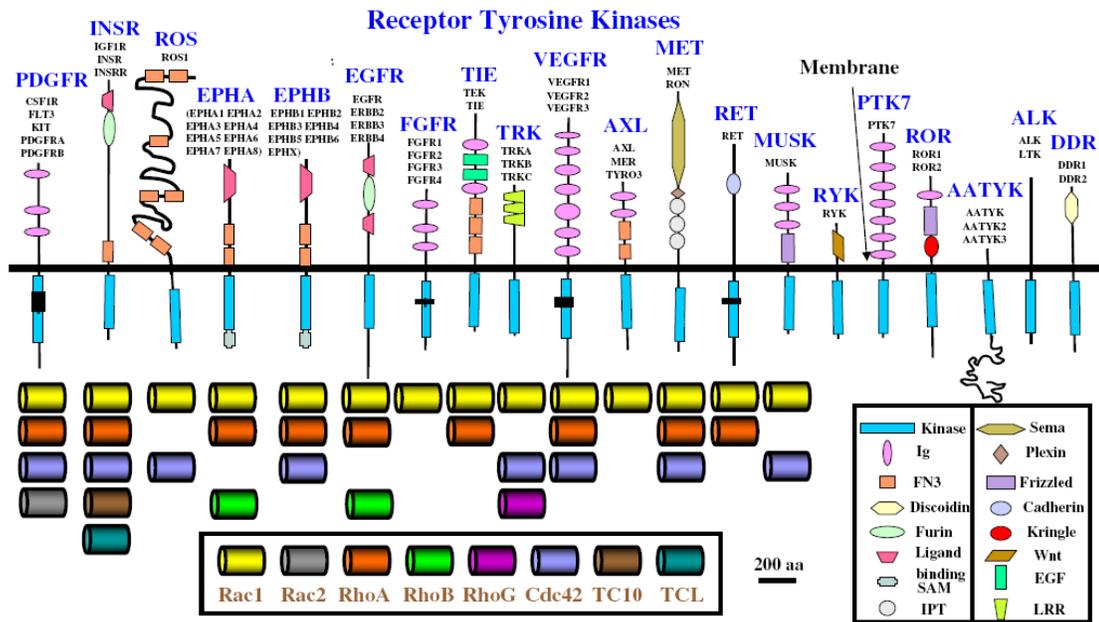


Figure 11 : Les 20 sous-groupes humains de récepteurs kinases à tyrosine et les GTPases de la famille Rho qu'ils activent
 Illustration issue de la revue publiée par Schiller *et al* ¹²¹.

L'activation des GEFs en aval des RTKs se produit généralement dans les minutes suivant la stimulation des RTKs. Jusqu'à maintenant, 16 des 69 GEFs de la famille Dbl sont impliquées dans la liaison entre les RTKs et les GTPases¹²¹. Il a été postulé que, puisque les RTKs et les GTPases se retrouvent toutes deux attachées à la membrane, l'activation des RTKs induit le recrutement de GEFs permettant l'activation des GTPases à la membrane¹²¹. Fait intéressant, la liaison entre les RTKs et les GEFs est souvent directe démontrant une proximité dans les cascades signalétiques. Dans plusieurs cas, les RTKs sont responsables de phosphorylations activatrices sur des GEFs¹²⁴⁻¹²⁶. Les sites de phosphorylation sur les RTKs peuvent aussi servir de site d'ancrage pour les GEFs qui contiennent des domaines SH2^{127, 128}.

1.4 Les récepteurs de la famille TAM

1.4.1 Structure et activation

1.4.1.1 Domaines protéiques et nomenclature des récepteurs TAM

Les récepteurs de la famille TAM, composée de Tyro3, Axl et Mer, sont des kinases à tyrosine transmembranaires. La portion extracellulaire de ces récepteurs est constituée de deux domaines de type immunoglobuline (Ig) et de deux domaines de type fibronectine III (FNIII). La portion intracellulaire de ces protéines est composée essentiellement du domaine kinase et d'une petite queue cytosolique. Les récepteurs de la famille TAM sont représentés à la Figure 12.

Les domaines protéiques Ig et FNIII que l'on retrouve dans la portion extracellulaire des récepteurs TAM sont aussi présents sur plusieurs membres de la grande famille des molécules d'adhésion cellulaire (CAMs) incluant NCAM. Il n'est donc pas étonnant que le récepteur Axl présente des propriétés de molécule d'adhésion. Lorsque surexprimé, Axl favorise l'agrégation des cellules. La liaison entre deux récepteurs se trouvant sur des cellules différentes ne nécessite pas l'activité kinase d'Axl, puisque la surexpression du récepteur dont la portion intracellulaire a été enlevée permet toujours l'agrégation des cellules¹²⁹. Ce type d'homodimère entre récepteurs se retrouvant sur deux cellules différentes n'a pas été démontré à des niveaux d'expression endogène. Il demeure possible que le rôle d'Axl comme molécule d'adhésion ne soit qu'un artefact de surexpression.

Il semble que les noms Tyro3, Axl et Mer fassent maintenant consensus dans le domaine. Cependant, plusieurs noms ont été attribués aux récepteurs TAM depuis leur découverte. Ces noms sont présentés au Tableau 1.

Tableau 1 : Nomenclature des récepteurs TAM

Les espèces autres qu'humaine sont indiquées entre parenthèse :
souris (s); poulet (p); rat (r).

Récepteur	Noms attribués
Tyro3 ¹³⁰	Sky ¹³¹ , Brt (s) ¹³² , Rse ¹³³ , Etk-2 (s) ¹³⁴ , Rek (p) ¹³⁵ , DTK(s) ¹³⁶ et Tif ¹³⁷
Axl ¹³⁸	Ark (s) ¹³⁹ , Ufo ¹⁴⁰ , Tyro7 (r) ¹³⁰
Mer ¹⁴¹	Eyk (p) ¹⁴² , MerTK, Nyk ¹⁴³ , Tyro-12 (r) ¹³⁰

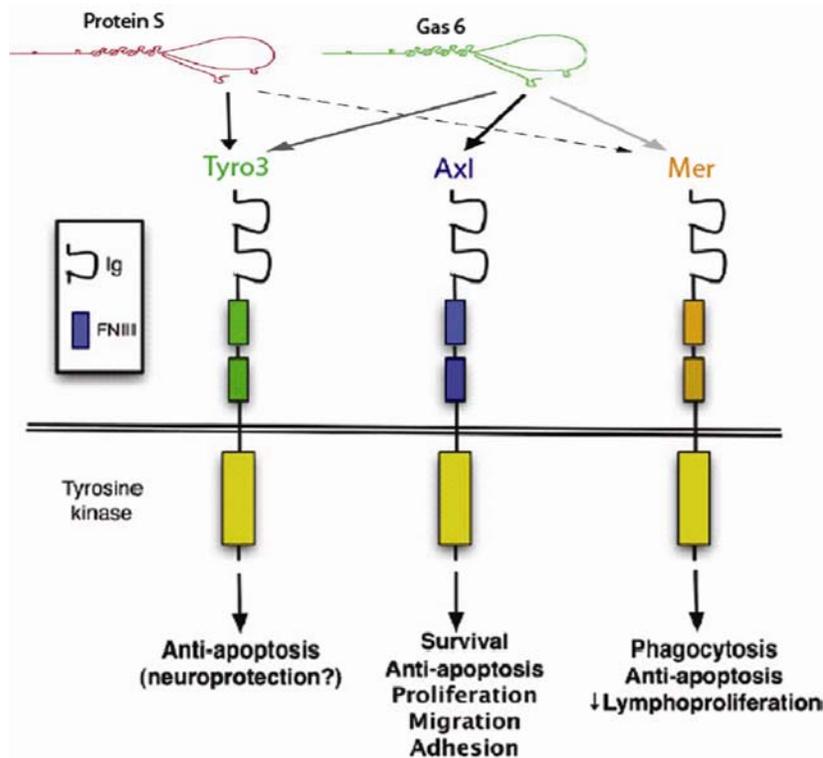


Figure 12 : Les récepteurs de la famille TAM : structure, activation et fonction biologique
 Illustration adaptée de la revue publiée par Hafizi *et al*¹⁴⁴.

1.4.1.2 Activation des TAM par liaison d'un ligand

Comme plusieurs autres récepteurs kinases à tyrosine, la liaison d'un ligand à la portion extracellulaire induit la dimérisation du récepteur et une trans-autophosphorylation de la portion interne. Les tyrosines ainsi phosphorylées permettent d'augmenter l'activité tyrosine kinase des récepteurs en plus de créer des sites de liaisons pour des protéines contenant des domaines de liaisons aux tyrosines phosphorylées comme les domaines SH2 et PTB. Les ligands identifiés pour les récepteurs TAM sont Gas6 et Protein S¹⁴⁵. Gas6 et Protein S ont en commun 43 % de leur séquence en acides aminés et présentent les mêmes domaines protéiques à l'exception d'un site de clivage pour la thrombine qui est présent seulement sur Protein S^{146, 147}. Gas6 induit l'activation des trois membres de la famille TAM avec une préférence pour Axl et Tyro3 suivi par Mer selon des mesures d'affinité *in vitro*^{148, 149}. Le rôle de Protein S comme ligand pour les récepteurs TAM ne fait toujours pas consensus⁴. Protein S possède aussi une autre fonction biologique connue qui est celle de réguler la coagulation sanguine¹⁴⁷. Au

centre de la structure de ces protéines, on retrouve quatre répétitions de type « EGF-like ». La liaison de Gas6/Protein S aux récepteurs TAM s'effectue par les deux domaines globulaires LG (Laminin G-like) des ligands situés dans la portion C-terminale. Gas6 et Protein S possèdent une région N-terminale présentant plusieurs résidus γ -carboxylés, c'est le domaine Gla. Le domaine Gla possède la particularité de lier les phospholipides membranaires en présence de Ca^{2+} ¹⁵⁰. Gas6 favorise la phagocytose des corps apoptotiques par l'opsonisation de ceux-ci via l'interaction PS/Gas6¹⁵¹. De plus, la γ -carboxylation du domaine Gla semble être nécessaire aux fonctions biologiques de Gas6 comme la phosphorylation d'Axl, la survie cellulaire via la phosphorylation d'Akt et la prolifération des fibroblastes¹⁵²⁻¹⁵⁴. La plupart des études décrivent l'activation des récepteurs TAM par homodimérisation. Toutefois, une récente étude présente une possible hétérodimérisation entre Tyro3 et Axl dans les neurones en développement³.

1.4.1.3 Activation indépendante du ligand

Un second type d'activation moins conventionnel a aussi été rapporté concernant Tyro3 et Axl, c'est l'activation par surexpression. Une forte concentration des récepteurs à la membrane plasmique induit une dimérisation spontanée de ceux-ci, sans la présence de ligand, et par conséquent une augmentation de leur activité kinase^{155, 156}. Axl est le seul récepteur de la famille des TAMs pour lequel un autre mode d'activation a été démontré par la formation d'un récepteur hybride, un dimère entre Axl et une autre famille de récepteurs. Le récepteur à l'interleukine 15, IL-15R α , coimmunoprécipite avec Axl et la stimulation de ce complexe avec Gas6 ou IL-15 induit la phosphorylation des deux récepteurs et la signalisation en aval. La portion extracellulaire d'Axl est nécessaire pour la formation du complexe Axl/IL-15R α ¹⁵⁷.

1.4.2 Profils d'expression des récepteurs TAM

Les profils d'expression des TAM dans le tissu adulte sont différents pour chaque récepteur bien que certaines régions expriment plus d'un TAM.

1.4.2.1 Tyro3

Tyro3 est principalement exprimé dans le système nerveux, mais on le retrouve aussi dans les ovaires, les testicules, la poitrine, les poumons, les reins, les ostéoclastes et la rétine^{133, 158-162}.

1.4.2.2 Axl

Axl est exprimé de façon ubiquitaire¹³⁸. Le niveau d'expression d'Axl est particulièrement élevé dans les tissus suivants : l'hippocampe, le cervelet, le cœur, les muscles squelettiques, le foie, les reins et les testicules ainsi que dans les types cellulaires suivants : les macrophages, les plaquettes et les cellules endothéliales^{129, 158, 163, 164}.

1.4.2.3 Mer

Le récepteur Mer est exprimé presque exclusivement dans les lignées cellulaires hématopoïétiques. Mer se retrouve dans les macrophages, les plaquettes, les mégacaryocytes, les cellules NK et NKT et les cellules dendritiques^{141, 158, 165}. L'expression de Mer a aussi été démontrée dans les ovaires, la prostate, les testicules, les poumons, la rétine et les reins^{141, 162, 163, 166}.

1.4.3 Fonctions biologiques des récepteurs TAM

Les souris KO pour les trois gènes de la famille TAM ont été produites et étudiées. Étonnamment, même si l'expression d'ARN messager codant pour les récepteurs TAM fut retrouvée dans les tissus embryonnaires^{130, 163, 167, 168}, les souris KO pour les récepteurs TAM séparément et même les triples KO ne présentent pas de signes évidents de défauts de développement à la naissance^{161, 169, 170}. Cependant, ces souris développent plusieurs phénotypes révélant certains rôles biologiques que jouent les récepteurs TAM.

1.4.3.1 Les récepteurs TAM et le système nerveux central

La principale fonction biologique de Tyro3 est associée au système nerveux central. Lorsqu'elles sont âgées, les souris KO pour Tyro3 développent des troubles de dégénérescence du système nerveux incluant une paralysie des

membres postérieurs^{169, 170}. De plus, l'expression de Tyro3 et d'Axl, chez les cellules neuronales en développement, est associée à la survie et la migration de ces cellules³. Cette dégénérescence neuronale est encore plus prononcée chez les animaux combinant les KO pour Tyro3 et un ou les deux autres TAM. Les triples KO présentent des signes de dégénérescence neuronale plus tôt et de façon plus sévère. Leurs cerveaux présentent une grande perte de neurones et des encéphalopathies spongiformes. Les souris âgées sont toutes paralysées¹⁷⁰.

1.4.3.2 Le récepteur Mer et la phagocytose

Le récepteur Mer joue un rôle important dans la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine. Les souris KO pour Mer deviennent aveugles due à une dégénérescence complète des photorécepteurs entre quatre et huit semaines¹⁷⁰. De plus, dans un modèle classique de dégénérescence de la rétine, les rats RCS, une délétion dans le gène de Mer a été identifiée, comme la cause de l'apoptose des photorécepteurs¹⁷¹. Mer n'est pas exprimé chez les photorécepteurs, mais il est exprimé dans l'épithélium pigmentaire de la rétine responsable de la phagocytose des segments externes de photorécepteurs. Mer semble induire le remodelage du cytosquelette nécessaire à la phagocytose^{172, 173}. Chez l'humain, des mutations dans le gène de Mer ont été détectées chez des patients atteints de rétinite pigmentaire¹⁷⁴. Les interactions permettant aux cellules phagocytaires de reconnaître les corps apoptotiques via les récepteurs TAM sont illustrées dans la figure 13. Deux études lient le récepteur Mer avec des régulateurs du cytosquelette d'actine. La première démontre une interaction entre Mer et la GEF Vav1. Lorsque Mer est activé, Vav1 est phosphorylé et se détache de Mer. Un chargement de GTP sur les GTPase Rac et Cdc42 est alors observé¹²⁸. La seconde, suggère une relation entre le récepteur Mer et Dock180 durant la phagocytose des corps apoptotiques par la stimulation de MER avec du Gas6¹⁷⁵.

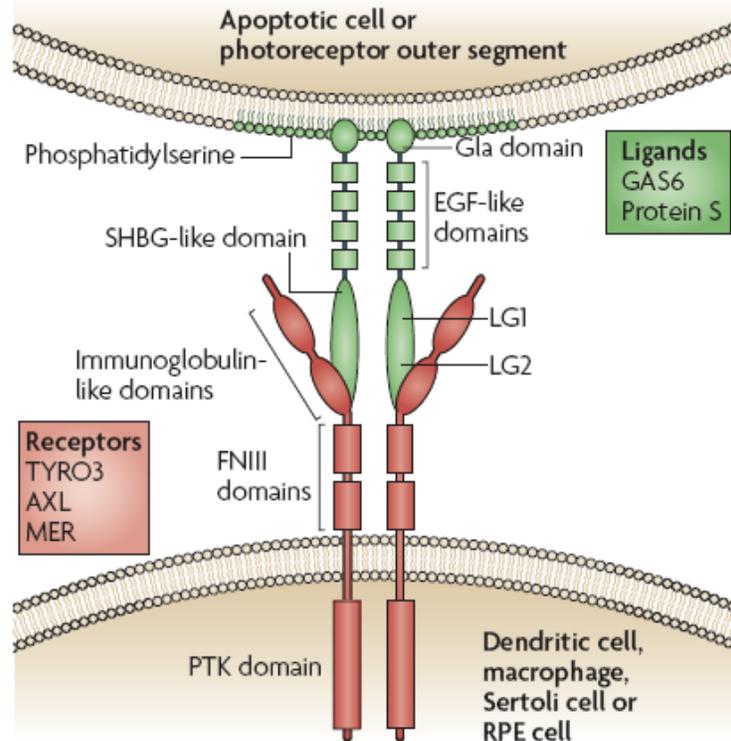


Figure 13 : Les interactions permettant aux cellules phagocytaires de reconnaître les corps apoptotiques via les récepteurs TAM

Illustration issue de la revue publiée par Lemke *et al*¹⁷⁶.

1.4.3.3 Les récepteurs TAM et l'homéostasie du système immunitaire

Les récepteurs TAM jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire. Les souris KO pour Tyro3, Axl et Mer séparément présentent des caractéristiques de réaction auto-immunes¹⁷⁷. Une fois de plus, chez les doubles et triples KO ce phénotype est aggravé¹⁶⁹. Ceci est considéré comme le phénotype le plus important des souris TAM. À trois semaines, ces souris présentent des ganglions de taille élevée. À 6 mois, la rate et les ganglions font souvent dix fois le poids de ceux d'animaux de souche sauvage. Ce phénomène est dû à la prolifération incontrôlée des cellules myéloïdes et lymphoïdes. Des colonies de lymphocytes se retrouvent éventuellement dans presque tous les tissus de l'organisme. Il n'est donc pas surprenant de constater que ces souris développent un large spectre de maladies auto-immunes¹⁷⁶. Chez ces souris, on retrouve aussi beaucoup d'inflammation résultant autant de la réponse inflammatoire par les cellules dendritiques et les macrophages face aux pathogènes que par la lyse des cellules apoptotiques non phagocytées¹⁷⁶. Le

mécanisme par lequel les récepteurs TAM calment le système immunitaire a été en partie élucidé. Lorsque les cellules dendritiques ou des macrophages sont en présence de pathogènes, ils enclenchent une réponse par la stimulation des TLR (Toll-Like Receptors). Cette réponse comprend la sécrétion de cytokines proinflammatoires. Dans ce contexte, la signalisation par les TAM induit la transcription des gènes SOCS. Les protéines SOCS sont des suppresseurs endogènes des voies de signalisation des cytokines en couplant l'activation des récepteurs aux voies d'ubiquitination. Ainsi, les protéines SOCS bloquent la signalisation induite par les récepteurs à cytokines et les TLR^{176, 178, 179}.

1.4.3.4 Autres fonctions biologiques des récepteur TAM

Tyro3 est exprimé dans les os, plus précisément dans les ostéoclastes, lui suggérant un rôle dans la résorption osseuse¹⁸⁰. De plus, les souris triple KO pour les TAM présentent des problèmes de fertilité. Tous les mâles sont infertiles due à la dégénérescence des cellules germinale dans les testicules et les femelles sont parfois aussi infertiles¹⁷⁰.

1.4.4 Les récepteurs de la famille TAM et la migration cellulaire

Dans des conditions non-pathologiques, les récepteurs TAM sont associé à la migration des cellules dans le système nerveux en développement. Une série d'articles qui étudie la migration de neurones sécrétant de la gonadotrophine au cours du développement s'est penchée sur la question. En utilisant les cellules NLT comme modèle de cellules neuronales qui migrent et les cellules GT1-7 comme modèle de cellules post-migration. Tout d'abord, il a été démontré que le gène d'Axl est amplement transcrit et la protéine Axl fortement exprimée dans les cellules NLT qui migrent. À l'opposé, le gène d'Axl est non transcrit et la protéine non détectable dans des cellules neuronales post-migration^{1, 181}. De plus, il a été démontré que l'activation de la GTPase Rac mène à la formation de lamellipodes, suite à la stimulation des cellules NLT avec du Gas6 puisque la transfection des cellules NLT avec un dominant négatif de Rac empêche la formation de lamellipodes en réponse au Gas6¹. Le dernier article de la série introduit les autres membres de la famille TAM dans la migration des cellules

NLT. Les cellules NLT expriment les kinases Axl et Tyro3 alors que les cellules GT1-7 expriment les kinases Tyro3 et Mer. L'utilisation d'ARN interférence a démontré que les récepteurs Axl et Tyro3 participent tous deux à la survie et la migration des cellules NLT³.

1.4.5 Les récepteurs de la famille TAM et le cancer

Les récepteurs de la famille TAM sont fréquemment associés au cancer. Le tableau II présente tous les types de cancer humains associés à une surexpression des récepteurs TAM ou à une expression ectopique de ceux-ci.

Les récepteurs TAM sont reconnus comme étant des cibles thérapeutiques intéressantes pour le développement de nouveaux médicaments pour le traitement du cancer^{4, 182-185}. Les deux stratégies reconnues pour développer des composés anti-cancer ciblant des kinases et qui sont approuvés pour des essais cliniques sont les anticorps monoclonaux dirigés contre la portion extracellulaire des RTKs et les inhibiteurs pharmacologiques agissant au niveau des domaines kinases intracellulaires. Les anticorps sont beaucoup plus spécifiques que les inhibiteurs pharmacologiques du à la forte homologie entre les différents domaines kinases. L'utilisation d'anticorps dirigés contre la portion extracellulaire du récepteur Axl a été testée *in vitro*. Ils permettent de diminuer le potentiel invasif de lignées cellulaires du cancer du sein hautement invasives. L'inhibiteur pharmacologique nommé SKI-606 est présentement dans la seconde phase clinique pour traiter différents types de cancer incluant le cancer du sein. Cette molécule est efficace pour inhiber Axl, mais aussi Src, FAK et MAPK4K4^{182, 186-190}.

Tableau 2 : Expression des récepteurs de la famille TAM dans les cancers humains

Surexpression (+) ou expression ectopique (Ect) des récepteurs TAM.

Tableau inspiré de la revue publiée par Linger *et al*.⁴

Type de cancer	Récepteur TAM			Commentaires
	Tyro3	Axl	Mer	
Leucémie myéloïde ^{164, 191-194}	+	+		La surexpression d'Axl est inversement proportionnelle avec le pronostic.
Leucémie lymphoïde ^{141, 195, 196}				Ect
Leucémie érythroïde ¹⁹¹		+		
Leucémie mégakaryocytaire ¹⁹¹		+		
Lymphome des cellules de mantele ¹⁹⁷			+	
Myélome multiple ¹⁹⁸	+			
Cancer de l'endomètre utérin ¹⁹⁹		+		
Cancer de l'estomac ^{200, 201}		+	+	La coexpression d'Axl et Mer est inversement proportionnelle avec le pronostic.
Cancer du colon ²⁰²		+		
Cancer de la prostate ²⁰³⁻²⁰⁶		+	+	
Cancer de la thyroïde ²⁰⁷⁻²⁰⁹		+		
Cancer du poumon ^{210, 211}		+		La surexpression d'Axl est inversement proportionnelle avec le pronostic et est associée avec le potentiel métastatique.
Cancer du sein ²¹²⁻²¹⁵		+	+	Axl est surexprimé dans 25% des tumeurs primaires de cancer du sein ¹⁸² .
Cancer des ovaires ^{216, 217}		+		
Cancer du foie ²¹⁸		+		
Carcinome des cellules rénales ²¹⁹		+		
Glioblastome ¹⁸³		+		
Adénome de l'hypophyse ²²⁰			+	
Mélanome ²²¹⁻²²³		+	+	
Ostéosarcome ²²⁴		+		
Rhabdomyosarcome ²²⁵			+	

Tyro3 est le membre de la famille qui a été le moins associé aux cancers humains jusqu'à maintenant. Tyro3 peut induire la transformation des cellules NIH 3T3 en permettant leur croissance dans l'agar mou²²⁶. Comme tous les autres membres de la famille TAM, Tyro3 est associé à la leucémie^{192, 198}.

Le récepteur Mer a été découvert, pour la première fois, en association avec le cancer, chez le poulet, sous la forme d'un proto-oncogène, c-eyk, dérivé du rétrovirus aviaire RPL30¹⁴². Le potentiel de transformation et les effets anti-apoptotiques de la portion intracellulaire de Mer ont été démontrés expérimentalement^{143, 227}.

Axl a été découvert lors de l'identification de gènes associés à la progression de la leucémie¹⁹³. Axl peut induire la transformation cellulaire. Cette transformation, en opposition à son rôle de molécule d'adhésion, nécessite l'activité kinase du récepteur. Une protéine de fusion contenant uniquement la portion intracellulaire d'Axl présente toujours le potentiel de transformation des cellules et est suffisant pour induire la formation de tumeurs *in vivo*²²⁸.

L'expression d'Axl est aussi associée à l'angiogénèse. Gas6 induit la migration chimiotactique, via Axl, des cellules musculaires lisses vasculaires²²⁹. Axl régule aussi la migration haptotactique des cellules endothéliales vers une matrice de vitronectine¹⁸⁵. Chez la souris, Axl est nécessaire pour l'angiogénèse *in vivo*. Dans la même étude, les auteurs démontrent qu'Axl est nécessaire pour la formation de tumeurs par des cellules du cancer du sein humain, les MDA-MB-231, chez les souris dépourvues de défenses immunitaires. Cette dualité dans les rôles (cancérogénèse et angiogénèse) joués par le récepteur Axl porte les auteurs à souligner l'intérêt à cibler Axl pour développer de nouveaux traitements contre le cancer qui auront à la fois un effet sur la cancérogénèse et sur la contribution du stroma au développement de la maladie¹⁸⁵.

L'expression d'Axl est fortement associée à la prolifération et au potentiel invasif des tumeurs. De plus, cette participation semble être commune à plusieurs types de cancer. La figure 14, tirée d'une publication de Shieh *et al*²¹⁰, démontre bien cette affirmation, puisqu'on y observe une corrélation entre le niveau

d'expression d'Axl et le potentiel invasif de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses.

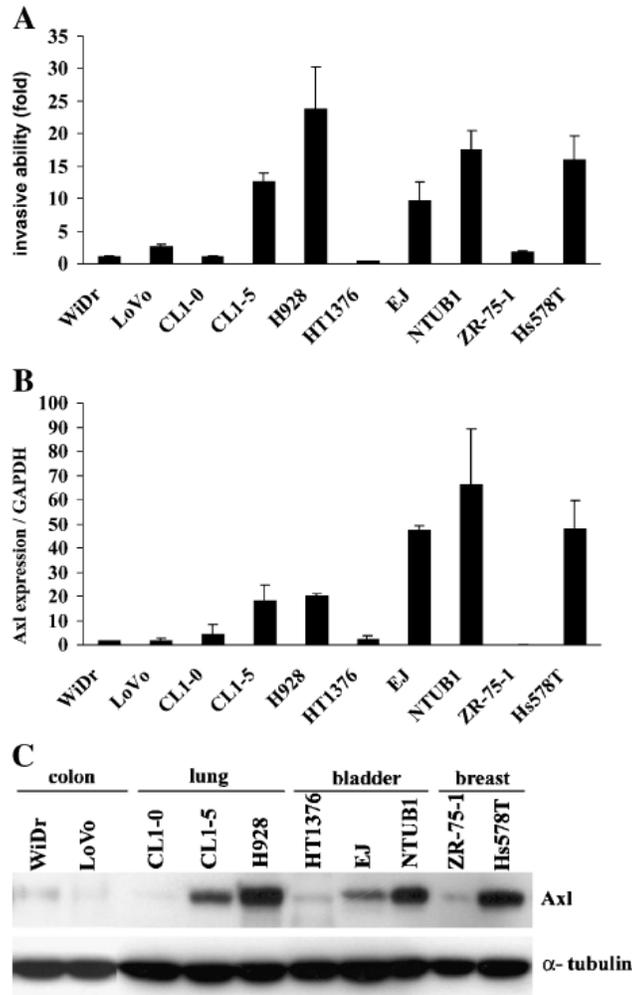


Figure 14 : Corrélation entre l'expression de la protéine Axl et le potentiel invasif de lignées cellulaires provenant de différents types de cancer

Résultats issue de l'article scientifique publié par Shieh *et al*²¹⁰.

La diminution de l'expression d'Axl chez les lignées cellulaires de cancer du sein diminue considérablement le potentiel invasif de ces cellules *in vitro* dans des essais d'invasion en trois dimensions¹⁸².

La participation d'Axl aux processus de migration dans plusieurs lignées cellulaires de cancer du cerveau a été clairement démontrée. L'inhibition d'Axl, en utilisant des dominants négatifs, supprime la prolifération et le potentiel invasif des tumeurs en plus de prolonger la survie des animaux dans un modèle de xénogreffe¹⁸³.

Une récente étude démontre une relation étroite entre le potentiel invasif du cancer du pancréas, la présence de métastases et l'expression d'Axl¹⁸⁴.

Dans une étude sur le cancer du poumon, Axl semble fortement associé avec le potentiel invasif des tumeurs et la progression du cancer. L'ablation de l'expression d'Axl diminue le potentiel invasif des cellules cancéreuses alors que l'expression d'Axl dans des lignées faiblement invasive augmente considérablement leur potentiel invasif²¹⁰.

