



**HAL**  
open science

# Caractérisation des voies de signalisation des oncogènes FGFR3 muté et FGFR3-TACC3 dans les carcinomes de vessie

Mélanie Mahé

► **To cite this version:**

Mélanie Mahé. Caractérisation des voies de signalisation des oncogènes FGFR3 muté et FGFR3-TACC3 dans les carcinomes de vessie. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT: 2015PA11T020 . tel-01508919

**HAL Id: tel-01508919**

**<https://theses.hal.science/tel-01508919v1>**

Submitted on 15 Apr 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Sud

Ecole doctorale 418 :  
de cancérologie

Laboratoire : *Equipe oncologie moléculaire- compartimentation et dynamique  
cellulaire, UMR144-CNRS, Institut Curie, Paris*

## Thèse de Doctorat

Science de la vie et de la santé

Par

**Mélanie Mahé**

Caractérisation des voies de signalisation des oncogènes  
FGFR3 muté et FGFR3-TACC3 dans les carcinomes de vessie

Date de soutenance : 14/04/2015

**Composition du jury :**

Directeur de thèse :	François Radvanyi	Docteur (Institut Curie, Paris)
Rapporteurs :	Serge Roche Thierry Massfelder	Docteur (CRBM, Montpellier) Docteur (Université de Strasbourg)
Examineurs :	Phillipe Pourquier Isabelle Bernard-Pierrot	Docteur (IRBM, Montpellier) Docteur (Institut Curie, Paris)
Président :	Christian Auclair	Professeur (ENS Cachan)

# TABLE DES MATIERES

Chapitre I : Le cancer.....	1
1.1 Epidémiologie.....	1
1.2 Les origines du cancer .....	2
1.2.1 Naissance des cellules clones cancéreuses .....	2
1.2.2 Progression de la tumeur et hétérogénéité tumorale.....	5
1.3 Les Caractéristiques du cancer .....	6
Chapitre II : Le Cancer de la vessie .....	9
2.1 La vessie : Anatomie et fonction .....	9
2.2 Epidémiologie.....	9
2.3 Facteurs de risques.....	10
2.3.1 Tabagisme.....	10
2.3.2 Facteurs génétiques .....	10
2.3.3 Facteurs environnementaux.....	11
2.4 Classification histopathologique des tumeurs de vessie .....	12
2.5 Origines des tumeurs de vessie .....	14
2.6 Voies de progression tumorales .....	17
2.6.1 Altérations moléculaires dans la voie des tumeurs papillaires.....	18
2.6.2 Altérations moléculaires dans le pathway des CIS.....	20
2.7 Classification des tumeurs de vessie : tumeurs luminales et basales .....	25
Chapitre III : RTK, structure, activation, voies de signalisation et cancer.....	27
3.1 Les récepteurs à activité Tyrosine Kinase (RTK).....	27
3.1.1 Structures et modes d'activation des RTK.....	28
3.1.2 Activation des voies de signalisation par les RTKs.....	32
3.2 RTKs et cancers.....	34
3.2.1 voies de signalisation dérégulées dans le cancer.....	34
3.2.2 RTK, voies de signalisations et cancer.....	36
3.2.3 Traitements thérapeutiques ciblant les RTKs et leurs voies de signalisations ..	50

Chapitre IV : Les récepteurs FGFR : structure, activation, rôles dans le développement et le cancer .....	52
4.1 Structure et Activation .....	52
4.2 Rôles des récepteurs FGFR dans le développement osseux .....	54
4.3 Récepteurs FGFR et Cancers .....	61
4.3.1 Mutations, Surexpression et type tumoral .....	62
4.3.2 récepteurs FGFR et protéines de fusion .....	63
4.3.3 Mutations du récepteur FGFR3 et protéines de fusion .....	65
4.3.4 Altérations du gène FGFR3 et kératoses séborrhéiques .....	69
4.3.5 Altérations du gène FGFR3 et cancers hématologiques .....	69
4.3.6 Altérations du gène FGFR3 et cancer de la vessie .....	72
Chapitre V : Traitements thérapeutiques actuels pour les tumeurs de vessie .....	75
5.1 Traitements des tumeurs n'envahissant pas le muscle .....	75
5.2 Thérapies pour les tumeurs de vessie envahissant le muscle (T2-T4).....	77
5.2.1 Tumeurs T2-T4 de phénotype basal-like et thérapie anti-EGFR.....	78
5.3 FGFR3 comme cible thérapeutique .....	79
5.3.1 Inhibition de l'activité de FGFR3 par un inhibiteur chimique .....	79
5.3.2 Inhibition de l'activité de FGFR3 par un anticorps : le R3mAb.....	80
Objectifs.....	82
Résultats.....	85
Chapitre I : Etude des voies de signalisation du récepteur FGFR3 muté et de la protéine de fusion FGFR3-TACC3 dans les carcinomes de vessie.....	86
1.1 Introduction .....	86
1.2 Discussion.....	130
Chapitre II : Identification du réseau d'interaction de FGFR3 .....	139
2.1 Introduction .....	139
2.2 Résultats .....	140
2.3 Discussion.....	150
2.4 Méthodes .....	152
Conclusion et perspectives .....	154

Bibliographie.....	161
--------------------	-----

## TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Le cancer dans le monde en 2012, Cancer Research UK.....	1
Figure 2 : Naissance d'une « cellule souche cancéreuse » à partir des cellules souches, des cellules progénitrices ou des cellules différenciées ayant acquis une mutation. (Bjerkvig, Tysnes, Aboody, & Najbauer, 2005).....	4
Figure 3 : Acquisitions de mutations et Hétérogénéité tumorale (Watson et al., 2013). ....	6
Figure 4 : Les 10 caractéristiques du Cancer (Hanahan & Weinberg, 2011). ....	7
Figure 5 : Les différentes thérapies existantes pour traiter le cancer basées sur les 10 caractéristiques du cancer (Hanahan & Weinberg, 2011) .....	8
Figure 6 : Représentation anatomique de la vessie ©The McGraw Hill companies.....	9
Figure 7 : Représentation schématique de la classification des différents stades des tumeurs de vessie (Aubertin, 2009) .....	14
Figure 8 : Les différents sous types cellulaires composant l'épithélium la vessie (Kobayashi, Owczarek, McKiernan, & Abate-Shen, 2014).....	15
Figure 9 : origines des tumeurs papillaires, des tumeurs CIS, et des tumeurs SCC (Van Batavia et al., 2014).....	16
Figure 10 : Voies de progression tumorale des carcinomes de vessie .....	17
Figure 11 : expression de PTEN et phospho-AKT dans les tumeurs de vessie (Calderaro et al., 2014).....	21
Figure 12 : Phosphorylation de RB et conséquences fonctionnelles (Mitra et al., 2006)....	22
Figure 13 : Combinaison des fréquences de mutations de <i>FGFR3</i> et <i>TP53</i> en fonction du groupe stade/grade (Yann Neuzillet et al., 2012). ....	23
Figure 14 : Analyse en cluster de 57 tumeurs de vessie versus 5 normaux en utilisant le niveau d'expression des gènes dans les 7 régions épigénétiquement réprimées (Vallot et al., 2011).....	24
Figure 15 : Classification des différents sous-groupes de tumeurs de vessie en fonction de leurs altérations moléculaires, d'après les études du TCGA, de Lund et du MDA. Dans cette figure la classification prise comme référence est celle du MDA (Choi et al., 2014). ....	25
Figure 16 : Origines probable des tumeurs basales et luminales ayant envahies le muscle et altérations moléculaires associées (Choi et al., 2014).....	26
Figure 17 : Les 20 sous-famille de RTKs (Lemmon & Schlessinger, 2010) .....	27
Figure 18 : Fixation du ligand et activation des RTKs : TrkA, KIT, FGFR et ErbB (Lemmon & Schlessinger, 2010).....	29
Figure 19 : Dimérisation des RTKs et activation (Lemmon & Schlessinger, 2010) .....	31
Figure 20 : Complexe multiprotéique conduisant à l'activation des voies de signalisation activées par les RTKs .....	33

Figure 21 : Intégration à la membrane plasmique par la PLC gamma des signaux générés par l'activation des RTK (Lemmon & Schlessinger, 2010).....	34
Figure 22 : Représentation schématique des voies de signalisation dérégulées dans le cancer (Hanahan & Weinberg, 2011).....	35
Figure 23 : Voies de signalisation connues pour être dérégulées et impliqués dans la progression tumorale (Vogelstein et al., 2013).....	35
Figure 24 : Voies de signalisation majeures activées par les facteurs de croissance et leurs récepteurs (Witsch, Sela, & Yarden, 2011) .....	37
Figure 25 : Voies de signalisation activées par les protéines Ras (Berndt et al., 2011) ....	38
Figure 26 : Modèle d'activation de PI3K (Vivanco & Sawyers, 2002). .....	39
Figure 27 : Voies de signalisation de PI3K/AKT (Vivanco & Sawyers, 2002) .....	40
Figure 28 : Voies de signalisation activées par les MAPK suite à un stress (Wagner & Nebreda, 2009).....	42
Figure 29 : Activation de la voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK par les RTK (H. J. Kim & Bar-Sagi, 2004) .....	44
Figure 30 : Les diverse propriétés de HuR dans le développement du cancer à travers la régulation de ses cibles (Wang et al. 2013). .....	45
Figure 31 : Mécanisme de stabilisation des ARNm par HuR (Jun Wang et al., 2013). ....	47
Figure 32 : Représentation des différents modes d'activation des protéines STAT (Yu & Jove, 2004).....	48
Figure 33 : Contrôle de la survie et de la croissance cellulaire par les protéines STAT (Yu & Jove, 2004) .....	49
Figure 34 : Représentation des voies de signalisation oncogéniques (Lee et al., 2011)...	50
Figure 35 : Ciblage thérapeutique des voies de signalisation des RTKs dans les tumeurs solides (Witsch et al., 2011) .....	51
Figure 36 : Structure des récepteurs FGFR (Mason, 2007).....	52
Figure 37 : Représentation de la structure prototypique d'un récepteur FGF (Haugsten, Wiedlocha, Olsnes, & Wesche, 2010b).....	53
Figure 38 : Régulation de l'ostéogénèse par les récepteurs FGFR1, 2 et 3 lors du développement selon le mode intra-membraneux (Su et al., 2014).....	54
Figure 39 : Représentation des principales voies activées par les récepteurs FGFR au cours du développement squelettique dans le mode endochondral (SU ET AL., 2014).....	55
Figure 40 : Les deux isoformes de FGFR3 : FGFR3b, FGFR3c.....	57
Figure 41 : Knock out de FGFR3 dans un modèle murin (Su, Xu, et al., 2010) .....	57
Figure 42 : Les différentes mutations de FGFR3 dans les chondrodysplasies (Harada et al., 2007) .....	59

Figure 43 : Activation du récepteur, localisation et sévérité des différentes chondrodysplasies (Harada et al., 2007).....	60
Figure 44 : Activation des pathways P38 et ERK1/2 par FGFR3 et conséquences sur la croissance et la minéralisation osseuse (Su, Sun, et al., 2010).....	60
Figure 45 : Structure, voies de signalisation, et dérégulations des récepteurs FGFR dans le cancer (a N. Brooks, Kilgour, & Smith, 2012). (1 ; 2) : régulation via les FGF ligands, (3 ;4) : Mutations et protéines de fusion, (5) : Amplification du gène codant pour le récepteur. ...	62
Figure 46 : Résumé des principales altérations touchant les récepteurs FGFR dans les cancers humains (Haugsten et al., 2010).....	63
Figure 47 : Représentation schématique des protéines de fusion impliquant les FGFR identifiés (Y. Wu et al., 2013).....	64
Figure 48 : mutations de FGFR3 sur les exons 7, 10 et 15 .....	65
Figure 49 : Fusion génomique entre l'exon 17 de FGFR3 et l'intron 7 de TACC3 ; Dans l'ARNm de fusion qui en résulte l'exon 16 de FGFR3 est épissé en 5' avec l'exon 8 de TACC3 dans le glioblastome (Singh et al., 2013).....	66
Figure 50 : Correction de la séparation prématurée des chromatides sœurs par le PD173074 (inhibiteur de FGFR3) dans les cellules exprimant la protéine FGFR3-TACC3 (Singh et al., 2013) .....	67
Figure 51 : La formation du produit de fusion FGFR3-TACC3 échappe à la régulation par le mir99a. (Babic & Mischel, 2013) .....	68
Figure 52 : Translocation t(4 ;14)(p16 ;q32) retrouvée dans les MM (M Chesi, Nardini, & Lim, 1998).....	69
Figure 53 : Mécanisme d'activation de RSK2 par le récepteur FGFR3 dans les Myélomes Multiples et les leucémies (Kang et al., 2007) .....	71
Figure 54 : gènes de fusion FGFR3-BAIAP2L1 et FGFR3-TACC3 dans les lignées cellulaires humaines de tumeurs vessie (Williams et al., 2013).....	73
Figure 55 : Représentation schématique des voies de signalisation activées par le récepteur FGFR3 muté dans les tumeurs de vessie (X.-R. Wu, 2005).....	74
Figure 56 : Représentation schématique des mécanismes d'action du BCG (Y Neuzillet & Lebre, 2010) .....	76
Figure 57 : Représentation schématique des traitements thérapeutiques actuels appliqués en fonction du stade dans le cancer de la vessie. TUR : Trans-urétral Résection ; BCG : Bacille Calmette-Guérin. (Kobayashi, Owczarek, McKiernan, & Abate-Shen, 2014) .....	77
Figure 58 : Représentation schématique de l'inhibition de l'activité oncogénique du récepteur FGFR3 muté (formation d'un pont disulfure) avec l'anticorps R3mAb. (Hadari et Schlessinger., 2009) .....	81

## TABLES

Table 1 : Classification TNM des carcinomes urothéliaux (Pedrosa et al., 2014) .....	12
Table 2: Classification des carcinomes de vessie par grade selon l'OMS en 1973 et 2004. European Association of Urology .....	13

## Résumé

Les tumeurs de vessie suivent deux voies de progression tumorale. La voie des carcinomes *in situ* (CIS) qui progressent pour envahir la membrane basale puis le muscle, et la voie des tumeurs papillaires de bas grade qui progressent peu mais qui récidivent fréquemment. Environ 65% des tumeurs papillaires de bas grade présentent une mutation du gène FGFR3 et récemment des protéines de fusion FGFR3-TACC3 ont été observées dans les tumeurs de vessie (dans 10% des tumeurs invasives). Le rôle oncogénique du récepteur FGFR3 muté et de FGFR3-TACC3 a été démontré *in vivo* et *in vitro*. Cependant, les voies de signalisation du récepteur FGFR3 muté ou de FGFR3-TACC3 sont à l'heure actuelle très peu caractérisées.

Dans ce contexte, deux approches ont été mises en place pour caractériser ces voies de signalisation. La première s'appuie sur l'étude de la phosphorylation des protéines p38, AKT et ERK1/2 par le récepteur FGFR3 muté (S249C) ou sauvage dans la lignée cellulaire fibroblastique NIH3T3, et a permis d'identifier les protéines p38 et AKT comme activées par le récepteur FGFR3 muté et nécessaire pour induire la transformation cellulaire. L'étude de l'activation de ces deux voies de signalisation a été réalisée dans des lignées cellulaires dérivées de tumeurs de vessie exprimant le récepteur FGFR3 muté ou FGFR3-TACC3 de manière endogène et a montré que leur activation était dépendante de celle du récepteur FGFR3. De plus nous avons montré que les protéines p38 et AKT sont impliquées dans le maintien d'une boucle de rétro-contrôle positive entre FGFR3 et MYC : l'activation de FGFR3 induit une surexpression de MYC qui en retour promeut l'expression de FGFR3. La seconde approche est basée sur une étude visant à identifier les partenaires protéiques de FGFR3 par spectrométrie de masse après immunoprécipitation de celui-ci qui avait été réalisée précédemment au laboratoire. L'analyse des données a permis l'obtention d'une liste de 60 protéines identifiées comme partenaires protéiques de FGFR3 avec une grande confiance. La construction d'un réseau à partir de cette liste n'a pas été possible (trop peu d'interactions existant entre ces protéines), nous avons donc développé un algorithme (PEPPER) en collaboration avec un étudiant en bio-informatique au laboratoire, Rémy Nicolle, pour proposer un réseau de signalisation de FGFR3.

Les deux approches mises en place au cours de cette thèse nous ont permis de mieux caractériser les voies de signalisation du récepteur FGFR3. L'identification d'une boucle de rétrocontrôle entre FGFR3 et MYC a permis de mieux comprendre pourquoi le récepteur FGFR3 possède des propriétés oncogéniques, et de proposer les protéines p38 et AKT comme cibles thérapeutiques potentielles pour traiter les tumeurs de vessie exprimant le récepteur FGFR3 altéré. La construction du réseau de signalisation de FGFR3 via PEPPER

donne une vue d'ensemble des voies de signalisation de FGFR3 et ouvre de nouvelles pistes à étudier.

**Mots Clés**

RTK, FGFR3, oncogènes, voies de signalisation, Réseau d'interaction, cancer de la vessie

**Discipline**

Cancérologie, Médecine, Santé

**Laboratoire**

Equipe oncologie moléculaire-Institut Curie-UMR144 CNRS

26 rue d'Ulm, 75248 PARIS cedex 05

## Remerciements

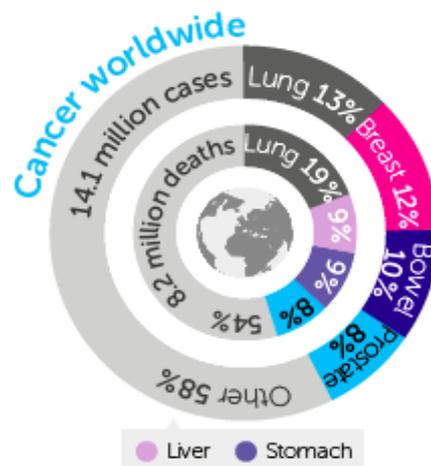
En premier lieu je tiens à remercier mon directeur de thèse, François Radvanyi et ma co-directrice de thèse, Isabelle Bernard-Pierrot, pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire et m'avoir fait confiance tout au long de cette thèse. Je suis heureuse d'avoir été formée à la recherche par des chercheurs passionnés, à l'écoute, et avec lesquels j'ai pu partager de très nombreuses idées scientifiques. Je remercie les membres de l'équipe oncologie moléculaire, en particulier Marion pour son amitié et son soutien sans faille dans les bons moments comme dans les moments de doute, et pour avoir pris le temps de relire cette thèse. Je remercie Rémy pour toutes nos discussions « passionnées » à propos de certains gènes, et pour tous les moments partagés au laboratoire, et pour sa bonne humeur et son optimisme. Je remercie Jennifer, d'avoir accepté de me suivre dans le projet vitamine D (pourvu que ça marche !), de m'avoir soutenue et écoutée et pour tous nos « débats » où nous étions finalement d'accord ainsi que pour sa bonne humeur quotidienne et son dynamisme. Je remercie chaleureusement les autres membres de l'équipe : Elodie pour sa bonne humeur permanente, Florent pour ces très bons conseils scientifiques et les bons moments passés au laboratoire, Alice pour son soutien, sa très bonne humeur et son aide souvent très précieuse. Je remercie Vera (la tranquillité incarnée, ce que j'admire sincèrement), Hélène, Daniela, Trang qui a partagé mes moments d'incompréhension totale face à certains résultats..., Thibault, Clem, Céline pour sa bonne humeur et son dynamisme. Je remercie Meriem (que dire...) pour sa bonne humeur (oh mince, oh zutt !!!), les moments de compréhension et d'incompréhension face à certaines situations au laboratoire, et pour m'avoir très souvent écouté et supporté. Je remercie Stéphanie, Natacha, Massy, Christine et Nicolas pour tous les moments partagés au laboratoire et au badminton. Je remercie Fatima pour sa bonne humeur quotidienne. Je remercie une personne chaleureuse, Michèle, toujours à l'écoute dans les moments difficiles et sans qui certains problèmes, administratifs et humains, auraient peut-être été plus difficiles à résoudre. Je remercie tout particulièrement mes proches pour m'avoir soutenu et supporté tout au long de mes études et plus particulièrement pendant ces trois ans et demi de thèse et pour avoir cru en moi. C'est votre soutien qui m'a permis de comprendre que rien n'est impossible ou insurmontable. Je remercie Simon et Alice avec qui je partage ma passion pour les sciences depuis quelques années déjà, et qui ont toujours été là pour me soutenir, et m'encourager dans les moments difficiles. Simon, il y en aurait beaucoup trop à écrire... Enfin je remercie Adrien pour m'avoir soutenu et encouragé sans faille du début à la fin, tout au long de cette thèse et pour avoir pris le temps de lire et relire cette thèse.

# INTRODUCTION

# CHAPITRE I : LE CANCER

## 1.1 EPIDEMIOLOGIE

Le cancer est une maladie qui représente un problème de santé publique majeur, à l'origine de plus de 14 millions de nouveaux cas et de 8,2 millions de décès annuels dans le monde (chiffres 2012, selon l'OMS) - les cancers du poumon, du sein, du côlon et de la prostate étant les plus fréquents. La distribution mondiale de la fréquence des différents types de cancer et des décès dus aux différents cancers est schématiquement représentée ci-dessous (figure 1) :



**FIGURE 1 : LE CANCER DANS LE MONDE EN 2012, CANCER RESEARCH UK**

*Le cercle extérieur correspond au nombre de nouveaux cas de cancers par an, il indique la fréquence des différents cancers et individualise les cancers les plus fréquents : cancers du poumon, du sein, du côlon et de la prostate. Le cercle intérieur correspond au nombre de décès par an du cancer, il individualise les cancers les plus meurtriers : cancers du poumon, du foie, de l'estomac et de la prostate.*

Cinq facteurs de risque sont principalement mis en cause : un indice de masse corporelle trop élevé, une mauvaise alimentation, peu d'activité physique, la consommation d'alcool et de tabac. Le tabac est le principal facteur de risque causant 20% des décès par cancer et 70 % des décès du cancer du poumon à travers le monde selon l'organisation mondiale pour la santé (OMS). Les infections chroniques à certains virus jouent un rôle important dans l'apparition des cancers du foie (hépatite B, HBV ; hépatite C ; HCV) et de l'utérus (papillomavirus, HPV).

En France on dénombre 365 000 nouveaux cas de cancers par an selon l'INCa (Institut National du Cancer). Malgré des progrès récents, un patient sur deux décèdera de son cancer.

## 1.2 LES ORIGINES DU CANCER

Le cancer est une maladie du soi, au cours de laquelle des cellules normales se mettent à proliférer de manière anarchique suite à l'acquisition de mutations génétiques. Ces mutations peuvent être des mutations dites spontanées ou des mutations qui apparaissent suite à des « agressions » dues à certains facteurs environnementaux. Si l'organisme ne les élimine pas ou si elles échappent à la mort cellulaire programmée (apoptose), ces cellules vont pouvoir envahir l'organe dans lequel elles sont apparues puis l'organisme. Un cancer peut être issu de mutations génétiques apparues dans une cellule germinale mais aussi dans une cellule somatique ou une cellule souche.

### 1.2.1 NAISSANCE DES CELLULES CLONES CANCEREUSES

#### ***Mutations génétiques et cancer***

Le cancer est généralement défini comme une maladie complexe, ou l'accumulation dans une cellule de mutations génétiques conduit à une transformation maligne de celle-ci. La capacité d'une seule cellule transformée à disséminer la maladie à tout l'organisme suit au départ un processus linéaire d'acquisition de nouvelles mutations telle que la substitution de paires de bases dans l'ADN, les insertions ou délétions de quelques paires de bases (indels), les réarrangements chromosomiques, les gains ou les pertes du nombre de copies d'un gène. Récemment des mutations de gènes régulant des processus épigénétiques ont été identifiées (Watson, Takahashi, Futreal, & Chin, 2013). Outre les mutations génétiques, des altérations purement épigénétiques sont vraisemblablement impliquées dans la tumorigénèse.

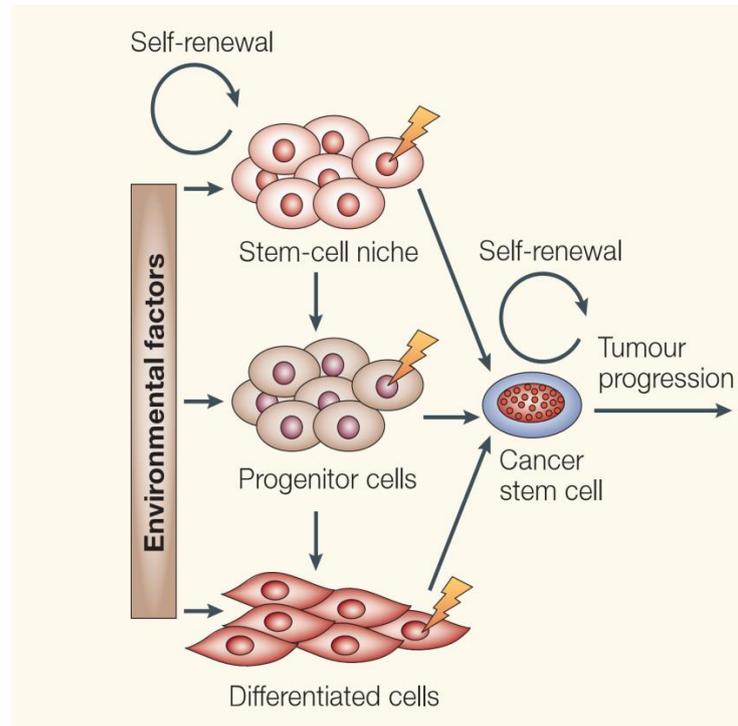
Deux types de mutations peuvent être impliqués dans l'apparition du cancer et sa progression : les mutations spontanées et les mutations dues à l'environnement cellulaire. Les mutations dites spontanées ne sont pas dues à des agressions extérieures provenant de l'environnement cellulaire. On peut citer par exemple les mutations dues à un mésappariement des bases lors de la réplication de l'ADN. Les mutations qui ne sont pas spontanées sont dues à l'influence de facteurs environnementaux (stress, inflammation, irradiations telles que les UV dans le cas du mélanome...). Les mutations spontanées sont les plus fréquemment retrouvées dans le cancer.

Très récemment, une étude basée sur les données statistiques du cancer a montré que la probabilité de développer un cancer due à l'apparition de mutations spontanées est corrélée au nombre de divisions cellulaires au sein d'un tissu et que l'apparition d'un cancer dû à ce processus n'était pas prévisible. La probabilité de développer un cancer n'est pas la même au sein des différents tissus et organes de l'organisme. Ainsi la probabilité de développer un cancer du poumon est de 6,9%, de 1,08% pour le cancer de la thyroïde alors qu'il n'est que 0,00072 % pour le cancer du cartilage du larynx. Cependant il n'était jusqu'à présent pas possible d'en établir les causes exactes. L'étude réalisée par Tomasetti et Vogelstein propose un élément de réponse basé sur le principe suivant : plus le renouvellement cellulaire au sein d'un tissu est important, plus la probabilité de développer un cancer au sein de ce tissu est grande (Tomasetti & Vogelstein, 2015). Le renouvellement des cellules souches au sein des tissus et organes permet le maintien de l'homéostasie et a lieu plus fréquemment dans certains d'entre eux. Plus le renouvellement de ces cellules souches est élevé, plus le nombre de divisions cellulaires et de réplication de l'ADN (à chaque division) est important. Ainsi, la probabilité que l'apparition d'une mutation spontanée puisse donner naissance à une cellule « souche » cancéreuse, est corrélée au nombre de divisions cellulaires au sein d'un tissu. Cette étude conclut que les mutations spontanées représenteraient environ 2/3 des mutations mises en cause dans l'apparition de cancers, tandis que les mutations dues aux facteurs environnementaux seraient responsables d'un peu moins d'1/3 des cancers (les prédispositions génétiques ne faisant ni parties des mutations spontanées, ni des mutations dues à l'environnement dans le cas présent). Cependant de manière surprenante cette étude n'inclut pas plusieurs cancers fréquents (dont les cancers du sein et de la prostate). Qu'en serait-il si cela était le cas ? De plus cette étude indique que les mélanomes sont dus majoritairement au hasard, or clairement l'environnement est impliqué dans l'apparition de ces tumeurs (exposition au soleil).

L'acquisition d'une mutation génétique au sein d'un type cellulaire composant un tissu (cellule souche, cellule progénitrice, cellule différenciée), qu'elle soit spontanée ou due à l'environnement n'est pas obligatoirement synonyme de cancer. On distingue en effet les mutations dites « driver » des mutations dites « passagers ». Une mutation « driver » va conférer un avantage sélectif directement ou indirectement à la cellule dans laquelle elle apparaît. Cette mutation va être à l'origine de la dérégulation d'un processus cellulaire particulier défini en fonction du gène au sein duquel elle est apparue, et va alors contribuer à l'initiation de la progression tumorale. Quant aux mutations dites « passagers », ce sont des mutations qui ne confèrent aucun avantage sélectif (Vogelstein et al., 2013).

Les mutations spontanées ou dues à l'environnement peuvent apparaître au sein d'un organe dans les cellules souches, les cellules progénitrices ou différenciées, qui le

composent. La cellule ayant acquis des propriétés tumorales suite à l'acquisition d'une mutation est alors appelée cellule souche cancéreuse. Cette cellule est à l'origine de la maladie et initie la formation de la tumeur. La naissance d'une « cellule souche cancéreuse » à partir de l'acquisition d'une mutation spontanée ou l'apparition d'une mutation due à l'environnement dans un type des 3 types cellulaires définis ci-dessus et à l'origine de l'initiation de la progression tumorale est représentée ci-dessous (figure 2) :



**FIGURE 2 : NAISSANCE D'UNE « CELLULE SOUCHE CANCEREUSE » A PARTIR DES CELLULES SOUCHES, DES CELLULES PROGENETRICES OU DES CELLULES DIFFERENCIEES AYANT ACQUIS UNE MUTATION. (Bjerkvig, Tysnes, Aboody, & Najbauer, 2005)**

*Les « cellules souches cancéreuses » peuvent apparaître après plusieurs mutations spontanées dans une cellule souche présente dans une « niche » de cellules souches au sein d'un tissu. Ces mutations peuvent également apparaître dans les cellules progénitrices ou dans des cellules différenciées. Ces cellules souches cancéreuses peuvent aussi apparaître suite à des mutations dans ces trois types cellulaires (souches, progénitrices, différenciées) sous l'influence de facteurs environnementaux (UV (exemple du mélanome), irradiation, carcinogènes, tabac...). Ces cellules souches cancéreuses sont à l'origine de l'initiation de la progression tumorale.*

Un autre concept pourrait aussi expliquer la naissance des tumeurs non seulement à partir d'une cellule souche ou d'une cellule différenciée ayant acquis une ou plusieurs mutations mais à partir de la fusion de ces deux types cellulaires.

### ***Autre mode d'acquisition de mutations : la fusion cellulaire***

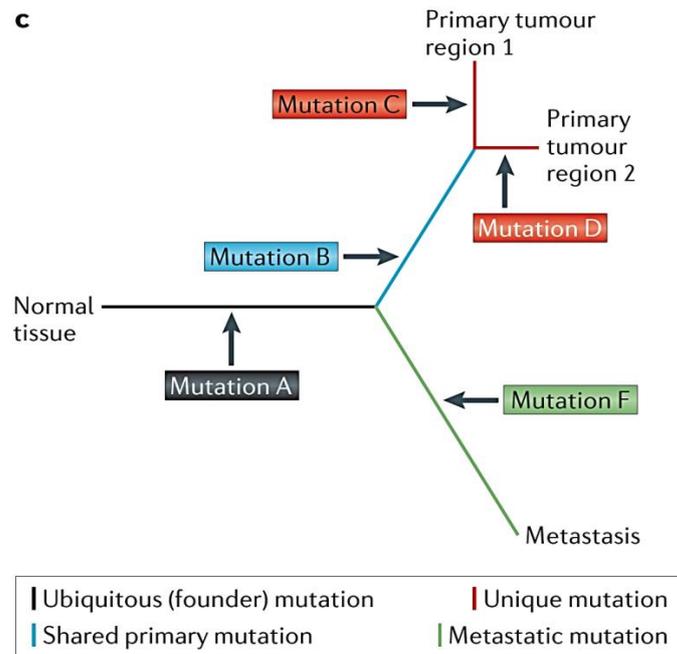
Au sein d'un tissu, les cellules différenciées qui le composent côtoient des « niches » ou « réservoirs » de cellules souches. Lors du développement et de la réparation tissulaire, les cellules souches et les cellules différenciées peuvent fusionner pour donner naissance à de nouvelles cellules différenciées. Or si une cellule souche et une cellule différenciée ayant acquis des mutations génétiques, l'une ou l'autre ou les deux, fusionnent, le mélange de leur matériel génétique altéré peut donner naissance à des clones cellulaires transformés (Bjerkvig et al., 2005).

### **1.2.2 PROGRESSION DE LA TUMEUR ET HETEROGENEITE TUMORALE**

Les tumeurs peuvent fréquemment évoluer vers ce qui est nommé l'hétérogénéité tumorale. On peut prendre l'exemple d'un tissu normal au sein duquel une cellule différenciée a accumulé des mutations et acquis des propriétés transformées. Cette cellule devient alors la cellule de départ qui est à l'origine de la formation de la tumeur pouvant donner naissance à de nouveaux clones.

Dans un tissu normal, une mutation A va apparaître dans une cellule. Si cette mutation est dite « driver » elle va permettre à la cellule de proliférer et de donner naissance à de nouvelles cellules. Si une mutation B apparaît au sein de cette première population, il peut alors y avoir des cellules porteuses de la mutation A, et des cellules porteuses à la fois de la mutation A mais aussi de la mutation B. Au cours de la progression tumorale, ces cellules qui présentent les mutations AB peuvent acquérir d'autres mutations que nous nommerons ici C et D. On distinguera alors des cellules porteuses des mutations A, B et C ou A, B et D. Dès lors, une tumeur peut être constituée de clones cellulaires provenant de la même cellule de départ mais ne présentant pas exactement les mêmes mutations génétiques. Il y aura alors des « régions » au sein d'une tumeur où l'on retrouve des altérations génétiques différentes (figure 3).

Cependant un autre cas de figure peut avoir lieu, la cellule d'origine au sein de laquelle est apparue la mutation A peut acquérir une mutation F. Cette seconde mutation peut conférer à la cellule la capacité à envahir tout l'organisme sous forme de métastases. Cette mutation F peut aussi bien apparaître dans les clones cellulaires, porteurs des mutations A et B. Mais elle peut aussi apparaître dans les cellules porteuses des mutations A, B, C ou A, B et D qui composent les deux « régions » de la tumeur (figure 3).

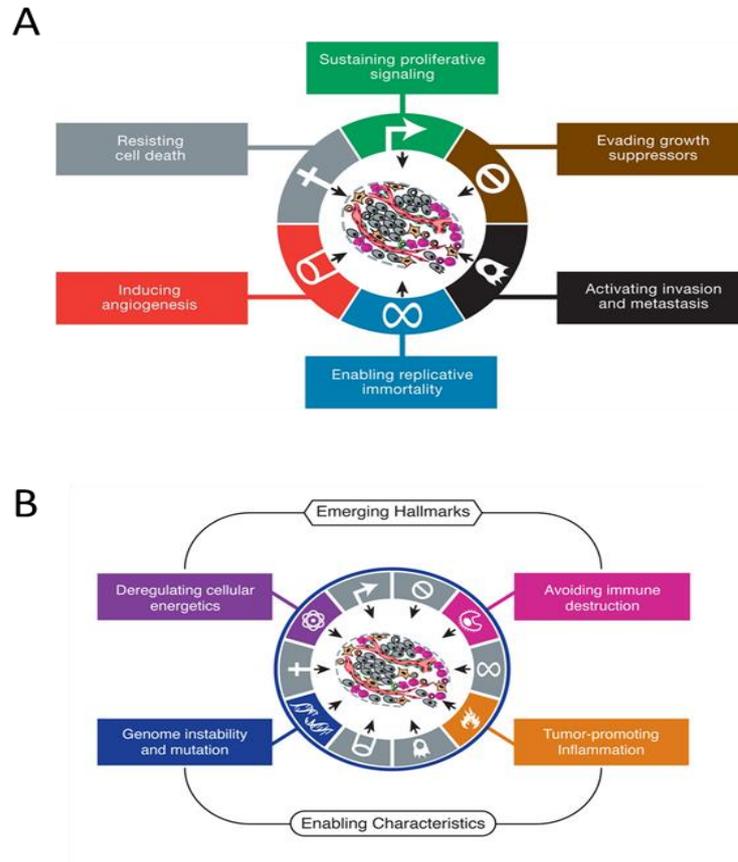


**FIGURE 3 : ACQUISITIONS DE MUTATIONS ET HETEROGENEITE TUMORALE** (Watson et al., 2013).

L'hétérogénéité tumorale peut représenter un problème majeur pour le traitement des cancers dans lesquels elle est présente. Si au sein d'une même tumeur une seule cible thérapeutique est prise en compte pour le traitement, mais qu'elle n'est pas exprimée dans la totalité des cellules composant la tumeur, cela peut aboutir à des phénomènes de résistance au traitement et des échecs thérapeutiques. C'est pourquoi la caractérisation des altérations moléculaires présentes au sein d'une tumeur est importante.

### 1.3 LES CARACTERISTIQUES DU CANCER

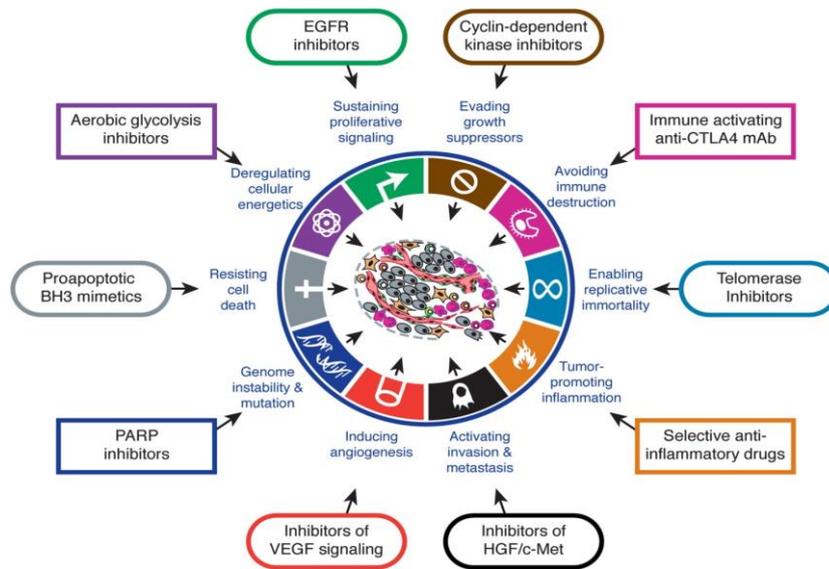
Six caractéristiques propres aux cellules cancéreuses ont été initialement proposées (Hanahan & Weinberg, 2000). Ces caractéristiques sont : l'indépendance vis-à-vis des signaux prolifératifs, l'échappement aux signaux suppresseurs de croissance, la capacité à envahir l'organe dans lequel la tumeur est apparue, puis le reste de l'organisme via les métastases, l'induction de l'angiogenèse, la résistance à la mort cellulaire (apoptose) et une capacité à proliférer de manière illimitée (Figure 4A). Une réflexion plus approfondie et les récentes recherches et découvertes sur le cancer ont permis de rajouter 4 autres caractéristiques que sont : la dérégulation des voies métaboliques (effet Warburg), l'instabilité génomique et les mutations génétiques, l'inflammation comme facteur promouvant la progression tumorale et enfin la capacité à échapper au système immunitaire (figure 4B), (Hanahan & Weinberg, 2011).



**FIGURE 4 : LES 10 CARACTERISTIQUES DU CANCER** (Hanahan & Weinberg, 2011).

*A : Les 6 premières caractéristiques du cancer ; B : Les 4 dernières caractéristiques du cancer ajoutées récemment suite aux dernières études et à une réflexion plus approfondie.*

La compréhension des mécanismes impliqués dans la progression tumorale a permis de caractériser les différentes propriétés des cellules cancéreuses et ainsi de développer différents types de drogues spécifiques à chacune de ces propriétés. A l'heure actuelle, ces 10 caractéristiques propres au développement tumoral peuvent être ciblées par un traitement thérapeutique visant l'angiogenèse, l'inflammation, l'échappement à la mort cellulaire ou encore au système immunitaire. Les propriétés des cellules cancéreuses ciblées par ces différentes drogues sont représentées ci-après (figure 5) :



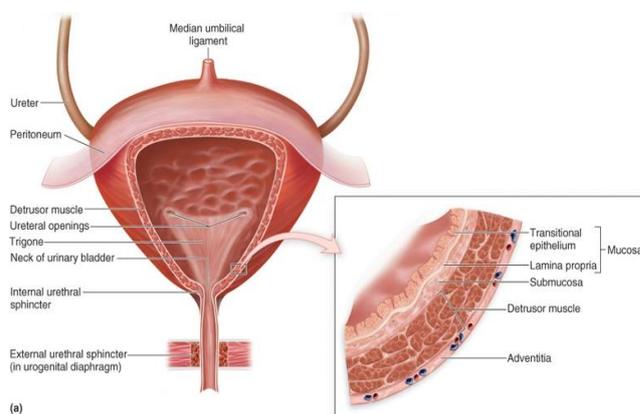
**FIGURE 5 : LES DIFFERENTES THERAPIES EXISTANTES POUR TRAITER LE CANCER BASEES SUR LES 10 CARACTERISTIQUES DU CANCER (Hanahan & Weinberg, 2011)**

Le cancer étudié au cours de cette thèse est le cancer de la vessie. Celui-ci sera donc détaillé ci-après selon les critères suivants : épidémiologie, facteurs de risques, classification histopathologique, voies de progression tumorales et altérations moléculaires connues.

## CHAPITRE II : LE CANCER DE LA VESSIE

### 2.1 LA VESSIE : ANATOMIE ET FONCTION

La vessie est un organe creux dont le rôle est de stocker et d'évacuer l'urine excrétée par les reins. Elle se subdivise en trois couches principales : la muqueuse, la sous-muqueuse, et le muscle. La muqueuse, est une couche de cellules qui tapisse l'intérieur de la vessie. Elle est aussi appelée urothélium ou épithélium transitionnel. C'est cette muqueuse qui se trouve fréquemment au contact directe de l'urine, et donc potentiellement de substances toxiques que celle-ci peut contenir. La sous-muqueuse est une couche de tissu conjonctif qui sépare la muqueuse et la musculuse, dans cette seconde couche se trouve des vaisseaux sanguins, de nerfs et des glandes. Elle est aussi appelée Lamina Propria, tissu sous-urothéliale ou encore stroma. La musculuse quant à elle est constituée de trois couches de tissu musculaire, s'étendant jusqu'à l'extérieur de la sous-muqueuse. Cette troisième couche est aussi appelée muscle lisse, musculuse longitudinale ou encore musculuse externe.



**FIGURE 6 : REPRESENTATION ANATOMIQUE DE LA VESSIE ©THE MCGRAW HILL COMPANIES**

**INC.**

### 2.2 EPIDEMIOLOGIE

Le cancer de la vessie est la 11<sup>e</sup> cause de cancer dans le monde. On dénombre environ 330 000 nouveaux cas par an, la plupart dans les pays industrialisés, notamment en Europe et en Amérique du nord. C'est le 6<sup>e</sup> cancer en termes d'incidence. La probabilité de développer un cancer de vessie est de 4% chez les hommes et 1,2% chez les femmes. Le risque de développer un cancer de vessie apparaît surtout après 60 ans. L'âge moyen au premier diagnostic est de 69 ans chez l'homme et 71 ans chez la femme. Les cancers de

vessie sont la cause de 130 000 décès par an, soit 3% des décès par cancer. Les décès dû à un cancer de vessie sont 5 fois plus élevé chez l'homme que chez la femme. L'apparition des tumeurs de vessie peut s'expliquer grâce à plusieurs facteurs de risque, notamment le tabagisme.

En France, le cancer de vessie occupe le 5<sup>e</sup> rang en termes d'incidence juste après les cancers du sein, les cancers colorectaux, et les cancers du poumon. On dénombre plus de 10 000 nouveaux cas par an.

## 2.3 FACTEURS DE RISQUES

Trois facteurs de risques principaux ont été identifiés comme impliqués dans l'apparition et le développement des tumeurs de vessie : le tabagisme, les facteurs génétiques (déficience pour certaines enzymes de détoxification), et les facteurs environnementaux (présence de certains produits dans l'eau de boisson comme le chlore ou l'arsenic, infections, expositions professionnelles, pollution atmosphérique).

### 2.3.1 TABAGISME

De nombreuses études épidémiologiques ont clairement montré qu'il existe un lien fort entre le tabagisme et le risque de développer un cancer de vessie, avec un ratio dose réponse (nombre de cigarettes par jour et nombre d'années de consommation). Le risque de développer une tumeur de vessie est trois fois plus élevé chez les fumeurs en comparaison aux non-fumeurs (Zeegers, Kellen, Buntinx, & van den Brandt, 2004). Au moins 43 substances reconnues comme étant carcinogènes chez l'animal ont été retrouvées dans le tabac (Phillips & Venitt, 2012). Cependant les mécanismes par lesquels ces substances carcinogènes contenues dans une cigarette induisent la formation de tumeurs de vessie ne sont pas clairement montrés.

### 2.3.2 FACTEURS GENETIQUES

On estime qu'un descendant direct d'un patient atteint d'un cancer de vessie a un risque augmenté de 50% à 100% de développer à son tour la maladie. Il existe en effet des gènes liés au système de détoxification, dont la déficience peut favoriser l'apparition de la maladie. Ainsi les individus présentant une déficience en enzymes NAT1 et NAT2 ont un risque plus élevé de développer une tumeur de vessie (faible capacité à éliminer de la vessie les métabolites N-hydroxylés), (A. K. Badawi, Hirvonen, Bell, Lang, & Kafflubar, 1995). L'autre facteur génétique pouvant être en cause dans le développement de tumeurs de vessie est une délétion homozygote conduisant à une déficience pour l'activité enzymatique de la

GSTM1 ou GSTP1b, qui sont impliqués dans la détoxification des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Harries, Stubbins, Forman, Howard, & Wolf, 1997).

### 2.3.3 FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

**Eau de boisson** : Il existe une corrélation entre la consommation d'eau potable désinfectée au chlore et le risque de développer un cancer de vessie. Le contact du chlore avec la matière organique contenu dans l'eau produit des hydrocarbures halogénés qui peuvent jouer le rôle de carcinogènes (Boorman et al., 1999; King & Marrett, 1996).

**Arsenic** : L'arsenic et ces métabolites peuvent conduire à l'apparition de cancers de vessie mais aussi de cancers du rein. L'exposition à ces substances peut avoir lieu via l'eau de boisson comme pour le chlore, certains herbicides utilisés pour l'agriculture, ou encore lors des traitements de certaines leucémies et lymphomes (chimiothérapie au trioxyde d'arsenic),(Chow et al., 1997; Kitchin, 2001). Les mécanismes impliquant l'arsenic inorganique dans l'apparition de cancer les cellules urothéliales incluent les dommages dus à un stress oxydatif, des effets sur les mécanismes épigénétiques et des interférences avec la réparation de l'ADN. Ces effets de l'arsenic dans la vessie sont reconnus comme directement impliqués dans la carcinogénèse urothéliale (Saint-Jacques, Parker, Brown, & Dummer, 2014).

**Infections** : L'infection par le parasite *Schistosoma haematobium* dans la vallée du Nil est responsable d'une métaplasie épidermoïde de l'urothélium. Cette infection, couplée à d'autres infections urinaires chroniques et/ou une exposition aux nitrosamines conduirait à une plus forte fréquence d'apparition de tumeurs de vessie (A. F. Badawi, 1996; El-Bolkainy, Mokhtar, Ghoneim, & Hussein, 1993). A l'heure actuelle les infections par des virus dont les HPV sont suspectées d'être impliquées dans l'apparition de cancers de vessie (TCGA, 2014) mais le lien n'a pas été clairement démontré.

**Néphropathie endémique des Balkans** : La néphropathie est une affection du rein, elle est peut être glomérulaire, vasculaire, interstitielle ou tubulaire. La néphropathie endémique des Balkans, due probablement à la présence d'acide aristolochique dans les plantes est de type tubulo-interstitielle et est associée à un risque accru de développer une tumeur urothéliale sur l'ensemble de l'appareil urinaire (Stefanovic, Toncheva, Atanasova, & Polenakovic, 2006).

**Expositions professionnelles** : le lien entre le développement de cancers de vessie et l'exposition à des produits utilisés dans certains milieux industriels a clairement été démontré. On distingue notamment l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) utilisés en métallurgie et sidérurgie pour la production de fer, de coke,

d'acier et d'aluminium, mais aussi présentes dans la cigarette, l'exposition aux amines aromatiques présente dans l'industrie du caoutchouc des colorants, et lors de l'utilisation de pesticides dans agriculture, et enfin l'exposition aux nitrosamines que l'on retrouve dans la cigarette et les huiles minérales.

**Pollution** : Il a récemment été montré que la pollution atmosphérique pouvait jouer un rôle dans l'apparition des tumeurs de vessie (Loomis et al., 2013).

## 2.4 CLASSIFICATION HISTOPATHOLOGIQUE DES TUMEURS DE VESSIE

La classification histopathologique des tumeurs de vessie est faite grâce à deux classifications. La première est la classification TNM (Tumor, Nodes, Metastasis) représentée ci-dessous (table 1) qui classe les tumeurs en fonction de leur stade (pT), de la présence ou non de ganglions lymphatiques (N), et de la présence ou non de métastases (M).

Pathologic TNM staging—2010	
<i>Primary tumor (pT)</i>	
Tx	Primary tumor cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumor
Ta	Noninvasive papillary carcinoma
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor invades the subepithelial connective tissue (lamina propria)
T2	Tumor invades the muscularis propria
T2a	Tumor invades the superficial muscularis propria (inner half)
T2b	Tumor invades the deep muscularis propria (outer half)
T3	Tumor invades the perivesical tissue
T3a	Microscopically
T3b	Macroscopically (extravesical mass)
T4	Tumor invades any of the following: prostatic stroma, uterus, vagina, pelvic wall, and abdominal wall
T4a	Tumor invades the prostatic stroma, uterus, or vagina
T4b	Tumor invades the pelvic wall or abdominal wall
<i>Regional lymph nodes (pN)</i>	
Nx	Regional lymph nodes cannot be assessed
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Single regional lymph node metastasis in the true pelvis (hypogastric, obturator, external iliac, or presacral lymph node)
N2	Multiple regional lymph node metastasis in the true pelvis (hypogastric, obturator, external iliac, or presacral lymph node)
N3	Lymph node metastasis to the common iliac lymph nodes
<i>Distant metastasis (pM)</i>	
M0	No distant metastasis
M1	Retroperitoneal lymph nodes and distant metastasis

**TABLE 1 : CLASSIFICATION TNM DES CARCINOMES UROTHELIAUX (Pedrosa et al., 2014)**

La seconde est la classification des tumeurs par grade. Il existe deux systèmes de classifications par grade établis par l’OMS, celui de 1973 et celui de 2004 (table 2).

<b>1973 WHO Grading classification</b>
urothelial papilloma
Grade 1: well differentiated
Grade 2 : moderately differentiated
Grade 3: poorly differentiated
<b>2004 WHO Grading classification</b>
urothelial papilloma
Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential
Low-grade papillary urothelial carcinoma
High-grade papillary urothelial carcinoma

**TABLE 2: CLASSIFICATION DES CARCINOMES DE VESSIE PAR GRADE SELON L’OMS EN 1973 ET 2004. EUROPEAN ASSOCIATION OF UROLOGY**

Les Tumeurs de vessie peuvent être divisées en deux groupes, en fonction de leur stade. Ainsi on distingue les tumeurs de stade CIS, Ta ou T1 n’ayant pas envahi le muscle, et les tumeurs de stade T2-T4 qui ont envahi le muscle. Le stade tumoral d’une tumeur de vessie est déterminé en fonction de l’infiltration de la tumeur à travers les différentes couches de tissu constituant la vessie. Ces stades sont décrits ci-dessous:

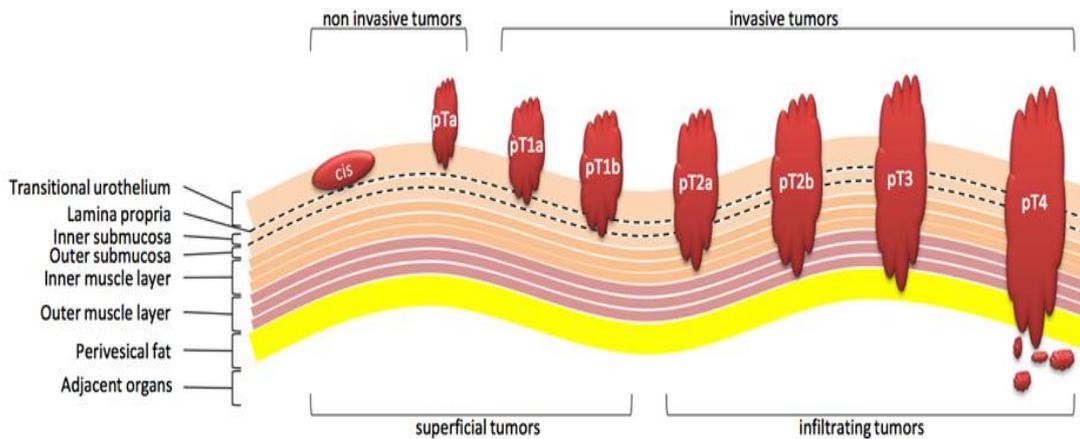
**Tumeurs CIS et Ta :** les tumeurs CIS (carcinomes in situ) sont des lésions planes présentes à la surface de l’urothélium. Les tumeurs papillaires Ta sont elles aussi présentes à la surface de l’urothélium mais sous forme de papilles.

**Tumeurs de stade T1 :** On distingue les tumeurs T1a et T1b. Les tumeurs de stade T1a sont retrouvées présentes à la surface de l’urothélium et en partie dans la lamina propria. Les tumeurs T1b ont quant à elles envahi la majeure partie de la lamina propria.

**Tumeurs de stade T2 :** On distingue les tumeurs T2a et T2b. Les tumeurs de stade T2a ont envahi la lamina propria, la sub-muqueuse et une première couche de la musculature. Les tumeurs de stade T2b ont quant à elles envahi les différentes couches de la musculature (interne et externe).

**Tumeurs de stade T3 et T4 :** Les tumeurs de stade T3 sont infiltrées dans toutes les couches composant la vessie. Les tumeurs de stade T4 ont envahi les organes adjacents. Ces tumeurs sont généralement très agressives.

La progression des tumeurs de vessie à travers les différentes couches constituant la vessie, que sont l’urothélium, la lamina propria, la sub-muqueuse et la musculature en fonction de leur évolution par stade est représentée ci-après (figure 7) :

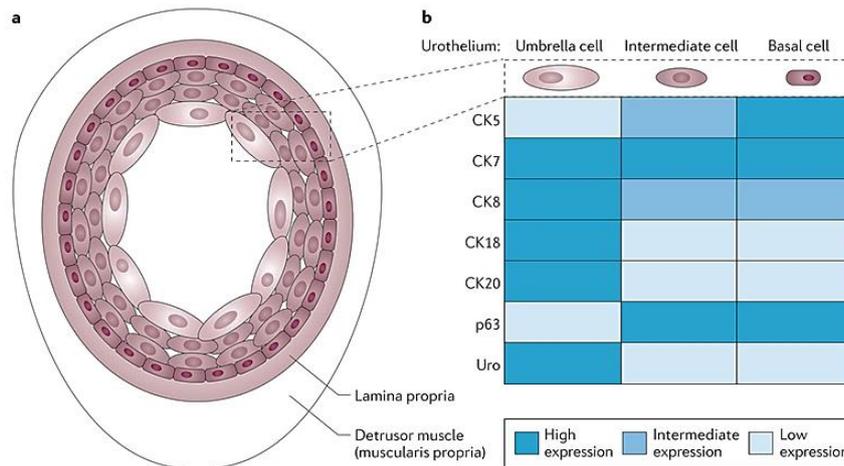


**FIGURE 7 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA CLASSIFICATION DES DIFFERENTS STADES DES TUMEURS DE VESSIE (Aubertin, 2009)**

## 2.5 ORIGINES DES TUMEURS DE VESSIE

L'urothélium est un épithélium composé de 3 sous-types cellulaires : les cellules superficielles, les cellules intermédiaires et les cellules basales. Ces sous-types cellulaires expriment différents niveaux de kératines que sont les kératines 5, 7, 8, 10 et 20. Les cellules basales expriment un fort taux de kératine 5 (CK5), tandis que les cellules en ombrelles (cellules superficielles) expriment de fort taux de CK7, CK8, CK18 et CK20.

C'est à partir de ce tissu épithélial que vont se former les tumeurs de vessie (cf figure 8). Cependant jusqu'à présent l'origine exacte des différents types de tumeurs de vessie n'avait pas été clairement montrée. On distinguait les tumeurs papillaires issues d'une hyperplasie d'un urothélium normal, non agressives et pour lesquelles la probabilité d'évoluer est faible, et les tumeurs CIS (carcinomes *in situ*) issues d'une dysplasie d'un urothélium normal et qui sont plus agressives que les tumeurs papillaires.



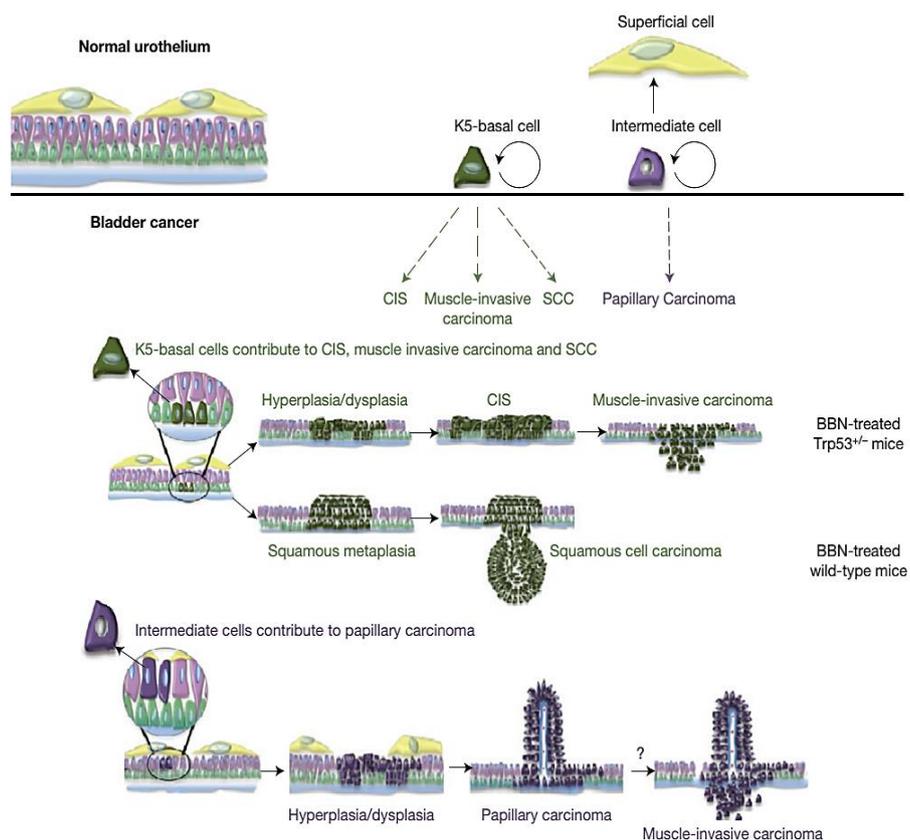
**FIGURE 8 : LES DIFFERENTS SOUS TYPES CELLULAIRES COMPOSANT L'EPITHELIUM LA VESSIE**  
(Kobayashi, Owczarek, McKiernan, & Abate-Shen, 2014)

La kératine 5 et p63 sont des marqueurs des cellules basales et intermédiaires alors que les kératines 7, 8, 18 et 20 ainsi que les uroplakine (URO) sont des marqueurs des cellules en ombrelles.

Récemment il a été montré dans un modèle murin que les tumeurs papillaires de vessie avaient pour origine les cellules lumineales intermédiaires de l'urothélium, alors que les CIS (carcinomes in situ) et les SCC (Squamous Cell Carcinoma) étaient issus des cellules CK5 basales.

Des souris ont été traitées avec un pro-carcinogène, le BBN (N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine), qui est une nitrosamine semblable à celles présentes dans les cigarettes. Le BBN ne devient un agent alkylant de l'ADN qu'après avoir été métabolisé par le foie. Il est utilisé dans les modèles murins pour induire de manière spécifique des carcinomes urothéliaux. En effet, le BBN n'a aucun effet sur les reins, les uretères, le tractus gastro-intestinal et les poumons. Deux modèles murins ont été étudiés : un premier modèle murin exprimant le gène TP53 sauvage (WT) et un second modèle murin présentant une perte d'hétérozygotie pour le gène TP53 (TP53+/-) et traité au BBN. L'expression de TP53+/- est sous dépendance de l'uroplakine 2, pour que la perte d'hétérozygotie soit spécifique à la vessie. Le gène TP53, comme décrit précédemment, est un gène fréquemment altéré dans les carcinomes urothéliaux évoluant vers des tumeurs agressives et envahissant le muscle. Le traitement au BBN des souris TP53+/- a conduit à la formation de différentes lésions : hyperplasies, dysplasies, carcinomes papillaires, CIS et lésions invasives. Il a été observé jusqu'à cinq fois plus de lésions de type carcinomes urothéliaux dans ces souris TP53+/- en comparaison aux souris TP53 WT. De plus, les mâles TP53+/- ont développés deux fois plus de lésions de type carcinomes urothéliaux que les femelles TP53+/-, suggérant que

ceux-ci ont une plus grande prédisposition à développer des carcinomes urothéliaux comme cela a déjà été rapporté chez l'homme (Van Batavia et al., 2014). Le fait que les mâles aient une plus grande prédisposition à développer des carcinomes urothéliaux suggère que les récepteurs hormonaux puissent jouer un rôle dans le développement tumoral des cancers de vessie (récepteur aux androgènes). Par la suite les marqueurs spécifiques aux différents sous-types cellulaires composant l'urothélium ont été étudiés par histologie dans les différentes tumeurs obtenues: CK5, 7, 8, 10 et 20, p63. Cela a permis de montrer que les tumeurs obtenues sous traitement BBN et présentant une perte d'hétérozygotie pour p53 étaient des tumeurs de type CIS issues de cellules K5 basales. Les tumeurs SCC (squamous cell carcinoma) ne sont obtenues que dans le cas où l'urothélium a subi une exposition au BBN mais sans altération de p53, et sont moins agressives que les CIS. Quant aux tumeurs papillaires, cette étude a permis de montrer qu'elles semblaient être issues des cellules intermédiaires (Van Batavia et al., 2014), (figure 9).