Jusqu'à maintenant, les mécanismes qui supportent la participation du récepteur kinase à tyrosine Axl au potentiel invasif des tumeurs sont l'activation de la GTPase Rac et l'activation des MMPs. Les études démontrant l'activation de la GTPase Rac par Axl lors de l'expression non pathologique du récepteur ont été présentées dans la section précédente (1.4.4 Les récepteurs de la famille TAM et la migration cellulaire). L'abolition de l'expression d'Axl dans des cellules du cancer du pancréas diminue la production de MMP et la présence de Rac et de Rho chargé d'un GTP¹⁸⁴. Une étude suggère qu'Axl favorise l'invasion en induisant la production de MMP par les cellules via l'activation de la voie de signalisation NFκB²³⁰.

2 Hypothèse de recherche

Au début de cette étude, peu de régulateurs en amont de la voie de signalisation Elmo/Dock810/Rac étaient connus. Nous avons posé l'hypothèse que le rôle biologique principal des protéines de la famille Elmo serait l'intégration de signaux extracellulaires menant à la signalisation par Dock180/Rac. La transduction de signaux en provenance de l'extérieur d'une cellule implique souvent une cascade d'événements de phosphorylation. Puisque des études ont démontré que la phosphorylation d'Elmo est possiblement impliquée dans la signalisation par Elmo/Dock180/Rac^{104, 105}, nous avons cherché à contribuer à l'avancement des connaissances en ce qui concerne la phosphorylation des protéines de la famille Elmo.

2.1 Approche expérimentale

Pour identifier de nouvelles kinases ayant le potentiel de phosphoryler les protéines de la famille Elmo, nous avons balayé le kinome humain par essai de phosphorylation *in vitro*. Nous avons identifié 7 kinases avec le potentiel de phosphoryler la protéine Elmo1 *in vitro*. Nous avons choisi d'approfondir la relation entre les récepteurs de la famille TAM et les protéines de la famille Elmo.

2.2 Pourquoi étudier la relation TAM/Elmo?

La famille des récepteurs TAM et la famille des protéines Elmo partagent plusieurs fonctions biologiques. Elles sont toutes les deux impliquées dans la migration cellulaire et la phagocytose des cellules apoptotiques. D'un point de vue pathologique, elles sont étroitement liées aux processus de migration/invasion chez les cellules tumorales. Les protéines de la famille Elmo participent à la signalisation en amont de la GTPase Rac. Les récepteurs TAM induisent l'activation de Rac, mais les processus biochimiques reliant les kinases et la GTPase sont encore méconnus. Nous croyons que l'étude de la relation TAM/Elmo puisse caractériser davantage les processus d'activation de Rac en aval des récepteurs TAM.

3 Résultats

3.1 Les kinases TAM phosphorylent les protéines de la famille Elmo

Un balayage pour identifier des kinases pouvant phosphoryler Elmo1

Afin de découvrir de nouvelles kinases pouvant phosphoryler les protéines de la famille Elmo, une collaboration avec l'équipe de Dr. Robert Screaton a été établie. Cette équipe a développé un balayage par essai de phosphorylation *in vitro* pour déterminer rapidement quelles kinases sont susceptibles de phosphoryler une protéine donnée²³¹. Ce balayage a été effectué à deux reprises. Une première fois avec Elmo1 sans tag comme substrat pour les kinases et une seconde fois avec GST-Elmo1 comme substrat. Ce balayage a permis d'identifier 7 kinases ayant le potentiel de phosphoryler Elmo1 *in vitro* (Tableau 3). Certains des rôles biologiques connus pour les 7 kinases sont présentés brièvement au tableau 4. Dans le but de valider les résultats des deux balayages, nous avons travaillé avec certaines de ces kinases dans notre laboratoire (Tableau 3). La phosphorylation d'Elmo1 s'est révélée négative pour deux des kinases (DCAMKL1 et PFTAIRE1) et positive pour le récepteur kinase à tyrosine Tyro3.

L'identification de la kinase DCAMKL1 dans le balayage s'est révélée être un faux positif, puisque cette kinase a un poids moléculaire semblable à Elmo1. Donc, le signal détecté par autoradiographie n'était que l'autophosphorylation de la kinase. Concernant la validation de PFTAIRE1, l'utilisation d'un clone Flag-PFTAIRE1 n'a pas permis d'observer de phosphorylation sur la protéine Elmo1 en essai de phosphorylation *in vitro* (données non présentées). Il est possible que le tag GST, présent dans le balayage, favorise la dimérisation et l'activation de la kinase dans les cellules HEK 293T. De plus, PFTAIRE1 fait partie de la famille des kinases dépendantes des cyclines (CDKs). Les CDKs doivent être activées par leurs cyclines pour être complètement actives comme kinases. Cependant, le

potentiel de phosphorylation de PFTAIRE, envers Elmo1, lorsque coexprimé avec sa cycline activatrice, CCND3, n'a pas été évalué.

Le potentiel de phosphorylation de la kinase Tyro3 pour le substrat Elmo1 a été validé à plusieurs reprises. Le domaine kinase de Tyro3 et le récepteur Tyro3 complet phosphorylent Elmo1 avec ou sans tag GST (Figure 15, Figure 16, Figure 17, Figure 18, Figure 19 et Tableau 5).

Tableau 3 : Résultats du balayage : présentation des kinases capables de phosphoryler Elmo1

Présentation des kinases humaines positives pour la phosphorylation d'Elmo1 de souris. Les noms utilisés pour identifier ces kinases dans la littérature ainsi que le code de référence Pubmed sont présentés. Le type de kinase est défini selon le type d'acide aminé auquel la kinase ajoute un groupement phosphate (Tyrosine (Y) ou Sérine/Thréonine (S/T)) et selon que la protéine soit ou non un récepteur. La validation du balayage effectuée à l'IRCM est aussi présentée.

Kinases identifiées	Autres noms attribués	Références Pubmed	Types de Kinase	Validation IRCM
BLK (B-Lymphocyte Kinase)	p55-BLK	NP_001706.2	Kinase à Y Non-récepteur	Non-testée
CAMKK2 (CaM-kinase kinase 2)	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase, CaMKK beta et KKCC2	NP_705719.2	Kinase à S/T Non-récepteur	Non-testée
DCAMKL1	DCDC3A, DCLK1, DCAK1, CAM kinase-like 1 et KIAA0369	NP_004725.1	Kinase à S/T Non-récepteur	Négatif
PFTAIRE1 (PFTAIRE protein kinase 1)	KIAA0834, PFT1 et PFTK1	NP_036527.1	Kinase à S/T Non-récepteur	Négatif
PRP4 (pre-mRNA processing factor 4)	CBP143, KIAA0536, Pre-mRNA protein kinase, PRP4B, PRP4H, PRP4K, PRP4M, et PRPF4B	NP_003904.3	Kinase à S/T Non-récepteur	Non-testée
TTBK2 (Tau-tubulin kinase 2)		NP_775771.3	Kinase à S/T Non-récepteur	Non-testée
Tyro3 (Tyrosine kinase gene 3)	Voir Tableau 1	NP_006284.2	Récepteur kinase à Y	Positif

Tableau 4 : Rôles biologiques connus des différentes kinases associées à la phosphorylation d'Elmo1 dans le balayage du kinome

Kinases identifiées	Rôles biologiques connus
BLK	Membre de la famille des kinases Src régulant la signalisation dans les lymphocytes B ²³² .
CAMKK2	Active les kinases CaMK1/CaMK4 ²³³ . Contrôle de la macroautophagie ²³⁴ .
DCAMKL1	Kinase reconnue pour son association aux microtubules. Elle est impliquée dans la régulation de la migration des neurones ²³⁵ .
PFTAIRE1	Membre de la famille des CDKs, impliquée dans la régulation du cycle cellulaire ²³⁶ . Associée aux processus d'invasion des carcinomes ²³⁷ .
PRP4	Impliquée dans l'épissage de l'ARNm ²³⁸ .
TTBK2	Phosphoryle Tau dans les neurones ^{239, 240}
Tyro3	Voir la section Introduction (1.4 Les récepteurs de la famille TAM).

Pour plusieurs raisons présentées précédemment, étudier la relation entre les récepteurs de la famille TAM et les protéines de la famille Elmo a semblé très intéressant (2 Hypothèse de recherche). Le reste de cette étude se concentre sur la relation entre les membres de la famille Elmo et les récepteurs de la famille TAM.

3.1.1 Les kinases TAM phosphorylent Elmo in vitro

3.1.1.1 Tyro3, Axl et Mer phosphorylent Elmo1 in vitro

Dans un premier temps, puisqu'un seul membre de la famille TAM était inclus dans la banque d'ADNc utilisée pour le balayage, le potentiel de phosphorylation d'Elmo1 *in vitro* par tous les membres de la famille TAM a été déterminé. Pour ce faire, les kinases TAM ont été purifiées par immunoprécipitation (IP) ou par précipitation d'affinité pour la glutathionne. Les kinases purifiées ont été utilisées pour phosphoryler *in vitro* la protéine Elmo1. Comme contrôle, des récepteurs TAM pour lesquels l'activité kinase a été abolie, KD (Kinase-Dead) ont été utilisés. Les résultats de cet essai de phosphorylation *in vitro* sont présentés à la Figure 15.

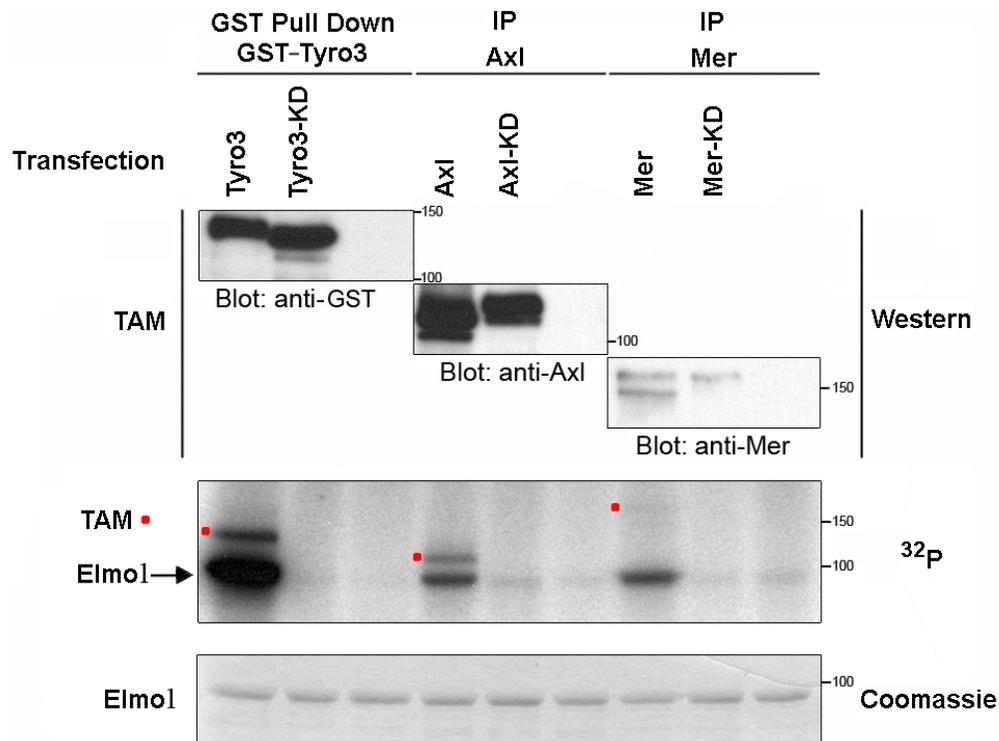


Figure 15 : Phosphorylation d'Elmo1 par les récepteurs TAM *in vitro*

Des cellules HEK 293T ont été transfectées avec les ADNc codant pour GST-Tyro3 humain, Axl de souris et Mer de souris. La purification des récepteurs TAM a été effectuée par précipitation d'affinité à la glutathionne (GST Pull Down) pour la kinase Tyro3 et par immunoprécipitation (IP) avec les anticorps anti-Axl (C-20) et anti-Mer de souris. Ces récepteurs TAM ont été utilisés pour phosphoryler 5ug de GST-Elmo1 de souris *in vitro*. La protéine GST-Elmo1 utilisée a été purifiée avec l'AKTprime. La présence des récepteurs TAM a été vérifiée par immunobuvardage (Western) avec les anticorps anti-GST pour Tyro3, anti-Axl (C-20) et anti-Mer de souris. La phosphorylation d'Elmo1 et l'autophosphorylation des TAM a été détectée par autoradiographie (^{32}P). La proportion d'Elmo1 dans chaque essai de phosphorylation a été contrôlée par coloration du gel de protéines au Coomassie. N>3

Les kinases de souche sauvage Tyro3, Axl et Mer phosphorylent la protéine Elmo1. Le transfert du groupement phosphate sur Elmo1 par les trois kinases TAM est détecté par autoradiographie (^{32}P , Figure 15). L'addition de phosphate radioactif sur la protéine Elmo1, dans les essais de phosphorylation *in vitro*, se produit lorsque l'essai de phosphorylation est effectué en présence des récepteurs TAM de souche sauvage et non lorsque l'essai de phosphorylation est effectué en présence de TAM pour lesquels l'activité kinase a été abolie (KD). La présence des récepteurs TAM a été vérifiée par immunobuvardage. Tous les récepteurs TAM de souche sauvage ainsi que les récepteurs sans activité kinase sont présents dans les essais de phosphorylation *in vitro* (Western, Figure 15).

À titre de contrôle additionnel, des essais de phosphorylation ont été effectués où le lysat cellulaire utilisé pour faire la précipitation d'affinité ou les IPs provenaient de cellules HEK 293T non-transfectées. Ces contrôles ont permis de confirmer que la phosphorylation d'Elmo1 observée par autoradiographie est bien due à la présence des kinases TAM et non à la présence d'une autre kinase endogène précipitée de façon non spécifique à partir des lysats cellulaires. On observe un faible signal par autoradiographie dans les essais de phosphorylation *in vitro* contrôles (TAM sans activité kinase et cellules HEK 293T non transfectées). Ce faible signal peut être causé par une ou plusieurs kinases contaminantes dans les précipitations d'affinité et les IPs. On observe aussi, par autoradiographie, l'autophosphorylation des récepteurs TAM de souche sauvage (points rouges, Figure 15). La proportion d'Elmo1 dans chaque essai de phosphorylation a été contrôlée par coloration du gel de protéines au Coomassie. La quantité d'Elmo1 dans chaque essai de phosphorylation est constante (Coomassie, Figure 15).

Ce phénomène a aussi été observé lors d'essai de phosphorylation *in vitro* avec la kinase Tyro3 sans tag GST. Tyro3 sans tag GST purifié par IP phosphoryle aussi Elmo1 par essai de phosphorylation *in vitro*. Cependant, l'IP contrôle effectuée avec l'anticorps anti-Tyro3 (C-20) à partir d'un lysat cellulaire non transfecté phosphoryle aussi Elmo1 de façon moins intense (données non présentées). Les cellules HEK 293T n'expriment pas Tyro3. Le signal obtenu en autoradiographie s'explique probablement par le fait que les IPs anti-Tyro3 effectuées sont contaminées par d'autres kinases. L'anticorps anti-Tyro3 (C-20) est dirigé contre la portion intracellulaire du récepteur qui contient le domaine kinase. Les domaines kinase sont bien conservés entre les différentes familles de kinases, il est donc fort possible que cet anticorps reconnaisse de façon non spécifique une ou plusieurs kinases endogènes dans les lysats cellulaires. La kinase Mer étant exprimée de façon endogène par les cellules HEK 293T (Figure 21) est peut-être responsable de ce signal non spécifique à Tyro3. La kinase Mer transfectée dans les cellules HEK 293T à la figure 15 est la kinase de souris. L'anticorps anti-Mer de souris ne reconnaît pas la forme humaine de Mer, c'est

pourquoi la kinase Mer humaine endogène n'est pas précipitée en IP Mer sur les lysats cellulaires non transfectés.

3.1.1.2 Les kinases TAM phosphorylent Elmo1, Elmo2 et Elmo3 *in vitro*

Afin de confirmer que la phosphorylation d'Elmo par les récepteurs TAM est bien due à l'activité kinase des récepteurs TAM et non à celle d'une autre protéine associée qui pourrait être coprécipitée par précipitation d'affinité ou IP, les domaines kinase purifiés de Tyro3, Axl et Mer disponibles commercialement ont été utilisés en essai de phosphorylation *in vitro* (Figure 16). Les substrats Elmo1, Elmo2 et Elmo3 ont été utilisés afin de déterminer si les kinases TAM ont le potentiel de phosphoryler tous les membres de la famille Elmo.

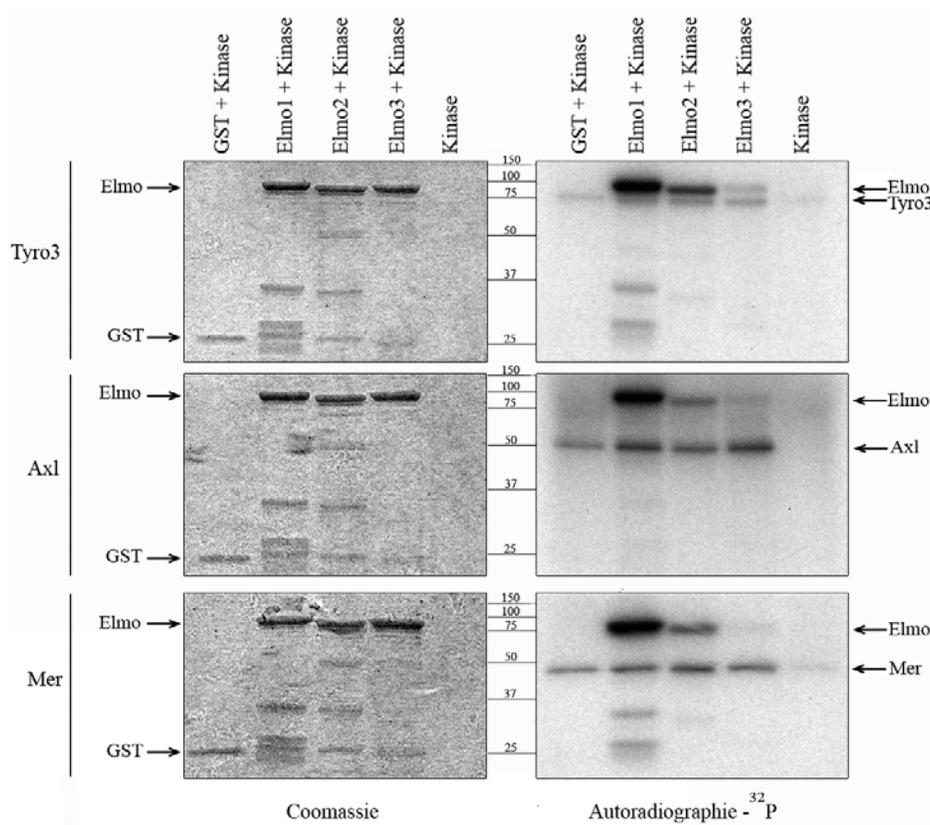


Figure 16 : Phosphorylation d'Elmo1, Elmo2 et Elmo3 par les kinases TAM purifiées
 Essai de phosphorylation *in vitro* où 2ug des protéines GST-Elmo1, GST-Elmo2, GST-Elmo3 et GST purifiées par purification d'affinité à la glutathionne sont phosphorylées par les domaines kinases de Tyro3, Axl et Mer humains (0.05ug) provenant de la compagnie Signal Chem. La présence des protéines purifiées par purification d'affinité à la glutathionne est détectée par coloration au Coomassie et la phosphorylation des protéines est détectée par autoradiographie (^{32}P). N=1

Dans la figure 16 (colonne de gauche), la présence des protéines purifiées par purification d'affinité à la glutathionne est détectée par coloration au Coomassie. On observe que les quantités d'Elmo1, d'Elmo2 et d'Elmo3 utilisées sont similaires. La quantité de GST est cependant inférieure à celle des protéines de la famille Elmo. Les domaines kinases des récepteurs TAM ne sont pas observables par coloration au coomassie due à leur faible quantité (0.05ug). On observe aussi pour Elmo1, Elmo2 et Elmo3 des produits de dégradation des protéines apparaissant à des poids moléculaires inférieurs à la bande majeure.

La Figure 16 (colonne de droite) présente aussi la phosphorylation des protéines par autoradiographie. On y observe la phosphorylation des protéines Elmo par les domaines kinase des récepteurs TAM. Les kinases TAM phosphorylent davantage Elmo1 qu'Elmo2. La phosphorylation d'Elmo3 est, quant à elle, très faible (Figure 16, autoradiographie, flèches Elmo). Par autoradiographie, on observe aussi l'autophosphorylation des domaines kinases. L'autophosphorylation des domaines kinase se produit davantage en absence de protéines purifiées par affinité à la glutathionne que cette protéine soit substrat de la kinase ou non. La présence des protéines Elmo et de la protéine GST favorise l'autophosphorylation des domaines kinase des récepteurs TAM (Figure 16, flèches Tyro3, Axl et Mer). Les domaines kinases des récepteurs TAM ne phosphorylent pas la protéine GST, puisqu'aucun signal n'est détecté au poids moléculaire de la protéine. Ce contrôle indique que la phosphorylation observée sur les protéines de fusion GST-Elmo se produit bien sur les protéines Elmo elles-mêmes et non sur le tag GST.

3.1.2 La surexpression des kinases TAM induit la phosphorylation des protéines de la famille Elmo dans les cellules HEK 293T

Dans le but de poursuivre l'étude sur la relation TAM-Elmo dans un contexte cellulaire, le potentiel de phosphorylation des protéines de la famille Elmo par les kinases de la famille TAM à l'intérieur des cellules a été vérifié. Par essai de phosphorylation *in vitro*, il est possible qu'une kinase phosphoryle un substrat, mais que, dans un contexte cellulaire, ces deux protéines ne se retrouvent pas

vraiment en contact. Il est donc important de valider que la phosphorylation observée *in vitro* ait aussi lieu à l'intérieur des cellules afin de déterminer si la relation kinase/substrat est valable biologiquement.

3.1.2.1 Tyro3, Axl et Mer phosphorylent Elmo1 dans les cellules HEK 293T

Les trois kinases TAM, leurs versions sans activité kinase et cMyc-Elmo1 ont été surexprimés dans les cellules HEK 293T.

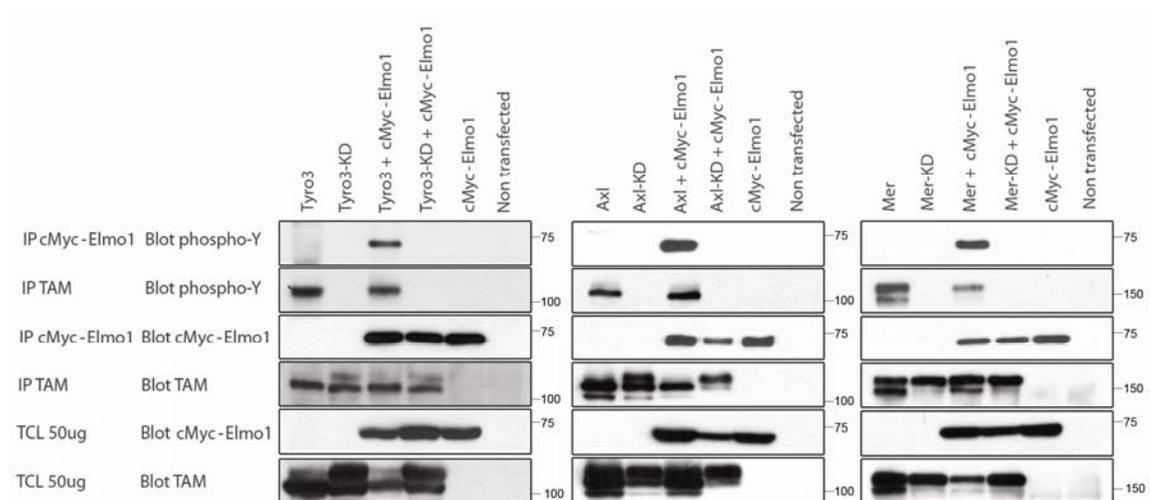


Figure 17 : Les kinases de la famille TAM phosphorylent Elmo1 au sein des cellules HEK 293T

Des cellules HEK 293T ont été transfectées avec les ADNc codant pour les récepteurs TAM sans tag (Tyro3 humain, Axl et souris et Mer de souris) et cMyc-Elmo1 de souris. La protéine Elmo1 est précipitée par IP en utilisant l'anticorps anti-cMyc (9E10). Les récepteurs TAM sont précipités par IP en utilisant les anticorps anti-Tyro3, anti-Axl (C-20) et anti-Mer de souris. Les protéines sont détectées par immunobuvardage en utilisant les anticorps anti-cMyc (9E10), anti-phospho-Y (PY99), anti-Tyro3 (C-20), anti-Axl (C-20) et anti-Mer de souris. N>3

La surexpression des kinases TAM induit l'activation de celles-ci par transphosphorylation. Cette phosphorylation se produit lorsque la kinase possède une activité kinase, puisque les versions des TAM sans activité kinase (KD) ne sont pas phosphorylées comme détecté en immunobuvardage avec une anti-phosphotyrosine (Figure 17, IP TAM Blot p-Y). La coexpression des kinases TAM et de la protéine Elmo1 induit la phosphorylation de tyrosines sur Elmo1. Dans nos contrôles négatifs, la phosphorylation d'Elmo1 n'est pas induite lorsque les récepteurs TAM sans activité kinase sont surexprimés où lorsqu'Elmo1 uniquement est surexprimé dans les cellules HEK 293T (Figure 17, IP cMyc Blot

p-Y). La précipitation des protéines TAM et Elmo1, à partir des extraits cellulaires, a été contrôlée en immunobuvardage (Figure 17, IP cMyc Blot cMyc et IP TAM Blot TAM). Les niveaux d'expression des protéines ont aussi été contrôlés par marquage des lysats cellulaires totaux (Figure 17, TCL Blot cMyc et TCL Blot TAM).

À partir de ces résultats, il est permis de conclure que les trois membres de la famille des récepteurs TAM induisent la phosphorylation d'Elmo1 dans un contexte cellulaire.

3.1.2.2 Tyro3 phosphoryle tous les membres de la famille Elmo dans les cellules HEK 293T

Nos résultats de phosphorylation *in vitro* démontrent que toutes les protéines de la famille Elmo peuvent être phosphorylées par les kinases TAM. Par conséquent, la phosphorylation de toutes les protéines de la famille Elmo par les kinases TAM a été évaluée dans les cellules. Ainsi, les protéines Elmo1, Elmo2 et Elmo3 ont été surexprimées avec et sans Tyro3 dans les cellules HEK 293T (Figure 18).

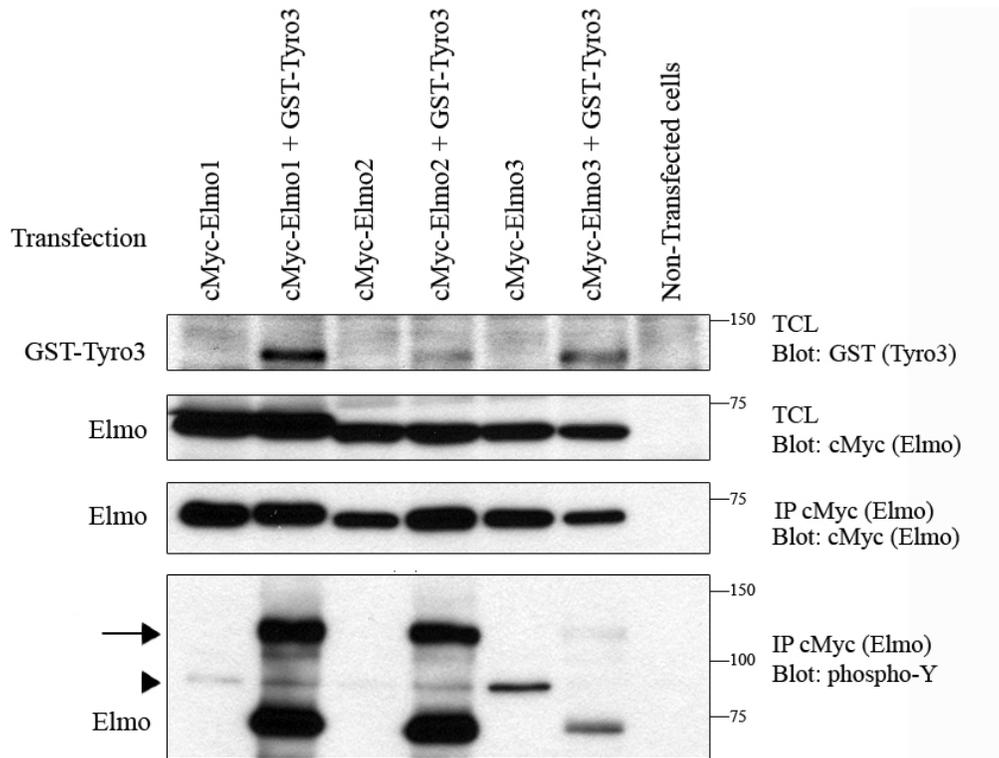


Figure 18 : La surexpression de Tyro3 dans les cellules HEK 293T induit la phosphorylation d'Elmo1, d'Elmo2 et d'Elmo3

Des cellules HEK 293T ont été transfectées avec les ADNc codant pour GST-Tyro3 humain, cMyc-Elmo1 de souris, cMyc-Elmo2 de souris et cMyc-Elmo3 de souris. Les protéines Elmo ont été purifiées par IP en utilisant l'anticorps anti-cMyc (9E10). Les protéines sont détectées par immunobuvardage en utilisant les anticorps anti-cMyc (9E10), anti-phospho-Y (PY99) et anti-GST. N=1

Cette expérience démontre que le récepteur Tyro3 phosphoryle les protéines de la famille Elmo dans les cellules HEK 293T. Comme en essai de phosphorylation *in vitro*, les protéines Elmo1 et Elmo2 sont de bien meilleurs substrats de Tyro3 qu'Elmo3, puisque le signal obtenu en immunobuvardage avec l'anticorps qui reconnaît les tyrosines phosphorylées est beaucoup plus intense (Figure 18, IP cMyc Blot p-Y, Elmo). Toutefois, d'autres protéines phosphorylées sur les tyrosines, qui coprécipitent avec Elmo, sont observables par immunobuvardage. Une protéine phosphorylée de poids moléculaire d'environ 125 kDa est coimmunoprécipitée avec les protéines Elmo (Figure 18, IP cMyc Blot p-Y, flèche). Cette protéine est fortement suspectée d'être GST-Tyro3, puisqu'on la retrouve uniquement lorsque GST-Tyro3 est exprimé. L'étude de l'interaction

Elmo/Tyro3 est présentée ultérieurement dans la section : 3.2 Les récepteurs Axl et Tyro3 se retrouvent en complexe avec Elmo et Dock180. Une autre protéine de poids moléculaire d'environ 90kDa coimmunoprécipite aussi avec les protéines de la famille Elmo (Figure 18, IP cMyc Blot p-Y, tête de flèche). Cette protéine phosphorylée est particulièrement présente en coIP lorsqu'Elmo3 est surexprimé seul (sans Tyro3). L'identité et la fonction de cette protéine demeurent encore à déterminer.

Les proportions d'Elmo précipitées en IP et les niveaux d'expression des protéines dans les lysats cellulaires totaux ont été contrôlés par immunobuvardage (Figure 18, IP cMyc Blot cMyc, TCL Blot GST et Blot cMyc).

3.1.3 Recherche des sites de phosphorylation sur Elmo1 ciblés par les TAM

3.1.3.1 Identification des tyrosines phosphorylées sur Elmo1 par Tyro3

Afin de déterminer quels sont les sites de phosphorylation ciblés par les récepteurs TAM sur Elmo1, une approche par spectrométrie de masse a été choisie. Pour ce faire, des extraits protéiques d'Elmo1 phosphorylés ont été préparés de deux façons.

La première méthode choisie est la phosphorylation d'Elmo1 par essai de phosphorylation *in vitro*. Dans ce cas, la kinase GST-Tyro3 purifiée par précipitation d'affinité pour la glutathionne a été utilisée pour l'essai de phosphorylation *in vitro*. Le choix de la kinase Tyro3 est justifié par le fait que la purification de GST-Tyro3 par précipitation d'affinité à la glutathionne donne le plus fort signal de phosphorylation en essai de phosphorylation *in vitro* (Figure 15). Cet échantillon est nommé l'échantillon *in vitro*.

La seconde méthode choisie pour obtenir la protéine Elmo1 phosphorylée est la surexpression des protéines de fusion GST-Tyro3 et cMyc-mElmo1 dans des cellules HEK 293T. La protéine Elmo1 phosphorylée est alors purifiée par IP avec un anticorps anti-cMyc. Cet échantillon est nommé l'échantillon *in vivo*.

Le service de protéomique de l'IRIC a été utilisé pour analyser le patron de phosphorylation d'Elmo1. Brièvement, les protéines sont digérées à la trypsine et

les peptides phosphorylés sont ensuite purifiés à l'aide d'une colonne de TiO₂ avant d'être analysés par spectrométrie de masse comme décrit précédemment²⁴¹. La technique de spectrométrie de masse utilisée a plusieurs limites. Lorsque les protéines sont digérées avec la trypsine, des peptides sont générés. La taille de ces peptides influence la possibilité de les détecter au spectre de masse. Les peptides trop petits ou trop gros ne pourront pas être détectés. De plus, la combinaison des modifications post traductionnelles peut rendre plus facile ou plus difficile la détection de certains peptides. Par exemple, la phosphorylation d'un peptide diminue le signal obtenu pour ce peptide en spectrométrie de masse. La proportion de peptides phosphorylés influence donc beaucoup les chances de détecter un événement de phosphorylation. C'est pourquoi une concentration des peptides phosphorylés par une colonne de TiO₂ a été effectuée avant l'injection des échantillons dans l'appareil. Les sites de phosphorylation obtenus sur la protéine Elmo1 en spectrométrie de masse sont présentés au Tableau 5.

Tableau 5 : Acides aminés sur Elmo1 phosphorylés directement et indirectement par Tyro3 détectés en spectrométrie de masse (N=1)

Acides aminés phosphorylés détectés en spectrométrie de masse											
<i>In Vitro</i>	Y18			Y216			Y511	Y576	Y588		
<i>In Vivo</i>	Y18	S31	Y48	Y216	Y352	Y395	Y511	Y576	Y588	S594	Y720

Plusieurs sites de phosphorylation sur Elmo1 ont été identifiés. L'analyse des résultats présentés au tableau 5 doit se faire en pleine conscience que certains sites de phosphorylation n'ont peut-être pas été détectés, même s'ils étaient présents sur la protéine Elmo1. L'échantillon *in vivo* présente plus de sites de phosphorylation que l'échantillon *in vitro*. Il est possible que certains des sites identifiés dans l'échantillon *in vivo* soient dus à d'autres kinases que les récepteurs TAM exprimées par les cellules de façon endogène. C'est certainement le cas pour les deux résidus sérines phosphorylés (S31 et S594), puisque les kinases TAM sont des kinases à tyrosine. Les sites de phosphorylation détectés dans l'échantillon *in vitro* peuvent aussi être dus à d'autres kinases que Tyro3 si elles coprécipitent avec Tyro3 à partir du lysat cellulaire des cellules HEK 293T.

3.1.3.2 Identification du principal site de phosphorylation sur Elmo1 ciblé par les kinases TAM

Afin de clarifier la contribution de chaque site de phosphorylation à la phosphorylation totale d'Elmo1, des mutants d'Elmo1 où les tyrosines (Y) ont été remplacées par des phénylalanines (F) ont été générés. L'acide aminé phénylalanine, qui possède un cycle aromatique comme la tyrosine, est un choix classique de remplacement, puisque cette substitution risque d'avoir un faible impact sur la structure de la protéine. Tous les mutants générés sont présentés au tableau 6.

Tableau 6 : Mutants Y/F d'Elmo1 générés par mutagenèse

Mutant d'Elmo1	Tyrosines mutées pour des phénylalanines									
5 YF	18		216			511	576	588		
6 YF	18	48	216			511	576	588		
8 YF	18	48	216	352		511	576	588	720	
10 YF	18	48	216	352	395	511	576	588	720	724
YF 352				352						
YF 720									720	
YF 352/720				352					720	
YF 720/724									720	724
YF 352/724				352						724

Ces mutants Y-F ont été utilisés en essai de phosphorylation *in vitro* afin de déterminer si certains sites de phosphorylation sont plus importants que d'autres sur le plan de la proportion de la phosphorylation totale de la protéine (Figure 19).

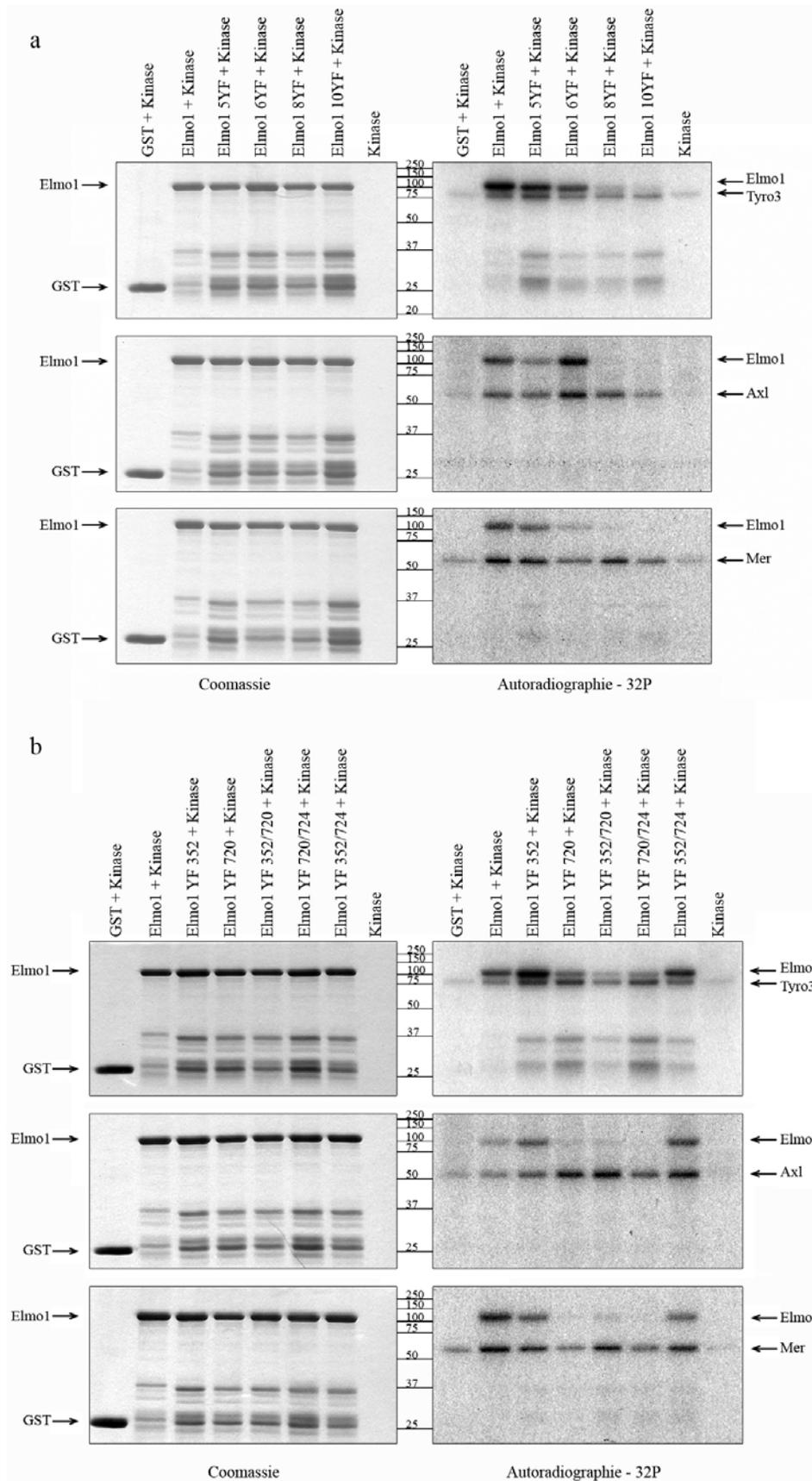


Figure 19 : Phosphorylation des mutants Y-F d'Elmo1 par les domaines kinase de Tyro3, d'Axl et de Mer

Essai de phosphorylation *in vitro* où les domaines kinase purifiés de Tyro3, d'Axl et de Mer (0.025ug) sont utilisés pour phosphoryler des mutants Y-F de la protéine de fusion GST-Elmo1 de souris (3ug) purifiée par précipitation d'affinité à la glutathionne. Voir tableau 6 pour la description des mutants Y-F. La présence des protéines purifiées par purification d'affinité à la glutathionne est détectée par coloration au Coomassie et la phosphorylation des protéines est détectée par autoradiographie (³²P). N=1 (N=2 pour la section (a) avec les kinases Axl et Tyro3)

À la Figure 19 section a, une combinaison grandissante de mutations Y-F a été utilisée afin de découvrir quel(s) site(s) de phosphorylation est(sont) majeur(s). Le mutant 5YF représente la mutation de toutes les tyrosines détectées en spectrométrie de masse pour l'échantillon *in vitro*. Les autres mutants 6YF 8YF et 10YF ont été construits en ajoutant au mutant 5YF d'autres mutations correspondant aux sites de phosphorylation détectés en spectrométrie de masse dans l'échantillon *in vivo*.

Les essais de phosphorylation *in vitro* démontrent que plus il y a de mutations Y-F sur la protéine Elmo1, moins le signal de phosphorylation est intense (Figure 19a, autoradiographie). Il y a seulement avec la kinase Axl que l'on observe une légère incohérence. En effet, le mutant 6YF présente un signal plus intense en autoradiographie que le mutant 5YF. Cependant, lors d'une première expérience semblable à celle-ci, les mutants 5YF et 6YF présentaient des signaux de phosphorylation par autoradiographie similaires (données non présentées). C'est pourquoi cette incohérence n'est pas inquiétante, mais, bien évidemment, cette figure devra être retravaillée. Il est intéressant de noter qu'avec les trois kinases TAM, la plus importante baisse de phosphorylation a lieu entre les mutants 6YF et 8YF. À partir de cette observation, il est raisonnable de croire que les sites mutés (Y352 et Y720) ajoutés sur le mutant 8YF, par rapport au 6YF, sont probablement responsables d'une grande portion de la phosphorylation totale d'Elmo1.

Des mutants Y-F simples et doubles, pour les sites 352 et 720, ont été utilisés afin de mesurer leur impact sur la phosphorylation totale d'Elmo1 (Figure 19b). L'impact d'une mutation Y-F sur la tyrosine 724, voisine de la 720, a aussi été évalué. Par essai de phosphorylation *in vitro*, une baisse importante de la phosphorylation d'Elmo1 dans tous les mutants pour lesquels la tyrosine 720 a été

mutée (YF720, YF352/720 et YF720/724) est observable. Ceci permet de conclure que le site majeur de phosphorylation sur Elmo1 par les trois kinases TAM est la tyrosine 720.

La coloration des protéines au coomassie indique une quantité de protéine relativement constante pour les différents mutants. La présence de produits de dégradation à des poids moléculaires se situant généralement entre 37 et 25 kDa est observable. Les mutants Y-F présentent une plus grande quantité de ses produits de dégradation que la protéine GST-Elmo1 de souche sauvage (Figure 19, Coomassie). Cette observation suggère un impact des mutations Y-F sur la stabilité de la protéine. Les domaines kinase des TAM ne sont pas observables au coomassie dû à leur faible quantité (0.025ug).

Par autoradiographie, il semble que Tyro3 soit la seule kinase de la famille TAM à phosphoryler les produits de dégradation. On observe aussi, par autoradiographie, l'autophosphorylation des domaines kinase. Il est important de ne pas confondre ce signal avec celui de la phosphorylation d'Elmo particulièrement dans le cas du domaine kinase de Tyro3 qui migre juste en dessous des protéines de fusion GST-Elmo1. Les domaines kinases des récepteurs TAM ne phosphorylent pas la protéine GST, puisqu'aucun signal n'est détecté au poids moléculaire de la protéine. Ce contrôle indique que la phosphorylation observée sur les protéines de fusion GST-Elmo se produit bien sur la portion Elmo1.

3.2 Les récepteurs Axl et Tyro3 se retrouvent en complexe avec Elmo et Dock180

3.2.1 Les récepteurs Tyro3 et Axl se retrouvent en complexe avec les protéines Elmo et cette interaction est dépendante de l'activité kinase des récepteurs

Par coimmunoprécipitation, une interaction entre les récepteurs Tyro3 et Axl et les protéines de la famille Elmo a été mise à jour. Toutefois, aucune interaction n'a été détectée entre le récepteur Mer et Elmo dans les mêmes conditions. Le

récepteur Tyro3 et le récepteur Axl coprécipitent avec Elmo1 lorsqu'activés par surexpression dans les cellules HEK 293T (Figure 20a,b). Cette interaction est dépendante de l'activité kinase du récepteur, puisque Elmo1 ne coprécipite pas avec les récepteurs Tyro3 et Axl dont l'activité kinase est abolie, KD (Figure 20a,b). La coprécipitation des complexes Axl/Elmo1 et Tyro3/Elmo1, à partir de lysats cellulaires provenant de cellules où les protéines ont été surexprimées, a été démontrée d'un seul sens dans chaque cas, en précipitant la kinase pour le complexe Axl/Elmo1 et en précipitant Elmo1 pour le complexe Tyro3/Elmo1. Nous croyons qu'en variant les quantités d'ADNc utilisées pour la transfection de cellules, il serait possible de démontrer ce complexe dans les deux sens. Le raffinement des conditions de transfection demeure encore à faire. D'un point de vue endogène, l'interaction Axl/Elmo dans les deux sens chez les lignées cellulaires du cancer du sein Hs578T et MDA-MB-231 a été démontrée (Figure 22).

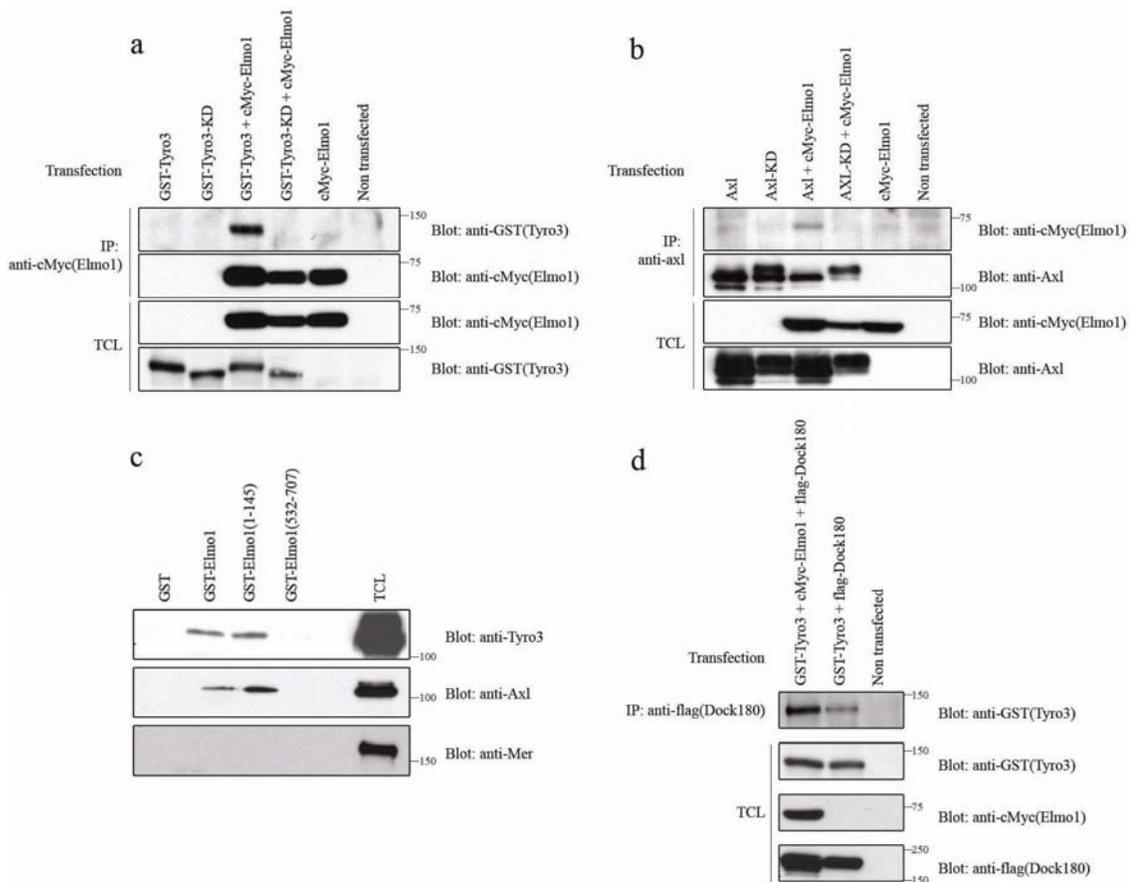


Figure 20 : Axl et Tyro3 se retrouvent en complexe avec Elmo1 et Dock180

(a) L'activité kinase de Tyro3 est nécessaire pour permettre l'interaction Tyro3/Elmo. Des cellules HEK 293T ont été transfectées avec les ADNc codant pour la protéine GST-Tyro3 humain et cMyc-Elmo1 de souris. La protéine cMyc-Elmo1 est précipitée par IP avec l'anticorps anti-cMyc (9E10). Les protéines sont détectées par immunobuvardage en utilisant les anticorps anti-cMyc (9E10) et anti-GST. N=2

(b) L'activité kinase d'Axl est nécessaire pour permettre l'interaction Axl/Elmo. Des cellules HEK 293T ont été transfectées avec les ADNc codant pour le récepteur Axl de souris sans tag et cMyc-Elmo1 de souris. Le récepteur Axl est précipité par IP en utilisant l'anticorps anti-Axl (C-20). Les protéines sont détectées par immunobuvardage en utilisant les anticorps anti-cMyc (9E10) et anti-Axl (C-20). N=1

(c) L'interaction TAM/Elmo est médiée par la portion N-terminale d'Elmo. Des cellules HEK 293T ont été transfectées avec les ADNc codant pour les récepteurs Tyro3 et Axl sans tag (Tyro3 humain, Axl et souris). L'extrait protéique de MER provient de cellules HEK 293T non-transfectées. Les protéines GST-Elmo1 de souris, GST-Elmo1(1-145) de souris et GST-Elmo1(532-707) de souris ont été purifiées par précipitation d'affinité à la glutathionne. Les billes opsonisées avec les protéines de fusion GST-Elmo sont ensuite utilisées pour effectuer une précipitation d'affinité avec les récepteurs TAM. Les protéines sont ensuite séparées par SDS-PAGE et détectées par immunobuvardage avec les anticorps anti-Tyro3 (C20), anti-Axl (C-20) et anti-Mer de souris. N=2

(d) Les protéines Tyro3/Elmo/Dock180 se retrouvent au sein du même complexe. Des cellules HEK 293T ont été transfectées avec les ADNc codant pour Flag-Dock180 humain, GST-Tyro3 humain et cMyc-Elmo1 de souris. La protéine Dock180 est précipitée par IP en utilisant l'anticorps anti-Flag. Les protéines sont détectées par immunobuvardage en utilisant les anticorps anti-GST, anti-cMyc (9E10) et anti-Flag. N=1

3.2.2 Tyro3 et Axl interagissent avec la portion N-terminale d'Elmo1

Afin de déterminer si tous les récepteurs TAM interagissent avec Elmo et quel domaine d'Elmo est responsable de cette interaction, des protéines de fusion GST-Elmo1 attachées à des billes recouvertes de glutathionne ont été utilisées. Ces billes ont été utilisées pour faire des précipitations d'affinité de récepteurs TAM (Figure 20c). Nos résultats démontrent que Tyro3 et Axl forment un complexe avec GST-Elmo1, mais que Mer ne se lie pas à GST-Elmo1 dans les mêmes conditions. La Figure 20c présente une précipitation d'affinité avec un lysat cellulaire de HEK 293T exprimant Mer de façon endogène. Les mêmes résultats ont été obtenus avec un lysat cellulaire de cellules HEK 293T dans lequel le récepteur Mer avait été surexprimé (données non présentées). Fait intéressant, les liaisons Tyro3/Elmo1 et Axl/Elmo1 sont médiées par le domaine N-terminal de la protéine Elmo1 (1-495) alors que le domaine d'Elmo1 responsable de l'interaction avec Dock180 (532-707)⁸ ne lie pas les récepteurs de la famille TAM (Figure 20c). Les lysats cellulaires totaux (TCL) ont été chargés sur gel et servent de contrôles positifs pour l'immunobuvardage anti-TAM dans la Figure 20c.

3.2.3 Tyro3, Elmo1 et Dock180 se retrouvent dans le même complexe protéique

Puisque l'interaction Elmo1/TAM se produit dans un domaine différent d'Elmo1 que l'interaction Elmo1/Dock180, la possibilité de la formation d'un complexe incluant Elmo, Dock180 et un récepteur TAM a été vérifiée. Pour ce faire, Dock180, Elmo1 et Tyro3 ont été surexprimés dans des cellules HEK 293T. Par coimmunoprécipitation, il a été démontré que Tyro3 et Dock180 se retrouvent au sein du même complexe protéique. Lorsque l'on précipite Dock180 avec l'anticorps anti-Flag, la protéine de fusion GST-Tyro3 est aussi précipitée. De plus, lorsque seules les protéines Dock180 et Tyro3 (sans Elmo1) sont surexprimées, la proportion de Tyro3 en complexe avec Dock180 est diminuée (Figure 20d). Les proportions de protéines transfectées et exprimées sont évaluées en immunobuvardage sur les lysats cellulaires totaux (TCL).

3.3 Les protéines Axl et Elmo2 sont associées à des lignées cellulaires du cancer du sein hautement métastatiques

Afin de caractériser les implications fonctionnelles de la relation entre les protéines de la famille Elmo et les récepteurs TAM, des lignées cellulaires cancéreuses surexprimant un ou plusieurs TAM et présentant un fort potentiel de migration ont été choisies. Ce choix est justifié par l'hypothèse de travail selon laquelle la relation TAM/Elmo pourrait favoriser la migration cellulaire. Les lignées cellulaires du cancer du sein Hs578T et MDA-MB-231 se présentent comme d'excellents choix, puisque, selon la littérature, elles expriment le récepteur Axl à un niveau élevé¹⁸². Aussi, selon la classification établie par Neve *et al*, en 2006, les lignées cellulaires Hs578T et MDA-MB-231 présentent des potentiels invasifs parmi les plus importants chez les lignées cellulaires du cancer du sein²⁴². De plus, le récepteur Axl a été démontré comme participant à la croissance tumorale et au potentiel invasif chez ces lignées cellulaires^{182, 185}.

3.3.1 Profils d'expression des récepteurs TAM et des protéines de la famille Elmo dans les lignées cellulaires MDA-MB-231 et Hs578T

Par immunobuvardage, l'expression des récepteurs de la famille TAM dans les lignées cellulaires choisies a été vérifiée (Figure 21a). Pour le marquage anti-Tyro3, les cellules HEK 293T ont été transfectées avec l'ADNc codant pour Tyro3 comme contrôle positif, puisque nous ne disposons pas de lignée cellulaire exprimant de façon endogène ce récepteur. Les résultats obtenus concordent avec la littérature, puisque les lignées cellulaires Hs578T et MDA-MB-231 expriment la kinase Axl. Fait nouveau, la démonstration que les cellules MDA-MB-231 expriment la kinase Mer a aussi été faite. Aucune des lignées cellulaires choisies n'exprime le récepteur Tyro3.

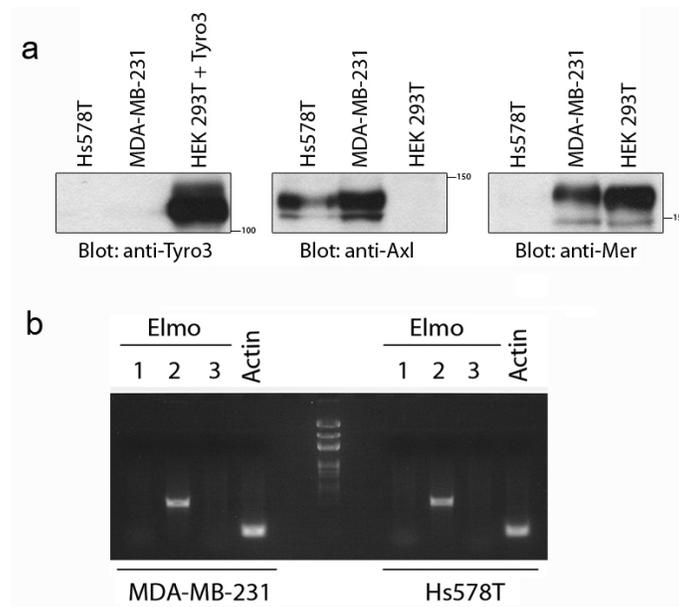


Figure 21 : Expression des récepteurs TAM et des protéines de la famille Elmo dans les lignées cellulaires Hs578T et MDA-MB-231

(a) L'expression des récepteurs TAM a été caractérisée par immunobuvardage de lysats cellulaires en provenance des lignées cellulaires Hs578T, MDA-MB-231 et HEK 293T. 50ug de lysats cellulaires sont séparés par SDS-PAGE. Les récepteurs TAM sont détectés par immunobuvardage avec les anticorps anti-Tyro3 humain, anti-Axl (C-20) et anti-Mer humain (Y323).

(b) Les cellules MDA-MB-231 et Hs578T expriment seulement Elmo2 parmi les protéines de la famille Elmo. Migration sur gel d'agarose des produits de RT-PCR sur l'ARN total extrait des lignées cellulaires MDA-MB-231 et Hs578T. Une paire d'amorces pour amplifier l'ARN codant pour l'actine a été utilisée comme contrôle positif.

Les profils d'expression des membres de la famille Elmo dans les lignées cellulaires MDA-MB-231 et Hs578T ont été explorés. Vu l'absence d'anticorps spécifiques pour chaque membre de la famille, il n'est pas possible de déterminer le profil d'expression des protéines de la famille Elmo par immunobuvardage. La technique de RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction) a donc été privilégiée pour y arriver. Brièvement, l'ARN total des cellules a été amplifié avec des amorces aléatoires afin de produire un extrait d'ADN complémentaire (ADNc). Cet ADNc a été amplifié par PCR avec des amorces spécifiques pour les gènes Elmo1, Elmo2 et Elmo3 humains. Les produits de PCR ont été séparés sur gel d'agarose (Figure 21b).

Les cellules Hs578T et MDA-MB-231 semblent exprimer uniquement Elmo2 parmi les membres de la famille Elmo. Le contrôle positif pour confirmer l'efficacité de la réaction de RT-PCR avec des amorces spécifiques pour amplifier

l'ADNc codant pour l'actine humaine a été effectué dans les deux lignées cellulaires. Aucun contrôle positif pour les amorces utilisées pour l'amplification de l'ADNc d'Elmo1 et d'Elmo3 n'a été effectué. Cependant, d'autres indices portent à croire que ces deux lignées cellulaires expriment uniquement Elmo2. La sélection de clones shElmo2, que nous avons effectuée par immunobuvardage en utilisant un anticorps anti-Elmo2 qui reconnaît aussi Elmo1 et Elmo3, a permis de sélectionner des clones où la détection des protéines de la famille Elmo par immunobuvardage était nulle. Ceci a été observé pour des clones shElmo2 dans les lignées Hs578T et MDA-MB-231 (Figure 24 et données non présentées).