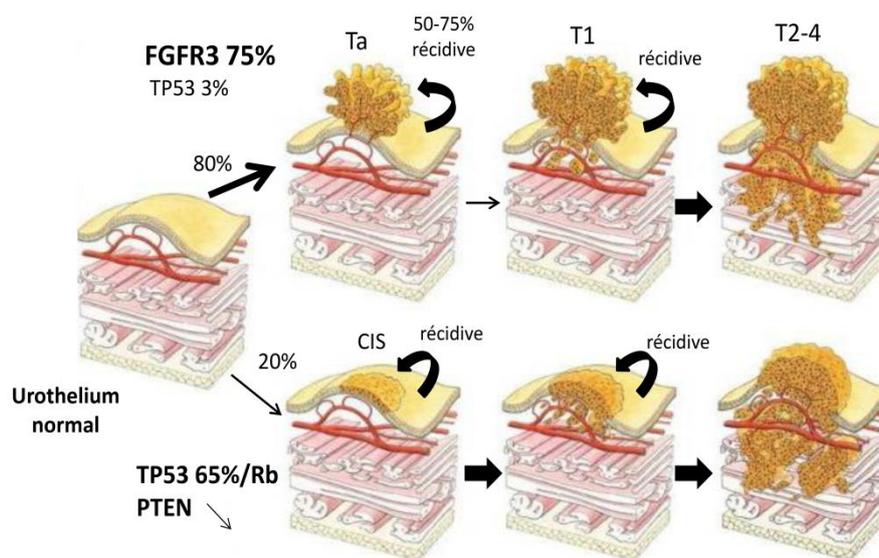


**FIGURE 9 : ORIGINES DES TUMEURS PAPILLAIRES, DES TUMEURS CIS, ET DES TUMEURS SCC**  
(Van Batavia et al., 2014).

*Les tumeurs papillaires semblent être issues des cellules intermédiaires alors que les tumeurs CIS semblent être issues des cellules basales.*

## 2.6 VOIES DE PROGRESSION TUMORALES

Deux voies de progression ont été décrites dans les cancers de vessie, la voie des tumeurs Ta et la voie des Carcinomes *in situ* (CIS). Les CIS sont issus d'une dysplasie d'un urothélium normal et forment à la surface de l'urothélium des lésions planes qui sont très difficiles à diagnostiquer. Les tumeurs de cette voie de progression tumorale sont généralement plus agressives que les tumeurs issues de la voie des tumeurs papillaires. La voie des tumeurs superficielles papillaires Ta, est initiée à partir d'une hyperplasie d'un urothélium normal. Les tumeurs de cette voie forment des lésions papillaires facilement détectables à la surface de l'urothélium. Ces tumeurs sont généralement moins agressives que les tumeurs de type CIS. Cependant si la tumeur évolue, passant du stade Ta au stade T1, et envahissant de ce fait la membrane basale, la probabilité qu'elle envahisse par la suite le muscle, est élevée. Ces deux voies de progression tumorale sont représentées ci-après (figure 10) :



**FIGURE 10 : VOIES DE PROGRESSION TUMORALE DES CARCINOMES DE VESSIE**

Les tumeurs de vessie peuvent être divisées en deux voies de progression tumorale. La première est celle des tumeurs papillaires Ta de bas grade qui forment des papilles à la surface de l'urothélium et qui évoluent peu mais récidivent fréquemment après résection de la tumeur. Ces tumeurs sont caractérisées par des altérations fréquentes de FGFR3. La seconde est la voie des tumeurs CIS qui forment des lésions planes à la surface de l'urothélium et sont plus agressives que les tumeurs papillaires. Ces tumeurs sont notamment caractérisées par des altérations fréquentes de TP53. Les tumeurs de ces deux voies de progression tumorale peuvent évoluer vers un envahissement de la membrane basale puis du muscle.

Les tumeurs de vessie constituent une maladie présentant une forte hétérogénéité. Les tumeurs superficielles sont caractérisées par des mutations du gène *FGFR3* et des altérations du chromosome 9. Les tumeurs de haut grade et celles ayant envahie le muscle sont caractérisées par des mutations de TP53 et de l'aneuploïdie (López-Knowles et al., 2006).

### 2.6.1 ALTERATIONS MOLECULAIRES DANS LA VOIE DES TUMEURS PAPILLAIRES

#### **Altérations génétiques du chromosome 9**

L'altération moléculaire la plus fréquemment retrouvée dans les tumeurs de vessie est la perte d'hétérozygotie du chromosome 9. Cette altération chromosomique est retrouvée dans près de 89% des tumeurs de vessie (Wada et al., 2003). Des pertes d'hétérozygotie sont fréquemment retrouvées à la fois sur les bras court et long du chromosome 9. Elles touchent les régions 9p22.1, 9q22.3 et 9q32-33.1, sur lesquels on trouve les gènes suppresseurs de tumeurs *PTCH* (Gorlin syndrome gene) et *DBCCR1* (Wada et al., 2003), mais aussi 9p21 sur lequel se trouve les locus des inhibiteurs de kinase cycline dépendants *CDKN2A* et *CKN2B*, et 9q34 sur lequel se trouve le gène *TSC1* (Tuberous Sclerosis 1).

Le locus *CDKN2A* code pour les protéines p16 et p14, et le locus *CDKN2B* code pour la protéine p15 (Pasin, Josephson, Mitra, Cote, & Stein, 2008). p16, p14 et p15 étant impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire. La perte de p16 est nécessaire pour acquérir l'immortalisation de cellules de tumeurs de vessie en culture cellulaire (Chapman, Harnden, Chambers, Johnston, & Knowles, 2005).

Dans la région 9q34, le gène *TSC1* code pour une protéine nommée hamartin, qui interagit avec le produit du gène *TSC2* impliqué dans la voie de signalisation PI3Kinase/AKT en promouvant la régulation négative de mTOR, protéine centrale dans le contrôle de la synthèse protéique et de la croissance cellulaire (Pasin et al., 2008). Des mutations du gène *TSC1* ont été identifiées dans 14,5% des tumeurs de vessie (Pymar, Platt, Askham, Morrison, & Knowles, 2008).

Les altérations chromosomiques retrouvées sur le chromosome 9 sont un changement génétique précoce, conduisant plus fréquemment à l'apparition des tumeurs de la voie des tumeurs papillaires, qu'à celle des carcinomes *in situ* (Pasin et al., 2008).

Notre équipe a montré récemment que la perte d'un allèle ou des deux allèles de *CDKN2A* dans les tumeurs papillaires *FGFR3* muté n'envahissant pas le muscle (T<sub>a</sub> et T<sub>1</sub>) est corrélée à une progression tumorale conduisant à un envahissement du muscle, indépendamment du grade (Rebouissou et al., 2012), en comparaison aux tumeurs papillaires *FGFR3* muté qui ne présentent pas d'altérations de *CDKN2A*.

### **Mutations des gènes *FGFR3* et *RAS***

Les gènes *FGFR3* (Fibroblast Growth Factor Receptor 3) et *RAS* (GTPases de la famille des protéines G monomériques) sont fréquemment mutés dans les tumeurs de vessie. Des mutations activatrices du gène *FGFR3* (exons 7,10 et 15) sont observées dans 60 à 70 % des cas des tumeurs papillaires de bas grade, alors que ces mutations ne sont trouvées que dans 10 à 20% des tumeurs envahissant le muscle.

Des mutations du gène *RAS* sont fréquemment observées dans les tumeurs papillaires. Un chiffre a été avancé quant à la fréquence des mutations du gène *RAS* dans ces tumeurs. Ainsi des mutations activatrices des gènes *RAS*, et notamment *HRAS* avaient été rapportées dans 30 à 40 % des cas des tumeurs papillaires de bas grade (Mitra, Datar, & Cote, 2006; Pasin et al., 2008). Il a été montré par la suite que les mutations du gène *RAS* (*HRAS, NRAS, KRAS*) étaient retrouvées dans 13% des tumeurs de vessie, tout stade et grade confondus (Jebar et al., 2005).

De manière intéressante, dans les tumeurs papillaires les mutations des gènes *FGFR3* et *RAS* (*HRAS, KRAS* et *NRAS*) sont mutuellement exclusives. Cependant il n'est pas possible à l'heure actuelle d'en établir les causes exactes. Il est vraisemblable d'imaginer que *RAS* puisse faire partie des voies de signalisation du récepteur *FGFR3*, et notamment du récepteur *FGFR3* muté dans les tumeurs papillaires de vessie, et qu'ainsi les mutations de *RAS* conduisent à l'activation des mêmes cibles biologiques que celles de *FGFR3*. Mais il est aussi possible que ces mutations de *FGFR3* et de *RAS* apparaissent simplement dans des sous-groupes de tumeurs différents, notamment compte tenu du fait que des mutations de *RAS* soient retrouvées dans des tumeurs ayant envahi le muscle. Dans ce dernier cas il n'y aurait aucun rapport entre les mutations de *RAS* et les mutations *FGFR3*, l'activation de *RAS* pouvant être due à l'activation du récepteur à l'EGF (*EGFR*).

### **Altérations du gène *PIK3CA***

Une étude a montré que sur un panel de 87 tumeurs de vessie, tous stades et grades confondus, 13% des tumeurs présentent une mutation activatrice du gène *PIK3CA*. Les tumeurs mutées pour ce gène étaient dans la majorité des cas des néoplasmes papillaires urothéliaux de potentiel malin incertain (PUNLMP), et des tumeurs papillaires Ta. Dans cette étude, *PIK3CA* n'a été retrouvé muté dans aucun des échantillons de tumeurs envahissant le muscle, et avec une très faible fréquence dans des tumeurs T1, suggérant que ce type d'altération (mutations) est plus spécifique de la voie des tumeurs superficielles papillaires. De plus les mutations de *PIK3CA* étaient préférentiellement retrouvées associées aux altérations du gène *FGFR3*. Ainsi, 26% des tumeurs *FGFR3* mutés présentent aussi une mutation du gène *PIK3CA*, contre seulement 7% des tumeurs

présentant un récepteur FGFR3 sauvage (López-Knowles et al., 2006). Dans les tumeurs de haut stade, haut grade les mutations de ce gène sont très peu présentes, mais on trouve des amplifications ou des gains de *PIK3CA* corrélées à des pertes du gène suppresseur de tumeur *PTEN* (Koksal et al., 2005).

## 2.6.2 ALTERATIONS MOLECULAIRES DANS LE PATHWAY DES CIS

### **Altérations du gène *PTEN***

*PTEN* (Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten) est le gène suppresseur de tumeur permettant de réguler négativement l'activation du pathway PI3K/AKT. De nombreux cancers (gliome, sein, prostate...) présentent des altérations du gène *PTEN*, généralement des mutations et des délétions homozygotes (Aveyard, Skilleter, Habuchi, & Knowles, 1999). C'est le deuxième gène suppresseur de tumeur le plus souvent muté dans les cancers humains après *TP53* (X. Wang & Jiang, 2008).

Dans les tumeurs de vessie, l'altération du gène *PTEN* la plus fréquemment retrouvée est une perte d'hétérozygotie dans la région 10q23 du chromosome 10 qui inclut *PTEN*. Il a été montré sur un échantillon de 132 tumeurs, la perte allélique dans la région où se situe *PTEN* est observée dans 24,5% des tumeurs envahissant le muscle (stade supérieur à pT2) et dans 6,6% des tumeurs n'envahissant pas la muscle (pTa/pT1). Concernant les mutations du gène *PTEN*, elles sont retrouvées avec une très faible fréquence, tout comme les délétions homozygotes (Aveyard et al., 1999). Il a été montré que l'expression de *PTEN* n'est pas négativement corrélée avec celle de phospho-AKT (figure 11). Une forte expression de *PTEN* est observée dans les tumeurs de vessie de stade Ta en comparaison aux échantillons « normaux ». Cette expression de *PTEN* diminue par la suite dans les échantillons de tumeurs de stade T1, T2/T3/T4. Cependant on observe une augmentation du niveau de phospho-AKT même dans les tumeurs Ta. Il y a même de façon inattendue une légère corrélation positive entre le niveau de *PTEN* et le niveau de phospho-AKT (Calderaro et al., 2014). L'étude conclut que l'activation d'AKT dans un panel de tumeurs de vessie est indépendante du stade et du grade et des altérations moléculaires connues dont les pertes de *PTEN*. Ceci peut s'expliquer par le nombre important de voies de signalisation régulées par la protéine AKT qui est impliqué dans de nombreux processus cellulaires.

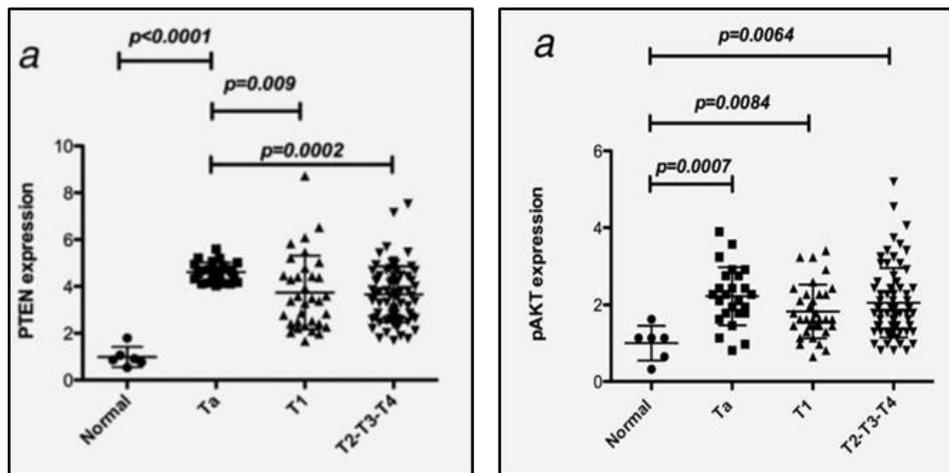
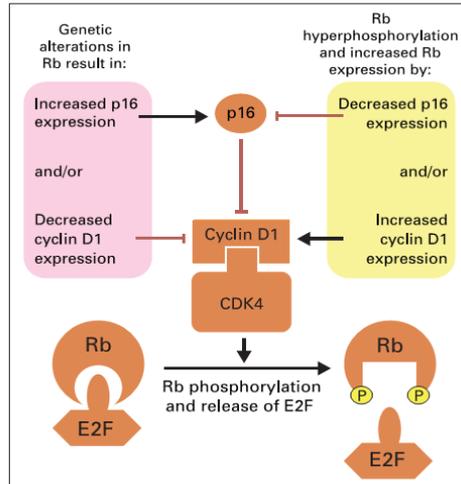


FIGURE 11 : EXPRESSION DE PTEN ET PHOSPHO-AKT DANS LES TUMEURS DE VESSIE  
(CALDERARO ET AL., 2014)

### Mutations des gènes *TP53* et *RB*

Les altérations chromosomiques du chromosome 9q et 9p peuvent avoir plusieurs conséquences. On trouve en effet sur ce chromosome les locus *CDKN2A* et *B*. L'inactivation de *CDKN2A* par exemple a des conséquences directes sur le rôle des protéines P53 et RB via les protéines p16 et p14 (Chapman et al., 2005). La protéine P16 peut inhiber la phosphorylation de RB ce qui conduit à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. La protéine p16 a d'autres effets anti-tumoraux, puisqu'elle agit négativement sur l'angiogenèse, l'invasion et la sénescence. Quant à la protéine p14, seconde protéine à être transcrite à partir du locus *CDKN2A*, elle permet la stabilisation de P53 en empêchant sa liaison avec MDM2. La protéine p14 est aussi capable d'interagir avec la topoisomérase I et de promouvoir l'apoptose via le clivage de la caspase 9 (Chapman et al., 2005).

Le gène *RB* code pour une phosphoprotéine jouant un rôle important pour la régulation du cycle cellulaire. La forme active de la protéine RB séquestre le facteur de transcription E2F. La phosphorylation de RB par les CDK (Cyclines Dépendantes des Kinases) induit le relargage d'E2F qui peut alors transcrire les gènes permettant d'induire la synthèse de l'ADN. (Mitra et al., 2006). L'hyper-phosphorylation de RB a les mêmes conséquences que l'inactivation de *RB* par des mécanismes génétiques. De plus une forte expression de RB dans certaines tumeurs est corrélée à une hyper-phosphorylation de celle-ci, conduisant à une perte d'expression de p16 et/ou à une surexpression de la cyclin D1, permettant ainsi un relargage permanent d'E2F, promouvant alors la prolifération cellulaire. Ce modèle identifié dans les tumeurs de vessie et proposé par Mitra et al, est représenté ci-après (figure 12) :



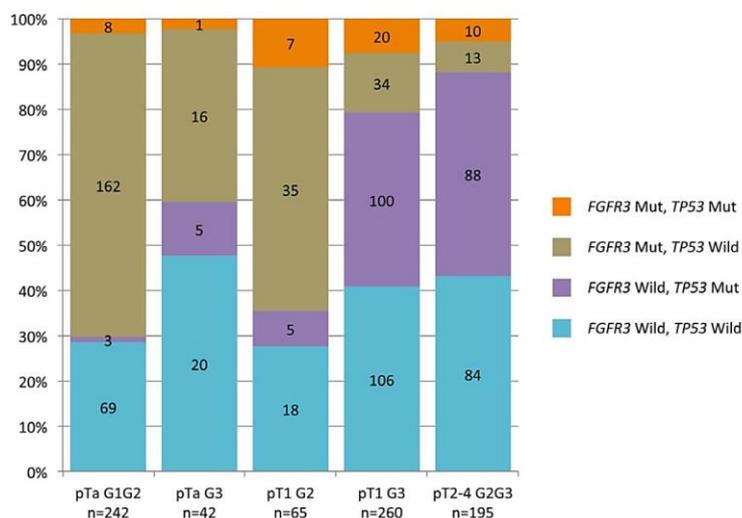
**FIGURE 12 : PHOSPHORYLATION DE RB ET CONSEQUENCES FONCTIONNELLES** (Mitra et al., 2006)

Dans les tumeurs invasives, l'activation des récepteurs EGFR et ERBB2, induit l'activation des voies RAS-MAPKinases qui transduisent le signal jusqu'au noyau ou l'activation des complexes Cycline/CDK induit la phosphorylation de RB et le relargage de E2F (Mitra et al., 2006).

La perte allélique fréquente dans les tumeurs de vessie de haut grade survient sur les chromosomes 9q et 9p mais aussi sur le chromosome 17p, avec une perte d'hétérozygotie dans 63% pour ce dernier dans les tumeurs de vessie (Olumi et al., 1990). Cependant alors que les altérations du chromosome 9q et 9p sont observées dans un panel très large de tumeurs, tous stade et grades confondus, celles du chromosome 17p sont observées majoritairement dans des tumeurs de haut grade (Olumi et al., 1990). Par la suite, des mutations du gène *TP53* ont été identifiées dans les tumeurs de vessie. Ces mutations sont caractérisées soit par la substitution d'un acide aminé soit par une délétion. De manière intéressante, elles sont fortement associées à la perte allélique du chromosome 17, et apparaissent beaucoup plus fréquemment dans les tumeurs invasives de haut grade (Fujimoto et al., 1992; Sidransky et al., 1989).

Dans un premier temps il a avait été montré que les mutations touchant *TP53* et *FGFR3* étaient des mutations exclusives dans les tumeurs de vessie. *FGFR3* étant muté dans la voies des tumeurs pTa et *TP53* étant muté dans le cas des CIS (Bakkar et al., 2003; van Rhijn et al., 2002). Par la suite, plusieurs études avaient apporté des conclusions contradictoires quant à l'association des mutations de *FGFR3* et *TP53*. Plus récemment, notre équipe a réalisé une méta-analyse de la relation entre les mutations de *FGFR3* et

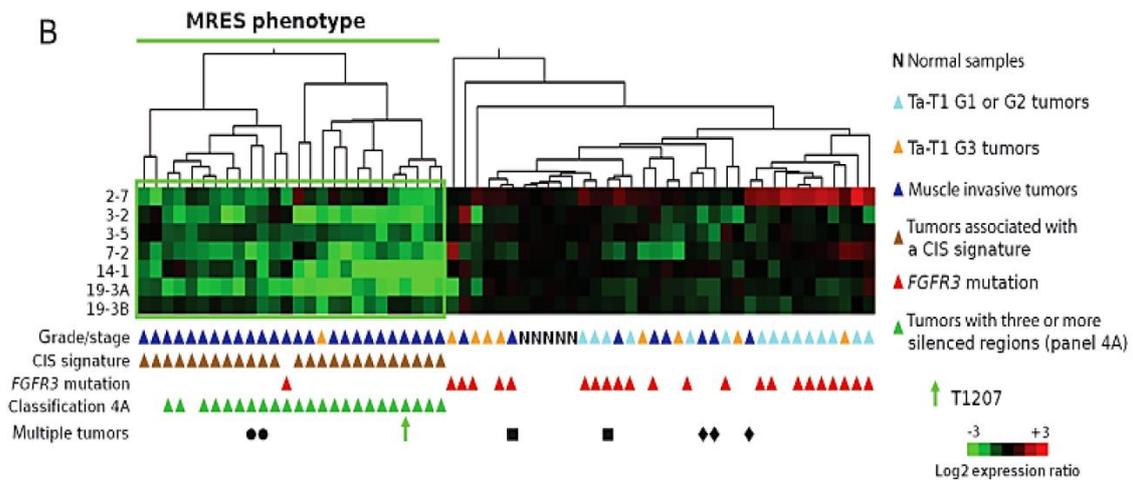
P53 dans les tumeurs de vessie. Le gène *FGFR3* est retrouvé muté dans 65% des tumeurs papillaires Ta, 33% des tumeurs pT1, 22% des tumeurs pT2-4 mais dans aucun cas de tumeur de vessie de type CIS. Le gène *TP53* est retrouvé muté dans 19% des cas de pTa, et 52% des cas de CIS (Yann Neuzillet et al., 2012), ces résultats sont présentés ci-après (figure 13) :



**FIGURE 13 : COMBINAISON DES FREQUENCES DE MUTATIONS DE *FGFR3* ET *TP53* EN FONCTION DU GROUPE STADE/GRADE (Yann Neuzillet et al., 2012).**

### **Phénotype MRES**

Notre groupe a identifié un phénotype de répression de l'expression des gènes de 7 régions chromosomiques contiguës dans des tumeurs présentant une signature de l'expression des gènes de type CIS. Cette répression est due à un mécanisme épigénétique, et se traduit par une méthylation des histones H3K9 et H3K27, ainsi qu'une hypo-acétylation de H3K9. Ce phénotype est appelé phénotype MRES (« Multiple Regional Epigenetic Silencing »). Sur un échantillon de 57 tumeurs, 26 présentent ce phénotype MRES, dont 25 avec une signature de type CIS. Parmi les 31 tumeurs restantes aucune ne présente ni signature CIS ni phénotype MRES. De plus, une seule tumeur avec un phénotype MRES arbore une mutation de *FGFR3*, alors que des mutations de ce gène sont observées dans 22 des 31 tumeurs non MRES. Sur l'échantillon des 57 tumeurs analysées, 33 sont des tumeurs de haut stade ayant envahi le muscle. Sur ces 33 tumeurs, 25 présentent un phénotype MRES (figure 14). Cette étude a donc permis de proposer que les tumeurs présentant un phénotype MRES dérivent des CIS, tumeurs déjà très agressives et évoluant rapidement vers un envahissement de la membrane basale puis du muscle.



**FIGURE 14 : ANALYSE EN CLUSTER DE 57 TUMEURS DE VESSIE VERSUS 5 NORMAUX EN UTILISANT LE NIVEAU D'EXPRESSION DES GENES DANS LES 7 REGIONS EPIGENETIQUEMENT REPRIMEES (VALLOT ET AL., 2011)**

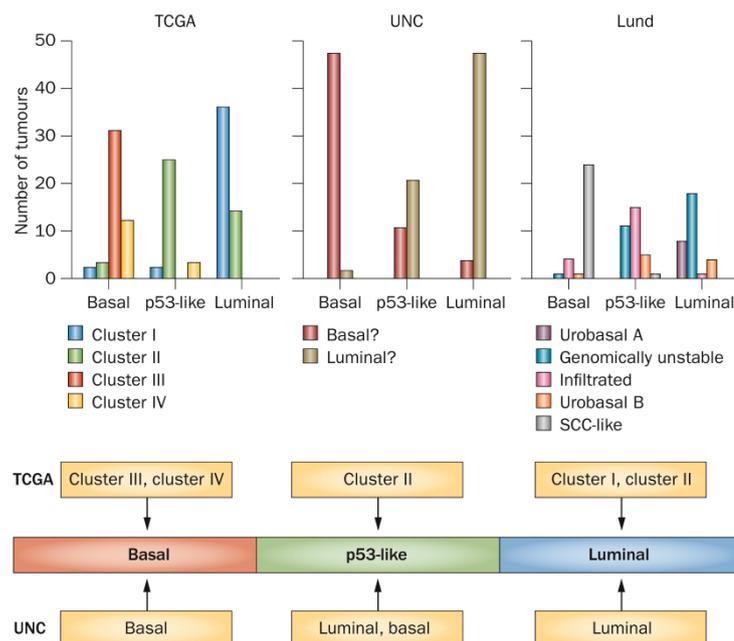
### Altérations épigénétiques

La récente étude menée par le TCGA, a permis l'analyse transcriptomique de 131 tumeurs de vessie envahissant le muscle (TCGA, 2014). De nombreuses altérations déjà décrites dans les tumeurs de vessie en sont ressorties (touchant les gènes *TP53*, *RB*, *RAS*, *FGFR3*), ainsi que des altérations très peu décrites jusqu'à présents. Ainsi, le pathway SWI/SNF (impliqué dans le remodelage de la chromatine) est altéré à 64% et celui de la modification des histones est altéré à 89%. Pour ces deux pathways on observe une inactivation des gènes impliqués. On citera notamment le gène *KDM6A*, aussi connu sous le nom de *UTX*, qui joue le rôle de déméthylase (déméthylase de H3K27Me2 et H3K27Me3) clé dans le code des histones et qui est fréquemment muté (mutation inactivatrice) dans les tumeurs de vessie.

Les tumeurs de vessie peuvent être classées en fonction du stade et du grade, du type d'altération moléculaire qu'elles présentent, mais elles peuvent aussi être classées en différents sous-groupes grâce aux données du transcriptome. Plusieurs classifications ont été récemment proposées. Le nombre de sous-groupes diffèrent selon les études mais un sous-groupe basal-like et un sous-groupe enrichi en tumeurs papillaires et/ou mutées pour *FGFR3* sont retrouvés dans pratiquement toutes les études.

## 2.7 CLASSIFICATION DES TUMEURS DE VESSIE : TUMEURS LUMINALES ET BASALES

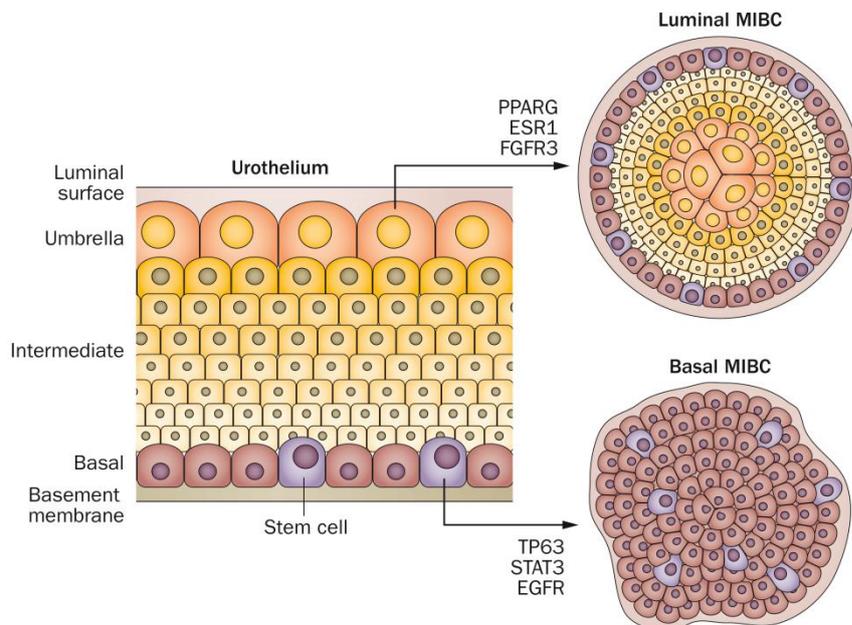
Ces différentes études sur la classification des tumeurs de vessie grâce aux données du transcriptome ont été menées par les équipes: de USCF (Blaveri et al., 2005), Lund (Sjödahl et al., 2012), UNC (Damrauer et al., 2014), TCGA (TCGA, 2014), MDA (Choi et al., 2014) et notre équipe en collaboration avec l'équipe CIT3 de la ligue contre le cancer (Rebouissou et al., 2014). Si l'on compare ces différentes études, il est possible d'observer des recouvrements entre les classifications des tumeurs de vessie. Choi et al, ont proposés une classification en trois grandes catégories : tumeurs lumineales, tumeurs p53-like, tumeurs basales (Choi et al., 2014). L'étude du TCGA a abouti à un classement de ces tumeurs en 4 clusters. Les clusters I et II représentent les tumeurs lumineales, le cluster II intègre aussi les tumeurs dites « p53 like », tandis que les clusters III et IV représentent les tumeurs dites basales. Ci-après sont représentées les différentes classifications établies par les études du TCGA, UNC, Lund et du groupe de Choi, obtenues après l'analyse transcriptomique des tumeurs de vessie :



**FIGURE 15 : CLASSIFICATION DES DIFFERENTS SOUS-GROUPES DE TUMEURS DE VESSIE EN FONCTION DE LEURS ALTERATIONS MOLECULAIRES, D'APRES LES ETUDES DU TCGA, DE LUND ET DU MDA. DANS CETTE FIGURE LA CLASSIFICATION PRISE COMME REFERENCE EST CELLE DU MDA (Choi et al., 2014).**

Le groupe basal-like que notre équipe a identifié (Rebouissou et al., 2014) correspond presque exactement aux tumeurs SCC-like de l'équipe de Lund, aux tumeurs basales du MDA et au groupe III du TCGA (résultats non publiés). Les tumeurs luminales sont caractérisées par l'expression du récepteur FGFR3, de PPAR $\gamma$ , des récepteurs ERBB2 et ERBB3, et des uroplakines, tandis que les tumeurs basales sont quant à elles caractérisées par l'expression des kératines des cellules basales des épithéliums, du récepteur EGFR, de STAT3 et de p63 (Choi et al., 2014).

Dans le cas des tumeurs de vessie ayant envahies le muscle (MIBC), l'origine de ces tumeurs ainsi que les biomarqueurs qu'elles expriment (tumeurs luminales ou basales) ont été proposés ci-après (figure 16) :



**FIGURE 16 : ORIGINES PROBABLE DES TUMEURS BASALES ET LUMINALES AYANT ENVAHIES LE MUSCLE ET ALTERATIONS MOLECULAIRES ASSOCIEES (Choi et al., 2014).**

# CHAPITRE III : RTK, STRUCTURE, ACTIVATION, VOIES DE SIGNALISATION ET CANCER

## 3.1 LES RECEPTEURS A ACTIVITE TYROSINE KINASE (RTK)

Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) sont une famille de molécules impliquées dans divers processus biologiques pour lesquels ils jouent un rôle essentiel, tels que le métabolisme, le contrôle du cycle cellulaire, la survie, la prolifération, la croissance ou encore la motilité cellulaire. 58 RTK classés en 20 sous-familles sont présents chez l'homme (figure 17). La topologie, le mode d'activation, ainsi que les composants clés recrutés par les RTK pour l'activation des voies de signalisation intracellulaires sont très conservées du nématode *C.elegans* à l'homme. De plus les mutations observées dans les RTK ainsi que l'activation aberrante de leurs voies de signalisation sont liées à de nombreuses pathologies : cancers, maladies inflammatoires, diabète, chondrodysplasies et angiogénèse. Ces observations ont conduit au développement de molécules bloquant ou atténuant l'activité des RTK.

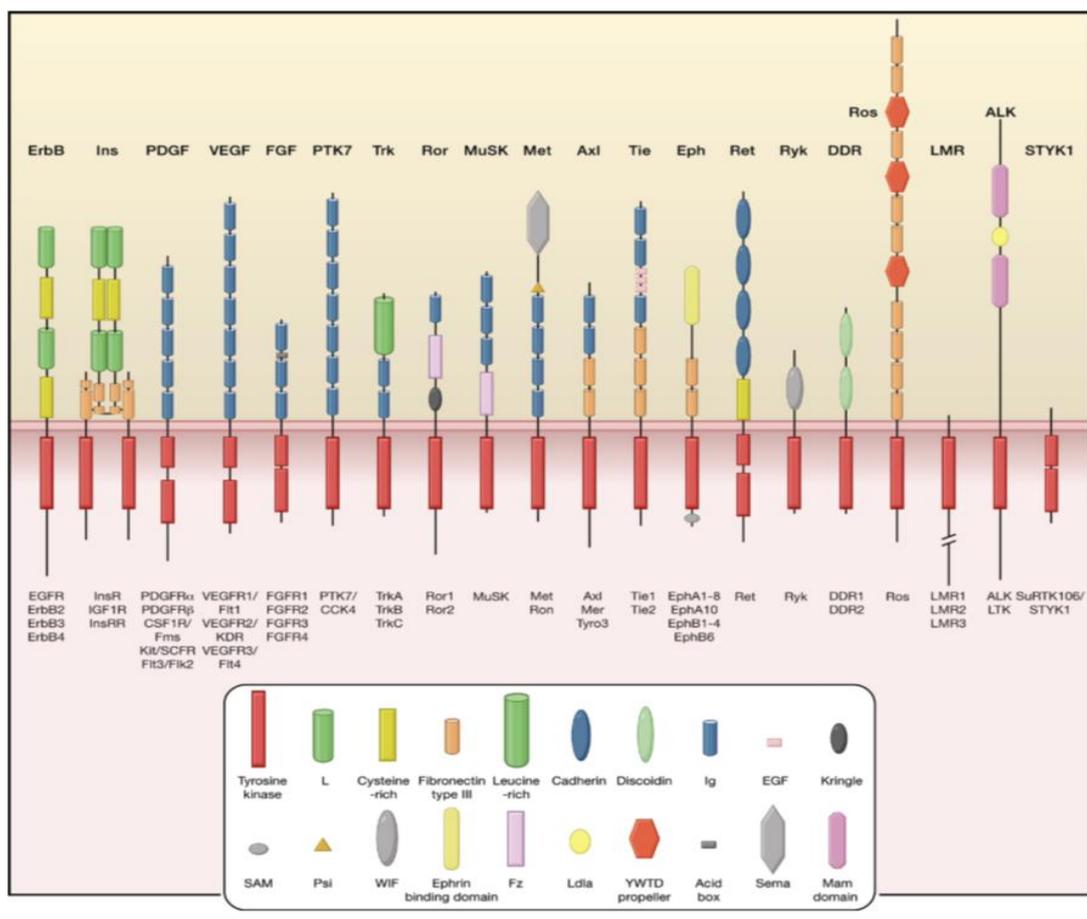


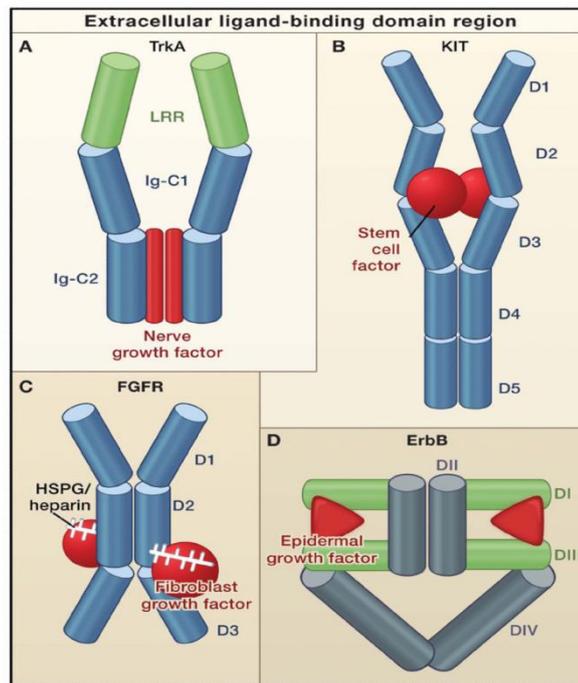
FIGURE 17 : LES 20 SOUS-FAMILLE DE RTKS (Lemmon & Schlessinger, 2010)

### 3.1.1 STRUCTURES ET MODES D'ACTIVATION DES RTK

#### ***Première étape d'activation des RTKs : fixation du ligand sur le domaine extracellulaire.***

Les RTK sont des protéines transmembranaires exprimées à la surface des membranes cellulaires, et notamment à la membrane plasmique. Ils sont constitués d'un domaine extracellulaire de liaison au ligand, d'un domaine transmembranaire, et d'un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase. En général, la fixation du ligand sur le domaine extracellulaire, induit le rapprochement de deux monomères et conduit à l'activation du RTK par phosphorylation du domaine tyrosine kinase. Cette activation conduit au recrutement de divers partenaires protéiques permettant d'induire des cascades de signalisation intracellulaires conduisant à l'activation ou à l'inhibition de divers processus cellulaires. Cependant certains RTK sont déjà présents sous forme d'oligomères sans que le ligand ne soit présent, c'est le cas pour les récepteurs de la sous-famille du récepteur à l'insuline qui sont déjà présents sous forme de dimère. Dans ce cas précis, la liaison du ligand sur le récepteur va induire un changement de conformation du dimère et stimuler son activité tyrosine kinase (Lemmon & Schlessinger, 2010). Plusieurs études ont suggéré que le ligand EGF se liait à des récepteurs déjà présents sous formes d'oligomères, mais la nature précise et la taille de ces oligomères n'est pas connue.

Chaque sous-famille de RTK possède un type de ligand ou une famille de ligands qui lui est propre. L'exemple de l'activation des récepteurs TrkA, KIT, FGFR et ErbB sera détaillé ci-après, figure 18, et illustre deux cas de mécanistique très différentes (récepteurs TrkA et ErbB) et deux cas intermédiaires (KIT et FGFR). Dans le cas du récepteur TrkA, la dimérisation du récepteur est totalement médiée par le ligand, il n'y a aucun contact entre les deux monomères (figure 18 A). A l'opposé de cela on trouve le cas du récepteur ErbB, où la dimérisation est entièrement médiée par le récepteur lui-même, le ligand n'apporte pas une contribution directe à l'interface du dimère (figure 18D). Les deux cas intermédiaires sont ceux des récepteurs KIT et FGFR (figure 18B et 18C). Dans ces deux cas la liaison du ligand sur chacun des monomères conduit au rapprochement de deux monomères et de ce fait à la dimérisation du récepteur. Certains domaines Immunoglobulines rentrent alors en contact (domaines D4 et D5 dans le cas du récepteur KIT et domaines D2 dans le cas des FGFR), (Lemmon & Schlessinger, 2010). De manière intéressante c'est dans le domaine D5 du récepteur KIT que des mutations activatrices sont retrouvées et permettent de stabiliser le récepteur dans une conformation active. Il en est de même pour les récepteur FGFR, et notamment le récepteur FGFR3 où la mutation d'un acide aminé en une cystéine dans le domaine extracellulaire conduit à la formation d'un pont disulfure et à une forme constitutivement active du récepteur.



**FIGURE 18 : FIXATION DU LIGAND ET ACTIVATION DES RTKS : TRKA, KIT, FGFR ET ERBB**  
(Lemmon & Schlessinger, 2010)

**(A)** : Activation du récepteur *TrkA*. Un dimère de facteur de croissance nerveuse (NGF : Nerve Growth Factor, ici en rouge) se fixe sur le domaine Ig-C2 de chaque monomère du récepteur *TrkA* et permet d'induire la dimérisation et l'activation du récepteur sans aucun contact direct entre les deux monomères (Werhman et al. 2007). **(B)** : Activation d'un récepteur *KIT*. Un dimère de facteur « stem cell » (SCF : Stem Cell Factor, ici en rouge) se fixe entre les domaines D2 et D3 de chaque monomère et permet d'induire la dimérisation du récepteur. Les domaines D4 et D5 rentrent alors en contact induisant l'activation du récepteur (Yuzawa et al. 2007). **(C)** : Activation d'un récepteur *FGFR*. L'activation du récepteur se fait suite à la fixation de deux molécules de ligand FGF (en rouge) sur chaque domaine D2 de chacun des deux monomères de FGF récepteur. Une molécule d'héparine vient se fixer en plus, permettant de consolider le rapprochement des deux monomères et la fixation du ligand (Schlessinger, 2000). **(D)** : Activation d'un récepteur *ErbB*. L'activation décrite ici est celle du récepteur *ErbB1*. La dimérisation est entièrement médiée par le récepteur. Le ligand qui est le facteur de croissance épidermique, (EGF : Epidermal Growth Factor) se lie sur les domaines DI et DIII d'une seule et même molécule de *ErbB*, et induit un changement de conformation du récepteur, induisant dès lors la dimérisation du domaine DII.

## **Seconde étape d'activation des RTKs : modulation et activation du domaine tyrosine kinase (intracellulaire)**

L'activation du domaine tyrosine kinase varie elle aussi en fonction du type de RTK et de sa structure, cependant il existe des types d'activation communs aux différents RTK. Par exemple, le mode d'activation du domaine tyrosine kinase est commun aux récepteurs FGF et aux récepteurs de la sous-famille du récepteur à l'insuline. Dans ce premier cas de figure l'inhibition du domaine tyrosine Kinase est apparentée à une inhibition de la boucle d'activation entre les domaines N-ter et C-ter du domaine tyrosine kinase. Dès lors, lorsque le ligand n'est pas fixé au domaine extracellulaire, il existe une boucle d'auto-inhibition due au rapprochement entre les domaines N-ter et C-ter empêchant la phosphorylation du site tyrosine. Le site actif de la kinase est alors inaccessible aux protéines partenaires du récepteur, empêchant ainsi l'activation des cascades de signalisation. La fixation du ligand sur le récepteur induit une dimérisation entre deux monomères conduisant à une phosphorylation des sites Tyrosine (Y) clés, inhibant cette boucle d'auto-inhibition et permettant alors de relâcher la structure du domaine tyrosine kinase, dont le site actif est alors accessible aux différents partenaires protéiques du récepteur. Les cascades de signalisation peuvent alors être enclenchées.

Il existe deux autres cas de figures. Celui du récepteur KIT et du récepteur Tie2. Dans le cas du récepteur KIT, l'inhibition du domaine kinase est apparentée à une inhibition juxtamembranaire. Une région juxtamembranaire située au niveau du sous-domaine N-ter du domaine tyrosine kinase interagit avec les différents éléments présents dans le domaine kinase, afin de stabiliser le site actif dans une conformation particulière inactive. La phosphorylation des sites tyrosine clés dans le domaine kinase suite à la fixation de ligand sur le domaine extracellulaire induit alors un changement de conformation et permet au récepteur de recruter et d'activer ces différents partenaires protéiques. Dans le cas du récepteur Tie2, c'est le sous-domaine C-ter qui interagit avec le site actif du domaine tyrosine kinase afin de le bloquer dans une conformation inactive (cf figure 19).

Dans le cas du récepteur à l'EGFR il existe aussi une conformation d'auto-inhibition mais l'activation est bien différente puisque la partie C-ter d'un domaine tyrosine kinase nommé « Activateur » vient interagir avec la partie N-ter d'un deuxième domaine tyrosine kinase, nommé « Recepteur ». Le domaine « Activateur » déstabilise alors les interactions d'auto-inhibition présentes dans le domaine « Recepteur », permettant ainsi l'activation de celui-ci (figure 19).

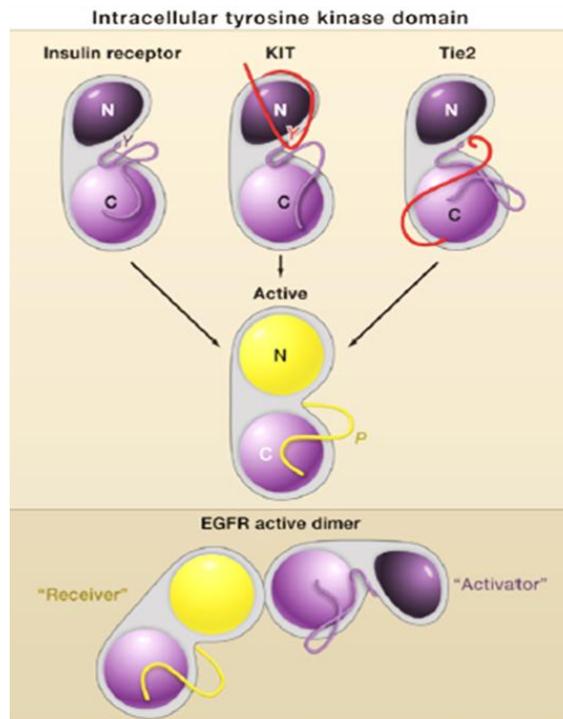


FIGURE 19 : DIMERISATION DES RTKS ET ACTIVATION (Lemmon & Schlessinger, 2010)

**Récepteur à l'insuline, à l'IGF1 et FGF récepteurs (inhibition de la boucle d'activation) :** pour les récepteurs FGFR, le récepteur à l'insuline et le récepteur IGF1, la boucle d'activation interagit directement avec le site actif du domaine kinase et bloque l'accès aux protéines substrats. La phosphorylation sur certaines tyrosines clés permet de lever cette interaction d'auto-inhibition et de relâcher le site actif de la kinase qui est alors accessible aux protéines substrats. **Récepteur KIT (inhibition juxtamembranaire) :** Dans le cas du récepteur KIT, la région juxtamembranaire (ici en rouge) interagit avec les éléments situés dans le site actif du domaine kinase (incluant la boucle d'activation ici en violet) afin de stabiliser le domaine kinase dans une conformation inactive. La phosphorylation sur certaines tyrosines clés dans la région juxtamembranaire permet de déstabiliser cette conformation inactive et permet au domaine tyrosine kinase d'être dans une conformation active. **Récepteur Tie2 (Inhibition C-terminale) :** dans le cas des récepteurs Tie1 et 2 et du récepteur MET, la queue C-terminale (ici en rouge) interagit avec le site actif du domaine tyrosine kinase, le stabilisant ainsi dans une conformation inactive. **Récepteur EGFR :** le domaine tyrosine kinase du récepteur EGFR est activé de manière allostérique par contact direct entre le « lobe C » d'un domaine tyrosine kinase nommé « activateur » et le « lobe N » d'un second domaine tyrosine kinase nommé « receveur ». Dans le domaine tyrosine kinase receveur, la présence d'une loupe d'activation permet de bloquer celui-ci dans une conformation inactive. C'est l'interaction du receveur avec l'activateur qui va permettre de déstabiliser cette auto-inhibition.

Pour tous les RTK, l'activation est une activation allostérique. La dimérisation permet une trans-phosphorylation d'un domaine kinase d'un monomère par l'autre. Même sous forme autoinhibé, chaque monomère possède assez d'activité kinase pour phosphoryler les sites tyrosine « clés » du domaine kinase de l'autre monomère. C'est cette auto-activation qui va alors permettre un changement de conformation du site actif de chaque domaine tyrosine kinase, induire l'activation complète du récepteur, et conduire au recrutement de partenaires protéiques via les sites dits d'ancrage tel que la protéine FRS2 $\alpha$  pour les récepteurs FGFR.

### 3.1.2 ACTIVATION DES VOIES DE SIGNALISATION PAR LES RTKS

#### ***Activation des voies de signalisation des RTKs : exemple des FGF récepteurs***

L'activation des récepteurs FGFR suite à leur liaison avec le ligand va permettre l'activation du récepteur, qui va alors s'auto-phosphoryler dans un premier temps ce qui va augmenter son activité catalytique (multipliée alors par 15 à 200 en fonction du RTK).

Dans le cas des récepteurs FGFR, l'activation du domaine tyrosine kinase conduit au recrutement de la protéine d'ancrage : FRS2 $\alpha$  (Fibroblast growth factor receptor substrate-2), protéine substrat des récepteurs FGFR. Le récepteur forme un complexe protéique avec FRS2 $\alpha$ , en interagissant avec le domaine PTB (phospho-tyrosine binding domain) de celle-ci (représentée en orange figure 20). Dès lors le récepteur FGFR va phosphoryler une multitude de sites présents sur la protéine FRS2 $\alpha$ , conduisant au recrutement des protéines GRB2 et de SHP2. GRB2 (growth factor receptor bound protein 2) est un adaptateur protéique contenant un domaine SH2 et deux domaines SH3 et est impliqué dans la transduction du signal. SHP2 est une tyrosine phosphatase, qui possède deux domaines SH2.

Les domaines SH2 et SH3 sont impliqués dans la reconnaissance de certains motifs présents sur les protéines. Le domaine SH2 (Src Homology 2) permet la reconnaissance de motifs contenant une tyrosine phosphorylée. Le domaine SH3 (Src Homology 3) permet la reconnaissance de motifs riche en proline.

Le fait que les protéines GRB2 et SHP2 possèdent des domaines SH2 et SH3 va donc permettre le recrutement de protéines contenant les motifs reconnus spécifiquement par ces domaines. Par exemple, la protéine GRB2 va recruter via son domaine SH3 N-terminal la protéine SOS (RAS-guanine exchange factor), impliquée dans l'activation de la voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK, et la protéine GAB1 via son domaine SH3 C-terminal (la protéine GAB1 est représentée en bleu figure 20). Le recrutement de GAB1 par GRB2 va alors permettre de recruter la PI3Kinase (le récepteur FGFR va en plus phosphoryler GAB1

afin de recruter d'autres molécules SHP2 et GRB2). Le recrutement et l'activation de la PI3Kinase par GAB1 va permettre de générer du PIP3 (phosphatidylinositol 3-phosphate) à partir de PIP2 (phosphatidylinositol 2-phosphate) à la membrane. La production de PI3P va permettre le recrutement à la membrane de PDK1 qui va alors activée la protéine AKT, impliquée dans l'activation ou l'inhibition de nombreux processus cellulaires.

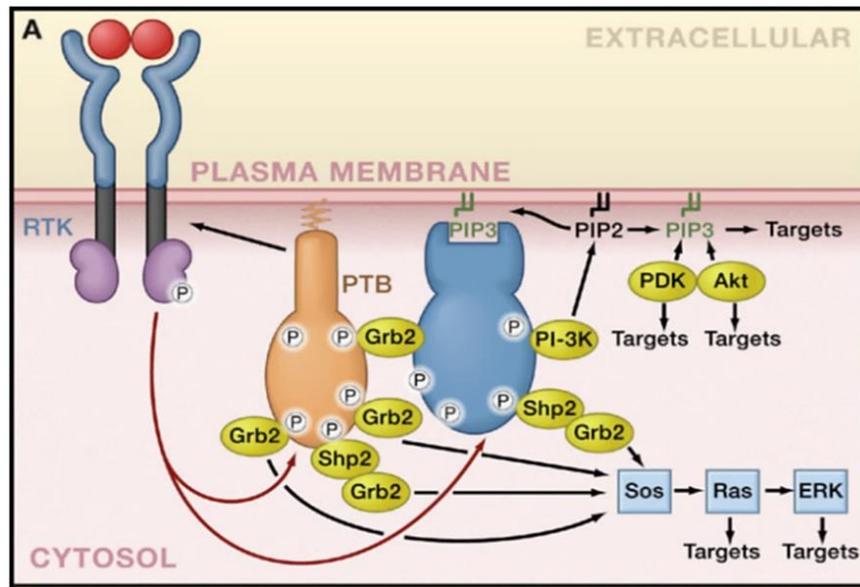
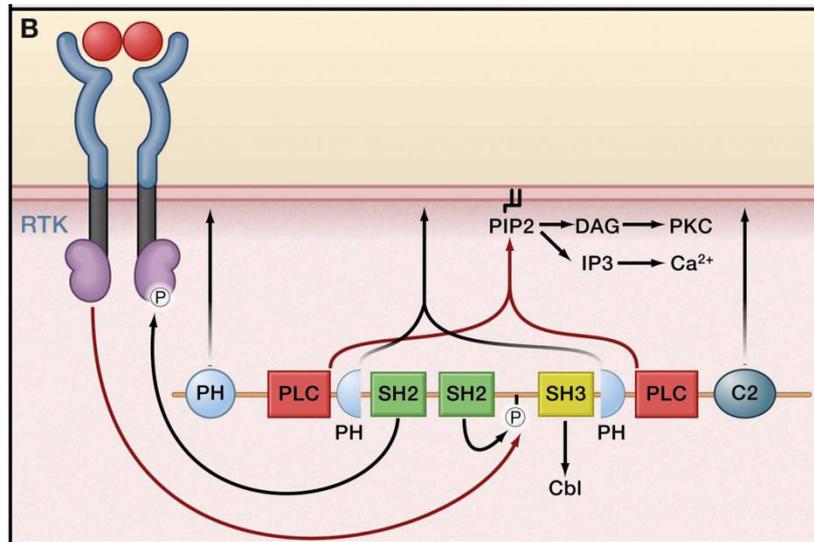


FIGURE 20 : COMPLEXE MULTIPROTEIQUE CONDUISANT A L'ACTIVATION DES VOIES DE SIGNALISATION ACTIVEES PAR LES RTKS

### **Activation de la voie de la PLC $\gamma$ : formation de DAG et d'IP3**

Il existe plusieurs types de Phospholipase C. La PLC $\gamma$ , ou Phospholipase C- $\gamma$ , est celle qui peut être activée par les RTK, notamment les récepteurs PDGFR, NGFR, FGFR et EGFR. Elle est composée d'un domaine PH (pleckstrin homogy), de deux domaines SH2 (un domaine N-SH2 et un domaine C-SH2), d'un domaine SH3 et d'un domaine C-terminal : C2 (figure 21). Le domaine SH2 N-terminal interagit avec le récepteur RTK sur un site phospho-tyrosine particulier du domaine tyrosine kinase. Le RTK va alors phosphoryler la PLC $\gamma$  sur des résidus tyrosine situés entre les domaines SH2 et SH3 permettant ainsi de stimuler l'activité enzymatique de la PLC $\gamma$ . Les domaines C2 et PH coopèrent avec le domaine SH2 afin d'emmener la PLC $\gamma$  à la membrane. Dès lors, la PLC $\gamma$  va reconnaître la PI3Kinase activée par le récepteur RTK via les domaines PH, conduisant à l'hydrolyse de PIP2 et à la génération d'Inositol triphosphate (IP3) et de Diacylglycérol (DAG), messagers secondaires impliqués dans la transduction du signal. La formation de DAG va permettre d'induire l'activation de la protéine kinase C (PKC). Contrairement au DAG qui reste ancré à la membrane, l'IP3 est soluble et va être diffusé dans la cellule. Il va aller se fixer sur les récepteurs à l'IP3 induisant alors l'augmentation de la concentration intracellulaire en ions

Ca<sup>2+</sup> qui vont agir comme second messagers sur de nombreux processus cellulaires (figure 21).



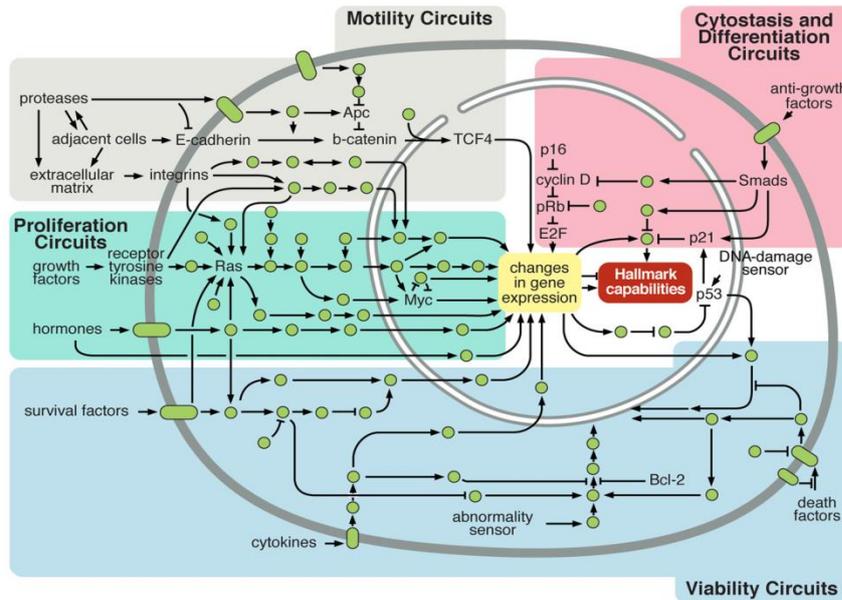
**FIGURE 21 : INTEGRATION A LA MEMBRANE PLASMIQUE PAR LA PLC GAMMA DES SIGNAUX GENERES PAR L'ACTIVATION DES RTK (Lemmon & Schlessinger, 2010)**

### 3.2 RTKS ET CANCERS

De par leur implication dans de nombreux processus biologiques clés (prolifération, différenciation, migration, apoptose) les RTK, lorsqu'ils sont génétiquement altérés (amplification, mutations et protéines de fusion) ou surexprimés, peuvent être impliqués dans la prolifération et la survie des cellules tumorales et constituent donc dans de nombreux cancers de bonnes cibles thérapeutiques (Haugsten, et al., 2010; Knights & Cook, 2010).

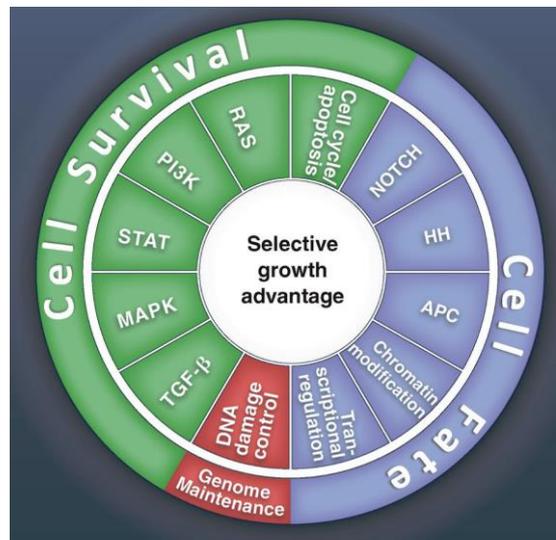
#### 3.2.1 VOIES DE SIGNALISATION DEREGULEES DANS LE CANCER

Les très nombreuses études menées ces 30 dernières années ont permis de mieux comprendre les altérations génétiques et moléculaires impliquées dans le cancer. D'après Hanahan et Weinberg, les altérations moléculaires promouvant la prolifération des cellules tumorales peuvent être regroupées en 4 grands groupes : La motilité cellulaire (cadhérines, Apc, intégrines) ; les mécanismes impliqués dans la différenciation et la croissance cellulaire (p16, cycline D, p21,...) ; les mécanismes impliqués dans la prolifération (RTK, RAS, MYC) et ceux impliqués dans la viabilité (facteurs de mort et de survie cellulaires, cytokines...). Les voies de signalisation que l'on retrouve généralement dérégulées sont représentées ci-dessous (figure 22) :



**FIGURE 22 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES VOIES DE SIGNALISATION DEREGULEES DANS LE CANCER (HANAHAN & WEINBERG, 2011)**

D'après Vogelstein et al, 12 voies de signalisation sont principalement impliquées dans la progression tumorale. Ces 12 voies sont regroupées en 3 grands groupes : la survie et la prolifération cellulaire, la maintenance de l'intégrité du génome, et les voies impliquées dans le « destin » cellulaire, et sont présentées ci-après (figure 23) :

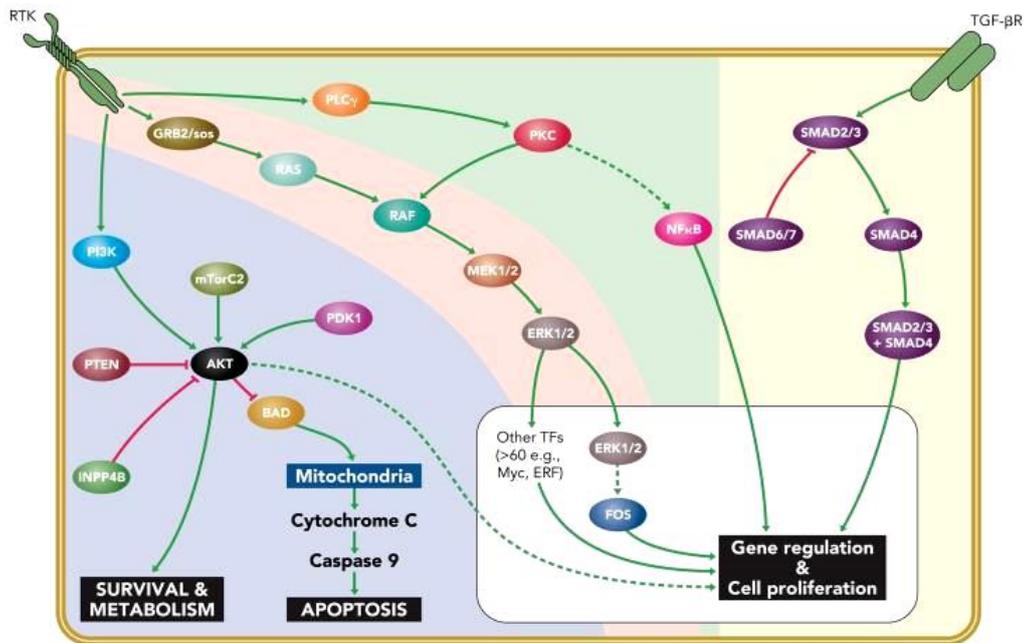


**FIGURE 23 : VOIES DE SIGNALISATION CONNUES POUR ETRE DEREGULEES ET IMPLIQUES DANS LA PROGRESSION TUMORALE (Vogelstein et al., 2013)**

### 3.2.2 RTK, VOIES DE SIGNALISATIONS ET CANCER

Parmi ces voies de signalisations dérégulées, on distingue notamment celles impliquées dans la survie cellulaire et la prolifération cellulaire, activées par les RTKs (cf figure 22).

La dérégulation de l'expression et/ou de l'activité des RTK peut induire un déséquilibre dans les voies de signalisation qu'ils régulent. Certaines voies impliquées dans le métabolisme, la survie et la prolifération peuvent alors être suractivées au détriment des voies de contrôle de la prolifération ou de la survie, telle que la régulation de certains gènes pro-apoptotiques ou suppresseurs de tumeurs. Parmi les protéines clés impliquées dans la survie et la prolifération et qui peuvent être suractivées, on peut citer les protéines AKT, RAS, ainsi que certaines protéines de la famille des MAPKinases (Mitogen-Activated-Protein-Kinases), telles que les protéines JNK, P38 et RAF. La protéine AKT possède un nombre important de substrats, comme les protéines BAD et GSK3 $\beta$  qui, lorsque phosphorylées par AKT, sont alors inhibées. La protéine BAD joue un rôle clé dans l'apoptose et son inhibition permet ainsi d'entraîner un échappement à la mort cellulaire. Quant à la protéine GSK3 $\beta$ , son inhibition permet la stabilisation de certaines protéines qui ne sont alors plus dégradées par le protéasome. On peut citer par exemple l'oncogène MYC dont la stabilisation et la localisation nucléaire peuvent être dépendantes de GSK3 $\beta$  (Gregory, Qi, & Hann, 2003). Une forte activation d'AKT peut permettre de promouvoir la survie cellulaire tout en inhibant les substrats qui permettent de la contrôler. Quant à la protéine Ras elle est impliquée dans une cascade de signalisation jouant un rôle important dans la régulation des gènes, tels que les gènes *FOS* et *MYC*, proto-oncogènes impliqués très fréquemment dans la progression tumorale. La voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK est aussi connue pour jouer un rôle majeur dans le contrôle de la prolifération cellulaire. L'activation des RTK peut donc jouer un rôle clé dans la régulation des différentes voies de signalisation. Dans une cellule normale ils orchestrent la régulation de ces voies afin de maintenir un équilibre entre prolifération, survie et arrêt de prolifération, différenciation ou mort cellulaire. Leurs dérégulations peuvent entraîner la perte d'équilibre dans la régulation de ces voies, promouvant ainsi la prolifération et la survie cellulaire, et donc promouvant l'apparition de tumeurs.



**FIGURE 24 : VOIES DE SIGNALISATION MAJEURES ACTIVEES PAR LES FACTEURS DE CROISSANCE ET LEURS RECEPTEURS (Witsch, Sela, & Yarden, 2011)**

### 3.2.1.1 PROTEINES RAS ET CANCER

Les protéines RAS (HRAS, NRAS, KRAS) sont des petites GTPases qui font parties de la famille des protéines G monomériques impliquées dans la transduction du signal. Les protéines RAS sont impliquées dans l'activation de nombreuses voies de signalisation, contrôlant la transcription, le cycle cellulaire, la survie, la migration, et la prolifération cellulaire mais aussi l'endocytose (figure 25), (Berndt, Hamilton, & Sebti, 2011). Des mutations somatiques entraînant des gains de fonction de RAS sont fréquemment retrouvées dans les cancers, c'est pourquoi on parle de « l'oncogène RAS » (Schubbert et al., 2007). Les récepteurs RTK présents à la surface cellulaire recrutent et activent des protéines qui relaient le signal. La mise en place de cette « plateforme » d'activation des voies de signalisation peut conduire à l'activation des protéines RAS via les facteurs GEF (guanine nucleotide-exchange factors). Les facteurs GEF possèdent une activité catalytique permettant de convertir le complexe RAS-GDP inactif en complexe RAS-GTP actif. La protéine RAS-GTP peut alors activer ses substrats, tels que la phosphatidyinositol 3-kinase (PI3K), ou la protéine RAF (Schubbert, Shannon, & Bollag, 2007). L'inactivation de RAS se fait grâce aux facteurs GAP dont le rôle de dé-phosphoryler le complexe RAS-GTP pour que RAS soit de nouveau lié au GDP et inactif.