3.3.2 Les protéines endogènes Axl et Elmo2 se retrouvent au sein du même complexe dans les lignées cellulaires MDA-MB-231 et Hs578T

Puisque les deux lignées cellulaires choisies expriment Axl et Elmo2, la présence de l'interaction TAM/Elmo caractérisée biochimiquement, essentiellement par des techniques de surexpression, a été confirmée au niveau des protéines endogènes. Afin de déterminer si le complexe TAM/Elmo est aussi présent lorsque les protéines sont exprimées de façon endogène, des expériences de coimmunoprécipitation ont été effectuées (Figure 22).

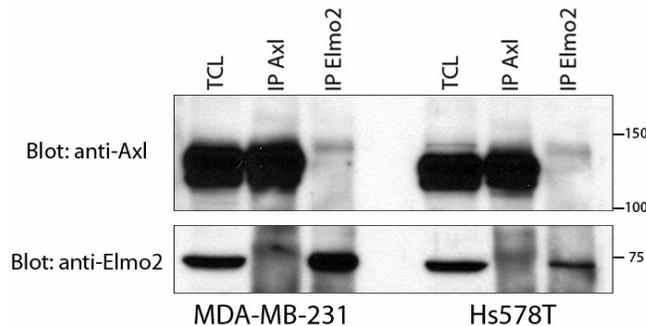


Figure 22 : Le récepteur Axl et la protéine Elmo2 se retrouvent au sein du même complexe dans les lignées cellulaires Hs578T et MDA-MB-231

Coimmunoprécipitation du complexe Axl/Elmo2 dans les cellules Hs578T et MDA-MB-231. Les immunoprécipitations ont été effectuées avec l'anticorps anti-Axl (C-20) et l'anticorps anti-Elmo2. Les extraits protéiques des lysats cellulaires totaux (TCL) et les protéines purifiées par IP ont été marqués par immunobuvardage avec l'anticorps anti-Axl (C-20) et l'anticorps anti-Elmo2. Les cellules étaient maintenues dans du milieu de culture contenant du FBS et n'ont pas été stimulées avant la lyse. N=2

Les protéines endogènes Axl et Elmo2 se retrouvent au sein du même complexe protéique au niveau endogène (Figure 22). La coimmunoprécipitation

de ces deux protéines est observée, que l'anticorps utilisé pour faire l'IP soit dirigé contre Elmo2 ou Axl. Cependant, le signal en immunobuvardage est faible, ce qui peut être expliqué par un faible niveau d'activation du récepteur Axl. Et ce, parce que l'interaction Axl/Elmo dépend de la stimulation de l'activité kinase du récepteur (Figure 20b). La spécificité des bandes peut être mise en doute, puisque les bandes d'Elmo2 dans les IPs Axl et les bandes d'Axl dans les IPs Elmo sont légèrement plus hautes que celles des lysats cellulaires totaux (Figure 22). Cependant, ces poids moléculaires plus élevés peuvent être dus à la phosphorylation des protéines Elmo2 et Axl. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à démontrer la phosphorylation d'Elmo2 dans les lignées cellulaires MDA-MB-231 et Hs578T par IP anti-Elmo2 suivi d'un marquage par immunobuvardage anti-phosphoY (données non présentées). Également, la stimulation de la formation du complexe avec du Gas6 a été tenté sans résultats.

3.3.3 La stimulation de la lignée cellulaire MDA-MB-231 avec du Gas6 induit l'activation de Rac

Afin d'explorer l'impact fonctionnel de la relation TAM/Elmo/Dock dans l'activation de la GTPase Rac, l'activation de Rac en réponse au ligand Gas6 chez les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 a été vérifiée. Les cellules NLT GnRH ont été choisies comme contrôle positif, puisque l'activation de Rac en réponse au ligand Gas6, dans ces cellules, a été publiée¹.

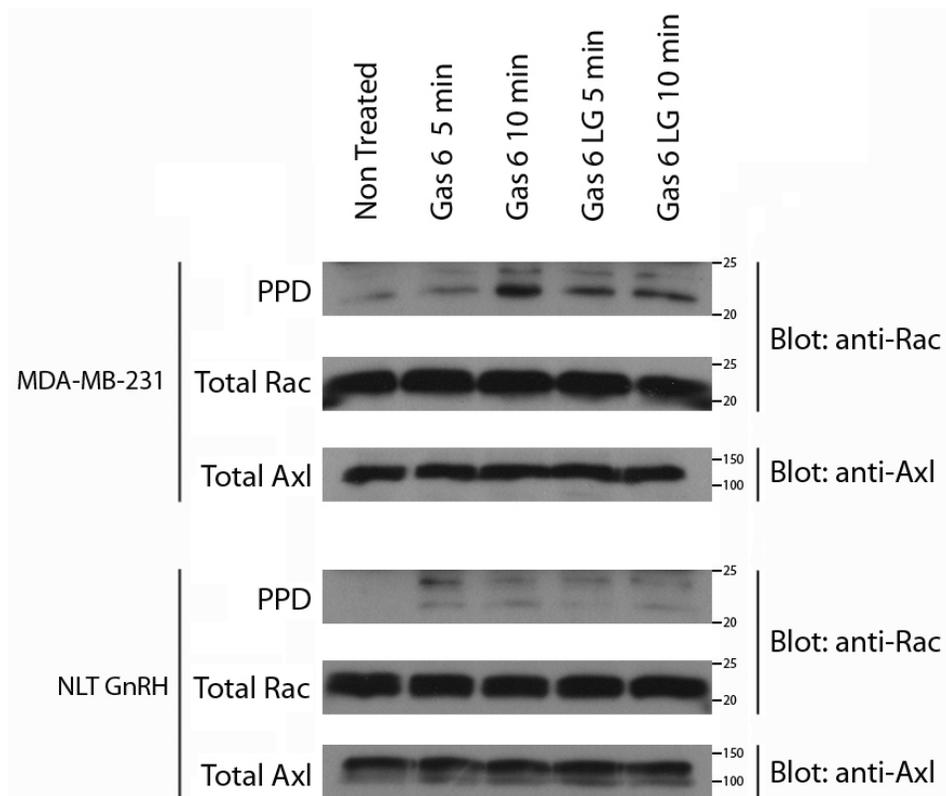


Figure 23 : Activation de Rac par stimulation avec du Gas6 dans les lignées cellulaires MDA-MB-231 et NLT GnRH

Deux différents types de ligand Gas6 ont été utilisés pour stimuler les cellules : du Gas6 pleine longueur (Gas6) et le domaine LG de Gas6 (Gas6 LG). Les cellules ont été stimulées avec 400ng/ml de Gas6 ou de Gas6 LG sur des périodes de 5 et 10 minutes. La portion de Rac activé est extraite par précipitation d'affinité pour la protéine de fusion GST-CRIB (5ug) et marquée par immunobuvardage avec l'anticorps anti-Rac (PPD). Les quantités totales de GTPase Rac (Total Rac) et du récepteur Axl (Total Axl) dans les lysats cellulaires sont marquées par immunobuvardage avec les anticorps anti-Rac et anti-Axl (C-20). N=2

La GTPase Rac est activée chez les deux lignées cellulaires exprimant Axl après stimulation au Gas6. La précipitation du Rac activé de l'extrait cellulaire est effectuée par précipitation d'affinité pour une protéine avec un tag GST. La protéine de fusion GST-CRIB (CRIB étant le domaine de PAK liant Rac) a été utilisée pour son affinité sélective envers la protéine Rac active (PPD, Figure 23). Les cellules NLT GnRH présentent la plus forte activation de Rac après 5 minutes de traitement au Gas6 ce qui reproduit les résultats obtenus par Allen et al¹. Chez les cellules MDA-MB-231, l'activation de Rac à la suite d'une stimulation au Gas6 est plus élevée après 10 minutes qu'après 5 minutes. Deux différents types de ligand Gas6 ont été utilisés pour stimuler les cellules. Le Gas6 pleine longueur n'est pas disponible commercialement et il a été offert gracieusement par Dr

Blostein¹⁵³. Le domaine LG de Gas6 disponible commercialement (R&D Systems, cat# 885-GS-050) a aussi été testé. Dans les deux lignées cellulaires, on observe que le Gas6 pleine longueur permet d'obtenir une activation de la GTPase Rac plus robuste que celle obtenue avec le domaine LG uniquement. Ces données viennent appuyer les études qui démontrent l'importance de la gamma-carboxylation du domaine Gla de ce ligand pour la signalisation par les récepteurs TAM¹⁵²⁻¹⁵⁴. Lors de cet essai, la quantité de lysat cellulaire a été contrôlée par immunobuvardage sur les lysats cellulaires totaux avec des anticorps contre Rac et Axl. Dans les deux cas, la quantité de protéines totale demeure constante.

Cette expérience n'est que préliminaire, puisque le principal objectif demeure de définir le rôle des protéines de la famille Elmo et des GEFs de la famille de Dock180 dans l'activation de Rac induite par les récepteurs TAM. Cependant, cet essai peut être utilisé en combinaison avec des ARNi dirigés contre Elmo2 et/ou Dock180 par exemple. Cet aspect est élaboré davantage dans la section discussion. Il serait intéressant de démontrer si l'activation de Rac est aussi mesurable, par cette technique, en réponse au Gas6 chez la lignée cellulaire Hs578T.

3.3.4 Les lignées stables de MDA-MB-231 shElmo2 présentent un potentiel de migration diminué

Afin de mieux comprendre le rôle d'Elmo2 dans la migration cellulaire chez les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 et Hs578T, le niveau d'expression de la protéine Elmo2 a été réduit par la technique d'ARN interférence. Des lignées stables exprimant différents clones shElmo2 (Origene, cat# TR317410) ont été créées. Deux des quatre plasmides codant pour des shElmo2 se sont avérés efficaces pour diminuer considérablement l'expression du gène chez les cellules Hs578T et MDA-MB-231 (Tableau 7).

Tableau 7 : Présentation des ARNi générés par les plasmides shRNA contre Elmo2 humain et leur validation dans les lignées cellulaires MDA-MB-231 et Hs578T

L'ensemble des plasmides pour générer les ARNi ainsi que les plasmides contrôles sont distribués par la compagnie Origene (cat#TR317410)

Séquence de l'ARNi généré	Identification du tube par Origene	Validation
CCTGGCATCCATTATCAAGGAAGTTTGTG	TI366849	Positif
ATGGTGGACGTGTCAATCCTTCAGAGGTC	TI366850	Négatif
ACAGCAGAGGACTTCAACAAGGTTATGCA	TI366851	Négatif
TGGAATTGGCCTTCTCCATCCTGTATGAC	TI366852	Positif

Dans les cellules Hs578T, la diminution de l'expression d'Elmo2 induit l'arrêt de la prolifération des cellules. Par conséquent, il ne fut pas possible de maintenir les clones positifs, avec des niveaux d'Elmo2 diminués, en culture.

Par contre, dans les cellules MDA-MB-231, il fut possible de maintenir les clones positifs, avec des niveaux d'Elmo2 diminués, en culture. Cependant, au fil des passages, un retour de l'expression de protéine Elmo a été observé par une augmentation de la concentration de protéine Elmo dans les lysats cellulaires détectée en immunobuvardage. Il n'a pas été déterminé si le retour d'expression des protéines est dû à Elmo1, Elmo2 ou Elmo3, puisque l'anticorps utilisé, anti-Elmo2, reconnaît tous les membres de la famille. Il demeure possible que les cellules, pour contourner l'absence d'Elmo2, commencent à exprimer une autre protéine de la famille. Malgré cette difficulté, il fut possible d'utiliser ces clones shElmo2 pour effectuer des essais de migration cellulaire (Figure 24).

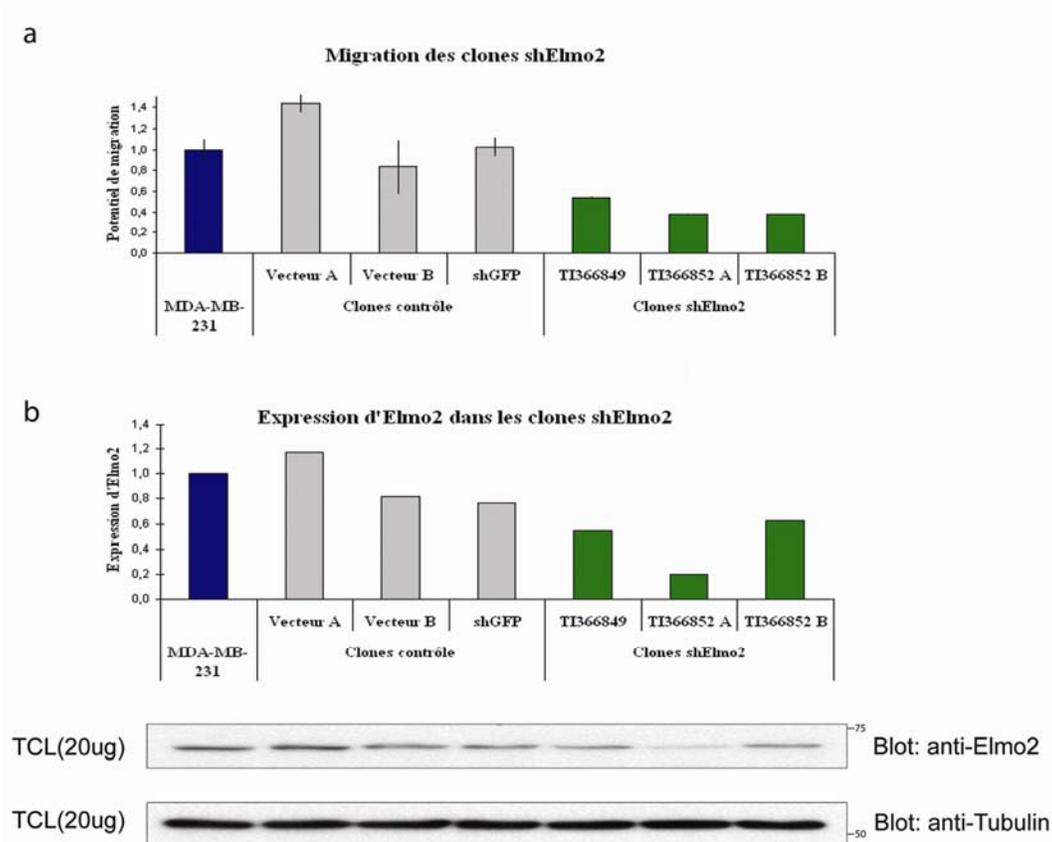


Figure 24 : Elmo2 joue un rôle important dans la migration des cellules MDA-MB-231

Analyses faites à partir de clones shElmo2 dans la lignée cellulaire MDA-MB-231.

(a) Proportion des cellules qui migre à travers les pores de chambres de Boyden attirée par chimiotactisme vers du milieu contenant du FBS 10%.

(b) Niveau d'expression de la protéine Elmo2 mesurée par immunobuvardage de lysats cellulaires totaux (TCL). Le signal en immunobuvardage a été quantifié à l'aide du programme Image J afin de produire un graphique qui se compare aisément au potentiel de migration des clones présenté en a. (N=1)

Une corrélation entre le potentiel de migration des cellules et le niveau d'expression de la protéine Elmo2 a été observée (Figure 24). Les clones shElmo2 (en vert) présentent un niveau d'expression d'Elmo2 diminué et un potentiel de migration diminué par rapport aux clones contrôles transfectés avec le vecteur vide ou avec un plasmide shGFP (en gris) et aux cellules parentales (en bleu) (Figure 24). Il fut également observé qu'un clone contrôle (Vector cloneA) présente une expression d'Elmo2 et un potentiel de migration plus élevé que les cellules parentales. Pour les essais de migration, le dénombrement des cellules ayant migré à travers les pores de la chambre de Boyden est corrigé par la quantification des cellules dans un puits contrôle. Une variation dans les comptes

cellulaires ne peut donc pas influencer nos résultats. De façon similaire, le graphique démontrant le niveau d'expression d'Elmo2 (Figure 24b) est corrigé par le signal obtenu pour la tubuline afin de s'assurer que des variations dans la quantification des protéines ne puissent pas influencer nos résultats.

Cette expérience avec les shRNA fut à la fois décevante et encourageante. Décevante, puisque notre objectif était de développer un outil pour étudier l'impact fonctionnel de la relation AXL/Elmo2 autant au niveau de la phosphorylation que de l'interaction. Le fait que les clones positifs retrouvent une expression d'Elmo avec le temps ne fait pas d'eux de bons outils pour réintroduire par transfection l'expression d'Elmo de souche sauvage, de mutants non phosphorylables (Y-F) ou de mutants ne pouvant pas interagir avec les TAM. Cette expérience fut cependant encourageante, puisque les résultats démontrent l'importance de la protéine Elmo2 dans les processus de signalisation favorisant la migration cellulaire chez la lignée cellulaire MDA-MB-231 du cancer du sein très invasive. Des stratégies alternatives sont proposées dans la section discussion.

4 Discussion et Conclusion

4.1 Discussion

4.1.1 Les kinases TAM phosphorylent les protéines de la famille Elmo

4.1.1.1 Le balayage du kinome

Ce projet a pris naissance par le balayage du kinome pour identifier des kinases ayant le potentiel de phosphoryler Elmo1. Le balayage du kinome est un outil intéressant pour découvrir de nouveaux liens kinase/substrat. Il faut cependant être vigilants et effectuer une bonne validation afin d'éliminer les faux positifs. Parmi les sept kinases obtenues lors du balayage du kinome, 3 kinases ont fait l'objet d'une validation et une seule s'est avérée intéressante et a conduit à la réalisation du présent projet de recherche (Tableau 3). Afin de clarifier davantage la fiabilité de ce balayage, il serait intéressant de valider toutes les kinases du balayage pour lesquelles le potentiel de phosphorylation envers Elmo1 n'a pas été confirmé. De plus, concernant la kinase dépendante des cyclines PFTAIRE1, la coexpression de la kinase avec sa cycline activatrice, CCND3, serait intéressante afin de démontrer si cette kinase a le potentiel de phosphoryler Elmo1, lorsqu'elle est coexprimée avec sa cycline activatrice.

4.1.1.2 Les kinases TAM phosphorylent Elmo1, 2 et 3 *in vivo* et *in vitro*

Il a été démontré que les récepteurs TAM phosphorylent les protéines de la famille Elmo (Figures 15-19, Tableau 3 et 5). Cette phosphorylation a été détectée par essai de phosphorylation *in vitro* en mesurant l'incorporation de phosphate radioactif sur les protéines de la famille Elmo et *in vivo* en mesurant la présence de tyrosines phosphorylées sur les protéines de la famille Elmo reconnues par un anticorps anti-phosphotyrosine. Il est intéressant de noter la corrélation entre les résultats *in vivo* et *in vitro*. Tous les membres de la famille des kinases TAM phosphorylent Elmo1 (*in vitro* Figure 15, *in vivo* Figure 17). De plus, les protéines de la famille Elmo ne sont pas toutes phosphorylées avec la même intensité par

les kinases TAM. Elmo1 semble plus phosphorylé sous l'action des kinases TAM qu'Elmo2. En comparaison avec Elmo1 et Elmo2, Elmo3 ne présente qu'un faible signal de phosphorylation (*in vitro* Figure 16, *in vivo* Figure 18). Cette variation s'explique probablement par le fait qu'Elmo3 ne possède pas le site de phosphorylation majeur ciblé par les kinases TAM.

4.1.1.3 La tyrosine 720 est le site majeur de phosphorylation sur Elmo1 ciblé par les TAM

Le site de phosphorylation majeur induit sur Elmo1 par les domaines kinase de Tyro3, d'Axl et de Mer est la tyrosine 720. L'utilisation de mutants non phosphorylables, pour lesquels certaines tyrosines ont été mutées pour des phénylalanines (Y-F) en essai de phosphorylation *in vitro*, a permis d'en arriver à cette conclusion (Figure 19). De plus, les essais de phosphorylation *in vitro* avec les mutants non phosphorylables (Y-F) d'Elmo1 ont permis de comprendre pourquoi la protéine Elmo3 n'est que faiblement phosphorylée par les TAM (Figure 16 et Figure 18), puisque le site 720 ne se retrouve pas dans la séquence protéique d'Elmo3 (Figure 9). Le site 720 est localisé dans la portion C-terminale de la protéine Elmo et se situe à proximité du site d'interaction avec la GEF Dock180 (532-707)⁸. L'utilisation du mutant non phosphorylable d'Elmo1 (YF 720) et de la protéine Elmo3 en comparaison avec Elmo1 de souche sauvage dans des essais fonctionnels pourrait générer davantage d'information sur le(s) rôle(s) de la phosphorylation de la tyrosine 720. Le site majeur en ce qui concerne la quantité de phosphorylation *in vitro*, pourrait s'avérer différent du(des) site(s) majeur(s) au niveau de l'impact fonctionnel de la phosphorylation, si impact fonctionnel il y a.

Il est étonnant que le site majeur de phosphorylation n'ait pas été détecté initialement en spectrométrie de masse dans l'échantillon *in vitro*. À la suite de l'obtention des résultats de spectrométrie de masse, les sites détectés *in vitro* étaient suspectés d'être les sites majeurs et les sites additionnels détectés dans l'échantillon *in vivo* d'être causés pas d'autres kinases présentes dans les cellules HEK 293T. La création de mutants Y-F, par la technique de mutagenèse dirigée, a permis de constater qu'en réalité le site majeur de phosphorylation avait été

détecté en spectrométrie de masse uniquement dans l'échantillon *in vivo*. Ceci est un bel exemple démontrant les limitations de la spectrométrie de masse. Cette méthode est un bon outil de détection des sites de phosphorylation d'une protéine, mais un résultat négatif n'est jamais assurément négatif, puisque plusieurs facteurs influencent la détectabilité d'un peptide en spectrométrie de masse (voir section 3.1.3.1 Identification des tyrosines phosphorylées sur Elmo1 par Tyro3). La présence d'autres modifications post-traductionnelles sur Elmo1, exprimé dans les cellules HEK 293T, a peut-être favorisé la détection du site 720 dans cet échantillon.

L'identification de la tyrosine 720, comme le site de phosphorylation privilégié par les kinases TAM, offre la possibilité de développer un nouvel outil pour poursuivre cette recherche. Le développement d'anticorps phospho-spécifiques permettrait d'approfondir la compréhension de la phosphorylation d'Elmo au niveau endogène et l'implication de cette phosphorylation dans la migration, la phagocytose et le développement du cancer comme discuté plus loin. Cependant, vu les coûts assez élevés pour développer ce type d'anticorps, il serait préférable d'obtenir la confirmation de l'importance de la phosphorylation d'Elmo au niveau fonctionnel avec les mutants Y-F au préalable.

Il est possible que la phosphorylation des protéines de la famille Elmo permette de créer des interactions avec d'autres protéines possiblement via des domaines SH2 ou PTB. Ces domaines protéiques reconnaissent spécifiquement des résidus phosphorylés. Cependant, l'environnement dans lequel se trouve le résidu phosphorylé, principalement l'identité des résidus voisins, influence sa capacité d'interaction avec les domaines SH2 et PTB. Les séquences protéiques reconnues par les domaines SH2 et PTB font l'objet d'intenses recherches. Dans la littérature, on retrouve plusieurs études où des séquences consensus sont présentées²⁴³⁻²⁴⁶. De plus, une ressource bio-informatique a été mise au point et offerte gratuitement sur internet pour trouver des protéines à domaines SH2 et PTB qui pourraient reconnaître une séquence donnée (<http://netphorest.net>²⁴⁶). À l'aide de ces outils, des candidats potentiels pour la reconnaissance d'Elmo phosphorylé sur la tyrosine 720 ont été identifiés (Tableau 8).

Tableau 8 : Tableau des protéines à domaines SH2 ou PTB pouvant reconnaître la tyrosine 720 d'Elmo1 phosphorylée

Données obtenues à l'aide de l'outil bio-informatique en ligne <http://netphorest.info> et à partir d'un article scientifique²⁴³.

Nom de la protéine	Type de domaine	Commentaire
Crk	SH2	Impliqué dans la cascade signalétique en aval des intégrines, Crk est reconnu pour se lier à Dock180 via la région C-terminale de Dock180 ⁷
FRS_group	PTB	Signalisation en aval des récepteurs au FGF ⁷⁴
MIST	SH2	Protéine adaptatrice dont la structure est associée à la famille de SLP-76, des protéines spécifiques aux cellules hématopoïétiques ²⁴⁷
VAV1_VAV3_group	SH2	GEF pour les GTPase Rho/Rac ²⁴⁸
SH2D1A_SH2D1B_group	SH2	
Shc4	SH2	Shc4 est exprimé dans le cerveau et les muscles squelettiques. Shc4 s'associe à MuSK, un RTK présent dans les jonctions neuromusculaires ²⁴⁹
ITK	SH2	Kinase impliquée dans la signalisation en aval de récepteurs d'antigènes dans les cellules B ²⁵⁰
Fgr_Fyn_Src_Yes_group	SH2	Kinases de la famille Src
SH2D3C	SH2	
BTK	SH2	Kinase à tyrosines importante pour le développement, la différenciation et la signalisation des lymphocytes B ²⁵¹
Shc1	SH2	Protéine adaptatrice associée à la signalisation des RTKs et impliquée dans la progression du cancer du sein ²⁵²
Brk	SH2	Kinase à tyrosine exprimée dans la majorité des tumeurs du cancer du sein et associée à une réduction de la mort cellulaire induite par un détachement de la matrice extracellulaire ²⁵³
TNS4	SH2	Gène associé avec le cancer du sein positif pour ErbB2 et avec le cancer de l'estomac où il est associé avec l'agressivité des tumeurs ^{254, 255}
LCP2	SH2	
TENC1 (Tensin2)	SH2	Protéine faisant un pont entre la matrice extracellulaire, le cytosquelette d'actine qui a été associée avec les cancers humains ²⁵⁶
SHD	SH2	
NCK2	SH2	Interagit avec le récepteur Axl ¹⁴⁴
Csk	SH2	Kinase à tyrosine
BRDG1	SH2	Protéine qui devient phosphorylée sur des tyrosines lors de la signalisation via les récepteurs d'antigènes dans les cellules B ²⁵⁷
BLNK	SH2	Suppresseur de tumeurs associé à la mort de cellules B pré-leucémiques ²⁵⁸
DAPP1	SH2	Impliquée dans l'activation de lymphocytes B ²⁵⁹

Selon une étude, le domaine SH2 de Crk reconnaît la séquence pY/D/F/V²⁴³. Cette séquence pY/D/F/V est présente sur Elmo1 et Elmo2 (Figure 9). Dans la

cascade signalétique en aval des intégrines, Crk est reconnu pour se lier à Dock180 via la région C-terminale de Dock180. Il serait très intéressant de déterminer si effectivement le domaine SH2 de Crk peut lier Elmo-pY720 et, si tel est le cas, de déterminer si Crk peut lier à la fois Elmo et Dock180. Cette hypothétique capacité de Crk à lier Elmo et Dock180 pourrait présenter des conséquences intéressantes. Premièrement, le domaine SH2 de Crk est reconnu pour interagir avec p130Cas phosphorylé afin de recruter la GEF Dock180 et permettre la polymérisation d'actine suite à l'engagement des intégrines. Il y a peut-être une compétition entre les protéines phosphorylées, p130Cas et Elmo, pour lier Crk. Peut-être aussi que la formation de la boucle Dock180-Crk-Elmo influence le recrutement d'autres joueurs comme des effecteurs de Rac par exemple.

Parmi les protéines à domaines SH2 et PTB présentées au Tableau 8 certaines présentent un intérêt particulier dans le cadre de notre projet de recherche. Les GEFs Vav 1 et Vav2 ont retenues notre attention, puisqu'elles possèdent la capacité d'activer la GTPase Rac^{123, 125-127, 248}. Les protéines Shc1, Brk, TNS4 et TENC1 sont intéressantes, puisqu'elles sont associées à la progression du cancer en particulier le cancer du sein^{213, 252, 253, 255}. La protéine adaptatrice NCK2 est aussi intéressante, puisqu'elle est connue pour interagir avec le récepteur Axl¹⁴⁴. Il serait intéressant de valider la capacité de ces protéines à domaine SH2 ou PTB de lier la protéine Elmo1 phospho-Y720.

4.1.1.4 La phosphorylation des protéines de la famille Elmo au niveau endogène

Tous les résultats générés concernant la phosphorylation d'Elmo l'ont été par essai de phosphorylation *in vitro* ou par surexpression de protéines. La phosphorylation des protéines de la famille Elmo par les récepteurs TAM au niveau endogène n'a pas encore été démontrée. Les lignées cellulaires choisies, Hs578T et MDA-MB-231, pour étudier la relation Elmo/TAM au niveau endogène, expriment Elmo2. Nous avons essayé de stimuler la signalisation par les récepteurs TAM avec du Gas6 ou en surexprimant les récepteurs TAM dans ces lignées cellulaires afin de mesurer la phosphorylation d'Elmo2. Pour détecter

Elmo2 phosphorylé, des immunoprécipitations avec l'anticorps anti-Elmo2 et le marquage de la phosphorylation par immunobuvardage avec l'anticorps anti-pY ont été effectués sans succès (données non présentées). Il est possible que l'anticorps anti-Elmo2 utilisé ne reconnaisse pas la forme phosphorylée de la protéine. Cet anticorps a été développé en immunisant des chèvres avec un peptide codant pour la région C-terminale de la protéine Elmo2 où la tyrosine 720 se retrouve au centre de la séquence du peptide (PKEPSS~~Y~~DFVYHYG). Cette tyrosine étant une cible de choix pour les TAM, peut-être que sa phosphorylation abolie la reconnaissance d'Elmo2 par l'anticorps. Conséquemment, il faudrait utiliser un autre anticorps dirigé contre Elmo2 pour détecter sa phosphorylation à un niveau d'expression endogène. L'utilisation d'un anticorps anti-Dock180 peut aussi être utile pour précipiter Elmo2. Cependant, cette méthode indirecte est risquée, puisque nous ne connaissons pas les effets de la phosphorylation d'Elmo sur la stabilité du complexe Dock180/Elmo2. Bien évidemment, un anticorps phospho-spécifique serait un excellent outil pour détecter Elmo endogène phosphorylé par immunobuvardage directement sur un lysat cellulaire.