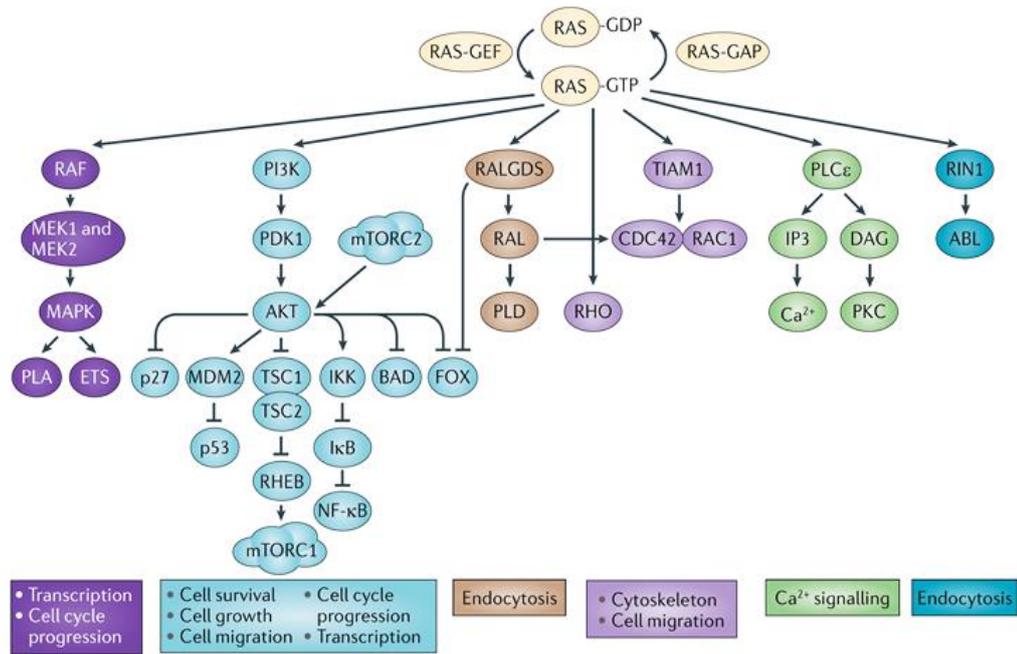


FIGURE 25 : VOIES DE SIGNALISATION ACTIVEES PAR LES PROTEINES RAS (Berndt et al., 2011)

Les mutations de RAS sont retrouvées dans environ 30% des cancers humains. Les différents membres de la famille des protéines RAS sont spécifiquement retrouvés mutés dans différents types de cancers. Ainsi, les mutations de *KRAS* sont prévalentes dans les cancers colorectaux, les cancers de l'endomètre, du poumon et du pancréas. Les mutations de *NRAS* et *KRAS* sont retrouvées dans les myélomes (Schubbert et al., 2007). Dans les cancers de vessie, on trouve dans l'ordre de fréquence de mutations *HRAS*, *KRAS* et très peu souvent *NRAS* (cosmic database : catalogue of somatic mutations in cancer). Dans la plupart des cas, les mutations du gène *RAS* sont des mutations somatiques faux-sens conduisant à la substitution d'un acide aminé aux positions 12,13 et 61. La protéine RAS-GTP devient alors résistante aux GAP (facteurs impliqués dans l'inactivation de RAS), lui permettant ainsi de rester en permanence dans une conformation active.

### 3.2.1.2 LA VOIE DE SIGNALISATION PI3K/AKT

#### Activation de la PI3Kinase par les RTK

L'une des voies de signalisation les plus actives dans de nombreux types de tumeurs est la voie PI3K/AKT, à la base de cascades de signalisation promouvant la croissance cellulaire, la prolifération, la survie et la motilité, réponses cellulaires impliquées dans la progression tumorale (Vivanco & Sawyers, 2002).

La kinase PI3K (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase) est composée de deux sous unités : la sous-unité p110 et la sous-unité p85. L'activation de PI3K par les RTK a pour but d'induire la formation de PI3P (phosphatidylinositol 3-phosphate) à partir de PI2P (phosphatidylinositol 2-phosphate) à la membrane. Cette activation de la PI3K par les RTKs peut se faire selon trois modes d'activations représentés figure 26.

Le RTK peut directement phosphoryler le domaine SH2 lié à la sous-unité p85 de la protéine PI3K, ou via le recrutement et l'activation de la protéine IRS1. Ces deux cas de figure permettent de transmettre le signal de la sous-unité 85 à la sous-unité p110 et ainsi conduire à la formation de PI3P à partir de PI2P à la membrane. Le dernier cas de figure permettant l'activation de PI3K et la formation de PI3P est plus complexe. Dans ce cas précis, le RTK va recruter et phosphoryler la protéine SHC qui va alors recruter les protéines Grb2, Gab2 et RAS. La protéine RAS va alors directement interagir avec la sous-unité P110 de PI3K afin de générer du PIP3 à la membrane, sans passer par les domaines SH2 de la sous-unité p85.

Une fois le PI3P généré, celui-ci agit comme second messenger pour activer les voies de signalisation sous-jacentes dont la protéine AKT. La production de PI3P est contrôlée par les protéines PTEN, SHIP1 et SHIP2. PTEN est une phosphatase dont le rôle est de convertir le PI3P en PI2P jouant ainsi le rôle de régulateur de l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT.

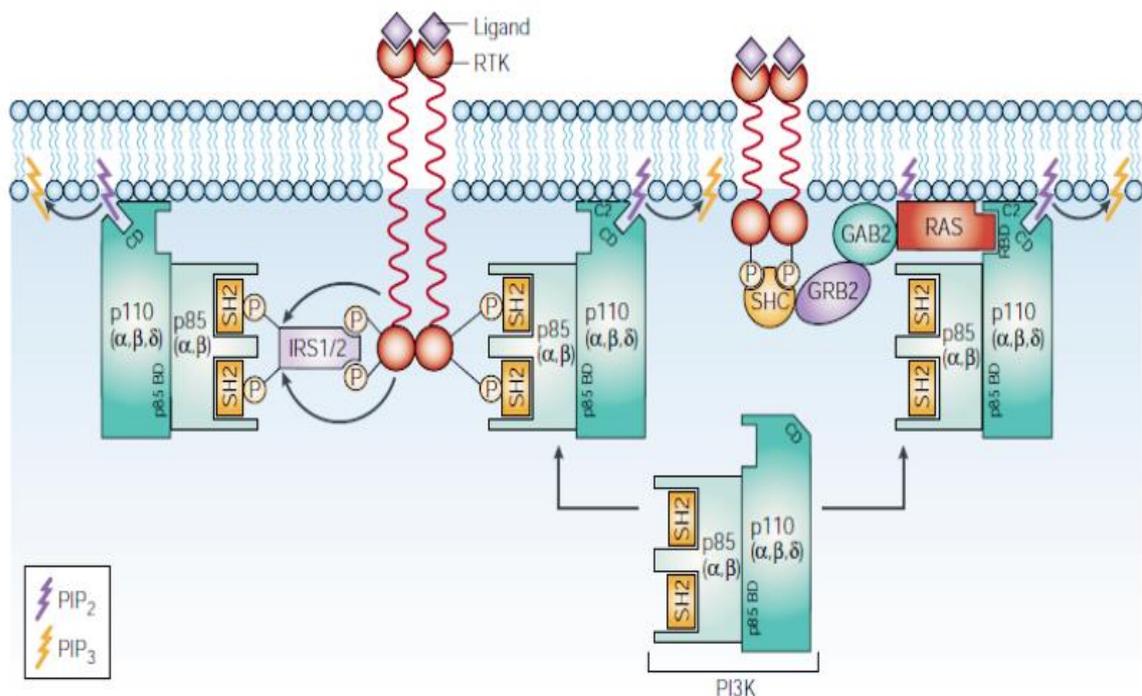


FIGURE 26 : MODELE D'ACTIVATION DE PI3K (Vivanco & Sawyers, 2002).

### Activation d'AKT et de ses cibles

La protéine PI3K activée induit la production de PI3P à la membrane, second messager qui va à son tour activer les protéines PDK1 et PDK2 (3-phosphoinositide dependent protein kinase-1/2). Les protéines PDK1 et PDK2 vont alors activer AKT. La protéine AKT est une sérine/thréonine kinase jouant un rôle crucial pour la prolifération et la survie cellulaire dans de nombreux cancers. Elle est capable en phosphorylant ses cibles de les activer ou de les inhiber. On citera par exemple MDM2, qui phosphorylée et activée par AKT, inhibe le gène suppresseur de tumeur TP53, ou encore NF $\kappa$ B, qui inhibe l'apoptose. A l'inverse, AKT phosphoryle la protéine GSK3 $\beta$  dans le but de l'inhiber. L'inhibition de GSK3 $\beta$  induit alors la stabilisation protéique de certains facteurs promouvant la tumorigénèse. Cependant la PI3K peut directement moduler certaines fonctions cellulaires telles que la survie et le réarrangement du cytosquelette sans passer par l'activation d'AKT, mais en activant d'autres cibles que sont les protéines SGK, RAC1, CDC42 et PKC. L'ensemble des voies de signalisation activées par PI3K/AKT est représenté ci-après (figure 27) :

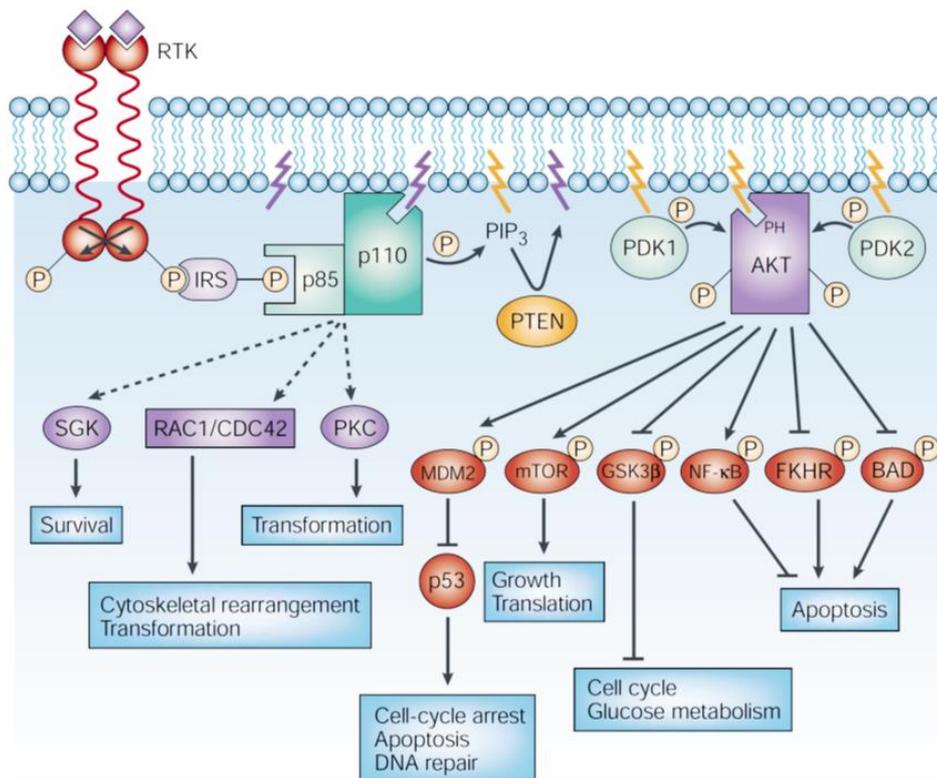


FIGURE 27 : VOIES DE SIGNALISATION DE PI3K/AKT (Vivanco & Sawyers, 2002)

### **Régulation de l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT par la protéine PTEN**

PTEN est considéré comme un gène suppresseur de tumeur, du fait de sa capacité à réguler négativement l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT, ainsi que la prolifération, la survie, la migration et la mort cellulaire. Dans les cancers de vessie, on trouve dans les tumeurs papillaires des mutations activatrices de *PI3KCA*, responsables en partie de la progression tumorale. Ces mutations de *PIK3CA* peuvent conduire à une forte activation des voies de signalisation régulées par la protéine AKT. De plus dans les tumeurs de vessie, la protéine PTEN est présente mais cela n'a aucune conséquence fonctionnelle quant à l'activation de la voie PI3K/AKT suggérant que l'inactivation de PTEN dans ces cancers est peut être due à une modification post-traductionnelle. PTEN peut subir différentes modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'oxydation ou encore la nitrosation (X. Wang & Jiang, 2008). Pour conserver son activité et rester présente au niveau cytosolique, PTEN doit être phosphorylée. Cependant ce n'est que la déphosphorylation de certains résidus dans le domaine C-terminal de PTEN qui permet à celle-ci d'être localisée à la membrane et de jouer son rôle de convertisseur de PI3P en PI2P. De plus, PTEN peut se trouver dans une conformation repliée lui permettant d'échapper à la dégradation par le protéasome. PTEN est alors stabilisé au niveau cytosolique mais ne peut pas migrer à la membrane (X. Wang & Jiang, 2008). Il est possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle, dans les tumeurs de vessie, PTEN puisse être présent dans une conformation l'empêchant d'être actif ou d'être phosphorylé sur des résidus le bloquant au niveau cytosolique.

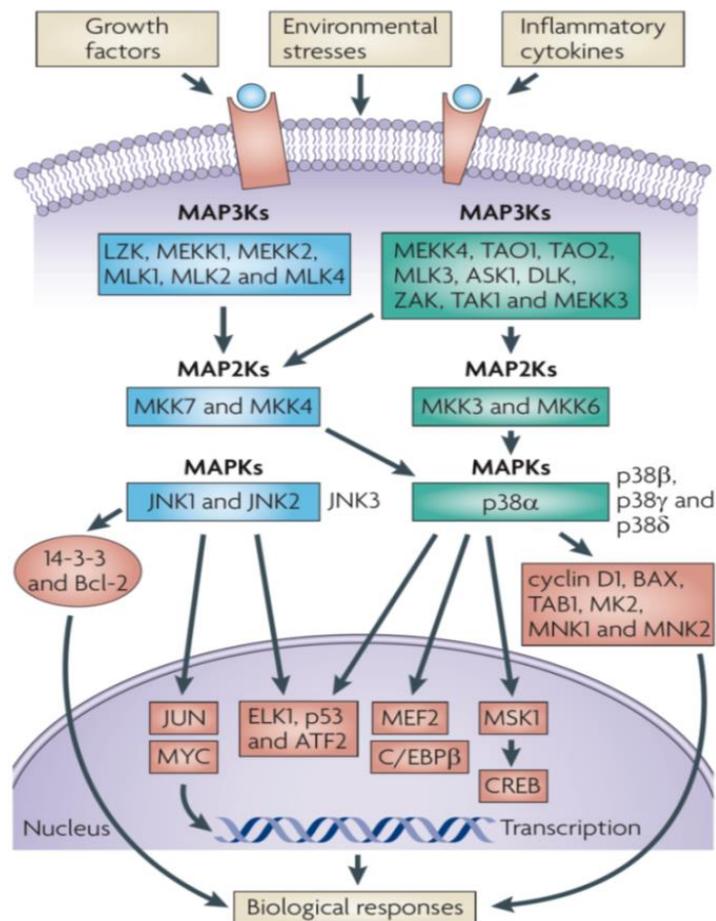
#### **3.2.1.3 VOIES DE SIGNALISATION DES MAPKINASES**

---

Les protéines MAPKinase (Mitogen-activated-protein Kinases) sont une famille de protéines activées en réponse à divers stimuli, notamment les mitogènes (composé chimique ou action promouvant la division cellulaire), les stress cellulaires (stress thermique, osmotique, UV...), les cytokines pro-inflammatoires et les RTK.

Les protéines MAPKinases modulent de manière contexte et tissu spécifique la prolifération, la différenciation, la survie et la migration (Wagner & Nebreda, 2009). La cascade de signalisation activée par l'un de ces processus débute par les protéines MAP3Ks (MAPKKK : Mitogen Activated Kinase Kinase Kinase) qui sont les premières activées dès que l'un de ces trois signaux arrive à la membrane extracellulaire. Ces MAP3Ks activent alors les MAP2Ks (MKK4, MKK7, MKK3 et MKK6). Les protéines MKK3 ET MKK6 vont alors phosphoryler la protéine p38, alors que les protéines MKK4 et MKK7 vont préférentiellement phosphoryler la protéine JNK. Les protéines JNK et p38 activées vont réguler positivement ou négativement certains facteurs de transcription (Jun, MYC,

P53) permettant ainsi d'induire la réponse biologique nécessaire. Elles peuvent également réguler directement certaines protéines telles que BAX ou Bcl-2 impliquées dans la mort cellulaire induite (apoptose), mais aussi la cycline D1 impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. L'activation de ces voies de signalisation est représentée ci-après (figure 28) :



**FIGURE 28 : VOIES DE SIGNALISATION ACTIVEES PAR LES MAPK SUITE A UN STRESS** (Wagner & Nebreda, 2009).

La protéine JNK (C-Jun N-terminal Kinase) existe sous 3 isoformes (JNK1, 2 et 3). La protéine P38 est présente sous 4 isoformes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ). Ce sont généralement les protéines JNK1, JNK2 et p38  $\alpha$  que l'on retrouve impliquée dans le développement de nombreux cancers.

### **Rôle anti-tumoral de p38**

L'activation de la protéine p38 peut jouer un rôle pro-ou anti-tumorale en fonction du contexte cellulaire. Avant de connaître le rôle pro-tumoral de la protéine p38 dans les tumeurs solides, celle-ci était considéré comme un potentiel suppresseur de tumeurs, plusieurs arguments allant dans ce sens. Il a en effet été montré que p38 est capable de

réguler négativement la cycline D1 contrairement aux MAPKinases p42/P44 (Lavoie, L'Allemain, Brunet, Muller, & Pouyssegur, 1996), de moduler l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire (Wong et al., 2009), et d'induire l'activation des voies de signalisations p16/Rb et p19/P53 en réponse à un stress cellulaire causant des dommages à l'ADN (Bulavin et al., 2004; Bulavin, Amundson, & Jr, 2002). Il a été montré par la suite que p38 coopérait avec la protéine HuR (protéine stabilisatrice des ARNm) pour induire la stabilisation de différents ARNm. C'est le cas de l'ARNm de p21. HuR se fixe sur la partie 3'UTR des ARNm qu'il stabilise. La phosphorylation de la protéine HuR par p38 induit une activation de HuR qui peut alors faire la navette entre le noyau et le cytoplasme. HuR est alors localisé dans le cytoplasme et stabilise l'ARNm de p21. Lors d'un stress cellulaire dû à une irradiation causant des dommages à l'ADN, p38 module donc positivement, via HuR, la stabilisation de l'ARNm de p21 afin d'induire un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire et ainsi empêche la transition entre les phases G1 et S et ce, indépendamment de p53 (Lafarga et al., 2009).

En plus de réguler l'apoptose et le cycle cellulaire, p38, et plus particulièrement p38 $\alpha$ , est capable d'inhiber la formation de tumeurs en jouant le rôle de senseur de stress. La production de ROS (« Reactive Oxygen Species ») par certains oncogènes (HRAS) induit l'activation de p38 $\alpha$  qui va alors induire l'apoptose (Dolado et al., 2007). P38 est dans ce cas un régulateur négatif clé pour la transformation cellulaire et la progression tumorale.

Récemment il a été montré que la régulation négative de l'activité de p38 permettait la formation de métastases de cellules tumorales du côlon, capables alors d'envahir le tissu pulmonaire (Urosevic et al., 2014).

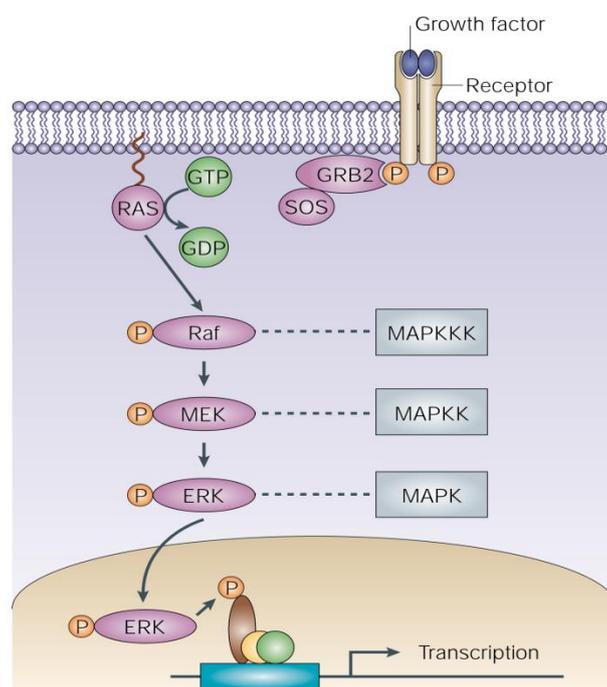
### ***Rôle pro-tumoral de p38***

Plusieurs études ont montré l'importance de l'activation de la protéine p38 dans le développement de tumeurs solides (Kennedy, Cellurale, & Davis, 2007) (Koul, Pal, & Koul, 2013). Dans le cas du sous-type du cancer du sein HER2 positif, il a été montré que p38 pouvait être impliquée dans la résistance au trastuzumab (Z. Chen & Nahta, 2014).

De plus tout comme la protéine AKT, la protéine p38 est capable de réguler l'activation de la protéine GSK3 $\beta$  en la phosphorylant sur le site sérine 389 (Thornton et al., 2008), aboutissant à la stabilisation de protéines qui auraient dues être dégradées en temps normal par le protéasome, comme par exemple, la protéine MYC.

### **Voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK**

La voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK fait elle aussi partie des voies de signalisation des MAPKinases. Cette voie est une des voies de signalisation les plus dérégulées dans de nombreux cancers, elle peut notamment être activée par les RTK. La protéine RAF est une MAP3K activée par la protéine RAS, qui va activée la protéine MEK (MAP2K), qui active *in fine* la MAPKinase ERK. La protéine ERK activée est alors transloquée dans le noyau où elle va activée de nombreux facteurs de transcription promouvant ainsi la prolifération et la survie cellulaire. L'activation de cette cascade de signalisation est représentée ci-après (figure 29) :



**FIGURE 29 : ACTIVATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION RAS/RAF/MEK/ERK PAR LES RTK**  
(H. J. Kim & Bar-Sagi, 2004)

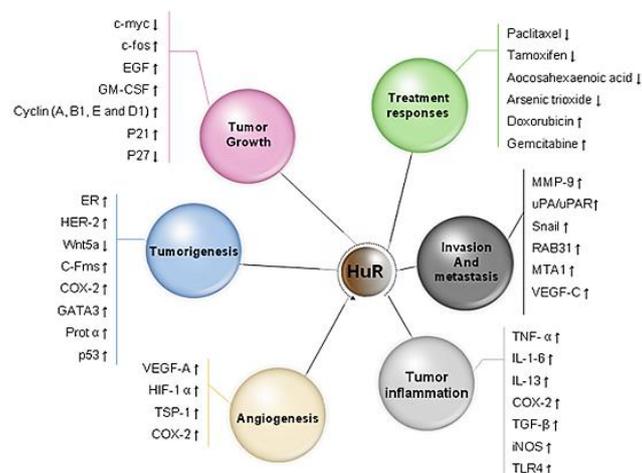
On citera l'exemple du récepteur EGFR dont la surexpression dans de nombreux cancers peut conduire à l'activation de cette voie de signalisation, qui aboutit à la production de TGF $\alpha$  aboutissant ainsi à une boucle de rétrocontrôle autocrine dont le rôle est essentiel à la progression tumorale (Roberts & Der, 2007).

Des mutations de RAF sont retrouvées dans les cancers humains et notamment dans le cas du mélanome où BRAF est mutée dans 70% des cas. Ces mutations des premiers effecteurs de la cascade de signalisation que sont les protéines RAS et RAF conduit à une très forte activation des protéines MEK1/2 et ERK1/2.

### 3.2.1.4 LA PROTEINE HuR

#### Structure et rôle

La protéine HuR, aussi appelée ELAVL1 (Embryonic Lethal Abnormal Vision Like 1) fait partie de la famille des protéines ELAV, famille de protéines se liant aux ARN messagers (ARNm). Cette famille de protéines a initialement été identifiée comme impliquée dans le développement neuronale chez la drosophile. On distingue 4 protéines dans cette famille: HuB, HuC et HuD qui sont exclusivement exprimées dans le tissu neuronal et HuR qui est exprimée dans de nombreux tissus et types cellulaires. Ces protéines de la famille ELAV font elles-mêmes parties de la grande famille des protéines RBPs (RNA Binding Protein), dans laquelle on trouve les protéines HNRNP. La protéine HuR est impliquée dans la stabilisation et la transcription de nombreux ARNm, dans de nombreux types cellulaires. HuR se fixe sur la partie non traduite des ARNm, que sont les parties 3'-UTR et 5'-UTR des ARNm, qui contiennent les domaines AU-rich Element (AREs). De nombreux ARNm de facteurs pro-oncogéniques font parties des cibles de HuR tels que des ARNm de proto-oncogènes, de facteurs de croissance ou encore des cytokines. Dans de nombreux cancers humains l'expression de HuR est retrouvée altérée (colon, sein, ovaires...). HuR est la première RBP pour laquelle il a été montré qu'elle pouvait jouer un rôle critique dans la progression tumorale, en tant qu'oncogène mais aussi comme suppresseur de tumeur, en fonction des cibles qu'elle régule, et de manière contexte spécifique (voir figure 30 ci-après). HuR est à l'heure actuelle considérée comme une nouvelle cible thérapeutique prometteuse ainsi qu'un potentiel bon marqueur pour le suivi de la réponse au traitement (Wang et al.2013).



**FIGURE 30 : LES DIVERSE PROPRIETES DE HuR DANS LE DEVELOPPEMENT DU CANCER A TRAVERS LA REGULATION DE SES CIBLES (WANG ET AL. 2013).**

### **Mécanismes de régulation des ARNm**

La protéine HuR est composée de 3 motifs RRM (RNA Recognition Motif) et d'une séquence HNS. Ces motifs RRM permettent à la protéine HuR de se lier à ces cibles, tandis que sa séquence HNS lui permet de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme. HuR reconnaît et se fixe sur les éléments riches en adénylate/uridylylate des parties UTR de l'ARNm cible, on parle alors de (AU) ou (U)-rich element (ARE) qui sont reconnus par les domaines RRM de HuR. Les motifs ARE présents sur les ARNm conduisent à une dégradation rapide de ceux-ci, la fixation de HuR sur ces ARNm induit leur stabilisation. C'est pourquoi la régulation des ARE-mRNA via les protéines RBP est un mécanisme important dans les cellules de mammifères.

HuR après avoir été transcrit et traduit est importé dans le noyau via la protéine importine 1. Une fois dans le noyau HuR se fixe sur ses ARNm cible. En réponse à certains stimuli cellulaires, HuR fait la navette du noyau vers le cytoplasme où il va stabiliser l'ARNm qu'il fixe dans le cytoplasme en le protégeant d'une dégradation par les exonucléases, et va promouvoir la transcription de cet ARNm. HuR se détache lui-même de l'ARNm qu'il a stabilisé et retourne dans le noyau pour aller fixer de nouveau ses ARNm cibles. Lorsque la protéine HuR est active sa localisation est répartie entre le noyau et le cytoplasme. Cependant si la protéine HuR peut induire la stabilisation de certains ARNm, elle peut aussi coopérer avec certains micro-ARN pour induire leur dégradation. Certains miRNA ont le même site de fixation sur un mRNA donné que la protéine HuR. Certains miRNA peuvent antagoniser l'effet stabilisateur de HuR, en entrant en compétition avec la protéine. La stabilisation ou la dégradation des ARNm dépend alors de la force avec laquelle HuR se lie à l'ARNm et des micro-ARN qui ciblent de manière spécifique l'ARNm auquel HuR est lié. D'autres protéines peuvent être impliquées dans la stabilisation des ARNm en plus de HuR, ces protéines font parties de la grande famille des RBP et appartiennent à la sous-famille des hnRNP (heterogenous Nuclear Ribo Nucleo Proteins). Cette famille de RBP n'a été identifiée que récemment. Les protéines hnRNP se lient aux pré-ARNm et peuvent coopérer avec HuR pour la stabilisation de certains ARNm. De plus, certaines hnRNP, notamment les protéines HNRNPA1, B1 et K voient leur expression fortement dérégulée (surexpression) dans certains cancers. Ces mécanismes sont représentés ci-dessous (figure 31) :

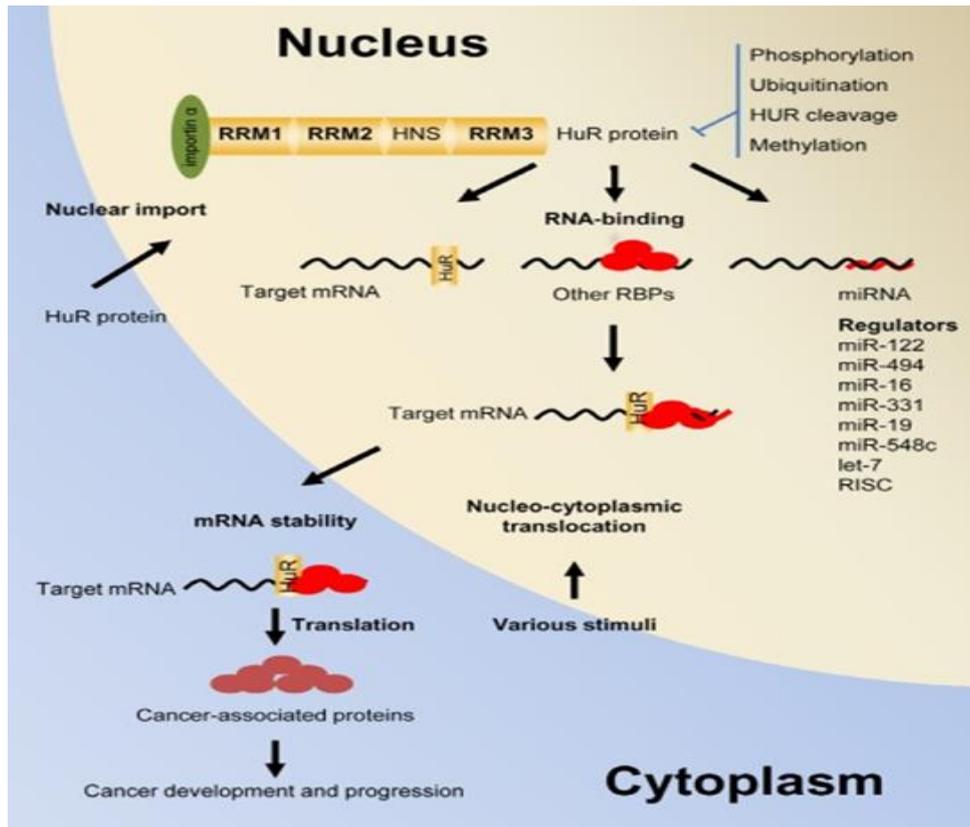


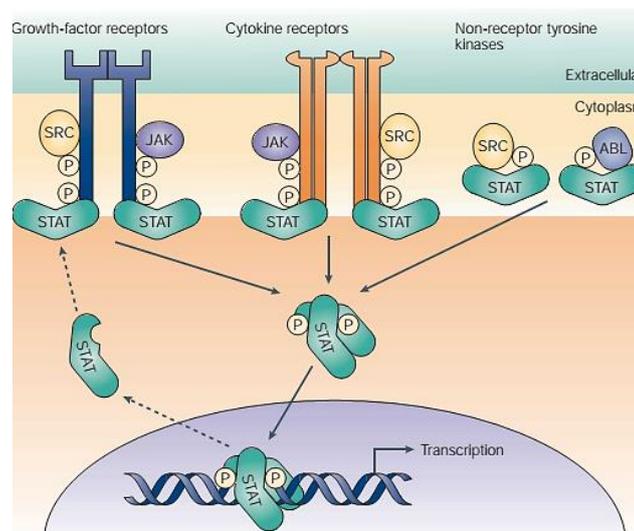
FIGURE 31 : MECANISME DE STABILISATION DES ARNm PAR HuR (Jun Wang et al., 2013).

*HuR est importé dans le noyau grâce à la protéine importine 1. La protéine HuR se lie aux ARNm cibles possédant un domaine ARE en 3'-UTR (partie non traduite des ARNm). Une fois que HuR s'est lié à l'ARNm cible, il induit un shuttle nucléo-cytoplasmique de cet ARNm, il protège alors l'ARN auquel il est lié afin de la dégradation par des exonucléases et promeut sa traduction. D'autres protéines peuvent se lier à ces mêmes ARNm, ce sont les protéines hnRNP représentées ici en rouge, avec lesquelles HuR peut coopérer pour stabiliser les ARNm. HuR peut aussi coopérer ou rentrer en compétition avec certains micro-ARN qui ciblent spécifiquement certains ARNm. La liaison des micro-ARN sur leurs ARNm cibles conduit généralement à la dégradation de ceux-ci. On peut citer l'exemple du recrutement de LET-7C et RISC par HuR pour réguler négativement l'ARNm de MYC, par liaison sur la partie 3'-UTR de l'ARNm de MYC (H. H. Kim et al., 2009).*

Il est intéressant de préciser ici que de nombreux stress cellulaires induisent une accumulation cytoplasmique de HuR (UV, LPS, composés chimiques, cytokines, infections...) et de corrélér cela au fait que HuR coopère avec la protéine de réponse au stress p38 pour stabiliser certains ARNm.

### 3.2.1.5 VOIES DE SIGNALISATION DES PROTEINES STAT

La famille des protéines STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) allant de STAT1 à STAT6 est composée de sept membres (dont 2 isoformes pour STAT5 : STAT5a et STAT5b). Contrairement aux voies de signalisation présentées précédemment, ces protéines n'induisent pas l'activation d'une cascade de signalisation mais relaient le signal directement, en le captant à la membrane (RTK, récepteurs aux cytokines) et le transportent jusque dans le noyau où elles jouent leur rôle de facteurs de transcription. Les protéines STAT peuvent être activées de trois manières différentes : soit par les récepteurs aux cytokines (plus précisément par le récepteur à l'interféron ou celui à l'interleukine 6), soit par les RTK, ou directement par les protéines SRC ou ABL. Bien qu'ils aient fixés leurs ligands, la plupart des récepteurs aux cytokines ne possèdent pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque, contrairement aux récepteurs RTK, et ont donc besoin de recruter les protéines kinases JAK et SRC pour être phosphorylés et activés. L'activation du récepteur va alors permettre le recrutement des protéines STAT (Yu & Jove, 2004), (figure 32).

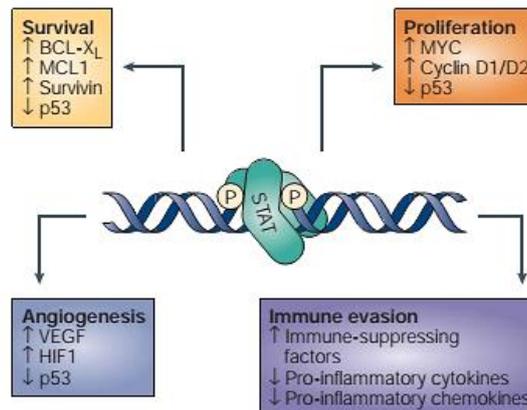


**FIGURE 32 : REPRESENTATION DES DIFFERENTS MODES D'ACTIVATION DES PROTEINES STAT**  
(Yu & Jove, 2004)

Dans différents types de cancers humains, les protéines STAT peuvent être en permanence activées, et plus particulièrement les protéines STAT3 et STAT5. Pour cela trois mécanismes peuvent être en cause. Le premier consiste en une activation constitutive des récepteurs aux cytokines due à une expression paracrine ou autocrine de leurs ligands, tels que l'IL6. Le second résulte d'une forte activation, voir d'une activation constitutive de certains RTK tels que l'EGFR ou le PDGFR qui possèdent une activité tyrosine kinase intrinsèque (Yu & Jove, 2004). Dans certains cas, suite à des altérations génétiques, les protéines STAT peuvent être directement activées par les kinases ABL ou SRC (dans ce

cas-là, ABL et SRC sont constitutivement activées). Le meilleur exemple est celui de la protéine de fusion BCR-ABL retrouvée dans les leucémies myéloïdes chroniques.

Les protéines STAT sont un véritable point de convergence pour de nombreuses voies de signalisation impliquées dans l'oncogenèse. Elles contrôlent la survie et la prolifération cellulaire mais aussi en partie l'angiogenèse et l'échappement au système immunitaire (figure 33). C'est pourquoi une activation aberrante des protéines STAT promeut la formation de tumeurs.

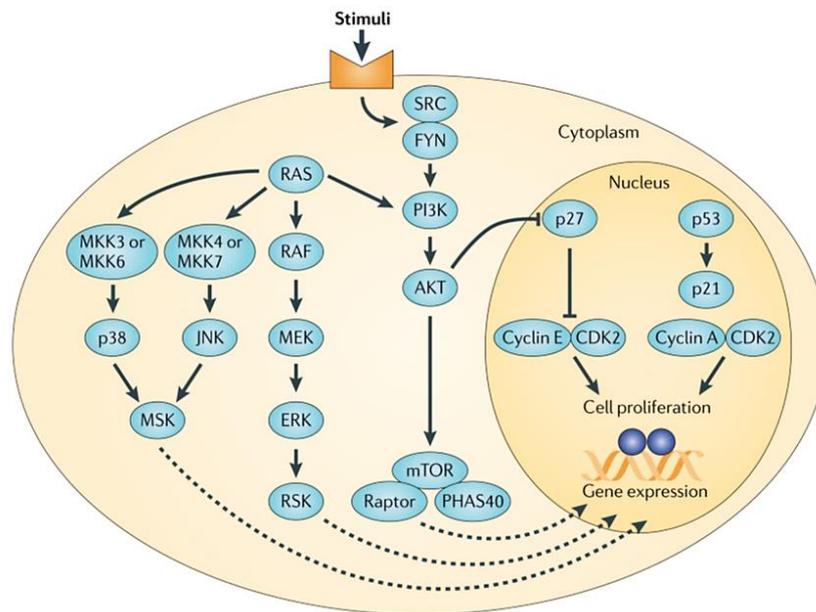


**FIGURE 33 : CONTROLE DE LA SURVIE ET DE LA CROISSANCE CELLULAIRE PAR LES PROTEINES STAT (Yu & Jove, 2004)**

### 3.2.1.6 VOIES DE SIGNALISATION ACTIVEES DANS LE CANCER

Dans les cellules de mammifères, suite à un stimuli cellulaire (cytokines inflammatoires, RTK, stress cellulaire) les voies Ras/Raf/MEK/ERK, JNK, p38, PI3K/AKT/mTOR peuvent être activées pour moduler une réponse cellulaire adaptée. La dérégulation de ces voies de signalisation à travers une activation permanente ou leur inhibition (exemple de la protéine p38) peut conduire à l'apparition de cellules tumorales capables d'échapper à la mort cellulaire et au système immunitaire. Il est important de préciser que les tumeurs RAS mutées sont généralement très agressives du fait que RAS est capable d'activer les voies RAF, PI3K, p38 et JNK. Un résumé des voies de signalisation généralement impliquées dans la progression tumorale est représenté ci-après (figure 34), (Lee, Bode, & Dong, 2011). Cependant bien que ces voies de signalisation soient plutôt bien caractérisées, leur recoupement (inhibition de l'une qui induit une sur-activation de l'autre) pour moduler les mêmes cibles et la même réponse cellulaire, leur inhibition ou leur activation de manières tissus et contextes spécifique restent à élucider dans de nombreux cancers. C'est le cas dans les tumeurs de vessie qui expriment le récepteur muté ou les protéines de fusion FGFR3-TACC3 et FGFR3-BAIAP2L1, où les voies de signalisation activées par le

récepteur restent à identifier. Ces voies de signalisation dérégulées dans le cancer et activées par divers stimuli dont les RTK sont représentées ci-après (figure 34) :

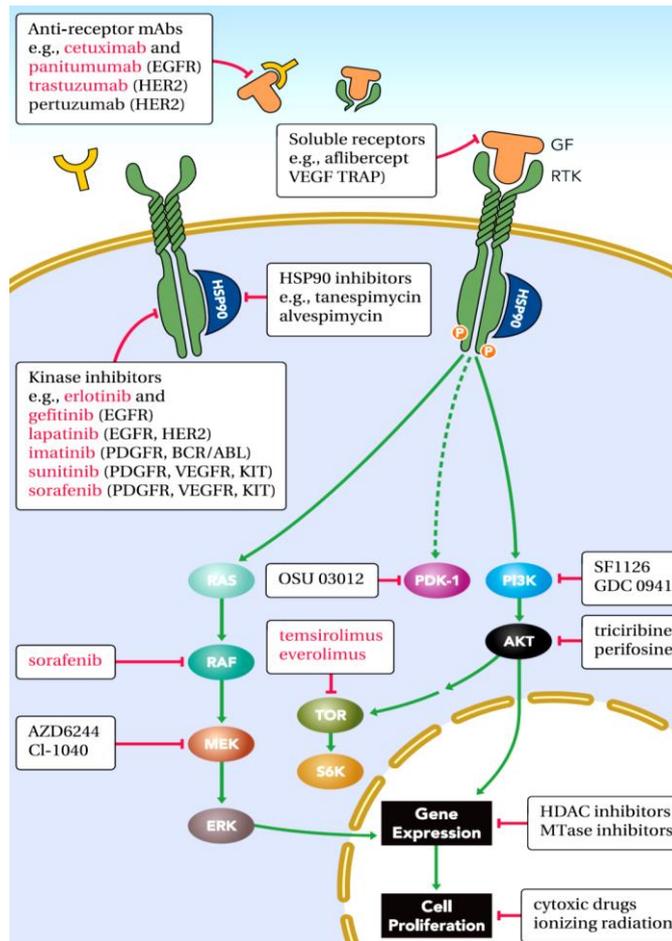


**FIGURE 34 : REPRESENTATION DES VOIES DE SIGNALISATION ONCOGENIQUES** (Lee et al., 2011)

L'identification des voies de signalisation activées par les RTK dans le cancer a permis d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques autres que les récepteurs eux-mêmes.

### 3.2.3 TRAITEMENTS THERAPEUTIQUES CIBLANT LES RTKS ET LEURS VOIES DE SIGNALISATIONS

A l'heure actuelle il existe principalement deux types de traitements thérapeutiques pour cibler les RTK dans les tumeurs humaines. Le premier repose sur l'utilisation d'anticorps ciblant les RTK et permettant d'induire la mort cellulaire. On peut citer l'exemple du trastuzumab ciblant spécifiquement la protéine HER2 (ERBB2), utilisé notamment dans un sous type du cancer du sein. Le second type de traitement repose sur l'utilisation de drogues ciblant soit l'activité du domaine kinase du récepteur ciblé, soit les protéines impliquées dans les voies de signalisation activées par le récepteur. La compréhension des voies de signalisation activées par les RTK dans les différents types de cancers a en effet permis de développer des inhibiteurs ciblant spécifiquement différentes protéines clés jouant le rôle d'oncogènes et promouvant la prolifération et la survie cellulaire, situés à différents niveaux dans les voies de signalisation, allant des protéines juste en aval du récepteur, jusqu'aux protéines impliquées dans la modification de l'expression des gènes par mécanismes épigénétiques, tels que les HDAC (figure 35).



**FIGURE 35 : CIBLAGE THERAPEUTIQUE DES VOIES DE SIGNALISATION DES RTKS DANS LES TUMEURS SOLIDES (Witsch et al., 2011)**

Le sujet de cette thèse a porté sur l'étude d'un RTK en particulier, le récepteur FGFR3. Ce récepteur fait partie de la famille des récepteurs FGFR. Le rôle des FGF récepteurs et plus particulièrement de FGFR3 seront présentés dans un premier temps dans le cadre du développement osseux puis dans le cadre du cancer.

## CHAPITRE IV : LES RECEPTEURS FGFR : STRUCTURE, ACTIVATION, ROLES DANS LE DEVELOPPEMENT ET LE CANCER

La famille des récepteurs FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor) est constituée de 4 membres : FGFR1 à 4. Les récepteurs FGFR sont impliqués dans divers processus biologiques au cours du développement embryonnaire mais aussi à l'âge adulte, tels que la prolifération cellulaire, la croissance, la survie, la différenciation et la migration.

### 4.1 STRUCTURE ET ACTIVATION

#### **Structure**

Un récepteur FGFR est constitué de trois domaines : un domaine extracellulaire, comprenant un peptide signal au niveau N-terminale, 3 domaines immunoglobulines (Ig I, II et III), une acide box, un domaine transmembranaire, et un domaine intracellulaire correspondant au domaine tyrosine kinase (figure 36). Cependant, l'épissage alternatif des transcrits des gènes codant pour les 4 membres de la famille des récepteurs FGFR permet d'obtenir une variété d'isoformes des récepteurs FGFR1 à 4. Ces épissages alternatifs permettent de synthétiser des récepteurs FGFR solubles ou sécrétés, des récepteurs avec un domaine terminal COOH tronqué, des récepteurs avec deux ou trois domaines Immunoglobulines (Ig). Il existe de plus un épissage alternatif possible dans la seconde moitié du troisième domaine immunoglobuline permettant d'obtenir les isoformes Ig IIIb ou IIIc du récepteur. Cependant ce dernier type d'épissage alternatif n'est retrouvé que pour les FGFR1, 2 et 3. Ces épissages alternatifs vont donc permettre d'obtenir un panel de récepteurs FGFR pour lesquels le ligand FGF (Fibroblast Growth Factor) ne sera pas le même.

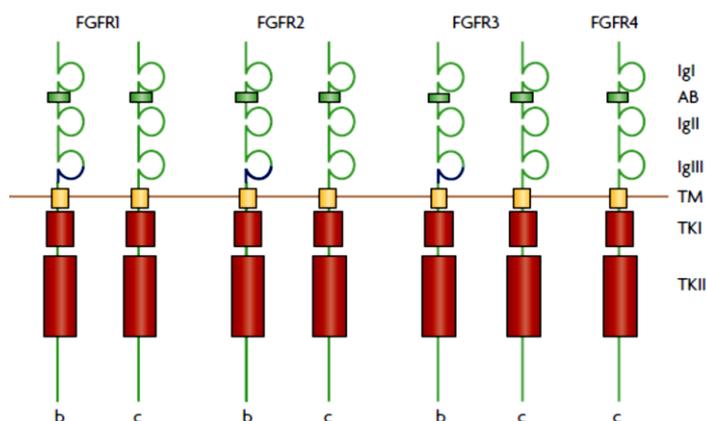
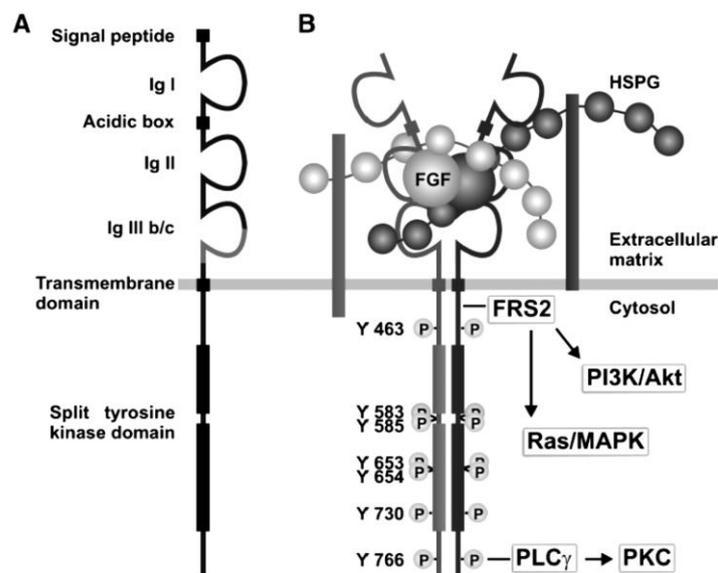


FIGURE 36 : STRUCTURE DES RECEPTEURS FGFR (Mason, 2007)

## Activation

L'activation des récepteurs FGFR se fait après fixation d'une molécule de ligand FGF sur le domaine immunoglobuline III d'un monomère FGFR, additionné d'une molécule d'Héparine Sulfate Proteoglycane (HSPG). L'activation du récepteur se fait après dimérisation entre deux monomères liés chacun à une molécule de FGF et une molécule de HSPG selon le modèle 2 :2 :2 FGF-FGFR-HSPG, formant un complexe ternaire. Cette dimérisation permet ainsi d'induire la phosphorylation des différents résidus tyrosine présents sur le domaine tyrosine kinase et la partie C-terminale. Le récepteur FGFR activé peut alors recruter la protéine FRS2 $\alpha$  qui sert de protéine d'ancrage aux autres partenaires protéiques du récepteur. Pour cela le récepteur phosphoryle FRS2 $\alpha$  qui peut alors recruter GRB2 et induire sa phosphorylation, GRB2 peut à son tour recruter d'autres protéines et induire leurs phosphorylations (figure 37).



**FIGURE 37 : REPRESENTATION DE LA STRUCTURE PROTOTYPIQUE D'UN RECEPTEUR FGF**  
(Haugsten, Wiedlocha, Olsnes, & Wesche, 2010b).

**A :** Représentation schématique d'un RTK sous forme monomérique, et principaux domaines. **B :** Représentation de la dimérisation d'un Récepteur FGFR après liaison au ligand FGF à l'héparine, et activation des voies de signalisations. (Haugsten et al., 2010)

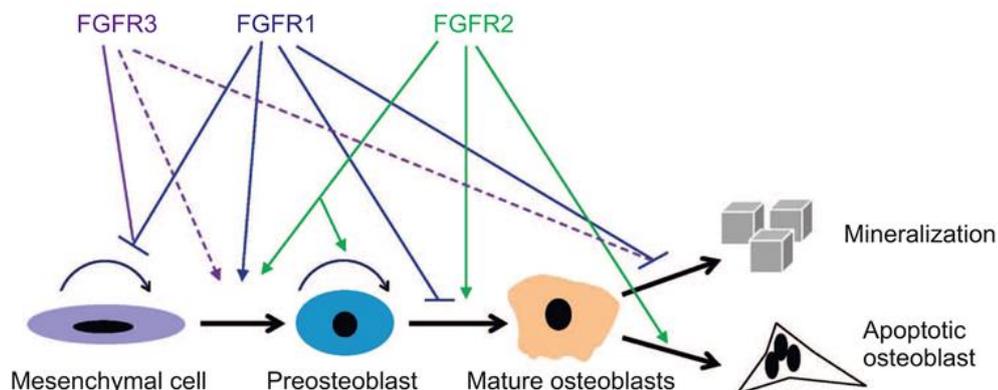
## 4.2 ROLES DES RECEPTEURS FGFR DANS LE DEVELOPPEMENT OSSEUX

Le développement osseux se fait selon deux modes : le premier est le mode intra-membraneux qui consiste en la formation d'ostéoblastes à partir de cellules mésenchymateuse progénitrices et qui est impliqué dans le développement des os plats (exemple du crâne). Le second est le mode endochondral ou intra-cartilagineux qui consiste en la différenciation de cellules mésenchymateuses en chondrocytes constituant une base de cartilage aboutissant à la formation des os longs et des vertèbres. Les récepteurs FGFR et les facteurs de croissance fibroblastiques (FGF) qui se lient à eux jouent un rôle essentiel dans le développement osseux, mais aussi dans la maintenance de l'homéostasie osseuse chez l'adulte. Les mutations activatrices des récepteurs FGFR1-3 sont impliquées dans de nombreux syndromes osseux (Su, Jin, & Chen, 2014).

Les récepteurs FGFR1-3 (mais pas le FGFR4) et les FGF avec lesquels ils interagissent sont impliqués dans le développement squelettique via ces deux modes, qui seront décrits ci-après.

### ***Implication des récepteurs FGFR1, 2, 3 dans la régulation de l'ostéogénèse (mode intra-membraneux)***

Les récepteurs FGFR1, 2 et 3 sont impliqués dans la différenciation des ostéoblastes, depuis la différenciation des cellules mésenchymateuses en pré-ostéoblastes, puis la différenciation de ces derniers en ostéoblastes, mais aussi dans la minéralisation osseuse (figure 38). Le rôle des récepteurs FGFR1 et FGFR2 sont bien connus au cours de ce développement alors que celui du récepteur FGFR3 reste très controversé, différentes études ne menant pas aux mêmes conclusions.



**FIGURE 38 : REGULATION DE L'OSTEOGENESE PAR LES RECEPTEURS FGFR1, 2 ET 3 LORS DU DEVELOPPEMENT SELON LE MODE INTRA-MEMBRANEUX (Su et al., 2014)**

### **Implication des FGFR dans la régulation du développement des os long (mode endochondral)**

Les différentes études menées sur le rôle des récepteurs FGFR1, 2 et 3 dans le développement des os long ont permis d'identifier les voies de signalisation activées par ces derniers en vue de réguler la prolifération et la différenciation des chondrocytes. Les voies principalement impliquées dans la régulation de ces deux processus sont les voies Ras/Raf/MEK/ERK, STAT1/p21, et la voie PI3K/AKT. L'activation de la protéine STAT1 va permettre de contrôler la prolifération des chondrocytes via l'activation de la protéine p21, l'activation de PI3K/AKT est impliquée dans l'induction de l'apoptose après différenciation des chondrocytes, quant à la voie RAS/RAF/MEK/ERK, elle est impliquée dans la régulation de la différenciation des chondrocytes (figure 39). D'autres protéines sont activées par les FGFR dans le développement des os longs mais ces mécanismes ne sont pas encore bien connus. Parmi ces protéines on trouve la protéine PLC $\gamma$  responsable de l'activation de la protéine PKC, ainsi que la protéine Shc.

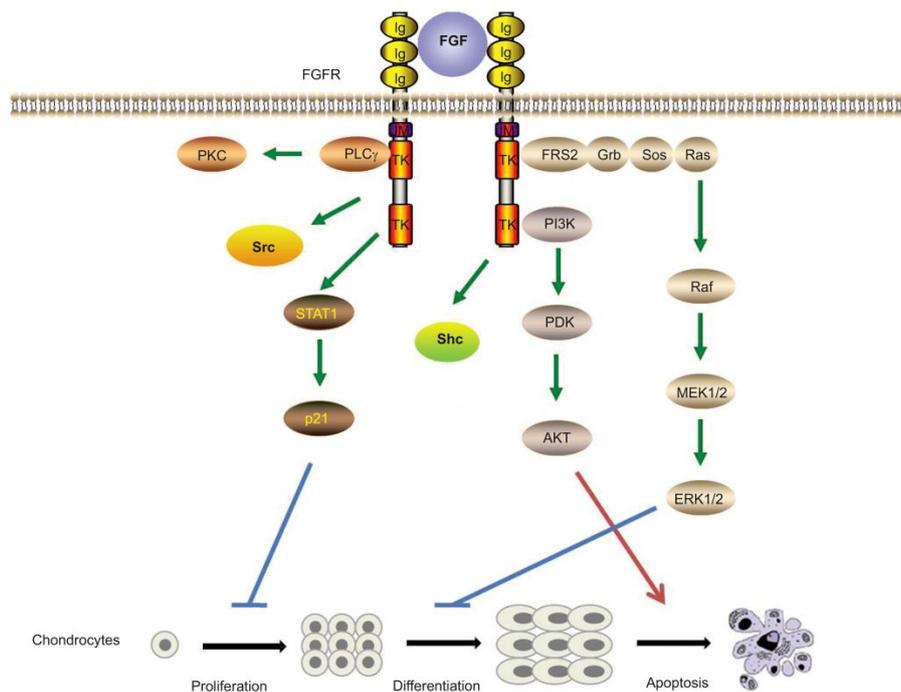


Figure 39 : Représentation des principales voies activées par les récepteurs FGFR au cours du développement squelettique dans le mode endochondral (SU ET AL., 2014).

*Le récepteur FGFR3 active la voie STAT1/P21 pour inhiber la prolifération des chondrocytes, la voie RAS/RAF/MEK/ERK pour inhiber la différenciation des chondrocytes et la voie PI3K/AKT pour induire (réguler) l'apoptose des chondrocytes différenciés.*

### ***FGFR3 : épissage alternatif, isoformes et expression tissulaire***

Le gène *FGFR3* est situé sur le chromosome 4, à la position 4p16. 19 exons codent pour le transcrit *FGFR3*. Les rôles que joue le récepteur FGFR3 dans l'homéostasie sont à l'heure actuelle peu connus. Il a cependant été montré qu'il est fortement exprimé au cours du développement du système nerveux central. Il est aussi exprimé dans les précurseurs de chondrocytes (cellules formant le cartilage) et joue un rôle important dans le contrôle de la croissance des os. Contrairement aux récepteurs FGFR1 et 2 pour lesquels l'expression est plus vaste au cours de l'organogénèse, celle de FGFR3 reste limitée, tout comme celle de FGFR4 (Peters, Werner, Chen, & Williams, 1992). Il avait été montré récemment que FGFR3 jouait aussi un rôle dans le développement de l'organe de Corti, organe de la perception auditive (Szarama et al., 2012). De plus il existe plusieurs isoformes du récepteur FGFR3, qui sont tissus dépendantes.

Un épissage alternatif au niveau des exons 8 et 9, codant pour le troisième domaine immunoglobuline de la partie extracellulaire du récepteur, où l'on trouve le site de liaison au ligand, permet d'obtenir deux isoformes : FGFR3b et FGFR3c. Ces deux isoformes sont ligands-et-tissus spécifiques (on retrouve par exemple la forme FGFR3b exprimée dans les cellules épithéliales et la forme FGFR3c dans les cellules de l'os), leurs homologies de séquence sont de 100 % pour la globalité du récepteur, ainsi que dans la première moitié du troisième domaine immunoglobuline, sauf au niveau du site d'épissage alternatif, où seul le domaine de liaison au ligand diffère. On ne retrouve alors que 32% d'homologie de séquence entre les deux isoformes (figure40).

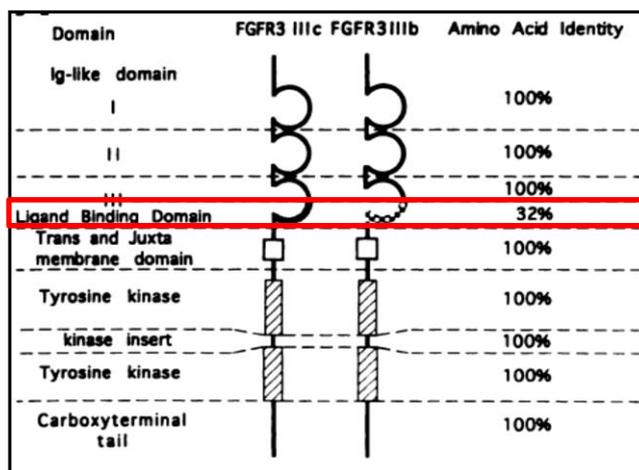


FIGURE 40 : LES DEUX ISOFORMES DE FGFR3 : FGFR3B, FGFR3C.

La forme *FGFR3b* est exprimée dans les cellules épithéliales, la forme *FGFR3c* dans les cellules de l'os. Leur homologie de séquence est de 100 % sauf au niveau du site d'épissage alternatif où il n'y a alors plus que 32% d'homologie (entouré en rouge), c'est alors le domaine de liaison au ligand qui diffère entre les deux isoformes.

### Mutations activatrices de *FGFR3* et syndromes squelettiques

La forme exprimée dans les chondrocytes suite à l'épissage alternatif du transcrit, est la forme *FGFR3c*. Il a clairement été établi grâce à différentes études que le gène *FGFR3* joue un rôle important dans l'arrêt de la croissance des os, conduisant au nanisme. Chez la souris un Knock out de *FGFR3* induit la formation d'os plus long comparé à un modèle où l'expression de *FGFR3* est normale (figure 41), (Su, Sun, et al., 2010).



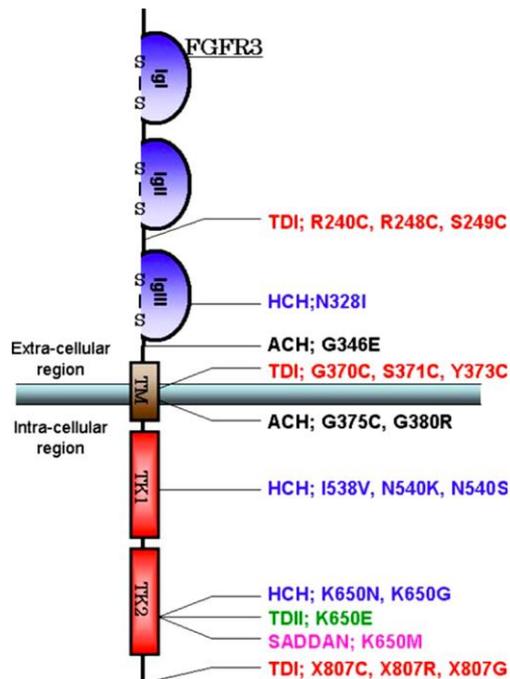
FIGURE 41 : KNOCK OUT DE *FGFR3* DANS UN MODELE MURIN (Su, Xu, et al., 2010)

Le Knock out de *FGFR3* dans un modèle murin conduit à la formation d'os plus long en comparaison à l'expression dans ce même modèle du récepteur *FGFR3* sauvage, montrant ainsi que *FGFR3* contrôle la croissance et le développement osseux.

De plus, dans les cellules germinales, les mutations activatrices de *FGFR3* sont la cause de différentes maladies squelettiques. Ces altérations du gène *FGFR3* sont notamment observées dans les différentes formes de chondrodysplasie et de craniosténose, et plus rarement dans une des formes de la maladie de Crouzon.

### ***Dysplasies squelettiques humaines***

Les dysplasies squelettiques sont des maladies de l'os se traduisant par différentes formes de nanisme, résultant dans la plupart des cas d'une mutation du gène *FGFR3* dans les cellules germinales. Les différentes mutations de *FGFR3* retrouvées dans les chondrodysplasies sont représentées ci-après (figure 42). Elles peuvent toucher le domaine extracellulaire du récepteur, le domaine transmembranaire, ainsi que le domaine tyrosine kinase. Les mutations retrouvées dans les hypochondroplasies sont réparties entre le domaine extracellulaire et le domaine tyrosine kinase du récepteur. Celles retrouvées dans l'ACH (achondroplasie) ne sont qu'au nombre de trois (deux dans le domaine transmembranaire qui sont caractéristiques de l'ACH et une dans le domaine extracellulaire). En ce qui concerne les TDI (nanisme thanatophore de type I), on trouve des mutations dans le domaine extracellulaire et le domaine tyrosine kinase. De manière surprenante, la plupart des mutations retrouvées dans les TDI, sont des mutations d'un acide aminé en une cystéine. Cette mutation conduit à la formation d'un pont disulfure et à une dimérisation constitutive du récepteur. En ce qui concerne les TDII et le SADDAN, c'est le même acide aminé qui est muté mais la mutation retrouvée n'est pas la même (mutation K650 E dans le cas des TDII (nanisme thanatophore de type II) et mutation K650 M dans le cas du SADDAN (Serve achondroplasia with developmental delay and acanthosis nigricans). Cette dérégulation de l'activation du récepteur est due soit à une mutation d'un acide aminé en une cystéine conduisant à la formation d'un pont disulfure, et à la dimérisation constitutive du récepteur qui peut dès lors activer son domaine tyrosine kinase, soit à l'activation directe du domaine kinase (mutations K650E et K650M). Les différentes mutations du récepteur *FGFR3* retrouvées dans les chondroplasies conduisent à une activation aberrante de l'activité kinase du récepteur induisant un arrêt de la croissance des os.