De plus, lorsque le ligand Gas6 est utilisé pour stimuler les cellules, les cellules sont incubées toute la nuit dans du milieu 0.5%FBS afin de diminuer la stimulation des récepteurs par les facteurs de croissance contenus dans le FBS. Peut-être que cette pratique n'est pas adéquate pour la stimulation des cellules avec le ligand Gas6. La protéine Gas6 a été découverte lors de l'identification de protéines dont la production est accrue par le manque de sérum d'où son nom (Growth arrest specific gene 6)²⁶⁰. Il est possible que la production de Gas6 par les cellules soit stimulée par une diminution de la concentration en FBS, dans les lignées cellulaires utilisées, et que la signalisation par les récepteurs TAM soit induite dans du milieu 0.5% FBS de façon autocrine.

Les protéines de la famille Elmo se retrouvent effectivement phosphorylées au niveau endogène dans la littérature (1.2.4 La phosphorylation des protéines de la famille Elmo). Plus spécifiquement, le site de phosphorylation majeur induit par les TAM (Y720) se retrouve phosphorylé sur Elmo1 dans les lymphoblastes¹⁰⁶.

4.1.1.5 Conséquences possibles de la phosphorylation d'Elmo

Les conséquences possibles de la phosphorylation d'Elmo sont multiples. La phosphorylation des protéines de la famille Elmo est susceptible d'influencer la migration cellulaire et/ou la phagocytose comme discuté plus loin. La phosphorylation des protéines de la famille Elmo pourrait aussi avoir un impact sur leur stabilité. La phosphorylation d'Elmo pourrait induire la stabilisation ou même la dégradation de celle-ci. Puisque la stabilité d'Elmo1 a aussi un impact important sur la stabilité de la protéine Dock180⁶², affecter la stabilisation des protéines de la famille Elmo entraînerait possiblement aussi une modulation de la stabilité des GEFs de la famille de Dock180.

La phosphorylation des protéines de la famille Elmo peut aussi influencer de façon positive ou négative leur affinité pour d'autres protéines. Parmi celles-ci notons les GEFs de la famille de Dock180, la GTPase RhoG, ILK et les récepteurs kinase à tyrosine Tyro3 et Axl. Il est aussi possible que la phosphorylation des protéines de la famille Elmo permette de créer des interactions avec d'autres protéines impliquées dans la cascade signalétique, possiblement via des domaines protéiques SH2 ou PTB. Dans l'optique de notre hypothèse de recherche, ces autres protéines pourraient être des effecteurs de Rac ou des protéines interagissant avec les molécules d'actine.

4.1.1.6 La phosphorylation d'Elmo et le cancer

La démonstration que les protéines de la famille Elmo sont phosphorylées dans les tumeurs humaines serait une étape importante pour démontrer s'il y a une corrélation entre la phosphorylation d'Elmo et le cancer particulièrement chez les tumeurs hautement métastatiques. Au préalable, il faudrait démontrer la phosphorylation de la protéine Elmo1 ou Elmo2 au niveau endogène et analyser l'impact fonctionnel de cette phosphorylation (voir la section : 4.1.3 La relation TAM/Elmo et la migration cellulaire). Si les protéines Elmo sont phosphorylées au niveau endogène en aval de l'activation des récepteurs TAM et que la tyrosine 720 semble jouer un rôle important, il serait alors intéressant d'utiliser un anticorps phospho-spécifique pour Elmo1 et Elmo2 phosphorylés sur la tyrosine

720. Cet anticorps pourrait permettre de démontrer si les protéines Elmo1 et 2 sont phosphorylés dans les tissus tumoraux humains. C'est par la technique d'immunohistochimie que la phosphorylation des protéines Elmo1 et/ou Elmo2 sur des coupes de tumeurs pourrait être marquée. De plus, la présence d'un signal de phosphorylation plus intense en périphérie de la tumeur et dans les cellules tumorales qui envahissent le tissu normal adjacent serait un indice que la phosphorylation d'Elmo est associée au potentiel invasif des cellules tumorales.

4.1.1.7 Autres aspects concernant la phosphorylation

La surexpression de la kinase Tyro3 et de la protéine Elmo1 dans les cellules HEK 293T a mené à la phosphorylation des sérines 31 et 594 d'Elmo1. Il est évident que Tyro3 n'est pas responsable de la phosphorylation de ces sérines, puisque c'est une kinase à tyrosine. Cependant, d'autres kinases identifiées dans le balayage du kinome pourraient en être responsables. Les kinases CAMKK2, PRP4 et TTBK2, pour lesquelles les résultats du balayage n'ont pas été confirmés, sont toujours suspectées d'être capables de phosphoryler Elmo1.

La phosphorylation des GEFs de la famille de Dock180 n'a pas été analysée. Ces protéines, spécialement celles interagissant avec les protéines de la famille Elmo seraient susceptibles d'être phosphorylées par les kinases TAM. Il a été démontré que Dock180 peut se retrouver au sein du même complexe protéique que Tyro3, alors que Tyro3 puisse phosphoryler la GEF est possible.

4.1.2 Les récepteurs Tyro3 et Axl se retrouvent en complexe avec les protéines de la famille Elmo

4.1.2.1 Tyro3 et Axl, mais pas Mer, se retrouvent en complexe avec les protéines de la famille Elmo

Une interaction entre deux des membres de la famille TAM (Tyro3 et Axl) et les protéines Elmo1 et Elmo2 a été observée (Figure 20 et Figure 22). Le récepteur Mer ne démontre pas d'affinité pour les protéines de la famille Elmo dans les mêmes conditions. L'affinité des récepteurs TAM pour la protéine Elmo3 n'a pas été étudiée. Il serait pertinent de comprendre pourquoi les trois récepteurs

de la famille TAM phosphorylent Elmo, alors que seulement deux d'entre eux se retrouvent en complexe avec Elmo1 (Figure 16 et Figure 20). La réponse se trouve probablement dans les rôles biologiques respectifs des récepteurs TAM. Les récepteurs Tyro3 et Axl sont fortement associés à la migration cellulaire³ alors que le récepteur Mer est plutôt associé à la phagocytose^{165, 175, 177}. Les protéines de la famille Elmo sont reconnues pour être impliquées dans la migration et la phagocytose. Ces deux fonctions biologiques impliquent un remodelage du cytosquelette, mais dans chaque cas celui-ci est différent. L'architecture des complexes protéiques impliqués, dans chacune de ces fonctions biologiques, varie même si la résultante est la polymérisation d'actine. Dans chaque cas, la polymérisation d'actine doit être coordonnée d'une façon différente afin d'induire la formation des structures membranaires adéquates.

4.1.2.2 La portion N-terminale d'Elmo1 est nécessaire pour l'interaction avec Tyro3 et Axl

Le domaine protéique d'Elmo1 responsable de l'interaction avec Tyro3 et Axl a été grossièrement défini, démontrant qu'Elmo interagit avec les récepteurs TAM (Tyro3 et Axl) par sa portion N-terminale (1-495) (Figure 20c). Il serait intéressant de raffiner la cartographie de ce domaine d'interaction. Pour ce faire, des précipitations d'affinité en utilisant de plus petits fragments de la portion N-terminale d'Elmo ou, mieux encore, l'utilisation de mutants d'Elmo pour lesquels certains domaines de la portion N-terminale seraient absents serait un moyen d'y parvenir.

4.1.2.3 L'activité kinase des récepteurs Tyro3 et Axl est nécessaire pour permettre l'interaction avec les protéines de la famille Elmo

Il a été démontré que l'activité kinase de Tyro3 et Axl est nécessaire pour l'interaction avec Elmo1 (Figure 20a,b). Cependant, il n'a pas été défini si c'est la phosphorylation d'Elmo et/ou la phosphorylation du récepteur qui est nécessaire pour l'interaction. Des expériences de coimmunoprécipitation avec des mutants Y-F d'Elmo pourraient permettre de démontrer si la phosphorylation d'Elmo est nécessaire pour la formation du complexe avec Tyro3 et Axl. Cependant, puisque

le site de phosphorylation majeur sur Elmo1 se situe dans la portion C-terminale de la protéine qui n'est pas nécessaire pour l'interaction avec les récepteurs TAM (Tyro3 et Axl), on peut présumer que ce n'est pas via la tyrosine 720 que la formation du complexe Elmo/Tyro3 ou Axl est permise. Il est alors plus probable que la transphosphorylation du récepteur permette de recruter Elmo directement ou via une protéine qui se lie avec les récepteurs TAM (Tyro3 et Axl) actifs. La création de mutants des récepteurs TAM (Tyro3 et Axl) pour lesquels les tyrosines seraient mutées en phénylalanine serait très utile pour clarifier ce point.

4.1.2.4 Autres protéines impliquées dans le complexe protéique incluant les protéines de la famille Elmo et les récepteurs TAM (Tyro3 et Axl)

En surexpression, la présence de Tyro3, d'Elmo1 et de la GEF Dock180 dans le même complexe protéique a été démontrée (Figure 20d). La proportion de Tyro3 qui se retrouve en complexe avec Dock180 diminue lorsqu'Elmo1 n'est pas surexprimé. La portion de Tyro3 qui se retrouve toujours en complexe avec Dock180 peut être due à la présence de protéines de la famille Elmo endogènes permettant de faire le pont entre le récepteur TAM et la GEF, à la participation d'autres protéines d'échafaudage stabilisant le complexe ou à une interaction directe entre Tyro3 et Dock180. Ces dernières hypothèses demeurent cependant à confirmer.

Il serait très intéressant de déterminer quelles protéines, autres que les GEFs de la famille de Dock180, parmi les partenaires connus d'Elmo (RhoG, ILK et ERM) peuvent interagir avec le complexe Elmo/TAM.

Finalement, il n'a pas encore été déterminé si l'interaction Elmo/TAM est directe ou indirecte. Il est possible qu'une ou plusieurs protéine(s) adaptatrice(s) permettent cette interaction. Nck, PINCH et ILK, par exemple, peuvent être soupçonnées. Nck2 interagit avec le récepteur Axl²⁶¹, PINCH interagit avec Nck2 et ILK⁹⁹ et une interaction directe entre ILK et Elmo2 a aussi été démontrée⁷⁶.

4.1.2.5 L'interaction entre les protéines de la famille Elmo et les récepteurs TAM (Tyro3 et Axl) au niveau endogène

Le signal obtenu pour le complexe endogène Axl/Elmo2 est faible (Figure 22). Toutefois, ce signal a été obtenu dans un contexte où le récepteur Axl n'était pas stimulé. Pour améliorer le signal du complexe endogène Axl/Elmo2, le récepteur Axl a été stimulé avec du Gas6 sans impact mesurable sur la formation du complexe Axl/Elmo2 (données non présentées). Il faut mentionner que les Gas6 utilisés (Gas6 pleine longueur du Dr. Blostein et le domaine LG du Gas6 de R&D Systems) n'activent pas le récepteur Axl de façon très importante. Lorsque l'on mesure la phosphorylation du récepteur Axl à la suite d'une stimulation au Gas6 (IP Axl suivi d'un immunobuvardage anti-phosphoY), elle n'est augmentée que très faiblement (données non présentées). Cette observation concorde avec ce qui a été publié par l'équipe du Dr. Blostein et d'autres précédemment^{153, 229}. Cependant, dans la littérature on retrouve aussi des exemples où l'activation d'Axl mesurée en immunobuvardage avec un anticorps anti-phosphoY suite à une stimulation au Gas6 est intense^{262, 263}. Il semble être assez difficile d'obtenir du Gas6 avec une très bonne capacité à activer Axl *in vitro*. De plus, la stimulation de la production du Gas6 par les cellules, lorsque la concentration en sérum est diminuée, comme discuté précédemment (4.1.1.4 La phosphorylation des protéines de la famille Elmo au niveau endogène) peut aussi expliquer cette difficulté à mesurer l'activation des récepteurs TAM en réponse au Gas6 et conséquemment la formation du complexe Axl/Elmo2 endogène.

Pour contourner ce problème, l'utilisation de récepteurs chimères constitués de la portion intracellulaire d'Axl ou Tyro3 fusionnée avec la portion extracellulaire d'un récepteur facilement activable par son ligand (Tac, par exemple) pourrait permettre de démontrer la formation du complexe entre la portion intracellulaire des récepteurs TAM (Tyro3 et Axl) et la protéine Elmo endogène. Cet outil pourrait démontrer le recrutement d'autres protéines endogènes comme des GEFs de la famille de Dock180. Suite à l'activation d'Axl, le recrutement des protéines et la formation de complexes pourraient être étudiés en coprécipitation de protéines à partir de lysats cellulaire. Afin d'observer le recrutement des protéines

à la membrane tout en préservant la structure cellulaire, la technique d'immunofluorescence pourrait être très utile.

4.1.3 La relation TAM/Elmo et la migration cellulaire

Nous croyons que la principale conséquence biologique de l'interaction de Tyro3 et Axl avec les protéines Elmo est le recrutement à la membrane plasmique d'une protéine de la famille Elmo et d'une GEF de la famille de Dock180 menant à l'activation de Rac et la formation de lamellipodes favorisant la migration cellulaire (Figure 25). Bien entendu, une caractérisation plus approfondie de l'impact biologique des événements de phosphorylation et de l'interaction entre ces deux familles de protéines est nécessaire pour confirmer cette hypothèse, mais elle demeure jusqu'à maintenant la principale hypothèse de travail de ce projet.

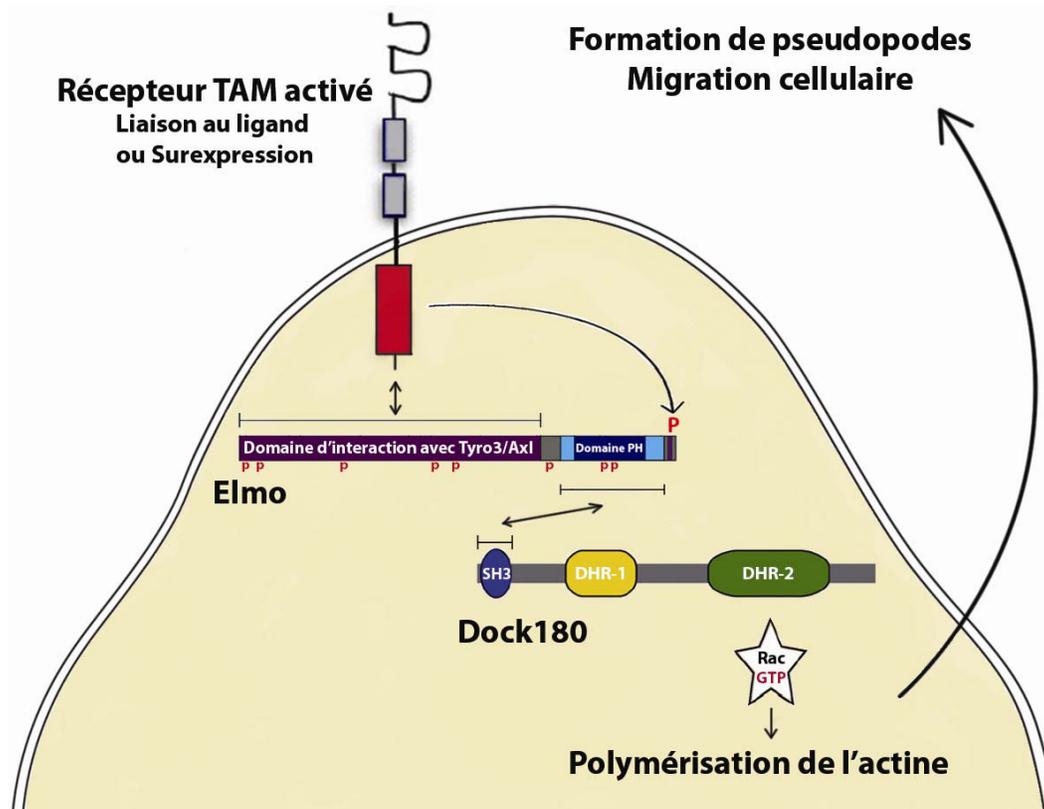


Figure 25 : Schématisation de l'hypothèse selon laquelle le complexe protéique TAM/Elmo induit le recrutement d'une GEF de la famille de Dock180, l'activation de Rac et la migration cellulaire

Dans cette étude, il a été démontré que l'activation des récepteurs TAM avec le ligand Gas6 induit l'activation de Rac dans les cellules MDA-MB-231 (Figure

23). De plus, la participation de la protéine Elmo2 au potentiel de migration de ces mêmes cellules a été démontrée avec des clones shElmo2 (Figure 24). Il faut être très prudent dans les conclusions que l'on peut tirer de l'utilisation des clones shElmo2, la diminution de l'expression de la protéine Elmo2 corrèle avec une baisse du potentiel de migration cellulaire (Figure 24). Nos essais de migration ont été stimulés avec du FBS 10% comme chimioattractant. Le FBS contient de multiples facteurs de croissance et Elmo peut, dans ce cas, être impliqué dans la réponse en aval de multiples stimulus pas uniquement la stimulation des récepteurs TAM. Il est probable que les protéines de la famille Elmo soient associées à plusieurs voies de signalisation en aval de facteurs de croissance. De plus, la diminution de l'expression d'Elmo2 a aussi probablement une influence sur le niveau d'expression des protéines de la famille de Dock180, puisqu'il a été démontré que la présence d'Elmo1 prévient la dégradation de Dock180 par le protéasome⁶². Le niveau d'expression de Dock180 dans les clones shElmo2 n'a pas été mesuré, mais ça serait une expérience intéressante à faire, puisque bien que la protéine Elmo1 favorise la stabilité de Dock180 il n'est toujours pas connu ce qui en est d'Elmo2. Il est donc possible que l'effet de la diminution de l'expression d'Elmo2 sur la migration soit causé par la diminution de l'expression de GEFs de la famille de Dock180. C'est pourquoi nous nourrissons beaucoup d'intérêt pour une stratégie où des mutants d'Elmo1 sont transfectés en même temps que les ARN interférence dirigés contre Elmo2. De cette façon, il serait plus facile de déterminer le rôle de la phosphorylation de la protéine Elmo et le rôle de l'interaction Elmo/TAM sans affecter le niveau d'expression des GEFs de la famille de Dock180. Avec des études de surexpression, la phosphorylation d'Elmo1 a été suggérée comme participant à la migration cellulaire¹⁰⁵.

L'importance de chacune des protéines soupçonnées d'agir de concert pour promouvoir la migration, Axl, Mer, Elmo2 et les GEF de la famille de Dock180, pourrait être mesurée dans les mêmes essais (mesure de l'activation de Rac Figure 23 et mesure du potentiel de migration Figure 24) en utilisant la technique de l'ARN interférence (ARNi). Par opposition à l'utilisation des clones shElmo2, les cellules n'ont pas le temps de mettre en place des mécanismes compensatoires

permettant de retrouver l'expression des protéines de la famille Elmo. Cette technique pourrait être utilisée dans les lignées cellulaires MDA-MB-231 et Hs578T. Premièrement, les profils d'expression des protéines de la famille de Dock180 pourraient être déterminés par RT-PCR. Nous nous attendons à déterminer que Dock180 (publié auparavant¹⁰¹) et peut-être d'autres membres de cette famille sont exprimées. Ensuite, la transfection des cellules MDA-MB-231 avec de l'ARNi pour diminuer l'expression des récepteurs Mer et Axl, d'Elmo2 et des GEFs de la famille de Dock180 séparément ou en combinaison pourrait permettre de clarifier plusieurs points.

- La participation d'Elmo2 et des GEFs de la famille de Dock180 à l'activation de Rac en réponse au Gas6.
- La contribution de chaque protéine dans la promotion de la migration cellulaire. Dans ce cas, l'utilisation de Gas6 comme chimioattractant dans les chambres de Boyden serait un bon moyen pour mesurer uniquement le potentiel de migration induit par les récepteurs TAM.
- Le rôle de la phosphorylation des protéines de la famille Elmo serait éclairci par la transfection, en même temps que les ARNi dirigés contre Elmo2 humain, des ADNc codant pour Elmo1 (souche sauvage et mutants YF). Ceci permettrait d'évaluer quel mutant d'Elmo1 n'est pas capable de permettre aux cellules de retrouver leur potentiel de migration. Si tel est le cas, la phosphorylation d'Elmo participe à la promotion de la migration dans les cellules MDA-MB-231. Si tous les mutants d'Elmo1 permettent de retrouver le potentiel de migration, il faudra alors se rediriger vers d'autres explications pour définir le rôle de la phosphorylation d'Elmo par les récepteurs TAM.
- Le rôle de l'interaction Axl/Elmo2 dans les processus de migration. Si le domaine d'interaction avec Axl sur Elmo est défini plus finement, des clones d'Elmo présentant la même affinité pour Dock180 qu'Elmo de souche sauvage, mais qui ne se retrouveront plus en complexe avec Axl pourraient être créés. Il suffirait alors de transfecter ces clones, en

même temps que les ARNi dirigés contre Elmo2, pour évaluer l'impact de l'interaction Elmo/TAM.

Au niveau endogène, l'utilisation d'anticorps phospho-spécifiques en immunofluorescence, sur des cellules en migration, pourrait nous permettre de localiser les protéines Elmo phosphorylées. La présence d'Elmo phosphorylé au front de migration serait en accord avec l'hypothèse selon laquelle la phosphorylation d'Elmo est impliquée dans la promotion de la migration (Figure 25).

4.1.4 La relation TAM/Elmo et la phagocytose

La relation Elmo/TAM est intéressante sous plusieurs aspects. D'un point de vue fonctionnel, ces deux familles de protéines partagent une implication dans la migration cellulaire et la phagocytose des cellules apoptotiques. Ces familles sont aussi associées à l'activation de Rac, qui peut expliquer la restructuration du cytosquelette nécessaire à la migration cellulaire et la phagocytose. Nous avons choisi de concentrer nos efforts pour développer un modèle pour étudier la relation Elmo/TAM dans un contexte de migration cellulaire. Il serait également intéressant de comprendre si cette relation régule la phagocytose.

Le récepteur Mer est le membre de la famille TAM le plus étroitement associé à la phagocytose. On pourrait alors croire que si la relation Elmo/TAM joue un rôle dans la phagocytose, c'est probablement davantage à cause de la phosphorylation d'Elmo qu'à cause d'une interaction TAM/Elmo, puisqu'aucune interaction physique entre le récepteur Mer et Elmo1 n'a été démontrée (Figure 20c). D'ailleurs, une étude suggère que la phosphorylation d'Elmo puisse jouer un rôle dans la phagocytose des cellules apoptotiques¹⁰⁵. L'utilisation d'anticorps phospho-spécifiques serait un bon outil pour déterminer si la phagocytose est associée avec une augmentation de la phosphorylation d'Elmo.

Le complexe Elmo/Dock180 est associé à la signalisation en aval de deux différents types de récepteurs pour la phosphatidylsérine. Ces récepteurs sont Mer qui reconnaît Gas6 et Protein S lié à la phosphatidylsérine et Bai1 un récepteur à 7 domaines transmembranaires qui lie directement la phosphatidylsérine²⁶⁴. Il serait

intéressant d'explorer si ces deux voies de signalisation sont indépendantes ou reliées. En d'autres mots, déterminer si les récepteurs TAM sont nécessaires à la signalisation via Bai1 et vice versa ou si ces deux systèmes de reconnaissance de la phosphatidylsérine sont indépendants. Il serait intéressant de clarifier le rôle de la phosphorylation d'Elmo dans la phagocytose médiée par Mer. Peut-être que la reconnaissance des molécules de phosphatidylsérine exposées à la surface des cellules apoptotiques varie selon le type cellulaire qui doit phagocyter ou peut-être qu'une double reconnaissance des cellules apoptotiques est nécessaire afin de bien contrôler la phagocytose. L'impact de la phosphorylation d'Elmo par Mer sur l'interaction avec Bai1 est probablement faible, puisque l'interaction Elmo/Bai1 est médiée par la portion *N*-terminale d'Elmo et que le site de phosphorylation privilégié par Mer se retrouve en *C*-terminal. Cependant, la phosphorylation d'Elmo pourrait influencer la signalisation en aval du récepteur Bai1.

4.2 Conclusion

La régulation en amont de la voie de signalisation du complexe Elmo/Dock180 associée à l'activation de Rac est peu connue. Dans cette étude, l'existence un nouveau lien entre les protéines de la famille Elmo et les kinases de la famille des récepteurs TAM a été découvert.

La phosphorylation des protéines de la famille Elmo par les kinases TAM *in vitro* et à l'intérieur des cellules a été clairement démontrée. La tyrosine 720 d'Elmo1 a été identifiée comme le site majeur de phosphorylation ciblé par les kinases TAM. De plus, la formation d'un complexe entre les récepteurs TAM (Tyro3 et Axl) et les protéines de la famille (Elmo1 et Elmo2) est révélée. Cette interaction est dépendante de l'activité kinase des récepteurs TAM et elle est médiée par la portion *N*-terminal d'Elmo. Finalement, la présence de la GEF Dock180 au sein du même complexe protéique a aussi été démontrée.

Ce projet de recherche a permis de dévoiler la relation TAM/Elmo/Dock180 pouvant expliquer, en partie, l'activation de Rac, la réorganisation du cytosquelette, la migration cellulaire et le potentiel invasif des tumeurs associé à la signalisation par les récepteurs TAM.

5 Matériel et méthodes

5.1 Culture cellulaire

Les cellules HEK 293T, MDA-MB-231, Hs578T et NLT GnRH sont cultivées selon les procédures classiques dans du DMEM (Wisent, cat# 309-005-CL) 10% FBS (Invitrogen, ca# 12483-020) contenant un mélange d'antibiotiques Pénicilline/Streptavidine (Invitrogen, cat#15140122).

5.1.1 Transfection calcium/phosphate

Les transfections calcium/phosphate sont effectuées suivant les directives publiées dans *Current protocols in cell biology*²⁶⁵. De façon standard, un total de 10ug de plasmide pour transfecter un pétris de 10cm est utilisé.

5.1.2 Génération de lignées stables shRNA

Les plasmides commerciaux (Origene cat# TR317410) codant pour des shRNA contre le gène d'Elmo2 humain sont transfectés dans les cellules utilisant la Lipofectamine 2000 (Invitrogene, cat#11668-019) selon les instructions du fabricant. 24h après la transfection, les cellules sont passées avec une dilution 1/10. 48h après la transfection, la puromycine 0.75ug/ml est ajouté au milieu de culture pour la sélection des clones. Par la suite le milieu est changé aux deux jours pour du milieu frais contenant de la puromycine. Environ 14 jours après la transfection, les clones isolés sont transférés dans des plaques à 96 puits. Par la suite, les clones sont transférés dans de plus gros puits et pétris. L'expression d'Elmo2 est évaluée par immunobuvardage avec l'anticorps anti-Elmo2 et les clones démontrant une réduction de la quantité du gène sont congelés dans l'azote liquide pour des expériences futures.

5.1.3 Essais de migration cellulaire

Les cellules MDA-MB-231 maintenues dans du DMEM 10% FBS sont trypsinisées et resuspendues dans du DMEM 0,1% FBS. Les cellules sont diluées pour obtenir 5×10^4 cellules/150ul. 150ul (5×10^4 cellules) sont introduites dans

chaque chambres de Boyden (« Transwell » support de 6.5mm en polycarbonate, pores de 8µm, 12puits/plaque, Corning Costar, cat#3422). La même quantité de cellules est introduite dans un puits contrôle sans chambre de Boyden. Les cellules migrent durant 12h à 37°C 5% de CO₂, vers du milieu complet DMEM 10% FBS (600ul/puit) comme attractant. Après la période de migration, tous les puits de cellules sont fixés avec une solution de fixation (Formalin phosphate, Fisher, cat# SF-100-4) durant 20 minutes et lavées trois fois à l'eau.

Les cellules dans les puits contrôle sont colorées avec du Crystal Violet pour normaliser le nombre de cellules dans chaque condition. La cellules fixées sont colorées durant 20 minutes (Crystal Violet 1% dans 20% EtOH) et lavées 4 fois avec de l'eau. Le Crystal Violet est ensuite mis en solution avec la solution de Sorenson (0.1M Citrate de Sodium pH4,2 , 50% EtOH 50% H₂O). La coloration proportionnelle à la quantité de cellules est évaluée au spectrophotomètre à 595nm.

Les cellules dans les chambres de Boyden sont préparées pour la microscopie. Les cellules qui n'ont pas traversé la membrane sont enlevées avec un coton-tige. La membrane est ensuite enlevée de la chambre et montée sur une lame de microscope dans du milieu de montage contenant du DAPI (Slow Fade Gold antifade reagent with DAPI, Invitrogen, cat#S36938). Les cellules ayant traversé la membrane sont comptées au microscope à fluorescence.

Calcul du potentiel de migration : $(\#X / DO_{595}X)$

$$\frac{(\#X / DO_{595}X)}{(\#Parental / DO_{595}Parental)}$$

#X = Nombre de cellules ayant traversé la chambre de boyden (clone X)

DO₅₉₅X = DO_{595nm} crystal violet (Clone X)

#Parental = Nombre de cellules ayant traversé la chambre de boyden (Cellules parentales - MDA-MB-231)

DO₅₉₅Parental = DO_{595nm} crystal violet (Cellules parentales- MDA-MB-231)

5.2 Essais de phosphorylation *in vitro*

5.2.1 Balayage du kinome humain par essai de phosphorylation *in vitro*

Ce balayage a été effectué par l'équipe de Dr Robert Screaton tel que publié précédemment²³¹. Nous avons fourni à son équipe le substrat, c'est-à-dire la protéine Elmo1 de souris purifiée avec l'ÄKTAprime (voir section 5.5.2 Purification de protéines avec tag GST via l'ÄKTAprime plus). Brièvement, un système automatisé permet de faire des essais de phosphorylation dans des plaques à 96 puits avec des protéines de fusion GST-Kinase. Des cellules HEK 293T sont transfectées avec une banque d'ADN codant pour des GST-Kinases. Cette banque couvre toutes les familles de kinases du génome humain pour un total de 180 kinases. Les cellules exprimant les kinases sont lysées et les kinases purifiées du lysat cellulaire à l'aide de plaques recouvertes de glutathionne. L'essai de phosphorylation *in vitro* est effectué dans ces mêmes plaques avec un substrat contrôle et avec du Elmo1. Les protéines phosphorylées sont détectées par autoradiographie. Une schématisation des étapes de ce balayage est présentée à la figure 26.

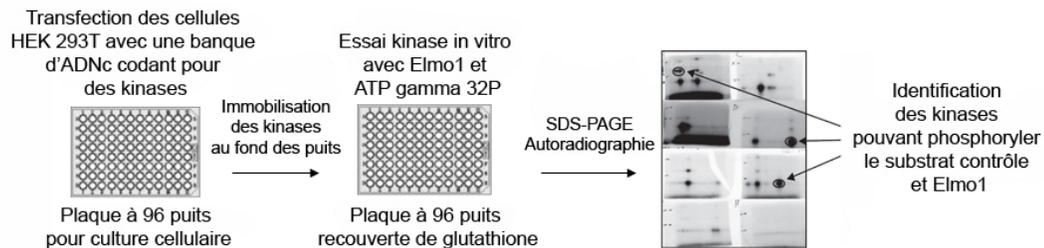


Figure 26 : Les différentes étapes du balayage effectué pour identifier des kinases pouvant phosphoryler Elmo1

5.2.2 Essai de phosphorylation *in vitro*

L'essai de phosphorylation *in vitro* est effectué dans un tampon de réaction (50mM Tris-HCl pH7.5, 100mM NaCl, 6mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 200uM Sodium orthovanadate (NaVO₄), 50uM ATP non-radioactif et 2mM DTT) où la kinase est en contact avec le substrat et 25uCi d'ATPgamma-³²P (Perken Elmer, cat#NEG502A) durant 30minutes à 30°C. Les domaines kinases des TAMs humains proviennent de la compagnie Signal Chem : Tyro3 (cat# T22-11G), Axl

(cat# A34-11H) et Mer (cat# M51-11G). Les protéines sont séparées par SDS-PAGE, le gel est coloré au Coomassie et séché afin de faciliter l'autoradiographie (Films : VWR cat#IB8294985).

5.3 Spectrométrie de masse – préparation des échantillons

5.3.1 Échantillon in vitro

Phosphorylation d'Elmo1 par essai de phosphorylation *in vitro*. La kinase GST-Tyro3 humaine purifiée par précipitation d'affinité à la glutathionne a été utilisée pour phosphoryler 2 ug d'Elmo1 de souris par essai de phosphorylation *in vitro*.

5.3.2 Échantillon in vivo

10mg de lysat cellulaire provenant de 3 pétris de 10cm de cellules HEK 293T, transfectées par la technique calcium/phosphate avec les ADNc codant pour GST-Tyro3 humain et cMyc-Elmo1 de souris, ont été utilisé pour faire l'IP avec 50ul d'anticorps anti-cMyc (9E10).

5.3.3 Migration sur gel et coloration

Les échantillons protéiques ont été séparés par SDS-PAGE en utilisant un gel de polyacrylamide précoulé (Invitrogen, NP0335BOX) et un tampon de migration vendu commercialement (Invitrogen, NP0001). Le gel a ensuite été coloré au bleu de coomassie (Bio-Rad, 161-0786). Les bandes correspondant à Elmo1 a été coupés en salle blanche, afin de minimiser la contamination protéique, et congelées à -80°C.

5.4 Biologie moléculaire

5.4.1 Plasmides pour la transfection des cellules de mammifères

Le plasmide codant pour GST-Tyro3 humain a été offert par Dr. Robert Screaton. La kinase a été introduite dans le vecteur pDEST27 du système Gateway distribué par Invitrogen comme décrit précédemment²³¹. Le plasmide pour l'expression de Tyro3 humain sans tag dans le vecteur pCMV6-XL5

provient de chez Origene (cat#SC108283). Le plasmide codant pour Axl de souris dans le vecteur pCMVSPORT6 a été offert par Dr. Robert Screaton. Les plasmides pour l'expression de Tyro3-KD et Axl-KD ont été générés par mutagenèse dirigée (Stratagene « QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit » cat#200523) avec des amorces spécifiques (Tableau 9). Les plasmides codant pour Mer et Mer-KD de souris ont été offerts par Dr. Birge¹⁷⁵. Le plasmide codant pour cMyc-Elmo1 de souris dans le vecteur pcDNA3 a été décrit précédemment⁴⁴. Les mutants Y-F d'Elmo1 de souris ont été générés par mutagenèse dirigée (Stratagene « QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit » cat#200523 et « QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit » cat#200515) avec les amorces spécifiques au mutant souhaité (Tableau 9). Les plasmides codant pour cMyc-Elmo2 de souris et cMyc-Elmo3 de souris dans le vecteur pcDNA3 ont été générés par les techniques standards de PCR. L'ADNc d'Elmo2 a été flanqué des sites de restriction BglII et XhoI alors que l'ADNc d'Elmo3 a été flanqué des sites de restriction BamHI et XhoI. Les ADNc ont alors été introduits dans le vecteur pcDNA3 digéré BamHI/XhoI. Les séquences des ADNc ont été confirmées par séquençage. Le plasmide codant pour flag-Dock180 humain a été décrit précédemment²⁶⁶.

Afin de produire l'ADN pour les transfections, les bactéries DH5alpha (Invitrogen, cat#18263-012) ont été transformées avec ces plasmides selon les instructions du fabricant. Les plasmides utilisés pour transférer les cellules ont été purifiés avec l'ensemble distribué par Invitrogen (Plasmid midi kit cat#K2100-05) ou l'équivalent.

Tableau 9 : Séquences des amorces utilisées pour introduire des mutations par mutagenèse dirigée

Mutation	Séquence de l'amorce
Tyro3 humain K550M (sens)	GTGAAAGTGGCTGTGATGATGCTGAAAGCTGAC
Tyro3 humain K550M (anti-sens)	GTCAGCTTTCAGCATCATCACAGCCACTTTCAC
Axl de souris K561M (sens)	CTCAAGGTCGCTGTGATGACCATGAAAATTGCC
Axl de souris K561M (anti-sens)	GGCAATTTTCATGGTCATCACAGCGACCTTGAG
Elmo1 de souris Y18F (sens)	GAATGGCCTGGCGCCTTCCTAAACTCATGGAG
Elmo1 de souris Y18F (anti-sens)	CTCCATGAGTTTAGGGAAGCGCCAGGCCATTC
Elmo1 de souris Y48F (sens)	CTCTTGCCAACCATGAATTTTTTGCACTGCAGCACG
Elmo1 de souris Y48F (anti-sens)	CGTGCTGCAGTGCAAAAAATTCATGGTTGGCAAGAG
Elmo1 de souris Y216F (sens)	CAACAGTCATGACCTCTTCCAAAAGGTAGCCCA
Elmo1 de souris Y216F (anti-sens)	CTGGGCTACCTTTTGAAGAGGTCATGACTGTTG
Elmo1 de souris Y352F (sens)	GAGAAACGCAAGTCCATGTTCACTCGGGATTATAAAAAAC
Elmo1 de souris Y352F (anti-sens)	GTTTTTATAATCCCGAGTGAACATGGACTTGC GTTTCTC
Elmo1 de souris Y395F (sens)	CACCAGGATGCATTCATCCGGATCGTGCTAG
Elmo1 de souris Y395F (anti-sens)	CTAGCACGATCCGGATGAATGCATCCTGGTG
Elmo1 de souris Y511F (sens)	CTGCAAAAACCTGAGCTTCACCGAGATCCTGAAAATC
Elmo1 de souris Y511F (anti-sens)	GATTTTCAGGATCTCGGTGAAGCTCAGGTTTTGTCAG
Elmo1 de souris Y576F (sens)	GACAAGACAAGTTTTGGTTTTGTCGGCTTTCACCAAATC
Elmo1 de souris Y576F (anti-sens)	GATTTGGTGAAAAGCCGACAAAACCAAACCTTGTCTTGTC
Elmo1 de souris Y588F (sens)	CACAAGGTCTTACATTTTGGCGACTTGAAGAGAGAGC
Elmo1 de souris Y588F (anti-sens)	GCTCTCTTCCAAGTCGCCAAAATGTAAGACCTTGTG
Elmo1 de souris Y720F (sens)	CCCAAGGAACCTAGCAACTTTGACTTTGTCTATGACTGTAAC TG
Elmo1 de souris Y720F (anti-sens)	CAGTTACAGTCATAGACAAAGTCAAAGTTGCTAGGTTCCCTGGG
Elmo1 de souris Y724F (sens)	CCCAAGGAACCTAGCAACTATGACTTTGTCTTTGACTGTAAC TG
Elmo1 de souris Y724F (anti-sens)	CAGTTACAGTCAAAGACAAAGTCATAGTTGCTAGGTTCCCTGGG
Elmo1 de souris Y720/724F (sens)	CCCAAGGAACCTAGCAACTTTGACTTTGTCTTTGACTGTAAC TG
Elmo1 de souris Y720/724F (anti-sens)	CAGTTACAGTCAAAGACAAAGTCAAAGTTGCTAGGTTCCCTGGG

5.4.2 Plasmides pour la production de protéines dans les bactéries

Les ADNc codant pour Elmo1 (incluant les mutants Y/F) et Elmo3 ont été sousclonés de pcDNA3 à pGEX 4T1 (Pharmacia Biotech, cat#27-4580-01) avec les enzymes de restriction XhoI et BamHI. Le produit de PCR codant pour l'ADNc d'Elmo2 flanqué des sites de restriction BglII/BamHI (Voir section : 5.4.1 Plasmides pour la transfection des cellules de mammifères) a été introduit

dans pGEX 4T1 digéré BamHI/XhoI. Des plasmides codant pour GST-Elmo avec un promoteur bactérien sont alors obtenus.

Les bactéries BL-21 (Novagen) ont été transformées avec le plasmide pGEX 4T1 contenant Elmo1 (incluant les mutants Y/F), Elmo2 ou Elmo3 pour la production de protéines GST-Elmo suite à une induction à l'IPTG.

5.4.3 RT-PCR

L'ARN total a été extrait des cellules avec le réactif Trizol (Invitrogen, cat#15596-026) en suivant les recommandations du fabricant. L'ARN total a été traité à la DNase1 (Invitrogen, cat#18068-015) afin de s'assurer d'éliminer les contaminations d'ADN. L'ARN a été amplifié par RT-PCR avec l'enzyme Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, cat#18064-022) en utilisant des amorces aléatoires (Invitrogen, cat#48190011) pour obtenir un extrait d'ADNc. L'ADNc a été amplifié avec des paires d'amorces spécifiques pour les ADNc codant pour l'actine, Elmo1, Elmo2 et Elmo3 (Tableau 10). Les produits de PCR ont été séparés sur gel d'agarose 1% et colorés au bromure d'éthidium selon les procédures régulières.

Tableau 10 : Séquences des amorces spécifiques pour amplifier les ADNc codant pour l'actine, Elmo1, Elmo2 et Elmo3

Amorce	Séquence
Actine humaine (sens)	TGA TGG TGG GCA TGG GTC AGA A
Actine humaine (anti-sens)	TCC ATG TCG TCC CAG TTG GTG A
Elmo1 humain (sens)	TGT CAC GAT CAC AGT GCA GA
Elmo1 humain (anti-sens)	CAA CTT TCA GCC CCT AGC TG
Elmo2 humain (sens)	CGT TGC CAA ACC CAG AGT AT
Elmo2 humain (anti-sens)	TGG AGG TGT GAG ATG AGC TG
Elmo3 humain (sens)	TGA CGC ACT CTG AGC GTT AC
Elmo3 humain (anti-sens)	CAA GGT CAC ACT CTC CAG CA

5.5 Purification de protéines recombinantes avec un tag GST

5.5.1 Précipitation d'affinité à l'aide de billes recouverte de glutathionne

Cette technique a été utilisée pour purifier des protéines avec tag GST provenant de lysats bactériens ou de lysats de cellules HEK 293T transfectées.

5.5.1.1 Précipitation à partir de lysats bactériens

Les bactéries BL-21 transformées avec le vecteur pGEX 4T1 contenant le gène d'intérêt sont cultivées durant la nuit avec agitation dans 5ml de LB avec ampicilline (100ug/ml). En matiné, 50ml de LB avec ampicilline (100ug/ml) et IPTG (0.1mM) sont mélangés avec la culture de 5ml et incubés 3h avec agitation à 37°C. Les bactéries sont culotées par centrifugation 3220g 15 minutes. Le culot bactérien est resuspendu dans 1ml de PBS 1X 1% Triton X-100. Les bactéries sont lysées par sonication. Les débris membranaires sont séparés de la solution protéique par centrifugation 16100g 20 minutes. Le surnageant contenant les protéines bactériennes est incubé avec des billes lavées (20ul de billes (Gen Script cat#L00206) sont lavés avec du PBS 0.1% Triton-X-100) 1h à 4°C. Les billes recouvertes des protéines recombinantes avec tag GST sont lavés trois fois avec du PBS 0.1% Triton-X-100 (centrifugation 1min à 400g). Les billes sont ensuite resuspendues dans 1ml de PBS 0.1% Triton-X-100. Les protéines avec tag GST peuvent être quantifiées par SDS-PAGE suivi d'une coloration du gel au Coomassie selon les procédures courantes. Des quantités connues de BSA sont alors utilisées comme références.

5.5.1.2 Précipitation à partir de lysats cellulaires de HEK 293T

Un pétris de 10cm de cellules confluentes est lysé dans 1ml de tampon NP-40 1% (150mM NaCl, 50mM Tris pH 7.5 et 1% NP-40) sous agitation (35-40 rpm) à 4°C 15 minutes. Les débris cellulaires sont séparés de la solution protéique par centrifugation 16100g 20 minutes à 4°C. Le surnageant obtenu est le lysat cellulaire total. La concentration en protéine dans le lysat cellulaire total est quantifiée avec un ensemble de Bio-Rad (Bio-Rad, cat#500-0206 et 500-0116). 500ug de lysat cellulaire total dans 500ul de tampon NP-40 1% est incubé avec

les billes lavées (20ul de billes (Gen Script cat#L00206) sont lavées avec 1ml de NP-40 1%) 1h à 4°C. Les billes recouvertes des protéines recombinantes avec tag GST sont lavés trois fois avec du NP-40 1% (centrifugation 1min à 400g). Les billes peuvent ensuite être utilisées pour des essais de phosphorylation *in vitro* ou pour analyse par SDS-PAGE et immunobuvardage. Lorsque la précipitation d'affinité à la glutathionne est séparée par SDS-PAGE et que des protéines précipitées ou coprécipitées sont marquées en immunobuvardage, 10% de la quantité de lysat cellulaire utilisé pour la précipitation d'affinité, soit 50ug, est utilisé comme contrôle.

5.5.2 Purification de protéines avec tag GST via l'ÄKTAprime plus

Les bactéries BL-21 transformées avec le plasmide pGEX 4T1 sont cultivées durant la nuit avec agitation dans 200ml de LB avec ampicilline (100ug/ml). En matinée, 2L de LB avec ampicilline (100ug/ml) et IPTG (0.1mM) est mélangé avec la culture de 200ml et incubés 3h avec agitation à 37°C. Les bactéries sont culotées par centrifugation 3220g 15 minutes. Le culot bactérien est resuspendu dans 25ml de PBS 1X. Les bactéries sont lysées par sonication. Les débris membranaires sont séparés de la solution protéique par centrifugation 16100g 20 minutes. Le surnageant est filtré à travers un filtre de 0.45microns lors de l'injection dans l'appareil. L'appareil « ÄKTAprime plus » de GE Healthcare est utilisé selon les recommandations du fabricant pour purifier avec la colonne GSTraptm HP (GE Healthcare, cat#17-5281-01) les protéines avec un tag GST. Les protéines sont éluées de la colonne dans un tampon contenant 10mM de Glutathionne et 50mM Tris-HCl pH8. Lorsque nécessaire, les protéines purifiées en solution avec de la glutathionne peuvent être lavées et/ou concentrées avec les unités à filtration Amicon (Millipore, cat#UFC801024).

5.6 Précipitations d'affinité (autre que pour le glutathionne)

Un pétris de 10cm de cellules confluentes est lysé avec 1ml de buffer NP-40 1% (150mM NaCl, 50mM Tris pH 7.5 et 1% NP-40) sous agitation (35-40 rpm) à 4°C durant 15 minutes. Les débris cellulaires sont séparés de la solution protéique par centrifugation 16100g 20 minutes à 4°C. Le surnageant obtenu est le lysat

cellulaire total. La concentration en protéine dans le lysat cellulaire total est quantifiée avec un ensemble de Bio-Rad (Bio-Rad, cat#500-0206 et 500-0116).

5.6.1 Immunoprécipitation

500ug de lysat cellulaire total dans 500ul de tampon NP-40 1% est incubé avec l'anticorps (Tableau 11) 1h à 4°C. La solution protéines/anticorps est incubée avec les billes Protéine A lavées (20ul de billes (Invitrogen cat#15918014) lavées avec 1ml de NP-40 1%) 30minutes à 4°C. Les billes recouvertes de complexes anticorps/protéines d'intérêt sont lavées trois fois avec du NP-40 1% (centrifugation 1min à 400g). Les billes peuvent ensuite être utilisées pour des essais de phosphorylation *in vitro* ou pour analyse par SDS-PAGE et immunobuvardage. Lorsque l'IP est séparée par SDS-PAGE et que des protéines immunoprécipitées ou coimmunoprécipitées sont marquées en immunobuvardage, 10% de la quantité de lysat cellulaire utilisé pour la précipitation d'affinité, soit 50ug, est utilisé comme contrôle.

5.6.2 Précipitation d'affinité pour une protéine avec un tag GST

500ug de lysat cellulaire total dans 500ul de tampon NP-40 1% est incubé avec des billes recouvertes de protéine de fusion GST-X (5ug) 1h à 4°C à l'exception des billes GST-CRIB (PAK) l'incubation est alors de 30 minutes. Pour la préparation de ces billes voir la section : 5.5 Purification de protéines recombinantes avec un tag GS, sous-section : 5.5.1.1 Précipitation à partir de lysats bactériens. Les billes sont ensuite lavées trois fois avec du NP-40 1% (centrifugation 1min à 400g). Les billes peuvent ensuite être utilisées pour analyse par SDS-PAGE et immunobuvardage. Lorsque les protéines sont séparées par SDS-PAGE et que des protéines précipitées ou coprécipitées sont marquées en immunobuvardage, 10% de la quantité de lysat cellulaire utilisé pour la précipitation d'affinité, soit 50ug, est utilisé comme contrôle.

Liste des anticorps

Tableau 11 : Tableau des anticorps commerciaux utilisés pour effectuer les immunoprécipitations et les immunobuvardages

Anticorps	Compagnie	Numéro de catalogue	Commentaires
anti-GST	GE Healthcare	27-4577-01	
anti-Tyro3 (C-20)	Santa Cruz Biotechnology	sc-1095	
Anti-Axl (C-20)	Santa Cruz Biotechnology	sc-1096	Reconnait le récepteur Axl humain et de souris
Anti-Axl (Z49M)	Santa Cruz Biotechnology	sc-73719	
Anti-Mer de souris	R&D Systems	AF591	Ne reconnaît pas Mer humain
Anti-Mer humain (Y323)	Abcam	Ab52968	Ne reconnaît pas Mer de souris
Anti Rac1 (23A8)	Millipore	05-389	
Anti-Elmo2	Novus Biologicals	NB100-879	Reconnait Elmo1, Elmo2 et Elmo3
Anti-cMyc (9E10)	Santa Cruz Biotechnology	sc-40	
Anti-phospho-Y (PY99)	Santa Cruz Biotechnology	sc-7020	
Anti-Flag (M2)	Sigma	F3165	
Anti-tubuline	Sigma	T5168	

6 Remerciements

Merci à Dr Jean-François Côté, mon superviseur, un excellent scientifique et un superviseur hors pair qui m'a bien dirigé tout au long de mon parcours de maîtrise. Je suis redevable envers lui pour m'avoir offert un projet de recherche très intéressant et pour m'avoir laissé toute la latitude nécessaire pour explorer les aspects qui m'intriguaient davantage. Je le remercie spécialement pour son écoute et sa grande disponibilité. C'est grâce à son soutien que je suis parvenu à mener à terme mes études de maîtrise dans le délai que je m'étais fixé. J'espère que ma contribution aux recherches de son laboratoire pourra lui être utile.

Merci à Francis, mon conjoint, pour toute la compréhension dont il a fait preuve durant les deux dernières années. Son réconfort m'a permis de traverser les moments les plus difficiles.

Merci à mes parents de m'avoir donné le goût d'apprendre et de persévérer. Un merci spécial à maman pour son écoute et son support financier.

Merci aux membres du laboratoire du Dr. Côté. Merci tout spécialement à Mélanie pour son accueil chaleureux, lors de mon arrivée au laboratoire et pour ses conseils en cours de route. Merci à Manishhha et Ariane, mes divertissantes voisines de paillasse avec lesquelles ce fut un plaisir de discuter de science et de partager les réactifs.

Merci aux membres de mon comité de maîtrise Dr. Jean-François Côté, Dr. William J. Muller, Dr. Louise Larose, Dr. Woong-Kyung Suh, Dr. Jean-Philippe Gratton et Dr. Claude Lazure pour vos conseils judicieux et pour m'avoir fait prendre conscience de mes limites.

Merci à nos collaborateurs : Dr Robesrt Sreaton, responsable du balayage du kinome, sans qui ce projet n'aurait jamais pris son envol et Dr. Blostein pour nous avoir gracieusement offert du Gas6.

Merci à Marie-France et Philippe, mes amis scientifiques, qui se sont porté volontaires pour m'offrir leurs commentaires concernant mon mémoire. En plus d'avoir participé à l'amélioration de la qualité de ce travail, vous m'avez fourni

l'énergie nécessaire pour terminer ce mémoire et les tapes dans le dos pour en être fière.

Merci à mon amie Mimi de m'avoir enseigné le programme Photoshop et pour l'impression de mon affiche à la dernière minute.

Merci aux gens des différents services offerts à l'IRCM spécialement à Nicole Campeau du centre de documentation et à Dominic Filion pour le soutien technique en microscopie.

7 Abréviations

Tableau 12 : Tableau des abréviations

Afin de demeurer constant avec la littérature scientifique, essentiellement anglophone, les abréviations utilisées dans le présent mémoire de maîtrise sont tirées de la langue anglaise.

Abi	Abl interactor
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	AND complémentaire
Arp2/3	Actin related protein 2/3
Axl	from the Greek word “anexelekto” or uncontrolled
BAI1	Brain specific Angiogenesis Inhibitor
BLK	B-Lymphocyte Kinase
BLNK	B-cell linker
BRDG1	BCR downstream signaling 1
BTK	Bruton agammaglobulinemia Tyrosine Kinase
CAAX	Cys-Aliphatic-Aliphatic-any residue
CAM	Cell Adhesion Molecule
CAMKK2	CaM-kinase kinase 2
Cdc42	Cell division cycle 42
CDK	Cycline Dependent Kinase
Ced	Cell death abnormal
CHO	Chinese Hamster Ovary cells
Cobl	Cordon-bleu
CSK	C-Src tyrosine Kinase
DAPP1	Dual Adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides
Dbl	Diffuse B-cell-Lymphoma
DCC	Deleted in Colorectal Carcinoma
DH	Dbl Homology domain
DHR-1	Dock Homology Region 1
DHR-2	Dock Homology Region 2
Dock180	Downstream of Crk with molecular weight of 180 kDa
DTT	Dithiothreitol
Duf	Dumfounded
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	EGF Receptor
ERM	Ezrin/Radixin/Moesin
FAK	Focal Adhesion Kinase

FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
GAP	GTPase Activating Proteins
Gas 6	Product of Growth Arrest-Specific gene 6
GDI	Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor
GDP	Guanosine 5'-diphosphate
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GST	Glutathione S-transferase
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
Hck	Hematopoietic cell kinase
HRG	Heregulin
HSPC300	Heamatopoietic Stem Progenitor Cell 300
ILK	Integrin-Linked Kinase
ITK	Inducible T-cell Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinases
KO	Knock Out
LG	Laminin G-like
LR73	Chinese Hamster Ovary cells
MAP	Mitogen activating Protein
MAPK	MAP Kinase
MAPKK	MAPK Kinase
MBC	Myoblast City
Mer	Monocytes, epihelial and reproductive tissus
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIST	Mast cell Immunoreceptor Signal Transducer
MMP	Matrix Metalloproteinases
MuSK	Muscle-Specific Kinase
Nap	Nck-associated protein
NFκB	Nuclear Factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
PA	Phosphatidic Acid
PAK	P21 Associated Kinase
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR	PDGF Receptor
PFTAIRE1	PFTAIRE protein kinase 1
PH	Pleckstrin Homology domain

PI3K	Phosphoinositide 3-kinases
PIP ₂	phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate
PIP ₃	phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate
PIR121	P53 Inducible mRNA 121
PRP4	Pre-mRNA Processing factor 4
PS	serine
PSR	PS Receptor
PTB	Phospho-Tyrosine Binding domain
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome TEN
PVR	PDGFR and VEGFR Related receptor
p130Cas	Crk-associated substrate
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RCS	Royal College of Surgeons
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
RT-PCR	Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction
SCAR	Suppressor of cAMP Receptor
SDS-PAGE	Sodium Dodecil Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SH2	Src-Homology domain 2
SHC1	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1
SHD	Src Homology 2 domain containing transforming protein D
shRNA	Short hairpin RNA
SNS	Sticks and Stones
Src	a short for sarcoma
TENC1	Tensin like C1 domain containing phosphatase
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix metalloproteinases
TLR	Tool Like Receptor
TTBK2	Tau Tubulin Kinase 2
Tyro3	Tyrosine kinase gene 3
uPA	urokinase-type Plasminogen Activator
uPAR	uPA Receptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	VEGF Receptor
vSMC	vascular Smooth Muscle Cell
WAVE	WASP family VEprolin homology
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
WH2	WASP-Homology 2

8 Liste des références

1. Allen, M.P., Linseman, D.A., Udo, H., Xu, M., Schaack, J.B., Varnum, B., Kandel, E.R., Heidenreich, K.A. & Wierman, M.E. Novel mechanism for gonadotropin-releasing hormone neuronal migration involving Gas6/Ark signaling to p38 mitogen-activated protein kinase. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 599-613 (2002).
2. Nielsen-Preiss, S.M., Allen, M.P., Xu, M., Linseman, D.A., Pawlowski, J.E., Bouchard, R.J., Varnum, B.C., Heidenreich, K.A. & Wierman, M.E. Adhesion-related kinase induction of migration requires phosphatidylinositol-3-kinase and ras stimulation of rac activity in immortalized gonadotropin-releasing hormone neuronal cells. *Endocrinology* **148**, 2806-14 (2007).
3. Pierce, A., Bliesner, B., Xu, M., Nielsen-Preiss, S., Lemke, G., Tobet, S. & Wierman, M.E. Axl and Tyro3 modulate female reproduction by influencing gonadotropin-releasing hormone neuron survival and migration. *Molecular Endocrinology* **22**, 2481-95 (2008).
4. Linger, R.M., Keating, A.K., Earp, H.S. & Graham, D.K. TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Advances in Cancer Research* **100**, 35-83 (2008).
5. Mehlen, P. & Puisieux, A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* **6**, 449-58 (2006).
6. Condeelis, J. & Segall, J.E. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer* **3**, 921-30 (2003).
7. Cote, J.F. & Vuori, K. GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends in Cell Biology* **17**, 383-93 (2007).
8. Komander, D., Patel, M., Laurin, M., Fradet, N., Pelletier, A., Barford, D. & Cote, J.F. An alpha-helical extension of the ELMO1 pleckstrin homology domain mediates direct interaction to DOCK180 and is critical in Rac signaling. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 4837-51 (2008).
9. Schnorrer, F. & Dickson, B.J. Muscle building; mechanisms of myotube guidance and attachment site selection. *Dev Cell* **7**, 9-20 (2004).
10. Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (ed. Flammarion, M.-S.) (Paris, 1999).
11. Friedl, P. & Brocker, E.B. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**, 41-64 (2000).
12. Bianco, A., Poukkula, M., Cliffe, A., Mathieu, J., Luque, C.M., Fulga, T.A. & Rorth, P. Two distinct modes of guidance signalling during collective migration of border cells. *Nature* **448**, 362-5 (2007).
13. Friedl, P. & Gilmour, D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 445-57 (2009).
14. Pals, S.T., de Gorter, D.J. & Spaargaren, M. Lymphoma dissemination: the other face of lymphocyte homing. *Blood* **110**, 3102-11 (2007).