**FIGURE 42 : LES DIFFERENTES MUTATIONS DE FGFR3 DANS LES CHONDRODYSPLASIES**  
(Harada et al., 2007)

Plusieurs études ont montré le rôle que jouent les mutations du gène *FGFR3* dans l'apparition des différentes chondrodysplasies, notamment l'ACH et les dysplasies thanatophore de type I et II. Le récepteur *FGFR3* muté induit à la fois la différenciation précoce des chondrocytes, mais aussi une mort cellulaire par apoptose des cellules progénitrices. Ces effets sont dus à la surexpression des protéines STAT1 et STAT5 ainsi que les inhibiteurs du cycle cellulaire p16 et p21Cip1 résultant de l'activité du récepteur *FGFR3* muté, dans les cas d'ACH mais aussi de dysplasie thanatophore de type 1 et 2 (C. Li, Chen, Iwata, Kitagawa, & Fu, 1999), (Lageai-Mallet et al., 2004, Li C et al., 1999). Il a de plus été montré que c'est le recrutement et l'activation de la PCLy par *FGFR3* qui conduit au recrutement de STAT1, permettant d'induire l'apoptose cellulaire des cellules progénitrices des chondrocytes (Harada et al., 2007). Cette étude a de plus permis de montrer que la localisation du récepteur *FGFR3* muté entre le cytoplasme et le réticulum endoplasmique joue un rôle crucial dans la sévérité des différentes formes de chondrodysplasies (figure 43).

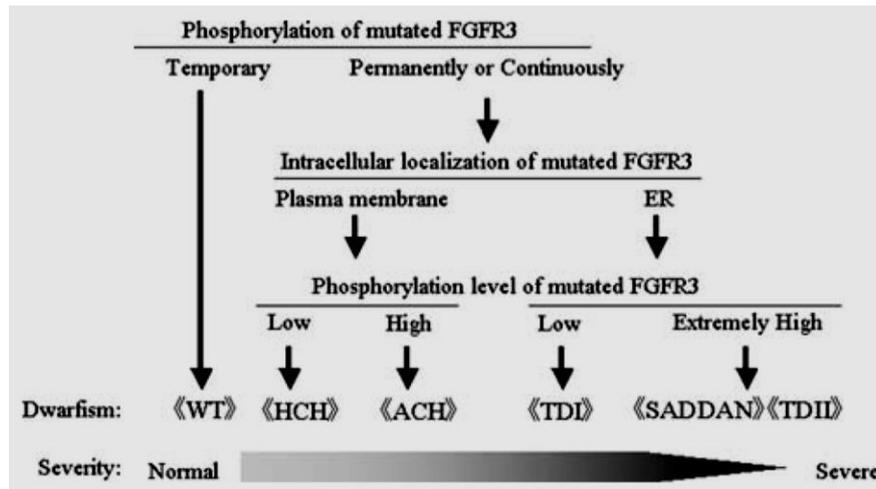


FIGURE 43 : ACTIVATION DU RECEPTEUR, LOCALISATION ET SEVERITE DES DIFFERENTES CHONDRODYSPLASIES (Harada et al., 2007)

Le taux de phosphorylation de FGFR3 ainsi que sa localisation cellulaire dans les cellules de l'os sont étroitement liés à la sévérité de la chondrodysplasie. Ainsi un récepteur FGFR3 constitutivement activé et localisé dans le réticulum endoplasmique donne lieu à des TDII et au syndrome SADDAN, formes de chondrodysplasies plus sévères que l'ACH.

En plus de la surexpression des protéines STAT1 et 5 et des protéines du cycle cellulaire, les protéines P38 et ERK1/2 jouent elles aussi un rôle dans l'ACH. Une étude réalisée dans un modèle murin a permis de montrer que dans le cas de la mutation activatrice G369C de FGFR3 (correspond à la mutation G380R chez l'homme), les protéines MAPKinase P38 et ERK1/2 étaient activées. L'activation de P38 par FGFR3 induit la différenciation ostéogénique des cellules mésenchymateuses progénitrices, tandis que l'activation de la voie ERK1/2 par FGFR3 inhibe la minéralisation osseuse (figure 44), (Su, Sun, et al., 2010).

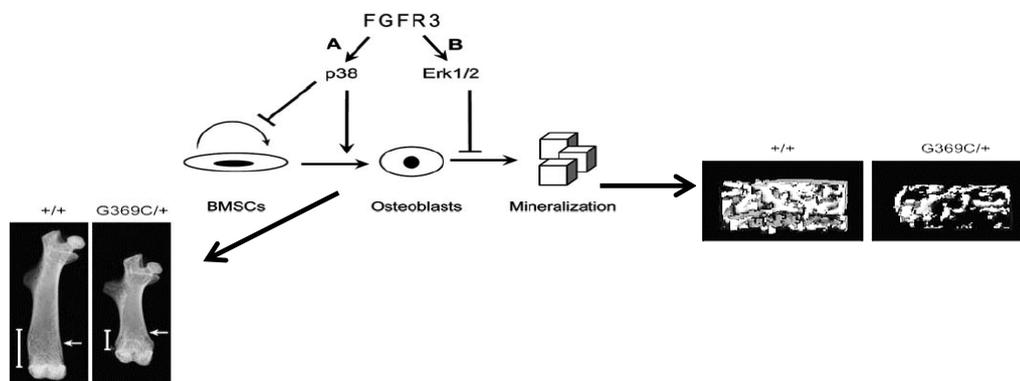


FIGURE 44 : ACTIVATION DES PATHWAYS P38 ET ERK1/2 PAR FGFR3 ET CONSEQUENCES SUR LA CROISSANCE ET LA MINERALISATION OSSEUSE (Su, Sun, et al., 2010)

Récemment, une étude a montré qu'un traitement aux statines permettait de restaurer totalement le phénotype en empêchant la dégradation du cartilage (Yamashita et al., 2014). Les résultats obtenus dans cette étude montrent que ce traitement pourrait être envisagé pour traiter les nourrissons et les jeunes enfants atteints d'ACH.

### 4.3 RECEPTEURS FGFR ET CANCERS

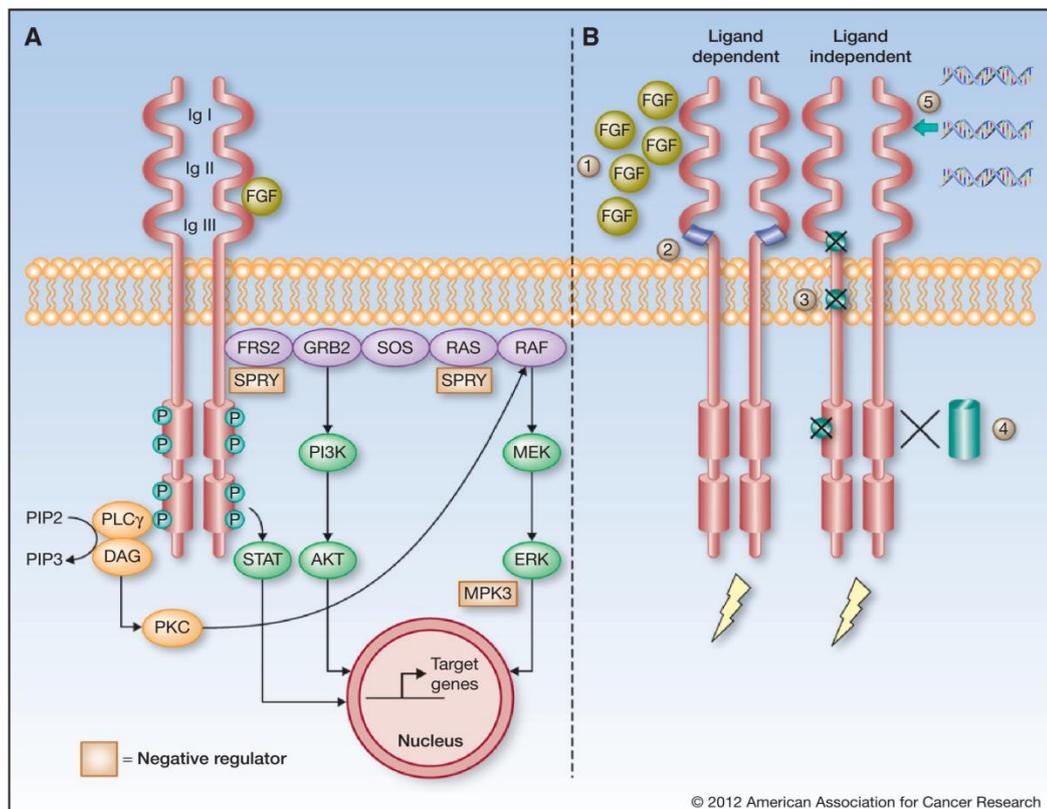
Les récepteurs FGFR sont retrouvés comme étant impliqués dans de nombreux cancers sous différentes formes : surexprimés, mutés ou sous forme de protéine de fusion. Lorsque l'activation du récepteur n'est pas altérée c'est uniquement la liaison du ligand FGF qui entraîne la dimérisation et l'activation du récepteur. La phosphorylation du récepteur dans son domaine tyrosine kinase permet l'activation de certaines voies de signalisation. Les voies de signalisation connues pour être activées par les récepteurs FGFR sont les voies de la PLC $\gamma$ , la voie PI3K/AKT, la voie RAS/RAF ainsi que les protéines STAT. L'activation de ces voies par les récepteurs FGFR va permettre la régulation de nombreux processus cellulaires. Dans un contexte normal ces voies de signalisation vont être contrôlées grâce à des régulateurs négatifs, tels que les protéines de la famille sprouty (SPRY) impliquées dans la régulation de l'activation de nombreux RTK, dont les récepteurs FGFR. Le second facteur de régulation négative est la protéine MPK3 (Mitogen-Activated-Protein-3) qui module négativement l'activation d'ERK (figure 45 A).

Dans le cadre du cancer plusieurs types d'altérations peuvent induire une activation non contrôlée des FGF récepteurs. Ces altérations sont :

- Implication du ligand FGF : L'activation des récepteurs FGFR peut être dérégulée via les ligands FGF. La cellule peut se mettre à produire de fortes concentrations de ligand FGF, ce qui peut induire une sur-activation de l'activité kinase du récepteur FGFR et des voies de signalisation sous-jacentes. Une variation de l'épissage de l'ARNm du récepteur FGFR exprimé peut entraîner une modification du type de ligand que le FGFR fixe habituellement pour être activé (Figure 45 B (1) et (2)).
- Implication des mutations ou apparition de protéines de fusion : des mutations du récepteur FGFR peuvent entraîner une dimérisation constitutive de celui-ci, ou une activation permanente du domaine tyrosine kinase. Des protéines de fusion ont été observées dans différents types de cancer pour les 4 récepteurs FGFR (FGFR1-4). Les protéines de fusion (fusion avec une région promotrice ou avec un facteur de transcription, ou avec un gène permettant un dimérisation constitutive, exemple

du produit de fusion FGFR3-TACC3), tout comme les mutations peuvent conduire à une surexpression du récepteur (figure 45 B (3) et (4)).

- Amplification du récepteur : l'amplification du gène codant pour un récepteur FGFR entraîne généralement une surexpression de celui-ci et une activation aberrante des voies de signalisation qu'il active (figure 40 B (5)).
- Un autre mécanisme peut être impliqué dans la dérégulation de l'activation des voies de signalisation par les récepteurs FGFR, c'est la régulation négative du fonctionnement des régulateurs négatifs décrits précédemment que sont les protéines SPRY et MPK3.

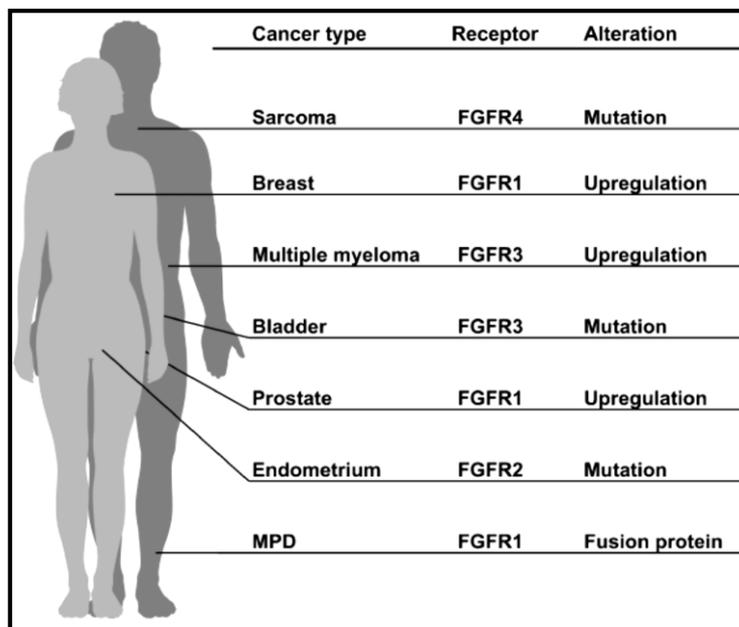


**FIGURE 45 : STRUCTURE, VOIES DE SIGNALISATION, ET DEREGULATIONS DES RECEPTEURS FGFR DANS LE CANCER** (a N. Brooks, Kilgour, & Smith, 2012). (1 ; 2) : REGULATION VIA LES FGF LIGANDS, (3 ; 4) : MUTATIONS ET PROTEINES DE FUSION, (5) : AMPLIFICATION DU GENE CODANT POUR LE RECEPTEUR.

#### 4.3.1 MUTATIONS, SUREXPRESSION ET TYPE TUMORAL

Le plus souvent, les altérations qui touchent les récepteurs FGFR sont la surexpression pouvant être due à une amplification du gène ou à une régulation transcriptionnelle dérégulée, ou l'acquisition de mutations activatrices, conduisant dans la plupart des cas à une dimérisation constitutive du récepteur, alors activé en permanence, et n'ayant plus

besoin de fixer son ligand. Cependant, dans le cas d'une surexpression comme d'une mutation d'un FGF récepteur, ces altérations ne sont pas obligatoirement « drivers » pour l'apparition de tumeurs et peuvent jouer un rôle « passagers », bien qu'il y ait souvent une corrélation entre la dérégulation d'un récepteur FGFR et la progression de certaines tumeurs. Les tumeurs dans lesquelles on retrouve des mutations et des surexpressions de ces récepteurs FGFR sont diverses (figure 46).



Cancer type	Receptor	Alteration
Sarcoma	FGFR4	Mutation
Breast	FGFR1	Upregulation
Multiple myeloma	FGFR3	Upregulation
Bladder	FGFR3	Mutation
Prostate	FGFR1	Upregulation
Endometrium	FGFR2	Mutation
MPD	FGFR1	Fusion protein

**FIGURE 46 : RESUME DES PRINCIPALES ALTERATIONS TOUCHANT LES RECEPTEURS FGFR DANS LES CANCERS HUMAINS** (Haugsten et al., 2010b)

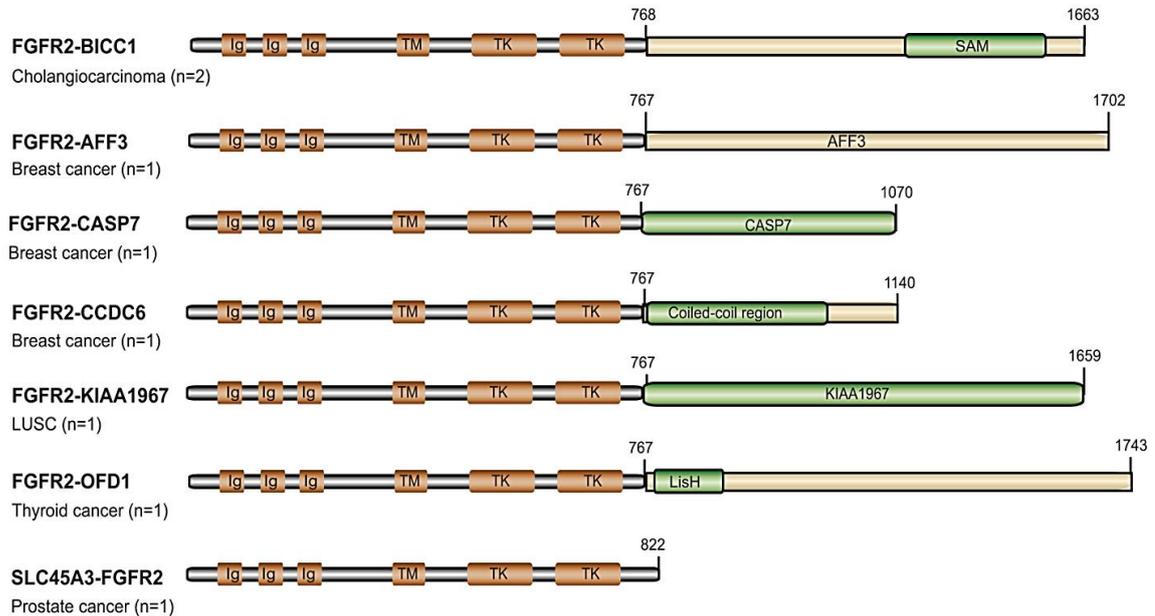
Jusqu'à très récemment les protéines de fusion impliquant les FGFR n'avaient pas été identifiées dans les désordres myélodysplasiques (MPD).

#### 4.3.2 RECEPTEURS FGFR ET PROTEINES DE FUSION

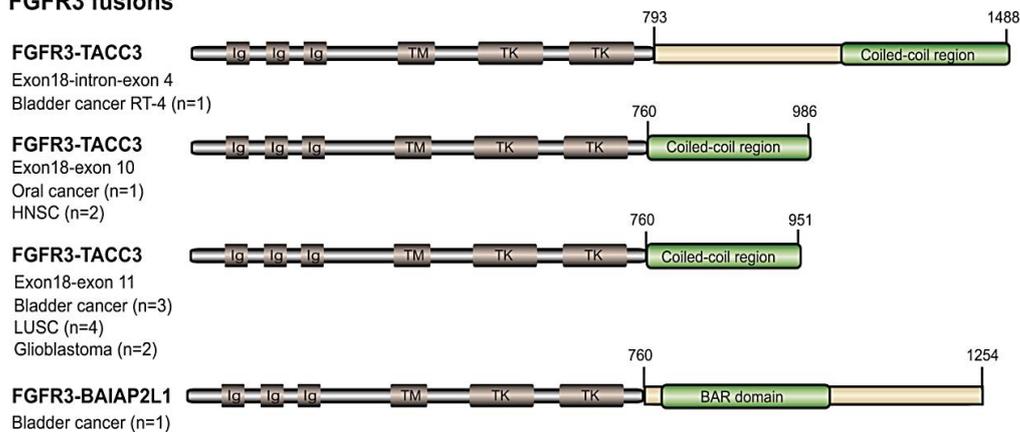
Les protéines de fusion impliquant les FGFR ont été retrouvées très récemment dans plusieurs cancers. Dans la majorité des cas l'apparition de ces protéines de fusion confèrent des propriétés oncogéniques au récepteur, bien que ce type d'altération semble plus rare que les surexpressions ou les mutations (leurs fréquences d'apparition n'est pas encore bien connue). Pour le récepteur FGFR2, 7 protéines de fusions ont été retrouvées dans différents cancers mais avec une très faible fréquence, elles sont de plus toutes différentes. Deux protéines de fusion ont été identifiées pour le gène FGFR3 (mais la protéine de fusion FGFR3-TACC3 apparaît beaucoup plus fréquemment et sous 3 formes différentes). Dans le cas des protéines de fusion FGFR2 ou FGFR3, la fusion se situe en aval du domaine tyrosine kinase. Cependant pour le gène FGFR1, deux protéines de fusion ont été identifiées, avec une faible fréquence, mais contrairement au deux autres récepteurs FGFR

la fusion a lieu au niveau du domaine N-terminal. Ces protéines de fusion sont représentées ci-après figure 47 :

### FGFR2 fusions



### FGFR3 fusions



### FGFR1 fusions

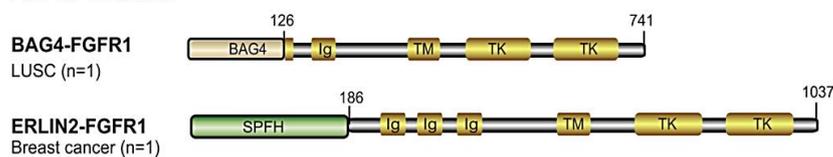
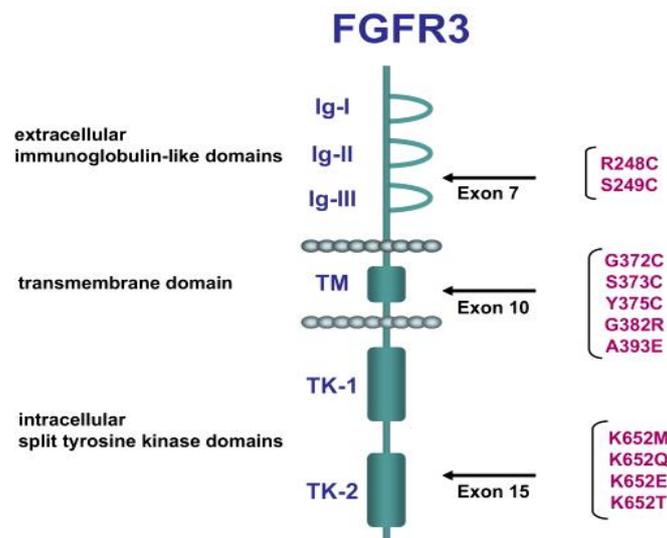


Figure 47 : Représentation schématique des protéines de fusion impliquant les FGFR identifiés (Y. Wu et al., 2013)

### 4.3.3 MUTATIONS DU RECEPTEUR FGFR3 ET PROTEINES DE FUSION

#### **Mutations**

Les mutations du gène *FGFR3* ont été identifiées sur 3 exons : les exons 7, 10 et 15. Les mutations du récepteur FGFR3 touchent le domaine extracellulaire (mutations dans l'exon 7), le domaine transmembranaire (mutations dans l'exon 10), et le domaine tyrosine kinase (intracellulaire, mutations dans l'exon 15) (figure 48). Toutes ces mutations conduisent à une activation aberrante du récepteur. Les mutations d'un acide aminé en une cystéine présentes dans le domaine extracellulaire ou juxtamembranaire conduisent à une dimérisation constitutive du récepteur, qui n'a dès lors plus besoin de fixer son ligand pour être activé. Les mutations retrouvées dans le domaine tyrosine kinase (TK), peuvent conduire à une dimérisation via la partie intracellulaire (mutation d'un acide aminé en une méthionine à l'instar de la cystéine, permettant d'induire la formation d'un pont disulfure), elles peuvent aussi conduire à une phosphorylation aberrante du domaine kinase.

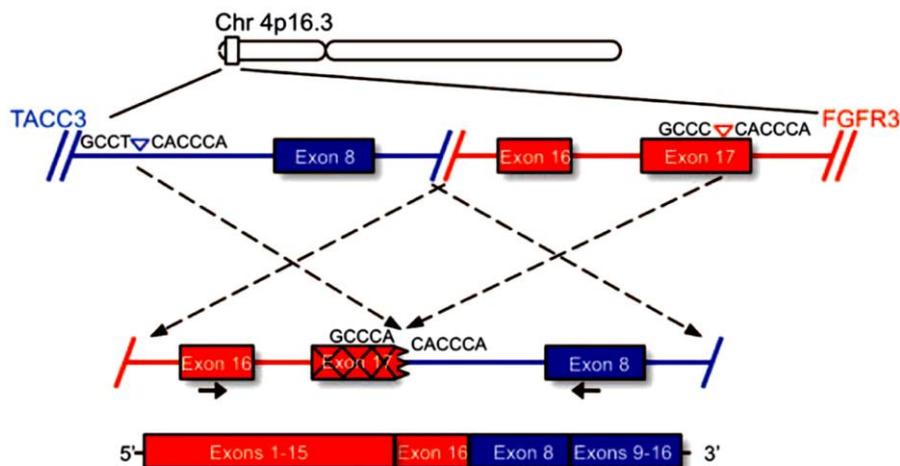


**FIGURE 48 : MUTATIONS DE FGFR3 SUR LES EXONS 7, 10 ET 15**

Les mutations du récepteur FGFR3 ont été retrouvées dans différentes tumeurs : tumeurs bénignes de la peau (kératoses séborrhéiques), cancer de la vessie, cancer du col de l'utérus et quelques cas de myélomes multiples où la translocation t (4 ; 14) est présente.

### La protéine de fusion *FGFR3-TACC3*

Le second type d'altération du récepteur *FGFR3* consiste en la formation d'un gène de fusion. Bien que ce type d'altération ait déjà été décrit pour les récepteurs *FGFR 1* et *2*, il n'a été décrit pour la première fois que très récemment pour le récepteur *FGFR3*. La protéine de fusion *FGFR3-TACC3* a été identifiée pour la première fois dans le glioblastome (Singh et al., 2013). Cette protéine de fusion est due à un remaniement chromosomique sur le chromosome 4p16 entre les gènes *FGFR3* et *TACC3* (figure 49).



**FIGURE 49 : FUSION GÉNOMIQUE ENTRE L'EXON 17 DE *FGFR3* ET L'INTRON 7 DE *TACC3* ; DANS L'ARNM DE FUSION QUI EN RESULTE L'EXON 16 DE *FGFR3* EST EPISSÉ EN 5' AVEC L'EXON 8 DE *TACC3* DANS LE GLIOBLASTOME (Singh et al., 2013)**

Pour le récepteur *FGFR3*, deux types de gènes de fusion sont retrouvés. Les premiers correspondant à une fusion entre les gènes *FGFR3* et *TACC3*, fusions les plus fréquemment observées. Le second transcrite de fusion est dû à la fusion entre les gènes *FGFR3* et *BAIAP2L1* et a été retrouvé dans plusieurs cas de tumeur de vessie. Les fusions entre les gènes *FGFR3* et *TACC3* ont été décrites dans le cancer de la vessie, dans le cancer de la cavité buccale, dans le cancer du cou, du poumon et dans le glioblastome. Quel que soit le gène de fusion, *FGFR3* est conservé du domaine extracellulaire (Ig) jusqu'au second domaine tyrosine kinase (TK). Le domaine de *TACC3* fusionné avec *FGFR3* est le domaine C-terminal, appelé domaine « coiled-coil », codant pour une structure hélicoïdale et permettant ainsi la formation d'une double hélice entre deux monomères du récepteur. Il en est de même pour le gène de fusion *FGFR3-BAIAP2L1*, dont le domaine BAR (dans la partie *BAIAP2L1* de la protéine de fusion) code aussi pour une structure hélicoïdale.

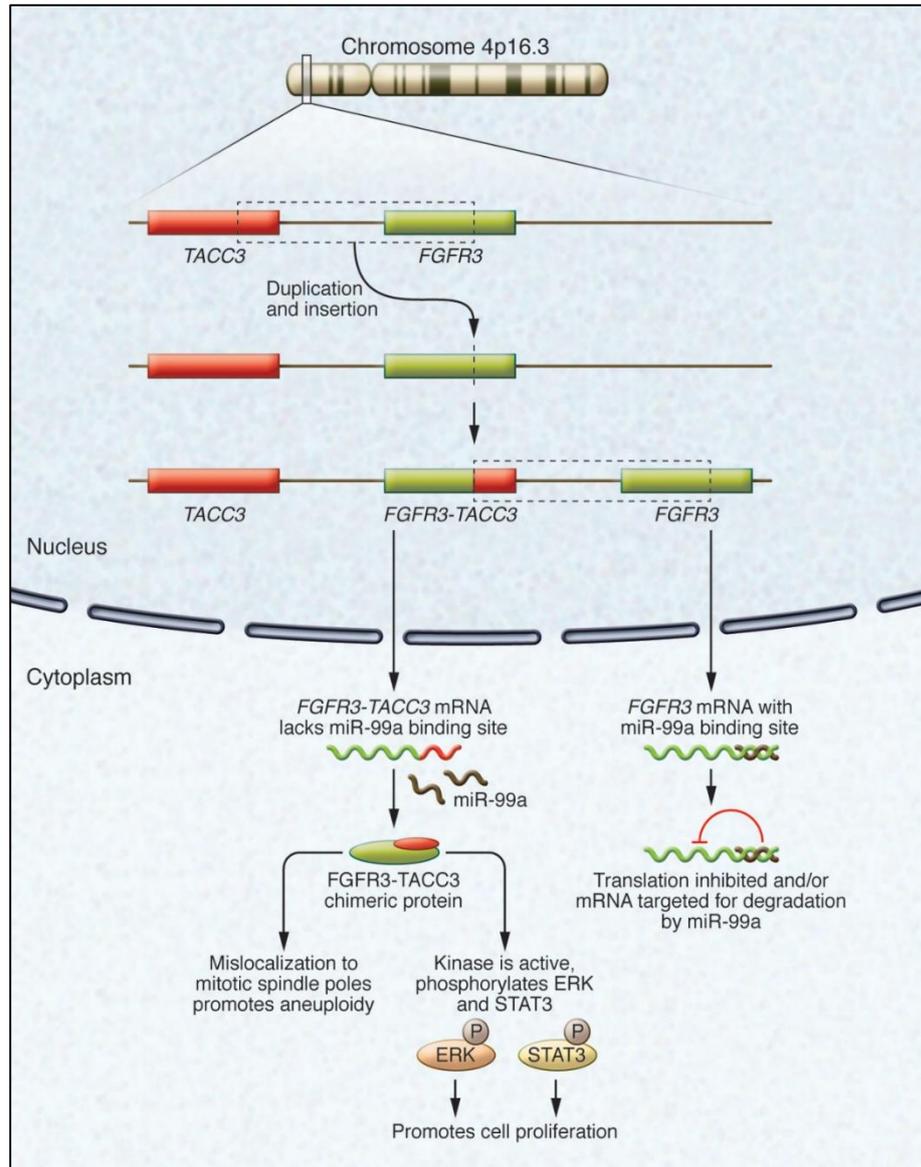
Que le récepteur soit muté ou qu'il soit sous la forme d'une protéine de fusion, il acquiert alors des propriétés oncogéniques de par son activation permanente. Il a été montré dans

le cas du glioblastome que la protéine de fusion FGFR3-TACC3 induit une hyperprolifération des cellules tumorales, et une aneuploïdie. Cette aneuploïdie est corrigée lorsque les cellules sont traitées avec un inhibiteur de l'activité kinase du récepteur FGFR3 (voir figure 50).



**FIGURE 50 : CORRECTION DE LA SEPARATION PREMATURÉE DES CHROMATIDES SŒURS PAR LE PD173074 (INHIBITEUR DE FGFR3) DANS LES CELLULES EXPRIMANT LA PROTEINE FGFR3-TACC3 (Singh et al., 2013)**

L'ARNm de FGFR3 peut être régulé par le micro ARN mir99a. La fixation de ce mir99a sur l'ARNm de FGFR3 induit sa dégradation. Or dans le cas du produit de fusion FGFR3-TACC3, la partie de l'ARNm de FGFR3 normalement reconnue par mir99a est remplacée par celle codant pour le domaine coiled-coil de TACC3 présent dans le produit de fusion. De ce fait, l'ARNm FGFR3-TACC3 ne peut pas être dégradé. Il en résulte une augmentation de l'expression de FGFR3-TACC3, corrélée à une augmentation de l'activation de ses cibles, notamment les protéines ERK et STAT3, promouvant ainsi la prolifération cellulaire (Babic & Mischel, 2013; Parker et al., 2013) ; (figure 51).



**FIGURE 51 : LA FORMATION DU PRODUIT DE FUSION FGFR3-TACC3 ECHAPPE A LA REGULATION PAR LE MIR99A.** (Babic & Mischel, 2013)

*Le produit de fusion FGFR3-TACC3 échappe à la régulation par le mir99a du fait que la partie de l'ARNm FGFR3 normalement reconnue par le mir99a n'est pas présente dans ce produit de fusion, conduisant à une surexpression du produit FGFR3-TACC3 qui active alors les protéines ERK et STAT3 promouvant ainsi la progression tumorale.*

#### 4.3.4 ALTERATIONS DU GENE FGFR3 ET KERATOSES SEBORRHIQUES

Les kératoses séborrhéiques, ou verrues séborrhéiques, sont des tumeurs épithéliales bénignes se présentant sous la forme de lésions cutanées bourgeonnantes. Ces tumeurs bénignes sont fréquentes chez l'homme âgé.

Il a été montré dans un modèle murin (Logié, Dunois-Lardé, Rosty, Levrel, Blanche, Ribeiro, Gasc, Jorcano, Werner, Sastre-Garau, et al., 2005) que l'expression du gène *FGFR3* muté (S249C) sous dépendance du promoteur à la kératine 5 (K5), et activé dans l'épiderme, conduit à la formation de lésions de l'épiderme (tumeurs bénignes de la peau) semblable aux kératoses séborrhéiques retrouvées chez l'homme. De plus, l'analyse de 62 tumeurs bénignes de la peau a permis d'identifier des points de mutations de *FGFR3*, au niveau des exons 7,10 et 15, dans 39 % des cas. De façon frappante, les mutations de *FGFR3* retrouvées dans ces échantillons tumoraux sont les mêmes que celles impliquées dans les différentes formes de chondrodysplasies (ACH, TDI et II, SADDAN) et les tumeurs de vessie.

#### 4.3.5 ALTERATIONS DU GENE FGFR3 ET CANCERS HEMATOLOGIQUES

##### **Myélomes Multiples**

Le myélome multiple (MM) est une hémopathie maligne due à la prolifération anormale de plasmocytes monoclonaux dans la moelle osseuse. Dans environ 15 à 20% des myélomes multiples (patients et lignées cellulaires), on trouve une translocation  $t(4; 14)(p16; q32)$ . Cette translocation se caractérise par une dérégulation de l'expression de 2 gènes : *FGFR3* et *MMSET* (Myélome Multiple SET).

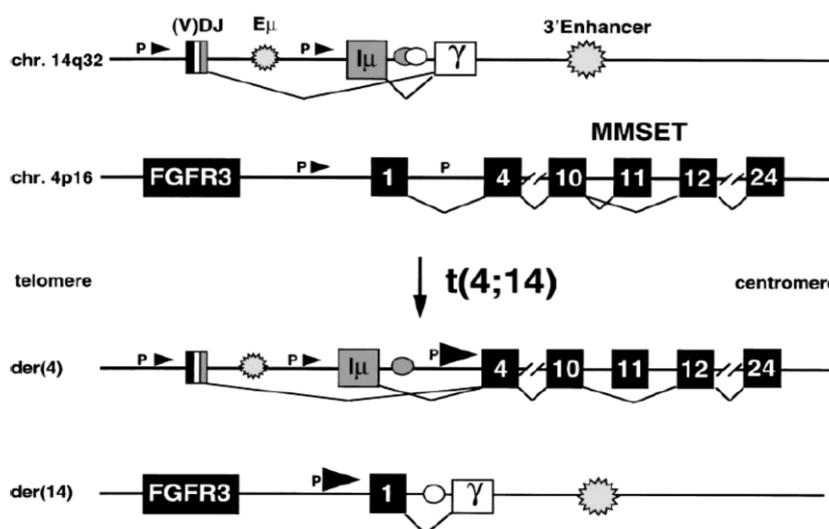


FIGURE 52 : TRANSLOCATION  $T(4 ;14)(P16 ; Q32)$  RETROUVEE DANS LES MM (M Chesi, Nardini, & Lim, 1998)

Cette translocation cause une surexpression du gène *FGFR3*, qui dans certains cas contient en plus une mutation activatrice. Certaines de ces mutations (K560E, K560M, et Y373C) sont retrouvées dans les cas de dysplasie thanatophore de type II (TDII), d'autres sont exclusivement retrouvées dans les Myélomes Multiples (Marta Chesi, Kuehl, & Bergsagel, 1997). Dans 40 % des cas de Myélomes Multiples on trouve des mutations activatrices des gènes *NRAS* et *KRAS*. De manière intéressante, comme pour le cancer de la vessie, les altérations de *RAS* et *FGFR3* dans le myélome multiple seraient exclusives. Soit *FGFR3* est surexprimé, soit *RAS* est muté. La surexpression du récepteur *FGFR3* conduit à l'activation de la voie de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK (Marta Chesi et al., 2001).

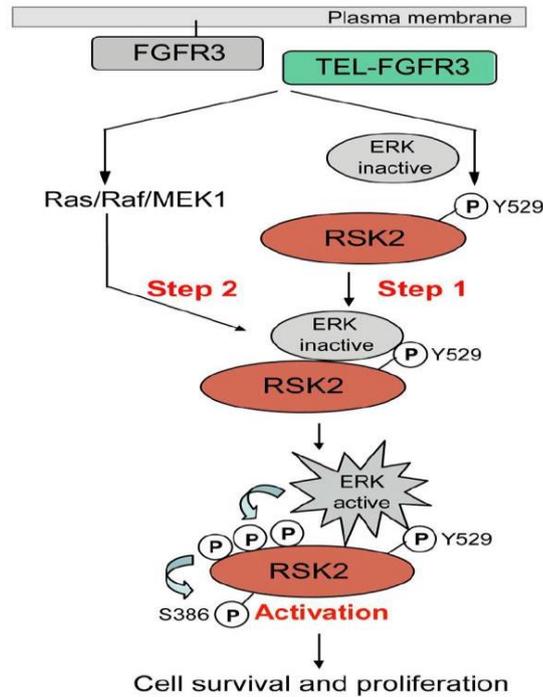
### ***La protéine TEL-FGFR3***

Dans les lymphomes à cellules T périphériques (PTCL), on trouve la translocation t(4 ; 12)(p16 ;q32). Cette translocation est parfois retrouvée associée à la protéine de fusion *TEL-FGFR3* (Yagasaki et al., 2001). Plusieurs fusions entre le gène *ETV6/TEL* et les gènes de récepteurs ou des protéines à activité tyrosine kinase (*PDGFR $\beta$* , *JAK*, *ABL*, *ABL2*, *TRKC*) ont été identifiées dans les cancers hématologiques. Ces protéines de fusion possèdent une activité tyrosine kinase constitutive due à l'activation du domaine HLH (« Helix Loop Helix ») de *ETV6* (Yagasaki et al., 2001). Les lymphomes arborant la protéine *TEL-FGFR3* peuvent évoluer en leucémie myéloïde aigüe (AML) à travers l'activation de la voie *PI3K/AKT* par la protéine *TEL-FGFR3* (Maeda, Yagasaki, Ishikawa, Takahashi, & Bessho, 2005).

### ***Mécanisme d'activation de la protéine ERK par le récepteur FGFR3 surexprimé ou muté dans les myélomes multiples ou par la protéine TEL-FGFR3***

Il a été montré récemment que le récepteur *FGFR3* surexprimé ou muté dans le cas des Myélomes Multiples et la protéine de fusion *TEL-FGFR3*, induisaient l'activation de la voie de signalisation *RAS/RAF/MEK/ERK* et le recrutement de la protéine *RSK2* (sérine/thréonine kinase inhibitrice des caspases) de la même manière. *FGFR3* va dans un premier temps phosphoryler la protéine *RSK2* sur le site tyrosine Y529, conduisant au recrutement de la protéine *RSK2* inactive (Kang et al., 2007). En parallèle, *FGFR3* active la voie *RAS/RAF/MEK*. La protéine *ERK* lié à *RSK2* va alors être activée par la MAP2Kinase *MEK*. *ERK* va alors phosphoryler *RSK2* sur plusieurs sites dont la sérine 386 induisant l'activation de *RSK2*. Il en résulte une activation d'*ERK* (qui va jouer son rôle de facteur de transcription dans le noyau) et de *RSK2*, promouvant la prolifération et la survie cellulaire (figure 53). L'identification de ce mécanisme a permis d'identifier la protéine *RSK2* comme

une cible nouvelle cible thérapeutique dans les leucémies arborant la protéine de fusion TEL-FGFR3 et les myélomes multiples présentant la translocation (t4 ;14).



**FIGURE 53 : MECANISME D'ACTIVATION DE RSK2 PAR LE RECEPTEUR FGFR3 DANS LES MYELOMES MULTIPLES ET LES LEUCEMIES (Kang et al., 2007)**

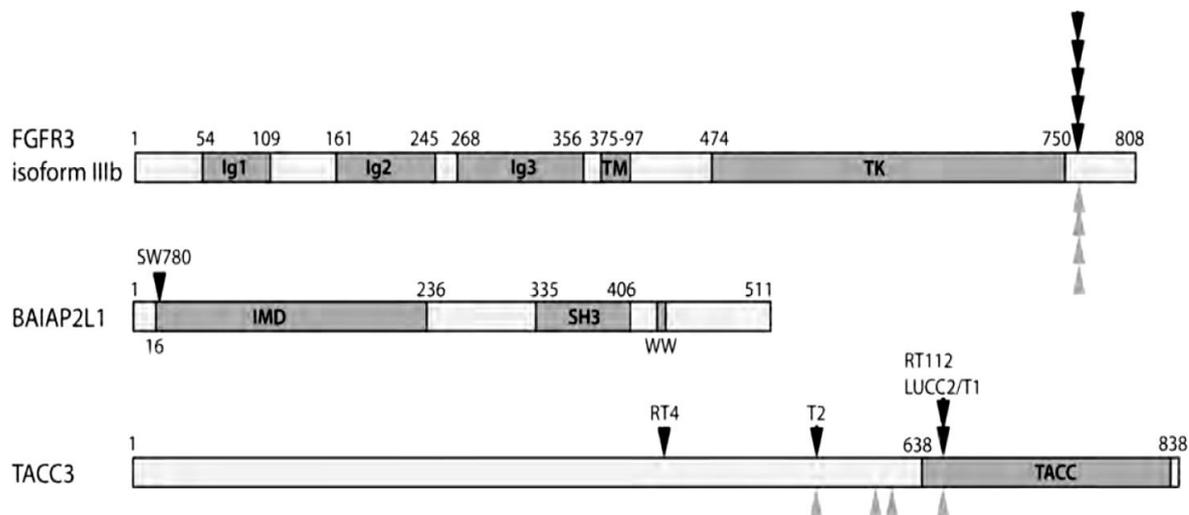
Le récepteur *FGFR3* muté ou surexprimé dans les myélomes multiples et la protéine *TEL-FGFR3* induisent l'activation de la voie *RAS/RAF/MEK/ERK* et recrute la protéine *RSK2* de la même manière. *FGFR3* va dans un premier temps phosphoryler la protéine *RSK2* sur le site tyrosine *Y529*, conduisant au recrutement de la protéine *RSK2* inactive. En parallèle, *FGFR3* active la voie *RAS/RAF/MEK*. La protéine *ERK* lié à *RSK2* va alors être activée par la *MAP2Kinase MEK*. *ERK* va alors phosphoryler *RSK2* sur plusieurs sites dont la sérine *386* induisant l'activation de *RSK2*. Il en résulte une activation d'*ERK* (qui va jouer son rôle de facteur de transcription dans le noyau) et de *RSK2*, promouvant la prolifération et la survie cellulaire

#### 4.3.6 ALTERATIONS DU GENE *FGFR3* ET CANCER DE LA VESSIE

Des mutations de *FGFR3* ont été identifiées dans le myélome multiple et les tumeurs bénignes de la peau (kératoses), mais aussi dans les tumeurs de vessie et du col de l'utérus (Cappellen, 1999). Les mutations alors identifiées étaient les suivantes: R248C, S249C, G372C et K562E. La mutation la plus fréquemment retrouvée est la mutation S249C. De manière surprenante, ces mutations sont identiques à celles retrouvées dans les cas de chondrodysplasie, par exemple les mutations G372C et K562E de la forme *FGFR3b* exprimée dans les cellules épithéliales correspondant aux mutations G370C et K560E de la forme *FGFR3c* exprimée dans l'os (décalage de deux acides aminés dû à l'épissage alternatif entre les formes *FGFR3b* et *FGFR3c*). Le gène *FGFR3* est 20 fois plus exprimé que les autres FGF récepteurs dans l'urothélium (Darren C Tomlinson, L'Hôte, Kennedy, Pitt, & Knowles, 2005). Dans les cancers de vessie, environ 75% des tumeurs papillaires Ta présentent une mutation du gène *FGFR3*. Les deux mutations les plus fréquemment retrouvées sont les mutations S249C et Y375C (20%). Sur un panel de 77 échantillons de tumeurs de vessie humaines, 31 présentent une mutation du gène *FGFR3*, dont 22 correspondant à la mutation S249C. Ces mutations résident pour la plupart dans des tumeurs papillaires Ta (bas stade) peu agressives, et beaucoup moins dans les carcinomes urothéliaux de haut grade. Par la suite, les propriétés oncogéniques du récepteur *FGFR3* muté (mutations Y375C et S249C) dans les tumeurs de vessie ont été démontrés *in vitro* et *in vivo* (Bernard-Pierrot et al., 2006; D C Tomlinson, Hurst, & Knowles, 2007).

Les voies de signalisation du récepteur *FGFR3* muté ont par la suite été étudiées dans deux types cellulaires de vessie (Martino, Hôte, Kennedy, Tomlinson, & Knowles, 2009). Le premier type cellulaire étudié est la lignée TERT-NHUC, cellules normales humaines de vessie immortalisées par la télomérase et transfectées avec une des trois formes suivantes de *FGFR3* muté : S249C, Y375C et K562E. Il apparaît dans les cellules TERT-NHUC que le récepteur *FGFR3* muté phosphoryle de manière ligand indépendante les protéines FRS2 $\alpha$  et ERK 1/2 mais pas les protéines AKT et SRC. De plus les formes *FGFR3* S249C et Y375C phosphorylent la PLC $\gamma$ , ce qui n'est pas le cas lorsque les cellules TERT-NHUC expriment la mutation *FGFR3* K562E. Lorsque le récepteur muté est exprimé dans le modèle cellulaire fibroblastique NIH3-T3, les protéines AKT et Src sont retrouvées phosphorylées. De plus dans ce cas-là, le récepteur *FGFR3* K562E induit la phosphorylation de la PLC $\gamma$ . Ces observations semblent montrer que l'activation de certaines voies de signalisation par le récepteur *FGFR3* muté est type cellulaire et contexte dépendant. Cette étude a de plus permis de mettre en évidence que les effets du récepteur *FGFR3* muté sur la prolifération et la transformation cellulaire sont dépendantes du type de mutation et du type cellulaire dans lesquels elles sont exprimées.

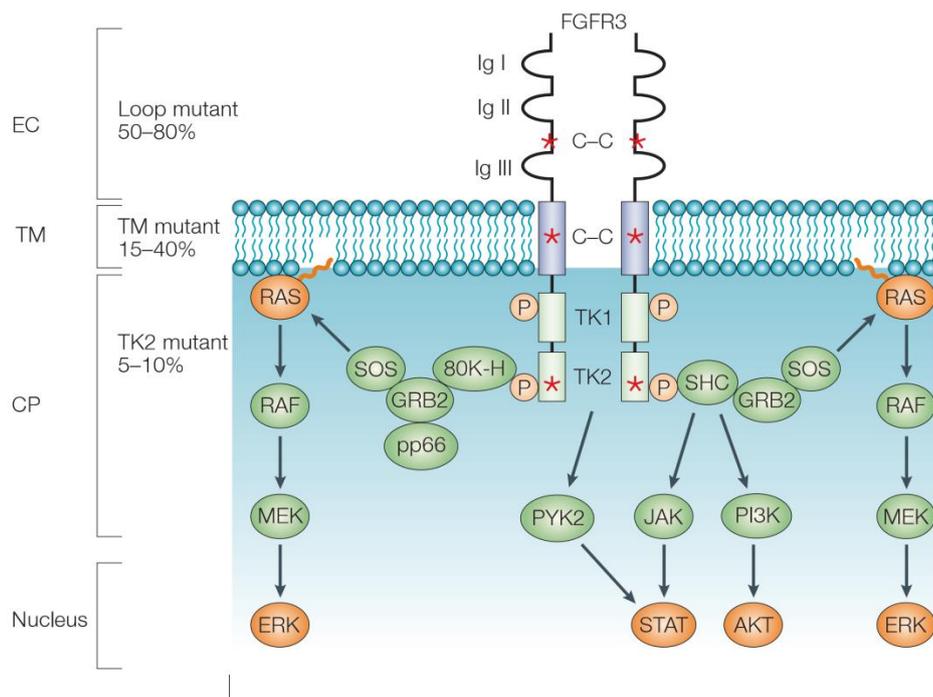
Récemment, deux gènes de fusion, FGFR3-TACC3 et FGFR3-BAIAP2L1 (Williams, Hurst, & Knowles, 2013) ont été identifiés dans des échantillons de tumeurs et dans des lignées cellulaires de tumeurs de vessie (RT112, RT4, SW780), (figure 54). Les propriétés oncogéniques de ces protéines de fusion ont été démontrées *in vitro* et *in vivo* dans le modèle cellulaire NIH3T3, mais aussi dans des xénogreffes de deux lignées cellulaires dérivées de tumeurs de vessie humaines arborant ces protéines de fusion (Williams et al., 2013; Y. Wu et al., 2013).



**FIGURE 54 : GENES DE FUSION FGFR3-BAIAP2L1 ET FGFR3-TACC3 DANS LES LIGNÉES CELLULAIRES HUMAINES DE TUMEURS VESSIE** (Williams et al., 2013)

Deux gènes de fusion *FGFR3-TACC3* différents ont été identifiés dans les tumeurs de vessie et dans les lignées cellulaires *RT112* (exprime la forme la plus courte de *FGFR3-TACC3*) et *RT4* (exprime la forme la plus longue de *FGFR3-TACC3*). Le gène de fusion *FGFR3-BAIAP2L1* a été identifié dans la lignée cellulaire *SW780*.

Cependant les voies de signalisation activées par le récepteur FGFR3 muté ou le récepteur FGFR3-TACC3 dans les cancers de vessie restent à l'heure actuelle peu caractérisées. L'ensemble des voies de signalisation connues pour être activées par le récepteur FGFR3 muté dans les tumeurs de vessie est représenté ci-après (figure 55) :



**FIGURE 55 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES VOIES DE SIGNALISATION ACTIVEES PAR LE RECEPTEUR FGFR3 MUTE DANS LES TUMEURS DE VESSIE (X.-R. WU, 2005)**

*Les différentes mutations du récepteur FGFR3 (représentées ici en rouge par une étoile) qu'elles soient présentes dans le domaine extracellulaire, le domaine intra-membranaire ou le domaine tyrosine kinase conduisent à une activation aberrante du récepteur. Le récepteur FGFR3 muté active les voies RAS/RAF/MEK/ERK, la voie de protéines STAT et la voie de la PI3K/AKT.*

## CHAPITRE V : TRAITEMENTS THERAPEUTIQUES ACTUELS POUR LES TUMEURS DE VESSIE

A l'heure actuelle, le cancer de la vessie reste l'un des cancers les plus coûteux à traiter, du fait du nombre d'interventions qui peuvent être nécessaires. Comme décrit précédemment on distingue deux voies de progression tumorale, celles des tumeurs papillaires, celles des tumeurs CIS. Les CIS sont rarement détectés à l'état isolé. De plus les tumeurs qui présentent une signature de type CIS sont plus agressives que les tumeurs papillaires, et évoluent plus rapidement vers un envahissement de la membrane basale et du muscle.

Les thérapies utilisées actuellement pour traiter les tumeurs de vessie peuvent être divisées en deux groupes en fonction de si la tumeur a envahie le muscle ou non. L'efficacité des traitements pour les cancers de vessie dépend fortement du stade et du grade de la tumeur ainsi que des facteurs de risque associés.

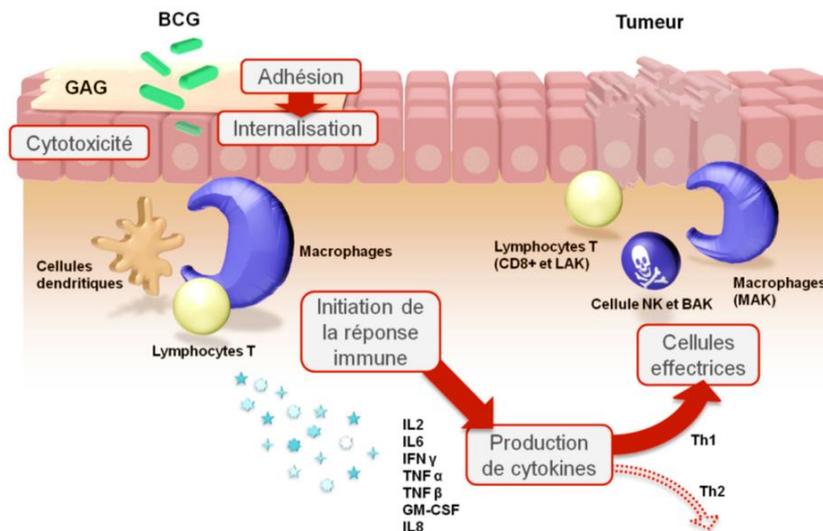
### 5.1 TRAITEMENTS DES TUMEURS N'ENVAHISSANT PAS LE MUSCLE

Parmi les tumeurs n'ayant pas envahi le muscle on distingue les tumeurs de type CIS, les tumeurs papillaires de stade Ta et les tumeurs de stade T1.

Concernant les tumeurs papillaires, les cliniciens distinguent 3 sous-groupes : les tumeurs de bas grade, les tumeurs de grade intermédiaire et les tumeurs de haut grade. Les tumeurs papillaires de bas stade/bas grade ont environ 5% de risque d'évoluer vers un envahissement de la membrane basale et du muscle, alors que les tumeurs de bas stade mais de haut grade ont 30% de risque d'évoluer. Le principal traitement appliqué pour les tumeurs n'ayant pas envahies le muscle est une résection de la tumeur (TUR), qui consiste en un « grattage » de celle-ci. Cependant, après ablation chirurgicale de la tumeur, plus de 50 % des tumeurs de vessie récidivent au moins 1 fois. En effet, la résection tumorale de ces tumeurs ne suffit pas, du fait de la récurrence des tumeurs de vessie. Ce « grattage » peut-être couplé à une chimiothérapie ou à un traitement au BCG (Bacille Calmet et Guérin) afin d'essayer de prévenir cette récurrence. La thérapie au BCG permet en effet d'activer le système immunitaire dans le but que celui-ci élimine les cellules tumorales.

Le BCG (bacille de Calmet et Guérin), est une mycobactérie qui adhère au mucus vésical puis à l'urothélium. Le BCG une fois dans l'urothélium, a un effet cytotoxique via la production de monoxyde d'azote (NO). Il va de plus activer l'immunité innée et être phagocyté par des cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, cellules

dendritiques). Ces cellules présentatrices d'antigènes vont alors présenter les produits de dégradation du BCG au lymphocytes T helper, permettant ainsi d'activer une réponse immunitaire spécifique, accompagnée par une production de cytokines. Ces cytokines orientent la réponse immunitaire vers une réponse de Th1, centrée sur l'activation, la migration et l'activation de cellules immunitaires cytotoxiques (CD8, lymphocytes Natural Killer, macrophages). (Neuzillet et al., 2010). La réaction immunitaire qui se produit grâce à un thérapie BCG est représentée ci-après (figure 56) :

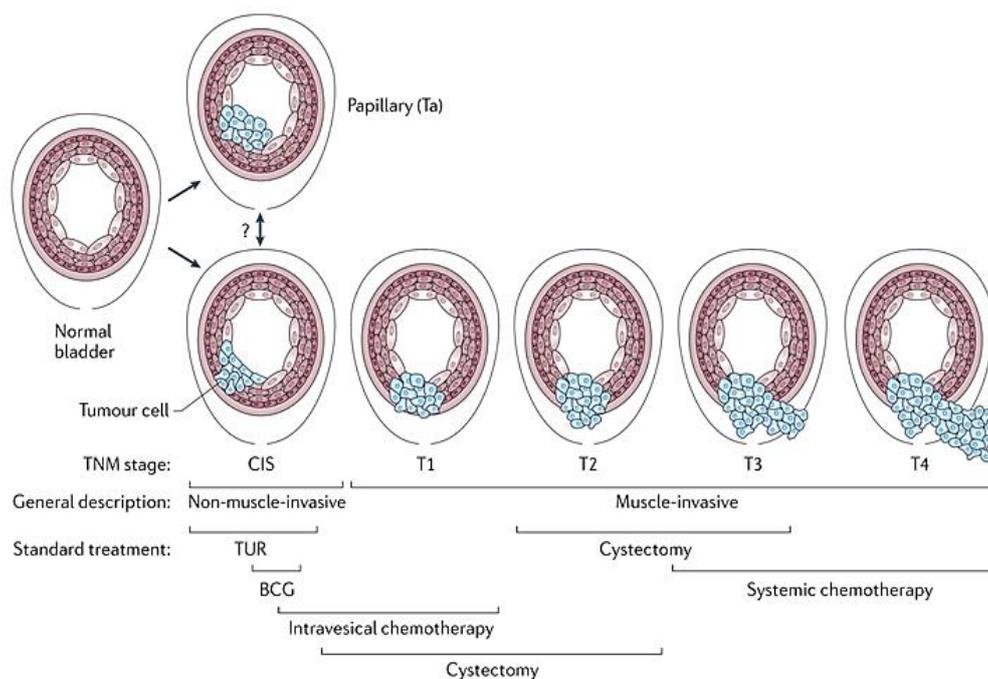


**FIGURE 56 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MECANISMES D'ACTION DU BCG** (Y Neuzillet & Lebret, 2010)

Cependant, si le traitement au BCG échoue et que la tumeur évolue, une cystectomie peut alors être envisagée (ablation de la vessie) couplée ou non à une chimiothérapie néo-adjuvante. La chimiothérapie peut cependant être envisagée seule.

## 5.2 THERAPIES POUR LES TUMEURS DE VESSIE ENVAHISSANT LE MUSCLE (T2-T4)

Les tumeurs de vessie de stade T2-T4 ayant envahis le muscle sont des tumeurs très agressives. Les seuls traitements existants à l'heure actuelle sont lourds et invasifs. Le premier, qui est aussi le principal traitement envisagé dans ce cas est une cystectomie (résection totale de la vessie) couplée ou non à une chimiothérapie néo adjuvante. Les patients qui ont subi une cystectomie ont une survie moyenne de 5 ans. Cependant s'il y a présence de métastase la cystectomie n'est plus envisagée. Dans ce cas-là le seul traitement qui prévaut est une chimiothérapie lourde composée des agents chimiothérapeutiques suivants: le méthotrexate, la vinblastine, l'adriamycine et le cisplatine (appelé traitement MVAC) ou alors un couplage cisplatine et gemcitabine (appelé traitement GC). Malheureusement, ces traitements en plus d'être lourds, n'ont que peu d'impact bénéfique, et la survie des patient n'est alors que de 12 à 15 mois.



**FIGURE 57 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES TRAITEMENTS THERAPEUTIQUES ACTUELS APPLIQUES EN FONCTION DU STADE DANS LE CANCER DE LA VESSIE. TUR : TRANS-URETRAL RESECTION ; BCG : BACILLE CALMETTE-GUERIN. (Kobayashi, Owczarek, McKiernan, & Abate-Shen, 2014)**

La caractérisation des altérations moléculaires de ces tumeurs a permis le développement d'inhibiteurs chimiques ciblant spécifiquement certaines de ces altérations. Plusieurs molécules sont à l'heure actuelle en phase d'essais cliniques. C'est le cas notamment des molécules inhibant l'activité des récepteurs FGF. L'étude récente du TCGA a par exemple

montré que 17% des tumeurs ayant envahi le muscle présentent des mutations activatrices du récepteur FGFR3 (Carneiro et al., 2014; The Cancer Genome Atlas, 2014), confirmant ce que notre équipe avait déjà montré (de l'ordre de 13% des tumeurs). Si l'on prend en plus en considération la très forte proportion de tumeurs papillaires qui présentent des altérations de ce gène, il est clairement important de développer des médicaments ciblant ce récepteur.

La description faite ici des traitements existants pour les cancers de vessie, montre bien qu'il est réellement important de mieux caractériser ces tumeurs, leurs altérations moléculaires et les voies de signalisation intracellulaires qui leurs sont associées afin de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques, en plus des altérations moléculaires déjà décrites. Ceci dans le but d'ouvrir la voie à de nouveaux traitements thérapeutiques et de cibler peut être deux altérations moléculaires plutôt qu'une seule afin d'avoir un impact le plus important possible sur la progression tumorale.

#### 5.2.1 TUMEURS T2-T4 DE PHENOTYPE BASAL-LIKE ET THERAPIE ANTI-EGFR

Une étude menée récemment au laboratoire, a permis d'identifier le récepteur EGFR comme une nouvelle cible thérapeutique prometteuse pour les tumeurs de stade T2-T4 ayant envahi le muscle et présentant un phénotype basal-like.

Des thérapies anti-EGFR ont déjà été testées en clinique mais sans succès. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'au moment où ces essais cliniques ont été réalisés le phénotype basal-like des tumeurs de vessie ayant envahi le muscle n'était pas connu.

L'étude menée au laboratoire a montré que les tumeurs ayant un phénotype basal-like présentent une forte activation du pathway de l'EGFR, liée à des gains du récepteur ou à une boucle d'activation autocrine de celui-ci (Rebouissou et al., 2014). Cette étude a permis également d'identifier des modèles précliniques pour ces tumeurs : des lignées cellulaires cultivées *in vitro* ou *in vivo* sous forme de xénogreffes et un modèle murin chimio-induit par un nitrosamine, le BBN (N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine)). Ces modèles ont permis de valider l'implication de l'EGFR dans la transformation cellulaire des tumeurs basal-like. Les lignées cellulaires de tumeur de vessie humaines présentant un phénotype basal étaient pour la plupart EGFR dépendantes, elles répondaient à une thérapie anti-EGFR *in vitro* mais aussi *in vivo*. Des xénogreffes réalisées dans un modèle murin à partir de 4 lignées cellulaires de type basal-like et de 2 lignées cellulaires ne présentant pas un phénotype basal-like ont permis de montrer que 3 des 4 xénogreffes des lignées cellulaires basal-like répondent à un traitement à l'erlotinib (petite molécule qui cible le récepteur à l'EGFR). La seule xénogreffe ne répondant pas à l'inhibiteur était issue de lignée cellulaire BFTC 905 qui présente une mutation activatrice de *NRAS*. Les deux xénogreffes issues

des lignées non basales like sont quant à elles insensibles à l'inhibiteur. Les tumeurs chez la souris induites par le BBN étaient de type basal-like et étaient également sensibles à l'erlotinib. Cependant il reste un point critique pour réaliser un essai clinique, celui de distinguer parmi les tumeurs ayant envahi le muscle, celles ayant un phénotype basal-like. Pour cela il pourrait être envisagé de réaliser un marquage des kératines 5 et 6 (fortement exprimé dans ces tumeurs) et de FOXA1 (peu voir pas exprimé dans ce sous-type tumoral), sur coupe de tumeurs de patients (Rebouissou et al., 2014).

L'identification de la dépendance des tumeurs ayant envahies le muscle de type basal-like pour le récepteur à l'EGFR non mutées pour RAS dans les modèles précliniques, permet donc de proposer une nouvelle thérapie basée sur un traitement à l'erlotinib pour ces tumeurs. Un tel traitement est déjà utilisé en clinique pour traiter les tumeurs du côlon ne présentant pas de mutations de *KRAS* et pour certaines tumeurs du poumon NSCLC (Non-Small Cell Lung Carcinoma).

### 5.3 FGFR3 COMME CIBLE THERAPEUTIQUE

L'inhibition de l'activité du récepteur FGFR3 peut être abordée de deux manières différentes : l'utilisation d'inhibiteurs chimiques, et celles d'anticorps comme le R3mAb.

#### 5.3.1 INHIBITION DE L'ACTIVITE DE FGFR3 PAR UN INHIBITEUR CHIMIQUE

Plusieurs inhibiteurs chimiques ont été développés dans le but de cibler la famille des FGF récepteurs. On citera notamment le AZ4547 (Astra Zeneca), le BGJ398 (Novartis) qui inhibent préférentiellement les récepteurs FGFR1, 2 et 3 et dont l'effet est nettement moins important sur le récepteur FGFR4, et le LY2874455 qui est pan-FGFR (Eli lily), et le Dovitinib. Il a été montré que ces quatre molécules présentent un effet anti-tumoral dans différents modèles murins présentant différentes altérations de ces FGF récepteurs. ( a N. Brooks, Kilgour, & Smith, 2012b). Ces inhibiteurs sont à l'heure actuelle en phase I d'essai clinique sur différents types de cancers, excepté le Dovitinib, qui est en phase II.

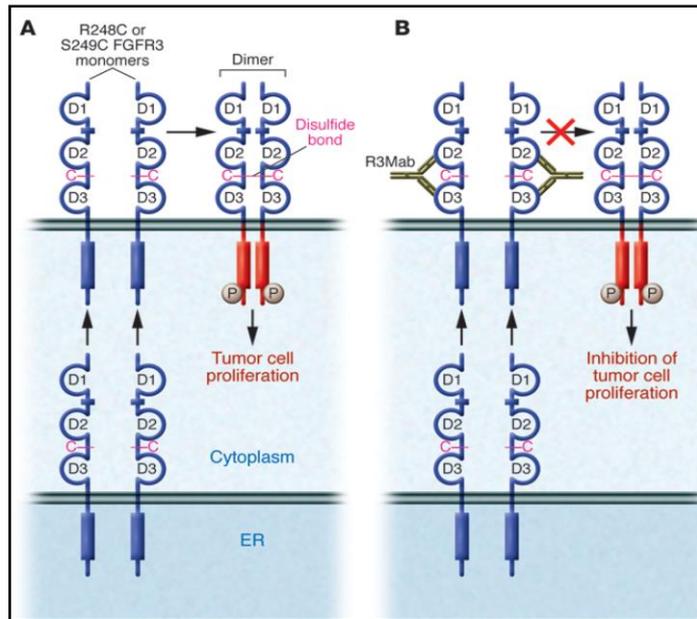
Le NVP-BGJ398 est aussi appelé composé 1h. Cette molécule présente l'avantage d'inhiber de manière spécifique les récepteurs FGFR1, 2 et 3 (IC50 de l'ordre de 1nM et 5nM pour FGFR3 K560E), en comparaison à d'autres protéines kinases (IC50 supérieure à 10 µM). L'utilisation de cet inhibiteur sur une xénogreffe chez la souris de la lignée RT112 qui exprime à la fois le récepteur sauvage et la protéine FGFR3-TACC3 a permis de montrer que cet inhibiteur pouvait être un nouvel agent thérapeutique (Guagnano et al., 2011). Cet inhibiteur permettrait donc de traiter les tumeurs arborant la protéine de fusion FGFR3-TACC3.

Par la suite, la prédiction de la réponse à cette drogue dans un large panel de lignées cellulaires de différentes tumeurs humaines présentant des altérations de FGFR1, 2 et 3 mais aussi de nombreux autres gènes dérégulés dans les cancers a été réalisée (Guagnano et al., 2012). Cette étude semble montrer que cet inhibiteur pourrait être utilisé en clinique pour un ciblage spécifique des tumeurs arborant des altérations d'un FGF récepteur, et notamment les récepteurs FGFR1 et 2.

Cependant les FGF sont impliqués dans l'homéostasie des voies du phosphate et de la vitamine D. Le développement préclinique de ces inhibiteurs anti-FGFR est compliqué par une hyperphosphatémie conduisant à la calcification des tissus, au blocage du relargage du FGF23 par l'os qui ne peut plus agir dans le rein ( Brooks et al., 2012; Brown et al., 2005).

### 5.3.2 INHIBITION DE L'ACTIVITE DE FGFR3 PAR UN ANTICORPS : LE R3MAB

L'anticorps R3mAb a été développé pour cibler le récepteur FGFR3 dans les tumeurs de vessie et les myélomes multiples. Cet anticorps cible à la fois le récepteur FGFR3 muté mais aussi le récepteur FGFR3 sauvage, en empêchant sa dimérisation. Cet anticorps cible les domaines D2 et D3 extracellulaire du récepteur FGFR3, domaines sur lesquels se fixe le FGF ligand et l'héparine pour induire la dimérisation et l'activation du récepteur. Dans le cas où le récepteur présente une mutation d'un acide aminé en cystéine par exemple, l'anticorps R3 mAb permet d'inhiber la formation du pont disulfure entre deux monomères du récepteur FGFR3 présentant les mutations R248C ou S249C (Qing et al., 2009). Le récepteur FGFR3 est présent sous forme monomérique lorsqu'il se trouve dans le Réticulum Endoplasmique (RE) ou dans d'autres compartiments cellulaires. La dimérisation et la formation du pont disulfure entre les deux cystéines, entre les domaines D2 et D3 a lieu lorsque le récepteur se trouve à la membrane plasmique. La dimérisation due à la formation du pont disulfure permet une activation constitutive du récepteur, et de ces voies de signalisation (figure 58), (Hadari et Schlessinger., 2009). De manière intéressante Qing et al, ont montré que l'utilisation de cet anticorps sur la lignée cellulaire RT112 avait un impact significatif sur la prolifération cellulaire, or le récepteur FGFR3-TACC3 n'avait pas encore été identifié, l'effet observé étant donc imputé à une inhibition de la dimérisation et de l'activation du récepteur FGFR3 sauvage. Il est donc possible que cet anticorps dans la lignée cellulaire RT112 ait un impact à la fois sur l'activation du récepteur sauvage et du récepteur FGFR3-TACC3.



**FIGURE 58 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'INHIBITION DE L'ACTIVITE ONCOGENIQUE DU RECEPTEUR FGFR3 MUTE (FORMATION D'UN PONT DISULFURE) AVEC L'ANTICORPS R3MAB. (HADARI ET SCHLESSINGER., 2009)**

*L'anticorps R3mAb se lie aux domaines extracellulaires D2 et D3 bloquant ainsi la dimérisation du récepteur FGFR3 et empêchant ainsi son activation.*

# OBJECTIFS

L'objectif de l'équipe Oncologie Moléculaire est d'identifier et caractériser de nouveaux gènes impliqués dans la progression tumorale des carcinomes, en se focalisant plus particulièrement sur les carcinomes vésicaux, les carcinomes mammaires, et le rétinoblastome. Pour cela deux approches sont utilisées. Une approche gènes candidats ou famille de gènes comme potentiellement impliqués dans la progression tumorale, comme les récepteurs à activité tyrosine kinase, et une approche globale qui tire parti des données de la biologie à grande échelle (données du transcriptomique, données de méthylation, identifications des altérations présentes dans les tumeurs, spectrométrie de masse).

Notre équipe a été la première à identifier des mutations activatrices du récepteur FGFR3 dans 50% des carcinomes de vessie (Cappellen et al., 1999 ; Billerey et al., 2001) puis dans 40 % des verrues séborrhéiques (tumeur bénigne très fréquente de la peau) (Logié et al., 2005). Elle a également été la première à démontrer les propriétés oncogéniques du récepteur FGFR3 activé par mutation dans une lignée cellulaire humaine dérivée d'un carcinome de vessie (Bernard-Pierrot et al. 2006). Récemment notre équipe a montré que le récepteur EGFR constitue une cible thérapeutique pour le sous-groupe basal-like de tumeurs de vessie ayant envahi le muscle (Rebouissou et al., 2014).

De plus, dans les carcinomes vésicaux, le récepteur FGFR3 est très fréquemment muté. Récemment les protéines de fusion FGFR3-TACC3 et FGFR3-BAIAP2L1 ont été observées dans les tumeurs de vessie (TCGA, 2014; Williams et al., 2013). Les propriétés oncogéniques du récepteur altéré (mutation ou protéine de fusion) ont été mises en évidence, cependant les voies de signalisation qui lui sont associées sont actuellement très peu caractérisées. Cette thèse avait donc pour principal objectif d'identifier les voies de signalisation du récepteur FGFR3 altéré (muté ou FGFR3-TACC3) dans les carcinomes vésicaux, afin d'expliquer les propriétés oncogéniques du récepteur FGFR3. L'identification de nouveaux partenaires protéiques de FGFR3 indispensables à la progression tumorale, à travers la compréhension des mécanismes cellulaires mis en place par le récepteur altéré, permettrait de plus d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Afin d'identifier ces voies de signalisation, deux approches seront mises en place : une première approche visant à caractériser les cascades de phosphorylation activées par le récepteur FGFR3 altéré et une seconde approche visant à caractériser le réseau d'interaction (interactome) de FGFR3. Pour chacune de ces deux approches, nous pourrions tirer parti de résultats préalablement obtenus au laboratoire.

- **Etude des cascades de phosphorylation activées par le récepteur FGFR3 altéré** : Cette approche a pour but d'identifier les voies de signalisation activées par le récepteur FGFR3 altéré à travers l'étude de la phosphorylation de certaines protéines clés impliquées dans ces voies de signalisation. Nous avons pu tirer parti dans un premier temps d'une étude réalisée au laboratoire dont le but était d'étudier l'activation de voies de signalisation p38/ERK/AKT/STAT par le récepteur FGFR3 muté. La phosphorylation de ces protéines a été étudiée par western blotting dans le modèle cellulaire fibroblastique NIH3T3 exprimant le récepteur FGFR3 muté ou sauvage et stimulé ou non avec le ligand FGF1. Dans cette étude, les protéines p38 et AKT ressortent comme spécifiquement activées par le récepteur FGFR3 muté. Les résultats observés dans cette étude pourront donc servir de base à l'étude des voies de signalisation activées par le récepteur FGFR3 altéré (muté ou FGFR3-TACC3) dans un modèle épithélial de lignées cellulaires dérivées de tumeurs de vessie exprimant de manière endogène le récepteur FGFR3.
- **Etude de l'interactome de FGFR3** : Cette approche devait permettre à travers la construction du réseau de FGFR3 d'avoir une vue à plus large échelle du réseau de signalisation de FGFR3 qu'avec la première approche. Pour cela l'étude menée au cours de cette thèse a tiré parti des résultats obtenus dans étude précédemment réalisée au laboratoire dont le but était de caractériser les voies de signalisation du récepteur FGFR3 muté et FGFR3 sauvage dans un modèle épithélial de lignée dérivée de tumeur de vessie. Cette étude avait permis d'obtenir une première liste de 110 partenaires protéiques du récepteur FGFR3. Nous avons construit le réseau d'interaction de FGFR3 à partir de cette liste et des bases de données d'interactions protéiques dans le but d'identifier les voies de signalisation de FGFR3 pouvant expliquer les propriétés oncogéniques du récepteur.

# RESULTATS

# CHAPITRE I : ÉTUDE DES VOIES DE SIGNALISATION DU RECEPTEUR FGFR3 MUTE ET DE LA PROTEINE DE FUSION FGFR3-TACC3 DANS LES CARCINOMES DE VESSIE

## 1.1 INTRODUCTION

Les récepteurs FGFR sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires, notamment la prolifération, la survie, la migration et l'apoptose (voir introduction chapitre III). Le récepteur FGFR3 est retrouvé activé dans différentes tumeurs et dans les verrues séborrhéiques (tumeurs bénignes de la peau). Cette activation est due dans la plupart des cas à des mutations activatrices, et plus rarement à des translocations aboutissant à l'expression de protéines de fusion telles que FGFR3-TACC3 et FGFR3-BAIP2L1. Les altérations génétiques de FGFR3 sont un évènement majeur au cours de la carcinogénèse vésicale, le récepteur étant altéré dans 65% des tumeurs n'envahissant pas le muscle et 15-20% des tumeurs envahissant le muscle. Les altérations sont très majoritairement des mutations activatrices mais les protéines de fusion FGFR3-TACC3 et FGFR3-BAIP2L1 ont également été récemment décrites dans respectivement 10% et 1% des tumeurs invasives. Les propriétés oncogéniques du récepteur FGFR3 altéré (muté ou protéine de fusion) ont été clairement mise en évidences *in vitro* et *in vivo* mais les voies de signalisation associées au récepteur altéré sont actuellement peu caractérisées. L'étude menée au cours de cette thèse avait donc pour objectif de mieux caractériser ces voies de signalisation dans les carcinomes de vessie.

Nous avons, dans un premier temps, tiré parti des cellules NIH-3T3 transformées suite à l'expression de FGFR3 muté (S249C) et des cellules NIH-3T3 non transformées exprimant le récepteur FGFR3 sauvage que nous avons précédemment développées (Bernard-Pierrot 2006). Nous avons cherché à identifier des voies de signalisation activées spécifiquement par le récepteur muté qui permettraient d'expliquer les différences d'activité transformante observées avec les deux types de récepteurs (muté et sauvage). Les cellules exprimant le récepteur (muté ou sauvage) ont été stimulées ou non avec le ligand FGF1, puis la phosphorylation des protéines p38, AKT et ERK dans ces différentes conditions a été étudiée. Ces voies de signalisation sont classiquement activées par les récepteurs à activité tyrosine kinase et en particulier par les récepteurs FGF (voir introduction chapitre III). Le récepteur FGFR3 muté (S249C) active, indépendamment d'une stimulation par FGF1, les protéines p38 et AKT tandis que le récepteur FGFR3 sauvage active AKT uniquement lorsqu'il est stimulé par son ligand FGF1 et n'active ERK dans aucune des conditions testées. Nous avons ensuite montré que l'inhibition de p38 et AKT inhibe la croissance en agar mou des cellules NIH3T3 exprimant le récepteur FGFR3 muté,

suggérant que l'activation des protéines p38 et AKT est critique pour la transformation des cellules fibroblastiques NIH3T3, induite par le récepteur FGFR3 muté.

Nous avons ensuite cherché à savoir si ces deux voies de signalisation étaient également impliquées dans la croissance et la transformation cellulaire de cellules épithéliales de vessie induites par le récepteur FGFR3 muté ou transloqué. L'activation des protéines p38 et AKT a donc été étudiée dans deux lignées cellulaires dérivées de tumeurs de vessie exprimant de manière endogène le récepteur FGFR3 constitutivement activé : les lignées RT112 et MGH-U3 qui expriment respectivement le récepteur FGFR3-TACC3 et le récepteur FGFR3 muté (Y375C). Les protéines p38 et AKT sont activées par FGFR3 dans ces deux modèles cellulaires et leur inhibition ou leur déplétion à l'aide de siRNA dans le cas de P38 $\alpha$  (MAPK14) est critique pour la prolifération cellulaire et la formation de colonies en agar mou. Nous avons ensuite cherché à comprendre par quels mécanismes l'activation de ces deux voies aboutissait à la prolifération et à la transformation des cellules urothéliales. Nous avons identifié grâce à l'utilisation de puces à ADN, les gènes régulés par FGFR3 lorsque celui-ci est exprimé dans le modèle fibroblastique NIH3T3 ou lorsqu'il est déplété (SiRNA) dans le modèle cellulaire MGH-U3. L'analyse de ces gènes à l'aide du logiciel GATHER (Gene Annotation Tool to Help Explain Relationship) et des données de la base de donnée TRANSFAC a permis de mettre en évidence un enrichissement en gènes cibles des facteurs de transcription MAX/MYC dans les deux cas (expression de FGFR3 dans les NIH3T3 ou déplétion dans les MGH-U3) suggérant une activation de MYC par FGFR3. De manière intéressante, l'expression de l'ARNm de MYC est régulée par FGFR3 suggérant que FGFR3 induit une up-regulation de MYC conduisant à une augmentation de l'expression de ces gènes cibles, ce qui pourrait expliquer les propriétés oncogéniques de FGFR3. Nous nous sommes donc focalisés sur l'étude de la régulation de MYC par les protéines p38 et AKT, afin de déterminer si ces deux voies de signalisation pouvaient être impliquées. La protéine p38 peut être impliquée dans la régulation de certains ARNm en coopérant avec la protéine HuR (impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle des ARNm), (Dean, Sully, Clark, & Saklatvala, 2004; Lafarga et al., 2009; J. Wang et al., 2013). La protéine AKT peut stabiliser la protéine MYC en inhibant la protéine GSK3 $\beta$  (AKT phosphoryle GSK3 $\beta$  sur la sérine 9), empêchant ainsi la dégradation de MYC par le protéasome (Domínguez-Cáceres et al., 2004). La protéine p38 pourrait donc être impliquée dans la régulation de l'ARNm de MYC, tandis qu'AKT serait impliquée dans la stabilisation protéique de MYC. L'étude de la régulation de l'ARNm de MYC a donc été étudiée dans un premier temps.

Dans les lignées cellulaires RT112 et MGH-U3 la déplétion de FGFR3 ou de p38 induit une perte de l'ARNm de MYC validant l'implication de p38 dans la régulation du niveau d'ARNm

de MYC. Le rôle de la protéine HuR dans cette régulation du niveau de l'ARNm de MYC a ensuite été étudié. Nous avons montré que la déplétion de HuR par SiRNA conduisait à une diminution du niveau de l'ARNm de MYC ainsi que de la protéine. L'implication de HuR a été confortée par l'étude de sa localisation subcellulaire après la déplétion ou de l'inhibition de FGFR3 ou de p38 dans la lignée cellulaire RT112. Dans les cellules non traitées HuR est majoritairement localisé dans le noyau, mais est aussi observé dans le cytoplasme. Après inhibition de FGFR3 ou de p38, HuR est très majoritairement localisé dans le cytoplasme et presque plus dans le noyau, suggérant que FGFR3 et p38 sont impliqués dans le shuttle nucléo-cytoplasmique de HuR à l'origine de la stabilisation des ARNm par HuR. La déplétion de FGFR3 et P38 ayant un impact négatif sur la régulation de l'ARNm de MYC, la conséquence sur l'expression de la protéine MYC a également été étudié. De manière intéressante, la déplétion de FGFR3 (SiRNA) conduit à une perte totale de la protéine MYC alors qu'une perte de 50-60% de l'ARNm avait été observée suggérant une régulation du niveau de la protéine MYC par FGFR3. Cette régulation ne semble pas être dépendante de P38 puisque sa déplétion induit une diminution de 50% du niveau d'ARNm et de la protéine MYC. Nous avons ensuite évalué le rôle de l'activation de la voie de signalisation AKT/GSK3 $\beta$  dans ce processus de régulation de protéine MYC par FGFR3. Nous avons tout d'abord montré que la régulation de la protéine MYC par FGFR3 est due à une protection contre la dégradation par le protéasome. En effet, nous avons montré que l'inhibition de FGFR3 seule conduisait à une perte totale de la protéine MYC, tandis que l'inhibition de FGFR3 couplée à l'inhibition du protéasome n'avait aucun impact sur la stabilité de la protéine MYC. L'impact de l'inhibition de FGFR3 sur la phosphorylation d'AKT et de la protéine GSK3 $\beta$  (ser9) a ensuite été étudié. L'inhibition de FGFR3 conduit à une perte totale de la phosphorylation d'AKT et de la phosphorylation de GSK3 $\beta$  (qui n'est dès lors plus inhibée), et à une perte totale de MYC. De plus, l'inhibition d'AKT induit bien une perte de phospho-GSK3 $\beta$  (ser9) et de MYC, tandis que l'inhibition de p38 n'a aucun impact sur la phosphorylation d'AKT, de GSK3 $\beta$  (ser9), et sur la protéine MYC. De manière intéressante, l'inhibition d'AKT n'a pas d'impact sur la localisation de HuR, mais induit une boucle de rétro-contrôle aboutissant à l'augmentation de la phosphorylation de p38 et de la quantité d'ARNm de MYC, montrant ainsi que p38 est impliqué dans la régulation de l'ARNm de MYC tandis qu'AKT est impliqué dans la stabilisation de la protéine MYC. De manière surprenante, les analyses pas western-blot ont montré que la déplétion par siRNA de P38, AKT ou MYC ainsi que l'inhibition de FGFR3 induisait une perte d'expression de la protéine FGFR3 suggérant l'existence d'une boucle de rétrocontrôle positive FGFR3/MYC. L'ensemble de ces données a donc permis de montrer que FGFR3 induit une augmentation de l'ARNm de MYC, via l'activation de P38 et le recrutement de HuR, protéine impliquée

dans la stabilisation des ARNm, ainsi qu'une stabilisation de la protéine MYC, via l'activation d'AKT et l'inhibition de GSK3 $\beta$  limitant la dégradation de la protéine MYC par le protéasome. Cette augmentation de l'expression de MYC induit l'expression de ces gènes cible ainsi que celle de FGFR3 et promeut la prolifération et la transformation cellulaire.

Enfin, pour déterminer si cette boucle mise en évidence dans des lignées cellulaire dérivée de tumeurs de vessie pouvait exister dans les tumeurs de vessie, nous avons étudié la phosphorylation de p38 et AKT par RPPA (Reverse Protein Phase Assay) en fonction du statut mutationnel de FGFR3, dans les tumeurs de vessie n'envahissant pas le muscle (NMIB) et dans les tumeurs infiltrant le muscle (MIBC). P38 est significativement plus fortement phosphorylée dans les tumeurs NMIBC et MIBC arborant le récepteur FGFR3 muté, tandis que la phosphorylation d'AKT est la même dans les tumeurs NMIBC et MIBC et est indépendante du statut mutationnel de FGFR3.

(Article en préparation)

**A FGFR3/MYC positive feedback loop relies on P38 and AKT activation and contributes to transformation of bladder cancer cells expressing mutated FGFR3 or FGFR3-TACC3.**

Mélanie Mahe<sup>1,2</sup>, Hélène Neyret-Khan<sup>1,2</sup>, Remy Nicolle<sup>1,2</sup>, Marion Dorland-Galliot<sup>1,2</sup>, Claude C. Abbou<sup>3,4,5</sup>, Agnès Laplanche<sup>6</sup>, Simone Benhamou<sup>6</sup>, Thierry Le Bret<sup>7,8</sup>, Yves Allory<sup>3,4,9</sup>, Celio Pouponnot, François Radvanyi<sup>1,2</sup>, and Isabelle Bernard-Pierrot<sup>1,2,#</sup>

**A FGFR3/MYC positive feedback loop relies on P38 and AKT activation and contributes to transformation of bladder cancer cells expressing mutated FGFR3 or FGFR3-TACC3.**

Mélanie Mahe<sup>1,2</sup>, Hélène Neyret-Khan<sup>1,2</sup>, Remy Nicolle<sup>1,2</sup>, Marion Dorland-Galliot<sup>1,2</sup>, Claude C. Abbou<sup>3,4,5</sup>, Agnès Laplanche<sup>6</sup>, Simone Benhamou<sup>6</sup>, Thierry Lebret<sup>7,8</sup>, Yves Allory<sup>3,4,9</sup>, Celio Pouponnot, François Radvanyi<sup>1,2</sup>, and Isabelle Bernard-Pierrot<sup>1,2,#</sup>

<sup>1</sup>CNRS, UMR 144, Institut Curie, 75248 cedex 05, Paris, France

<sup>2</sup>Institut Curie, Centre de Recherche, 75248 cedex 05, Paris, France

<sup>3</sup>Current address:

<sup>3</sup>INSERM U841, <sup>4</sup>Université Paris 12, Faculté de Médecine, <sup>5</sup>AP-HP Groupe Henri Mondor-Albert Chenevier, Service d'urologie.

<sup>6</sup>CNRS FRE 2939, Génomes et Cancers, Institut Gustave Roussy, 94800 Villejuif, France

<sup>7</sup>Hôpital Foch, Service d'urologie, 92150 Suresnes, France

<sup>8</sup>Faculté de médecine Paris-Ile-de-France-Ouest, UVSQ, France

<sup>9</sup>AP-HP Groupe Henri Mondor-Albert Chenevier, Département de Pathologie 94000 Créteil, France

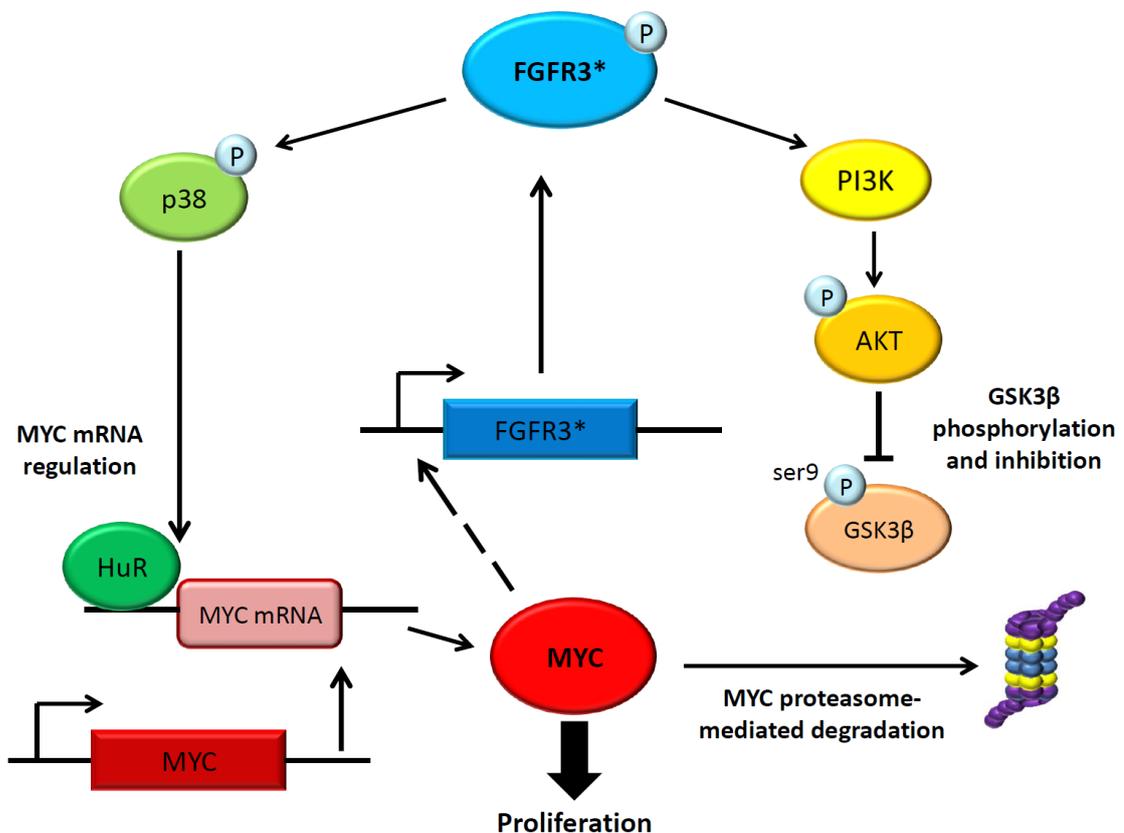
**Running title:** critical role of P38 and AKT in bladder cancer harboring FGFR3 alteration

**Abbreviations:** fibroblast growth factor receptor (FGFR), fibroblast growth factor (FGF), newborn calf serum (NCS), fetal calf serum (SVF), phosphotyrosine (PY), reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

## ABSTRACT

FGFR3 is frequently activated, sometimes through creation of a fusion-gene but mostly through mutations, in bladder carcinomas where it is necessary for urothelial cell proliferation. Signaling pathways activated by altered-receptor in bladder tumors remain poorly characterized. Here we described a novel positive feedback loop whereby FGFR3 induces MYC up-regulation which in turn induces the transcription of FGFR3 and promotes cell growth. FGFR3 activates P38 that stabilizes MYC mRNA by recruiting Human antigen R protein (HuR) in the nucleus and AKT that stabilizes MYC protein through Glycogen synthase kinase 3 (GSK3 $\beta$ ) inhibition which prevents proteasome-mediated degradation of MYC. Importantly, AKT and P38 are phosphorylated in human bladder tumors harboring FGFR3 mutations and could be potential therapeutic target to disrupt this oncogenic loop.

## Graphical Abstract:



## Introduction

FGFR3 belongs to a family of structurally related tyrosine kinase receptors (FGFR1-4). These receptors regulate various physiological processes, including proliferation, differentiation, migration and apoptosis. The FGFR family (FGFR1-4) has received a strong interest as these receptors are frequently involved by various mechanisms in genetic disorders and cancer and they are potential therapeutic targets (Haugsten et al., 2010a; Itoh & Ornitz, 2004; Knights & Cook, 2010; Turner et al., 2010). *FGFR3* is frequently activated by somatic mutations in bladder carcinomas (about 50 % of cases) (Billerey et al., 2001; Cappellen, 1999), in benign epidermal tumors, such as seborrheic keratosis (40% to 85% of cases) (Hafner et al., 2006; Logié, et al., 2005) and epidermal nevi (Hafner et al., 2006; Hernández et al., 2007) and much more rarely in cervix cancer (R. Wu et al., 2000), multiple myeloma (Onwuazor et al., 2003) and lung squamous carcinomas (Majewski et al., 2013). Involvement of *FGFR3* in gene fusions with different partners (*FGFR3-TACC3* or *FGFR3-BAIAP2L1*) have also been reported in bladder cancer (about 10 % of the cases) (TCGA, 2014; Williams et al., 2013) and more rarely in glioblastomas, IDH wild type gliomas, lung carcinomas, head and neck squamous cell carcinomas and nasopharyngeal carcinomas (Majewski et al., 2013; Nakanishi et al., 2015; Singh et al., 2013; Y. Wu et al., 2013b; Yuan et al., 2014). These genetic evidences of the involvement of altered FGFR3 in bladder cancer have further been supported by functional studies. Indeed, FGFR3 fusion proteins display *in vitro* oncogenic activity when introduced in NIH-3T3 cells (FGFR3-TACC3 and FGFR3-BAIAP2L1) (Williams et al., 2013) or in Rat2 cells (FGFR3-BAIAP2L1), (Nakanishi et al., 2015) and *in vivo* pharmacologic inhibition of FGFR3 inhibits growth of xenografts of two bladder derived cell lines harboring these FGFR3 fusion proteins (Y. Wu et al., 2013b). Furthermore, mutated-FGFR3 expression induces the proliferation and transformation of NIH-3T3 cells *in vitro* whereas the *in vitro* inhibition of mutated FGFR3 blocks the proliferation and transformation of bladder tumor-derived cell lines (Bernard-Pierrot et al., 2006; D C Tomlinson et al., 2007). The same activating mutations of FGFR3 identified in somatic tumor tissues have also been identified in the germline. These germline mutations have multiple consequences but, surprisingly, the main clinical feature is an inhibition of bone growth, leading to various forms of chondrodysplasia (Ornitz, 2005).The

transduction pathways mediating the inhibitory effects of activated FGFR3 on bone growth are relatively well characterized and this effects are mediated partly by p38 activation (Raucci et al., 2004). By contrast, the signaling pathways associated with the tumorigenic properties of mutated-FGFR3 and FGFR3 fusion proteins remain largely unknown in particular in the context of bladder cancer. In this study, we therefore aimed to characterize altered-FGFR3 signaling pathways involved in bladder cancer cell growth/transformation. We pointed out P38 and AKT as two signaling pathways activated by FGFR3-S249C and involved in FGFR3-S249C induced NIH-3T3 cells transformation. We further focused on these two signaling pathways and demonstrated that they were also activated by FGFR3-Y375C and FGFR3-TACC3 in MGH-U3 and RT112 bladder tumor derived cell lines respectively. Both pathways were critical for FGFR3-induced bladder cancer cell proliferation and transformation. They induced MYC up-regulation that contributed to FGFR3 oncogenic activity and promote in turn FGFR3 expression. p38 activation through recruitment of HuR lead to MYC mRNA up-regulation/stabilization whereas AKT activation prevented MYC proteosomal degradation through phosphorylation and inhibition of GSK3 $\beta$  (ser 9). We finally showed, studying 129 human bladder tumors, that p38 phosphorylation was increased in tumors expressing mutated-FGFR3 and that AKT was phosphorylated in all tumors suggesting that as FGFR3 inhibitors, P38 and AKT inhibitors could be used as treatment to disrupt this FGFR3/MYC oncogenic loop in bladder tumors harboring FGFR3 alterations.

## **Results**

### **FGFR3-S249C-induced NIH-3T3 cell transformation is p38 MAP Kinase and AKT activation-dependent.**

To better understand pathways related to mutated-FGFR3 oncogenic activity, we first took advantage of transformed-NIH-3T3 cells expressing FGFR3-S249 and non- transformed NIH-3T3 cells expressing wild-type FGFR3 that we previously developed (Bernard-Pierrot et al., 2006). We analyzed by western-blot and compared activation of some candidate pathways known to be activated by tyrosine kinase receptors and in particular FGFRs (P38, AKT, ERK1/2 (Maher, 1999; Powers, McLeskey, & Wellstein, 2000) in NIH-3T3 cells expressing FGFR3-S249C (S249C1.1 and S249C1.2), in FGF1-stimulated clones expressing the wild-type receptor (R3b1.1 and R3b1.3) and in control cells (Neo1.5 and Neo2.1) (Fig. 1A).

Both clones expressing FGFR3-S249C (S249C1.1 and S249C1.2) and FGF1-stimulated clones expressing the wild-type receptor (R3b1.1 and R3b1.3) were able to phosphorylate AKT and ERK1/2 (p42/p44) but strong phosphorylation of p38 was observed only in clones expressing the mutant receptor (Fig. 1A) suggesting a critical role of this pathway in FGFR3-induced cell transformation. Inhibition of P38 phosphorylation in FGFR3-S249C expressing cells by a FGFR tyrosine kinase inhibitor (SU5402) confirmed that p38 activation did directly depend on FGFR3-S249C activation (Fig. 1B).

To assess the functional significance of FGFR3-S249C-induced p38, AKT and ERK1/2 phosphorylation in cell transformation, we evaluated the effect of one of their respective inhibitor (SB203580 for P38, PD98059 for ERK1/2 and LY294002 for PI3kinase) on anchorage-independent growth of FGFR3-S249C expressing NIH-3T3 cells (clone S249C1.2). Inhibition of both PI3 kinase (AKT pathway) and P38 MAP kinase inhibited significantly their ability to form colonies on soft agar as well as FGFR inhibitor (SU5402) whereas ERK1/2 inhibition had only limited effect (Fig. 1C). Taken together these results highlighted the critical role of both PI3 Kinase and P38 MAP kinase pathway in FGFR3-S249C induced cell transformation in NIH-3T3 cells.

### **Both P38 MAP Kinase and AKT activation are critical for constitutively-activated FGFR3 to induce human epithelial bladder tumor cells proliferation and transformation.**

We then further investigated whether this critical role of p38 and AKT phosphorylation in mutated-FGFR3 -induced cell transformation was also relevant in epithelial bladder cancer cells. We made use of MGH-U3 and RT112 cell lines, which were derived from a human bladder tumor and endogenously expressed respectively a mutated activated form of FGFR3 (FGFR3-Y375C) and FGFR3-TACC3 fusion protein, the growth and transformation of these cell lines being dependent on activated-FGFR3 activity (Bernard-Pierrot et al., 2006; Gómez-román et al., 2005; Qing et al., 2009; Y. Wu et al., 2013b). Immunoblotting analysis (Fig. 2A) showed in both cell lines a constitutive p38 and AKT phosphorylation, dependent on mutated FGFR3 expression. Indeed, p38 and AKT phosphorylation was abolished by the decrease of FGFR3 expression observed following treatment with siRNA targeting FGFR3, a similar effect being obtained with two different

siRNAs in each cell lines (Fig.2A). Since FGFR3 is constitutively expressed and activated in MGH-U3 (mutated FGFR3) and RT112 (FGFR3-TACC3 fusion protein) cells, p38 and AKT activation by FGFR3 could be direct or an indirect effect of FGFR3 expression in these cells. Interestingly, regarding P38 activation by FGFR3 which was striking, we further demonstrated that p38 was co-immuno-precipitated together with FGFR3 in these two cell lines (Supplementary Fig.1A) and that this interaction between FGFR3 and p38 required FGFR3 phosphorylation since it was inhibited by PD173074, a FGFR inhibitor (Supplementary Fig.1B). Taken together those results clearly demonstrated that activated-FGFR3 directly induced p38 and AKT activation in bladder tumor cells. We then demonstrated that these FGFR3-induced p38 and AKT activations were required for cell growth and transformation. Indeed, inhibition of p38 or PI3 Kinase, using respectively SB203580 and LY294002 kinase inhibitors, decreased MGH-U3 and RT112 cell viability as efficiently as FGFR3 inhibition using PD173074 (Fig. 2B). Role of P38 in FGFR3-induced cell growth was further confirmed using two siRNA targeting p38 $\alpha$  isoform (MAPK14) (Figure 2C, left panel). MAPK14 is the mostly express isoform in MGH-U3 and RT112 as assessed by Affymetrix U133 plus 2.0 DNA chip data analysis (data not shown) and confirmed by the decrease by 90% of P38 expression following P38 $\alpha$  SiRNA transfection (Fig.2C, right panel). Furthermore, inhibition of p38 or PI3K, or p38 $\alpha$  siRNAs inhibited the colony formation on soft agar of MGH-U3 cells (as efficiently as PD173074 or FGFR3 (siRNA)) (Fig.2D). Hence, our data clearly pointed out the critical role of P38 and AKT in FGFR3-induced bladder cancer cell growth and transformation.

### **Up-regulation of MYC by FGFR3 promotes bladder cancer cell growth.**

To further decipher molecular mechanisms by which activated-FGFR3 contributes to bladder cancer cells growth and transformation and try to understand role of P38 and AKT in this process, we analyzed genes regulated by FGFR3 expression. Gene expression pattern in MGH-U3 cells treated or not with three different FGFR3 siRNAs were analyzed using Affymetrix U133 2.0 DNA array. 1506 significantly differentially expressed genes after FGFR3 depletion were identified (see methods) (Supplementary table 1). 583 genes regulated by FGFR3 expression in NIH-3T3 cells were also identified comparing gene expression pattern of two control clones

(neo1.5 and neo2.1) and two FGFR3-S249C-expressing clones (S249C1.1 and S249C1.2) using U74Av2 Affymetrix DNA microarrays (see methods) (supplementary table 2). Analysis of these two lists of FGFR3-regulated genes using GATHER software (Gene Annotation Tool to Help Explains Relationships) (<http://gather.genome.duke.edu/>) and TRANSFAC data base revealed in both cases enrichment for E2F and MYC/MAX target genes. Furthermore, FGFR3 knock-down in MGH-U3 cells induced MYC mRNA down-regulation (supplementary Table 1 and Fig.3A) whereas FGFR3 expression induced MYC mRNA up-regulation in NIH-3T3 cells (supplementary Table 2). Real time RT-QPCR analysis confirmed that FGFR3 siRNA reduced MYC mRNA expression level by approximately 40% and 70% in MGH-U3 and RT112 cells respectively (Fig.3A). We further showed that FGFR3 siRNAs reduced dramatically (by 95%) MYC protein expression level as MYC siRNA in both MGH-U3 and RT112 cells (Fig.3B). Taken together those results suggested that FGFR3 leads to both MYC mRNA up-regulation and MYC protein stabilization that induces MYC target genes expression that could account for its oncogenic properties. We next validated using MYC siRNA that MYC down-regulation contributes to MGH-U3 cell growth inhibition induced by FGFR3 siRNA. Both MYC and FGFR3 siRNAs reduced by 50% cell viability and no additional or synergistic effect between FGFR3 and MYC siRNAs was observed (Fig.3C).

Because we observed down-regulation (mRNA and protein) after FGFR3 knock-down and that p38 and AKT, that we showed being activated by FGFR3, could respectively induced MYC mRNA stabilization or transcriptional up-regulation (S. Chen et al., 2005; Frank & Miranti, 2013) and MYC protein stabilization (Tsai et al., 2012), we investigated their involvement in these processes in MGH-U3 and RT112 cells.

### **FGFR3-induced increase of MYC mRNA level is P38-dependent and involves HuR.**

We first demonstrated that P38 depletion, as FGFR3 depletion, decreased by approximately 40% and 60% MYC mRNA level in MGH-U3 and RT112 cells respectively (Fig.3A). However, in case of P38 depletion, decrease of MYC protein level was more correlated with that of MYC mRNA expression suggesting that P38 was only involved in MYC mRNA level regulation and not in MYC protein stabilization (Fig.3B).

This FGFR3-induced and P38-dependent increase of MYC mRNA level could be due to a transcriptional regulation but also to a post-transcriptional regulation of MYC mRNA level by P38. Indeed, MYC mRNA contains A+U-rich Elements (ARE) in its 3'-untranslated region (UTR), (C. Y. Chen & Shyu, 1995) that can interact with ARE-binding proteins called AU-BPs such as HuR or AUF1 that can either stabilize mRNA or favor mRNA degradation (Lafon et al., 1998; Weidensdorfer et al., 2009). Furthermore, P38 is known to be involved in mRNA stabilization by phosphorylating AU-BPs (Frank & Miranti, 2013; Knapinska et al., 2011) and in particular HuR (Dean et al., 2004; Lafarga et al., 2009). So, we then examined involvement of HuR in FGFR3-driven increase of MYC mRNA. In RT112 cells, HuR depletion with two different siRNAs decreased by approximately 30-40% both MYC mRNA level (Fig. 4A) and MYC protein level (Fig. 4B). Same ranges of decreased were observed after p38 depletion (Fig. 3A and Fig.3B) suggesting that P38-induced up-regulation of MYC mRNA could be, at least partially, mediated by HuR that would stabilize MYC mRNA. Involvement of HuR in this FGFR3/P38-induced regulation of MYC mRNA level was reinforced by studying its subcellular localization. Indeed, HuR shuttles from nucleus to cytoplasm and its role in mRNA stabilization has been related to its subcellular localization (Fan & Steitz, 1998; Jun Wang et al., 2013). Immuno-labeling anti-HuR in RT112 cells showed that HuR subcellular localization was affected by both FGFR3 and P38 depletion using siRNA or inhibition using kinase inhibitor (SB203580 for P38, PD174004 for FGFR) (Fig. 4C). In control cells, HuR was mostly localized in nucleus and also in cytoplasm whereas after FGFR3 or P38 loss of function, HuR was no longer observed in the nucleus suggesting that P38 activation by FGFR3 favors HuR nuclear import (Fig. 4C). As control, we showed that PI3Kinase inhibitor (LY294002) did not alter HuR localization (Supplementary Fig.2A). Taken together, these data suggest that up-regulation of MYC mRNA induced by FGFR3 and dependent of P38 activation is mainly due to a post-transcriptional regulation of MYC mRNA level involving HuR.

### **FGFR3 prevents proteasome-mediated MYC protein degradation through AKT-mediated GSK3 $\beta$ inhibition.**

Interestingly, western-blot analysis showed that FGFR3 siRNAs induced a loss of MYC protein expression in a much more extent than that of MYC mRNA in both

RT112 and MGH-U3 cells (Fig.3A and 3B) suggesting that FGFR3 could, in addition to regulate MYC mRNA level, regulate MYC protein stability. This discrepancy was not observed using P38 $\alpha$  inhibitor suggesting that P38 activation by FGFR3 was not involved in this process (Fig.3A and 3B). Because MYC protein is degraded through proteasome-mediated proteolysis, MGH-U3 and RT112 cells were treated with a FGFR inhibitor (PD173074) alone or in combination with the proteasome inhibitor (MG132) (fig 5A). Western-blot analysis showed that, in both cell line, FGFR3 inhibition decreased MYC protein expression, MG132 up-regulated MYC expression and MG132 totally inhibited MYC down-regulation induced by FGFR3 inhibition (Fig.5A). These data demonstrated that FGFR3 reduces proteasome-mediated MYC protein degradation and therefore stabilizes MYC protein.

Proteasome-mediated MYC protein degradation is induced by MYC phosphorylation at Thr58 that is enhanced by glycogen synthase kinase 3 (GSK3 $\beta$ ) (Kotliarova et al., 2009). GSK3 $\beta$  is inhibited by phosphorylation and in particular by phosphorylation at ser9 by AKT (Domínguez-Cáceres et al., 2004). We therefore examined whether GSK3 $\beta$  phosphorylation at ser9 was modulated through AKT activation by FGFR3 to prevent proteasome-mediated MYC protein degradation. As shown in Figure 5B, FGFR3 inhibition using PD173074 decreased AKT phosphorylation at Ser473, GSK3 $\beta$  phosphorylation at ser9 and MYC protein level in both RT112 and MGH-U3 cells expressing respectively constitutively-activated FGFR3, FGFR3-TACC3 and FGFR3-Y375C. We then investigated involvement AKT in FGFR3-induced regulation of GSK3 $\beta$  phosphorylation. In both RT112 and MGHU-3 cells, PI3-kinase inhibitor (LY294002) down-regulated GSK3 $\beta$  phosphorylation at ser9 and MYC protein level (Fig.5C). Taken together, these data suggest that FGFR3 stabilize MYC protein by up-regulating AKT phosphorylation which in turn up-regulates GSK3 $\beta$  phosphorylation at ser9 which prevents proteosomal-mediated MYC degradation. Interestingly, we also showed that AKT inhibition induced a feedback increased of p38 up-phosphorylation that we demonstrated above to induce MYC RNA stability (Supplementary Fig.2B).

**FGFR3-driven MYC up-regulation induces a feedback up-regulation of FGFR3 expression.**

Surprisingly, our immunoblotting analysis (Fig.3B) showed in RT112 and MGH-3 cells, that in addition to down-regulate MYC expression level, P38 and MYC siRNAs also dramatically decreased FGFR3 expression level suggesting that FGFR3

activation could up-regulate MYC expression level that would in turn increase FGFR3 expression. Decreased expression of FGFR3 observed following transfection with MYC#1 siRNA (Fig.3B) was first further confirmed in RT112 and MGH-U3 cell using MYC#2 siRNA that decreased FGFR3 expression and consecutively P38-phosphorylation (Fig.6A). We then demonstrated that in these both cell lines, FGFR3 inhibition using PD173074 abolished FGFR3 expression (Fig.6B). We further investigated this FGFR3 positive feedback loop in two other bladder cancer derived cell lines expressing constitutively activated FGFR3: UMU14 (FGFR3-S249C) and RT4 (FGFR3-TACC3, longer that FGFR3-TACC3 expressed in RT112) (Williams et al., 2013) (Fig.6B). In both cell lines, FGFR3 inhibition lead to a loss of FGFR3 expression suggesting that FGFR3/MYC positive feedback loop that we highlighted here is relevant whatever FGFR3 alteration is. We demonstrated a critical role of P38 and AKT to maintain this FGFR3/MYC positive feedback loop in bladder tumor derived cell lines expressing constitutively activated-FGFR3. We so finally investigated, studying P38 and AKT phosphorylation, whether this loop could be of relevance in human bladder tumors expressing activated-FGFR3.

### **P38 and AKT are phosphorylated in human bladder tumors presenting mutation of FGFR3.**

Reverse phase protein array (RPPA) analysis of a panel of 57 NMIBC (Non-Invasive Bladder Carcinoma) and 72 MIBC (Muscle Invasive Bladder Carcinoma) showed that p38 was significantly more phosphorylated in NMIBC and MIBC that expressed mutated FGFR3 in comparison to other tumors (Fig.7A) while it was not the case for AKT (Fig.7B). However, AKT was phosphorylated in all FGFR3 mutated tumors (Fig.7B). Taken together, these data suggest that FGFR3/MYC loop relying on P38 and AKT activation by FGFR3 could take place in human bladder tumors with genetic alteration of FGFR3 and that in consequence AKT and P38 could be potential therapeutic target to treat these tumors.

### **Discussion**

Genetic alterations of FGFR3 (mutations or translocation) are one of the most common frequent event in bladder carcinoma affecting approximately 70% of NMIBC and 15% of MIBC. These alterations induce a constitutive activation of FGFR3 and activated-FGFR3 displays oncogenic properties (Bernard-Pierrot et al.,

2006; D C Tomlinson et al., 2007; Williams et al., 2013). In this study, we further characterized mechanisms involved in activated-FGFR3 oncogenic activities. We demonstrated in bladder cancer derived cell lines that mutated FGFR3 (FGFR3-Y375C) and the fusion protein, FGFR3-TACC3, induce an up-regulation of MYC oncoprotein and that MYC induces cell proliferation. We showed that FGFR3-driven MYC up-regulation was due to both an increase of MYC mRNA level and MYC protein stabilization. In one hand, FGFR3 induces MYC protein stabilization by activating AKT that in turn phosphorylates GSK3 $\beta$  at ser9 that prevents MYC protein degradation by proteasome. In the other hand, FGFR3 increases MYC mRNA level by activating P38 $\alpha$  MAP Kinase that regulates nucleo –cytoplasmic shuttle of HuR protein which stabilizes MYC mRNA. We also pointed-out that FGFR3-driven MYC up-regulation promotes in turn FGFR3 expression. Based on these data, we drew out a model for this new FGFR3/MYC positive feedback loop involved in bladder tumor cells proliferation (see graphical abstract). Interestingly, study of P38 and AKT phosphorylation in human bladder tumor samples harboring FGFR3 genomic alterations suggested that this loop identified in tumor derived cell lines could take place in tumors.

We so demonstrated here that FGFR3 activation induces MYC over-expression that in turn induces FGFR3 expression. Such a FGFR3 positive feed-back loop, could explain FGFR3 overexpression that we previously observed in FGFR3-mutated human bladder tumors as compared to non-mutated tumors and normal samples (Bernard-Pierrot et al., 2006). We highlighted molecular mechanisms by which FGFR3-activation lead to MYC up-regulation but we did not explore how MYC over-expression induced FGFR3 expression assessed by western-blot. We did not measured FGFR3 mRNA level following FGFR3 inhibition or MYC depletion but given known activities of MYC, it is tempting to speculate that MYC is involved in FGFR3 mRNA level regulation rather than in FGFR3 protein stabilization. MYC, as a transcription factor, could directly bind FGFR3 promoter. Analysis of MYC Chip-seq data from the project ENCODE did not allow us to point out MYC binding to FGFR3 promoter. However, no bladder cell lines were analyzed within this project and MYC potential binding site exist on FGFR3 promoter so that this hypothesis worth being tested in bladder cancer cells. MYC could also induce a post-transcriptional regulation of FGFR3 mRNA by regulating miRNA. Indeed, FGFR3 mRNA has been

shown to be regulated by mir-99a and mir-100 (Blick et al., 2013; Catto et al., 2010) and MYC has been involved in regulation of miRNA expression and in particular MYC induces down regulation of mir99 and mir100 (Chang et al., 2008). In RT112 cells, we demonstrated that MYC regulates expression of both FGFR3 and FGFR3-TACC3 protein. FGFR3-TACC3 mRNA, lacking FGFR3 3'-untranslated region (3'-UTR) but presenting TACC3 3'UTR, has recently been demonstrated to escape mir-99 regulation in glioblastomas (Parker et al., 2013). Hence, in RT112 cells, it is unlikely that FGFR3 mRNA level is regulated by miR even if we could not rule out regulation by a miRNA that could bind both FGFR3 and TACC3 3'UTR.

We demonstrated in this study that both p38 and AKT activation were critical for FGFR3 to induce bladder cancer cell proliferation and transformation. Their critical role was linked to their ability to induce MYC up-regulation through stabilizing respectively MYC mRNA and MYC protein. The role of AKT for cancer progression (Vivanco & Sawyers, 2002) is well known and established including for bladder cancer (Calderaro et al., 2014; Carneiro et al., 2014) but the role of p38 is controversial. It was initially thought that p38 inhibited tumor progression by inducing cell apoptosis. It is now clearly established that p38 can be activated by tyrosine kinase receptor (PDGF receptor, VEGF receptor, EGF receptor, FGFR1) (Frey, Golovin, & Polk, 2004; He, Ding, & Li, 2003; Maher, 1999; Matsumoto et al., 1999; Rousseau, Houle, Landry, & Huot, 1997) to act also as a positive regulator of tumor progression, mediating motility and invasion, suppressing apoptosis and stimulating the epithelial-to-mesenchymal transition in various cell types (Bates & Mercurio, 2003; Behren et al., 2010; Chatzinikolaou et al., 2010; Elenitoba-Johnson et al., 2003; Frey et al., 2004; Matsumoto et al., 1999; Nishihara, Hwang, Kizaka-Kondoh, Eckmann, & Insel, 2004). A direct involvement of p38 in transformation (the characteristic change in morphology and anchorage-independent growth) has also been reported in several cell lines (He et al., 2003; Tadlock & Patel, 2001; Turkson et al., 1999). This finding that p38 actually favored tumor progression in some cancers was interpreted as reflecting a modification to the cancer cell that diverted p38 function from a negative to a positive effect on tumor progression. In this context, p38 has generally been reported to favor tumor cell mobility and invasion (Wagner & Nebreda, 2009b). We show here that p38 may even upregulate cell proliferation, having positive effects on cell growth by up-regulating MYC mRNA level. Activated FGFR3-induced activation of p38 in bladder tumors may therefore

contribute to malignant behavior and the inhibition of this activation may be of therapeutic value, as reported for pancreatic and breast carcinomas (Dreissigacker et al., 2006). RPPA data showing a significant increase of p38 activation in NMIBC and MIBC expressing mutated FGFR3, suggest that mutated-FGFR3 expressing tumors could be more sensitive to P38 inhibitors than the others. AKT being activated in all bladder tumors, AKT inhibitor could also be treatment in particular for NMIBC and MIBC expressing mutated FGFR3 mutations or FGFR3-TACC3. For Disrupting FGFR3/MYC oncogenic loop in altered-FGFR3 expressing bladder tumors by inhibiting AKT and/or P38 is of great potential interest, since p38 and AKT inhibitors have already been developed and are currently clinical trials (Y. Wu et al., 2013). Moreover, a study has shown that bladder cancer cell line RT112 may bypass their dependence for FGFR3 signaling by switch to ERBB2/3 receptors (J Wang et al., 2014). Our study proposes here another alternative therapy to treat FGFR3 dependant tumors. Furthermore several others cancers express FGFR3-TACC3 fusion protein as glioblastoma (Singh et al., 2013), Nasopharyngeal Carcinoma (Yuan et al., 2014) and lung adenocarcinoma (Capelletti et al., 2014). It could be interesting to show if this FGFR3/MYC feedback loop is true in these others types of human cancers expressing FGFR3-TACC3. If that was the case, this therapy could be extended to other cancer types.

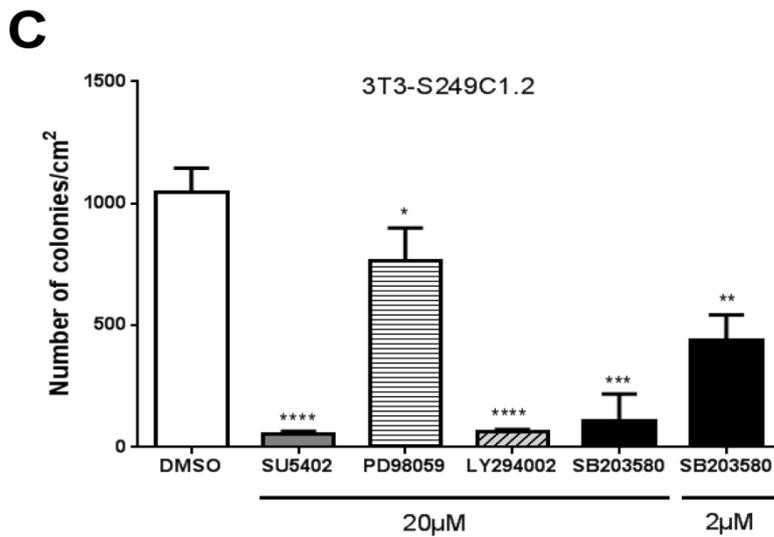
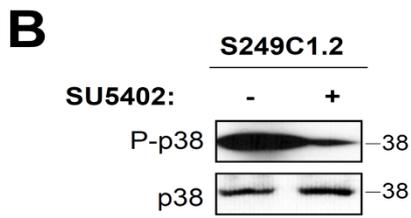
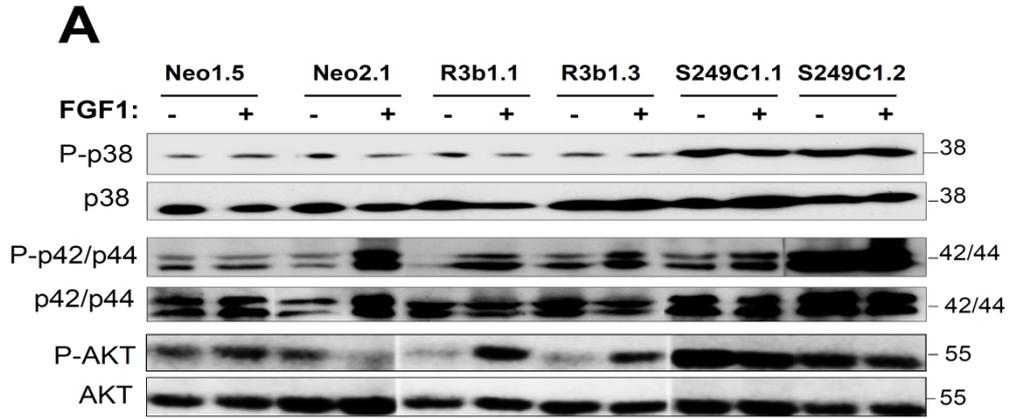


Figure 1(Figure legend page 103)

**Figure 1: P38 MAP Kinase and PI3 Kinase pathways are critical for FGFR3-S249C to induce NIH-3T3 cells transformation.**

**(A)** NIH-3T3 control cells (Neo1.5, Neo2.3), FGFR3-S249C-expressing cells (S249C1.1, S249C1.2) and wild-type FGFR3-expressing cells (R3b1.1, R3b1.3) were serum starved for 24h and stimulated for 10 min, where indicated, with 20ng/ml FGF1 in the presence of 50µg/ml heparin. Western blot analysis of 50 µg of whole cell lysate protein using the following specific antibodies: anti-phospho-p38 (Pp38), anti-p38, anti-phospho-Akt (PAkt), anti-Akt, anti-phospho-p42/p44 (ERK1/2) (Pp42/p44) and anti-p42/p44 antibodies. **(B)** FGFR3-S249C-expressing cells (S249C1.2) were treated, where indicated, for 2 hours with 30 µM SU5402 (FGFRs inhibitor). 50 µg of whole cell lysate protein were immunoblotted with anti-phospho-p38 (Pp38) and anti-p38 antibodies. **(C)** Soft agar assay of FGFR3-S249C-expressing cells (S249C1.2) in the presence or absence of inhibitors. SU5402, PD98059, LY294002 and SB203580 are specific respectively for FGFRs, ERK1/2, PI3 kinase and p38 activation. Data are the means of two independent experiments carried out in triplicate and the standard errors are indicated. Results were compared using unpaired Student's t-test, \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $0.001 < p < 0.005$ ; \*\*\*,  $0.0001 < p < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$

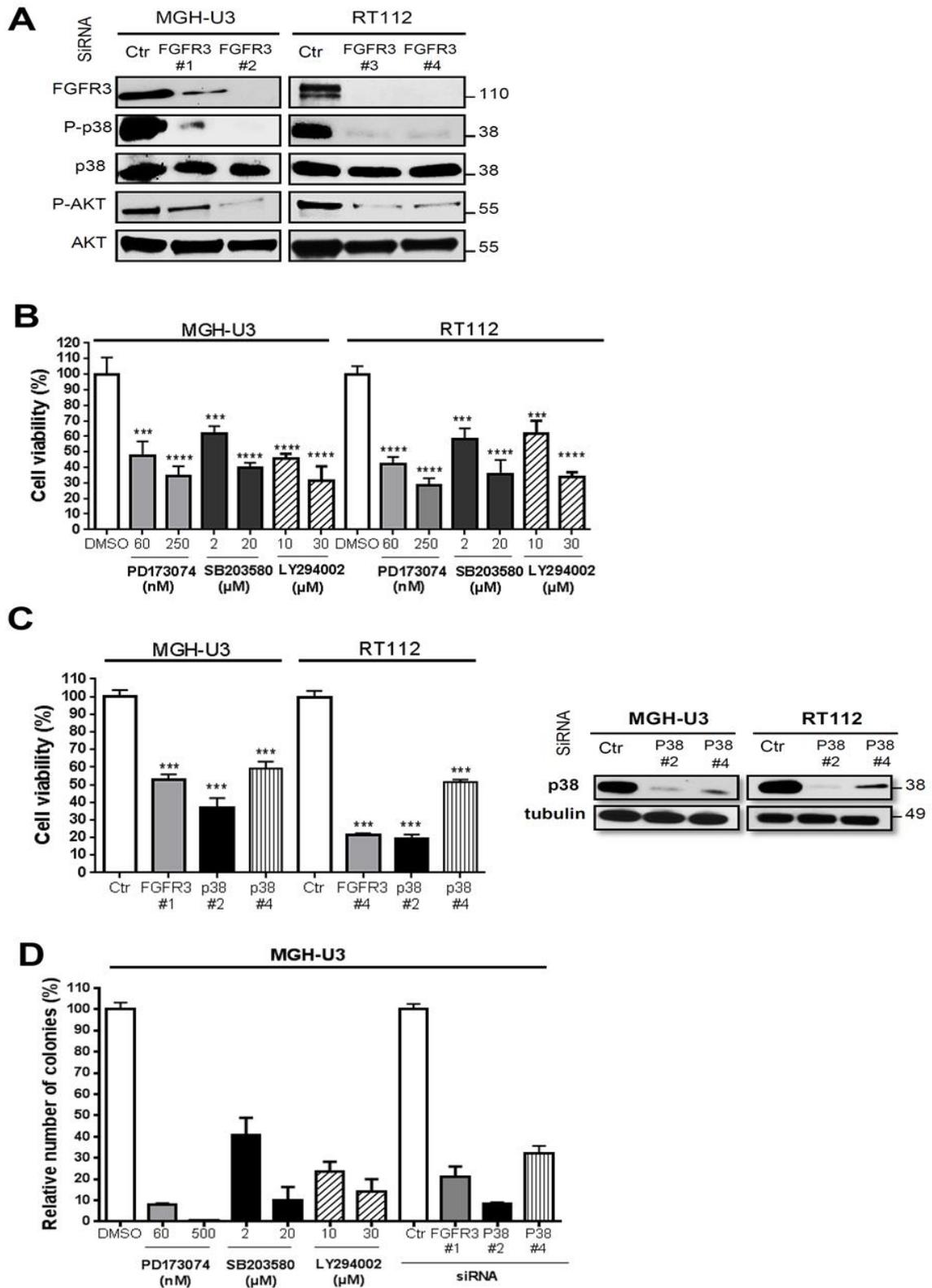
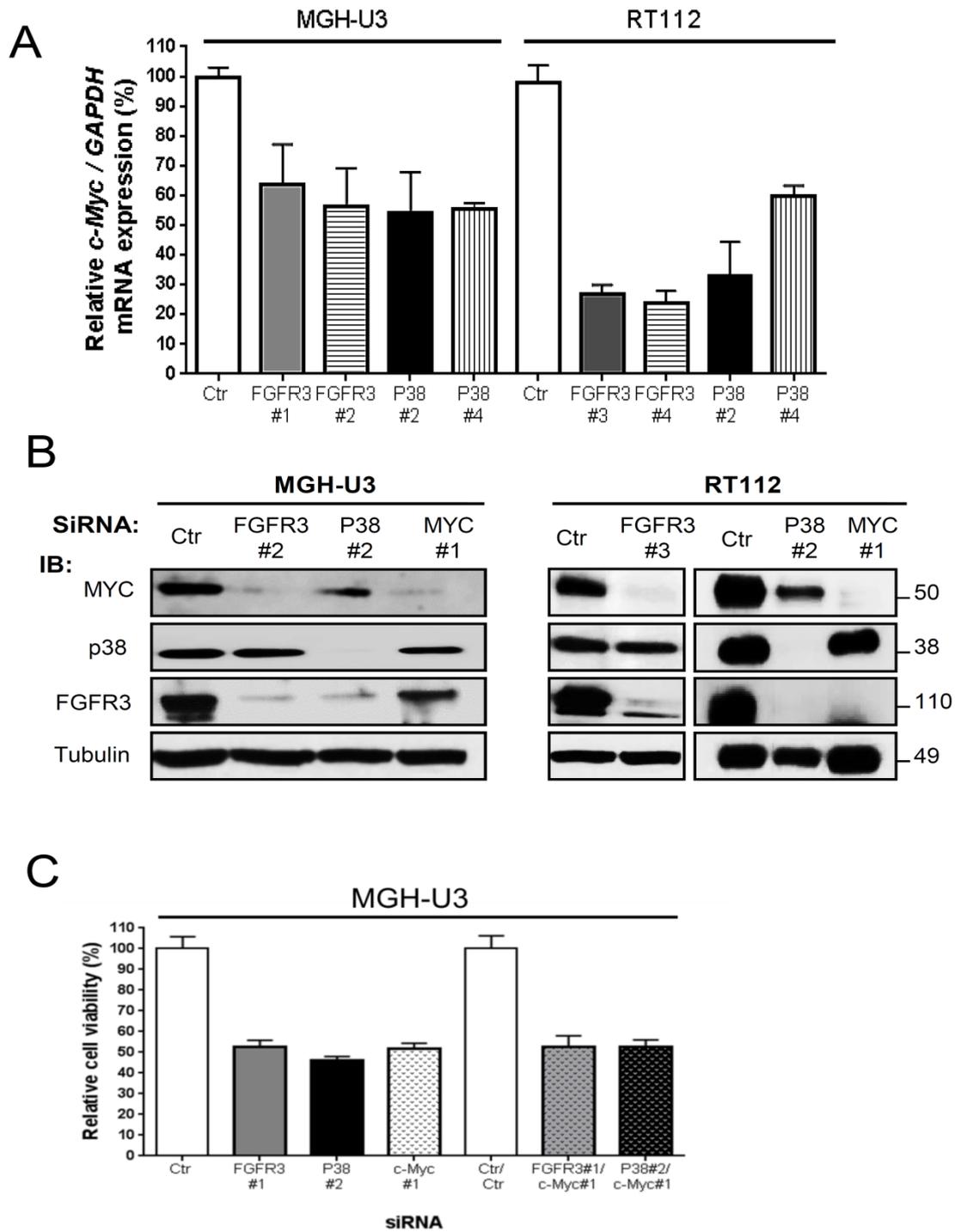