15. Friedl, P., Zanker, K.S. & Brocker, E.B. Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microscopy Research and Technique* **43**, 369-78 (1998).
16. Friedl, P., Borgmann, S. & Brocker, E.B. Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement. *Journal of Leukocyte Biology* **70**, 491-509 (2001).
17. Sabeh, F., Shimizu-Hirota, R. & Weiss, S.J. Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *Journal of Cell Biology* **185**, 11-9 (2009).
18. Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., Pinner, S., Sahai, E. & Marshall, C.J. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* **135**, 510-23 (2008).
19. Goldman, R.D., Grin, B., Mendez, M.G. & Kuczmarski, E.R. Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure. *Current Opinion in Cell Biology* **20**, 28-34 (2008).
20. Pampaloni, F. & Florin, E.L. Microtubule architecture: inspiration for novel carbon nanotube-based biomimetic materials. *Trends in Biotechnology* **26**, 302-10 (2008).
21. Jaffe, A.B. & Hall, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**, 247-69 (2005).
22. Frieden, C. Polymerization of actin: mechanism of the Mg²⁺-induced process at pH 8 and 20 degrees C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 6513-7 (1983).
23. Pollard, T.D. & Berro, J. Mathematical models and simulations of cellular processes based on actin filaments. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 5433-7 (2009).
24. Higgs, H.N. & Pollard, T.D. Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annual Review of Biochemistry* **70**, 649-76 (2001).
25. Kelleher, J.F., Atkinson, S.J. & Pollard, T.D. Sequences, structural models, and cellular localization of the actin-related proteins Arp2 and Arp3 from Acanthamoeba. *Journal of Cell Biology* **131**, 385-97 (1995).
26. Chhabra, E.S. & Higgs, H.N. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol* **9**, 1110-21 (2007).
27. Wallar, B.J. & Alberts, A.S. The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends in Cell Biology* **13**, 435-46 (2003).
28. Rosales-Nieves, A.E., Johndrow, J.E., Keller, L.C., Magie, C.R., Pinto-Santini, D.M. & Parkhurst, S.M. Coordination of microtubule and microfilament dynamics by Drosophila Rho1, Spire and Cappuccino. *Nat Cell Biol* **8**, 367-76 (2006).
29. Ahuja, R., Pinyol, R., Reichenbach, N., Custer, L., Klingensmith, J., Kessels, M.M. & Qualmann, B. Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell* **131**, 337-50 (2007).
30. Renault, L., Bugyi, B. & Carrier, M.F. Spire and Cordon-bleu: multifunctional regulators of actin dynamics. *Trends in Cell Biology* **18**, 494-504 (2008).

31. Quinlan, M.E., Heuser, J.E., Kerkhoff, E. & Mullins, R.D. Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature* **433**, 382-8 (2005).
32. Bosch, M., Le, K.H., Bugyi, B., Correia, J.J., Renault, L. & Carlier, M.F. Analysis of the function of Spire in actin assembly and its synergy with formin and profilin. *Molecular Cell* **28**, 555-68 (2007).
33. Naumanen, P., Lappalainen, P. & Hotulainen, P. Mechanisms of actin stress fibre assembly. *Journal of Microscopy* **231**, 446-54 (2008).
34. Wennerberg, K., Rossman, K.L. & Der, C.J. The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science* **118**, 843-6 (2005).
35. Meller, N., Merlot, S. & Guda, C. CZH proteins: a new family of Rho-GEFs. *Journal of Cell Science* **118**, 4937-46 (2005).
36. Hall, A. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochemical Society Transactions* **33**, 891-5 (2005).
37. Huvneers, S. & Danen, E.H. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *Journal of Cell Science* **122**, 1059-69 (2009).
38. Keely, P.J., Westwick, J.K., Whitehead, I.P., Der, C.J. & Parise, L.V. Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* **390**, 632-6 (1997).
39. Srivastava, S.K., Wheelock, R.H., Aaronson, S.A. & Eva, A. Identification of the protein encoded by the human diffuse B-cell lymphoma (dbl) oncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 8868-72 (1986).
40. Hart, M.J., Eva, A., Evans, T., Aaronson, S.A. & Cerione, R.A. Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. *Nature* **354**, 311-4 (1991).
41. Rossman, K.L., Der, C.J. & Sondek, J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 167-80 (2005).
42. Zheng, Y. Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 724-32 (2001).
43. Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S.F., Tosello-Tramont, A.C., Macara, I.G., Madhani, H., Fink, G.R. & Ravichandran, K.S. Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol* **4**, 574-82 (2002).
44. Cote, J.F. & Vuori, K. Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *Journal of Cell Science* **115**, 4901-13 (2002).
45. Meller, N., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W.B., Del Pozo, M.A. & Schwartz, M.A. Zizimin1, a novel Cdc42 activator, reveals a new GEF domain for Rho proteins. *Nat Cell Biol* **4**, 639-47 (2002).
46. Cote, J.F., Motoyama, A.B., Bush, J.A. & Vuori, K. A novel and evolutionarily conserved PtdIns(3,4,5)P₃-binding domain is necessary for DOCK180 signalling. *Nat Cell Biol* **7**, 797-807 (2005).
47. Nishikimi, A., Fukuhara, H., Su, W., Hongu, T., Takasuga, S., Mihara, H., Cao, Q., Sanematsu, F., Kanai, M., Hasegawa, H., Tanaka, Y., Shibasaki, M., Kanaho, Y., Sasaki, T., Frohman, M.A. & Fukui, Y. Sequential

- regulation of DOCK2 dynamics by two phospholipids during neutrophil chemotaxis. *Science* **324**, 384-7 (2009).
48. Kanai, A., Ihara, S., Ohdaira, T., Shinohara-Kanda, A., Iwamatsu, A. & Fukui, Y. Identification of DOCK4 and its splicing variant as PIP3 binding proteins. *IUBMB Life* **60**, 467-72 (2008).
 49. Cote, J.F. & Vuori, K. Cell biology. Two lipids that give direction. *Science* **324**, 346-7 (2009).
 50. Kuramoto, K., Negishi, M. & Katoh, H. Regulation of dendrite growth by the Cdc42 activator Zizimin1/Dock9 in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Research* **87**, 1794-805 (2009).
 51. Watabe-Uchida, M., John, K.A., Janas, J.A., Newey, S.E. & Van Aelst, L. The Rac activator DOCK7 regulates neuronal polarity through local phosphorylation of stathmin/Op18. *Neuron* **51**, 727-39 (2006).
 52. Hiramoto, K., Negishi, M. & Katoh, H. Dock4 is regulated by RhoG and promotes Rac-dependent cell migration. *Experimental Cell Research* **312**, 4205-16 (2006).
 53. Yajnik, V., Paulding, C., Sordella, R., McClatchey, A.I., Saito, M., Wahrer, D.C., Reynolds, P., Bell, D.W., Lake, R., van den Heuvel, S., Settleman, J. & Haber, D.A. DOCK4, a GTPase activator, is disrupted during tumorigenesis. *Cell* **112**, 673-84 (2003).
 54. Miyamoto, Y., Yamauchi, J., Sanbe, A. & Tanoue, A. Dock6, a Dock-C subfamily guanine nucleotide exchanger, has the dual specificity for Rac1 and Cdc42 and regulates neurite outgrowth. *Experimental Cell Research* **313**, 791-804 (2007).
 55. Lin, Q., Yang, W., Baird, D., Feng, Q. & Cerione, R.A. Identification of a DOCK180-related guanine nucleotide exchange factor that is capable of mediating a positive feedback activation of Cdc42. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 35253-62 (2006).
 56. Nishikimi, A., Meller, N., Uekawa, N., Isobe, K., Schwartz, M.A. & Maruyama, M. Zizimin2: a novel, DOCK180-related Cdc42 guanine nucleotide exchange factor expressed predominantly in lymphocytes. *FEBS Letters* **579**, 1039-46 (2005).
 57. Grimsley, C.M., Kinchen, J.M., Tosello-Tramont, A.C., Brugnera, E., Haney, L.B., Lu, M., Chen, Q., Klingele, D., Hengartner, M.O. & Ravichandran, K.S. Dock180 and ELMO1 proteins cooperate to promote evolutionarily conserved Rac-dependent cell migration. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 6087-97 (2004).
 58. Lu, M., Kinchen, J.M., Rossman, K.L., Grimsley, C., Hall, M., Sondek, J., Hengartner, M.O., Yajnik, V. & Ravichandran, K.S. A Steric-inhibition model for regulation of nucleotide exchange via the Dock180 family of GEFs. *Current Biology* **15**, 371-7 (2005).
 59. Gumienny, T.L., Brugnera, E., Tosello-Tramont, A.C., Kinchen, J.M., Haney, L.B., Nishiwaki, K., Walk, S.F., Nemergut, M.E., Macara, I.G., Francis, R., Schedl, T., Qin, Y., Van Aelst, L., Hengartner, M.O. & Ravichandran, K.S. CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell* **107**, 27-41 (2001).

60. Lu, M., Kinchen, J.M., Rossman, K.L., Grimsley, C., deBakker, C., Brugnera, E., Tosello-Tramont, A.C., Haney, L.B., Klingele, D., Sondek, J., Hengartner, M.O. & Ravichandran, K.S. PH domain of ELMO functions in trans to regulate Rac activation via Dock180. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 756-62 (2004).
61. Lu, M. & Ravichandran, K.S. Dock180-ELMO cooperation in Rac activation. *Methods in Enzymology* **406**, 388-402 (2006).
62. Makino, Y., Tsuda, M., Ichihara, S., Watanabe, T., Sakai, M., Sawa, H., Nagashima, K., Hatakeyama, S. & Tanaka, S. Elmo1 inhibits ubiquitylation of Dock180. *Journal of Cell Science* **119**, 923-32 (2006).
63. Moon, S.Y. & Zheng, Y. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends in Cell Biology* **13**, 13-22 (2003).
64. Bernards, A. & Settleman, J. GAPs in growth factor signalling. *Growth Factors* **23**, 143-9 (2005).
65. Schmandke, A. & Strittmatter, S.M. ROCK and Rho: biochemistry and neuronal functions of Rho-associated protein kinases. *Neuroscientist* **13**, 454-69 (2007).
66. Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A.V., Mann, M. & Kirschner, M.W. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* **418**, 790-3 (2002).
67. Takenawa, T. & Miki, H. WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *Journal of Cell Science* **114**, 1801-9 (2001).
68. Ibarra, N., Pollitt, A. & Insall, R.H. Regulation of actin assembly by SCAR/WAVE proteins. *Biochemical Society Transactions* **33**, 1243-6 (2005).
69. Blagg, S.L., Stewart, M., Sambles, C. & Insall, R.H. PIR121 regulates pseudopod dynamics and SCAR activity in Dictyostelium. *Current Biology* **13**, 1480-7 (2003).
70. Innocenti, M., Zucconi, A., Disanza, A., Frittoli, E., Areces, L.B., Steffen, A., Stradal, T.E., Di Fiore, P.P., Carlier, M.F. & Scita, G. Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat Cell Biol* **6**, 319-27 (2004).
71. Steffen, A., Rottner, K., Ehinger, J., Innocenti, M., Scita, G., Wehland, J. & Stradal, T.E. Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO Journal* **23**, 749-59 (2004).
72. Bokoch, G.M. Biology of the p21-activated kinases. *Annual Review of Biochemistry* **72**, 743-81 (2003).
73. Katoh, H., Fujimoto, S., Ishida, C., Ishikawa, Y. & Negishi, M. Differential distribution of ELMO1 and ELMO2 mRNAs in the developing mouse brain. *Brain Research* **1073-1074**, 103-8 (2006).
74. Katoh, H. & Negishi, M. RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo. *Nature* **424**, 461-4 (2003).
75. Grimsley, C.M., Lu, M., Haney, L.B., Kinchen, J.M. & Ravichandran, K.S. Characterization of a novel interaction between ELMO1 and ERM proteins. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 5928-37 (2006).

76. Ho, E., Irvine, T., Vilk, G.J., Lajoie, G., Ravichandran, K.S., D'Souza, S.J. & Dagnino, L. Integrin-linked kinase interactions with ELMO2 modulate cell polarity. *Molecular Biology of the Cell* **20**, 3033-43 (2009).
77. Katoh, H., Hiramoto, K. & Negishi, M. Activation of Rac1 by RhoG regulates cell migration. *Journal of Cell Science* **119**, 56-65 (2006).
78. Vigorito, E., Bell, S., Hebeis, B.J., Reynolds, H., McAdam, S., Emson, P.C., McKenzie, A. & Turner, M. Immunological function in mice lacking the Rac-related GTPase RhoG. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 719-29 (2004).
79. Meller, J., Vidali, L. & Schwartz, M.A. Endogenous RhoG is dispensable for integrin-mediated cell spreading but contributes to Rac-independent migration. *Journal of Cell Science* **121**, 1981-9 (2008).
80. Bretscher, A., Edwards, K. & Fehon, R.G. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 586-99 (2002).
81. Mangeat, P., Roy, C. & Martin, M. ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends in Cell Biology* **9**, 187-92 (1999).
82. Tsukita, S. & Yonemura, S. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 34507-10 (1999).
83. Ellis, R.E., Jacobson, D.M. & Horvitz, H.R. Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **129**, 79-94 (1991).
84. Chung, S., Gumienny, T.L., Hengartner, M.O. & Driscoll, M. A common set of engulfment genes mediates removal of both apoptotic and necrotic cell corpses in *C. elegans*. *Nat Cell Biol* **2**, 931-7 (2000).
85. Reddien, P.W. & Horvitz, H.R. The engulfment process of programmed cell death in *caenorhabditis elegans*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **20**, 193-221 (2004).
86. Wang, X., Wu, Y.C., Fadok, V.A., Lee, M.C., Gengyo-Ando, K., Cheng, L.C., Ledwich, D., Hsu, P.K., Chen, J.Y., Chou, B.K., Henson, P., Mitani, S. & Xue, D. Cell corpse engulfment mediated by *C. elegans* phosphatidylserine receptor through CED-5 and CED-12. *Science* **302**, 1563-6 (2003).
87. Wu, Y.C. & Horvitz, H.R. *C. elegans* phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180. *Nature* **392**, 501-4 (1998).
88. Rushton, E., Drysdale, R., Abmayr, S.M., Michelson, A.M. & Bate, M. Mutations in a novel gene, myoblast city, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for *Drosophila* muscle development. *Development* **121**, 1979-88 (1995).
89. Erickson, M.R., Galletta, B.J. & Abmayr, S.M. *Drosophila* myoblast city encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure, and cytoskeletal organization. *Journal of Cell Biology* **138**, 589-603 (1997).
90. Geisbrecht, E.R., Haralalka, S., Swanson, S.K., Florens, L., Washburn, M.P. & Abmayr, S.M. *Drosophila* ELMO/CED-12 interacts with Myoblast city to direct myoblast fusion and ommatidial organization. *Developmental Biology* **314**, 137-49 (2008).

91. Laurin, M., Fradet, N., Blangy, A., Hall, A., Vuori, K. & Cote, J.F. The atypical Rac activator Dock180 (Dock1) regulates myoblast fusion in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 15446-51 (2008).
92. Tosello-Tramont, A.C., Kinchen, J.M., Brugnera, E., Haney, L.B., Hengartner, M.O. & Ravichandran, K.S. Identification of two signaling submodules within the CrkII/ELMO/Dock180 pathway regulating engulfment of apoptotic cells. *Cell Death and Differentiation* **14**, 963-72 (2007).
93. Park, D., Tosello-Tramont, A.C., Elliott, M.R., Lu, M., Haney, L.B., Ma, Z., Klibanov, A.L., Mandell, J.W. & Ravichandran, K.S. BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature* **450**, 430-4 (2007).
94. Somersan, S. & Bhardwaj, N. Tethering and tickling: a new role for the phosphatidylserine receptor. *Journal of Cell Biology* **155**, 501-4 (2001).
95. Li, X., Gao, X., Liu, G., Xiong, W., Wu, J. & Rao, Y. Netrin signal transduction and the guanine nucleotide exchange factor DOCK180 in attractive signaling. *Nature Neuroscience* **11**, 28-35 (2008).
96. Hynes, R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-87 (2002).
97. Gustavsson, A., Yuan, M. & Fallman, M. Temporal dissection of beta1-integrin signaling indicates a role for p130Cas-Crk in filopodia formation. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 22893-901 (2004).
98. Hehlhans, S., Haase, M. & Cordes, N. Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochimica et Biophysica Acta* **1775**, 163-80 (2007).
99. McDonald, P.C., Fielding, A.B. & Dedhar, S. Integrin-linked kinase--essential roles in physiology and cancer biology. *Journal of Cell Science* **121**, 3121-32 (2008).
100. Kjoller, L. & Hall, A. Rac mediates cytoskeletal rearrangements and increased cell motility induced by urokinase-type plasminogen activator receptor binding to vitronectin. *Journal of Cell Biology* **152**, 1145-57 (2001).
101. Smith, H.W., Marra, P. & Marshall, C.J. uPAR promotes formation of the p130Cas-Crk complex to activate Rac through DOCK180. *Journal of Cell Biology* **182**, 777-90 (2008).
102. Abmayr, S.M., Zhuang, S. & Geisbrecht, E.R. Myoblast fusion in *Drosophila*. *Methods in Molecular Biology* **475**, 75-97 (2008).
103. Kim, S., Shilagardi, K., Zhang, S., Hong, S.N., Sens, K.L., Bo, J., Gonzalez, G.A. & Chen, E.H. A critical function for the actin cytoskeleton in targeted exocytosis of prefusion vesicles during myoblast fusion. *Dev Cell* **12**, 571-86 (2007).
104. Scott, M.P., Zappacosta, F., Kim, E.Y., Annan, R.S. & Miller, W.T. Identification of novel SH3 domain ligands for the Src family kinase Hck. Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP), WASP-interacting protein (WIP), and ELMO1. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 28238-46 (2002).

105. Yokoyama, N., deBakker, C.D., Zappacosta, F., Huddleston, M.J., Annan, R.S., Ravichandran, K.S. & Miller, W.T. Identification of tyrosine residues on ELMO1 that are phosphorylated by the Src-family kinase Hck. *Biochemistry* **44**, 8841-9 (2005).
106. Rush, J., Moritz, A., Lee, K.A., Guo, A., Goss, V.L., Spek, E.J., Zhang, H., Zha, X.M., Polakiewicz, R.D. & Comb, M.J. Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nature Biotechnology* **23**, 94-101 (2005).
107. Mayya, V., Lundgren, D.H., Hwang, S.I., Rezaul, K., Wu, L., Eng, J.K., Rodionov, V. & Han, D.K. Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions. *Sci Signal* **2**, ra46 (2009).
108. Zhang, Y., Wolf-Yadlin, A., Ross, P.L., Pappin, D.J., Rush, J., Lauffenburger, D.A. & White, F.M. Time-resolved mass spectrometry of tyrosine phosphorylation sites in the epidermal growth factor receptor signaling network reveals dynamic modules. *Mol Cell Proteomics* **4**, 1240-50 (2005).
109. Wolf-Yadlin, A., Kumar, N., Zhang, Y., Hautaniemi, S., Zaman, M., Kim, H.D., Grantcharova, V., Lauffenburger, D.A. & White, F.M. Effects of HER2 overexpression on cell signaling networks governing proliferation and migration. *Mol Syst Biol* **2**, 54 (2006).
110. Wolf-Yadlin, A., Hautaniemi, S., Lauffenburger, D.A. & White, F.M. Multiple reaction monitoring for robust quantitative proteomic analysis of cellular signaling networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 5860-5 (2007).
111. Ballif, B.A., Carey, G.R., Sunyaev, S.R. & Gygi, S.P. Large-scale identification and evolution indexing of tyrosine phosphorylation sites from murine brain. *J Proteome Res* **7**, 311-8 (2008).
112. Luo, W., Slebos, R.J., Hill, S., Li, M., Brabek, J., Amanchy, R., Chaerkady, R., Pandey, A., Ham, A.J. & Hanks, S.K. Global impact of oncogenic Src on a phosphotyrosine proteome. *J Proteome Res* **7**, 3447-60 (2008).
113. Huang, P.H., Mukasa, A., Bonavia, R., Flynn, R.A., Brewer, Z.E., Cavenee, W.K., Furnari, F.B. & White, F.M. Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 12867-72 (2007).
114. Cao, L., Yu, K., Banh, C., Nguyen, V., Ritz, A., Raphael, B.J., Kawakami, Y., Kawakami, T. & Salomon, A.R. Quantitative time-resolved phosphoproteomic analysis of mast cell signaling. *Journal of Immunology* **179**, 5864-76 (2007).
115. Rikova, K., Guo, A., Zeng, Q., Possemato, A., Yu, J., Haack, H., Nardone, J., Lee, K., Reeves, C., Li, Y., Hu, Y., Tan, Z., Stokes, M., Sullivan, L., Mitchell, J., Wetzel, R., Macneill, J., Ren, J.M., Yuan, J., Bakalarski, C.E., Villen, J., Kornhauser, J.M., Smith, B., Li, D., Zhou, X., Gygi, S.P., Gu, T.L., Polakiewicz, R.D., Rush, J. & Comb, M.J. Global survey of

- phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* **131**, 1190-203 (2007).
116. Guo, A., Villen, J., Kornhauser, J., Lee, K.A., Stokes, M.P., Rikova, K., Possemato, A., Nardone, J., Innocenti, G., Wetzel, R., Wang, Y., MacNeill, J., Mitchell, J., Gygi, S.P., Rush, J., Polakiewicz, R.D. & Comb, M.J. Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 692-7 (2008).
 117. Jarzynka, M.J., Hu, B., Hui, K.M., Bar-Joseph, I., Gu, W., Hirose, T., Haney, L.B., Ravichandran, K.S., Nishikawa, R. & Cheng, S.Y. ELMO1 and Dock180, a bipartite Rac1 guanine nucleotide exchange factor, promote human glioma cell invasion. *Cancer Research* **67**, 7203-11 (2007).
 118. Chen, M., Sinha, M., Luxon, B.A., Bresnick, A.R. & O'Connor, K.L. Integrin alpha6beta4 controls the expression of genes associated with cell motility, invasion, and metastasis, including S100A4/metastasin. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 1484-94 (2009).
 119. Gadea, G., Sanz-Moreno, V., Self, A., Godi, A. & Marshall, C.J. DOCK10-mediated Cdc42 activation is necessary for amoeboid invasion of melanoma cells. *Current Biology* **18**, 1456-65 (2008).
 120. Kuo, K.T., Guan, B., Feng, Y., Mao, T.L., Chen, X., Jinawath, N., Wang, Y., Kurman, R.J., Shih Ie, M. & Wang, T.L. Analysis of DNA copy number alterations in ovarian serous tumors identifies new molecular genetic changes in low-grade and high-grade carcinomas. *Cancer Research* **69**, 4036-42 (2009).
 121. Schiller, M.R. Coupling receptor tyrosine kinases to Rho GTPases--GEFs what's the link. *Cellular Signalling* **18**, 1834-43 (2006).
 122. Ambrogio, C., Voena, C., Manazza, A.D., Martinengo, C., Costa, C., Kirchhausen, T., Hirsch, E., Inghirami, G. & Chiarle, R. The anaplastic lymphoma kinase controls cell shape and growth of anaplastic large cell lymphoma through Cdc42 activation. *Cancer Research* **68**, 8899-907 (2008).
 123. Colomba, A., Courilleau, D., Ramel, D., Billadeau, D.D., Espinos, E., Delsol, G., Payrastre, B. & Gaits-Iacovoni, F. Activation of Rac1 and the exchange factor Vav3 are involved in NPM-ALK signaling in anaplastic large cell lymphomas. *Oncogene* **27**, 2728-36 (2008).
 124. Cowan, C.W., Shao, Y.R., Sahin, M., Shamah, S.M., Lin, M.Z., Greer, P.L., Gao, S., Griffith, E.C., Brugge, J.S. & Greenberg, M.E. Vav family GEFs link activated Ephs to endocytosis and axon guidance. *Neuron* **46**, 205-17 (2005).
 125. Liu, B.P. & Burridge, K. Vav2 activates Rac1, Cdc42, and RhoA downstream from growth factor receptors but not beta1 integrins. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 7160-9 (2000).
 126. Zeng, L., Sachdev, P., Yan, L., Chan, J.L., Trenkle, T., McClelland, M., Welsh, J. & Wang, L.H. Vav3 mediates receptor protein tyrosine kinase signaling, regulates GTPase activity, modulates cell morphology, and

- induces cell transformation. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 9212-24 (2000).
127. Tamas, P., Solti, Z., Bauer, P., Illes, A., Sipeki, S., Bauer, A., Farago, A., Downward, J. & Buday, L. Mechanism of epidermal growth factor regulation of Vav2, a guanine nucleotide exchange factor for Rac. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 5163-71 (2003).
 128. Mahajan, N.P. & Earp, H.S. An SH2 domain-dependent, phosphotyrosine-independent interaction between Vav1 and the Mer receptor tyrosine kinase: a mechanism for localizing guanine nucleotide-exchange factor action. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 42596-603 (2003).
 129. Bellosta, P., Costa, M., Lin, D.A. & Basilico, C. The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 614-25 (1995).
 130. Lai, C. & Lemke, G. An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system. *Neuron* **6**, 691-704 (1991).
 131. Ohashi, K., Mizuno, K., Kuma, K., Miyata, T. & Nakamura, T. Cloning of the cDNA for a novel receptor tyrosine kinase, Sky, predominantly expressed in brain. *Oncogene* **9**, 699-705 (1994).
 132. Fujimoto, J. & Yamamoto, T. brt, a mouse gene encoding a novel receptor-type protein-tyrosine kinase, is preferentially expressed in the brain. *Oncogene* **9**, 693-8 (1994).
 133. Mark, M.R., Scadden, D.T., Wang, Z., Gu, Q., Goddard, A. & Godowski, P.J. rse, a novel receptor-type tyrosine kinase with homology to Axl/Ufo, is expressed at high levels in the brain. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 10720-8 (1994).
 134. Biesecker, L.G., Gottschalk, L.R. & Emerson, S.G. Identification of four murine cDNAs encoding putative protein kinases from primitive embryonic stem cells differentiated in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 7044-8 (1993).
 135. Biscardi, J.S., Denhez, F., Buehler, G.F., Chesnutt, D.A., Baragona, S.C., O'Bryan, J.P., Der, C.J., Fiordalisi, J.J., Fults, D.W. & Maness, P.F. Rek, a gene expressed in retina and brain, encodes a receptor tyrosine kinase of the Axl/Tyro3 family. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 29049-59 (1996).
 136. Crosier, P.S., Lewis, P.M., Hall, L.R., Vitas, M.R., Morris, C.M., Beier, D.R., Wood, C.R. & Crosier, K.E. Isolation of a receptor tyrosine kinase (DTK) from embryonic stem cells: structure, genetic mapping and analysis of expression. *Growth Factors* **11**, 125-36 (1994).
 137. Dai, W., Pan, H., Hassanain, H., Gupta, S.L. & Murphy, M.J., Jr. Molecular cloning of a novel receptor tyrosine kinase, tif, highly expressed in human ovary and testis. *Oncogene* **9**, 975-9 (1994).
 138. O'Bryan, J.P., Frye, R.A., Cogswell, P.C., Neubauer, A., Kitch, B., Prokop, C., Espinosa, R., 3rd, Le Beau, M.M., Earp, H.S. & Liu, E.T. axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Molecular and Cellular Biology* **11**, 5016-31 (1991).

139. Rescigno, J., Mansukhani, A. & Basilico, C. A putative receptor tyrosine kinase with unique structural topology. *Oncogene* **6**, 1909-13 (1991).
140. Janssen, J.W., Schulz, A.S., Steenvoorden, A.C., Schmidberger, M., Strehl, S., Ambros, P.F. & Bartram, C.R. A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene* **6**, 2113-20 (1991).
141. Graham, D.K., Dawson, T.L., Mullaney, D.L., Snodgrass, H.R. & Earp, H.S. Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer. *Cell Growth and Differentiation* **5**, 647-57 (1994).
142. Jia, R. & Hanafusa, H. The proto-oncogene of v-eyk (v-ryk) is a novel receptor-type protein tyrosine kinase with extracellular Ig/GN-III domains. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 1839-44 (1994).
143. Ling, L. & Kung, H.J. Mitogenic signals and transforming potential of Nyk, a newly identified neural cell adhesion molecule-related receptor tyrosine kinase. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 6582-92 (1995).
144. Hafizi, S. & Dahlback, B. Signalling and functional diversity within the Axl subfamily of receptor tyrosine kinases. *Cytokine and Growth Factor Reviews* **17**, 295-304 (2006).
145. Varnum, B.C., Young, C., Elliott, G., Garcia, A., Bartley, T.D., Fridell, Y.W., Hunt, R.W., Trail, G., Clogston, C., Toso, R.J. & et al. Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6. *Nature* **373**, 623-6 (1995).
146. Stenflo, J., Lundwall, A. & Dahlback, B. beta-Hydroxyasparagine in domains homologous to the epidermal growth factor precursor in vitamin K-dependent protein S. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 368-72 (1987).
147. Dahlback, B. & Villoutreix, B.O. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **25**, 1311-20 (2005).
148. Chen, J., Carey, K. & Godowski, P.J. Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation. *Oncogene* **14**, 2033-9 (1997).
149. Fisher, P.W., Brigham-Burke, M., Wu, S.J., Luo, J., Carton, J., Staquet, K., Gao, W., Jackson, S., Bethea, D., Chen, C., Hu, B., Giles-Komar, J. & Yang, J. A novel site contributing to growth-arrest-specific gene 6 binding to its receptors as revealed by a human monoclonal antibody. *Biochemical Journal* **387**, 727-35 (2005).
150. Mann, K.G. & Lawson, J.H. The role of the membrane in the expression of the vitamin K-dependent enzymes. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* **116**, 1330-6 (1992).
151. Wu, Y., Tibrewal, N. & Birge, R.B. Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends in Cell Biology* **16**, 189-97 (2006).
152. Stenhoff, J., Dahlback, B. & Hafizi, S. Vitamin K-dependent Gas6 activates ERK kinase and stimulates growth of cardiac fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **319**, 871-8 (2004).