Figure 2 (Figure legend page 105)

**Figure 2: P38 and AKT activation depends on FGFR3 expression and are critical for constitutively-activated FGFR3 expressing Human epithelial bladder tumor cells proliferation and transformation.**

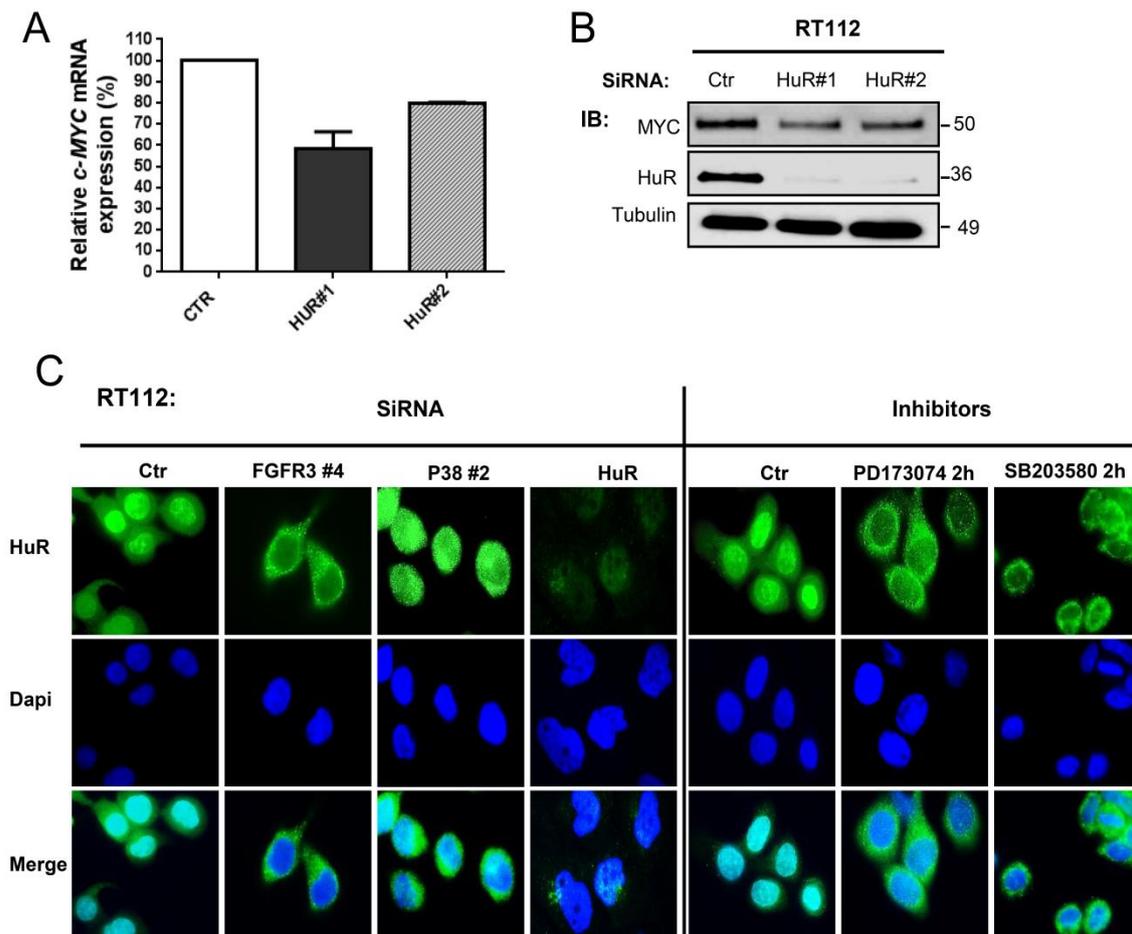
**(A)** FGFR3 knockdown inhibits p38 and AKT activation in MGH-U3 and RT112 human bladder tumor cells that expressed activated-FGFR3, respectively FGFR3-Y375C and FGFR3-TACC3. Lysates (10 µg of protein) of cells transfected with control siRNA (Ctr) or with siRNA targeting FGFR3 (72 h after transfection) were subjected to immunoblotting with anti-phospho-p38 (Pp38), anti-p38, anti-phospho-AKT, AKT and anti-FGFR3 antibodies. FGFR3 siRNAs decreased FGFR3 protein levels by 80 to 90 % in MGH-U3 and in RT112 cells. siRNA #1 and #2 could inhibit mutated or wild-type FGFR3 gene expression whereas siRNAs #3 and #4 also allowed to inhibit FGFR3-TACC3 fusion gene expression and were therefore used with RT112 cells (see methods). **(B)** FGFR3 inhibition using 0,5 µM PD173074 (FGFR inhibitor) for two hours decreased AKT and P38 phosphorylation as assessed by western-blot. **(C)** P38 and PI3K inhibition decreases cell viability of MGH-U3 and RT112 cells that expressed respectively mutated FGFR3-S249C and FGFR3-TACC3 fusion protein. MTT incorporation was evaluated 72 hours after treatment with PD173074 (FGFR inhibitor) or SB203580 (p38 inhibitor) or LY294002 (PI3 Kinase inhibitor). **(D)** Transfection with p38 $\alpha$  or FGFR3 siRNA had same effect on MGH-U3 and RT112 cell viability than P38 and FGFR3 inhibition using kinase inhibitors (fig.2C) (left panel). p38 expression was decreased by at least 90% 72h after p38 $\alpha$  (MAPK14) siRNA treatment (right panel). Lysates (10µg) of p38 siRNA-transfected cells were immunoblotted with anti-p38 or anti-tubulin antibodies. **(E)** The inhibition or depletion of p38 or FGFR3 or the inhibition of AKT inhibited the anchorage-independent growth of MGH-U3 cells by 70 to 80%. Colonies with diameters greater than 50 µm were counted 14 days after seeding in the presence or absence of the FGFR inhibitor PD173074 or the p38 inhibitor SB203580 or following transfection with siRNA. The results presented are the means of two independent experiments carried out in triplicate; the standard errors are indicated. Results were compared using unpaired Student's t-test, \*, p<0.05; \*\*, 0.001<p<0.005; \*\*\*, 0.0001<p<0.001; \*\*\*\*, p<0.0001



**Figure 3**

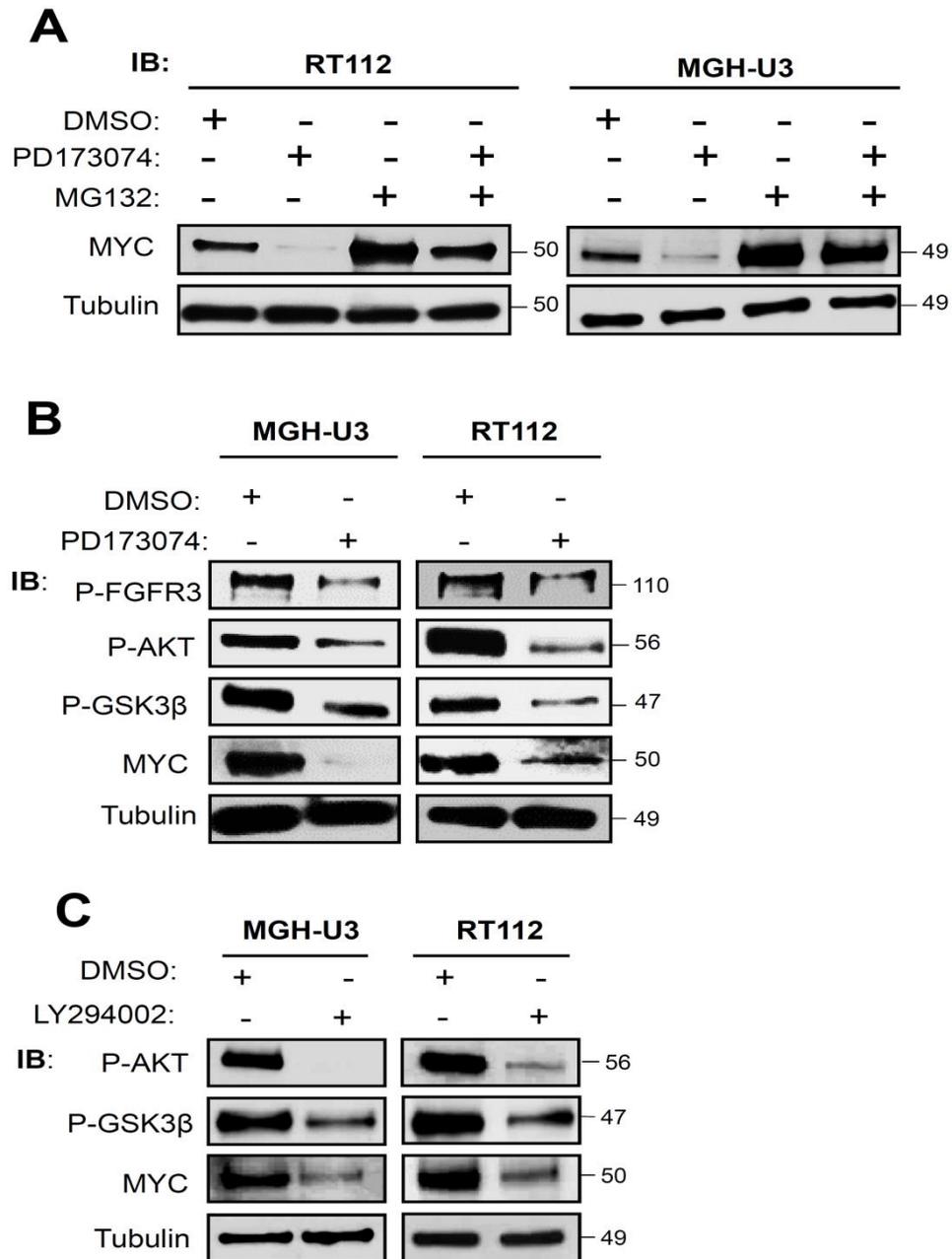
**Figure 3: up-regulation of MYC mRNA by FGFR3 depends on P38 activation and promotes bladder cancer cell growth.**

**(A)** FGFR3 and P38 depletion using siRNA lead to a downregulation of MYC mRNA in MGH-U3 and RT112 human bladder tumors cells that expressed activated-FGFR3, respectively FGFR3-Y375C and FGFR3-TACC3 (72h after transfection). MYC mRNA level was quantified by RT-QPCR as describe in materials and methods. **(B)** FGFR3 and p38 siRNAs decreased MYC protein level in MGH-U3 and RT112 cells. MYC siRNA was used as control. Lysates (10 µg of protein) of cells transfected with control siRNA (Ctr) or with siRNAs targeting FGFR3, p38 or MYC (72 h after transfection) were subjected to immunoblotting with anti-FGFR3, P38, MYC and anti-Tubulin antibodies. **(C)** Effect of MYC, P38 and FGFR3 down-regulation using 20 nM of each siRNA on MGH-U3 cell viability was assessed 72 hours post transfection by MTT assay.



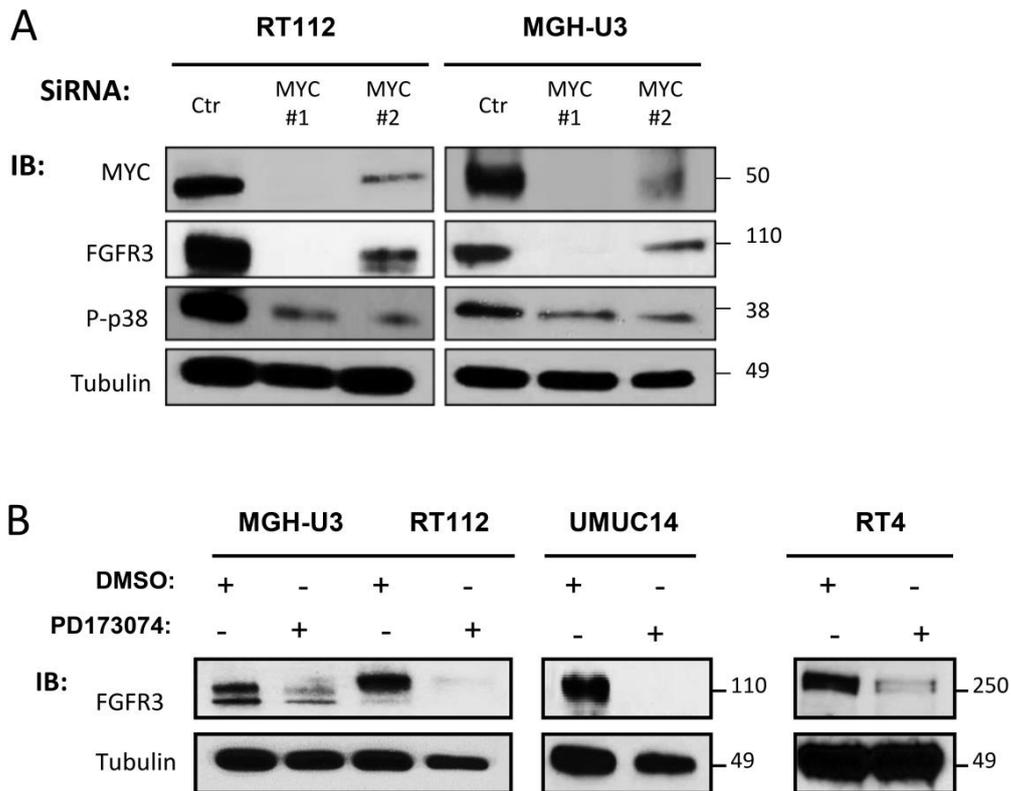
**Figure 4: HuR is involved in P38-induced MYC mRNA up-regulation in RT112 cells.**

**(A-B).** HuR knockdown in RT112 cells using two different siRNA decrease MYC RNA level as assessed by RT-QPCR **(A)** and MYC protein level as assessed by western-blot **(B)**. 72 hours post transfection with control siRNA (Ctr) or with siRNA targeting HuR, RNA were extracted and MYC RNA level assessed by RT-QPCR as described in methods and cell lysates (10µg) were subjected to immunoblotting with anti-MYC, anti-HuR, anti-FGFR3 and anti-Tubulin antibodies. **(C)** FGFR3 or p38 were depleted using SiRNA (72h) or inhibited respectively with PD173074 (0.5 µM) or SB203580 (2 µM) for 2h in RT112 cells. Immunofluorescence analysis of subcellular localization of HuR in cells was performed with anti-HuR antibody.



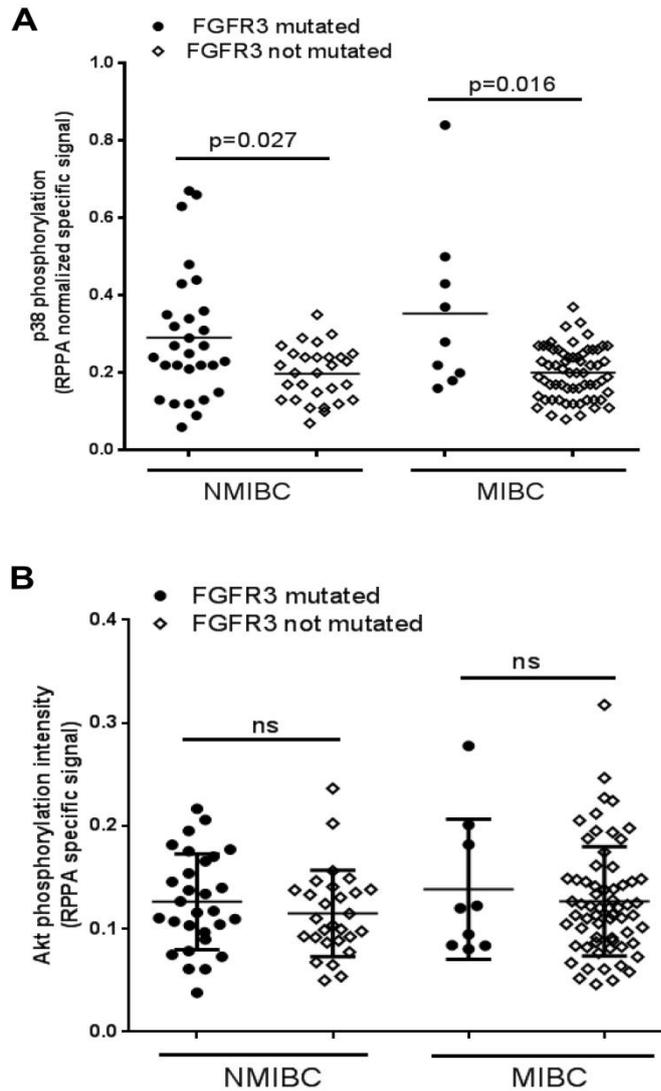
**Figure 5: FGFR3 prevents proteasome-mediated MYC protein degradation through AKT-mediated GSK3 $\beta$  inhibition.**

(A) RT112 and MGH-U3 cells were treated for three hours with FGFR inhibitor (0,5  $\mu$ M PD173074) or proteasome inhibitor (10 $\mu$ M MG132), alone or in combination. MYC expression was analyzed by immunoblot. (B-C) RT112 and MGH-U3 cells were treated for three hours with a FGFR inhibitor (0,5  $\mu$ M PD173074) (B) or a PI3kinase inhibitor (20 $\mu$ M LY294002). Lysates (10  $\mu$ g of protein) were subjected to immunoblotting with anti-phospho-FGFR3, anti-MY, phospho-AKT (Ser 473), Phospho GSK3B (ser 9) and anti-Tubulin antibodies.



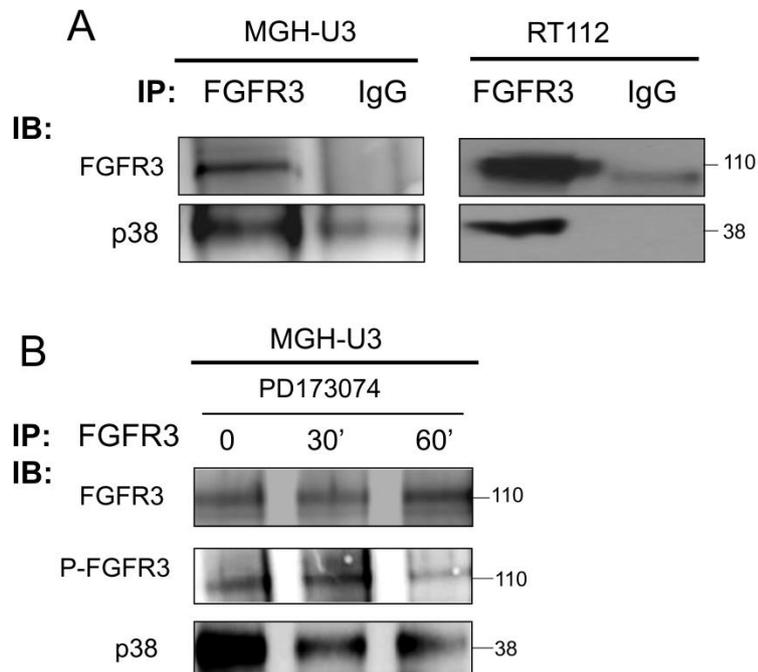
**Figure 6: A FGFR3/MYC positive feedback loop regulates FGFR3 expression level.**

**(A)** RT112 and MGH-U3 cells were transfected with MYC siRNA#1 or MYC siRNA#2 for 72 hours followed by protein extraction. MYC, FGFR3 and phospho-P38 level were analyzed by immunoblotting. **(B)** RT112, MGH-U3, UMUC14 and RT4 cells were treated for 72 hours with FGFR inhibitor (0,5  $\mu$ M PD173074). Lysates (10  $\mu$ g of protein) were subjected to immunoblotting with anti-FGFR3 and anti-MYC antibodies. Anti-tubulin was used as a loading control.



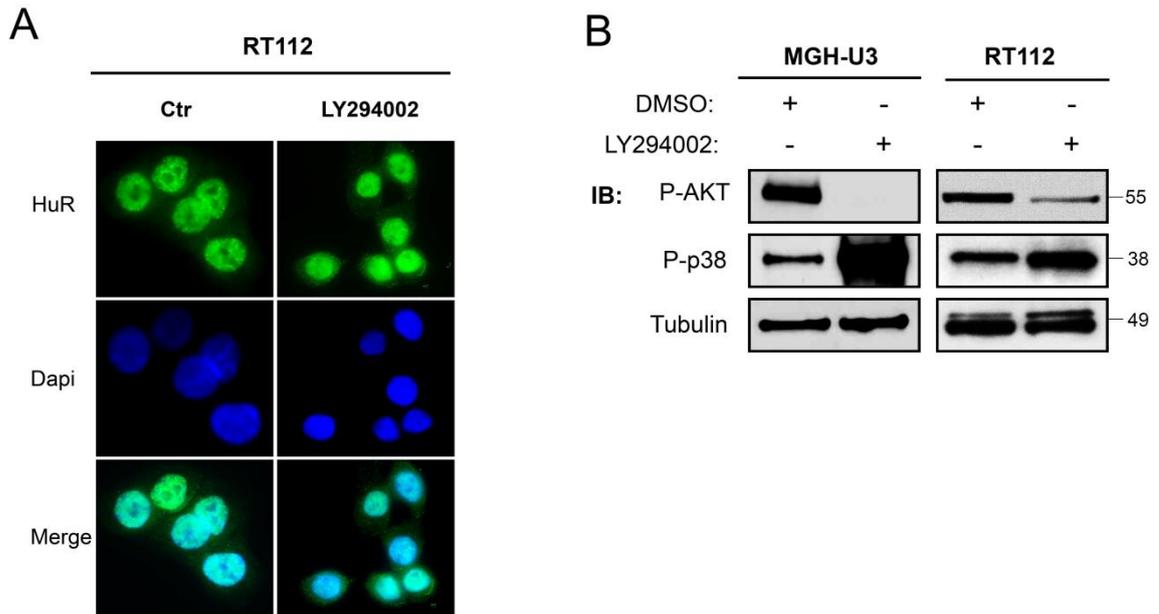
**Figure 7: P38 and AKT are phosphorylated in human bladder tumors presenting FGFR3 mutation.**

**(A-B)** Phosphorylation level of P38 **(A)** and AKT **(B)** was assessed by reverse phase protein array (RPPA) in 57 NMIBC (Non-Invasive Bladder Carcinoma) and 72 MIBC (Muscle Invasive Bladder Carcinoma) as described in method section. 29 NMIBC and 9 MIBC presented FGFR3 mutation. Comparisons between mutated and non-mutated tumors were performed using Wilcoxon rank sum test.



**Supplementary Figure 1: P38 is part of FGFR3 signaling complex**

**(A)** FGFR3 and p38 co-immunoprecipitates in MGH-U3 and RT112 cells. Total cell lysates (1 mg) were incubated with protein G-coupled FGFR3 antibody (directed toward the extra-cellular domain of FGFR3) or control IgG. Protein immunoprecipitated were subjected to immunoblotting with the same anti-FGFR3 antibody or with anti-p38 antibody. **(B)** P38-FGFR3 interaction requires FGFR3 phosphorylation. MGH-U3 cells were treated 1 hour with 0.2  $\mu$ M PD173074 (a FGFR inhibitor) and total cell lysates (1mg) were incubated with protein G-coupled FGFR3 antibody. Protein immunoprecipitated were subjected to immunoblotting with anti-FGFR3 or anti-p38 antibodies.



**Supplementary Figure 2: AKT inhibition does not modify HuR subcellular localization but up-regulates P38 phosphorylation.**

**(A)** HuR localization was assessed in RT112 cells after two hours of treatment with PI3K inhibitor (LY294002) by immunocytolabeling using anti-HuR antibodies. **(B)** PI3 kinase inhibition using 20  $\mu$ M LY294002 for two hours decreased AKT phosphorylation and increase P38 phosphorylation as assessed by western-blot in RT112 and MGH-U3 cells.

## **Materiels and Methods**

### **Cell culture and transfection**

Transfected NIH-3T3 cells expressing the wild-type FGFR3b isoform (clones R3b1.1, R3b1.3) or expressing the mutated FGFR3b-S249C receptor (clones S249C1.1, S249C 1.2) or those transfected with the control pcDNA1-Neo plasmid (clones Neo1.5, Neo 2.1) were established previously {Bernard-Pierrot, 2005 #97} and cultured in DMEM with 10% newborn calf serum, 2 mM glutamine, 100 u/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 400 µg/ml G418. Human bladder derived cell lines RT112, RT4 and UMUC14 were obtained from DKFZ (Heidelberg, Germany). MGH-U3 cells were kindly provided by Dr. Paco Real. MGH-U3 and UMUC14 cells were cultured in DMEM/F12, RT112 and RT4 in RPMI. Medium were complemented with 10% fetal calf serum (FCS). Cells were kept at 37 °C, under an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The identity of cell lines used was checked by analyzing the genomic alterations with comparative genomic hybridization arrays [and FGFR3 and TP53 mutations with the SNaPshot technique (for FGFR3) or classical sequencing for TP53.

For siRNA transfection, MGH-U3 and RT112 cells were used to seed 6-well or 24-well plates at 250 000 cells/ well for MGH-U3 cells and 200 000 cells/ well for RT112 cells. Cells were transfected with 20 nM in the presence of lipofectamine RNAi Max reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. siRNAs were purchased from Ambion and Qiagen. For the control siRNA we used a Qiagen control (Luciferase GL2 SiRNA, #1022070).

Sequences of siRNA used are listed above:

**Control SiRNA:** 5'-CGUACGCGGAAUACUUCG-3' (sens strand)

5'-UCGAAGUAUCCGCGUAC-3' (antisens strand)

**FGFR3#1:** 5'-GCUUUACCUUUUAUGCAA-3' (sens strand)

5'-UUGCAUAAAAGGUAAAAGGC-3' (antisens strand)

**FGFR3#2:** 5'-GGGAAGCCGUGAAUUCAGU-3' (sens strand)

5'-ACUGAAUUCACGGUCCCC-3' (antisens strand)

**FGFR3#3:** 5'-CCGUAGCCGUGAAGAUGC-3' (sens strand)

5'-AGCAUCUUCACGGCUACGG-3' (sens antistrand)

**FGFR3 #4:** 5'-CCUGCGUCGUGGAGAACA-3' (sens strand)

5'-UUGUUCUCCACGACGCAGG-3'(sens antistrand)

**P38 $\alpha$  #2:** 5'-GGUCUCUGGAGGAAUUCAA-3' (sens strand)

5'-UUGAAUCCUCCGAGACC-3' (antisens strand)

**P38 $\alpha$  #4:** 5'-CUGCGGUUACUUAACAUA-3' (sens strand)

5'-UAUGUUUAAGUAACCGCAG-3' (antisens strand)

**MYC #1:** 5'-UCCCGGAGUUGGAAAACAATT-3' (sens strand)

5'-UUGUUUCCAACUCCGGGATC-3' (antisens strand)

**MYC #2:** 5'-CGGUGCAGCCGUUUUCUATT-3' (sens strand)

5'-UAGAAUACGGCUGCACCGAG-3' (antisens strand)

**HuR#1:** 5'-ACUUAUUCGGGAUAAAGUA-3' (sens strand)

5'-UACUUUAUCCCGAAUAAGU-3' (antisens strand)

**HuR#2:** 5'-CAGUUUCAUUGGUCAUAAATT-3' (sens strand)

5'-UUUAUGACCAUUGAAACUGGT-3' (antisens strand)

Cell viability was assessed by MTT assay (0,5 mg/mL), 72 h after transfection, in 24-well plates. Cell lysates were also prepared 72 h after transfection, in six-well plates.

### **Kinase inhibitors.**

The inhibitors LY294002, PD98059, SB203580, SU5402, PD173074 were purchased from Calbiochem (Merck Eurolab, Fontenay Sous Bois, France). Concerning FGFR inhibitors, we initially used SU5402 and once available we moved on PD173074 which was more potent, (IC<sub>50</sub> of 10-20  $\mu$ M and 25 nM, respectively)

### **Immunoblotting**

NIH-3T3, MGH-U3 and RT112 cells were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 250 mM NaCl, 1% triton X100, Proteases and phosphatases inhibitors

(Roche)) and the resulting lysates were clarified by centrifugation. The protein concentration of the supernatants was determined with the Biorad Bradford Protein Assay Kit (BioRad). Proteins (10 µg or 50 µg) were resolved by SDS-PAGE in 10 % polyacrylamide gels, electrotransferred to biorad nitrocellulose membrane and analyzed with antibodies against p38 and the phosphorylated form of p38 (cell signaling technology # 9212 and # 4511), AKT and the phosphorylated form of AKT (Ser413) (cell signaling technologies # 2920 and # 4060), GSK3B (ser9) ( cell signaling Technology # 5558), MYC (cell signaling Technology # 9402), Tubulin (Sigma Aldrich #T6199) or extra-cellular domain of FGFR3 (abcam, ab 133644). Lyophilized proteins extracted from human bladder tumors by the cesium chloride procedure were solubilized in 1 x Laemmli sample buffer and boiled for 10 min. Protein concentrations were determined with the Biorad Bradford Protein Assay Kit (BioRad). Proteins (50 µg) were analyzed similarly by SDS-PAGE, as described above, using antibodies against p38 and phosphorylated p38. Protein loading was checked by Amido Black 10B staining of the membrane after electro-transfer.

### **Immunoprecipitation.**

MGH-U3 and RT112 cells were resuspended in lysis buffer (50 mM Hepes (pH 7.5), 250 mM NaCl, 1% triton X-100, cocktail of phosphatase and protease inhibitors (Roche) and the resulting lysates were clarified by centrifugation. The protein concentration of the supernatants was determined with the Biorad Bradford Protein Assay Kit (BioRad). 500 µg of protein was incubated over-night with 50 µl Protein G-agarose beads coupled to anti-FGFR3 antibodies (sigma Aldrich , F0425 and abcam ). Beads were rinsed two times with lysis buffer, one time with 50 mM Hepes containing 250 Mm Nacl and once with Hepes 50 mM . Immunoprecipitated proteins were eluted with laemlli buffer, resolved in a 4-12% acrylamide SDS-PAGE electrotransferred to biorad nitrocellulose membrane and analyzed with antibodies against p38 (Cell Signaling Technology) or FGFR3 (abcam) as described above.

### **Soft agar assay**

MGH-U3 cells (20,000), untransfected or transfected with siRNA, were used to seed 12-well plates containing MEM supplemented with 10% FCS and 1% agar, in triplicate. Cells were cultured in the presence or absence of inhibitors in the agar and culture medium, as appropriate. The medium was changed weekly. The plates

were incubated for 14 days and colonies larger than 50  $\mu\text{m}$  in diameter — when viewed under a phase-contrast microscope equipped with a measuring grid — were counted.

### **RNA extraction from cell lines**

RNA was isolated from cell lines with RNeasy Mini kits (Qiagen).

### **DNA array**

To identify gene regulated after FGFR3 depletion in MGH-U3 cells, we analyzed 0.2  $\mu\text{g}$  of total RNA of control and siRNA treated cells with the Affymetrix human exon 1.0 ST DNA array, as previously described (biton et al., 2014).LIMMA was used to identify genes differentially expressed between FGFR3 siRNA-treated (3 different siRNA) and Lipofectamine-treated cells (3 replicates) from the MGH-U3 cell line. The  $p$ -values were adjusted for multiple testing by BH FDR methods. Genes with a FDR below 5% were considered to be differentially expressed.

To compare gene expression pattern in two control clones (neo1.5 and neo2.1) and in two FGFR3-S249C-expressing clones (S249C1.1 and S249C1.2), we used Affymetrix® U74Av2 microarrays. Each clone was analysed on three replicate chips A detailed protocol for RNA amplification, cDNA probe labelling and hybridisation is available from <http://affymetrix.com>. Array were normalized using RMA algorithm and affymetrix annotation were used. For each gene, we considered the mean expression level in the two control clones (3 replicates each) and the mean expression level in each of the two FGFR3-S249C clones (3 replicates per clone). Genes with different patterns of expression in the FGFR3-S249C-expressing and control clones were identified by calculating the log<sub>2</sub> fold change for each gene and retaining only genes displaying a significant over- or under-expression in both FGFR3-S249C clones compared to the mean expression of the two control clones. With a cut-off point of a log<sub>2</sub> fold change of at least 1.5, we identified 139 probe sets corresponding to 113 genes displaying differential expression between the two FGFR3-S249C-expressing clones and the control clones (supplementary table 2).

### **Real-time reverse transcription-quantitative PCR**

Reverse transcription was performed with 1  $\mu\text{g}$  of total RNA, with the High-Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems), and MYC and TBP were

amplified by PCR in a Roche real-time thermal cycler using Roche taqman master mix (Roche) and respectively assay on demand Hs00153408\_m1 and 4326322E (encompassing primers and taqman probe) purchased from Applied (Life technologies).

### **Anti-HUR immunocyto-labeling**

Cells were plated in 6 wells plate (200 000 cells/well). The next day, cells were treated with SB203580 (P38 inhibitor) at a concentration of 2  $\mu$ M during 1h or with PD173074 (FGFR inhibitor) at a concentration of 0.5  $\mu$ M during 2 hours. After treatment, wells were rinsed three times with ice cold PBS. Cells were fixed on coverslips with 4% PFA at 4°C, during 45 min in moist chamber. Cells were permeabilized using triton 5% during 5 min. Coverslips were incubated in blocking buffer (PSBT tween 0.1%, 0.3 M glycine, 5% BSA) for 1h. Coverslips were incubated at 4°C overnight with primary antibody (HuR antibody, 19F12 clone, genetex) diluate in PBS (1/50e). Next day, coverslips were washed three times using ice cold PBS for 5 min each, and incubate with secondary antibody (mouse Alexa fluor 488, 1/50e) during 1h at room temperature in dark. Coverslips were washed three times in cold PBS for 5 min each.

Coverslips were mounted with mountain medium containing DAPI (Prolong gold Antifad Mountant with DAPI, life technologies). Cells were observed using epifluorescence microscope.

### **Human bladder samples**

We used protein extracted from 129 human bladder tumors (59 non muscle-invasive and 70 muscle invasive tumors) for western-blot analysis. The flash-frozen tumor samples were stored at -80 °C immediately after transurethral resection or cystectomy. All tumor samples contained more than 80% tumor cells, as assessed by the hematoxylin and eosin (H&E) staining of histological sections adjacent to the samples used for transcriptome analyses. All subjects provided informed consent and the study was approved by the institutional review boards of the Henri Mondor, Foch and Institut Gustave Roussy Hospitals. Proteins were extracted by from the surgical samples by cesium chloride density centrifugation as previously described (Calderaro et al., 2014).

## **Mutation analysis**

*FGFR3* mutations were studied with the SNaPshot technique {van Oers, 2005 #19}.

## **Reverse phase protein array (RPPA)**

RPPA was performed and analyzed as previously described (Calderaro et al., 2014). Briefly, samples were deposited onto nitrocellulose covered slides (Schott Nexterion NC-C, Jena, Germany) using a dedicated arrayer (2470 Arrayer, Aushon Biosystems, Billerica, MA, USA). Four serial dilutions, ranging from 1500 to 187 µg/ml, and four technical replicates per dilution were deposited for each sample. Arrays were revealed with specific anti-phospho-AKT (Ser473) (#4058) and anti-phosphoP38 (# 4511) antibodies (Cell Signaling Technology, Ozyme, France) or without primary antibody (negative control), using Autostainer Plus (Dako, Trappes, France). Briefly, slides were incubated with avidin, biotin and peroxidase blocking reagents (Dako, Trappes, France) before saturation with TBS containing 0.1% Tween-20 and 5% BSA (TBST-BSA). Slides were then probed overnight at 4°C with primary antibodies diluted in TBST-BSA. After washes with TBST, arrays were probed with horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Newmarket, UK) diluted in TBST-BSA for 1 h at RT. To amplify the signal, slides were incubated with Bio-Rad Amplification Reagent for 15 min at RT. The arrays were washed with TBST, probed with Alexa647-Streptavidin (Molecular Probes) diluted in TBST-BSA for 1 hour at RT and washed again in TBST. For staining of total protein, arrays were incubated 15 min in 7% acetic acid and 10% methanol, rinsed twice in water, incubated 10 min in Sypro Ruby (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and rinsed again. The processed slides were dried by centrifugation and scanned using a GenePix 4000B microarray scanner (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Spot intensity was determined with MicroVigene software (VigeneTech Inc, Carlisle, USA), corrected for background signal without antibody and normalized to Sypro Ruby signal. Antibodies used in RPPA have been previously tested by Western-Blotting to assess their specificity for the protein of interest within 18 tumor lysates and presented a Pearson correlation coefficient between RPPA and Western blotting of 0.84 for p-AKT (Calderaro et al.2014) and 0.86 for p-P38 (data not shown).

## **Statistical analysis**

All functional experiments were carried out twice or three times, in triplicate. Data were analyzed as means  $\pm$  SD. The control siRNA group or control DMSO treated group was used as the reference. Results were evaluated using Student's t-test. RPPA signals in FGFR3-mutated tumors and in tumors without FGFR3 mutation were compared using Wilcoxon rank sum test. Genes modulated after FGFR3 expression in NIH-3T3 cells and after FGFR3 depletion in MGH-U3 cells were identified as described above in DNA array section.

### References:

Bates, R. C., & Mercurio, A. M. (2003). Tumor necrosis factor-alpha stimulates the epithelial-to-mesenchymal transition of human colonic organoids. *Molecular Biology of the Cell*, 14(5), 1790–800. doi:10.1091/mbc.E02-09-0583

Behren, A., Mühlen, S., Acuna Sanhueza, G. A., Schwager, C., Plinkert, P. K., Huber, P. E., ... Simon, C. (2010). Phenotype-assisted transcriptome analysis identifies FOXM1 downstream from Ras-MKK3-p38 to regulate in vitro cellular invasion. *Oncogene*, 29(10), 1519–30. doi:10.1038/onc.2009.436

Bernard-Pierrot, I., Brams, A., Dunois-Lardé, C., Caillault, A., Diez de Medina, S. G., Cappellen, D., ... Radvanyi, F. (2006). Oncogenic properties of the mutated forms of fibroblast growth factor receptor 3b. *Carcinogenesis*, 27(4), 740–7. doi:10.1093/carcin/bgi290

Billerey, C., Chopin, D., Bralet, M., Lahaye, J., Abbou, C. C., Bonaventure, J., ... Radvanyi, F. (2001). Frequent FGFR3 Mutations in Papillary Non-Invasive Bladder (pTa) Tumors, 158(6), 1955–1959.

Blick, C., Ramachandran, a, Wigfield, S., McCormick, R., Jubb, a, Buffa, F. M., ... Harris, a L. (2013). Hypoxia regulates FGFR3 expression via HIF-1 $\alpha$  and miR-100 and contributes to cell survival in non-muscle invasive bladder cancer. *British Journal of Cancer*, 109(1), 50–9. doi:10.1038/bjc.2013.240

Calderaro, J., Rebouissou, S., de Koning, L., Masmoudi, A., Hérault, A., Dubois, T., ... Allory, Y. (2014). PI3K/AKT pathway activation in bladder carcinogenesis. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 134(8), 1776–84. doi:10.1002/ijc.28518

- Capelletti, M., Dodge, M. E., Ercan, D., Hammerman, P. S., Park, S.-I., Kim, J., ... Janne, P. a. (2014). Identification of Recurrent FGFR3-TACC3 Fusion Oncogenes from Lung Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, 20, 6551–6558. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1337
- Cappellen, D. (1999). Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder, 23(september), 18–20.
- Carneiro, B. a, Meeks, J. J., Kuzel, T. M., Scaranti, M., Abdulkadir, S. a, & Giles, F. J. (2014). Emerging therapeutic targets in bladder cancer. *Cancer Treatment Reviews*. doi:10.1016/j.ctrv.2014.11.003
- Catto, J. W. F., Miah, S., Owen, H. C., Bryant, H., Myers, K., Larré, S., ... Hamdy, F. C. (2010). Europe PMC Funders Group Distinct microRNA alterations characterize high and low grade bladder cancer, 69(21), 8472–8481. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0744.Distinct
- Chang, T.-C., Yu, D., Lee, Y.-S., Wentzel, E. a, Arking, D. E., West, K. M., ... Mendell, J. T. (2008). Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nature Genetics*, 40(1), 43–50. doi:10.1038/ng.2007.30
- Chatzinikolaou, G., Nikitovic, D., Berdiaki, a., Zafiroopoulos, a., Katonis, P., Karamanos, N. K., & Tzanakakis, G. N. (2010). Heparin regulates colon cancer cell growth through p38 mitogen-activated protein kinase signalling. *Cell Proliferation*, 43, 9–18. doi:10.1111/j.1365-2184.2009.00649.x
- Chen, C. Y., & Shyu, A. B. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(11), 465–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8578590>
- Chen, S., Qiong, Y., & Gardner, D. (2005). A Role for p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Myc in Endothelin-Dependent Rat Aortic Smooth Muscle Cell Proliferation. *Hypertension*, 47, 252–258. doi:10.1161/01.HYP.0000198424.93598.6b
- Dean, J. L. E., Sully, G., Clark, A. R., & Saklatvala, J. (2004). The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cellular Signalling*, 16(10), 1113–21. doi:10.1016/j.cellsig.2004.04.006

Domínguez-Cáceres, M. A., García-Martínez, J. M., Calcabrini, A., González, L., Porque, P. G., León, J., & Martín-Pérez, J. (2004). Prolactin induces c-Myc expression and cell survival through activation of Src/Akt pathway in lymphoid cells. *Oncogene*, 23(44), 7378–90. doi:10.1038/sj.onc.1208002

Dreissigacker, U., Mueller, M. S., Unger, M., Siegert, P., Genze, F., Gierschik, P., & Giehl, K. (2006). Oncogenic K-Ras down-regulates Rac1 and RhoA activity and enhances migration and invasion of pancreatic carcinoma cells through activation of p38. *Cellular Signalling*, 18, 1156–1168. doi:10.1016/j.cellsig.2005.09.004

Elenitoba-Johnson, K. S. J., Jenson, S. D., Abbott, R. T., Palais, R. A., Bohling, S. D., Lin, Z., ... Lim, M. S. (2003). Involvement of multiple signaling pathways in follicular lymphoma transformation: p38-mitogen-activated protein kinase as a target for therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12), 7259–64. doi:10.1073/pnas.1137463100

Fan, X. C., & Steitz, J. a. (1998). Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO Journal*, 17(12), 3448–3460. doi:10.1093/emboj/17.12.3448

Frank, S. B., & Miranti, C. K. (2013). Disruption of prostate epithelial differentiation pathways and prostate cancer development. *Frontiers in Oncology*, 3(October), 273. doi:10.3389/fonc.2013.00273

Frey, M. R., Golovin, A., & Polk, D. B. (2004). Epidermal growth factor-stimulated intestinal epithelial cell migration requires Src family kinase-dependent p38 MAPK signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 44513–44521. doi:10.1074/jbc.M406253200

Gómez-román, J. J., Saenz, P., González, J. C., Escuredo, K., Gonza, J. C., Martí, A., ... Gutie, J. L. (2005). Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Is Overexpressed in Urinary Tract Carcinomas and Modulates the Neoplastic Cell Growth. *Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Is Overexpressed in Urinary Tract Carcinomas and Modulates the Neoplastic Cell Growth*, 11, 459–465.

Hafner, C., van Oers, J. M. M., Hartmann, A., Landthaler, M., Stoehr, R., Blaszyk, H., ... Vogt, T. (2006). High frequency of FGFR3 mutations in adenoid seborrhic

keratoses. *The Journal of Investigative Dermatology*, 126, 2404–2407. doi:10.1038/sj.jid.5700422

Haugsten, E. M., Wiedlocha, A., Olsnes, S., & Wesche, J. (2010). Roles of fibroblast growth factor receptors in carcinogenesis. *Molecular Cancer Research: MCR*, 8(11), 1439–52. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0168

He, Q. P., Ding, C., & Li, P. A. (2003). Effects of hyperglycemic and normoglycemic cerebral ischemia on phosphorylation of c-jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, 49(8), 1241–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14983993>

Hernández, S., Toll, A., Baselga, E., Ribé, A., Azua-Romeo, J., Pujol, R. M., & Real, F. X. (2007). Fibroblast growth factor receptor 3 mutations in epidermal nevi and associated low grade bladder tumors. *The Journal of Investigative Dermatology*, 127(September 2006), 1664–1666. doi:10.1038/sj.jid.5700705

Itoh, N., & Ornitz, D. M. (2004). Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends in Genetics : TIG*, 20(11), 563–9. doi:10.1016/j.tig.2004.08.007

Knapinska, A. M., Gratacós, F. M., Krause, C. D., Hernandez, K., Jensen, A. G., Bradley, J. J., ... Brewer, G. (2011). Chaperone Hsp27 modulates AUF1 proteolysis and AU-rich element-mediated mRNA degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 31(7), 1419–31. doi:10.1128/MCB.00907-10

Knights, V., & Cook, S. J. (2010). De-regulated FGF receptors as therapeutic targets in cancer. *Pharmacology and Therapeutics*, 125(1), 105–117. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.10.001

Kotliarova, S., Pastorino, S., Kovell, L. C., Kotliarov, Y., Song, H., Bailey, R., ... Fine, a. (2009). Glycogen Synthase Kinase 3 inhibition induces Glioma Cell Death through c-MYC, NF-κB and Glucose Regulation. *Cancer Research*, 68(16), 6643–6651. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0850.Glycogen

Lafarga, V., Cuadrado, A., Lopez de Silanes, I., Bengoechea, R., Fernandez-Capetillo, O., & Nebreda, A. R. (2009). p38 Mitogen-activated protein kinase- and HuR-dependent stabilization of p21(Cip1) mRNA mediates the G(1)/S checkpoint. *Molecular and Cellular Biology*, 29(16), 4341–51. doi:10.1128/MCB.00210-09

Lafon, I., Carballès, F., Brewer, G., Poiret, M., & Morello, D. (1998). Developmental expression of AUF1 and HuR, two c-myc mRNA binding proteins. *Oncogene*, 16, 3413–3421. doi:10.1038/sj.onc.1201895

Logié, A., Dunois-Lardé, C., Rosty, C., Levrel, O., Blanche, M., Ribeiro, A., ... Radvanyi, F. (2005). Activating mutations of the tyrosine kinase receptor FGFR3 are associated with benign skin tumors in mice and humans. *Human Molecular Genetics*, 14(9), 1153–1160. doi:10.1093/hmg/ddi127

Maher, P. (1999). P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation Is Required for Fibroblast Growth Factor-2-Stimulated Cell Proliferation But Not Differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(25), 17491–17498.

Majewski, I. J., Mittempergher, L., Davidson, N. M., Bosma, A., Willems, S. M., Horlings, H. M., ... Bernards, R. (2013). Identification of recurrent FGFR3 fusion genes in lung cancer through kinome-centred RNA sequencing. *The Journal of Pathology*, 230(3), 270–6. doi:10.1002/path.4209

Matsumoto, T., Yokote, K., Tamura, K., Takemoto, M., Ueno, H., Saito, Y., & Mori, S. (1999). Platelet-derived growth factor activates p38 mitogen-activated protein kinase through a Ras-dependent pathway that is important for actin reorganization and cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 13954–13960. doi:10.1074/jbc.274.20.13954

Nakanishi, Y., Akiyama, N., Tsukaguchi, T., Fuji, T., Satoh, Y., Ishii, N., & Aoki, M. (2015). Mechanism of oncogenic signal by the novel fusion kinase FGFR3-BAIAP2L1. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0927-T

Nishihara, H., Hwang, M., Kizaka-Kondoh, S., Eckmann, L., & Insel, P. a. (2004). Cyclic AMP promotes cAMP-responsive element-binding protein-dependent induction of cellular inhibitor of apoptosis protein-2 and suppresses apoptosis of colon cancer cells through ERK1/2 and p38 MAPK. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26176–26183. doi:10.1074/jbc.M313346200

Onwuazor, O., Wen, X.-Y., Wang, D.-Y., Zhuang, L., Masih-Khan, E., & Stewart, A. K. (2003). Mutation, SNP, and isoform analysis of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) in 150 newly diagnosed multiple myeloma patients. *Blood*, 102(18), 773–774; author reply 774. doi:10.1182/blood-2003-03-0980

- Ornitz, D. M. (2005). FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytogfr*, 16(2), 205–213. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.02.003.FGF
- Parker, B. C., Annala, M. J., Cogdell, D. E., Granberg, K. J., Sun, Y., Ji, P., ... Zhang, W. (2013). The tumorigenic FGFR3-TACC3 gene fusion escapes miR-99a regulation in glioblastoma, 1–11. doi:10.1172/JCI67144DS1
- Powers, C. J., McLeskey, S. W., & Wellstein, a. (2000). Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-Related Cancer*, 7(2000), 165–197. doi:10.1677/erc.0.0070165
- Qing, J., Du, X., Chen, Y., Chan, P., Li, H., Wu, P., ... Ashkenazi, A. (2009). Antibody-based targeting of FGFR3 in bladder carcinoma and t ( 4 ; 14 ) -positive multiple myeloma in mice, 119(5). doi:10.1172/JCI38017DS1
- Rauci, A., Laplantine, E., Mansukhani, A., & Basilico, C. (2004). Activation of the ERK1/2 and p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathways Mediates Fibroblast Growth Factor-induced Growth Arrest of Chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 1747–1756. doi:10.1074/jbc.M310384200
- Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., & Huot, J. (1997). p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene*, 15(18), 2169–77. doi:10.1038/sj.onc.1201380
- Singh, D., Chan, J. M., Zoppoli, P., Niola, F., Castano, A., Liu, E. M., ... Zagzag, D. (2013). Transforming Fusion of FGFR and TACC Genes in Human Glioblastoma, 337(6099), 1231–1235. doi:10.1126/science.1220834.Transforming
- Tadlock, L., & Patel, T. (2001). Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling in transformed growth of a cholangiocarcinoma cell line. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 33(1), 43–51. doi:10.1053/jhep.2001.20676
- TCGA. (2014). Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*, 507(7492), 315–22. doi:10.1038/nature12965
- Tomlinson, D. C., Hurst, C. D., & Knowles, M. a. (2007). Knockdown by shRNA identifies S249C mutant FGFR3 as a potential therapeutic target in bladder cancer. *Oncogene*, 26(40), 5889–5899. doi:10.1038/sj.onc.1210399

- Tsai, W., Aiba, I., Long, Y., Lin, H.-K., Feun, L., Savaraj, N., & Kuo, T. M. (2012). Activation of Ras/PI3K/ERK Pathway Induces c-Myc Stabilization to Upregulate Argininosuccinate Synthetase, Leading to Arginine Deiminase Resistance in Melanoma Cells. *Cancer Research*, 29(10), 997–1003. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted
- Turkson, J., Bowman, T., Adnane, J., Zhang, Y., Djeu, J. Y., Sekharam, M., ... Jove, R. (1999). Requirement for Ras/Rac1-mediated p38 and c-Jun N-terminal kinase signaling in Stat3 transcriptional activity induced by the Src oncoprotein. *Molecular and Cellular Biology*, 19(11), 7519–7528.
- Turner, N., Pearson, A., Sharpe, R., Lambros, M., Geyer, F., Lopez-Garcia, M. a., ... Ashworth, A. (2010). FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Research*, 70(5), 2085–2094. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3746
- Vivanco, I., & Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 2(7), 489–501. doi:10.1038/nrc839
- Wagner, E. F., & Nebreda, A. R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews. Cancer*, 9, 537–549. doi:10.1038/nrc2694
- Wang, J., Guo, Y., Chu, H., Guan, Y., Bi, J., & Wang, B. (2013). Multiple Functions of the RNA-Binding Protein HuR in Cancer Progression, Treatment Responses and Prognosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 10015–41. doi:10.3390/ijms140510015
- Wang, J., Mikse, O., Liao, R. G., Li, Y., Tan, L., Janne, P. a., ... Hammerman, P. S. (2014). Ligand-associated ERBB2/3 activation confers acquired resistance to FGFR inhibition in FGFR3-dependent cancer cells. *Oncogene*, (April), 1–11. doi:10.1038/onc.2014.161
- Weidensdorfer, D., Stöhr, N., Baude, A., Lederer, M., Kohn, M., Schierhorn, A., ... Huttelmaier, S. (2009). Control of c-myc mRNA stability by IGF2BP1-associated cytoplasmic RNPs. *Rna*, 104–115. doi:10.1261/rna.1175909.the

- Williams, S. V, Hurst, C. D., & Knowles, M. a. (2013). Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Human Molecular Genetics*, 22(4), 795–803. doi:10.1093/hmg/dds486
- Wu, R., Connolly, D., Ngelangel, C., Bosch, F. X., Muñoz, N., & Cho, K. R. (2000). Somatic mutations of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) are uncommon in carcinomas of the uterine cervix. *Oncogene*, 19, 5543–5546. doi:10.1038/sj.onc.1203934
- Wu, Y., Su, F., Kalyana-sundaram, S., Khazanov, N., Cao, X., Lonigro, R. J., ... Rhodes, D. R. (2013a). Identification of targatable FGFR gene Fusions in diverse Cancers, 3(6), 636–647. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0050.Identification
- Wu, Y., Su, F., Kalyana-sundaram, S., Khazanov, N., Cao, X., Lonigro, R. J., ... Rhodes, D. R. (2013b). Identification of Targetable FGFR Gene Fusion in Diverse Cancers, 3(6), 636–647. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0050.Identification
- Yuan, L., Liu, Z.-H., Lin, Z.-R., Xu, L.-H., Zhong, Q., & Zeng, M.-S. (2014). Recurrent FGFR3-TACC3 fusion gene in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biology & Therapy*, 15(12), 1613–21. doi:10.4161/15384047.2014.961874

## 1.2 DISCUSSION

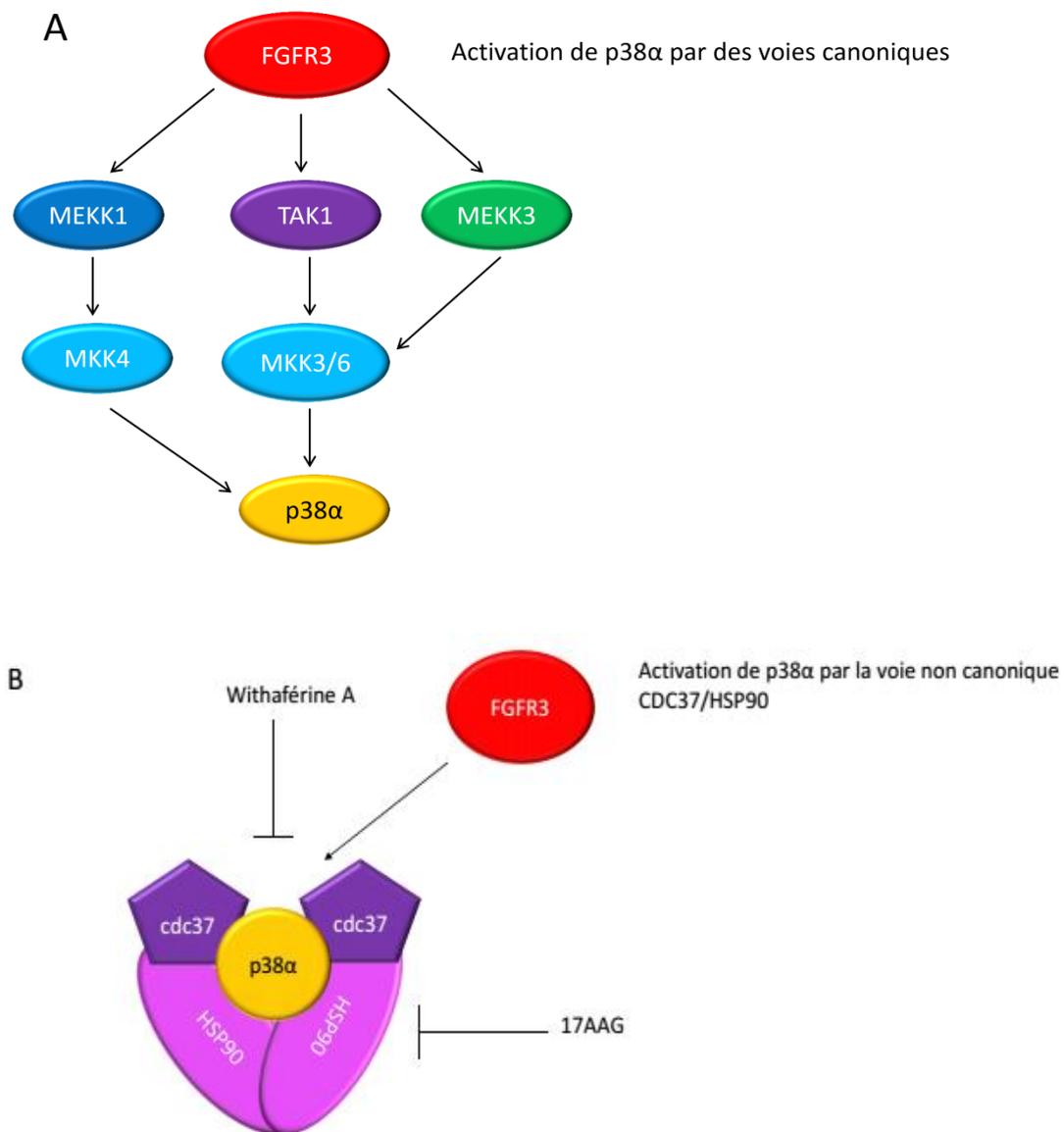
Cette étude a permis de mettre en évidence le rôle critique de l'activation des protéines p38 et AKT par le récepteur FGFR3 altéré pour la prolifération et la transformation cellulaire de cellules dérivées de tumeurs de vessie. Nous avons montré que l'activation de ces deux voies par FGFR3 induisait une surexpression de la protéine MYC. L'activation de p38 induit une stabilisation de l'ARNm de MYC tandis que l'activation d'AKT conduit à la stabilisation de la protéine MYC en empêchant sa dégradation par le protéasome.

Dans cette étude nous avons utilisé un inhibiteur de la PI3Kinase, le LY294002 pour inhiber la phosphorylation d'AKT et étudier son rôle. Nous avons ainsi montré que comme classiquement décrit pour les récepteurs à activité tyrosine kinase, FGFR3 active AKT via l'activation de la PI3Kinase. Cependant le mécanisme d'activation de p38 par FGFR3 n'a pas été déterminé. Plusieurs hypothèses peuvent être émises aux vues de la littérature et du réseau d'interaction de FGFR3 (chapitre II des résultats). P38 pourrait être activée par une des voies canoniques décrites dans la littérature impliquant les protéines TAK1, MEKK1 et MEKK3 ou p38 pourrait être activée par une voie non canonique impliquant les protéines CDC37 et HSP90 (Ota, Zhang, Ping, Han, & Wang, 2010) (voir figure 1). La protéine TAK1 (MAP3K7) a été identifiée comme partenaire protéique de FGFR3 lors des analyses par de spectrométrie de masse des protéines co-immunopécipitées avec FGFR3 dans la lignée RT112. L'utilisation de l'algorithme PEPPER a permis de proposer des interactions avec les protéines TAK1 et avec les protéines MEKK1 et MEKK3. Les protéines TAK1 et MEKK3 pouvant activer la protéine p38 $\alpha$  de manière canonique via les MAP2Kinases MKK3/MKK6, la protéine MEKK1 peut, elle, conduire à l'activation de p38 $\alpha$  via l'activation de la MAP2Kinase MKK4 (figure 1A). D'autre part, nous avons également mis en évidence l'existence d'un complexe CDC37/HSP90 interagissant avec FGFR3 (voir chapitre II des résultats) qui pourrait réguler l'activation de p38.

Nous avons commencé à tester ces différentes hypothèses de mode d'activation de p38 par FGFR3.

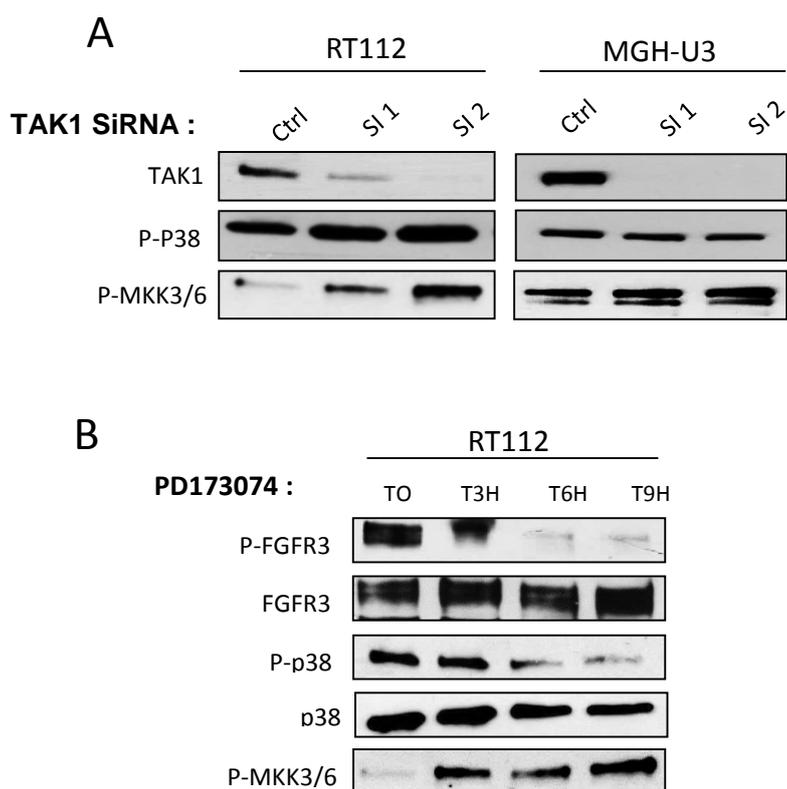
Nous nous sommes d'abord focalisés sur l'étude de l'activation de p38 par la voie canonique TAK1/MKK3/MKK6, en étudiant l'impact de la déplétion de TAK1 grâce à l'utilisation de SiRNA sur l'activation de p38 dans les lignées cellulaires RT112 et MGH-U3. Nous avons montré par western blot que la perte d'expression de TAK1 n'a aucun impact sur la phosphorylation de p38 et conduit à l'activation des MAP2Kinases MKK3/MKK6 dans la lignée cellulaire RT112 (figure 2A). De plus dans cette lignée RT112, l'inhibition de FGFR3 grâce à l'utilisation d'un inhibiteur de l'activité kinase des FGFR (PD173074) induit une inhibition de la phosphorylation de p38 (Figure 2B). Ces résultats suggèrent que p38

n'est pas activé par la voie TAK1/MKK3/MKK6 car dans cette lignée cellulaire MKK3/6 n'est de base pas activé.



**FIGURE 1 : MODELES D'ACTIVATION DE P38A PAR FGFR3 PROPOSES AU COURS DE CETTE THESE.**

**(A)** Activation de p38 $\alpha$  par une voie canonique. P38 peut être activée par la voie TAK1/MKK3/6, la voie MEKK3/MKK3/6 ou encore la voie MEKK1/MKK4. **(B)** Activation de p38 par la voie non canonique CDC37/HSP90.



**FIGURE 2: ETUDE DE L'ACTIVATION DE P38 PAR FGFR3 DANS LES LIGNEES CELLULAIRES RT112 ET MGH-U3.**

**(A)** La déplétion de TAK1 n'a aucun effet sur la phosphorylation de p38. Les cellules RT112 et MGH-U3 ont été transfectées avec les SiRNA TAK1#1 Et TAK1#2. L'extraction protéique a été réalisée 72h après la transfection et la phosphorylation des protéines P38 et MKK3/6 a été étudiée par western blot. **(B)** L'inhibition de FGFR3 induit une inhibition de phospho-p38 et conduit à l'activation de MKK3/6. Les cellules RT112 ont été traitées à différents temps (0, 3h, 6h et 9h) avec un inhibiteur des FGFR, le PD173074. La phosphorylation de FGFR3, P38 et MKK3/6 ont été étudiés par western blotting.

Nous n'avons pas encore exploré les deux hypothèses émises pour expliquer l'activation de p38 par FGFR3 (voir figure 1). L'implication de la voie canonique MEKK1/MKK4 pourra être testée grâce à l'utilisation de SiRNA ou d'inhibiteurs de ces enzymes. L'implication de la voie non canonique CDC37/HSP90 pourra être étudiée grâce à l'utilisation de SiRNA, en inhibant HSP90 (traitement au 17AAG) ou en bloquant l'interaction entre CDC37 et HSP90 (Withaférine A),(figure 1B).

Quel que soit le mécanisme par lequel FGFR3 active la protéine p38 $\alpha$  cela conduit à la stabilisation de l'ARNm et de la protéine MYC. La protéine HuR, quand elle est active voit sa localisation subcellulaire répartie entre le noyau et le cytoplasme. Nous avons montré dans la lignée cellulaire RT112 que dans les cellules non traitées HuR était majoritairement présente dans le noyau, mais était aussi localisée dans le cytoplasme. Nous nous sommes donc par la suite focalisés sur l'étude de l'implication de HuR dans la stabilisation de l'ARNm de MYC. La déplétion de HuR par SiRNA conduit à une perte de l'ARNm de MYC, bien qu'elle soit moins importante que celle observée suite à la déplétion des protéines FGFR3 et p38. De plus la déplétion de HuR par SiRNA conduit à une perte partielle de la protéine MYC, suggérant que HuR est aussi impliquée dans la traduction de l'ARNm de MYC en protéine. Cependant la déplétion de FGFR3 ou de p38 par SiRNA conduit à une perte de l'ARNm de MYC beaucoup plus importante que lorsque c'est HuR qui est déplétée. Ces résultats suggèrent que HuR n'est peut-être pas la seule protéine recrutée par FGFR3 à être impliquée dans la stabilisation de l'ARNm de MYC. Les protéines HNRNPU et HNRNPH2 ont été identifiées comme partenaires protéiques de FGFR3 par spectrométrie de masse (résultats chapitre II). Ces protéines se lient aux pré-ARNm dans le noyau et appartiennent à la famille des hnRNP (heterogenous-Ribo-Nuclear-Protein). Les protéines hnRNP peuvent coopérer avec HuR pour stabiliser les ARNm, et la protéine HNRNPU est décrite comme pouvant être impliquée dans la stabilisation de l'ARNm de MYC (Weidensdorfer, Stöhr, Baude, Lederer, Kohn, et al., 2009). L'étude de l'implication de la protéine HNRNPU est actuellement en cours au laboratoire. Dans le but de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation de l'ARNm de MYC, il serait intéressant d'étudier l'impact de la déplétion simultanée de HuR et HNRNPU afin de voir s'il y a un effet additif sur la perte de l'ARNm de MYC.

Au cours de cette étude nous avons également montré que cette sur-expression de MYC induite par l'expression de FGFR3 activé de manière constitutive (mutation activatrice ou protéine de fusion) induisait en retour une surexpression de FGFR3. Cependant le mécanisme par lequel MYC régule le niveau d'expression de FGFR3 reste inconnu. Deux hypothèses peuvent être avancées aux vues de l'implication connue de MYC dans la régulation transcriptionnelle directe de gènes codant et non-codant et des modes de régulation connues du niveau d'expression de FGFR3. Premièrement, l'inhibition de MYC conduit à la dégradation post-transcriptionnelle du transcrit FGFR3 par un micro-ARN dont MYC régulerait directement la transcription. Il a en effet déjà été décrit que le niveau d'ARNm de FGFR3 était régulé négativement par des micro-ARN tels que mir-99a mir-100 ou LET-7 (Blick et al., 2013; Catto et al., 2010) et que MYC peut être impliquée dans la régulation de nombreux micro-ARN, dont les micro-ARN mir99, mir100 et LET-7 (Chang et

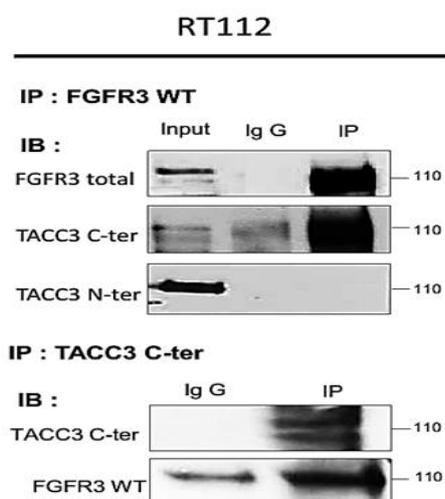
al., 2008). Cependant il a été montré dans le cas du glioblastome que le micro-ARN mir-99a qui se fixait en 3'-UTR de l'ARNm de FGFR3 afin d'induire sa dégradation ne se lie pas à la partie 3'-UTR de TACC3 présent sur l'ARNm du produit de fusion FGFR3-TACC3 et qu'ainsi il échappe à cette régulation (Parker et al., 2013). Dans notre étude, dans la lignée cellulaire RT112, la perte d'expression de MYC induit une perte d'expression de FGFR3 et de FGFR3-TACC3. Le gène de fusion exprimé dans la lignée RT112 est le même que celui retrouvé dans le glioblastome, il n'est donc pas possible que la perte de FGFR3 observée soit due à une régulation par le micro-ARN, mir 99a. Il est donc possible que la perte de MYC conduise à une régulation positive de l'expression de certains micro-ARN, dont certains pouvant être impliqués dans la régulation du transcrite de FGFR3. Toutefois nous ne pouvons pas exclure que le niveau des ARNm de FGFR3 et FGFR3-TACC3 puisse être régulé par un micro-ARN capable de se fixer à la fois sur les 3'-UTR de FGFR3 et de FGFR3-TACC3. Cela pourrait être vérifié en mesurant le taux d'ARNm de TACC3 après la déplétion de MYC par SiRNA.

La seconde hypothèse qui peut être avancée est que MYC se fixe directement sur le promoteur de FGFR3 pour induire sa transcription. En effet, il existe des sites prédits dans le promoteur de FGFR3 pour la fixation de MYC permettant d'envisager cette hypothèse d'activation transcriptionnelle directe de FGFR3 par MYC. Nous avons dans un premier temps analysé les données publiques de Chip-seq (Base N-code) concernant la fixation de MYC sur le promoteur de FGFR3 mais sans résultat. Cependant aucune expérience n'a été réalisée dans un système cellulaire exprimant fortement FGFR3. Le fait que cette information ne soit pas connue peut s'expliquer par le fait que FGFR3 est exprimé dans très peu de tissus (seulement la vessie et la peau) et donc que les expériences de Chip-seq qui auraient pu mettre cela en évidence n'ont pas été réalisées. Une étude est actuellement en cours au laboratoire pour déterminer via la méthode de Chip-QPCR si MYC se fixe sur le promoteur de FGFR3 dans les lignées cellulaires RT112 et MGH-U3.

Nous avons donc montré dans cette étude l'existence d'une boucle de rétrocontrôle positive entre le récepteur FGFR3 muté ou le récepteur FGFR3-TACC3 et MYC. Une autre protéine de fusion a été identifiée dans les tumeurs de vessie-la protéine FGFR3-BAIAP2L1, qui n'a pas été étudiée dans cette étude car elle n'avait été initialement identifiée que dans une seule lignée cellulaire dérivée d'une tumeur de vessie alors que la protéine FGFR3-TACC3 avait été observée avec une plus grande fréquence dans les tumeurs de vessie. Récemment il a été montré que la protéine de fusion FGFR3-BAIAP2L1 est également dans le cancer du poumon (Nakanishi et al., 2015). Il serait donc intéressant de réaliser la même étude dans la lignée cellulaire SW780 exprimant la protéine de fusion FGFR3-BAIAP2L1 de manière endogène, afin de déterminer si cette boucle de rétro-contrôle entre le récepteur

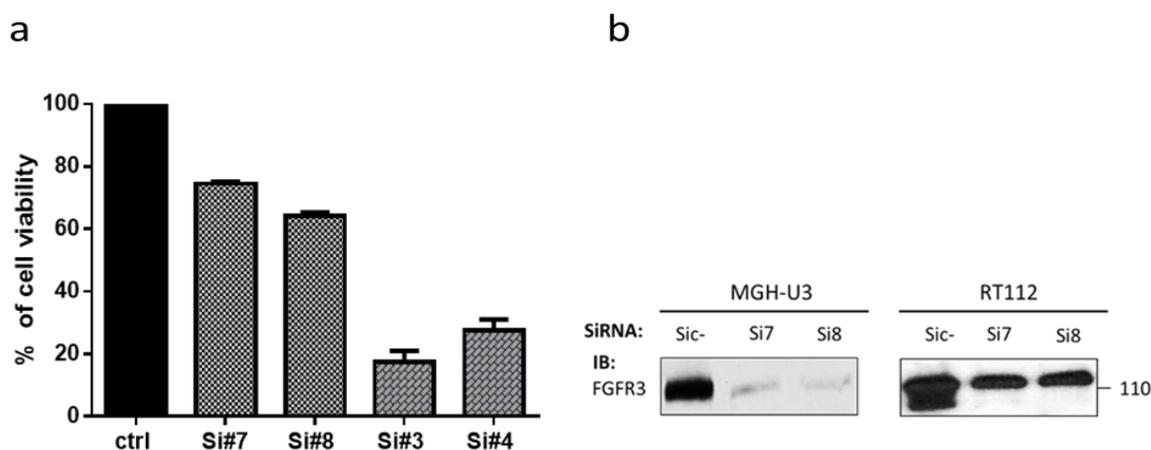
FGFR3 et MYC existe aussi dans ce cas. Il serait intéressant de voir si c'est également le cas dans d'autres types de cancer exprimant le récepteur FGFR3 muté ou les protéines de fusion FGFR3-TACC3 et FGFR3-BAIP2L1, et notamment dans le cancer du poumon, du glioblastome et dans les myélomes multiples où il a déjà été montré que le récepteur FGFR3 sauvage et MYC lorsqu'ils sont conjointement exprimé (surexpression de FGFR3) coopèrent pour induire la formation de lymphomes matures (Zingone et al., 2010).

La lignée cellulaire RT112 exprime à la fois la forme FGFR3-TACC3 et la forme sauvage du récepteur. Si dans les myélomes multiples le récepteur FGFR3 sauvage coopère avec MYC il est aussi possible que cela soit le cas dans les tumeurs de vessie. La déplétion de MYC par SiRNA dans la lignée RT112 conduit à une perte de FGFR3-TACC3 mais aussi de FGFR3, montrant ainsi que MYC régule les deux transcrits (FGFR3 et FGFR3-TACC3). Dans cette étude, les SiRNA utilisés (Si3 et 4) ciblent les deux formes du récepteur : FGFR3 et FGFR3-TACC3. Nous avons donc dans un premier temps étudié l'interaction entre les récepteurs FGFR3 sauvage et FGFR3-TACC3. Les deux formes du récepteur ayant le même poids moléculaire, nous avons réalisé une immunoprécipitation du récepteur sauvage et révélée par western blot l'interaction avec la partie C-ter ou la partie N-ter de TACC3 pour montrer que les deux formes du récepteur interagissent spécifiquement ensemble. En effet, Le fait que le récepteur FGFR3 sauvage interagisse avec la partie C-ter de TACC3 mais pas avec la partie N-ter de TACC3, ce qui montre que le récepteur sauvage interagit avec la protéine FGFR3-TACC3 mais pas avec la protéine TACC3 endogène (figure 3). Nous avons validé cette interaction en réalisant une immunoprécipitation de la partie C-ter de TACC3 et révélé par western blot son interaction avec le récepteur FGFR3 sauvage.



**FIGURE 3 : INTERACTION ENTRE LES RECEPTEURS FGFR3 SAUVAGE ET FGFR3-TACC3 DANS LA LIGNEE CELLULAIRE RT112.**

Les deux formes du récepteur (FGFR3 sauvage et FGFR3-TACC3) interagissent ensemble dans cette lignée cellulaire, suggérant que le récepteur FGFR3-TACC3 recrute et active le récepteur sauvage. Nous avons donc par la suite étudié le rôle du récepteur sauvage pour la prolifération cellulaire. Deux nouveaux SiRNA (SI 7 et 8) ont été utilisés pour dépler spécifiquement la forme sauvage du récepteur, les SiRNA 1 et 2 utilisés au cours de la première étude dans la lignée cellulaire MGH-U3 n'induisant pas une perte d'expression suffisante du récepteur FGFR3 sauvage dans la lignée cellulaire RT112. La déplétion du récepteur sauvage conduit à une inhibition de la prolifération cellulaire d'environ 25% à 35 %, en comparaison à une inhibition de la prolifération cellulaire de 75-80% lorsque les deux formes (sauvage et altéré) sont déplétées (figure 4). Ces résultats suggèrent que le récepteur FGFR3 sauvage possède des propriétés oncogéniques dans le contexte où il est exprimé conjointement avec la protéine de fusion FGFR3-TACC3.

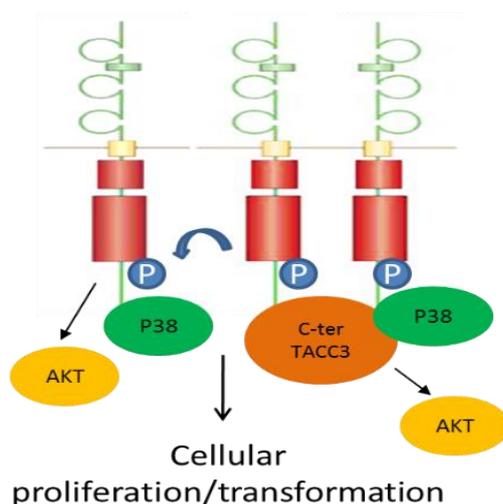


**FIGURE 4 : ETUDE DE L'IMPACT DE LA DEPLETION DU RECEPTEUR FGFR3 SAUVAGE SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE DANS LA LIGNEE CELLULAIRE RT112.**

(a) La déplétion du récepteur sauvage impact sur la prolifération cellulaire. Le récepteur FGFR3 sauvage a été déplété avec les SiRNA 7 et 8. Les SiRNA 3 et 4 ciblent à la fois la forme FGFR3-TACC3 et la forme FGFR3 sauvage. La prolifération cellulaire a été mesurée par un test MTT, 72h après transfection. (b) Validation de la déplétion de FGFR3 par les SiRNA 7 et 8 dans les lignées MGH-U3 et RT112. Les cellules MGH-U3 et RT112 ont été transfectées avec les SiRNA 7 et 8. Le lysat protéique a été extrait 72h après la transfection. La déplétion de FGFR3 dans les lignées cellulaires MGH-U3 et RT112 a été étudiée par western blotting.

Ces résultats permettent de proposer un modèle selon lequel, le récepteur FGFR3-TACC3 interagit avec le récepteur FGFR3 sauvage pour le phosphoryler et l'activer, selon un

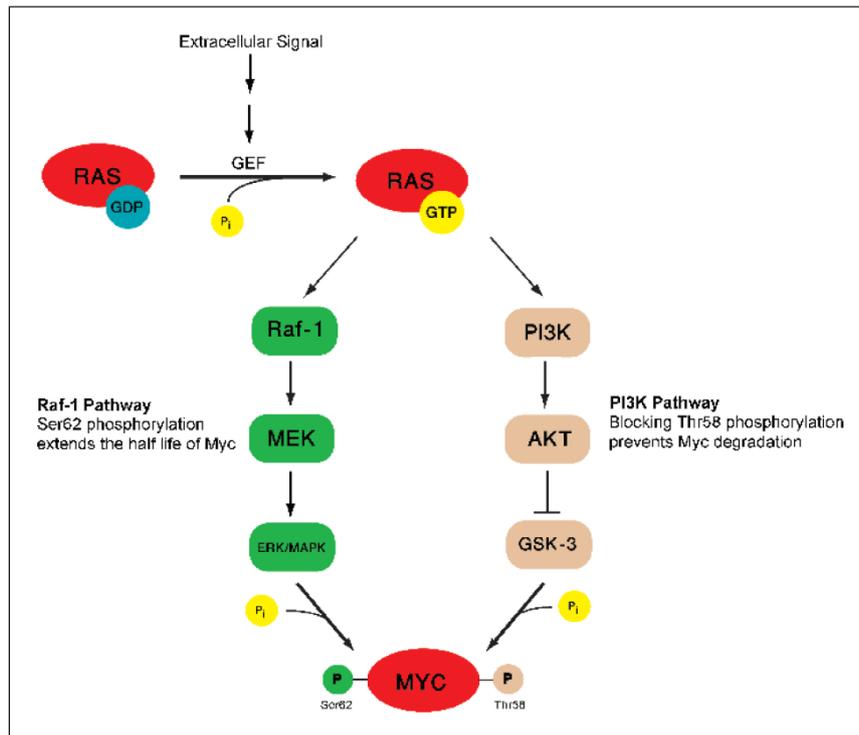
modèle FGFR3 WT/FGFR3-TACC3 1 :2 ou FGFR3 WT/FGFR3-TACC3 2 :2. L'activation permanente du récepteur FGFR3-TACC3 conduit à une activation aberrante du récepteur FGFR3 sauvage (figure 64). Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de la déplétion du récepteur FGFR3 sauvage sur l'activation des protéines p38 et AKT mais aussi sur la stabilisation de la protéine MYC.



**FIGURE 5 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU RECRUTEMENT ET DE L'ACTIVATION DU RECEPTEUR FGFR3 SAUVAGE PAR LE RECEPTEUR FGFR3-TACC3 ET AMPLIFICATION DE L'ACTIVATION DES VOIES DE SIGNALISATION DES PROTEINES P38 ET AKT**

Les mutations de RAS et de FGFR3 sont mutuellement exclusives dans les tumeurs de vessie. L'hypothèse la plus souvent avancée pour expliquer cette observation est l'appartenance de RAS aux voies de signalisation de FGFR3, suggérant que l'activation de RAS muté ou de FGFR3 muté dans les carcinomes de vessie a les mêmes conséquences. Cependant cette hypothèse n'a jamais clairement été démontrée. Dans le glioblastome RAS est impliqué dans la stabilisation de la protéine NMYC via l'activation de deux voies de signalisation. La voie PI3K/AKT et la voie RAF/MEK/ERK. L'activation de la voie PI3K/AKT conduit à l'inhibition de la protéine GSK3 $\beta$  (AKT phosphoryle GSK3 $\beta$  sur la ser9). La protéine GSK3 $\beta$  étant inactive, elle ne peut plus promouvoir la dégradation par le protéasome de la protéine MYC qui est alors stabilisée. L'activation de la voie RAF/MEK/ERK conduit, elle aussi, à une stabilisation de la protéine MYC en induisant l'allongement du temps de demi-vie de MYC, en phosphorylant MYC sur la sérine 62 (figure 6). De manière intéressante, la voie PI3K/AKT conduisant à l'inhibition de GSK3 $\beta$  et empêchant la dégradation par le protéasome de la protéine MYC, est aussi activée par le récepteur FGFR3 altéré dans les tumeurs de vessie. Concernant la voie RAF/MEK/ERK, l'étude réalisée dans les NIH3T3 a montré que les protéines ERK1/2 n'étaient pas

différentiellement activées lorsque les cellules expriment le récepteur sauvage ou le récepteur muté, indépendamment d'une stimulation au ligand FGF1. Cependant l'activation de ERK1/2 n'a pas été réalisée dans les lignées cellulaires RT112 et MGH-U3, il n'est donc pas possible d'affirmer dans le cas présent que cette voie n'est pas impliquée dans la boucle FGFR3/MYC. Dans cette étude, nous avons par contre montré l'implication d'une autre voie MAPKinase, celle de la protéine p38 qui est impliquée dans la stabilisation de l'ARNm de MYC.



**FIGURE 6: STABILISATION DE LA PROTEINE MYC VIA L'ACTIVATION DES VOIES DE SIGNALISATION PI3K/AKT ET RAK/MEK/ERK PAR RAS (Bachirredy, Bendapudi, & Felsher, 2005; Yaari et al., 2005)**

Afin de savoir si les mutations de RAS et de FGFR3 conduisent à l'activation des mêmes voies de signalisation, il serait intéressant de réaliser la même étude que celle effectuée au cours de cette thèse mais dans une lignée RAS mutée, qui ne présente pas d'altération du gène FGFR3. Ainsi cette étude pourrait être réalisée dans la lignée cellulaire T24 qui répond à ces critères. Nous avons déjà montré dans cette même lignée cellulaire que p38 est phosphorylé et que l'inhibition de p38 (traitement au SB203580) a un impact négatif sur la prolifération et la transformation cellulaire. Cependant l'étude de la phosphorylation d'AKT n'a pas été réalisée.

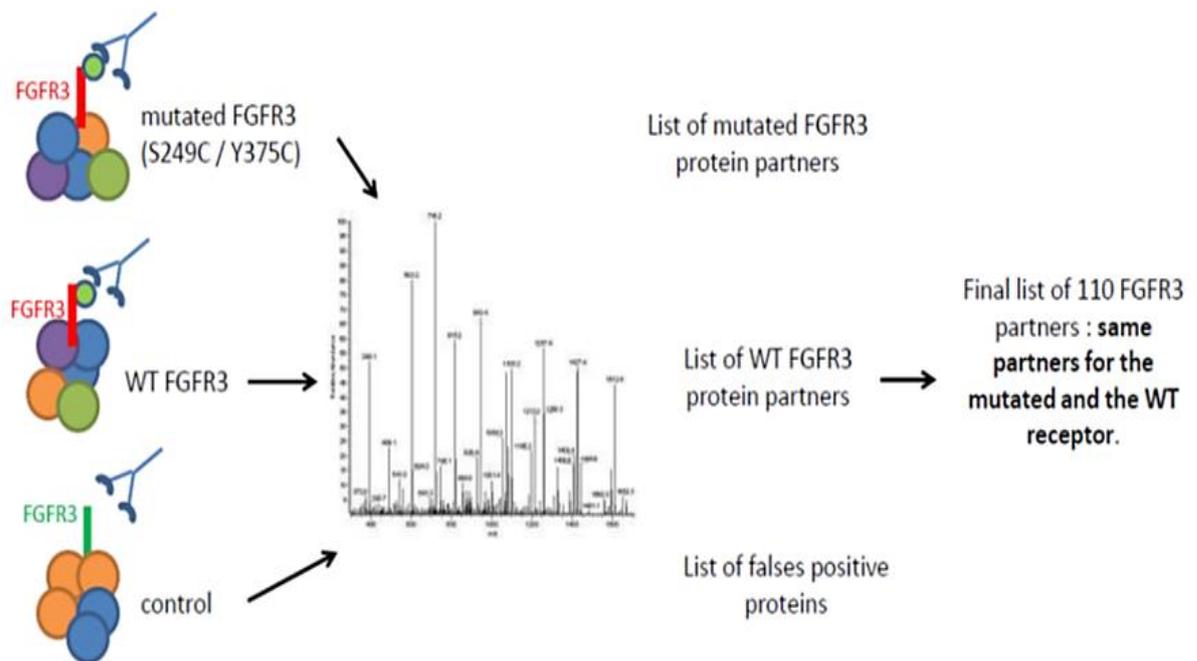
## CHAPITRE II : IDENTIFICATION DU RESEAU D'INTERACTION DE FGFR3

### 2.1 INTRODUCTION

L'étude des voies de signalisation du récepteur FGFR3 muté ou FGFR3-TACC3 réalisée au cours de cette thèse a permis de mettre en évidence l'implication des protéines p38 et AKT dans le maintien d'une boucle de rétrocontrôle entre FGFR3 et MYC, permettant d'expliquer en partie les propriétés oncogéniques du récepteur FGFR3 muté ou FGFR3-TACC3 dans les carcinomes de vessie. Cependant de nombreuses voies de signalisation activées par le récepteur FGFR3 restaient à caractériser. C'est pourquoi, nous avons décidé de mettre en place une seconde stratégie visant à identifier l'interactome de FGFR3. Pour cela nous avons tiré parti d'une étude de protéomique précédemment réalisée au laboratoire.

Cette étude avait pour but d'identifier les partenaires protéiques de FGFR3 par spectrométrie de masse (Aubertin, 2009). Le récepteur FGFR3 sous forme sauvage, muté S249C ou muté Y375C, portant un flag-tag avait été transfecté dans la lignée cellulaire RT112. Cette lignée a été choisie car c'est une lignée cellulaire dérivée d'une tumeur de vessie exprimant uniquement le récepteur FGFR3 sauvage (il n'était pas connu que cette lignée exprimait aussi le récepteur FGFR3-TACC3). La surexpression par transfection du récepteur sauvage ou muté dans cette lignée avait pour but de permettre d'immunoprécipiter les partenaires protéiques du récepteur dans des quantités suffisantes pour pouvoir les identifier correctement lors de l'analyse par spectrométrie de masse. Une immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps anti-flag a été réalisée pour chaque condition (S249C, Y375C, sauvage), suivi d'une élution des protéines interagissant avec le récepteur à l'aide d'un peptide flag puis d'une analyse par spectrométrie de masse (LC MS/MS) permettant ainsi d'identifier des partenaires protéiques du récepteur FGFR3 muté ou sauvage. Le récepteur FGFR3 sauvage non flagé a servi de contrôle (figure 1). Les expériences de spectrométrie de masse réalisées à partir du récepteur sauvage ont été réalisées 3 fois, celles réalisées à partir du récepteur FGFR3 muté (S249C ou Y375C) ont été réalisées 8 fois (4 fois pour le récepteur FGFR S249C et 4 fois pour le récepteur FGFR3 Y375C). Certaines interactions (interactions moins fortes ou de courte durée, pouvant être éventuellement dépendantes de l'état des cellules) étant difficiles à mettre en évidence, il était donc nécessaire de multiplier les expériences afin d'optimiser la reproductibilité des résultats. Les interactions impliquant les protéines Rab par exemple, impliquées dans le trafic cellulaire sont connues pour être transitoires. Après analyse par spectrométrie de masse des protéines co-immunoprécipitées avec le récepteur FGFR3, une liste de 1904

protéines candidates a été obtenue. Pour identifier les partenaires protéiques de FGFR3 plusieurs filtres ont été appliqués. Les protéines identifiées par spectrométrie de masse avec un ou plusieurs peptides dans les expériences contrôles ont été éliminées ainsi que celles identifiées avec moins de trois peptides (pour augmenter la stringence). Une liste finale de 110 partenaires protéiques a ainsi été établie.



**FIGURE 1: METHODE D'IDENTIFICATION DES PARTENAIRES PROTEIQUE DE FGFR3 SAUVAGE ET MUTE PAR IMMUNOPRECIPITATION ET ANALYSE MS/MS**

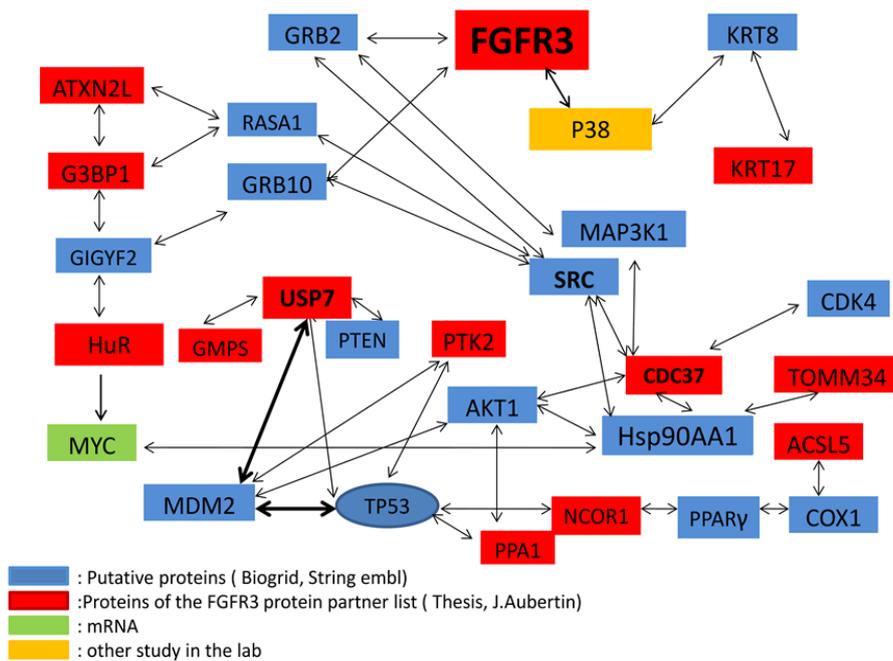
Le récepteur FGFR3 sauvage ou muté (S249C ou Y375C) portant un flag tag a été transfectée dans la lignée cellulaire RT112. Par la suite une Immunoprecipitation du Flag-Tag a été réalisée. Le contrôle utilisé est le récepteur FGFR3 non flagé. Les protéines immunoprécipitées ont été identifiées par LC MS/MS. Une première liste de 110 partenaires protéiques de FGFR3 a ainsi pu être établie (Thèse J.Aubertin, 2009).

## 2.2 RESULTATS

### **Construction du réseau d'interaction de FGFR3**

Pour étudier le réseau d'interaction du récepteur FGFR3 deux approches pouvaient être initialement envisagées: l'étude une à une des protéines de cette liste de 110 protéines, en commençant par les protéines pouvant expliquer les propriétés oncogéniques du récepteur ou la construction d'un réseau d'interaction de FGFR3 manuellement à partir de cette liste

en l'enrichissant grâce aux bases de données d'interactions protéiques. Dans le but d'identifier l'interactome de FGFR3 nous nous sommes focalisés sur la seconde approche. Notre approche manuelle initiale ne permettait pas d'étudier l'ensemble des 110 protéines, les partenaires protéiques de FGFR3 ont donc été sélectionnés en fonction de leur « score », c'est-à-dire le nombre de fois où l'on retrouve chaque protéine dans les différentes expériences d'immunoprécipitation (11 au total). Nous avons considéré les protéines qui ont un score supérieur ou égal à 4/11 permettant ainsi de sélectionner 26 protéines partenaires de FGFR3. Ces 26 partenaires protéiques avaient été immunoprécipités aussi bien avec le récepteur muté qu'avec le récepteur sauvage, et donc n'étaient pas spécifique de l'une des formes du récepteur. A partir de cette liste de 26 partenaires, grâce à des bases de données d'interactions protéiques et des données de la littérature nous avons pu rajouter des protéines putatives et faire le lien entre les 26 protéines sélectionnées proposer un réseau impliquant FGFR3. Ce réseau comprend 13 des 26 protéines sélectionnées et 15 protéines putatives. Pour faire le lien entre deux protéines partenaires de FGFR3, deux protéines putatives au maximum ont été rajoutées afin de limiter le risque d'introduire de « fausses » interactions (figure 2). Au sein du réseau ainsi obtenu se dégage plusieurs sous-réseaux qui correspondent de manière intéressante à certaines voies de signalisation. C'est le cas notamment du sous-réseau NCOR1/PPAR $\gamma$ /COX1/ACSL5 impliqué dans le métabolisme lipidique et l'inflammation (les protéines identifiées au cours de l'expérience initiale d'immunoprecipitation sont soulignées). Le sous-réseau USP7/GMPS/TP53/MDM2 est impliqué dans la réparation des dommages à l'ADN et l'apoptose, et sur lequel nous reviendrons plus en détails par la suite. Parmi les sous-réseaux d'intérêt on trouve le sous-réseau CDC37/HSP90AA1 pour lequel il a récemment été montré qu'il était impliqué dans la stabilisation du récepteur FGFR3. En effet, l'inhibition de CDC37 comme de HSP90AA1 conduit à une dégradation rapide du récepteur (Laederich, Degrin, Lunstrum, Holden, & Horton, 2011). Le fait que nous retrouvions via cette méthode des données déjà existantes valide notre approche.



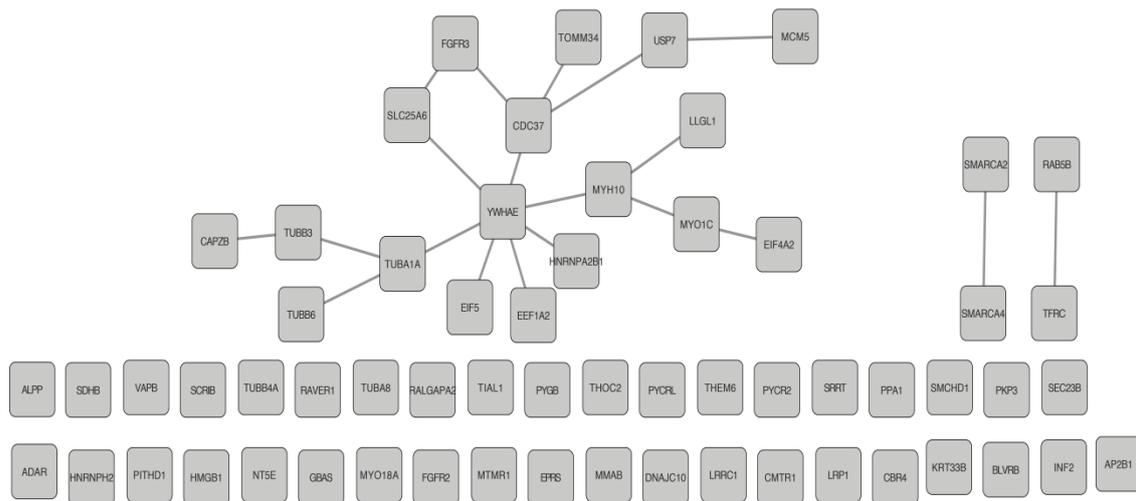
**FIGURE 2: RESEAU D'INTERACTION PROTEIQUE DU RECEPTEUR FGFR3 CONSTRUIT MANUELLEMENT A PARTIR DE LA LISTE DES 110 PARTENAIRES PROTEIQUES IDENTIFIES INITIALEMENT ET DES BASES DE DONNEES D'INTERACTIONS PROTEIQUES.**

Les protéines en **rouges** sont celles identifiées par spectrométrie de masse et faisant partie de la liste des 26 partenaires protéiques de FGFR3 sélectionnées, elles sont au nombre de 13 dans le réseau. Les protéines en **bleu** sont des protéines putatives qui font le lien entre les différentes protéines partenaires de FGFR3. Les flèches indiquent les interactions connues. La protéine p38 a été rajoutée au réseau car l'étude présentée précédemment dans cette thèse a permis de l'identifier comme partenaire protéique de FGFR3. Il en va de même pour l'ARNm de MYC pour lequel nous avons démontré qu'il est régulé par le pathway FGFR3/P38/HuR.

### **Nécessité d'utiliser une méthode automatique pour construire le réseau de FGFR3**

La construction d'un réseau d'interaction semble donc être une bonne approche pour identifier le réseau d'interaction du récepteur FGFR3. En effet, l'approche manuelle développée ici a conduit à l'identification d'un sous-réseau connu et de certains sous-réseaux permettant de caractériser des voies de signalisation activées par le récepteur FGFR3. Cependant cette approche est limitée. En effet, nous avons été obligé de sélectionner 26 protéines parmi une liste de 110 partenaires protéiques passant donc à coté de nombreuses interactions qui pourraient permettre d'identifier d'autres sous-réseaux clés pour la compréhension des mécanismes pro-tumoraux régulés par FGFR3. De plus, pour construire ce réseau, les protéines et leurs interactions sont étudiées une à une dans les bases d'interactions protéiques (String, Embl) ce qui représente donc très rapidement

une limitation « humaine » à plusieurs niveaux (temps pour analyser ces interactions connues, choix parfois orienté de certaines protéines putatives). La construction manuelle de ce réseau ne peut donc pas être aussi exhaustive que si elle avait été réalisée de manière automatique. C'est donc pour ces raisons que nous avons entrepris de construire ce réseau via une méthode bio-informatique. Nous avons d'abord de nouveau analysé les données obtenues par spectrométrie de masse via la base de données Uniprot dont les identifiants correspondant à une protéine donnée sont ceux repris par les bases de données d'interaction protéique, ce qui devait permettre par la suite de pouvoir aisément interroger les bases de données d'interaction protéique sans que se pose le problème de non reconnaissance du nom d'un gène dans ces bases. A partir de la nouvelle liste de partenaires protéique de FGFR3 ainsi obtenue nous avons sélectionné les protéines pour lesquelles on estime avec une grande confiance qu'elles sont des partenaires protéiques de FGFR3. Ainsi, seul les protéines identifiées avec au moins 3 peptides par expérience et aucun peptide dans l'expérience contrôle dans au moins 2 expériences d'immunoprécipitation (IP-MS) ont été sélectionnées. Nous avons choisi la limite basse de 3 peptides pour sélectionner les protéines afin de s'assurer de « l'identité » des protéines sélectionnées et le fait que 3 peptides soient retrouvés dans au moins 2 expériences permet de s'assurer que les protéines sélectionnées comme partenaire de FGFR3 ne sont pas des faux-positifs. Suite à l'application de ces filtres nous avons ainsi obtenu une liste finale de 60 partenaires protéiques de FGFR3. Les interactions protéiques entre les protéines de cette liste ont été analysées par la suite dans la base de données d'interactions protéiques HIPPIE. Cependant le nombre d'interactions directes retrouvé par cette analyse entre ces 60 protéines est faible (figure 3), seulement 20 interactions en ressortent, dont deux interactions connues pour FGFR3, les interactions FGFR3-SLC25A6 et FGFR3-CDC37. Cette liste des 60 protéines identifiées avec une grande confiance comme partenaire protéique de FGFR3 n'étant pas suffisante pour construire le réseau d'interaction de FGFR3, un algorithme a été développé pour résoudre ce problème en proposant comme solution d'étendre le réseau en introduisant des protéines putatives.



**FIGURE 3: INTERACTIONS PREDITES PAR LA BASE D'INTERACTIONS PROTEIQUES HIPPIE ENTRE FGFR3 ET LES 60 PROTEINES IDENTIFIEES COMME PARTENAIRES PROTEIQUES DE FGFR3 AVEC UNE GRANDE CONFIANCE.**

Cet algorithme est l'algorithme PEPPER, co-développé par un étudiant en bio-informatique au laboratoire (Rémy Nicolle) (Winterhalter et al., 2014). PEPPER (Protein complex Expansion using Protein-Protein IntERaction) est une application de Cytoscape créée pour identifier des réseaux protéiques denses à partir d'expériences d'immunoprécipitation (liste de partenaires protéiques identifiés par spectrométrie de masse) et des réseaux d'interactions protéiques déjà connus (PPI network). C'est le seul algorithme disponible actuellement qui permet d'intégrer des interactions déjà connues à des expériences de spectrométrie de masse. Généralement les interactions protéiques sont étudiées soit à partir de réseaux d'interactions déjà connus, soit à partir de très grands jeux de données obtenus par IP-MS. PEPPER connecte des sous-réseaux entre eux grâce à une optimisation prenant en compte deux paramètres qui chacun pris séparément conduisent à deux solutions optimales différentes (optimisation multi-objective) :

- La couverture : la solution finale doit contenir le maximum de protéines possibles identifiées par spectrométrie masse.
- La densité : Les protéines doivent être le plus connecté possible dans une solution en se basant sur les interactions connus dans un protéome large.

Le fonctionnement du module d'extension PEPPER est présenté ci-après (figure 4) :

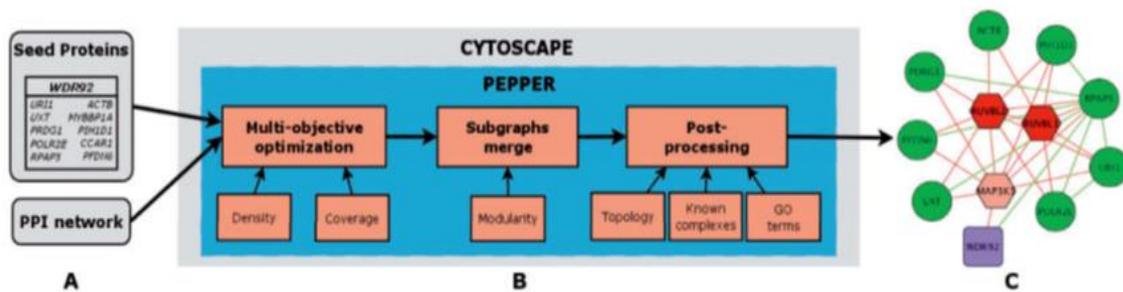
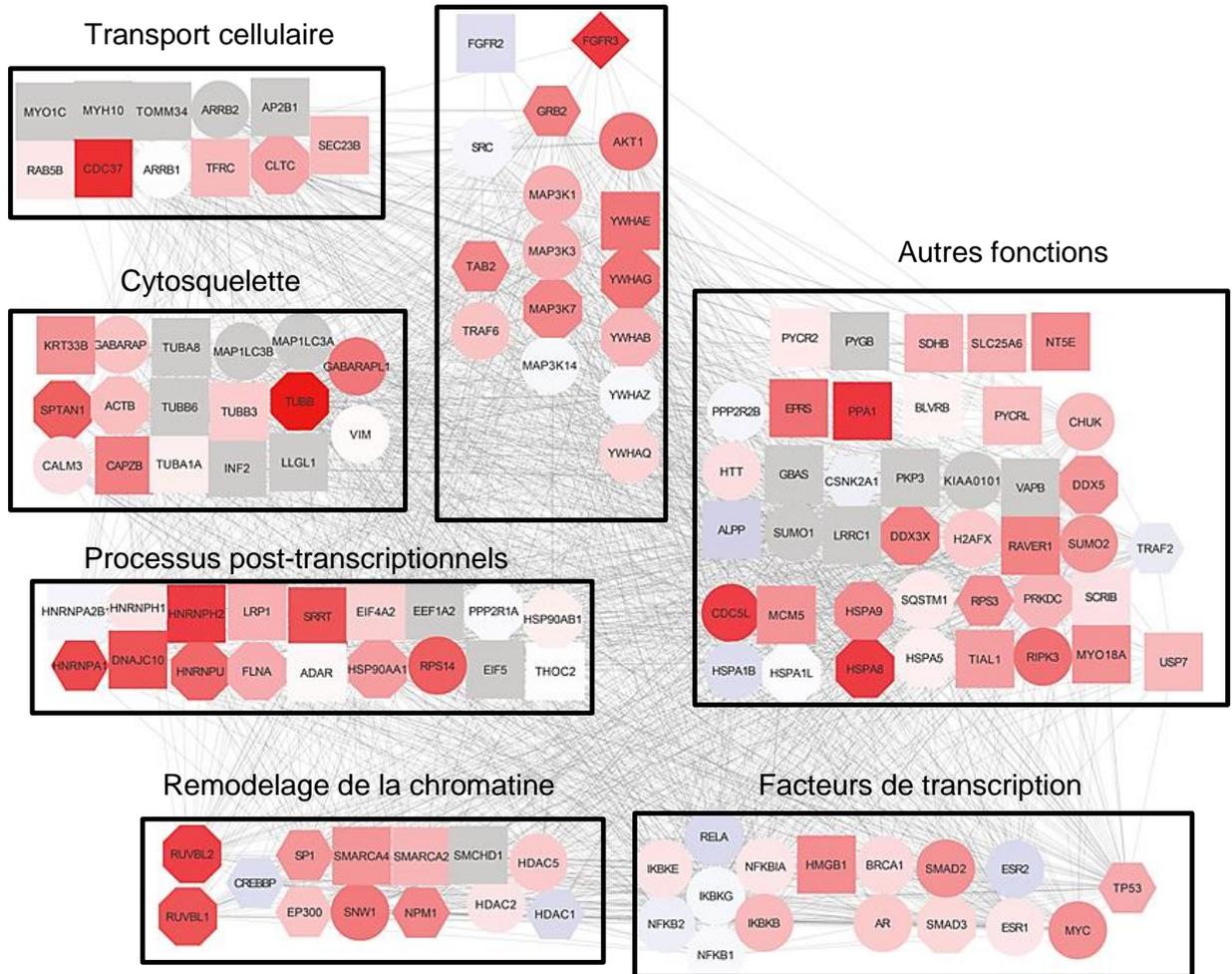


FIGURE 4 : REPRESENTATION DU MODULE D'EXTENSION (PLUG-IN) PEPPER (Winterhalter et al., 2014).

(A) Données issues des expériences de spectrométrie de masse et des interactions protéiques humaines connues (PPI network). (B) Analyse de l'ensemble de ces données dans l'algorithme PEPPER. Optimisation multiobjectif via les fonctions de couverture et de densité. Construction de la solution finale (réseau) se faisant grâce à la connexion sous-réseaux identifiées à partir des données des expériences de spectrométrie de masse et d'interactions protéiques déjà identifiées dans un protéome large. (C) Solution finale : réseau d'interaction obtenu après analyse des données par PEPPER. La protéine représentée ici en violet (WDR92) est celle dont on veut déterminer le réseau d'interaction, les protéines représentées en vert sont celles identifiées comme partenaires protéique de la protéine violette par MS/MS. Les protéines représentées en rouge et orange sont celles rajoutées par PEPPER. Les deux protéines en rouge sont les protéines prédites avec une haute pertinence comme faisant partie du réseau de WDR92.

C'est donc à partir de cette méthode (figure 4) que le réseau de signalisation de FGFR3 a été construit. De manière intéressante, parmi les nouvelles protéines ajoutées au réseau de FGFR3 par PEPPER on retrouve des protéines identifiées dans les différentes expériences de spectrométrie de masse comme des faux négatifs, éliminés suite à l'application des filtres (protéines identifiées avec moins de 3 peptides par expérience, ou 1 peptide dans l'expérience contrôle). Ainsi le réseau obtenu grâce à l'algorithme PEPPER comprend 136 protéines dont 57 des 60 protéines « grande confiance », reliées entre elles par 1738 interactions (figure 5). De manière intéressante, 38 des 79 protéines putatives rajoutées par PEPPER sont des protéines identifiées par spectrométrie de masse comme partenaires protéique de FGFR3, dans les expériences d'immunoprécipitations. Les données de Gene Ontology (qui permettent de regrouper les protéines par rapport à une fonction cellulaire donnée) et des données du projet Achille (projet visant à par un screen ShRNA à identifier les protéines codées par des gènes identifiés comme essentiels pour la viabilité cellulaire, RT112 faisant partie des lignées cellulaires utilisées pour ce projet) ont permis de montrer la pertinence de ce réseau.

## MAPK et RTK



**FIGURE 5 : RESEAU DE SIGNALISATION DE FGFR3 (OBTENU AVEC PEPPER)**

Réseau d'interaction protéique prédit des voies de signalisation du récepteur FGFR3. Les protéines ont été regroupées par fonction cellulaire. Les nœuds ont été établis en fonction de leur identification par spectrométrie de masse et colorés en fonction de leur impact sur la survie cellulaire (données du projet AChille du Broad Institute, ShRNA dans la lignée cellulaire RT112), en utilisant un gradient allant du rouge au bleu. **Rouge**: protéines identifiées avec une haute confiance comme ayant un impact sur la survie cellulaire; **Bleu**: basse confiance; **Gris**: pas de données. Les **protéines représentées sous forme de carrés** ont été identifiées avec une haute confiance comme partenaires protéiques de FGFR3, avec au moins 3 peptides uniques retrouvés dans au moins deux expériences et aucun dans les expériences contrôles. Les **hexagones** sont les protéines identifiées avec moins de 3 peptides par expérience et aucun peptide dans les expériences contrôle. Quant aux **octogones**, ils diffèrent des hexagones de par le fait que des peptides ont été retrouvés dans les expériences contrôles. Finalement les **protéines rondes** sont celles pour lesquelles aucun peptide n'a été retrouvé dans les expériences après immunoprecipitation de FGFR3 et analyse par MS/MS.

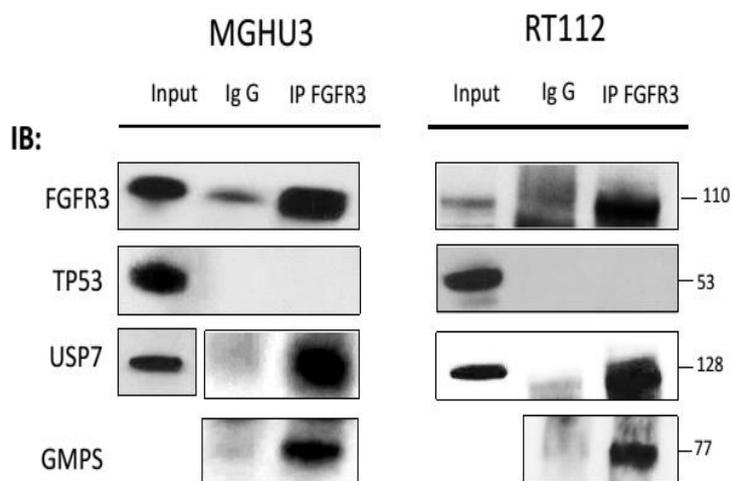
### ***Etude du sous-réseau FGFR3/USP7/TP53***

La construction du réseau de signalisation de FGFR3 via l'algorithme PEPPER permet de visualiser un nombre important de voies de signalisation potentiellement régulées par le récepteur FGFR3 altéré. De manière intéressante l'activation de certaines de ces voies aboutit au recrutement de facteurs de transcription, dont le facteur MYC, rejoignant ainsi les résultats obtenus lors de la première étude réalisée au cours de cette thèse. Parmi ces facteurs de transcription on trouve de manière surprenante la protéine TP53, qui dans ce réseau interagit avec la protéine USP7. Nous nous sommes donc focalisés sur l'étude du sous-réseau FGFR3/USP7/TP53 afin d'examiner si cette participation putative de TP53 dans le réseau d'interaction de FGFR3 était compatible avec les données de la littérature et avec nos propres données.

La protéine USP7, aussi appelée HAUSP, est une déubiquitylase impliquée dans la stabilisation de TP53 et de MDM2 (C. Brooks, Li, Hu, Shi, & Gu, 2013). USP7 est activée par la protéine GMPS (Faesen et al., 2011), qui n'apparaît pas dans le réseau de signalisation de FGFR3 mais que nous avons initialement identifiée comme partenaire protéique de FGFR3 par spectrométrie de masse dans les expériences d'immunoprécipitations. La protéine MDM2 peut ubiquityler TP53 pour induire la dégradation protéasomale de cette dernière (Fang, Jensen, Ludwig, Vousden, & Weissman, 2000). MDM2 est de plus capable de s'auto-ubiquityler pour être envoyé vers le protéasome, USP7 peut inhiber cette ubiquitylation conduisant à la stabilisation de MDM2 et indirectement la dégradation protéasomale de TP53 (Cummins & Vogelstein, 2004). USP7 peut dé-ubiquityler TP53 lorsque la protéine est présente dans le cytoplasme sous forme mono-ubiquitylée afin d'induire son import nucléaire où elle sera dégradée par le protéasome via la protéine MDM2 (Dai & Gu, 2010). Plusieurs études ont effectivement montré que la déplétion ou l'inhibition d'USP7 conduisait à la stabilisation de TP53. Dans ce cas USP7 agit donc comme un oncogène en déstabilisant TP53. Cependant il a été montré qu'USP7 peut induire la stabilisation de TP53 même lorsque MDM2 est présent en forte concentration en déubiquitylant TP53 conduisant ainsi à un arrêt de croissance cellulaire. Dans ce cas USP7 joue le rôle de suppresseur de tumeur (M. Li et al., 2002). Il est donc difficile à partir de ces résultats opposés d'émettre une hypothèse quant au rôle de suppresseur de tumeur ou d'oncogène que pourrait jouer USP7 dans le contexte des voies de signalisation activées par FGFR3.

Afin de mieux connaître l'implication possible de ce sous-réseau d'interactions nous avons dans un premier temps étudié par immunoprécipitation les interactions entre FGFR3 et les protéines TP53, USP7 et GMPS. Ces immunoprécipitations ont été réalisées dans les

lignées cellulaires MGH-U3 (FGFR3 Y375C) et RT112 (FGFR3-TACC3) qui expriment le récepteur FGFR3 altéré de manière endogène. L'interaction de FGFR3 avec les protéines TP53, USP7 et GMPS après immunoprécipitation de FGFR3 a été révélée par western blot. Les interactions entre FGFR3 avec USP7 et FGFR3 et GMPS ont ainsi été validées dans les lignées cellulaires MGH-U3 et RT112. Cependant FGFR3 n'interagit pas avec TP53. Le gène *TP53* n'est pas muté dans les lignées MGH-U3 et RT112 et il est clairement exprimé (figure 6). On ne sait cependant pas si P53 est sous forme active ou inactive et si FGFR3 régule son activité.

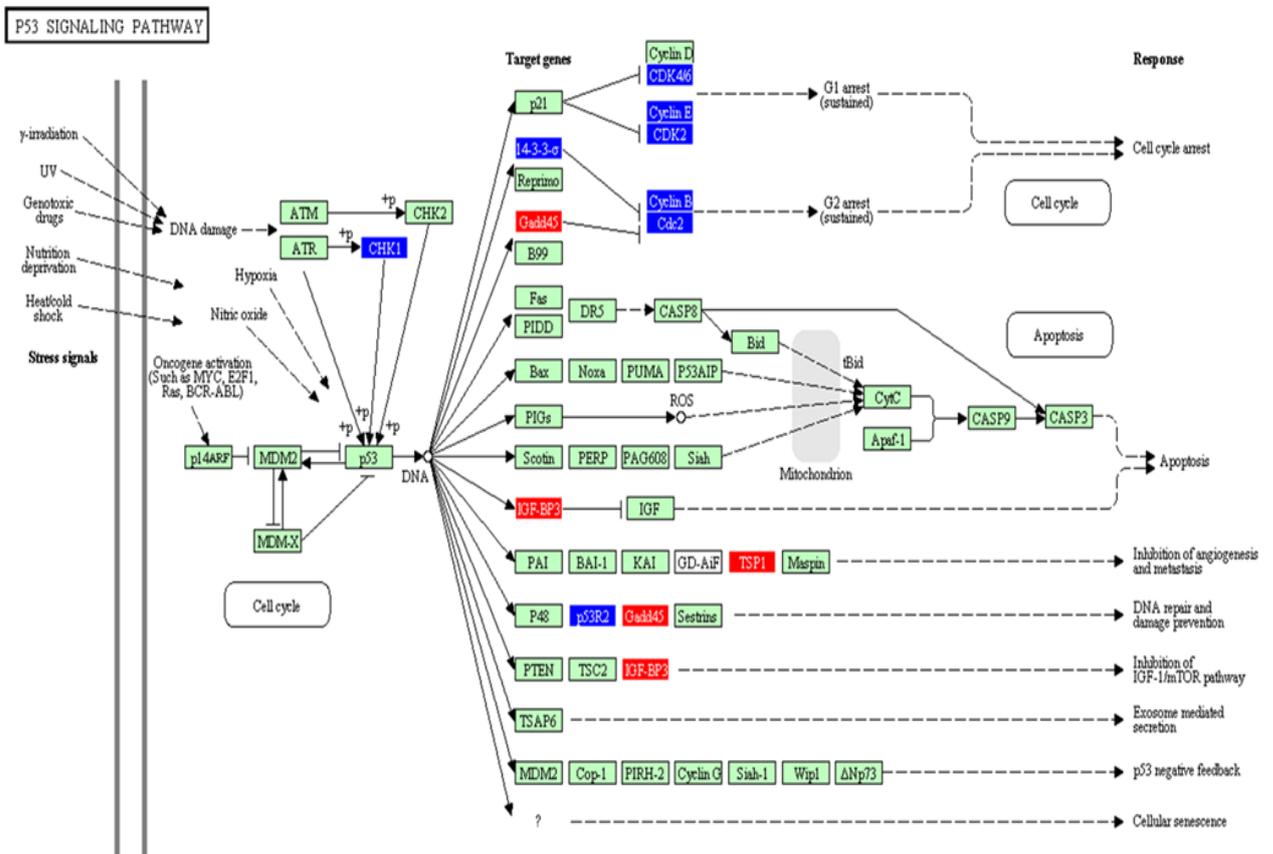


**FIGURE 6 : VALIDATION DU SOUS-RESEAU DE P53 DANS LES LIGNEES CELLULAIRES MGH-U3 ET RT112**

*Le récepteur FGFR3 muté et le récepteur FGFR3-TACC3 interagissent spécifiquement avec les protéines UPS7 et GMPS mais pas avec la protéine TP53. De manière surprenante la protéine TP53 est bien présente dans les deux lignées cellulaires, mais il n'est pas possible de dire si ça présence est totale ou partielle (due à une dégradation).*

L'analyse de l'impact de la déplétion de FGFR3 (SiRNA), dans la lignée MGH-U3, sur le transcriptome (obtenu en utilisant les puces à ADN U133 plus) a été réalisée avec le logiciel DAVID dans le but d'identifier les voies de signalisation régulées par le récepteur FGFR3. Cette analyse montre que le pathway de TP53 ressort comme étant activé après la déplétion de FGFR3, suggérant que l'activation du récepteur FGFR3 altéré conduit à l'inhibition du pathway de TP53. Les voies de signalisation régulées par TP53 qui sont

modulées suite à la déplétion de FGFR3 sont notamment : le cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation des dommages à l'ADN (figure 7).

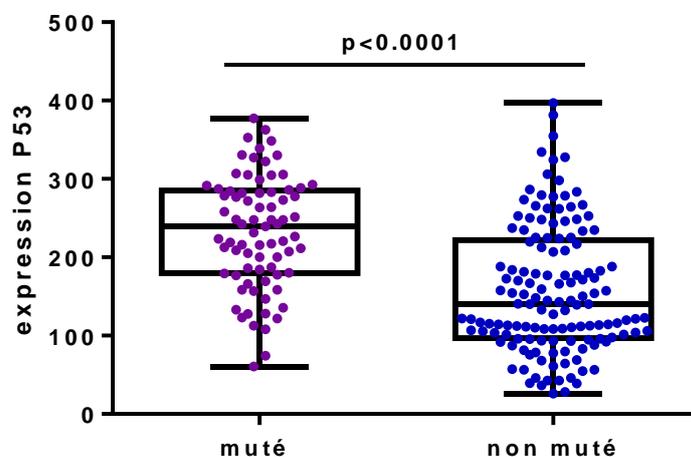


**FIGURE 7 : IMPACT DE LA DEPLETION DE FGFR3 SUR LE PATHWAY DE P53 DANS LA LIGNEE CELLULAIRE MGH-U3 ET ANALYSE DANS DAVID.**

La déplétion par siRNA de FGFR3 et l'analyse des conséquences sur les voies de signalisation en utilisant le logiciel DAVID montrent que le pathway de P53 est dans ce cas activé, on observe notamment une régulation négative des cyclines CDK4, CDK2 et de la cycline E via p21, mais aussi de CDC2 et de la cycline B due à une augmentation de l'expression de GADD45. Cette régulation positive de GADD45 est aussi impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN. On observe de plus une régulation positive d'IGFBP3 impliqué dans l'activation de l'apoptose et de l'inhibition du pathway IGF1/mTOR et du gène TSP1 impliqué dans l'inhibition de l'angiogénèse et de la formation de métastases. Ces observations semblent montrer que FGFR3 régule négativement l'activation de ces voies anti-tumorales.

Nous avons donc voulu savoir par la suite s'il existait un lien entre TP53 et le récepteur FGFR3 muté dans les tumeurs de vessie. Nous disposons pour cela d'une analyse

transcriptomique des échantillons de tumeurs de vessie réalisée au laboratoire. Il en ressort que le gène *TP53* est plus fortement exprimé dans les échantillons FGFR3 mutés, aux tumeurs non mutées FGFR3 (figure 8).



**FIGURE 8 : EXPRESSION DE *TP53* EN FONCTION DU STATUT MUTATIONNEL DE *FGFR3* DANS LES ECHANTILLONS DE TUMEURS DE VESSIE (PUCE EXON)**

## 2.3 DISCUSSION

Le but de cette étude était de construire l'interactome de FGFR3. Pour cela nous avons tiré parti d'une étude précédemment réalisée au laboratoire qui avait permis d'identifier les partenaires protéiques du récepteur FGFR3 sauvage et FGFR3 muté (S249C et Y375C) dans un modèle cellulaire de tumeur de vessie, la lignée RT112. Après analyse des données de spectrométrie de masse, une première liste de 110 partenaires protéiques avait été obtenue. Etonnement, cette liste était commune au récepteur sauvage et au récepteur muté (quel que soit la mutation : Y375C ou S249C). Nous pensions donc que nous n'avions pas réussi à mettre en évidence de différence entre les voies de signalisation du récepteur muté et celles du récepteur sauvage. Par la suite la mise en évidence de la présence du récepteur FGFR3-TACC3 dans la lignée cellulaire RT112 a permis d'apporter un élément de réponse à cette observation. Nous avons en effet montré dans la première étude réalisée au cours de cette thèse que les récepteurs sauvage et FGFR3-TACC3 interagissent. Il est donc probable que le récepteur sauvage portant un flag-tag interagisse avec le récepteur FGFR3-TACC3, et que les protéines co-immunoprécipitées avec le récepteur FGFR3 sauvage flag-tagué soient en réalité celles recrutées par le complexe FGFR3-

TACC3/FGFR3 sauvage flag-tag. Ceci expliquerait que la liste des 110 partenaires protéiques soit strictement la même entre le récepteur sauvage et le récepteur muté. Il sera donc nécessaire de refaire ces expériences de spectrométrie de masse dans une lignée cellulaire n'exprimant pas le récepteur FGFR3 altéré.