153. Hasanbasic, I., Rajotte, I. & Blostein, M. The role of gamma-carboxylation in the anti-apoptotic function of gas6. *J Thromb Haemost* **3**, 2790-7 (2005).
154. Rajotte, I., Hasanbasic, I. & Blostein, M. Gas6-mediated signaling is dependent on the engagement of its gamma-carboxyglutamic acid domain with phosphatidylserine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **376**, 70-3 (2008).
155. Burchert, A., Attar, E.C., McCloskey, P., Fridell, Y.W. & Liu, E.T. Determinants for transformation induced by the Axl receptor tyrosine kinase. *Oncogene* **16**, 3177-87 (1998).
156. Taylor, I.C., Roy, S. & Varmus, H.E. Overexpression of the Sky receptor tyrosine kinase at the cell surface or in the cytoplasm results in ligand-independent activation. *Oncogene* **11**, 2619-26 (1995).
157. Geiger, B., Spatz, J.P. & Bershadsky, A.D. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 21-33 (2009).
158. Angelillo-Scherrer, A., de Frutos, P., Aparicio, C., Melis, E., Savi, P., Lupu, F., Arnout, J., Dewerchin, M., Hoylaerts, M., Herbert, J., Collen, D., Dahlback, B. & Carmeliet, P. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nature Medicine* **7**, 215-21 (2001).
159. Katagiri, M., Hakeda, Y., Chikazu, D., Ogasawara, T., Takato, T., Kumegawa, M., Nakamura, K. & Kawaguchi, H. Mechanism of stimulation of osteoclastic bone resorption through Gas6/Tyro 3, a receptor tyrosine kinase signaling, in mouse osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 7376-82 (2001).
160. Lai, C., Gore, M. & Lemke, G. Structure, expression, and activity of Tyro 3, a neural adhesion-related receptor tyrosine kinase. *Oncogene* **9**, 2567-78 (1994).
161. Lu, Q. & Lemke, G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science* **293**, 306-11 (2001).
162. Prasad, D., Rothlin, C.V., Burrola, P., Burstyn-Cohen, T., Lu, Q., Garcia de Frutos, P. & Lemke, G. TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Molecular and Cellular Neurosciences* **33**, 96-108 (2006).
163. Graham, D.K., Bowman, G.W., Dawson, T.L., Stanford, W.L., Earp, H.S. & Snodgrass, H.R. Cloning and developmental expression analysis of the murine c-mer tyrosine kinase. *Oncogene* **10**, 2349-59 (1995).
164. Neubauer, A., Fiebeler, A., Graham, D.K., O'Bryan, J.P., Schmidt, C.A., Barckow, P., Serke, S., Siegert, W., Snodgrass, H.R., Huhn, D. & et al. Expression of axl, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis. *Blood* **84**, 1931-41 (1994).
165. Behrens, E.M., Gadue, P., Gong, S.Y., Garrett, S., Stein, P.L. & Cohen, P.L. The mer receptor tyrosine kinase: expression and function suggest a role in innate immunity. *European Journal of Immunology* **33**, 2160-7 (2003).

166. Chan, M.C., Mather, J.P., McCray, G. & Lee, W.M. Identification and regulation of receptor tyrosine kinases Rse and Mer and their ligand Gas6 in testicular somatic cells. *Journal of Andrology* **21**, 291-302 (2000).
167. Crosier, P.S., Freeman, S.A., Orlic, D., Bodine, D.M. & Crosier, K.E. The Dtk receptor tyrosine kinase, which binds protein S, is expressed during hematopoiesis. *Experimental Hematology* **24**, 318-23 (1996).
168. Faust, M., Ebensperger, C., Schulz, A.S., Schleithoff, L., Hameister, H., Bartram, C.R. & Janssen, J.W. The murine ufo receptor: molecular cloning, chromosomal localization and in situ expression analysis. *Oncogene* **7**, 1287-93 (1992).
169. Lemke, G. & Lu, Q. Macrophage regulation by Tyro 3 family receptors. *Current Opinion in Immunology* **15**, 31-6 (2003).
170. Lu, Q., Gore, M., Zhang, Q., Camenisch, T., Boast, S., Casagrande, F., Lai, C., Skinner, M.K., Klein, R., Matsushima, G.K., Earp, H.S., Goff, S.P. & Lemke, G. Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature* **398**, 723-8 (1999).
171. D'Cruz, P.M., Yasumura, D., Weir, J., Matthes, M.T., Abderrahim, H., LaVail, M.M. & Vollrath, D. Mutation of the receptor tyrosine kinase gene MerTK in the retinal dystrophic RCS rat. *Human Molecular Genetics* **9**, 645-51 (2000).
172. Todt, J.C., Hu, B. & Curtis, J.L. The receptor tyrosine kinase MerTK activates phospholipase C gamma2 during recognition of apoptotic thymocytes by murine macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* **75**, 705-13 (2004).
173. Jennings, J.H., Linderman, D.J., Hu, B., Sonstein, J. & Curtis, J.L. Monocytes recruited to the lungs of mice during immune inflammation ingest apoptotic cells poorly. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **32**, 108-17 (2005).
174. Gal, A., Li, Y., Thompson, D.A., Weir, J., Orth, U., Jacobson, S.G., Apfelstedt-Sylla, E. & Vollrath, D. Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nature Genetics* **26**, 270-1 (2000).
175. Wu, Y., Singh, S., Georgescu, M.M. & Birge, R.B. A role for Mer tyrosine kinase in alphavbeta5 integrin-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *Journal of Cell Science* **118**, 539-53 (2005).
176. Lemke, G. & Rothlin, C.V. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol* **8**, 327-36 (2008).
177. Cohen, P.L., Caricchio, R., Abraham, V., Camenisch, T.D., Jennette, J.C., Roubey, R.A., Earp, H.S., Matsushima, G. & Reap, E.A. Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. *Journal of Experimental Medicine* **196**, 135-40 (2002).
178. O'Neill, L.A. TAMpering with toll-like receptor signaling. *Cell* **131**, 1039-41 (2007).
179. Rothlin, C.V., Ghosh, S., Zuniga, E.I., Oldstone, M.B. & Lemke, G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* **131**, 1124-36 (2007).

180. Nakamura, Y.S., Hakeda, Y., Takakura, N., Kameda, T., Hamaguchi, I., Miyamoto, T., Kakudo, S., Nakano, T., Kumegawa, M. & Suda, T. Tyro 3 receptor tyrosine kinase and its ligand, Gas6, stimulate the function of osteoclasts. *Stem Cells* **16**, 229-38 (1998).
181. Fang, Z., Xiong, X., James, A., Gordon, D.F. & Wierman, M.E. Identification of novel factors that regulate GnRH gene expression and neuronal migration. *Endocrinology* **139**, 3654-7 (1998).
182. Zhang, Y.X., Knyazev, P.G., Cheburkin, Y.V., Sharma, K., Knyazev, Y.P., Orfi, L., Szabadkai, I., Daub, H., Keri, G. & Ullrich, A. AXL is a potential target for therapeutic intervention in breast cancer progression. *Cancer Research* **68**, 1905-15 (2008).
183. Vajkoczy, P., Knyazev, P., Kunkel, A., Capelle, H.H., Behrndt, S., von Tengg-Kobligk, H., Kiessling, F., Eichelsbacher, U., Essig, M., Read, T.A., Erber, R. & Ullrich, A. Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 5799-804 (2006).
184. Koorstra, J.B., Karikari, C.A., Feldmann, G., Bisht, S., Rojas, P.L., Offerhaus, G.J., Alvarez, H. & Maitra, A. The Axl receptor tyrosine kinase confers an adverse prognostic influence in pancreatic cancer and represents a new therapeutic target. *Cancer Biol Ther* **8**, 618-26 (2009).
185. Holland, S.J., Powell, M.J., Franci, C., Chan, E.W., Frieria, A.M., Atchison, R.E., McLaughlin, J., Swift, S.E., Pali, E.S., Yam, G., Wong, S., Lasaga, J., Shen, M.R., Yu, S., Xu, W., Hitoshi, Y., Bogenberger, J., Nor, J.E., Payan, D.G. & Lorens, J.B. Multiple roles for the receptor tyrosine kinase axl in tumor formation. *Cancer Research* **65**, 9294-303 (2005).
186. Yeatman, T.J. A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer* **4**, 470-80 (2004).
187. McLean, G.W., Carragher, N.O., Avizienyte, E., Evans, J., Brunton, V.G. & Frame, M.C. The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer* **5**, 505-15 (2005).
188. Mon, N.N., Ito, S., Senga, T. & Hamaguchi, M. FAK signaling in neoplastic disorders: a linkage between inflammation and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1086**, 199-212 (2006).
189. Wright, J.H., Wang, X., Manning, G., LaMere, B.J., Le, P., Zhu, S., Khatry, D., Flanagan, P.M., Buckley, S.D., Whyte, D.B., Howlett, A.R., Bischoff, J.R., Lipson, K.E. & Jallal, B. The STE20 kinase HGK is broadly expressed in human tumor cells and can modulate cellular transformation, invasion, and adhesion. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 2068-82 (2003).
190. Collins, C.S., Hong, J., Sapinoso, L., Zhou, Y., Liu, Z., Micklash, K., Schultz, P.G. & Hampton, G.M. A small interfering RNA screen for modulators of tumor cell motility identifies MAP4K4 as a promigratory kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 3775-80 (2006).
191. Challier, C., Uphoff, C.C., Janssen, J.W. & Drexler, H.G. Differential expression of the ufo/axl oncogene in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia* **10**, 781-7 (1996).

192. Crosier, P.S., Hall, L.R., Vitas, M.R., Lewis, P.M. & Crosier, K.E. Identification of a novel receptor tyrosine kinase expressed in acute myeloid leukemic blasts. *Leukemia and Lymphoma* **18**, 443-9 (1995).
193. Liu, E., Hjelle, B. & Bishop, J.M. Transforming genes in chronic myelogenous leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 1952-6 (1988).
194. Rochlitz, C., Lohri, A., Bacchi, M., Schmidt, M., Nagel, S., Fopp, M., Fey, M.F., Herrmann, R. & Neubauer, A. Axl expression is associated with adverse prognosis and with expression of Bcl-2 and CD34 in de novo acute myeloid leukemia (AML): results from a multicenter trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Leukemia* **13**, 1352-8 (1999).
195. Graham, D.K., Salzberg, D.B., Kurtzberg, J., Sather, S., Matsushima, G.K., Keating, A.K., Liang, X., Lovell, M.A., Williams, S.A., Dawson, T.L., Schell, M.J., Anwar, A.A., Snodgrass, H.R. & Earp, H.S. Ectopic expression of the proto-oncogene Mer in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Cancer Research* **12**, 2662-9 (2006).
196. Yeoh, E.J., Ross, M.E., Shurtleff, S.A., Williams, W.K., Patel, D., Mahfouz, R., Behm, F.G., Raimondi, S.C., Relling, M.V., Patel, A., Cheng, C., Campana, D., Wilkins, D., Zhou, X., Li, J., Liu, H., Pui, C.H., Evans, W.E., Naeve, C., Wong, L. & Downing, J.R. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* **1**, 133-43 (2002).
197. Ek, S., Hogerkorp, C.M., Dictor, M., Ehinger, M. & Borrebaeck, C.A. Mantle cell lymphomas express a distinct genetic signature affecting lymphocyte trafficking and growth regulation as compared with subpopulations of normal human B cells. *Cancer Research* **62**, 4398-405 (2002).
198. De Vos, J., Couderc, G., Tarte, K., Jourdan, M., Requirand, G., Delteil, M.C., Rossi, J.F., Mechti, N. & Klein, B. Identifying intercellular signaling genes expressed in malignant plasma cells by using complementary DNA arrays. *Blood* **98**, 771-80 (2001).
199. Sun, W.S., Fujimoto, J. & Tamaya, T. Coexpression of growth arrest-specific gene 6 and receptor tyrosine kinases Axl and Sky in human uterine endometrial cancers. *Annals of Oncology* **14**, 898-906 (2003).
200. Lin, W.C., Li, A.F., Chi, C.W., Chung, W.W., Huang, C.L., Lui, W.Y., Kung, H.J. & Wu, C.W. tie-1 protein tyrosine kinase: a novel independent prognostic marker for gastric cancer. *Clinical Cancer Research* **5**, 1745-51 (1999).
201. Wu, C.W., Li, A.F., Chi, C.W., Lai, C.H., Huang, C.L., Lo, S.S., Lui, W.Y. & Lin, W.C. Clinical significance of AXL kinase family in gastric cancer. *Anticancer Research* **22**, 1071-8 (2002).
202. Craven, R.J., Xu, L.H., Weiner, T.M., Fridell, Y.W., Dent, G.A., Srivastava, S., Varnum, B., Liu, E.T. & Cance, W.G. Receptor tyrosine kinases expressed in metastatic colon cancer. *International Journal of Cancer* **60**, 791-7 (1995).

203. Jacob, A.N., Kalapurakal, J., Davidson, W.R., Kandpal, G., Dunson, N., Prashar, Y. & Kandpal, R.P. A receptor tyrosine kinase, UFO/Axl, and other genes isolated by a modified differential display PCR are overexpressed in metastatic prostatic carcinoma cell line DU145. *Cancer Detection and Prevention* **23**, 325-32 (1999).
204. Mahajan, N.P., Whang, Y.E., Mohler, J.L. & Earp, H.S. Activated tyrosine kinase Ack1 promotes prostate tumorigenesis: role of Ack1 in polyubiquitination of tumor suppressor Wwox. *Cancer Research* **65**, 10514-23 (2005).
205. Sainaghi, P.P., Castello, L., Bergamasco, L., Galletti, M., Bellosta, P. & Avanzi, G.C. Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *Journal of Cellular Physiology* **204**, 36-44 (2005).
206. Wu, Y.M., Robinson, D.R. & Kung, H.J. Signal pathways in up-regulation of chemokines by tyrosine kinase MER/NYK in prostate cancer cells. *Cancer Research* **64**, 7311-20 (2004).
207. Ito, T., Ito, M., Naito, S., Ohtsuru, A., Nagayama, Y., Kanematsu, T., Yamashita, S. & Sekine, I. Expression of the Axl receptor tyrosine kinase in human thyroid carcinoma. *Thyroid* **9**, 563-7 (1999).
208. Ito, M., Nakashima, M., Nakayama, T., Ohtsuru, A., Nagayama, Y., Takamura, N., Demedchik, E.P., Sekine, I. & Yamashita, S. Expression of receptor-type tyrosine kinase, Axl, and its ligand, Gas6, in pediatric thyroid carcinomas around chernobyl. *Thyroid* **12**, 971-5 (2002).
209. Tanaka, K., Nagayama, Y., Nakano, T., Takamura, N., Namba, H., Fukada, S., Kuma, K., Yamashita, S. & Niwa, M. Expression profile of receptor-type protein tyrosine kinase genes in the human thyroid. *Endocrinology* **139**, 852-8 (1998).
210. Shieh, Y.S., Lai, C.Y., Kao, Y.R., Shiah, S.G., Chu, Y.W., Lee, H.S. & Wu, C.W. Expression of axl in lung adenocarcinoma and correlation with tumor progression. *Neoplasia* **7**, 1058-64 (2005).
211. Wimmel, A., Glitz, D., Kraus, A., Roeder, J. & Schuermann, M. Axl receptor tyrosine kinase expression in human lung cancer cell lines correlates with cellular adhesion. *European Journal of Cancer* **37**, 2264-74 (2001).
212. Berclaz, G., Altermatt, H.J., Rohrbach, V., Kieffer, I., Dreher, E. & Andres, A.C. Estrogen dependent expression of the receptor tyrosine kinase axl in normal and malignant human breast. *Annals of Oncology* **12**, 819-24 (2001).
213. Meric, F., Lee, W.P., Sahin, A., Zhang, H., Kung, H.J. & Hung, M.C. Expression profile of tyrosine kinases in breast cancer. *Clinical Cancer Research* **8**, 361-7 (2002).
214. Zantek, N.D., Walker-Daniels, J., Stewart, J., Hansen, R.K., Robinson, D., Miao, H., Wang, B., Kung, H.J., Bissell, M.J. & Kinch, M.S. MCF-10A-NeoST: a new cell system for studying cell-ECM and cell-cell interactions in breast cancer. *Clinical Cancer Research* **7**, 3640-8 (2001).

215. Tavazoie, S.F., Alarcon, C., Oskarsson, T., Padua, D., Wang, Q., Bos, P.D., Gerald, W.L. & Massague, J. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* **451**, 147-52 (2008).
216. Macleod, K., Mullen, P., Sewell, J., Rabiasz, G., Lawrie, S., Miller, E., Smyth, J.F. & Langdon, S.P. Altered ErbB receptor signaling and gene expression in cisplatin-resistant ovarian cancer. *Cancer Research* **65**, 6789-800 (2005).
217. Sun, W., Fujimoto, J. & Tamaya, T. Coexpression of Gas6/Axl in human ovarian cancers. *Oncology* **66**, 450-7 (2004).
218. Tsou, A.P., Wu, K.M., Tsen, T.Y., Chi, C.W., Chiu, J.H., Lui, W.Y., Hu, C.P., Chang, C., Chou, C.K. & Tsai, S.F. Parallel hybridization analysis of multiple protein kinase genes: identification of gene expression patterns characteristic of human hepatocellular carcinoma. *Genomics* **50**, 331-40 (1998).
219. Chung, B.I., Malkowicz, S.B., Nguyen, T.B., Libertino, J.A. & McGarvey, T.W. Expression of the proto-oncogene Axl in renal cell carcinoma. *DNA and Cell Biology* **22**, 533-40 (2003).
220. Evans, C.O., Young, A.N., Brown, M.R., Brat, D.J., Parks, J.S., Neish, A.S. & Oyesiku, N.M. Novel patterns of gene expression in pituitary adenomas identified by complementary deoxyribonucleic acid microarrays and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86**, 3097-107 (2001).
221. Gyorffy, B. & Lage, H. A Web-based data warehouse on gene expression in human malignant melanoma. *Journal of Investigative Dermatology* **127**, 394-9 (2007).
222. Quong, R.Y., Bickford, S.T., Ing, Y.L., Terman, B., Herlyn, M. & Lassam, N.J. Protein kinases in normal and transformed melanocytes. *Melanoma Research* **4**, 313-9 (1994).
223. van Ginkel, P.R., Gee, R.L., Shearer, R.L., Subramanian, L., Walker, T.M., Albert, D.M., Meisner, L.F., Varnum, B.C. & Polans, A.S. Expression of the receptor tyrosine kinase Axl promotes ocular melanoma cell survival. *Cancer Research* **64**, 128-34 (2004).
224. Nakano, T., Tani, M., Ishibashi, Y., Kimura, K., Park, Y.B., Imaizumi, N., Tsuda, H., Aoyagi, K., Sasaki, H., Ohwada, S. & Yokota, J. Biological properties and gene expression associated with metastatic potential of human osteosarcoma. *Clinical and Experimental Metastasis* **20**, 665-74 (2003).
225. Khan, J., Bittner, M.L., Saal, L.H., Teichmann, U., Azorsa, D.O., Gooden, G.C., Pavan, W.J., Trent, J.M. & Meltzer, P.S. cDNA microarrays detect activation of a myogenic transcription program by the PAX3-FKHR fusion oncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 13264-9 (1999).
226. Lan, Z., Wu, H., Li, W., Wu, S., Lu, L., Xu, M. & Dai, W. Transforming activity of receptor tyrosine kinase tyro3 is mediated, at least in part, by the PI3 kinase-signaling pathway. *Blood* **95**, 633-8 (2000).
227. Georgescu, M.M., Kirsch, K.H., Shishido, T., Zong, C. & Hanafusa, H. Biological effects of c-Mer receptor tyrosine kinase in hematopoietic cells

- depend on the Grb2 binding site in the receptor and activation of NF-kappaB. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 1171-81 (1999).
228. Zhang, Q.K., Boast, S., de los Santos, K., Begemann, M. & Goff, S.P. Transforming activity of retroviral genomes encoding Gag-Axl fusion proteins. *Journal of Virology* **70**, 8089-97 (1996).
 229. Fridell, Y.W., Villa, J., Jr., Attar, E.C. & Liu, E.T. GAS6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 7123-6 (1998).
 230. Tai, K.Y., Shieh, Y.S., Lee, C.S., Shiah, S.G. & Wu, C.W. Axl promotes cell invasion by inducing MMP-9 activity through activation of NF-kappaB and Brg-1. *Oncogene* **27**, 4044-55 (2008).
 231. Jansson, D., Ng, A.C., Fu, A., Depatie, C., Al Azzabi, M. & Screaton, R.A. Glucose controls CREB activity in islet cells via regulated phosphorylation of TORC2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 10161-6 (2008).
 232. Hsueh, R.C. & Scheuermann, R.H. Tyrosine kinase activation in the decision between growth, differentiation, and death responses initiated from the B cell antigen receptor. *Advances in Immunology* **75**, 283-316 (2000).
 233. Racioppi, L. & Means, A.R. Calcium/calmodulin-dependent kinase IV in immune and inflammatory responses: novel routes for an ancient traveller. *Trends Immunol* **29**, 600-7 (2008).
 234. Hoyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., Bianchi, K., Fehrenbacher, N., Elling, F., Rizzuto, R., Mathiasen, I.S. & Jaattela, M. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Molecular Cell* **25**, 193-205 (2007).
 235. Friocourt, G., Liu, J.S., Antypa, M., Rakic, S., Walsh, C.A. & Parnavelas, J.G. Both doublecortin and doublecortin-like kinase play a role in cortical interneuron migration. *Journal of Neuroscience* **27**, 3875-83 (2007).
 236. Shu, F., Lv, S., Qin, Y., Ma, X., Wang, X., Peng, X., Luo, Y., Xu, B.E., Sun, X. & Wu, J. Functional characterization of human PFTK1 as a cyclin-dependent kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 9248-53 (2007).
 237. Pang, E.Y., Bai, A.H., To, K.F., Sy, S.M., Wong, N.L., Lai, P.B., Squire, J.A. & Wong, N. Identification of PFTAIRE protein kinase 1, a novel cell division cycle-2 related gene, in the motile phenotype of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* **46**, 436-45 (2007).
 238. Bottner, C.A., Schmidt, H., Vogel, S., Michele, M. & Kaufer, N.F. Multiple genetic and biochemical interactions of Brr2, Prp8, Prp31, Prp1 and Prp4 kinase suggest a function in the control of the activation of spliceosomes in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Genetics* **48**, 151-61 (2005).
 239. Houlden, H., Johnson, J., Gardner-Thorpe, C., Lashley, T., Hernandez, D., Worth, P., Singleton, A.B., Hilton, D.A., Holton, J., Revesz, T., Davis, M.B., Giunti, P. & Wood, N.W. Mutations in TTBK2, encoding a kinase

- implicated in tau phosphorylation, segregate with spinocerebellar ataxia type 11. *Nature Genetics* **39**, 1434-6 (2007).
240. Kitano-Takahashi, M., Morita, H., Kondo, S., Tomizawa, K., Kato, R., Tanio, M., Shirota, Y., Takahashi, H., Sugio, S. & Kohno, T. Expression, purification and crystallization of a human tau-tubulin kinase 2 that phosphorylates tau protein. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **63**, 602-4 (2007).
 241. Marcantonio, M., Trost, M., Courcelles, M., Desjardins, M. & Thibault, P. Combined enzymatic and data mining approaches for comprehensive phosphoproteome analyses: application to cell signaling events of interferon-gamma-stimulated macrophages. *Mol Cell Proteomics* **7**, 645-60 (2008).
 242. Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.P., Tong, F., Speed, T., Spellman, P.T., DeVries, S., Lapuk, A., Wang, N.J., Kuo, W.L., Stilwell, J.L., Pinkel, D., Albertson, D.G., Waldman, F.M., McCormick, F., Dickson, R.B., Johnson, M.D., Lippman, M., Ethier, S., Gazdar, A. & Gray, J.W. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* **10**, 515-27 (2006).
 243. Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R.J. & et al. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* **72**, 767-78 (1993).
 244. Liu, B.A., Jablonowski, K., Raina, M., Arce, M., Pawson, T. & Nash, P.D. The human and mouse complement of SH2 domain proteins-establishing the boundaries of phosphotyrosine signaling. *Molecular Cell* **22**, 851-68 (2006).
 245. Huang, H., Li, L., Wu, C., Schibli, D., Colwill, K., Ma, S., Li, C., Roy, P., Ho, K., Songyang, Z., Pawson, T., Gao, Y. & Li, S.S. Defining the specificity space of the human SRC homology 2 domain. *Mol Cell Proteomics* **7**, 768-84 (2008).
 246. Miller, M.L., Jensen, L.J., Diella, F., Jorgensen, C., Tinti, M., Li, L., Hsiung, M., Parker, S.A., Bordeaux, J., Sicheritz-Ponten, T., Olhovsky, M., Pasculescu, A., Alexander, J., Knapp, S., Blom, N., Bork, P., Li, S., Cesareni, G., Pawson, T., Turk, B.E., Yaffe, M.B., Brunak, S. & Linding, R. Linear motif atlas for phosphorylation-dependent signaling. *Sci Signal* **1**, ra2 (2008).
 247. Fujii, Y., Wakahara, S., Nakao, T., Hara, T., Ohtake, H., Komurasaki, T., Kitamura, K., Tatsuno, A., Fujiwara, N., Hozumi, N., Ra, C., Kitamura, D. & Goitsuka, R. Targeting of MIST to Src-family kinases via SKAP55-SLAP-130 adaptor complex in mast cells. *FEBS Letters* **540**, 111-6 (2003).
 248. Katzav, S. Flesh and blood: the story of Vav1, a gene that signals in hematopoietic cells but can be transforming in human malignancies. *Cancer Letters* **255**, 241-54 (2007).
 249. Jones, N., Hardy, W.R., Friese, M.B., Jorgensen, C., Smith, M.J., Woody, N.M., Burden, S.J. & Pawson, T. Analysis of a Shc family adaptor protein,

- ShcD/Shc4, that associates with muscle-specific kinase. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 4759-73 (2007).
250. Prince, A.L., Yin, C.C., Enos, M.E., Felices, M. & Berg, L.J. The Tec kinases Itk and Rlk regulate conventional versus innate T-cell development. *Immunological Reviews* **228**, 115-31 (2009).
251. Mohamed, A.J., Yu, L., Backesjo, C.M., Vargas, L., Faryal, R., Aints, A., Christensson, B., Berglof, A., Vihinen, M., Nore, B.F. & Smith, C.I. Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunological Reviews* **228**, 58-73 (2009).
252. Ursini-Siegel, J. & Muller, W.J. The ShcA adaptor protein is a critical regulator of breast cancer progression. *Cell Cycle* **7**, 1936-43 (2008).
253. Harvey, A.J., Pennington, C.J., Porter, S., Burmi, R.S., Edwards, D.R., Court, W., Eccles, S.A. & Crompton, M.R. Brk Protects Breast Cancer Cells from Autophagic Cell Death Induced by Loss of Anchorage. *American Journal of Pathology* (2009).
254. Marchio, C., Natrajan, R., Shiu, K.K., Lambros, M.B., Rodriguez-Pinilla, S.M., Tan, D.S., Lord, C.J., Hungermann, D., Fenwick, K., Tamber, N., Mackay, A., Palacios, J., Sapino, A., Buerger, H., Ashworth, A. & Reis-Filho, J.S. The genomic profile of HER2-amplified breast cancers: the influence of ER status. *Journal of Pathology* **216**, 399-407 (2008).
255. Sakashita, K., Mimori, K., Tanaka, F., Kamohara, Y., Inoue, H., Sawada, T., Hirakawa, K. & Mori, M. Prognostic relevance of Tensin4 expression in human gastric cancer. *Annals of Surgical Oncology* **15**, 2606-13 (2008).
256. Yam, J.W., Ko, F.C., Chan, C.Y., Yau, T.O., Tung, E.K., Leung, T.H., Jin, D.Y. & Ng, I.O. Tensin2 variant 3 is associated with aggressive tumor behavior in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **44**, 881-90 (2006).
257. Yokohari, K., Yamashita, Y., Okada, S., Ohya, K., Oda, S., Hatano, M., Mano, H., Hirasawa, H. & Tokuhisa, T. Isoform-dependent interaction of BRDG1 with Tec kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **289**, 414-20 (2001).
258. Nakayama, J., Yamamoto, M., Hayashi, K., Satoh, H., Bundo, K., Kubo, M., Goitsuka, R., Farrar, M.A. & Kitamura, D. BLNK suppresses pre-B-cell leukemogenesis through inhibition of JAK3. *Blood* **113**, 1483-92 (2009).
259. Marshall, A.J., Zhang, T. & Al-Alwan, M. Regulation of B-lymphocyte activation by the PH domain adaptor protein Bam32/DAPP1. *Biochemical Society Transactions* **35**, 181-2 (2007).
260. Schneider, C., King, R.M. & Philipson, L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell* **54**, 787-93 (1988).
261. Hafizi, S., Alindri, F., Karlsson, R. & Dahlback, B. Interaction of Axl receptor tyrosine kinase with C1-TEN, a novel C1 domain-containing protein with homology to tensin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **299**, 793-800 (2002).

262. Sasaki, T., Knyazev, P.G., Clout, N.J., Cheburkin, Y., Gohring, W., Ullrich, A., Timpl, R. & Hohenester, E. Structural basis for Gas6-Axl signalling. *EMBO Journal* **25**, 80-7 (2006).
263. Sawabu, T., Seno, H., Kawashima, T., Fukuda, A., Uenoyama, Y., Kawada, M., Kanda, N., Sekikawa, A., Fukui, H., Yanagita, M., Yoshibayashi, H., Satoh, S., Sakai, Y., Nakano, T. & Chiba, T. Growth arrest-specific gene 6 and Axl signaling enhances gastric cancer cell survival via Akt pathway. *Molecular Carcinogenesis* **46**, 155-64 (2007).
264. Bratton, D.L. & Henson, P.M. Apoptotic cell recognition: will the real phosphatidylserine receptor(s) please stand up? *Current Biology* **18**, R76-9 (2008).
265. Robert E. Kingston, C.A.C., Hiroto Okayama. Calcium Phosphate Transfection. *Current Protocols in cell biology*, 20.3.1-20.3.8 (2003).
266. Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kurata, T., Sugimura, H. & Matsuda, M. Evidence that DOCK180 up-regulates signals from the CrkII-p130(Cas) complex. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 24479-84 (1998).