Nous avons cependant pu tirer parti de cette liste de 110 partenaires protéiques en construisant manuellement un premier réseau d'interaction protéique dans le but de mieux caractériser les voies de signalisation activées par le récepteur. Nous avons ainsi pu identifier des sous-réseaux dont le réseau CDC37/HSP90AA1 validé par une autre étude, indiquant que la stratégie mise en place semblait pouvoir répondre à l'objectif fixé. Cependant la méthode visant à construire un réseau de manière manuel étant limitée pour les raisons décrites précédemment nous avons décidé de construire ce réseau de manière automatique. Dans un premier temps nous avons ré-analysé la liste des protéines identifiées par spectrométrie de masse via Uniprot. Par la suite l'application de filtres (au moins 3 peptides dans 2 expériences d'immunoprécipitations et aucun dans le contrôle) a permis de sélectionner 60 protéines que nous considérons comme identifiées en tant que partenaire protéique de FGFR3 avec une grande confiance. Afin de construire le réseau de FGFR3 à partir de cette liste de 60 protéines, celle-ci a été analysée dans la base d'interactions protéiques HIPPIE. Cependant seulement 20 interactions en sont ressorties montrant que cette liste n'était pas suffisante pour construire le réseau de signalisation de FGFR3. C'est pourquoi cette liste a été étendue grâce à l'algorithme PEPPER, développé spécifiquement pour répondre à ce problème. Le réseau obtenu nous a permis d'identifier des sous-réseaux d'interactions activées par le récepteur FGFR3. De manière intéressante certains de ces sous-réseaux d'interactions aboutissent à des processus post-transcriptionnels, des processus de remodelage de la chromatine et au recrutement de certains facteurs de transcription. Parmi ces facteurs de transcription se trouve la protéine TP53, qui interagit avec la protéine USP7 au sein du réseau de FGFR3. Nous avons voulu comprendre quel était le lien entre FGFR3 et TP53, c'est pourquoi nous nous sommes focalisés sur l'étude du sous-réseau TP53/USP7, la protéine USP7 étant impliquée dans la régulation de la stabilisation de TP53. Nous avons pu montrer dans les lignées cellulaires MGH-U3 et RT112 que le récepteur FGFR3 interagissait avec USP7 et avec la protéine GMPS (initialement identifiée dans la liste des 110 partenaires protéiques de FGFR3). De plus nous avons tiré parti des données obtenus suite à la déplétion de FGFR3 par SiRNA dans la lignée cellulaire MGH-U3. L'analyse de l'impact de la déplétion de FGFR3 sur l'activation ou l'inhibition des voies de signalisation montre que le pathway de TP53 ressort significativement dérégulé. Par la suite l'étude de l'expression de TP53 en fonction du statut mutationnel de FGFR3 dans les tumeurs de vessie a montré que les tumeurs FGFR3

mutées surexpriment TP53. Il est important de préciser ici que dans la plupart des échantillons arborant une mutation de FGFR3, le gène *TP53* n'est pas muté. De plus d'après la classification des tumeurs de vessie établie par Choi et al (2014), qui classe les tumeurs de vessie en tumeurs lumineales, tumeurs basales et tumeurs P53-like (activation de TP53 dans ce sous-groupe), les tumeurs FGFR3 muté se classent parmi les tumeurs lumineales et non pas parmi les tumeurs P53-like confortant l'analyse des résultats observés dans cette étude qui montre que FGFR3 induit l'inhibition du pathway de P53. Généralement, les altérations du gène *TP53* (mutations) conduisant à l'inactivation des voies de signalisation qu'elle régule sont associées à la voie des carcinomes in situ (CIS) et des tumeurs agressives envahissant le muscle. Or il semblerait qu'un autre mécanisme, différent de celui retrouvé dans les tumeurs de type CIS, existe dans les tumeurs papillaires de vessie exprimant le récepteur FGFR3 muté. Cependant il existe une explication pour cette forte expression : FGFR3 est retrouvé muté beaucoup plus fréquemment dans les tumeurs papillaires de bas stade que dans les tumeurs envahissant le muscle. Or les tumeurs envahissant le muscle présentent fréquemment une perte d'hétérozygotie de *TP53*. Cette perte d'une copie de gène pourrait aussi expliquer cette différence d'expression de *TP53* entre les tumeurs mutées et non mutées.

## 2.4 METHODES

### **Co-Immunoprecipitation de FGFR3 et de ces partenaires protéiques :**

L'isoforme FGFR3b a été taguée avec l'épitope suivant : DYKDDDDK (FLAG<sup>TM</sup>)-séquence. Le FLAG-FGFR3 a été inséré dans un vecteur pIRES puro 3 sous le contrôle d'un promoteur CMV. Les formes FGFR3 mutées S249C et Y375C ont été obtenues par mutagenèse dirigée. Les immunoprécipitations ont été réalisées avec un anticorps anti-flag couplé à des billes d'agaroses. L'éluion a été réalisée à l'aide de peptides FLAG. La migration a été réalisée sur gel d'acrylamide. A chaque peptide présent sur le gel, la bande d'intérêt a été découpée puis digérée, les peptides extraits et analysés par LC-MS/MS. L'analyse des spectres des peptides analysés par MS/MS a été réalisée en utilisant le système MASCOT (Matrix Science) et alignés sur la database Uniprot. Au total 2014 protéines ont été identifiées parmi lesquelles 921 protéines "contaminantes", soit 1093 protéines au final. Une première liste de 110 partenaires protéiques de FGFR3 a été établie par J.Aubertin (thèse 2009). Par la suite seules les protéines identifiées avec au moins 3 peptides uniques dans au moins deux expériences et aucun peptide dans les expériences contrôles ont été sélectionnées. Il en a résulté une liste de 60 partenaires protéiques de FGFR3. Cette seconde liste a été établie par R.Nicolle (thèse 2015).

### **Immunoprécipitations et western blot :**

Le protocole utilisé est le même que celui décrit au paragraphe 4.2. Les anticorps utilisés pour réaliser l'immunoprécipitation sont les anticorps anti-FGFR3 (Sigma Aldrich) dans la lignée MGH-U3 et anti-FGFR3 total (Abcam) dans la lignée RT112. Les anticorps utilisés pour le western blot sont : anticorps anti-FGFR3 (Abcam), anticorps anti-TP53 D0-1 (ab80645), anticorps anti-UPS7 (ab109109), anticorps anti-GMPS (Abcam).

### **Déplétion de FGFR3 par SiRNA et analyse sur puce :**

FGFR3 a été déplété par SiRNA dans la lignée cellulaire MGH-U3. Le résultat a été analysé sur puce affymetrix, et analysé dans DAVID.

### **Logiciel PEPPER**

Ce logiciel est décrit dans Winterhalter et al., 2014

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les deux études menées au cours de cette thèse, avaient pour objectif de caractériser les voies de signalisation du récepteur FGFR3 selon deux approches : la première visait à identifier les voies de signalisation activées par le récepteur FGFR3, la seconde à définir le réseau d'interaction de FGFR3.

La première approche basée une étude ciblée de cascades de phosphorylation activées par le récepteur FGFR3 altéré a permis de caractériser une partie des voies de signalisation du récepteur FGFR3 altéré et de mieux comprendre pourquoi celui-ci possède des propriétés oncogéniques. Nous avons tiré parti dans un premier temps d'une étude réalisée dans la lignée cellulaire fibroblastique NIH3T3 dont le but était d'identifier les voies de signalisation (étude de la phosphorylation de ERK1/2, p38, AKT) spécifiquement activées par le récepteur FGFR3 muté (S249C) en comparaison au récepteur sauvage, suite à stimulation ou non avec le ligand FGF1. Les résultats obtenus montraient que les voies p38 et AKT étaient spécifiquement activées par le récepteur FGFR3 muté, et que l'inhibition de ces protéines conduisait à une inhibition de la capacité des cellules NIH3T3 exprimant le récepteur FGFR3 muté à former de nouveaux clones en agar mou. Nous nous sommes donc focalisés sur l'activation des protéines p38 et AKT dans des lignées cellulaires dérivées de tumeurs de vessie (cellules épithéliales) exprimant le récepteur FGFR3 muté ou le récepteur transloqué FGFR3-TACC3. Cette étude a montré que l'activation de ces deux voies de signalisation était critique pour la prolifération cellulaire, et qu'elles étaient impliquées dans le maintien d'une boucle de rétrocontrôle entre FGFR3 et MYC (l'activation permanente de FGFR3 conduit à la surexpression de MYC qui en retour promeut la stabilisation de FGFR3). La mise en évidence de cette boucle FGFR3/MYC a permis de mieux comprendre les propriétés oncogéniques du récepteur FGFR3, grâce à la caractérisation d'une partie des voies de signalisation activées par le récepteur FGFR3 altéré. Par la suite, l'étude de la phosphorylation de p38 et AKT en fonction du statut mutationnel de FGFR3 dans les tumeurs n'ayant pas envahi le muscle (NMIBC) et les tumeurs ayant envahi le muscle (MIBC) FGFR3 muté ou non a montré que la phosphorylation de p38 était plus importante dans les tumeurs FGFR3 mutées, tandis que la phosphorylation d'AKT était la même dans les tumeurs NMIBC et MIBC et n'était pas liée au statut mutationnel de FGFR3. L'ensemble de ces observations nous a permis de proposer les protéines p38 et AKT comme de potentielles cibles thérapeutiques pour traiter les tumeurs de vessie exprimant le récepteur FGFR3 altéré (muté ou FGFR3-TACC3). Actuellement des inhibiteurs de p38 sont en phase III d'essai clinique. Environ 40% des tumeurs de vessie arborent une activation de la voie PI3K/AKT/mTOR. A l'heure actuelle le traitement pour inhiber la voie PI3K/AKT/mTOR est envisagé chez les patients présentant une altération des protéines de la voie PI3K/AKT, ou des gènes TSC1 et TSC2. Dans le

cas des patients présentant une altération du gène TSC1, un traitement chimiothérapeutique à base d'everolimus (inhibiteur de mTOR) permet d'allonger significativement l'espérance de vie de ces patients, montrant que la caractérisation des altérations moléculaires est importante pour proposer le traitement le plus adapté (Houédé & Pourquier, 2015). Nous avons montré dans notre étude que FGFR3 active la voie PI3K/AKT dans le but de protéger MYC d'une dégradation par le protéasome. Les patients dont la tumeur présente une altération du gène FGFR3 (mutation ou FGFR3-TACC3) pourraient donc être traités avec des inhibiteurs de la PI3Kinase ou des inhibiteurs d'AKT. Cependant il serait intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition de FGFR3 sur la phosphorylation des protéines mTORC1 et mTORC2, afin de savoir si un traitement à l'everolimus peut aussi être envisagé pour traiter les patients qui ont une tumeur de vessie présentant une altération du gène FGFR3.

Il serait cependant intéressant de tenter de généraliser nos résultats dans d'autres modèles, notamment un modèle exprimant la protéine FGFR3-BAIP2L1 et un modèle exprimant le gène RAS muté. La protéine de fusion FGFR3-BAIP2L1 avait été identifiée initialement avec une fréquence beaucoup moins importante que la protéine FGFR3-TACC3 (FGFR3-BAIP2L1 avait été retrouvée seulement dans une lignée cellulaire dérivée d'une tumeur de vessie, la lignée SW780). Cependant cette protéine de fusion a été observée récemment dans des tumeurs de vessie et des tumeurs du poumon (Nakanishi et al., 2015). Il serait donc intéressant de voir si cette boucle de rétrocontrôle FGFR3/MYC est aussi retrouvée dans ce cas. Cette étude pourra être réalisée dans la lignée cellulaire SW780 qui exprime cette protéine de fusion de manière endogène. Les mutations de FGFR3 et de RAS sont exclusives dans les tumeurs de vessie, l'hypothèse fréquemment avancée pour expliquer cette observation est que la protéine RAS fait partie des voies de signalisation de FGFR3. Il serait donc intéressant de refaire cette même étude dans la lignée cellulaire T24, qui exprime le gène RAS muté. Nous avons déjà montré dans cette lignée cellulaire que la protéine p38 est activée et que l'inhibition de RAS conduit à l'inhibition de l'activation de p38. Il est donc tentant de penser que dans ce modèle cellulaire le mécanisme est semblable à celui identifié dans les lignées cellulaires exprimant le récepteur FGFR3 altéré. Pour vérifier cette hypothèse l'étude de l'activation d'AKT dans ce modèle cellulaire avant et après inhibition de RAS, serait envisagée dans un premier temps, afin de voir si AKT fait aussi parti des voies de signalisation activées par RAS muté. Par la suite l'étude de l'impact de l'inhibition de RAS sur la protéine MYC pourra être réalisée, afin de voir si l'activation de RAS muté est responsable d'une stabilisation de MYC. En fonction des résultats observés, il serait alors possible d'expliquer la cause des mutations exclusives de RAS et de FGFR3 dans les tumeurs de vessie. Enfin, il pourrait être intéressant d'étudier ce mécanisme dans

d'autres cancers, notamment le glioblastome et le cancer du poumon, dans lesquels la protéine de fusion FGFR3-TACC3 a aussi été observée. Il serait en effet surprenant que la boucle de rétrocontrôle identifiée dans les tumeurs de vessie soit aussi retrouvée dans d'autres types de cancers exprimant le récepteur FGFR3-TACC3. Cette étude pourrait être réalisée dans des lignées cellulaires dérivées de tumeurs du poumon et du glioblastome exprimant le récepteur FGFR3-TACC3. Si cette boucle de rétrocontrôle existe aussi dans ces types de cancer et si les voies permettant de la maintenir sont les mêmes que celles identifiées dans le cancer de la vessie, les protéines p38 et AKT pourraient alors être envisagées comme cibles thérapeutiques dans les différents cancers exprimant le récepteur FGFR3-TACC3.

La seconde approche mise en place avait pour but de définir l'interactome de FGFR3. Nous avons tiré parti d'une étude réalisée au laboratoire dont l'objectif était d'identifier les partenaires protéiques du récepteur FGFR3 muté ou sauvage par spectrométrie de masse. Une liste de 110 partenaires protéiques de FGFR3 avait ainsi été obtenue à partir de 8 expériences d'immunoprécipitations pour le récepteur muté (4 expériences pour FGFR3 S249C/ 4 expériences pour FGFR3 Y375C) et 3 expériences d'immunoprécipitations pour le récepteur FGFR3 sauvage. A partir de cette liste et des bases d'interactions protéiques nous avons construit le réseau d'interaction de FGFR3 de manière manuelle. Cependant cette méthode présentait de nombreuses limitations et ne permettait pas de construire le réseau de FGFR3 de manière aussi exhaustive que s'il avait été construit de manière automatique. Dans un premier temps les données de spectrométrie de masse ont de nouveaux été analysées via la base Uniprot. Nous avons par la suite sélectionnés les protéines identifiées avec au moins 3 peptides par expérience et aucun peptide dans l'expérience contrôle, et ce, dans au moins deux expériences. Une liste de 60 protéines a ainsi été obtenue, et analysée dans la base d'interaction protéique HIPPIE. Cependant les 60 protéines étaient très peu connectées entre elles c'est pourquoi afin d'étendre le réseau, l'algorithme PEPPER a été développé. Le réseau d'interaction de FGFR3 a ainsi été obtenu. Un réseau ainsi construit permet de voir que FGFR3 recrute des protéines impliquées dans les voies MAPKinase, ce qui a permis de faire le lien avec la première étude afin d'identifier les protéines impliquées dans l'activation de P38 $\alpha$ , mais aussi certains facteurs post-transcriptionnels dont la protéine HNRNPU, décrite pour être impliquée dans la stabilisation de l'ARNm de MYC (Weidensdorfer, Stöhr, Baude, Lederer, Kohn, et al., 2009). Nous avons montré que la déplétion de HNRNPU par SiRNA conduit à une diminution de la quantité d'ARNm de MYC dans la lignée RT112, apportant ainsi des éléments de réponse permettant de consolider le mécanisme proposé pour la régulation de l'ARNm de MYC par FGFR3 et P38 dans la première étude. Il sera donc intéressant par la

suite d'étudier l'impact sur l'ARNm de MYC d'une déplétion simultanée de HuR et HNRNPU. Les allers-retours qui ont ainsi pu être effectués entre la première et la deuxième étude, ont montrés qu'il est nécessaire pour identifier de manière plus complète les voies de signalisation du récepteur FGFR3, d'étudier en parallèle les voies de signalisation activées par le récepteur et d'identifier son réseau d'interaction (interactome).

La construction du réseau de FGFR3 a permis de mettre en évidence de nombreuses interactions qui pourraient expliquer les propriétés oncogéniques du récepteur. Il serait donc intéressant dans un premier temps de valider ces interactions puis de tester leur importance fonctionnelle. Nous avons commencé au cours de cette thèse à étudier le sous-réseau P53/USP7, et avons validé l'interaction entre la protéine USP7 et FGFR3 et montré que TP53 et FGFR3 n'interagissent pas ensemble. Cependant la protéine TP53 n'est pas dégradée dans les lignées cellulaires RT112 et MGH-U3. Nous formulons ici l'hypothèse selon laquelle la protéine TP53 est présente sous forme mono-ubiquitinilée ou multi-ubiquitinilée, ce qui lui permet d'être dans un état stable et de ne pas être dégradée par le protéasome (c'est le cas lorsque TP53 est poly-ubiquitinilée). Une étude réalisée en parallèle au laboratoire a permis de montrer que la déplétion de FGFR3 dans la lignée cellulaire MGH-U3 avait un impact positif sur l'activation de certaines cibles de TP53. Les différentes études visant à caractériser le rôle de la protéine USP7 ont montré que celle-ci pouvait avoir un rôle d'oncogène ou de suppresseur de tumeur. Dans le cas présent il n'est pas possible pour l'instant de savoir quel rôle joue USP7 (oncogène ou suppresseur de tumeur). Le récepteur FGFR3 interagit-il avec la protéine USP7 pour l'activer ou au contraire la séquestrer. Afin d'étudier le rôle de la protéine USP7 au sein du réseau de FGFR3, il serait intéressant dans un premier temps d'étudier la localisation cellulaire de USP7 et de TP53 et le taux d'ubiquitination de TP53 dans les lignées cellulaires RT112 ou MGH-U3 traitées ou non avec l'inhibiteur de FGFR3 ou de USP7.

Nous avons construit le réseau de FGFR3 à partir d'une liste de protéines identifiées comme partenaires protéiques de FGFR3 dans un système artificiel, construit dans de la lignée cellulaire RT112, exprimant le récepteur sauvage ou le récepteur muté (S249C ou Y375C) portant un flag tag. Au moment où ces expériences ont été réalisées, le récepteur FGFR3-TACC3 n'avait pas encore été identifié, et nous pensons que la lignée cellulaire RT112 exprimait uniquement le récepteur FGFR3 sauvage. Les expériences de spectrométrie de masse réalisées à partir de ce système artificiel montraient de plus que les partenaires protéiques du récepteur FGFR3 muté (S249C/Y375C) tagué étaient identiques à ceux du récepteur FGFR3 sauvage tagué. Or il a été montré récemment que lignée cellulaire RT112 exprime à la fois le récepteur sauvage et le récepteur FGFR3-TACC3, et nous avons de plus montré que les deux formes du récepteur interagissent

ensemble, et que dans ce contexte le récepteur sauvage possède des propriétés oncogéniques. Le réseau de signalisation de FGFR3 obtenu au cours de cette thèse dans la lignée cellulaire RT112 correspond donc au réseau d'interaction du récepteur sauvage et du récepteur FGFR3-TACC3 et non pas du récepteur FGFR3 sauvage seul, ce qui peut expliquer que les partenaires protéiques du récepteur FGFR3 sauvage et du récepteur muté soient les mêmes, et que cette étude n'ait pas permis de mettre en évidence les différences entre le récepteur altéré ou le récepteur sauvage, contrairement à ce qui était attendu.

Il serait intéressant par la suite d'identifier le phospho-protéome et l'interactome de chaque forme altérée du récepteur FGFR3 (S249C, Y375C, FGFR3-TACC3, FGFR3-BAIAP2L1) et du récepteur FGFR3 sauvage, dans le but de définir à la fois les cascades de phosphorylations activées par FGFR3 et les partenaires d'interactions recrutés par le récepteur FGFR3. En effet l'identification de l'interactome de FGFR3 bien qu'apportant de nombreuses informations ne permet pas de définir les voies de signalisation activées par le récepteur, d'où l'intérêt de réaliser une étude phospho-protéomique. Le phospho-protéome et le protéome en présence de chaque récepteur FGFR3 (sauvage, muté ou protéine de fusion) pourra être déterminé via la technique SILAC (Stable Isotypic Labelling by Amino acids in Cell culture) qui présente l'avantage d'être quantitative et dont l'analyse permettra dans un premier temps de voir s'il existe des différences notables entre les différents protéomes des différentes formes altérées du récepteur FGFR3. De plus cette technique pourra être utilisée afin de caractériser les différences entre les voies de signalisation activées par le récepteur FGFR3 sauvage et les récepteurs FGFR3 altérés (FGFR3 muté ou FGFR3-TACC3), suite à une stimulation ou non des cellules exprimant le récepteur sauvage ou le récepteur altéré avec le ligand FGF1, permettant ainsi de mettre en évidence les réelles différences existantes entre les voies de signalisation activées par le récepteur sauvage et celles activées par le récepteur FGFR3 altéré. Cette technique pourra aussi être utilisée pour caractériser la réponse à un traitement anti-FGFR3 (traitement au PD173074) afin d'identifier les voies de signalisation affectées par ce traitement.

Cependant le choix de la lignée cellulaire dans laquelle ces expériences pourront être réalisées pose problème. Il aurait pu être envisagé de réaliser ces expériences dans des systèmes cellulaires exprimant chacun une altération de FGFR3 de manière endogène (MGH-U3 : Y375C ; UMUC14 : S249C ; RT112 : FGFR3-TACC3 ; SW780 : FGFR3-BAIP2L1) mais les différences de fond génétique entre les différentes lignées cellulaires aurait posé problème pour comparer les résultats par la suite. La surexpression de chaque forme du récepteur dans la lignée cellulaire RT112 ne peut pas être envisagée puisque le

récepteur sauvage et le récepteur FGFR3-TACC3 sont exprimés conjointement. La lignée TERT-NHUC qui est une lignée de cellules de vessies normales immortalisées aurait pu parfaitement convenir mais il a clairement été montré que l'expression du récepteur FGFR3 muté (S249C ou Y375C) dans cette lignée cellulaire ne conduit pas à l'activation des protéines AKT et SRC, alors que nous avons montré au cours de cette thèse dans des lignées cellulaires exprimant le récepteur FGFR3 altéré de manière endogène qu'AKT est activée. Une autre solution peut cependant être envisagée mais elle impose de travailler dans un modèle cellulaire fibroblastique et non épithélial, le modèle NIH3T3.

# BIBLIOGRAPHIE

- Aubertin, J. (2009). Universite paris xi.
- Aveyard, J. S., Skilleter, a, Habuchi, T., & Knowles, M. a. (1999). Somatic mutation of PTEN in bladder carcinoma. *British Journal of Cancer*, *80*(5-6), 904–8. doi:10.1038/sj.bjc.6690439
- Babic, I., & Mischel, P. S. (2013). Multiple functions of a glioblastoma fusion oncogene, *123*(2), 10–13. doi:10.1172/JCI67658.548
- Bachirredy, P., Bendapudi, P., & Felsher, D. (2005). Getting at MYC through RAS 55Commentary on Yaari et al ., p . 4321. *Clinical Cancer Research*, *11*(12), 4278–4281.
- Badawi, A. F. (1996). Molecular and genetic events in schistosomiasis-associated human bladder cancer: role of oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer Letters*, *105*(2), 123–138. doi:10.1016/0304-3835(96)04284-X
- Badawi, A. K., Hirvonen, A., Bell, D. A., Lang, N. P., & Kafflubar, F. K. (1995). Role of Aromatic Amine Acetyltransferases , NAT1 and NAT2 , in Carcinogen-DNA Adduct Formation in the Human Urinary Bladder, 5230–5237.
- Bakkar, A. A., Wallerand, H., Lahaye, J., Pissard, S., Lecerf, L., Kouyoumdjian, J. C., ... Medina, D. De. (2003). Advances in Brief FGFR3 and TP53 Gene Mutations Define Two Distinct Pathways in Urothelial Cell Carcinoma of the Bladder, 8108–8112.
- Bates, R. C., & Mercurio, A. M. (2003). Tumor necrosis factor-alpha stimulates the epithelial-to-mesenchymal transition of human colonic organoids. *Molecular Biology of the Cell*, *14*(5), 1790–800. doi:10.1091/mbc.E02-09-0583
- Behren, A., Mühlen, S., Acuna Sanhueza, G. A., Schwager, C., Plinkert, P. K., Huber, P. E., ... Simon, C. (2010). Phenotype-assisted transcriptome analysis identifies FOXM1 downstream from Ras-MKK3-p38 to regulate in vitro cellular invasion. *Oncogene*, *29*(10), 1519–30. doi:10.1038/onc.2009.436
- Bernard-Pierrot, I., Brams, A., Dunois-Lardé, C., Caillault, A., Diez de Medina, S. G., Cappellen, D., ... Radvanyi, F. (2006). Oncogenic properties of the mutated forms of fibroblast growth factor receptor 3b. *Carcinogenesis*, *27*(4), 740–7. doi:10.1093/carcin/bgi290
- Berndt, N., Hamilton, A. D., & Sebti, S. M. (2011). Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, *11*(11), 775–91. doi:10.1038/nrc3151
- Billerey, C., Chopin, D., Bralet, M., Lahaye, J., Abbou, C. C., Bonaventure, J., ... Radvanyi, F. (2001). Frequent FGFR3 Mutations in Papillary Non-Invasive Bladder (pTa) Tumors, *158*(6), 1955–1959.
- Bjerkvig, R., Tysnes, B. B., Aboody, K. S., & Najbauer, J. (2005). current controversies and new insights, *5*(November), 899–905.

- Blaveri, E., Simko, J., Korkola, J., Brewer, J., Baehner, F., Mehta, K., ... Waldman, F. (2005). Bladder Cancer Outcome and Subtype Classification by Gene Expression by Gene Expression. *Clin Cancer Res*, 11(11), 4044–4055.
- Blick, C., Ramachandran, a, Wigfield, S., McCormick, R., Jubb, a, Buffa, F. M., ... Harris, a L. (2013). Hypoxia regulates FGFR3 expression via HIF-1 $\alpha$  and miR-100 and contributes to cell survival in non-muscle invasive bladder cancer. *British Journal of Cancer*, 109(1), 50–9. doi:10.1038/bjc.2013.240
- Boorman, G. A., Dellarco, V., Dunnick, J. K., Chapin, R. E., Hunter, S., Hauchman, F., ... Sills, R. C. (1999). Drinking water Disinfection Byproducts: Review and Approach to toxicity evaluation.
- Brooks, a N., Kilgour, E., & Smith, P. D. (2012a). Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(7), 1855–62. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0699
- Brooks, a N., Kilgour, E., & Smith, P. D. (2012b). Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(7), 1855–62. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0699
- Brooks, C., Li, M., Hu, M., Shi, Y., & Gu, W. (2013). The p53-Mdm2-HAUSP complex is involved in p53 stabilization by HAUSP, 26(51), 7262–7266. doi:10.1038/sj.onc.1210531.The
- Brown, A. P., Courtney, C. L., King, L. M., Groom, S. C., & Graziano, M. J. (2005). Cartilage dysplasia and tissue mineralization in the rat following administration of a FGF receptor tyrosine kinase inhibitor. *Toxicologic Pathology*, 33(4), 449–55. doi:10.1080/01926230590961845
- Bulavin, D. V, Amundson, S. A., & Jr, A. J. F. (2002). p38 and Chk1 kinases : different conductors for the G 2 / M checkpoint symphony, 92–97.
- Bulavin, D. V, Phillips, C., Nannenga, B., Timofeev, O., Donehower, L. a, Anderson, C. W., ... Fornace, A. J. (2004). Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nature Genetics*, 36(4), 343–50. doi:10.1038/ng1317
- Calderaro, J., Rebouissou, S., de Koning, L., Masmoudi, A., Hérault, A., Dubois, T., ... Allory, Y. (2014). PI3K/AKT pathway activation in bladder carcinogenesis. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 134(8), 1776–84. doi:10.1002/ijc.28518
- Capelletti, M., Dodge, M. E., Ercan, D., Hammerman, P. S., Park, S.-I., Kim, J., ... Janne, P. a. (2014). Identification of Recurrent FGFR3-TACC3 Fusion Oncogenes from Lung Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, 20, 6551–6558. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1337

- Cappellen, D. (1999). Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder, 23(september), 18–20.
- Carneiro, B. a, Meeks, J. J., Kuzel, T. M., Scaranti, M., Abdulkadir, S. a, & Giles, F. J. (2014). Emerging therapeutic targets in bladder cancer. *Cancer Treatment Reviews*. doi:10.1016/j.ctrv.2014.11.003
- Catto, J. W. F., Miah, S., Owen, H. C., Bryant, H., Myers, K., Larré, S., ... Hamdy, F. C. (2010). Europe PMC Funders Group Distinct microRNA alterations characterize high and low grade bladder cancer, 69(21), 8472–8481. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0744.Distinct
- Chang, T.-C., Yu, D., Lee, Y.-S., Wentzel, E. a, Arking, D. E., West, K. M., ... Mendell, J. T. (2008). Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nature Genetics*, 40(1), 43–50. doi:10.1038/ng.2007.30
- Chapman, E. J., Harnden, P., Chambers, P., Johnston, C., & Knowles, M. a. (2005). Comprehensive analysis of CDKN2A status in microdissected urothelial cell carcinoma reveals potential haploinsufficiency, a high frequency of homozygous co-deletion and associations with clinical phenotype. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(16), 5740–7. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0411
- Chatzinikolaou, G., Nikitovic, D., Berdiaki, a., Zafiropoulos, a., Katonis, P., Karamanos, N. K., & Tzanakakis, G. N. (2010). Heparin regulates colon cancer cell growth through p38 mitogen-activated protein kinase signalling. *Cell Proliferation*, 43, 9–18. doi:10.1111/j.1365-2184.2009.00649.x
- Chen, C. Y., & Shyu, A. B. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(11), 465–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8578590>
- Chen, S., Qiong, Y., & Gardner, D. (2005). A Role for p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Myc in Endothelin-Dependent Rat Aortic Smooth Muscle Cell Proliferation. *Hypertension*, 47, 252–258. doi:10.1161/01.HYP.0000198424.93598.6b
- Chen, Z., & Nahta, R. (2014). NIH Public Access, 21(4), 501–510.
- Chesi, M., Brents, L. A., Ely, S. A., Bais, C., Robbani, D. F., Mesri, E. A., ... Bergsagel, P. L. (2001). Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma, 97(3), 729–737.
- Chesi, M., Kuehl, M., & Bergsagel, P. L. (1997). Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3, 16(3), 260–264. doi:10.1038/ng0797-260.Frequent

- Chesi, M., Nardini, E., & Lim, R. (1998). The t (4; 14) Translocation in Myeloma Dysregulates Both FGFR3 and a Novel Gene, MMSET, Resulting in IgH/MMSET Hybrid Transcripts. *...*, 92(9), 3025–3034. Retrieved from <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/92/9/3025.short>
- Choi, W., Czerniak, B., Ochoa, A., Su, X., Siefker-Radtke, A., Dinney, C., & McConkey, D. J. (2014). Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Nature Reviews. Urology*, 11(7), 400–10. doi:10.1038/nrurol.2014.129
- Chow, N.-H., Guo, Y., Lin, J.-N., Su, J.-J., Tzai, T.-S., Guo, H.-R., & Su, I.-J. (1997). Clinicopathological features of bladder cancer associated with chronic exposure to arsenic. *British Journal of Cancer*, 75(11), 1708–1710. doi:10.1038/bjc.1997.291
- Cummins, J. M., & Vogelstein, B. (2004). HAUSP is required for p53 destabilization, (June), 689–692.
- Dai, C., & Gu, W. (2010). P53 Post-Translational Modification: Deregulated in Tumorigenesis. *Trends in Molecular Medicine*, 16(11), 528–36. doi:10.1016/j.molmed.2010.09.002
- Damrauer, J. S., Hoadley, K. a, Chism, D. D., Fan, C., Tiganelli, C. J., Wobker, S. E., ... Kim, W. Y. (2014). Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(8), 3110–5. doi:10.1073/pnas.1318376111
- Dean, J. L. E., Sully, G., Clark, A. R., & Saklatvala, J. (2004a). The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cellular Signalling*, 16(10), 1113–21. doi:10.1016/j.cellsig.2004.04.006
- Dean, J. L. E., Sully, G., Clark, A. R., & Saklatvala, J. (2004b). The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cellular Signalling*, 16(10), 1113–21. doi:10.1016/j.cellsig.2004.04.006
- Dolado, I., Swat, A., Ajenjo, N., De Vita, G., Cuadrado, A., & Nebreda, A. R. (2007). p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell*, 11(2), 191–205. doi:10.1016/j.ccr.2006.12.013
- Domínguez-Cáceres, M. A., García-Martínez, J. M., Calcabrini, A., González, L., Porque, P. G., León, J., & Martín-Pérez, J. (2004a). Prolactin induces c-Myc expression and cell survival through activation of Src/Akt pathway in lymphoid cells. *Oncogene*, 23(44), 7378–90. doi:10.1038/sj.onc.1208002
- Domínguez-Cáceres, M. A., García-Martínez, J. M., Calcabrini, A., González, L., Porque, P. G., León, J., & Martín-Pérez, J. (2004b). Prolactin induces c-Myc

- expression and cell survival through activation of Src/Akt pathway in lymphoid cells. *Oncogene*, 23(44), 7378–90. doi:10.1038/sj.onc.1208002
- Dreissigacker, U., Mueller, M. S., Unger, M., Siegert, P., Genze, F., Gierschik, P., & Giehl, K. (2006). Oncogenic K-Ras down-regulates Rac1 and RhoA activity and enhances migration and invasion of pancreatic carcinoma cells through activation of p38. *Cellular Signalling*, 18, 1156–1168. doi:10.1016/j.cellsig.2005.09.004
- El-Bolkainy, M. ., Mokhtar, N. ., Ghoneim, M. ., & Hussein, M. . (1993). The impact of schistosomiasis on human nutrition. *Parasitology*, 107 Suppl, S107–S123. doi:10.1017/S0031182000075545
- Elenitoba-Johnson, K. S. J., Jenson, S. D., Abbott, R. T., Palais, R. A., Bohling, S. D., Lin, Z., ... Lim, M. S. (2003). Involvement of multiple signaling pathways in follicular lymphoma transformation: p38-mitogen-activated protein kinase as a target for therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12), 7259–64. doi:10.1073/pnas.1137463100
- Faesen, A. C., Dirac, A. M. G., Shanmugham, A., Ovaa, H., Perrakis, A., & Sixma, T. K. (2011). Mechanism of USP7/HAUSP activation by its C-terminal ubiquitin-like domain and allosteric regulation by GMP-synthetase. *Molecular Cell*, 44(1), 147–59. doi:10.1016/j.molcel.2011.06.034
- Fan, X. C., & Steitz, J. a. (1998). Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO Journal*, 17(12), 3448–3460. doi:10.1093/emboj/17.12.3448
- Fang, S., Jensen, J. P., Ludwig, R. L., Vousden, K. H., & Weissman, A. M. (2000). Mdm2 Is a RING Finger-dependent Ubiquitin Protein Ligase for Itself and p53 \*, 275(12), 8945–8951.
- Frank, S. B., & Miranti, C. K. (2013). Disruption of prostate epithelial differentiation pathways and prostate cancer development. *Frontiers in Oncology*, 3(October), 273. doi:10.3389/fonc.2013.00273
- Frey, M. R., Golovin, A., & Polk, D. B. (2004). Epidermal growth factor-stimulated intestinal epithelial cell migration requires Src family kinase-dependent p38 MAPK signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 44513–44521. doi:10.1074/jbc.M406253200
- Fujimoto, K., Yamada, Y., Okajima, E., Kakizoe, T., Sasaki, H., & Sugimura, T. (1992). Frequent Association of p53 Gene Mutation in Invasive Bladder Cancer Frequent Association of p53 Gene Mutation in Invasive Bladder Cancer1, 1393–1398.
- Gómez-román, J. J., Saenz, P., González, J. C., Escuredo, K., Gonza, J. C., Martí, A., ... Gutie, J. L. (2005). Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Is Overexpressed in Urinary Tract Carcinomas and Modulates the Neoplastic Cell

Growth Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Is Overexpressed in Urinary Tract Carcinomas and Modulates the Neoplastic Cell Growth, *11*, 459–465.

Gregory, M. a., Qi, Y., & Hann, S. R. (2003). Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase-3 Controls c-Myc Proteolysis and Subnuclear Localization. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(51), 51606–51612. doi:10.1074/jbc.M310722200

Guagnano, V., Furet, P., Spanka, C., Bordas, V., Douget, L., Stamm, C., ... Porta, D. G. (2011). 1-methyl-urea ( NVP-BGJ398 ), A Potent and Selective Inhibitor of the Fibroblast Growth Factor Receptor Family of Receptor Tyrosine Kinase, 7066–7083.

Guagnano, V., Kauffmann, A., Wöhrle, S., Stamm, C., Ito, M., Barys, L., ... Graus-Porta, D. (2012). FGFR genetic alterations predict for sensitivity to NVP-BGJ398, a selective pan-FGFR inhibitor. *Cancer Discovery*, *2*(12), 1118–33. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0210

Hafner, C., van Oers, J. M. M., Hartmann, A., Landthaler, M., Stoehr, R., Blaszyk, H., ... Vogt, T. (2006). High frequency of FGFR3 mutations in adenoid seborrhic keratoses. *The Journal of Investigative Dermatology*, *126*, 2404–2407. doi:10.1038/sj.jid.5700422

Hanahan, D., & Weinberg, R. a. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

Hanahan, D., & Weinberg, R. a. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*, 57–70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9

Harada, D., Yamanaka, Y., Ueda, K., Nishimura, R., Morishima, T., Seino, Y., & Tanaka, H. (2007). Sustained phosphorylation of mutated FGFR3 is a crucial feature of genetic dwarfism and induces apoptosis in the ATDC5 chondrogenic cell line via PLCgamma-activated STAT1. *Bone*, *41*(2), 273–81. doi:10.1016/j.bone.2006.11.030

Harries, L. W., Stubbins, M. J., Forman, D., Howard, G. C. W., & Wolf, C. R. (1997). Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder , testicular and prostate cancer, *18*(4), 641–644.

Haugsten, E. M., Wiedlocha, A., Olsnes, S., & Wesche, J. (2010a). Roles of fibroblast growth factor receptors in carcinogenesis. *Molecular Cancer Research : MCR*, *8*, 1439–1452. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0168

Haugsten, E. M., Wiedlocha, A., Olsnes, S., & Wesche, J. (2010b). Roles of fibroblast growth factor receptors in carcinogenesis. *Molecular Cancer Research : MCR*, *8*(11), 1439–52. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0168

He, Q. P., Ding, C., & Li, P. A. (2003). Effects of hyperglycemic and normoglycemic cerebral ischemia on phosphorylation of c-jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Cellular and Molecular Biology*

(Noisy-Le-Grand, France), 49(8), 1241–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14983993>

- Hernández, S., Toll, A., Baselga, E., Ribé, A., Azua-Romeo, J., Pujol, R. M., & Real, F. X. (2007). Fibroblast growth factor receptor 3 mutations in epidermal nevi and associated low grade bladder tumors. *The Journal of Investigative Dermatology*, 127(September 2006), 1664–1666. doi:10.1038/sj.jid.5700705
- Houédé, N., & Pourquier, P. (2015). Targeting the genetic alterations of the PI3K-AKT-mTOR pathway: its potential use in the treatment of bladder cancers. *Pharmacology & Therapeutics*, 145, 1–18. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.06.004
- Itoh, N., & Ornitz, D. M. (2004). Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends in Genetics : TIG*, 20(11), 563–9. doi:10.1016/j.tig.2004.08.007
- Jebar, A. H., Hurst, C. D., Tomlinson, D. C., Johnston, C., Taylor, C. F., & Knowles, M. a. (2005). FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene*, 24(33), 5218–25. doi:10.1038/sj.onc.1208705
- Kang, S., Dong, S., Gu, T., Guo, A., Cohen, M. S., Khoury, H. J., ... Chen, J. (2007). FGFR3 activates RSK2 to mediate Hematopoietic Transformation through tyrosine Phosphorylation of RSK2 and Activation of the MEK/ERK Pathway. *Cancer Cell*, 12(3), 201–214.
- Kennedy, N. J., Cellurale, C., & Davis, R. J. (2007). A radical role for p38 MAPK in tumor initiation. *Cancer Cell*, 11(2), 101–3. doi:10.1016/j.ccr.2007.01.009
- Kim, H. H., Kuwano, Y., Srikantan, S., Lee, E. K., Martindale, J. L., & Gorospe, M. (2009). HuR recruits let-7 / RISC to repress c-Myc expression, 1743–1748. doi:10.1101/gad.1812509.target
- Kim, H. J., & Bar-Sagi, D. (2004). Modulation of signalling by Sprouty: a developing story. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(June), 441–450. doi:10.1038/nrm1400
- King, W. D., & Marrett, L. D. (1996). Case-control study of bladder cancer and chlorination by-products in treated water (Ontario, Canada). *Cancer Causes and Control*, 7(6), 596–604. doi:10.1007/BF00051702
- Kitchin, K. T. (2001). Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 172(3), 249–61. doi:10.1006/taap.2001.9157
- Knapinska, A. M., Gratacós, F. M., Krause, C. D., Hernandez, K., Jensen, A. G., Bradley, J. J., ... Brewer, G. (2011). Chaperone Hsp27 modulates AUF1 proteolysis and AU-rich element-mediated mRNA degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 31(7), 1419–31. doi:10.1128/MCB.00907-10

- Knights, V., & Cook, S. J. (2010). De-regulated FGF receptors as therapeutic targets in cancer. *Pharmacology and Therapeutics*, 125(1), 105–117. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.10.001
- Kobayashi, T., Owczarek, T. B., McKiernan, J. M., & Abate-Shen, C. (2014a). Modelling bladder cancer in mice: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*, 15(1), 42–54. doi:10.1038/nrc3858
- Kobayashi, T., Owczarek, T. B., McKiernan, J. M., & Abate-Shen, C. (2014b). Modelling bladder cancer in mice: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*, 15(1), 42–54. doi:10.1038/nrc3858
- Koksal, I. T., Yasar, D., Dirice, E., Usta, M. F., Karauzum, S., Luleci, G., ... Sanlioglu, S. (2005). Differential PTEN protein expression profiles in superficial versus invasive bladder cancers. *Urologia Internationalis*, 75(2), 102–6. doi:10.1159/000085933
- Kotliarova, S., Pastorino, S., Kovell, L. C., Kotliarov, Y., Song, H., Bailey, R., ... Fine, a. (2009). Glycogen Synthase Kinase 3 inhibition induces Glioma Cell Death through c-MYC, NF-κB and Glucose Regulation. *Cancer Research*, 68(16), 6643–6651. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0850.Glycogen
- Koul, H. K., Pal, M., & Koul, S. (2013). Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. *Genes & Cancer*, 4(9-10), 342–59. doi:10.1177/1947601913507951
- Laederich, M. B., Degnin, C. R., Lunstrum, G. P., Holden, P., & Horton, W. a. (2011). Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) is a strong Heat shock protein 90 (Hsp90) client: Implications for therapeutic manipulation. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 19597–19604. doi:10.1074/jbc.M110.206151
- Lafarga, V., Cuadrado, A., Lopez de Silanes, I., Bengoechea, R., Fernandez-Capetillo, O., & Nebreda, A. R. (2009). p38 Mitogen-activated protein kinase- and HuR-dependent stabilization of p21(Cip1) mRNA mediates the G(1)/S checkpoint. *Molecular and Cellular Biology*, 29(16), 4341–51. doi:10.1128/MCB.00210-09
- Lafon, I., Carballès, F., Brewer, G., Poiret, M., & Morello, D. (1998). Developmental expression of AUF1 and HuR, two c-myc mRNA binding proteins. *Oncogene*, 16, 3413–3421. doi:10.1038/sj.onc.1201895
- Lavoie, J. N., L'Allemain, G., Brunet, a., Muller, R., & Pouyssegur, J. (1996). Cyclin D1 Expression Is Regulated Positively by the p42/p44MAPK and Negatively by the p38/HOGMAPK Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 271(34), 20608–20616. doi:10.1074/jbc.271.34.20608
- Lee, K. W., Bode, A. M., & Dong, Z. (2011). Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention, 11(March).

- Lemmon, M. a, & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, *141*(7), 1117–34. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011
- Li, C., Chen, L., Iwata, T., Kitagawa, M., & Fu, X. (1999). ARTICLE A Lys644Glu substitution in fibroblast growth factor receptor 3 ( FGFR3 ) causes dwarfism in mice by activation of STATs and ink4 cell cycle inhibitors, *8*(1), 35–44.
- Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A., Qin, J., & Gu, W. (2002). Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature*, *416*(April). doi:10.1038/nature735.1.
- Logié, A., Dunois-Lardé, C., Rosty, C., Levrel, O., Blanche, M., Ribeiro, A., ... Radvanyi, F. (2005). Activating mutations of the tyrosine kinase receptor FGFR3 are associated with benign skin tumors in mice and humans. *Human Molecular Genetics*, *14*(9), 1153–1160. doi:10.1093/hmg/ddi127
- Logié, A., Dunois-Lardé, C., Rosty, C., Levrel, O., Blanche, M., Ribeiro, A., ... Radvanyi, F. (2005). Activating mutations of the tyrosine kinase receptor FGFR3 are associated with benign skin tumors in mice and humans. *Human Molecular Genetics*, *14*(9), 1153–60. doi:10.1093/hmg/ddi127
- Loomis, D., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., Ghissassi, F. El, Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., ... Straif, K. (2013). The carcinogenicity of outdoor air pollution. *The Lancet Oncology*, *14*(December), 1262–1263. doi:10.1016/S1470-2045(13)70487-X
- López-Knowles, E., Hernández, S., Malats, N., Kogevinas, M., Lloreta, J., Carrato, A., ... Real, F. X. (2006). PIK3CA mutations are an early genetic alteration associated with FGFR3 mutations in superficial papillary bladder tumors. *Cancer Research*, *66*(15), 7401–4. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1182
- Maeda, T., Yagasaki, F., Ishikawa, M., Takahashi, N., & Bessho, M. (2005). Transforming property of TEL-FGFR3 mediated through PI3-K in a T-cell lymphoma that subsequently progressed to AML. *Blood*, *105*(5), 2115–2123. doi:10.1182/blood-2003-12-4290
- Maher, P. (1999). P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation Is Required for Fibroblast Growth Factor-2-Stimulated Cell Proliferation But Not Differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(25), 17491–17498.
- Majewski, I. J., Mittempergher, L., Davidson, N. M., Bosma, A., Willems, S. M., Horlings, H. M., ... Bernards, R. (2013). Identification of recurrent FGFR3 fusion genes in lung cancer through kinome-centred RNA sequencing. *The Journal of Pathology*, *230*(3), 270–6. doi:10.1002/path.4209
- Martino, E., Hôte, C. G. L., Kennedy, W., Tomlinson, D. C., & Knowles, M. A. (2009). Mutant Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Induces Intracellular Signaling and Cellular Transformation in a Cell Type- and Mutation-Specific Manner, *28*(48), 4306–4316. doi:10.1038/onc.2009.280.Mutant

- Mason, I. (2007). Initiation to end point: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. *Nature Reviews. Neuroscience*, 8(8), 583–96. doi:10.1038/nrn2189
- Matsumoto, T., Yokote, K., Tamura, K., Takemoto, M., Ueno, H., Saito, Y., & Mori, S. (1999). Platelet-derived growth factor activates p38 mitogen-activated protein kinase through a Ras-dependent pathway that is important for actin reorganization and cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 13954–13960. doi:10.1074/jbc.274.20.13954
- Mitra, A. P., Datar, R. H., & Cote, R. J. (2006). Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(35), 5552–64. doi:10.1200/JCO.2006.08.2073
- Nakanishi, Y., Akiyama, N., Tsukaguchi, T., Fuji, T., Satoh, Y., Ishii, N., & Aoki, M. (2015). Mechanism of oncogenic signal by the novel fusion kinase FGFR3-BAIAP2L1. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0927-T
- Neuzillet, Y., & Leuret, T. (2010). [Bladder tumour treatment: the real BCG definitive contra-indications]. *Progrès En Urologie : Journal de l'Association Française D'urologie et de La Société Française D'urologie*, 20 Suppl 1, S41–5. doi:10.1016/S1166-7087(10)70025-7
- Neuzillet, Y., Paoletti, X., Ouerhani, S., Mongiat-Artus, P., Soliman, H., de The, H., ... Radvanyi, F. (2012). A meta-analysis of the relationship between FGFR3 and TP53 mutations in bladder cancer. *PloS One*, 7(12), e48993. doi:10.1371/journal.pone.0048993
- Nishihara, H., Hwang, M., Kizaka-Kondoh, S., Eckmann, L., & Insel, P. a. (2004). Cyclic AMP promotes cAMP-responsive element-binding protein-dependent induction of cellular inhibitor of apoptosis protein-2 and suppresses apoptosis of colon cancer cells through ERK1/2 and p38 MAPK. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26176–26183. doi:10.1074/jbc.M313346200
- Olumi, A. F., Tsai, Y. C., Nichols, P. W., Skinner, D. G., Cain, D. R., Bender, L. I., & Jones, P. A. (1990). Allelic Loss of Chromosome 17p Distinguishes High Grade from Low Grade Transitional Cell Carcinomas of the Bladder. *Cell*, 61(4), 7081–7083.
- Onwuazor, O., Wen, X.-Y., Wang, D.-Y., Zhuang, L., Masih-Khan, E., & Stewart, A. K. (2003). Mutation, SNP, and isoform analysis of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) in 150 newly diagnosed multiple myeloma patients. *Blood*, 102(18), 773–774; author reply 774. doi:10.1182/blood-2003-03-0980
- Ornitz, D. M. (2005). FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytogfr*, 16(2), 205–213. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.02.003.FGF
- Ota, A., Zhang, J., Ping, P., Han, J., & Wang, Y. (2010). Specific Regulation of oncogenic p38 Activation by Hsp90-Cdc37 VChaperone Complex in

cardiomyocyte. *Changes*, 29(8), 997–1003.  
doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted

- Parker, B. C., Annala, M. J., Cogdell, D. E., Granberg, K. J., Sun, Y., Ji, P., ... Zhang, W. (2013). The tumorigenic FGFR3-TACC3 gene fusion escapes miR-99a regulation in glioblastoma, 1–11. doi:10.1172/JCI67144DS1
- Pasin, E., Josephson, D. Y., Mitra, A. P., Cote, R. J., & Stein, J. P. (2008). Superficial Bladder Cancer: An Update on Etiology , Molecular Development , Classification , and, 10(1), 31–43.
- Pedrosa, J. a, Kaimakliotis, H. Z., Monn, M. F., Cary, K. C., Masterson, T. a, Rice, K. R., ... Cheng, L. (2014). Critical analysis of the 2010 TNM classification in patients with lymph node-positive bladder cancer: Influence of lymph node disease burden. *Urologic Oncology*, 32(7), 1003–9. doi:10.1016/j.urolonc.2014.04.002
- Peters, K. G., Werner, S., Chen, G., & Williams, L. T. (1992). Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Development (Cambridge, England)*, 114, 233–243.
- Phillips, D. H., & Venitt, S. (2012). DNA and protein adducts in human tissues resulting from exposure to tobacco smoke. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 131(12), 2733–53. doi:10.1002/ijc.27827
- Powers, C. J., McLeskey, S. W., & Wellstein, a. (2000). Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-Related Cancer*, 7(2000), 165–197. doi:10.1677/erc.0.0070165
- Pymar, L. S., Platt, F. M., Askham, J. M., Morrison, E. E., & Knowles, M. a. (2008). Bladder tumour-derived somatic TSC1 missense mutations cause loss of function via distinct mechanisms. *Human Molecular Genetics*, 17(13), 2006–17. doi:10.1093/hmg/ddn098
- Qing, J., Du, X., Chen, Y., Chan, P., Li, H., Wu, P., ... Ashkenazi, A. (2009). Antibody-based targeting of FGFR3 in bladder carcinoma and t ( 4 ; 14 ) - positive multiple myeloma in mice, 119(5). doi:10.1172/JCI38017DS1
- Rauci, A., Laplantine, E., Mansukhani, A., & Basilico, C. (2004). Activation of the ERK1/2 and p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathways Mediates Fibroblast Growth Factor-induced Growth Arrest of Chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 1747–1756. doi:10.1074/jbc.M310384200
- Rebouissou, S., Bernard-Pierrot, I., de Reyniès, A., Lepage, M.-L., Krucker, C., Chapeaublanc, E., ... Radvanyi, F. (2014). EGFR as a potential therapeutic target for a subset of muscle-invasive bladder cancers presenting a basal-like phenotype. *Science Translational Medicine*, 6(244), 244ra91. doi:10.1126/scitranslmed.3008970

- Roberts, P. J., & Der, C. J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, *26*(22), 3291–310. doi:10.1038/sj.onc.1210422
- Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., & Huot, J. (1997). p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene*, *15*(18), 2169–77. doi:10.1038/sj.onc.1201380
- Saint-Jacques, N., Parker, L., Brown, P., & Dummer, T. J. (2014). Arsenic in drinking water and urinary tract cancers: a systematic review of 30 years of epidemiological evidence. *Environmental Health : A Global Access Science Source*, *13*(1), 44. doi:10.1186/1476-069X-13-44
- Schubbert, S., Shannon, K., & Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *7*(4), 295–308. doi:10.1038/nrc2109
- Sidransky, D., Eschenbach, A. V. O. N., Tsai, Y. C., Jones, P., Summerhayes, I. A. N., Marshall, F., ... Vogelstein, B. (1989). Identification of p53 Gene Mutations in Bladder Cancers and Urine Samples, 1–4.
- Singh, D., Chan, J. M., Zoppoli, P., Niola, F., Castano, A., Liu, E. M., ... Zagzag, D. (2013). Transforming Fusion of FGFR and TACC Genes in Human Glioblastoma, *337*(6099), 1231–1235. doi:10.1126/science.1220834.Transforming
- Sjödahl, G., Lauss, M., Lövgren, K., Chebil, G., Gudjonsson, S., Veerla, S., ... Höglund, M. (2012). A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *18*(12), 3377–86. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0077-T
- Stefanovic, V., Toncheva, D., Atanasova, S., & Polenakovic, M. (2006). Etiology of Balkan endemic nephropathy and associated urothelial cancer. *American Journal of Nephrology*, *26*(1), 1–11. doi:10.1159/000090705
- Su, N., Jin, M., & Chen, L. (2014). Role of FGF/FGFR signaling in skeletal development and homeostasis: learning from mouse models. *Bone Research*, *2*(April), 14003. doi:10.1038/boneres.2014.3
- Su, N., Sun, Q., Li, C., Lu, X., Qi, H., Chen, S., ... Chen, L. (2010). Gain-of-function mutation in FGFR3 in mice leads to decreased bone mass by affecting both osteoblastogenesis and osteoclastogenesis. *Human Molecular Genetics*, *19*(7), 1199–210. doi:10.1093/hmg/ddp590
- Su, N., Xu, X., Li, C., He, Q., Zhao, L., Li, C., ... Chen, L. (2010). Generation of Fgfr3 Conditional Knockout Mice, *6*(4), 327–332.
- Szarama, K. B., Stepanyan, R., Petralia, R. S., Gavara, N., Frolenkov, G. I., Kelley, M. W., & Chadwick, R. S. (2012). Fibroblast growth factor receptor 3 regulates

- microtubule formation and cell surface mechanical properties in the developing organ of Corti. *Bioarchitecture*, 2(6), 214–9. doi:10.4161/bioa.22332
- Tadlock, L., & Patel, T. (2001). Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling in transformed growth of a cholangiocarcinoma cell line. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 33(1), 43–51. doi:10.1053/jhep.2001.20676
- TCGA. (2014). Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*, 507(7492), 315–22. doi:10.1038/nature12965
- The Cancer Genome Atlas. (2014). Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*, 507(7492), 315–22. doi:10.1038/nature12965
- Thornton, T. M., Pedraza-alva, G., Deng, B., Wood, C. D., Clements, J. L., Sabio, G., ... Rincon, M. (2008). Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative Pathway for GSK3B Inactivation, 320(5876), 667–670. doi:10.1126/science.1156037.Phosphorylation
- Tomasetti, C., & Vogelstein, B. (2015). Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions, 347(6217).
- Tomlinson, D. C., Hurst, C. D., & Knowles, M. a. (2007). Knockdown by shRNA identifies S249C mutant FGFR3 as a potential therapeutic target in bladder cancer. *Oncogene*, 26(40), 5889–5899. doi:10.1038/sj.onc.1210399
- Tomlinson, D. C., L'Hôte, C. G., Kennedy, W., Pitt, E., & Knowles, M. a. (2005). Alternative splicing of fibroblast growth factor receptor 3 produces a secreted isoform that inhibits fibroblast growth factor-induced proliferation and is repressed in urothelial carcinoma cell lines. *Cancer Research*, 65(22), 10441–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1718
- Tsai, W., Aiba, I., Long, Y., Lin, H.-K., Feun, L., Savaraj, N., & Kuo, T. M. (2012). Activation of Ras/PI3K/ERK Pathway Induces c-Myc Stabilization to Upregulate Argininosuccinate Synthetase, Leading to Arginine Deiminase Resistance in Melanoma Cells. *Cancer Research*, 29(10), 997–1003. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted
- Turkson, J., Bowman, T., Adnane, J., Zhang, Y., Djeu, J. Y., Sekharam, M., ... Jove, R. (1999). Requirement for Ras/Rac1-mediated p38 and c-Jun N-terminal kinase signaling in Stat3 transcriptional activity induced by the Src oncoprotein. *Molecular and Cellular Biology*, 19(11), 7519–7528.
- Turner, N., Pearson, A., Sharpe, R., Lambros, M., Geyer, F., Lopez-Garcia, M. a., ... Ashworth, A. (2010). FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Research*, 70(5), 2085–2094. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3746
- Urosevic, J., Garcia-Albéniz, X., Planet, E., Real, S., Céspedes, M. V., Guiu, M., ... Gomis, R. R. (2014). Colon cancer cells colonize the lung from established liver

- metastases through p38 MAPK signalling and PTHLH. *Nature Cell Biology*, 16(7), 685–94. doi:10.1038/ncb2977
- Vallot, C., Stransky, N., Bernard-Pierrot, I., Hérault, A., Zucman-Rossi, J., Chapeaublanc, E., ... Radvanyi, F. (2011). A novel epigenetic phenotype associated with the most aggressive pathway of bladder tumor progression. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(1), 47–60. doi:10.1093/jnci/djq470
- Van Batavia, J., Yamany, T., Molotkov, A., Dan, H., Mansukhani, M., Batourina, E., ... Mendelsohn, C. (2014). Bladder cancers arise from distinct urothelial sub-populations. *Nature Cell Biology*, 16(10), 982–91, 1–5. doi:10.1038/ncb3038
- Van Rhijn, B. W. G., van Tilborg, A. a G., Lurkin, I., Bonaventure, J., de Vries, A., Thiery, J.-P., ... Radvanyi, F. (2002). Novel fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutations in bladder cancer previously identified in non-lethal skeletal disorders. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 10(12), 819–24. doi:10.1038/sj.ejhg.5200883
- Vivanco, I., & Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 2(7), 489–501. doi:10.1038/nrc839
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., & Kinzler, K. W. (2013). Cancer Genome Landscapes, 339(6127), 1546–1558. doi:10.1126/science.1235122.Cancer
- Wada, T., Berggren, P., Steineck, G., Adolfsson, J., Wijkstro, H., Hansson, J., ... Larsson, P. (2003). Bladder Neoplasms — Regions at Chromosome 9 with Putative Tumour Suppressor Genes, (5).
- Wagner, E. F., & Nebreda, A. R. (2009a). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews. Cancer*, 9(8), 537–49. doi:10.1038/nrc2694
- Wagner, E. F., & Nebreda, A. R. (2009b). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews. Cancer*, 9, 537–549. doi:10.1038/nrc2694
- Wang, J., Guo, Y., Chu, H., Guan, Y., Bi, J., & Wang, B. (2013). Multiple Functions of the RNA-Binding Protein HuR in Cancer Progression, Treatment Responses and Prognosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 10015–41. doi:10.3390/ijms140510015
- Wang, J., Mikse, O., Liao, R. G., Li, Y., Tan, L., Janne, P. a, ... Hammerman, P. S. (2014). Ligand-associated ERBB2/3 activation confers acquired resistance to FGFR inhibition in FGFR3-dependent cancer cells. *Oncogene*, (April), 1–11. doi:10.1038/onc.2014.161
- Wang, X., & Jiang, X. (2008). PTEN: a default gate-keeping tumor suppressor with a versatile tail. *Cell Research*, 18(8), 807–16. doi:10.1038/cr.2008.83

- Watson, I. R., Takahashi, K., Futreal, P. A., & Chin, L. (2013). Emerging patterns of somatic mutations in cancer. *Nature Reviews. Genetics*, *14*(10), 703–18. doi:10.1038/nrg3539
- Weidensdorfer, D., Stöhr, N., Baude, A., Lederer, M., Kohn, M., Schierhorn, A., ... Hüttelmaier, S. (2009). Control of c-myc mRNA stability by IGF2BP1-associated cytoplasmic RNPs. *Rna*, 104–115. doi:10.1261/rna.1175909.the
- Weidensdorfer, D., Stöhr, N., Baude, A., Lederer, M., Köhn, M., Schierhorn, A., ... Hüttelmaier, S. (2009). Control of c-myc mRNA stability by IGF2BP1-associated cytoplasmic RNPs. *RNA (New York, N.Y.)*, *15*, 104–115. doi:10.1261/rna.1175909
- Williams, S. V, Hurst, C. D., & Knowles, M. a. (2013). Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Human Molecular Genetics*, *22*(4), 795–803. doi:10.1093/hmg/dds486
- Winterhalter, C., Nicolle, R., Louis, a, To, C., Radvanyi, F., & Elati, M. (2014a). Pepper: cytoscape app for protein complex expansion using protein-protein interaction networks. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *30*(23), 3419–20. doi:10.1093/bioinformatics/btu517
- Winterhalter, C., Nicolle, R., Louis, a, To, C., Radvanyi, F., & Elati, M. (2014b). Pepper: cytoscape app for protein complex expansion using protein-protein interaction networks. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *30*(23), 3419–20. doi:10.1093/bioinformatics/btu517
- Witsch, E., Sela, M., & Yarden, Y. (2011). Roles for Growth Factors in Cancer Progression, *25*(2), 85–101. doi:10.1152/physiol.00045.2009.Roles
- Wong, E. S. M., Le Guezennec, X., Demidov, O. N., Marshall, N. T., Wang, S. T., Krishnamurthy, J., ... Bulavin, D. V. (2009). p38MAPK controls expression of multiple cell cycle inhibitors and islet proliferation with advancing age. *Developmental Cell*, *17*(1), 142–9. doi:10.1016/j.devcel.2009.05.009
- Wu, R., Connolly, D., Ngelangel, C., Bosch, F. X., Muñoz, N., & Cho, K. R. (2000). Somatic mutations of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) are uncommon in carcinomas of the uterine cervix. *Oncogene*, *19*, 5543–5546. doi:10.1038/sj.onc.1203934
- Wu, X.-R. (2005). Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nature Reviews. Cancer*, *5*(August), 713–725. doi:10.1038/nrc1697
- Wu, Y., Su, F., Kalyana-sundaram, S., Khazanov, N., Cao, X., Lonigro, R. J., ... Rhodes, D. R. (2013a). Identification of targetable FGFR gene Fusions in diverse Cancers, *3*(6), 636–647. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0050.Identification
- Wu, Y., Su, F., Kalyana-sundaram, S., Khazanov, N., Cao, X., Lonigro, R. J., ... Rhodes, D. R. (2013b). Identification of Targetable FGFR Gene Fusion in

Diverse Cancers, 3(6), 636–647. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0050. Identification

- Yaari, S., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Haklai, R., Rechavi, G., & Kloog, Y. (2005). Disruption of cooperation between Ras and MycN in human neuroblastoma cells promotes growth arrest. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(8), 4321–4330. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2071
- Yagasaki, F., Wakao, D., Yokoyama, Y., Uchida, Y., Murohashi, I., Kayano, H., ... Bessho, M. (2001). Advances in Brief Fusion of ETV6 to Fibroblast Growth Factor Receptor 3 in Peripheral T-Cell Lymphoma with a t ( 4 ; 12 )( p16 ; p13 ) Chromosomal Translocation 1. *Pathology*, 8371– 8374.
- Yamashita, A., Morioka, M., Kishi, H., Kimura, T., Yahara, Y., Okada, M., ... Tsumaki, N. (2014). Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes. *Nature*, 513(7519), 507–511. doi:10.1038/nature13775
- Yu, H., & Jove, R. (2004). The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nature Reviews. Cancer*, 4(2), 97–105. doi:10.1038/nrc1275
- Yuan, L., Liu, Z.-H., Lin, Z.-R., Xu, L.-H., Zhong, Q., & Zeng, M.-S. (2014). Recurrent FGFR3-TACC3 fusion gene in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biology & Therapy*, 15(12), 1613–21. doi:10.4161/15384047.2014.961874
- Zeegers, M. P. a, Kellen, E., Buntinx, F., & van den Brandt, P. a. (2004). The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. *World Journal of Urology*, 21(6), 392–401. doi:10.1007/s00345-003-0382-8
- Zingone, a, Cultraro, C. M., Shin, D.-M., Bean, C. M., Morse, H. C., Janz, S., & Kuehl, W. M. (2010). Ectopic expression of wild-type FGFR3 cooperates with MYC to accelerate development of B-cell lineage neoplasms. *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 24(6), 1171–1178. doi:10.1038/leu.2010.50



